

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

Programa de Pós-graduação em Química

Alana Evangelista Honório

Avaliação química e biológica de fungos endofíticos
associados às algas marinhas

Acanthophora spicifera, *Dichotomaria marginata* e
Sargassum vulgare.



Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena S. Silva

Co-orientador: Dr. Alan César Pilon

Araraquara

2018

Alana Evangelista Honório

Avaliação química e biológica de fungos endofíticos
associados às algas marinhas

Acanthophora spicifera, *Dichotomaria marginata* e
Sargassum vulgare.

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutora em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena S. Silva

Co-orientador: Dr. Alan César Pilon

Araraquara

2018

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome: Alana Evangelista Honório

Filiação: Manoel Augusto Honório e Margareth Martins Evangelista

Data de Nascimento: 25 de fevereiro de 1987

Naturalidade: São João da Boa Vista - SP

Nacionalidade: Brasileira

ENDEREÇO PROFISSIONAL

NuBBE – Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais.

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,

Instituto de Química de Araraquara

Rua Prof. Francisco Degni, n. 55 – Araraquara-SP,

CEP: 14081-970, SP - Brasil

Telefone: 16 3301-9600 (ramal 9793)

e-mail: lana_quim@yahoo.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2014 – 2018

Doutorado em Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Instituto de Química (Araraquara – SP).

2011 - 2013

Mestrado em Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Instituto de Química (Araraquara – SP).

2006 - 2010

Graduação em Licenciatura Química.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Instituto de Química (Araraquara – SP).

BOLSAS CONCEDIDAS

(1) Bolsista de Doutorado – CAPES (2014-2018)

Título do projeto: Avaliação química e biológica de fungos endofíticos associados as algas marinhas *Acanthophora spicifera*, *Dichotomaria marginata* e *Sargassum vulgare*.

Orientação: Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva

(2) Bolsista de Mestrado – CAPES (2011-2013)

Título do projeto: Prospecção química e biológica do fungo endofítico *Saccharicola* sp. isolado de *Eugenia jambolana* (Myrtaceae).

Orientação: Profa. Dra. Angela Regina Araujo

(3) Bolsista de Extensão – CNPQ (2009-2009)

Título do projeto: Síntese Eletroquímica de Nano partículas de Magnetita e Funcionalização com Polietilenoglicol para uso em Biomedicina, voltado principalmente para utilização em tratamento antitumoral.

Orientação: Prof. Dr. Miguel Jafellici

(4) Bolsista de Extensão – BAE (2007-2009)

Título do projeto: Prospecção química e biológica do fungo endofítico AM-01 isolado de *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae).

Orientação: Profa. Dra. Ângela Regina Araújo

(5) Bolsista de Extensão Centro de Ciências de Araraquara – BAE (2006-2007)

Título do projeto: Ciência Viva (programa de visitação ao Centro de Ciências de Araraquara de alunos de escolas públicas e privadas, comunidade em geral).

Elaboração de jogos didáticos.

Plantão de dúvidas (programa de tira-dúvidas destinado aos estudantes do Ensino Fundamental, Médio e de Cursos Pré-Vestibulares).

Ciência Vai à Escola (laboratório volante visitando as escolas com experimentos e recursos audiovisuais nas diferentes áreas da ciência).

Orientação: Prof. Dr. Luiz Antônio Andrade de Oliveira

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

(1). HONÓRIO, A.E.; GUBIANI, J. R.; CHAPLA, V.M.; ARAUJO, A. R.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J. **Saccharicola sp. um endófito de *Eugenia jambolana*, um prolífico produtor de metabólitos bioativos.** In: 36ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2013, Águas de Lindóia.

(2). ROMERO, J. H. S.; BONI, A. C; **HONORIO, A. E**; BOCANEGRA, C. H.; ZANON, D. A. V. Era uma vez em atomolândia: o lúdico para contextualizar o ensino de Química. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

(3). Oliveira, Camila M.; SILVA, G. H.; REGASINI, L. O.; ZANARDI, L. M.; **EVANGELISTA, A. H.**; Young, Maria C.M.; Bolzani, Vanderlan da S.; ARAUJO, A. R. Bioactive metabolites produced by *Penicillium* sp.1 and sp.2, two endophytes associated. Zeitschrift für Naturforschung. C, A Journal of Biosciences, v. 64, p. 824-830, 2009.

ORIENTAÇÕES E SUPERVISÕES:

Iniciação científica e Monografia de conclusão de curso

(1) Beatriz Barcelos Rodrigues, com o projeto intitulado: “Comparação do perfil químico e biológico do fungo endofítico *Hypoxylum monticulosum* associado as algas vermelhas *Acanthophora spicifera* e *Dichotomaria marginata*” no período de março de 2017 a dezembro de 2018.

Supervisão

(1) Supervisão do aluno de intercâmbio Christopher Albert, do programa IAESTE.

PRESEÇA EM WORKSHOP, PALESTRA, SIMPÓSIOS.

(1) Curso de Planejamento Experimental com o Prof. Roy Edward Bruns, UNESP-2014.

(2) “Desafios e Perspectivas da Ficologia Brasileira” Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto-2015.

(3) 1ª. Reunião (Workshop) com apresentação de Painel –CEPID, São Pedro - 2015.

(4) "Compostos heterocíclicos na Química medicinal: planejamentos, compostos em fase de desenvolvimento e medicamentos disponíveis comercialmente." Prof. Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Junior, 2015.

(5) 2ª. Reunião (Workshop) –CEPID, São Carlos – 2015.

(6) “Maxis Impact: Princípios e Aplicações de Espectrometria de Massas de Alta Resolução” WATERS-2015.

Estudo do metabolismo "in vivo" e "in vitro" de produtos naturais, UNESP-2016.

(7) 3ª. Reunião (Workshop) com apresentação de Painel –CEPID, São Pedro - 2017.

ATIVIDADES DIDÁTICAS E PEDAGÓGICAS

(1) Professora de Química no curso técnico de Química do programa PRONATEC da Instituição de Ensino UniFEOB, “Fundação de Ensino Octávio Bastos” 2013-2015.

(2) Professora de Química no Ensino Médio da escola SESI 2015-2017.

(3) Professora de Química no curso técnico de Farmácia do programa MÉDIOTEC da Instituição de Ensino UniFAE, 2018.

(4) Curso para Formação de Tutores para Ensino a Distância/ Semi-Presencial.

(5) Jornada Virtual de Educação a Distância - JOVAED 2015

Palestra: A utilização das redes sociais aplicadas à Educação.

Palestra: Acessibilidade na EaD.

DEMAIS ATIVIDADES ACADÊMICAS RELEVANTES

(1) Estágio docência na disciplina Preparação e caracterização de compostos orgânicos.

(2) Coordenadora do Laboratório de Química Orgânica – NuBBE III durante o período Janeiro 2015 à Janeiro 2016.

(3) Avaliadora de Painéis do CIC 2014

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos e amados pais Margareth e Manoel (*in memoriam*) por todo apoio, incentivo e amor. Vocês são meu alicerce.

A minha irmã Paula pela amizade e carinho e por sempre apoiar meus sonhos.

A minha orientadora Dulce pela amizade, respeito e ensinamentos.

A todos os meus amigos e pessoas que torcem por mim, meu eterno Obrigado.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Margareth e Manoel Augusto (*in memoriam*), por todo apoio, incentivo, amor e carinho. Por sempre acreditarem em mim e nos meus sonhos; por estarem sempre ao meu lado e me incentivar a seguir em frente; por nunca me deixarem desistir nos momentos difíceis e serem meus melhores amigos. Sem o apoio e a força de vocês não teria chego até aqui.

A minha irmã Paula por todo carinho, amizade, lealdade e cumplicidade. Por todas as coisas que superamos juntas e estarmos sempre unidas.

As minhas pimentinhas Manoela, Valentina e Cecília.

A minha prima Jennifer por toda amizade, companheirismo, e por todas as risadas que demos juntas.

A todas as pessoas das famílias Sperti, Brás e Caires por me acolher, apoiar e por todo carinho nos 10 anos de convivência maravilhosa que tivemos.

A minha querida orientadora Dulce, pelos ensinamentos, ética, postura social, confiança, amizade e carinho que compartilhou comigo nesses anos juntas. Por todo apoio e por sempre me acalmar e dar diferentes perspectivas. Por me deixar voar e por me segurar no chão quando necessário. Não podia ter escolhido uma orientadora melhor.

Aos amigos Igrayne e Iatã pela convivência, risadas, jantares, por me aguentarem nos piores momentos e por compartilharem dos melhores.

A minha querida aluna de IC Beatriz, por toda ajuda, bom astral e seu sorriso contagiante e por embarcar nas minhas ideias.

Aos professores do Instituto de Química pelos conhecimentos transmitidos, em especial ao querido professor Antônio Eduardo Mauro por todo carinho, apoio e presença durante todos esses 13 anos de IQ.

Aos queridos técnicos e funcionários do IQ, Lucineia, Silvia, Jú, João e Marquinhos e por todo apoio e ajuda. Em especial ao Nivaldo (Santa Claus), Albertinho (Peste), Bel e Cidinha por todo carinho e por todas as risadas e conversas que tivemos nesses anos. Conviver com vocês foi um enorme prazer.

A Camila Martins, Lisinéia Zanardi e Profa. Ângela por todo apoio e ensinamentos no início da minha trajetória.

Aos amigos dentro e fora do laboratório, Juzinha, Rebeca, Terezinha, Victor, Leonardo (Chucky), Gustavo, Laura, Vitor (Gota), Luis Paulo, Camila, Airton, Erika,

Vanessa, Toni, Lidi, Vânia e todos os colegas do NuBBE pela amizade, risadas, conversas e confraternizações, por sempre me incentivar, apoiar e principalmente me acalmar. É fácil trabalhar quando se tem pessoas como vocês ao lado.

Aos amigos de graduação que duram até hoje e que espero que dure para sempre, Nathalia, Carol, Susi, Lucy e Fernandinho por todas as risadas, alegria, brincadeiras, conversas e piadas e principalmente por mantermos essa amizade e estarmos sempre ao lado um do outro, mesmo com a distância que às vezes nos separa.

A querida Bia que me ouve, aconselha, incentiva e me motiva a ser uma pessoa melhor a cada dia.

Ao colégio Integral São João e a todos os professores e funcionários, em especial aos queridos Ana Claudia, Frank e Rodrigo por acreditarem em mim, por me incentivar e pelas oportunidades que me deram. Toda minha formação e conquistas agradeço eternamente a vocês.

Ao Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química – UNESP - Araraquara pela possibilidade de realização deste projeto.

Ao Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais – NuBBE, pelo aceite no grupo de pesquisa, pelo desenvolvimento deste trabalho e por ter sido cenário de mais uma etapa importante da minha vida.

A todos os funcionários da biblioteca que sempre foram muito solícitos, educados, sempre prontos para nos ajudar e auxiliar.

Aos professores membros da banca que gentilmente aceitaram o convite para avaliação desta dissertação.

Á CAPES pela bolsa concedida e a FAPESP e CNPQ pelo financiamento.

E, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada.

“O cientista não é o homem que fornece as
verdadeiras repostas; é quem faz as verdadeiras
perguntas”
(Claude Lévi-Strauss).

“A persistência é o menor caminho para o êxito”
(Charles Chapplin).

“All we need is just a little patience”
(Guns n’ Roses)

HONÓRIO, Alana Evangelista. **Avaliação química e biológica de fungos endofíticos associados às algas marinhas *Acanthophora spicifera*, *Dichotomaria marginata* e *Sargassum vulgare***. 2018. Tese de Doutorado em Química, Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

RESUMO

A química de produtos naturais é uma estratégia de grande sucesso na descoberta de compostos bioativos para o desenvolvimento de novos fármacos. Neste contexto destacam-se os estudos com plantas, micro-organismos, e mais recentemente organismos marinhos. Avanços recentes nos estudos com algas marinhas e de seus fungos associados, com destaque para os fungos endofíticos, revelaram bioatividades relevantes, como anti-inflamatória, antioxidante antimicrobiana e antitumoral, além de estruturas químicas diversificadas, incluindo compostos halogenados.

Este trabalho explorou o potencial químico e biológico dos endófitos associados às algas *A. spicifera*, *D. marginata* e *S. vulgare*, permitindo o isolamento de 40 linhagens fúngicas e a identificação de doze gêneros e espécies por taxonomia molecular e morfológica. Após isolados, preservados e cultivados no meio líquido extrato de Malte preparado com água do mar ou água ultra pura, foram obtidos os extratos brutos em acetato de etila, que foram avaliados quanto ao perfil químico por RMN de ¹H, CLAE-DAD, CG-EM e CL-EM, além de triagem biológica em ensaios antimicrobianos contra linhagens de bactérias super-resistentes e formadoras de biofilme, Doença de Chagas, Leishmaniose, bem como em ensaio anticolinesterásico, de inibição da atividade de protease de veneno de serpente e citotóxico frente as linhagens tumorais HCT-116 e MTT.

A análise química permitiu a identificação de 78 compostos por CG-EM e 26 por CL-EM. A avaliação biológica dos extratos brutos e frações semipurificadas mostrou alto percentual de amostras bioativas, incluindo algumas com potenciais acima dos padrões utilizados.

Após a prospecção inicial, linhagens de *Hypoxylon monticulosum* isoladas de *A. spicifera* (AS 09 MQ) e de *D. marginata* (DM 02 MQ), foram selecionadas para investigação de sua produção metabólica para verificação de possíveis interações entre hospedeiro e micro-organismos associados, bem como a descoberta de novos compostos. O cultivo das duas linhagens de *H. monticulosum*, em água ultrapura, levou ao isolamento de dois compostos majoritários para cada extrato, sendo Diidroesporotriolídeo (**S02**) comum aos dois extratos. Essa classe de compostos pertence à família das furofurandionas e são comumente relatadas para o gênero

Hypoxylon. Do extrato de DM 02 MQ foi isolada uma Ciclohexadiona (**S03**) inédita na literatura. Essas substâncias apresentaram atividade antimicrobiana contra diferentes linhagens de bactérias super-resistentes.

A linhagem de *Annulohypoxylon stygium* (AS 01 MQ) isolada da alga *A. spicifera* foi cultivada nos meios Líquido Czapek e Malte utilizando planejamento fatorial 2³ com 5 réplicas no ponto central, afim de avaliar como as condições de cultivo, variação de pH, tempo de crescimento e tipo de água afetam sinergicamente a produção em massa e a diversidade química de seus componentes. Os resultados obtidos para o cultivo em Malte mostrou que a variável água é o fator determinante para melhora do cultivo do endófito, enquanto para Czapek, a variável tempo representou o fator determinante. A análise química permitiu identificar 20 compostos por CG-EM. Esses dados confirmaram a expectativa de que as condições de cultivo podem influenciar a produção de metabólitos secundários, permitindo planejar e direcionar os experimentos de acordo com as respostas desejadas.

Os dados gerados nesse trabalho demonstraram a importância do estudo dos organismos marinhos, como os fungos endofíticos, contribuindo para o conhecimento da quimiodiversidade desses micro-organismos associados às algas *A. spicifera*, *D. marginata* e *S. vulgare*, ainda sub-explorada do ponto de vista químico, confirmando que estes são uma fonte prolífica de metabólitos novos, bioativos e de elevada quimiodiversidade.

Palavras-chave: micro-organismos marinhos, fungos endofíticos, algas marinhas, quimiometria, *Hypoxylon monticulosum*, *Annulohypoxylon stygium*.

ABSTRACT

The chemistry of natural products is a highly successful strategy in the discovery of bioactive compounds for the development of new drugs. In this context studies with plants, microorganisms and more recently marine organisms stand out. Recent advances in marine algae studies, along with studies on their associated fungi, with emphasis on endophytic fungi, disclosed relevant bioactivities such as anti-inflammatory, antimicrobial, antitumor and antioxidant, as well as strong chemodiversity, including halogenated compounds.

This work explored the chemical and biological potential of endophytes associated to marine algae *A. spicifera*, *D. marginata* and *S. vulgare* and led to the identification of twelve endophytic fungal strains by molecular and morphological taxonomy. After isolation, preservation and cultivation in Malte liquid medium prepared with sea water or ultra pure water, crude extracts were obtained in ethyl acetate, and were evaluated for their chemical profile by ¹H NMR, HPLC-DAD, GC-MS and LC-MS, in addition to biological screening against multi-resistant bacterial strains and biofilm-forming bacteria, against Chagas disease, Leishmaniasis, as well as anti-cholinesterase assay, inhibition of snake venom protease activity and cytotoxic activity against human colon adenocarcinoma (HCT-116).

Chemical analyses led to the identification of 78 compounds by GC-MS and 26 by LC-MS. Biological evaluation of crude extracts and fractions disclosed a high rate of bioactive samples, including some higher potentials than standard compounds.

After preliminary prospection, *Hypoxyton monticulosum* strains isolated from *A. spicifera* (AS 09 MQ) and *D. marginata* (DM 02 MQ) were selected for their metabolic production investigation and detection of possible host-microorganisms interactions as well as the discovery of new compounds. Cultivation of *H. monticulosum*, in ultrapure water, led to the isolation of two major compounds from each extract, with dihydroesporotriolide (SO2) as a common constituent in both extracts. This class of compounds belongs to the furofurandione family and are widely reported in genus *Hypoxyton*. From DM 02 MQ extract, a novel Cyclohexadione (SO3) was isolated. These substances showed antimicrobial activity against multi-resistant bacterial strains.

In addition, *Annulohypoxyton stygium* (AS 01 MQ) isolated from *A. spicifera* was selected for chemometric studies and was grown in Czapek and Malte liquid media using 2³ factorial design with 5 replicates at the central point in order to evaluate how the

culture conditions, pH variation, growth time and type of water might synergistically affect mass production yield and chemical diversity of its components. The results obtained for the Malte cultivation evidenced that the variable water is the determining factor for the improvement of the endophyte culture, whereas for Czapek, time was the determining factor variable. Their chemical analysis allowed the identification of 20 compounds by GC-MS.

These data confirm the expectation that the cultivation conditions can modify, increase or direct the production of secondary metabolites, and it is possible to plan and direct the experiments according to the desired responses.

The data generated in this study demonstrated the importance of marine organisms studies, such as endophytic fungi, and contributed to the knowledge of the chemodiversity of microorganisms associated with marine algae *A. spicifera*, *D. marginata* and *S. vulgare*, which are still underexplored, and confirm that they represent a prolific source of novel, bioactive and highly chemodiverse metabolites.

Key words: marine microorganisms, endophytic fungi, marine algae, chemometrics, *Hypoxylon monticulosum*, *Annulohypoxylon stygium*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número de publicações de compostos de origem marinha nos últimos anos.....	29
Figura 2: Área de aplicação dos compostos marinhos estudados até 2016.....	30
Figura 3: Exemplos de fármacos de origem marinha aprovados pelo FDA e suas fontes de origem.....	31
Figura 4: Produtos naturais de origem marinha / filo.....	33
Figura 5: Metabólitos secundários bioativos oriundos de algas marinhas.....	35
Figura 6: Algas em estudo (Espécies hospedeiras).....	36
Figura 7: Metabólitos isolados de algas pardas.....	37
Figura 8: Derivados oxigenados do desmosterol, presentes em extrato de <i>D. marginata</i>	39
Figura 9: Exemplos de metabólitos isolados de <i>A. spicifera</i>	40
Figura 10: Variação no número de publicações de novos produtos naturais de origem marinha por país de 2006-2011.....	42
Figura 11: Número de artigos publicados no Brasil sobre PN marinho, entre Janeiro de 2004 e Agosto de 2017.....	43
Figura 12: Número de compostos produzidos por fungos de origem marinha, por ano.....	44
Figura 13: A: Distribuição (por Filo) de compostos ativos contra MO resistentes. B: PN marinhos ativos contra MO resistentes aos antibióticos comerciais nos últimos 20 anos.....	46
Figura 14: Local de coleta das algas.....	55
Figura 15: Metodologia de esterilização, isolamento e purificação dos endófitos.....	56
Figura 16: Parte superior da placa de Petri, (B) Parte inferior, (C) Preservação em slants.....	57
Figura 17: Fungo associado à alga <i>S. vulgare</i>	57
Figura 18: Fungos associados à alga <i>D. marginata</i>	58
Figura 19: Fungos associados à alga <i>A. spicifera</i>	58
Figura 20: Série homóloga de hidrocarbonetos C8-C40.....	61
Figura 21: Biorreator (A) e estocagem do biorreator (B).....	65
Figura 22: Catálise da acetiltiocolina e reação de Ellman.....	65
Figura 23: Cromatograma ilustrando o decrescimento da atividade enzimática do ICER-AChEe na presença de inibidor padrão a 200 μmolL^{-1}	66

Figura 24: Divisão dos micélios cultivados em BDA para posterior repique em meio líquido.....	71
Figura 25: Fungos identificados e seus códigos de isolamento.....	75
Figura 26: Metodologia de estudo das linhagens isoladas.....	77
Figura 27: Análise por cromatografia em camada delgada comparativa dos extratos.....	79
Figura 28: <i>A. atroroseum</i> isolado de <i>D. marginata</i> em água do mar: A: Superfície e B: parte inferior do endófito.....	80
Figura 29: Espectro de RMN de ¹ H do extrato de <i>A. atroroseum</i> em água do mar (DMSO-d ₆ , 300 MHz).....	81
Figura 30: Cromatograma da análise por CLAE-DAD – fase reversa do extrato bruto de <i>A. atroroseum</i> em modo gradiente, com detecção em 254nm.....	82
Figura 31: Exemplos de metabolitos secundários bioativos isolados de <i>C. gloeosporioides</i>	83
Figura 32: <i>C. gloeosporioides</i> isolado de <i>D. marginata</i> em água do mar: A: Superfície e B: parte inferior do endófito.....	83
Figura 33: Cromatograma da análise por CLAE-DAD – fase reversa do extrato bruto de <i>C. gloeosporioides</i> em água do mar (modo gradiente, com detecção em 254nm).....	84
Figura 34: Exemplos de metabólitos secundários isolados de <i>F. Begoniae</i>	85
Figura 35: <i>F. begoniae</i> isolado de <i>A. spicifera</i> em água do mar: A: Superfície e B: parte inferior do endófito.....	85
Figura 36: Espectro de RMN de ¹ H do extrato de <i>F. begoniae</i> em água ultrapura (DMSO-d ₆ , 300 MHz).....	86
Figura 37: Cromatograma da análise por CLAE-DAD – fase reversa do extrato bruto de <i>F. begoniae</i> em água ultrapura (modo gradiente, com detecção em 254nm).....	87
Figura 38: <i>P. microspora</i> isolado de <i>D. marginata</i> em água do mar: A: Superfície e B: parte inferior do endófito.....	88
Figura 39: Espectro de RMN de ¹ H do extrato de <i>P. microspora</i> em água do mar (DMSO-d ₆ , 300 MHz).....	89
Figura 40: Cromatograma da análise por CLAE-DAD – fase reversa do extrato bruto de <i>P. microspora</i> em água do mar (modo gradiente, com detecção em 254nm).....	90
Figura 41: <i>X. coccophora</i> isolado de <i>A. spicifera</i> em água ultrapura (Superfície do endófito).....	91
Figura 42: Espectro de RMN de ¹ H do extrato de <i>X. coccophora</i> em água ultrapura (DMSO-d ₆ , 300 MHz).....	92

Figura 43: Cromatograma da análise por CLAE-DAD – fase reversa do extrato bruto de <i>X. coccophora</i> em água ultrapura (modo gradiente, com detecção em 254nm).....	93
Figura 44: Cultivo de <i>E. pallida</i> isolado da alga parda <i>S. vulgare</i> em meio BDA e água ultrapura: Superfície e parte inferior da placa de Petri contendo o endófito.....	94
Figura 45: Espectro de RMN de ¹ H do extrato bruto de <i>E. pallida</i> (DMSO- d ₆ , 300 MHz).....	95
Figura 46: Cromatograma da análise por CLAE-DAD – fase reversa do extrato bruto de <i>E. pallida</i> em modo gradiente, com detecção em 254nm.....	96
Figura 47: Perfil químico do extrato bruto de <i>E. pallida</i> por CG-EM.....	97
Figura 48: Compostos identificados por CG-EM no extrato de <i>E. pallida</i>	98
Figura 49: <i>R. neopustulans</i> isolado de <i>D. marginata</i> em água ultrapura: Superfície e parte inferior.....	99
Figura 50: Cromatograma da análise por CLAE-DAD – fase reversa do extrato bruto de <i>R. neopustulans</i> em água ultrapura (modo gradiente, com detecção em 254nm).....	100
Figura 51: Perfil do extrato bruto de <i>R. neopustulans</i> em CG-EM.....	101
Figura 52 A: Compostos identificados no extrato de <i>R. neopustulans</i>	102
Figura 52 B: Compostos identificados no extrato de <i>R. neopustulans</i>	103
Figura 53: <i>F. solani</i> isolado de <i>D. marginata</i> em água do mar: Superfície, Parte inferior, Superfície colorida pela mudança de temperatura.....	105
Figura 54: Espectro de RMN de ¹ H do extrato de <i>F. solani</i> isolado de <i>D. marginata</i> em água do mar (DMSO-d ₆ , 300MHz).....	106
Figura 55: Cromatograma da análise por CLAE-DAD – fase reversa do extrato bruto de <i>F. solani</i> em água do mar (modo gradiente, com detecção em 254nm).	107
Figura 56: Perfil do extrato bruto de <i>F. solani</i> em CG-EM.....	108
Figura 57: Compostos identificados no extrato de <i>F. solani</i>	109
Figura 58: Local onde as algas foram coletadas (muito próximas uma da outra).....	117
Figura 59: <i>D. terebinthifolii</i> isolado de <i>A. spicifera</i> em água MQ: Superfície.....	119
Figura 60: <i>D. terebinthifolii</i> isolado de A: <i>D. marginata</i> em água MQ; B: <i>D. marginata</i> em água Mar (Superfície e parte inferior do endófito).....	119
Figura 61: Espectro de RMN de ¹ H do extrato <i>D. terebinthifolii</i> isolado de <i>D. marginata</i> em água do Mar (DMSO-d ₆ , 300 MHz).....	120

Figura 62: Comparação entre os cromatogramas das análises por CLAE-DAD – fase reversa do extrato bruto de <i>D. terebinthifolii</i> (em modo gradiente, com detecção em 254nm).....	121
Figura 63: Perfil do extrato bruto de <i>D. terebinthifolii</i> em CG-EM.....	121
Figura 64: Compostos identificados no extrato de <i>D. terebinthifolii</i>	123
Figura 65: <i>A. stygium</i> isolado de A: <i>A. spicifera</i> em água ultrapura; B: <i>D. marginata</i> em água ultrapura (Superfície e parte inferior do endófito).....	125
Figura 67: Comparação entre os cromatogramas das análises por CLAE-DAD – fase reversa do extrato bruto de <i>A. stygium</i> (modo gradiente, com detecção em 254nm).....	127
Figura 68: Perfil do extrato bruto de <i>A. stygium</i> em CG-EM.....	128
Figura 69: Compostos identificados no extrato bruto de <i>A. stygium</i>	129
Figura 70: Cultivo de <i>H. monticulosum</i> isolado da alga vermelha <i>A. spicifera</i> em meio BDA em A: água ultrapura; B: água do mar (Superfície e parte inferior da placa de Petri contendo o endófito).....	131
Figura 71: Comparação dos espectros de RMN de ¹ H dos extratos de <i>H. monticulosum</i> isolado de <i>A. spicifera</i> em água do mar (A) e ultrapura (B) (DMSO- d ₆ , 300 MHz).....	132
Figura 72: Comparação dos espectros de RMN de ¹ H dos extratos de <i>H. monticulosum</i> isolado de <i>A. spicifera</i> em água do mar (A) e ultrapura (B) (DMSO- d ₆ , 300 MHz).....	133
Figura 73: Perfil do extrato bruto de <i>H. monticulosum</i> isolado de <i>A. spicifera</i> por CG-EM.....	134
Figura 74: Compostos identificados no extrato de <i>H. monticulosum</i> isolado de <i>A. spicifera</i>	135
Figura 75: Cultivo de <i>H. monticulosum</i> isolado de <i>D. marginata</i> em meio BDA. A: água ultrapura; B: água do mar (Superfície e parte inferior da placa de Petri contendo o endófito).....	137
Figura 76: Comparação dos RMN de ¹ H Extrato de <i>H. monticulosum</i> isolado de <i>D. marginata</i> em água ultrapura (A) e do Mar (B) (DMSO- d ₆ , 300 MHz).....	138
Figura 77: Cromatograma da análise por CLAE-DAD – fase reversa do extrato bruto de <i>H. monticulosum</i> isolado de <i>D. marginata</i> em modo gradiente, com detecção em 254nm.....	139
Figura 78: Perfil do extrato bruto de <i>H. monticulosum</i> isolado de <i>D. marginata</i> em CG-EM.....	139
Figura 79: Compostos identificados no extrato de <i>H. monticulosum</i> isolado de <i>D. marginata</i>	141
Figura 80: Atividade citotóxica dos extratos brutos dos fungos endofíticos em estudo contra linhagens de células tumorais HCT-116.....	142

Figura 81: Resultado dos ensaios anticolinesterásico realizado com os extratos brutos.....	143
Figura 82: Atividade antimicrobiana dos extratos brutos contra linhagens bacterianas.....	144
Figura 83 A: Quantidade de biofilme da <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984 depois de tratado com os extratos brutos AS 07 MQ B, AS 04 MQ e DM 06 M2 MQ a 512 µg/mL.....	145
Figura 83 B: Quantidade de biofilme da <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984 depois de tratado com os extratos DM 03 M1, AS 06 M2 MQ e DM 02 M1 MQ A a 512 µg/mL.....	146
Figura 83 C: Quantidade de biofilme da <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984 depois de tratado com os extratos AS 05/ AS 09 MQ a 512 µg/mL.....	147
Figura 85: Comparação dos espectros de RMN de ¹ H do extrato de <i>H. monticulosum</i> isolado de <i>A. spicifera</i> e <i>D. marginata</i> (DMSO-d ₆ , 300MHz).....	152
Figura 86: Ampliações dos sinais de RMN de ¹ H.....	153
Figura 87: Comparação dos resultados para atividade Antitumoral entre os extratos de <i>H. monticulosum</i>	154
Figura 88: Espectro de RMN de ¹ H da Substância <u>2</u> (DMSO- d ₆ , 600 MHz).....	159
Figura 89: Espectro de DEPT da Substância <u>2</u> (DMSO- d ₆ , 150 MHz).....	160
Figura 90: Espectro de HSQC da Substância <u>2</u> (DMSO- d ₆ , 150 MHz).....	161
Figura 91: Espectro de HMBC da Substância <u>2</u> (DMSO- d ₆ , 150 MHz).....	162
Figura 92: Espectro de TOCSY 1D da Substância <u>2</u> (DMSO- d ₆).....	163
Figura 93: Substância <u>2</u> e as principais correlações em HMBC.....	164
Figura 94: Cromatograma substância <u>2</u> em gradiente exploratório, modo analítico (254nm).....	165
Figura 95: Espectro de UV da substância <u>2</u>	165
Figura 96 A: Espectro de Massas de baixa resolução da substância <u>2</u> , em modo negativo.....	167
Figura 96B: Espectro de Massas de baixa resolução da substância <u>2</u> , em modo positivo.....	167
Figura 97: Espectro de RMN de ¹ H da Substância <u>3</u> (DMSO- d ₆ , 600 MHz).....	169
Figura 98: Espectro de ¹³ C da Substância <u>3</u> (DMSO- d ₆ , 150 MHz).....	170
Figura 99: Espectro de HSQC da Substância <u>3</u> (DMSO- d ₆ , 150 MHz).....	171
Figura 100: Espectro de HMBC da Substância <u>3</u> (DMSO- d ₆ , 150 MHz).....	172
Figura 101: Estrutura parcial A da substância <u>3</u>	173
Figura 102: Substância <u>3</u> e as principais correlações em HMBC.....	174

Figura 103: Espectro de UV da substância 3	174
Figura 104 A: Espectros de NOESY 1D da substância 3 (irradiação de H-5, H-9 e H-6).....	176
Figura 104 B: Espectros de NOESY 1D da substância 3 (irradiação de H-11, H-8, H-5 e H-2).....	177
Figura 105: Espectro de Massas de baixa resolução da substância 3 , em modo negativo.....	178
Figura 106: Curva de crescimento microbiano teórico.....	179
Figura 107 A: Análise por CLAE-EM dos extratos obtidos com os experimentos para o meio de cultivo Malte (Exp. 01 e Exp. 02).....	190
Figura 107 B: Análise por CLAE-EM dos extratos obtidos com os experimentos para o meio de cultivo Malte (Exp. 03 e Exp. 04).....	191
Figura 107 C: Análise por CLAE-EM dos extratos obtidos com os experimentos para o meio de cultivo Malte (Exp. 05 e Exp. 06).....	192
Figura 107 D: Análise por CLAE-EM dos extratos obtidos com os experimentos para o meio de cultivo Malte (Exp. 07 e Exp. 08).....	193
Figura 107 E: Análise por CLAE-EM dos extratos obtidos com os experimentos para o meio de cultivo Malte (Exp. 09).....	194
Figura 108 A: Análise por CLAE-EM dos extratos obtidos com os experimentos para o meio de cultivo CZAPEK (Exp.01 e Exp.02).....	195
Figura 108 B: Análise por CLAE-EM dos extratos obtidos com os experimentos para o meio de cultivo CZAPEK (Exp.03 e Exp.04).....	196
Figura 108 C: Análise por CLAE-EM dos extratos obtidos com os experimentos para o meio de cultivo CZAPEK (Exp.05 e Exp.06).....	197
Figura 108 D: Análise por CLAE-EM dos extratos obtidos com os experimentos para o meio de cultivo CZAPEK (Exp.07 e Exp.08).....	198
Figura 108 E: Análise por CLAE-EM dos extratos obtidos com os experimentos para o meio de cultivo CZAPEK (Exp.09).....	199
Figura 109: Vista superior e inferior das placas de cultivo da linhagem AS-01: Variação do aspecto do micélio nas placas de PDA com variação do tipo de água.	201
Figura 110: Variação do aspecto do micélio e na coloração do meio de cultivo Malte ao alterar o tipo de Água.....	202
Figura 111: Variação da coloração dos extratos ao alterar o tipo de água.....	202
Figura 112: Variação da coloração dos extratos ao alterar o pH.....	202
Figura 113: Variação da coloração dos extratos ao alterar o meio de cultivo.....	203
Figura 114: Respostas escolhidas para análise do planejamento.....	203

Figura 115: Gráfico de Pareto para a resposta Massa, mostrando as variáveis da regressão em ordem de importância para o modelo.....	208
Figura 116: Superfície de resposta e gráfico plano para a resposta Massa (mg) em relação às variáveis pH, tempo de cultivo e tipo de água utilizadas neste estudo.....	211
Figura 117: Resumo dos resultados obtidos nos experimentos com Malte.....	212
Figura 118: Gráfico de Pareto para a resposta Compostos polares, mostrando as variáveis da regressão em ordem de importância para o modelo.....	215
Figura 119: Superfície de resposta e gráfico plano para a resposta #Picos 1ª Metade (Polares) em relação às variáveis em estudo.....	217
Figura 120: Gráfico de Pareto para a resposta compostos apolares, mostrando as variáveis da regressão em ordem de importância para o modelo.....	218
Figura 121: Superfície de resposta e gráfico plano para a resposta #Picos 2ª Metade (Apolares) em relação às variáveis em estudo.....	220
Figura 122: Resumo dos resultados obtidos nos experimentos com Czapek.....	221
Figura 123: Perfil do extrato Czapek Mar em CG-EM.....	223
Figura 124: Compostos identificados no extrato Czapek Mar por desreplicação.	224
Figura 125: Perfil do extrato Malte torneira em CG-EM.....	225
Figura 126: Compostos identificados no extrato Malte Torneira por desreplicação.....	226

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produtos naturais de origem marinha aprovados para uso terapêutico ou em fase de avaliação clínica.....	32-33
Tabela 2: PNM com propriedade anti-infecciosas aprovados pela FDA e pela UE.....	46
Tabela 3: Massas dos extratos brutos obtidas nos experimentos de escala reduzida.....	78
Tabela 4: Compostos propostos pelo programa GC-MS Data Analysis.....	94
Tabela 5: Compostos propostos pelo GC-MS Data Analysis para <i>R. neopustulans</i>	102
Tabela 6: Compostos propostos pelo GC-MS Data Analysis para <i>F. solani</i>	108
Tabela 7: Compostos identificados no extrato DM 08 Mar B por CLAE-EM.....	110-116

Tabela 8: Compostos propostos pelo GC-MS Data Analysis para <i>D. terebinthifolii</i>	122
Tabela 9: Compostos propostos pelo GC-MS Data Analysis para <i>A. stygium</i>	128
Tabela 10: Compostos propostos pelo GC-MS Data Analysis para <i>H. monticulosum</i>	134
Tabela 11: Compostos propostos pelo GC-MS Data Analysis para <i>H. monticulosum</i>	140
Tabela 12: Capacidade de erradicação do biofilme formado por <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984.....	145
Tabela 13: % de inibição crescimento do <i>Tripanossoma cruzi</i> - 20ug/mL.....	147
Tabela 14: % de inibição do crescimento de <i>Leishmania infantum</i> - 20ug/mL.....	149
Tabela 15: Resultados dos ensaios com os extratos selecionados.....	149-150
Tabela 16: Variação na produção de extrato bruto do fungo <i>H. monticulosum</i>	151
Tabela 17: Dados de RMN de ¹ H (600 MHz) e ¹³ C (150 MHz) da substância 2 em DMSO-d ₆	154
Tabela 18: Comparação dos resultados para atividade Anticolinesterásica entre os extratos de <i>H. monticulosum</i>	164
Tabela 19: Dados de RMN de ¹ H (600 MHz) e ¹³ C (150 MHz) da substância 3 em DMSO-d ₆	173
Tabela 20: Correlações observadas através do experimento de Noesy 1D.....	175
Tabela 21: Variáveis escolhidas para realização do planejamento.....	183
Tabela 22: Planejamento realizado para os meios de cultivo líquidos.....	186
Tabela 23: Codificação dos níveis.....	188
Tabela 24: Configuração dos experimentos com as variáveis codificadas.....	188
Tabela 25: Massas dos extratos brutos obtidos do Planejamento experimental realizado com a linhagem do fungo endofítico AS-01.....	189
Tabela 26: Porcentagem de inibição das enzimas ICER-AChE _{ee} e ICER-AChE _{hu} dos extratos do planejamento.....	200
Tabela 27: Valores das respostas obtidas após realização dos experimentos com Malte.....	207
Tabela 28: Valores das respostas obtidas após realização dos experimentos com Czapek.....	214
Tabela 29: Compostos propostos pelo GC-MS Data Analysis a partir da análise por GC-MS do extrato Czapek Mar do fungo <i>A. stygium</i>	223
Tabela 30: Compostos propostos pelo GC-MS Data Analysis para extrato Malte torneira.....	225

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Equação de Van Den Dool e Kratz.....	61
Equação 2: Equação de percentuais de inibição da atividade da enzima na presença do inibidor (A_i) com a área da atividade da enzima na ausência de inibidor (A_0).....	66
Equação 3: Interação entre as variáveis.....	205
Equação 4: Soma do quadrado dos efeitos	205

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1: Obtenção e triagem química e biológica dos extratos brutos obtidos.....	74
Fluxograma 2: Fracionamento do extrato AS 09 MQ por CC (fase reversa C-18) e obtenção das substâncias 1 e 2	156
Fluxograma 3: Fracionamento do extrato DM 02 MQ por CC (fase reversa C-18) e obtenção das substâncias 2 e 3	157
Fluxograma 4: Metodologia de obtenção dos extratos brutos do Planejamento experimental realizado com o fungo AS-01.....	187

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AchE – Enzima acetilcolinesterase

AcOEt - Acetato de etila

AS - *Acanthophora spicifera*

MeOH – Metanol

BDA – Batata-dextrose-ágar

CC – Cromatografia em coluna

CCDC – Cromatografia em camada delgada comparativa

C18 - Sílica gel de fase reversa tipo octadecil silano

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-DAD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos

CIM- Concentração Inibitória Mínima

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CPQBA - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas

DEPT – Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

DM – *Dichotomaria marginata*

DMSO-d6 – Dimetilsulfóxido Deuterado

d – Dupleto

dd – Duplo - dupleto

ddd – Duplo – duplo – dupleto

dt – Duplo-tripleto

EM – Espectrometria de Massas

E. jambolana– *Eugenia jambolana*

Ejc – *Eugenia jambolana* caule

Extr- extrato bruto

Fr – Fração

δ – Deslocamento químico

gCOSY – Gradient Correlated Spectroscopy

gHMBC - Gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlation

gHMQC - Gradient Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

Hex – Hexano

IC50 – Concentração Inibitória

IQAr – Instituto de Química de Araraquara

IV – Infravermelho

J – Constante de Acoplamento

m – Multiplete

MHz - Megahertz

min. – Minutos

MTT - sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium

m/z – Relação massa-carga

NaClO – Hipoclorito de sódio

nm – Nanômetro

NOESY 1D – Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy em uma dimensões

NuBBE – Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais

pág. - Página

ppm – Parte por milhão

q – Quarteto

RMN de ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN de ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

s – Simpleto

sl – Simpleto largo

SV – *Sargassum vulgare*

Subst- Substância

t – Tripleto

TMS – Tetrametilsilano

UV – Ultravioleta

v/v – Volume/volume

λ – Comprimento de onda

μm – Micrometro



Sumário

INTRODUÇÃO.....	31
1.0 Produtos Naturais Marinhos como Fontes de Substâncias Bioativas	31
1.1 Algas como fonte de Produtos Bioativos	37
1.2 Micro-organismos Marinhos	43
1.3 Ensaio biológicos	46
1.4 Desreplicação	51
1.5 OSMAC	52
1.6 Quimiometria e Planejamento Experimental.....	52
2. OBJETIVOS.....	55
Objetivos Gerais	55
Objetivos Específicos	55
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
3.1 Seleção e coleta das espécies vegetais	57
3.2 Obtenção e cultivo do endófito	57
3.3 Perfil Químico e Biológico em escala reduzida.....	61
3.3.1 Perfil Químico (instrumentos e técnicas)	61
3.3.2 Perfil Biológico	64
3.3.2.1 Atividade Antibiótica contra linhagens bacterianas resistentes.....	64
3.3.2.2 Ensaio Anticolinesterásico.....	67
3.3.2.3 Ensaio de citotoxicidade.....	69
3.3.2.4 Ensaio Leishmanicida.....	69
3.3.2.4 Ensaio Tripanocida	70
3.3.2.5 Triagem de inibidores de enzimas serino-proteases envolvidas em diferentes etiologias.	71
3.4 Cultivo dos fungos endofíticos em escala reduzida e obtenção dos extratos brutos.	74
3.4.1 Metodologia utilizada para realização dos cultivos:.....	74
3.4.2 Identificação dos fungos endofíticos	74
3.4.3 Escolha do meio de cultivo.....	79
3.4.4 Escolha das linhagens dos fungos endofíticos.	79
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
CAPÍTULO 1. Avaliação química dos extratos brutos	81
4.1 Análise química dos extratos brutos	81

4.1.1 Quantidade dos extratos brutos produzidos	81
4.1.2 Perfil Químico por CCDC dos extratos brutos	82
4.2 Análise do perfil químico dos endófitos.....	82
4.2.1 Análise química do endófito <i>Annulohyphoxylon atroroseum</i>	83
4.2.2 Análise química do endófito <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	86
4.2.3 Análise química do endófito <i>Fusarium begoniae</i>	88
4.2.4 Análise química do endófito <i>Pestalotiopsis microspora</i>	91
4.2.5 Análise química do endófito <i>Xylaria coccophora</i>	94
4.2.6 Análise química do endófito <i>Entonoema pallida</i>	97
4.2.7 Análise química do endófito <i>Roussoella neopustulans</i>	102
4.2.8 Análise química do endófito <i>Fusarium solani</i>	108
4.3 Comparação do perfil químico de fungos de mesmo gênero e espécie associados à algas distintas.	120
4.3.1 Análise química do endófito <i>Diaporthe terebinthifolii</i>	121
4.3.2 <i>Annulohyphoxylon stygium</i>	127
4.3.3 Análise química do endófito <i>Hypoxylum monticulosum</i>	133
CAPÍTULO 2. PERFIL BIOLÓGICO DOS EXTRATOS	145
4.4 Resultados dos ensaios biológicos testados	145
4.4.1 Atividade citotóxica	145
4.4.2 Ensaio Anticolinesterásico.....	146
4.4.3 Ensaio Antimicrobiano	146
4.4.4 Avaliação da atividade tripanocida.....	150
4.4.5 Avaliação da atividade leishmanicida	152
4.4.6 Avaliação das atividades antibiótica frente a <i>E. coli</i> , coagulação do sangue e inibição de veneno de cobra.	152
CAPÍTULO 3. Estudo Químico e Biológico de <i>Hypoxylum monticulosum</i>	154
4.5 Perfil Químico	154
4.5.1 Variação da massa dos extratos brutos.....	154
4.5.2 RMN de ¹ H dos extratos de <i>H. monticulosum</i>	154
4.6 Perfil Biológico	157
4.7 Cultivo em escala ampliada de <i>H. monticulosum</i> codificado AS 09 MQ (para o isolado de <i>A. spicifera</i>) e DM 02 MQ (para o isolado de <i>D. marginata</i>).	158

4.7.1 Crescimento em escala ampliada	158
4.7.2 Fracionamento do extrato AS 09 MQ.....	158
4.7.3 Fracionamento dos extratos de DM 02 MQ	158
4.8 Determinação Estrutural das Substâncias majoritárias	161
4.8.1 Determinação Estrutural da Substância 2	161
4.8.2 Determinação Estrutural da Substância 3	171
4.9 Atividade biológica das frações e substâncias isoladas	182
4.9.1 Resultado da atividade citotóxica.....	182
4.9.2 Resultado da atividade antimicrobiana	183
CAPÍTULO 4. Utilização de planejamento experimental no cultivo de <i>A. stygium</i>	185
4.10 Escolha das variáveis e respostas	185
4.10.1 Meio de Cultivo	186
4.10.2 Variável pH	187
4.10.3 Variável Tempo.....	187
4.10.4 Variável Tipo de Água	188
4.11 Cultivo do endófito e obtenção dos extratos brutos.....	189
4.12 RESULTADOS E DISCUSSÃO PLANEJAMENTO	190
4.12.1 Análise Química dos Extratos brutos Planejamento.....	192
4.12.2 Perfil Biológico dos extratos Planejamento.....	203
4.12.3 Variações do cultivo.	204
4.12.4 Influência dos efeitos nas respostas	206
4.12.5 Efeitos	207
4.12.6 Interações das variáveis selecionadas	207
4.12.7 Discussão dos efeitos sobre as respostas para experimentos com MALTE.	209
4.12.8 Discussão dos efeitos sobre as respostas para experimentos com CZAPEK.....	216
4.12.8.3 Interpretação dos resultados gerais:.....	225
4.13 Análise por CG-EM de extratos oriundos do planejamento	225
4.13.1 Identificação de metabólitos por Desreplicação utilizando CG-EM.....	226
4.13.2 Identificação de metabólitos por Desreplicação utilizando CG-EM.....	228
CONCLUSÃO	230
BIBLIOGRAFIA	233

ANEXO I Respostas para experimentos com MALTE	242
I) Efeito na Resposta Massa.....	242
II) Efeito na Resposta %Inibição AChEee	243
III) Efeito na Resposta %Inibição AChEhu	244
IV) Efeito na Resposta Número de picos no CLAE-EM.....	245
V) Efeito na Resposta Área dos picos observados por CLAE-EM.....	246
VI) Efeito na Resposta Área dos picos (Acima da média) observados por CLAE-EM.	247
VII) Efeito na Resposta Área dos picos (Abaixo da Média) no CLAE-EM.	248
VIII) Efeito na Resposta Número de picos na 1ª metade (Polares) CLAE-EM.	249
IX) Efeito na Resposta Número de picos na 2ª metade (Apolares) observados no CLAE-EM.	250
X) Efeito na Resposta Intensidade dos picos no CLAE-EM.....	251
XI) Efeito na Resposta Intensidade de picos (Abaixo da média) no CLAE-EM.	252
XII) Efeito na Resposta Intensidade dos picos (Acima da média) no CLAE-EM	253
ANEXO II Discussão dos efeitos sobre as respostas para experimentos com CZAPEK.....	254
I) Efeito na Resposta Massa.....	254
II) Efeito na Resposta %Inibição AChEee no CLAE-EM.....	255
III) Efeito na Resposta % Inibição de AChEhu no CLAE-EM.....	256
IV) Efeito na Resposta Número de picos observados no CLAE-EM.....	257
V) Efeito na Resposta Área dos picos observados por CLAE-EM.....	258
VI) Efeito na Resposta Área dos picos (Abaixo da Média) no CLAE-EM.	259
VII) Efeito na Resposta Área dos picos (Acima da média) observados por CLAE-EM.	260
VIII) Efeito na Resposta Número de picos na 1ª metade (Polares) CLAE-EM.	261
IX) Efeito na Resposta Número de picos na 2ª metade (Apolares) observados no CLAE-EM.	262
X) Efeito na Resposta Intensidade dos picos no CLAE-EM.....	263
XI) Efeito na Resposta Intensidade de picos (Abaixo da média) no CLAE-EM.	264
XII) Efeito na Resposta Intensidade dos picos (Acima da média) no CLAE-EM	266

INTRODUÇÃO

1.0 Produtos Naturais Marinhos como Fontes de Substâncias Bioativas

Estudos acerca da química de produtos naturais apresentam-se como uma das estratégias de maior sucesso para a descoberta de substâncias bioativas para o desenvolvimento de novos fármacos. Essa linha de pesquisa é uma das áreas mais tradicionais da Química no Brasil, principalmente devido à ampla biodiversidade existente em nosso país, aos grandes avanços obtidos ao longo dos séculos através da descoberta e a utilização de metabólitos secundários com importantes aplicações na medicina, agricultura, indústrias alimentícias entre outros (PUPO, M. T, et al. 2007).

Neste contexto destacam-se os estudos com plantas, micro-organismos, e mais recentemente organismos marinhos. Este ecossistema é um nicho ainda subexplorado de compostos com estruturas químicas diferenciadas, que são consideradas fontes potenciais para descoberta de novos fármacos (TORRES, V. R, et al. 2017).

O avanço em técnicas de mergulho ou prospecção marítima, juntamente com o desenvolvimento de novas tecnologias analíticas, espectroscopia e métodos de triagem de alto rendimento, contribuíram para um aumento no interesse em se estudar esse ambiente. Estudos envolvendo organismos marinhos e seus compostos bioativos tiveram maior destaque nos últimos trinta anos, especialmente no que se refere ao estudo do câncer (**Figura 1**), sendo que mais de 60% dos metabólitos descritos até o momento apresentam aplicação em áreas da Bioquímica, Farmacologia e Medicina (**Figura 2**) (TORRES, V. R, et al. 2017).

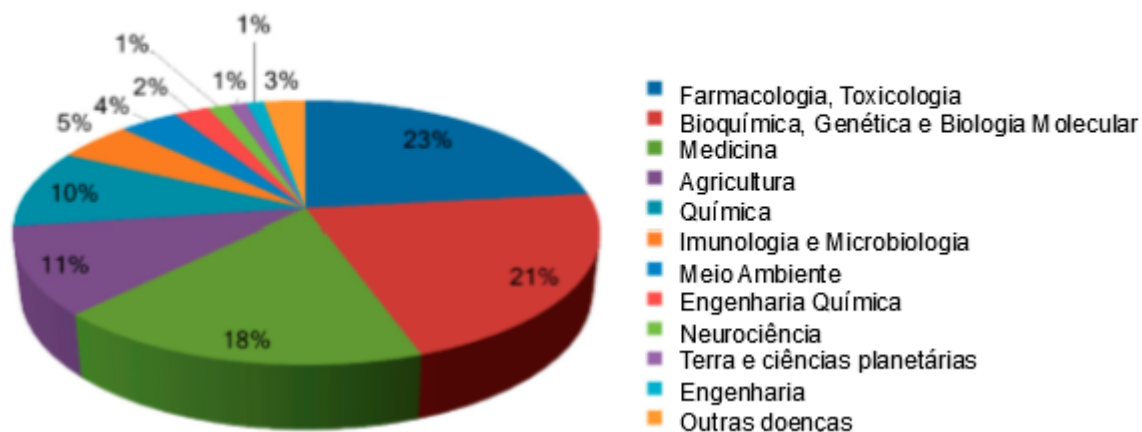
Figura 1: Número de publicações de compostos de origem marinha nos últimos anos.



FONTE: Adaptado de TORRES, V. R, et al. 2017.

Figura 2: Área de aplicação dos compostos marinhos estudados até 2016.

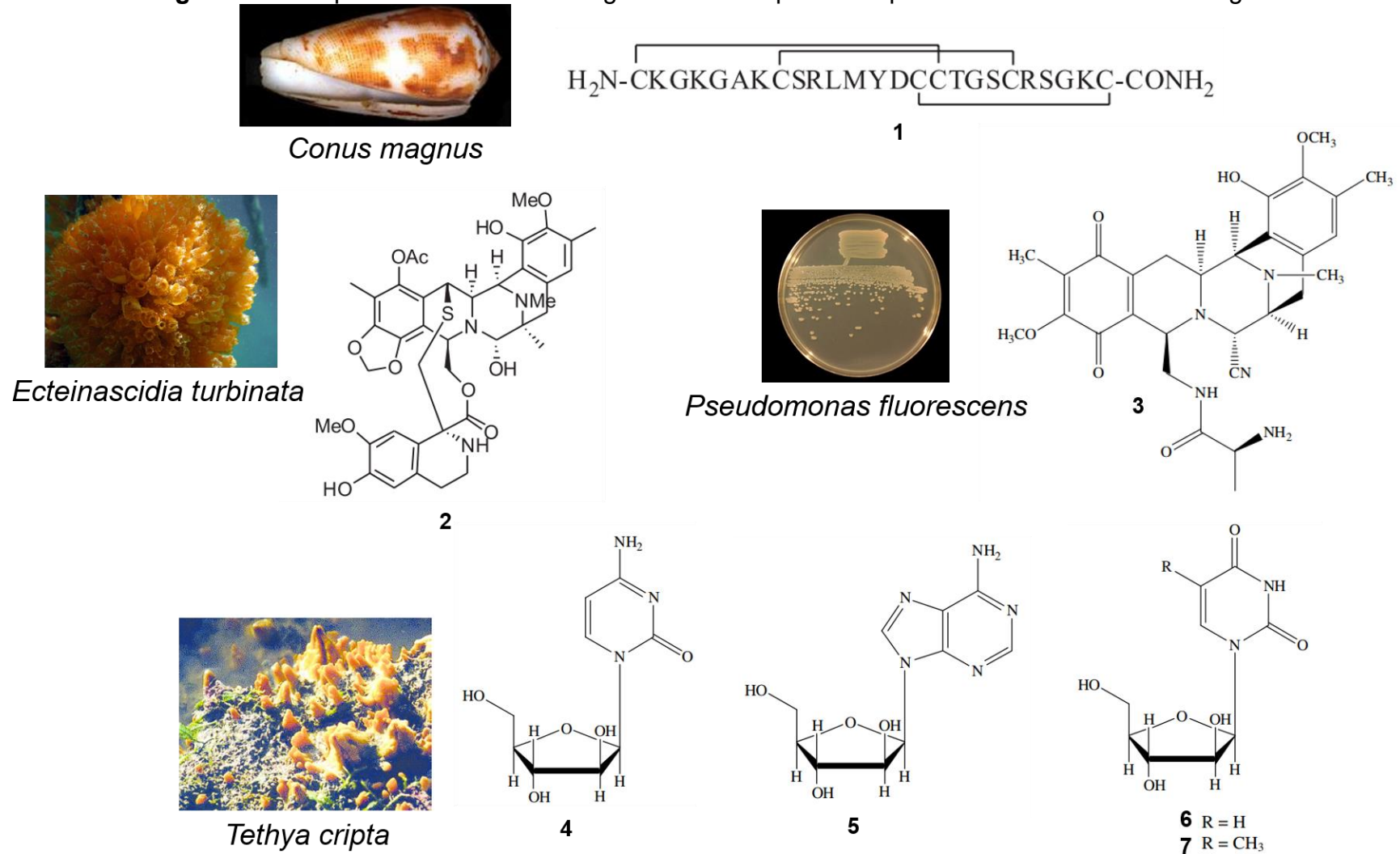
Compostos de origem marinha em estudo, por área



FONTE: Adaptado de TORRES, V. R, et al. 2017.

Nas últimas décadas, metabólitos secundários provenientes de organismos marinhos produziram um grande número de candidatos a fármacos. Apesar disso, apenas em 2004 foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration, EUA) o primeiro medicamento produzido diretamente a partir de um produto natural marinho. O peptídeo ziconotídeo, isolado do molusco *Conus magus*, é utilizado no tratamento de dores crônicas, sendo comercializado sob o nome de Prialt® (1). Este fato representa um marco histórico para os estudos com organismos marinhos. Poucos anos depois, em 2007, foi aprovado o antitumoral Ecteinascidina 743, um alcaloide tetraidroquinolínico isolado da ascídia *Ecteinascidia turbinata*, comercializado sob o nome de Yondelis® (2) (MOLINSKI, 2009). Além dos exemplos citados acima, nos quais o fármaco mantém a estrutura original do metabólito natural, atualmente existem cinco fármacos disponíveis no mercado que são produtos de síntese inspirados no esqueleto químico de produtos naturais marinhos. Como exemplos podemos citar a Ecteinascidina 743, produzida por semi-síntese a partir da cianosafracina B (3), um produto natural obtido da fermentação da bactéria *Pseudomonas fluorescens*. Já a citarabina ou Ara-C (4), comercialmente conhecida como Cytosar-U® ou Depocyt®, é utilizada no tratamento de câncer, enquanto a vidarabina ou Ara-A (5), comercializada como Vira-A®, é utilizada como antiviral. Ambas são derivados sintéticos dos nucleosídeos esponouridina (6) e espongotimidina (7), isolados da esponja caribenha *Tethya cripta* (MAYER et al., 2010). (GERWICK & MOORE, 2012) (Figura 3).

Figura 3: Exemplos de fármacos de origem marinha aprovados pelo FDA e suas fontes de origem.



Outras substâncias, derivadas direta ou indiretamente de metabólitos secundários, encontram-se em fase clínica de avaliação, conforme descrito na **Tabela 1**.

Tabela 1: Produtos naturais de origem marinha aprovados para uso terapêutico ou em fase de avaliação clínica.

Situação	Composto	Organismo Marinho	Atividade Biológica
Aprovado FDA	Trabectedina	Tunicato	Sarcoma de tecido mole e câncer de ovário
Aprovado FDA	Brentuximab vedotina	Molusco / Cianobactéria	Linfoma sistêmico
Aprovado FDA	Mesilato de eribulina	Esponja	Câncer de mama
Aprovado FDA	Ômega-3	Peixe / Microalga	Anti hipertrigliceridemia
Aprovado FDA	Ziconotídeo	Molusco	Dores neuropáticas
Aprovado FDA	Vidarabina (Ara-A)	Esponja	Antiviral
Aprovado FDA	Citarabina (Ara-C)	Esponja	Leucemia
FASE III	Plinabulina	Fungo	Câncer de pulmão, tumor cerebral
FASE III	Plitidepsina	Tunicato	Mieloma múltiplo, leucemia, linfoma
FASE III	Esqualamina e Lactato	Tubarão	Doenças vasculares
FASE III	Tetrodotoxina	Peixe bolha	Dores crônicas
FASE III	Glembatumumab vedotina	Molusco / Cianobactéria	Câncer de mama
FASE III	Lurbinectedina	Tunicato	Câncer de ovário, câncer de mama
FASE II	Depatuxizumab mafodotina	Molusco / Cianobactéria	Glioblastoma, tumores cerebrais pediátricos
FASE II	GTS-21 (DMXBA)	Minhoca	Esquizofrenia, Doença de Alzheimer e outros transtornos mentais.
FASE II	Denintuzumab mafodotina	Molusco / Cianobactéria	Câncer
FASE II	AGS-16C3F	Molusco / Cianobactéria	Carcinoma de células renais

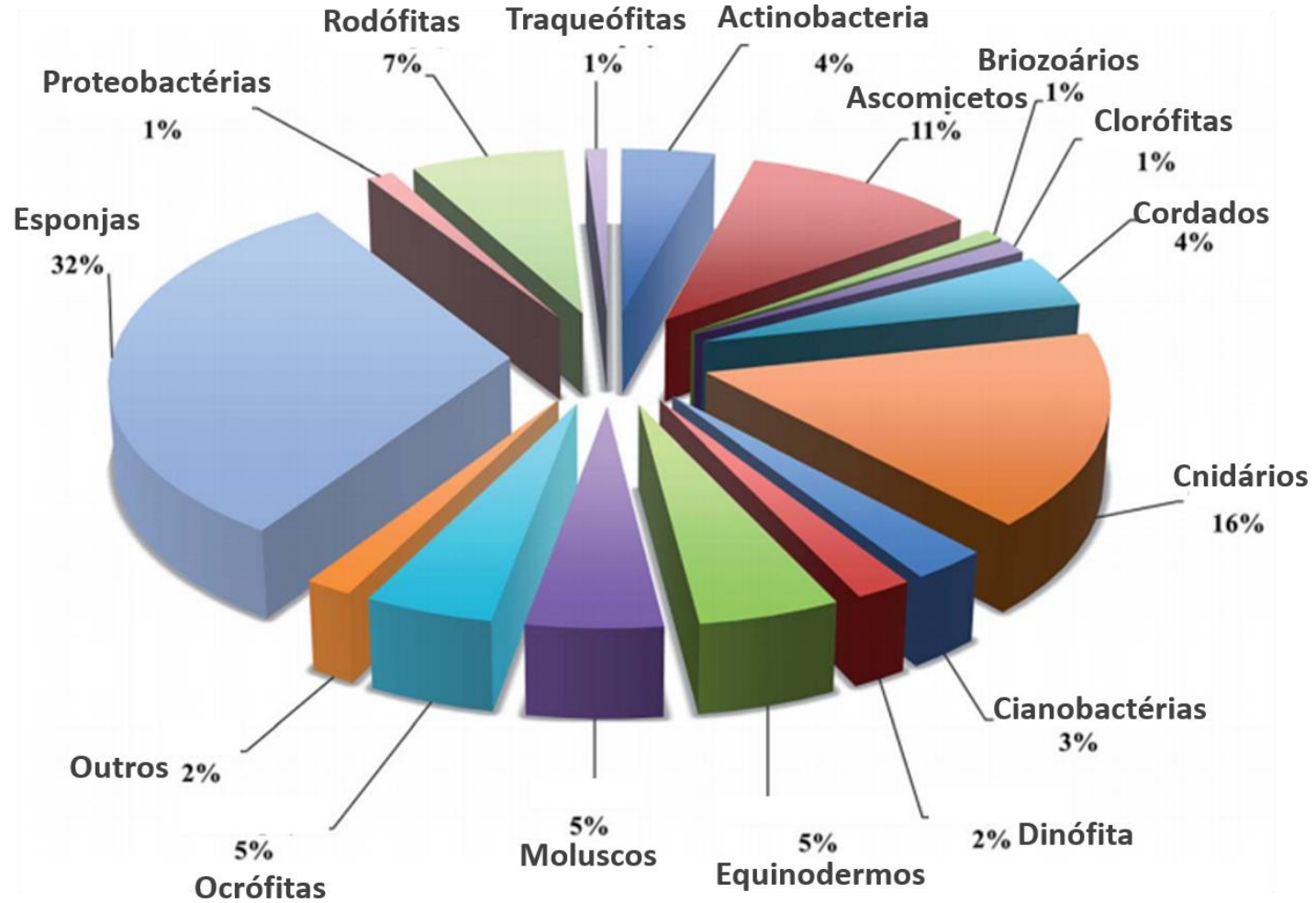
FASE II	Polatuzumab vedotina	Molusco / Cianobactéria	Linfoma, leucemia
FASE II	PM 184	Espunja	Tumores sólidos
FASE II	Tisotumab vedotina	Molusco / Cianobactéria	Diversos tipos de Câncer
FASE II	Enfortumab vedotina	Molusco / Cianobactéria	Câncer
FASE I	GSK 2857916	Molusco / Cianobactéria	Mieloma múltiplo
FASE I	ABBV-085	Molusco / Cianobactéria	Tumores sólidos
FASE I	ABBV-399	Molusco / Cianobactéria	Tumores sólidos
FASE I	ABBV-221	Molusco / Cianobactéria	Tumores sólidos
FASE I	ASG-67E	Molusco / Cianobactéria	Câncer
FASE I	ASG-15ME	Molusco / Cianobactéria	Câncer
FASE I	Marizomib (Salinosporamida A)	Bactéria	Câncer de pulmão, câncer de pâncreas

FONTE: Adaptado de <http://marinepharmacology.midwestern.edu/clinPipeline.htm>

(Acesso em Março/2018)

Em relação ao ambiente marinho tem destaque os estudos com esponjas, que apresentam as maiores quantidades de compostos descritos na literatura, incluindo o relato de novas substâncias bioativas (WANG, 2006). Embora haja descrição de estudos químicos e biológicos envolvendo algas marinhas, de acordo com o gráfico a seguir (**Figura 4**) (BLUNT et al. 2017), pode-se observar que esta fonte promissora de metabólitos secundários ainda é pouco explorada, sendo as algas vermelhas as que apresentam um maior número de publicações nos últimos anos.

Figura 4: Produtos naturais de origem marinha / filo



Fonte: Adaptado de BLUNT, et al.; 2017.

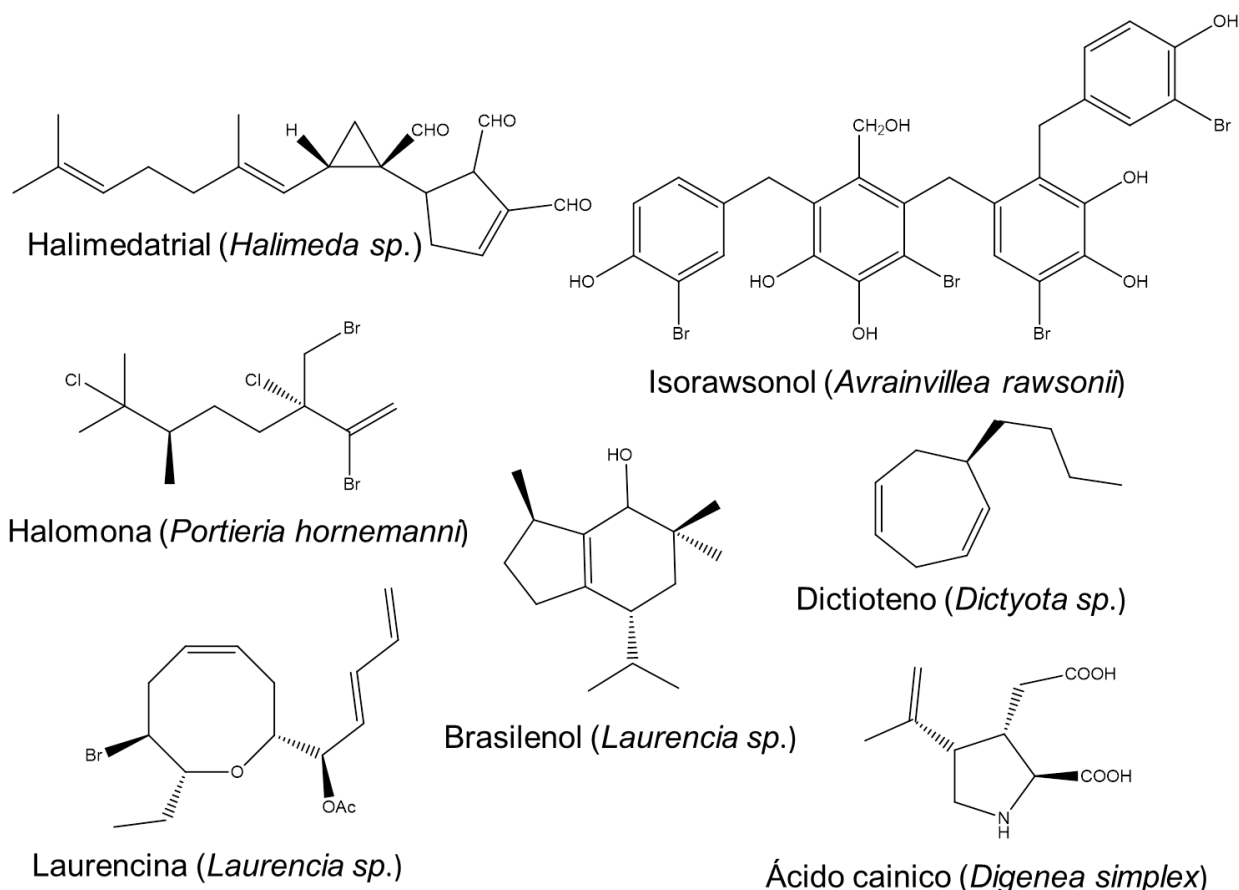
1.1 Algas como fonte de Produtos Bioativos

As algas estão entre os primeiros organismos marinhos a serem investigados por químicos de produtos naturais, na busca por substâncias bioativas com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos (FOLMER et al., 2010).

Dentre os metabólitos secundários isolados com maior frequência destacam-se: sesquiterpenos, policetídeos, esteróis, terpenóides, ácidos graxos, carotenoides, polissacarídeos, aminoácidos, peptídeos e proteínas (OLIVEIRA, A. L., 2013).

Os estudos com algas marinhas têm crescido nos últimos anos, juntamente com o estudo dos seus micro-organismos associados, motivado principalmente pelos resultados obtidos até o momento, que demonstraram relevantes bioatividades, como antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral, além de estruturas químicas extremamente diversificadas, incluindo compostos halogenados, como pode-se observar na **Figura 5**.

Figura 5: Metabólitos secundários bioativos oriundos de algas marinhas.



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA, A. L., 2013.

Do ponto de vista biológico, as macroalgas são algas multicelulares, autótrofas e fotossintetizantes. De acordo com o banco de dados AlgaeBase, é estimada a existência de 72.500 espécies de algas, agrupadas em Algas Verdes (Filo Chlorophyta), Pardas (Filo Phaeophyta) e as vermelhas (Filo Rhodophyta) (LIU et al., 2009).

Um dos fatores mais importantes no trabalho com micro-organismos de algas marinhas é a seleção da espécie hospedeira, pois além do estudo químico e biológico destas, há oportunidade de isolamento de linhagens de fungos associados de novos gêneros e/ou espécies, possibilitando um estudo mais aprofundado das interações existentes entre hospedeiro e micro-organismos associados, bem como a descoberta de novos compostos com diferentes estruturas e aplicações.

Com base no exposto, para a realização deste trabalho foram escolhidas as espécies *Acanthophora spicifera*, *Dichotomaria marginata* e *Sargassum vulgare* (**Figura 6**). As duas primeiras pertencem ao filo das algas vermelhas (Rhodophyta), enquanto a última é uma alga parda (Phaeophyta).

Figura 6: Algas em estudo (Espécies hospedeiras)



Sargassum vulgare

Dichotomaria marginata

Acanthophora spicifera

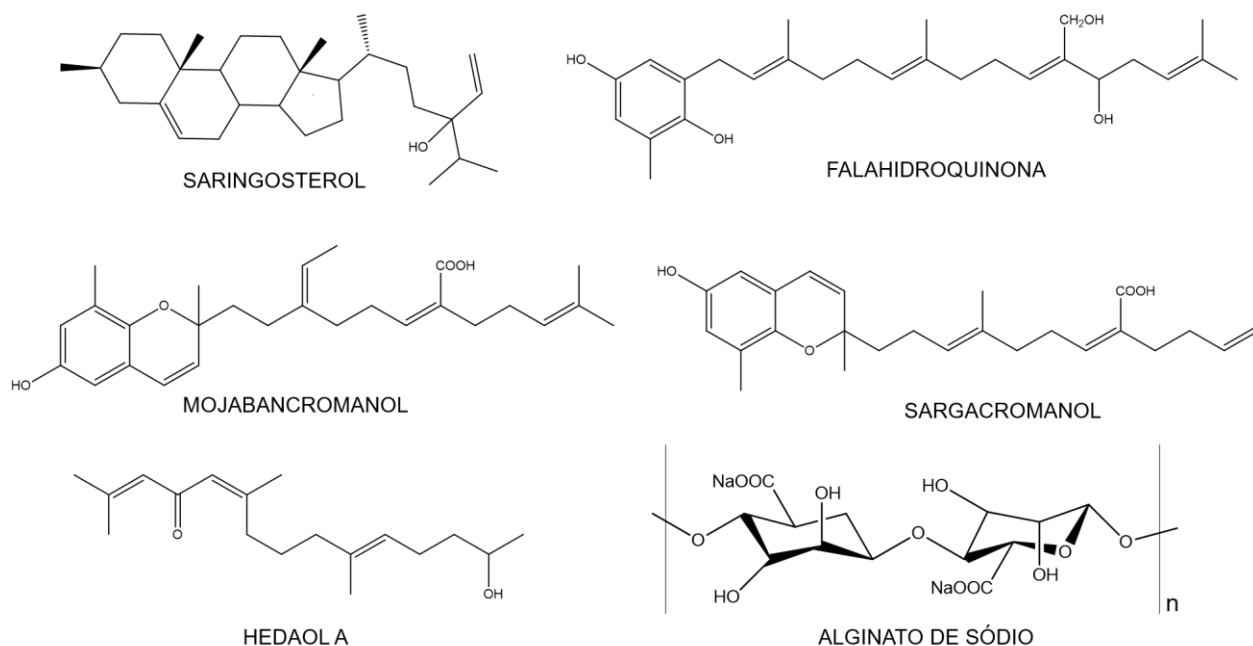
1.1.1 Algas Pardas

São as algas que apresentam tamanhos e diferenciação estrutural mais elaborado, aproximando-se das plantas vasculares. Estas algas formam grandes maciços que, quando ancorados fora da costa, oferecem abrigo para uma extensa diversidade de organismos (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996).

É frequentemente encontrada nas águas rasas do litoral tropical e subtropical, sendo uma espécie abundante em grande extensão da costa Brasileira (PAULA & OLIVEIRA FILHO, 1980) e o pigmento responsável pela coloração marrom é a fucoxantina.

Essas algas são conhecidas por suas diversas atividades biológicas, como antibiótica, citotóxica, anti-tuberculose, associadas a metabólitos secundários, de diversas classes como esteróides, quinonas e ácidos quinônicos, cromonas, terpenoides e alginatos, (LIU et al., 2009) como mostrado na **Figura 7**.

Figura 7: Metabólitos isolados de algas pardas.



Fonte: Elaboração própria.

1.1.1.1 Características químicas e biológicas da alga parda *Sargassum vulgare*.

A família de algas pardas Sargassaceae é constituída de 12 gêneros nos quais estão distribuídas cerca de 480 espécies.

Sargassum vulgare apresenta a filogenia abaixo.

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie
Phaeophyta	Phaeophyceae	Fucales	Sargassaceae	<i>Sargassum</i>	<i>vulgare</i>

Fonte: Elaboração própria.

Sargassum vulgare pertence à família de maior distribuição, sendo encontrada em regiões tropicais e subtropicais em quase todos os oceanos. Costuma se adaptar bem em costões rochosos, podendo atingir dezenas de centímetros de comprimento, e se assemelham a folhas, denominadas filóides por não possuírem sistema condutor. Uma

característica notória é a presença de vesículas esféricas ocas em seu talo que auxiliam na sua livre flutuação. Essa espécie é conhecida, principalmente, pela presença de alginatos que conferem diversas atividades biológicas a esta alga, como antitumoral, anticoagulante, antitrombótica, antioxidante e anti-inflamatória (PLOUGUERNÉ, E., et al., 2013).

1.1.2 Algas Vermelhas

Também conhecidas como Rodofíceas, são quase exclusivamente pluricelulares, marinhas e vivem fixadas em substratos no nível da mare baixa de águas quentes e tropicais (LEE, 1989) e o pigmento responsável pela coloração avermelhada é a ficoeritrina, uma proteína da família das ficobiliproteínas.

Essas algas são produtoras de substâncias halogenadas com diferentes esqueletos químicos, tais como terpenos, policetídeos, fenóis e hidrocarbonetos voláteis (CABRITA et al., 2010).

Diversas atividades biológicas estão relacionadas aos produtos do metabolismo secundários de algas vermelhas. Como exemplo, podemos citar o extrato aquoso de *Digenea simplex*, que foi usado como vermífugo durante séculos na medicina tradicional de países asiáticos. Estudos químicos posteriores resultaram no isolamento do ácido caínico, considerado o principal metabólito ativo deste extrato. Este aminoácido tem recebido grande atenção nos últimos anos, uma vez que lhe foram atribuídas propriedades neuroativas, culminando em sua utilização como reagente padrão em estudos de distúrbios neurofisiológicos como a doença de Alzheimer, Parkinson e epilepsia (SAKAI, et al., 2005; SMIT, 2004).

1.1.2.1 Características químicas e biológicas da alga vermelha *Dichotomaria marginata*.

Dichotomaria marginata apresenta a filogenia abaixo.

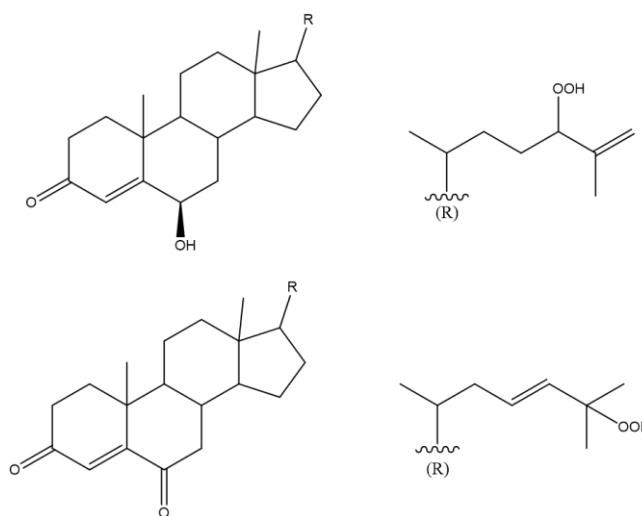
Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie
Rhodophyta	Florideophyceae	Nemaliales	Galaxauraceae	<i>Dichotomaria</i>	<i>marginata</i>

Fonte: Elaboração própria.

Existem poucos estudos químicos e biológicos para esta espécie, geralmente limitados a estudos taxonômicos.

Diversas atividades biológicas estão relacionadas aos produtos do metabolismo secundário das algas vermelhas. No que diz respeito a *D. marginata* as atividades mais relatadas são antitumoral e anti-inflamatória, reportadas a presença de derivados oxigenados do desmosterol (SHEU, 1997) conforme **Figura 8**.

Figura 8: Derivados oxigenados do desmosterol, presentes em extrato de *D. marginata*.



Fonte: Elaboração própria.

1.1.2.2 Características químicas e biológicas da alga vermelha *Acanthophora spicifera*.

A. spicifera é uma das espécies de algas vermelhas mais abundantes em regiões de recifes, e geralmente encontra-se fixada a substratos duros como rochas, regiões de mar calmo, raso e em bancos rochosos. Sua estrutura tem a forma de touceiras verticais de ramos espinhosos, com 1-2 mm de diâmetro (MUTHURAMAN, et al; 2014).

As algas dessa classe são eucariotas, com clorofila a e d, ficobilinas, ficoeritina, alofococianina e ficocianina, além de xantofilas e amido, denominado “amido das florídeas”, como substância de reserva.

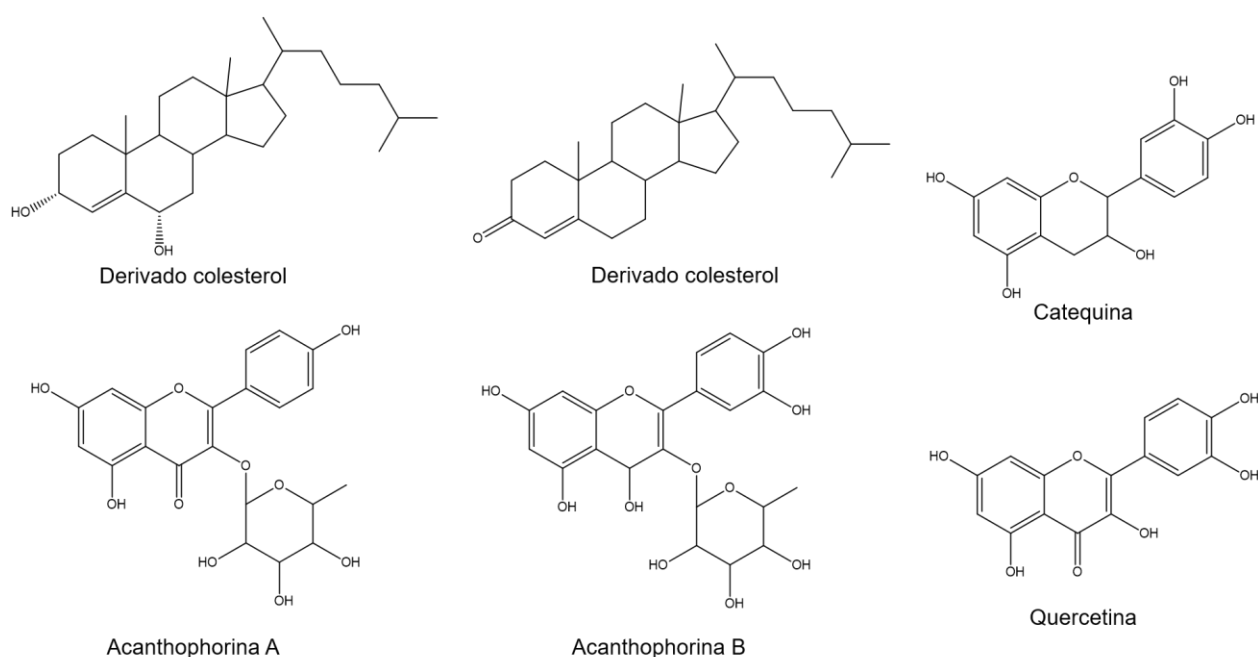
A. *spicifera* apresenta a filogenia abaixo.

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie
Rhodophyta	Rhodophyceae	Ceramiales	Rhodomelaceae	<i>Acanthophora</i>	<i>spicifera</i>

Fonte: Elaboração própria.

Trabalhos com *A. spicifera* mostraram substâncias com diferentes esqueletos químicos, tais como flavonoides, glicosídeos, ácidos graxos e esteroides (**Figura 9**), que podem estar associados às propriedades biológicas relatadas para esta espécie: antitumoral, antiviral, antibiótica, antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (MUTHURAMAN, et al; 2014). ZENG e colaboradores (2001), além do flavonóide tilirosídeo, descreveram a presença dos flavonóides quercetina e catequina e dos glicosídeos acanthophorina A (canferol 3-O- α -L-fucopiranosídeo) e acanthophorina B (quercetina 3-O- α -L-- fucopiranosídeo) no extrato etanólico de *A. spicifera* (**Figura 9**).

Figura 9: Exemplos de metabólitos isolados de *A. spicifera*.



Fonte: Elaboração própria.

Embora haja uma grande diversidade de algas ainda a serem exploradas, na última década as pesquisas tem-se concentrado no estudo dos micro-organismos associados às algas, como por exemplo, os fungos endofíticos. Estes apresentam marcante diversidade biológica e química, e representam uma das mais relevantes fontes de substâncias bioativas, cujas aplicações tem auxiliado no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

1.2 Micro-organismos Marinhos

A definição mais atual de endófitos diz que são aqueles micro-organismos cultiváveis ou não, que habitam de forma sistêmica o interior das células sem causar prejuízos aos hospedeiros (AZEVEDO et al., 2003; MARTINEZ-KLIMOVA, 2017). A associação endófito-hospedeiro ainda não é bem compreendida e, do ponto de vista ecológico, tal descoberta é de extrema importância, por exemplo, para melhor compreensão da função que os fungos podem desempenhar para adaptação ao meio, proteção contra pragas e patógenos, aumento do crescimento, resistência a estresses bióticos e abióticos, proteção solar, além da produção de compostos químicos como enzimas, hormônios e antibióticos (PEIXOTO NETO et al., 2002).

Existem na literatura diversos relatos acerca da associação entre algas e fungos. Entretanto, o estudo químico de fungos endofíticos associados às algas marinhas é relativamente recente, sendo que as primeiras publicações datam de aproximadamente 15 anos (OLIVEIRA, A. L.; 2013)

A melhor definição de fungos marinhos foi proposta por KOHLMAYER e KOHLMAYER (1979): “fungos marinhos obrigatoriamente são aqueles que se desenvolvem e esporulam exclusivamente em um habitat marinho ou de estuário; fungos marinhos facultativos são aqueles provenientes de ambiente de água doce ou terrestres e que são capazes de crescer e até mesmo esporular no ambiente marinho”.

O meio marinho é um habitat para muitos micro-organismos únicos, que produzem compostos biologicamente ativos para se adaptarem a condições ambientais específicas a que estão submetidos. Estas substâncias geralmente são intermediários dos produtos do seu metabolismo, formadas a partir de reações enzimáticas, que incluem os processos envolvidos no anabolismo, catabolismo e excreção. Estas biomoléculas são classificadas em dois tipos: metabólitos primários, que estão envolvidos no nível celular e são essenciais para a vida (divisão celular, proliferação, crescimento, desenvolvimento e reprodução) e metabólitos secundários, que participam da homeostase e defesa natural desses organismos (TORRES, V. R, et al. 2017).

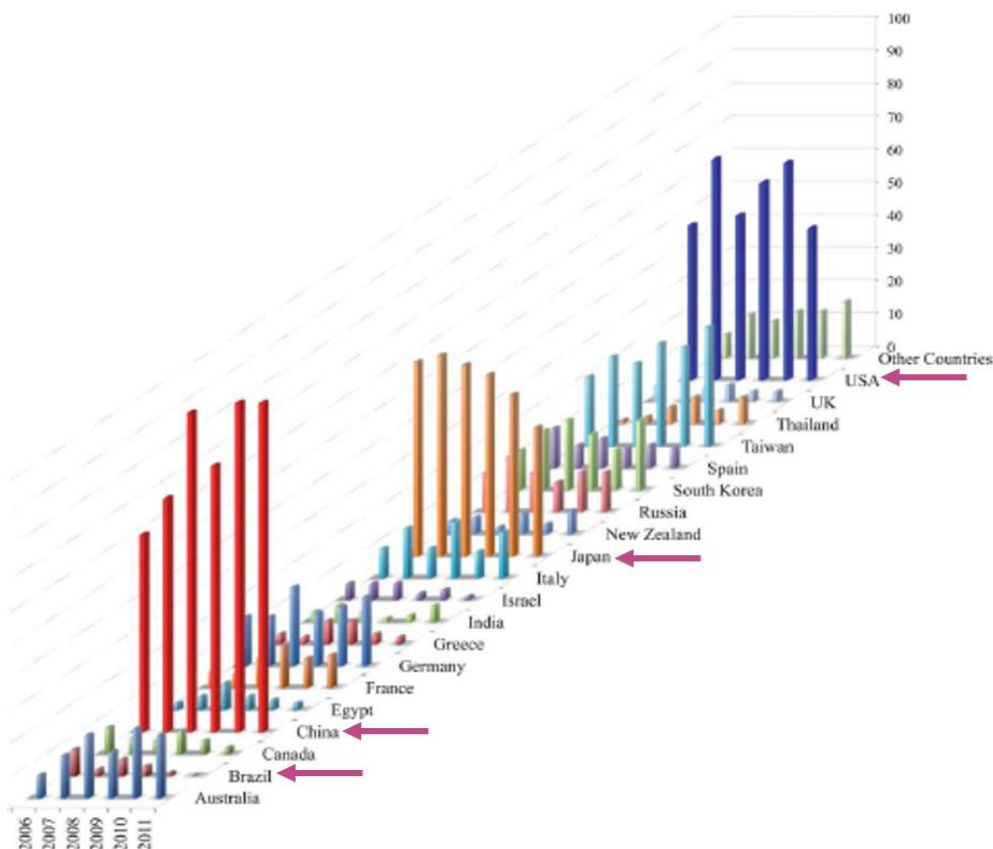
Werner Bergmann foi um dos primeiros pesquisadores, na década de 50, a investigar a química de produtos naturais de micro-organismos marinhos (COSTA-LOTUFO et al., 2009). Nas últimas duas décadas, esses estudos ganharam destaque, sendo descritos na literatura 1378 novos compostos em 2014, 1340 em 2015 e 1277 em 2016 (BLUNT et al., 2018).

Os fungos associados às macroalgas apresentam grande importância na pesquisa de PN, não apenas pela ampla gama de metabólitos secundários produzidos, mas também, pela sustentabilidade associada à produção de matéria prima em larga escala através de processos fermentativos (COSTA-LOTUFO et al., 2009) e principalmente, pelos efeitos biológicos, tais como fungicida, antimicrobiano, antimalárico, antibacteriano, citotóxico e antiviral, das substâncias produzidas (ZHANG, 2014).

Apesar do relato de mais de 20.000 substâncias isoladas, estima-se que menos de 3% do total estimado de organismos marinhos já tenha sido estudado (COSTA-LOTUFO et al., 2009; BLUNT, et al.; 2012).

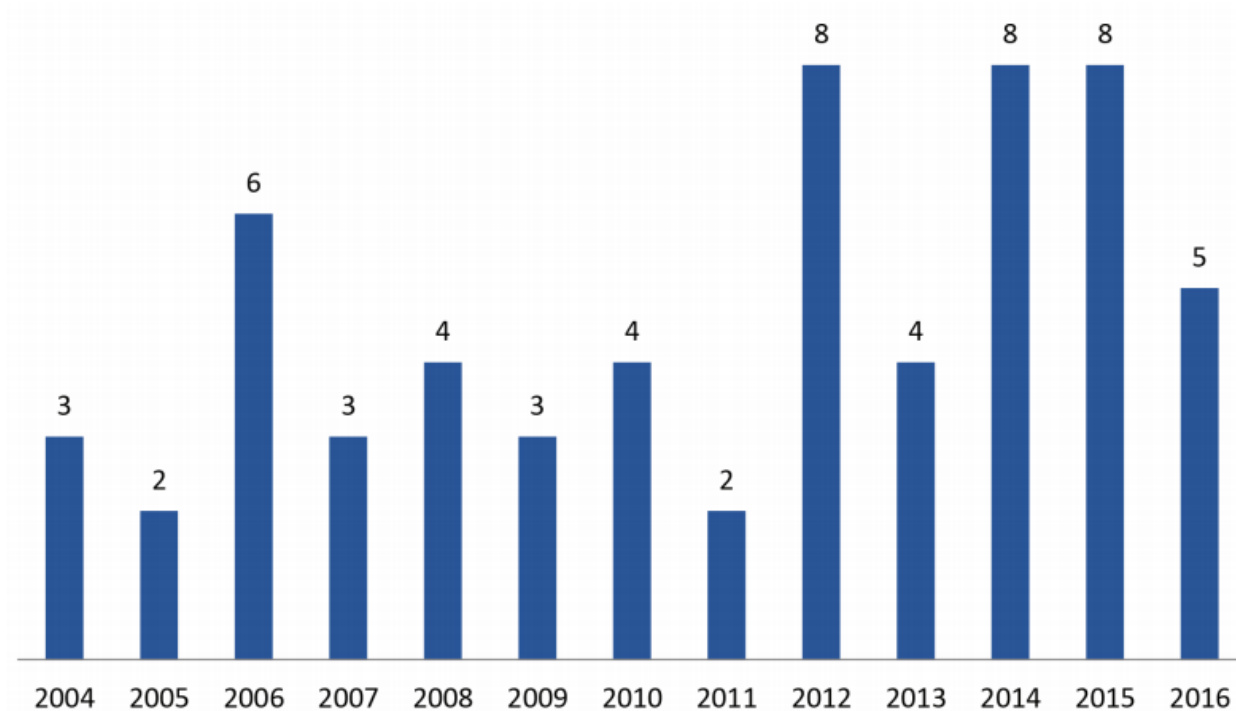
Nos últimos anos houve um crescente avanço nessa linha de pesquisa, principalmente na China, Japão e EUA, e embora o Brasil seja a 16ª nação com a maior costa marítima do mundo (aproximadamente 7,5 mil quilômetros), grande parte de sua diversidade de organismos permanece subexplorada e com poucos trabalhos na literatura, como pode ser observado nas **Figura 10** e **Figura 11**.

Figura 10: Variação no número de publicações de novos produtos naturais de origem marinha por país de 2006-2011.



Fonte: (BLUNT, et al.; 2013).

Figura 11: Número de artigos publicados no Brasil sobre PN marinho, entre Janeiro de 2004 e Agosto de 2017.

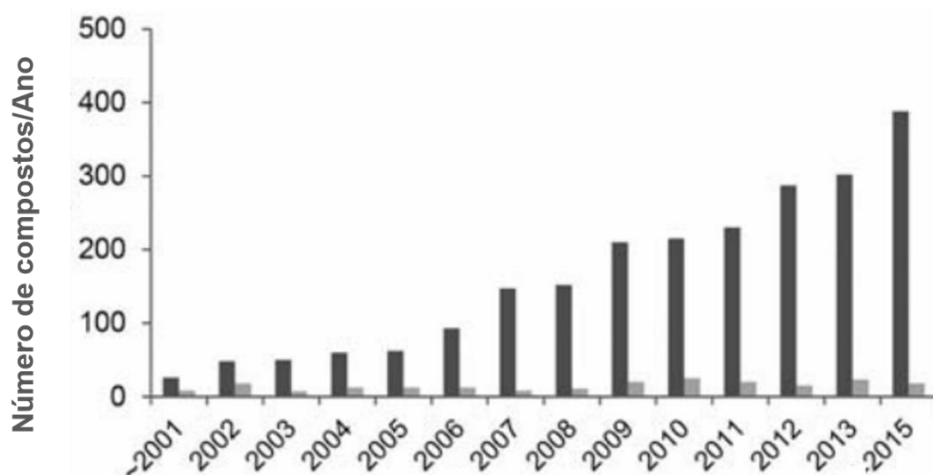


Fonte: (BERLINCK, et al. 2018)

Nesse sentido, a classificação e o entendimento do comportamento bioquímico de algas e os micro-organismos associados a elas, com destaque para os fungos endofíticos, são fundamentais para a compreensão dos ciclos autotróficos e as subsequentes associações resultantes de interações ecológicas (LEAL et al., 2013; KILDGAARD et al., 2014).

Existem na literatura diversos relatos sobre a associação de fungos com organismos marinhos, entretanto, o número de trabalho relacionados a fungos associados a algas marinhas ainda é escasso (**Figura 12**), constituindo assim, uma importante fonte para busca de novas substâncias.

Figura 12: Número de compostos produzidos por fungos de origem marinha, por ano.



- Compostos derivados de fungos associados a organismos marinhos.
- Compostos derivados de fungos isolados de algas marinhas.

Fonte: Adaptado de ZHANG, et al. 2016.

Considerando esse grande potencial que os micro-organismos apresentam na produção de metabólitos bioativos, extratos, frações e substâncias puras têm sido testados em diferentes ensaios biológicos para a busca de compostos com aplicações diversificadas.

1.3 Ensaios biológicos

Bioensaio ou ensaio biológico são experimentos realizados a fim de se investigar os efeitos de uma substância em um órgão isolado ou em um organismo vivo, ou ainda em sistemas ex-vivo ou enzimáticos in vitro, sendo essencial para o processo de desenvolvimento de novos fármacos. Existem diversos tipos de ensaios quali e quantitativos aos quais podemos submeter um extrato ou compostos puros, como Antifúngico, Anti-inflamatório, Antimicrobiano, Anticolinesterásico, Antitumoral, entre outros.

1.3.1 Antimicrobiano

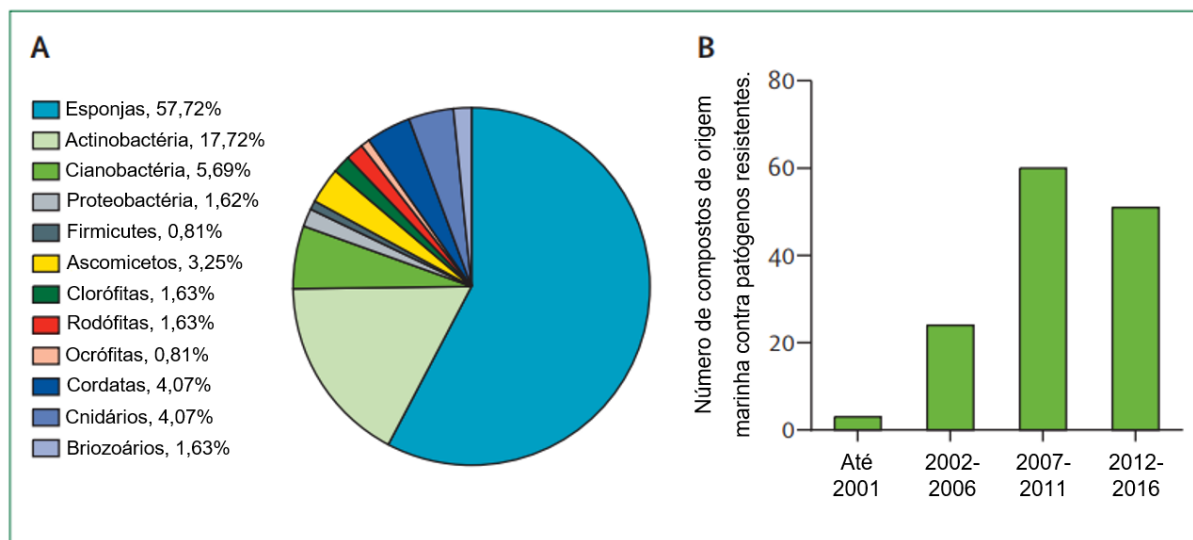
Os primeiros relatos do uso de antibióticos pelo homem são muito antigos, como a descrição do uso de sapatos mofados por chineses para curar feridas infeccionadas nos pés (3000 anos a.C.), porém, o primeiro metabólito fúngico de notória eficácia foi, sem dúvida, a penicilina, substância produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, cuja capacidade de inibir o crescimento bacteriano foi descoberta acidentalmente por Fleming, em 1928. Seu emprego em larga escala no início da década de 40, fruto dos esforços dos pesquisadores ingleses Forey e Chain, levou à redução do índice de mortalidade de soldados de 39% durante a Primeira Guerra Mundial para 3,9%, na Segunda Guerra. O grande impacto do uso penicilina motivou sua produção industrial, sendo este o primeiro medicamento produzido em grande escala, originando, portanto, a indústria farmacêutica. Deu-se início, com esta descoberta, à exploração dos micro-organismos como fonte de substâncias biologicamente ativas, com uma grande ênfase, ainda vigente, na busca de novas substâncias com atividade antibiótica (TAKAHASHI, J.A.; 2008).

Os antibióticos revolucionaram a medicina em muitos aspectos, e sua descoberta é considerada um marco na história da humanidade. No entanto, a consequência mais grave do uso de antibióticos é o desenvolvimento de resistência contra eles, ou seja, capacidade dos micróbios para persistirem e se multiplicar, apesar da administração de drogas anti-infecciosas (ABDELMOHSEN, U. R., et al., 2017).

Com isso, existe uma grande e urgente necessidade de descoberta de novos compostos para tratamento de pacientes infectados por essas cepas resistentes aos medicamentos convencionais.

O ambiente marinho tem apresentado um crescente avanço nos estudos em busca de compostos bioativos e tem provado ser uma fonte rica de substâncias com relevantes atividades biológicas, como antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante e imunomoduladora (**Figura 13**). Muitos produtos naturais marinhos, por exemplo, a Neoeccinulina B, foram descritos como promissores para diminuir as taxas de mortalidade causadas por infecções bacterianas (ABDELMOHSEN, U. R., et al., 2017).

Figura 13: A: Distribuição (por Filo) de compostos ativos contra MO resistentes. **B:** PN marinhos ativos contra MO resistentes aos antibióticos comerciais nos últimos 20 anos.



Fonte: Adaptado de ABDELMOHSEN, U. R., et al., 2017.

Atualmente, diversos compostos de origem marinha com potencial anti-infeccioso encontram-se em fase 1, 2 e 3 de ensaios clínicos, com seis aprovados para uso pela agência norte-americana Food and Drug Administration (FDA) e um pela Uniao Europeia (UE) (**Tabela 2**) (ABDELMOHSEN, U. R., et al., 2017).

Tabela 2: PNM com propriedade anti-infecciosas aprovados pela FDA e pela UE.

Organismo Marinho	Composto	Doença
<i>Eurotium rubrum</i>	Neocinulina B	Antiviral contra H1N1
<i>Aspergillus terreus</i>	Asperterrestide A	Antiviral contra Influenza A / H1N1
<i>Stachybotrys chartarum</i>	Enilspirodrimane stachybotrin D	Antiviral contra HIV-1
<i>Symphocladia latiuscula</i>	2,3,6-tribromo-4,5-dihidroxibenzil-éter metílico	Antiviral contra HSV-1 resistente
<i>Haliclona spp</i>	Haliclonaclamina A	Antimalária
<i>Haliclona spp</i>	Sitsikammamina C	Antimalária

Fonte: Adaptado de ABDELMOHSEN, et al.; 2017.

1.3.2 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa progressiva, que resulta em prejuízo da memória e mudanças comportamentais. É o tipo mais comum de demência entre os idosos e afeta mais de 36 milhões de pessoas no mundo (da SILVA, J. I; et al., 2015).

Uma das abordagens mais promissoras para tratar a doença é aumentar o nível de acetilcolina no cérebro usando inibidores da acetilcolinesterase. Os anticolinesterásicos são os fármacos que mostraram melhora mais significativa nos sintomas cognitivos da doença. De fato, dentre os cinco medicamentos comercialmente disponíveis para tratar a doença, quatro deles, Tacrina, Donepezil, Rivastigmina, e Galantamina, são inibidores de AChE (AChEI). Infelizmente, todos estes medicamentos são apenas paliativos, causando efeitos colaterais indesejados, além da perda de eficácia após o tratamento prolongado (Y.-W. LIU et al., 2014).

Diversos estudos de bioprospecção voltados à busca por novas substâncias com atividade anticolinesterásica têm sido realizados e vários compostos de origem marinha se destacam, apresentado resultados relevantes e com potencial para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento dessa doença.

1.3.3 Câncer

Câncer é um conjunto de doenças causadas pela proliferação anormal das células defeituosas, formando tumores. Foram descritos mais de cem tipos de câncer, sendo responsáveis anualmente pela morte de mais de 4 milhões de pessoas em todo mundo (SOUZA, M. V., 2004).

A medicina moderna tem encontrado no oceano uma vasta fonte de compostos com importante potencial terapêutico. Como exemplo podem-se citar os produtos naturais marinhos: discodermolida, eleuterobina, sarcodictina e laulimalida, que apresentam potente atividade antitumoral e possuem mecanismo de ação similar ao do paclitaxel, sendo compostos promissores na luta contra o câncer (SOUZA, M. V., 2004).

O ambiente marinho tem se mostrado uma fonte promissora de agente antitumorais. Prova disto é o número de compostos em estudo para esta finalidade sendo 4 já aprovados para uso pelo FDA, 4 na Fase III, 7 na Fase II e 7 na Fase I de testes clínicos.

1.3.4 Doenças tropicais negligenciadas

Malária, doença de Chagas e Leishmaniose são três doenças infecciosas tropicais, causadas por protozoários. Causam graves problemas de saúde pública, sendo responsáveis por milhões de novas infecções e mortes por ano, em países endêmicos. Com isso, há uma urgente necessidade de novos medicamentos contra estas doenças, uma vez que os medicamentos existentes apresentam problemas com a resistência desenvolvida pelos parasitas, além da toxicidade e as maneiras pelas quais eles são administrados (ANNANG, et al.; 2016).

1.3.4.1 Doença de Chagas

Doença de Chagas ou tripanossomíase é uma doença protozoária parasítica, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, que afeta cerca de 10 milhões de pessoas e é endêmico na América do Sul e Central (PARKER and SETHI; 2011) Estima-se que 30 a 40% dos indivíduos afetados irão desenvolver cardiomiopatias, levando a 12.500 mortes por ano (BRANQUINHO et al.; 2014). A doença se manifesta em duas formas, uma fase aguda curta assintomática e uma parasitemia patente que, quando não tratada, desenvolve-se ainda mais em uma fase crônica, décadas mais tarde.

Não existem vacinas disponíveis para a prevenção de Chagas portanto, seu tratamento está limitado aos dois compostos nitro-heterocíclicos benzonidazol e nifurtimox, ambos requerendo longos períodos de tratamento, frequentes efeitos adversos, baixa atividade contra o estágio crônico e recorrentes problemas de resistência (BRANQUINHO et al.; 2014).

1.3.4.2 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença que afeta, principalmente, populações de países em desenvolvimento. Em humanos, *Leishmania spp.* causa uma variedade de doenças clínicas, devido à capacidade do micro-organismos de se proliferar em tecidos profundos ou à superfície da pele. Segundo a OMS, a leishmaniose podem ser classificados em quatro formas principais: leishmaniose visceral (mortal), cutânea leishmaniose (forma comum, lesões cutâneas), leishmaniose mucocutânea (tecido destruição) e leishmaniose cutânea difusa (lesões cutâneas de difícil cura) (ANNANG, et al.; 2016).

Historicamente, o tratamento da leishmaniose tem sido realizado com base no uso de metais pesados tóxicos, particularmente compostos de antimônio como estibogluconato e antimoniato de meglumina. Quando estes compostos perdem a eficiência, outros são usados, incluindo pentamidina e anfotericina B. Esses produtos químicos devem ser injetados, o que requer atendimento clínico ou hospitalização durante o tratamento, devido a possíveis efeitos colaterais (CROFT and YARDLEY; 2002).

Acredita-se que, aproximadamente, 600.000 infecções são oficialmente relatadas a cada ano, evidenciando a urgente necessidade na busca por novos medicamentos e tratamentos.

1.4 Desrepliação

A desrepliação (do inglês, *dereplication*) é uma abordagem metodológica utilizada para diferenciar, a partir de extratos de alta complexidade molecular oriundos de produtos naturais, os compostos já conhecidos daqueles possíveis compostos desconhecidos e com algum potencial de interesse (LANG et al., 2008). Para tanto, várias técnicas combinadas de separação e detecção tem sido utilizadas, sendo elas CL-RMN (cromatografia líquida acoplada com ressonância magnética nuclear); CG-EM (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas) e CL-EM (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas), além de bioensaios e análises, por exemplo quimiométricas, que permitam a comparação dos conjuntos de dados obtidos através do uso de base de dados (CORDELL et al., 2009; LANG et al., 2008, NG et al., 2009). Isso tudo auxilia na elucidação de moléculas bioativas sem precisar re-isolar compostos já conhecidos descritos na literatura, acelerando a descoberta de moléculas com potencial de interesse.

Estas técnicas estão atualmente bem estabelecidas no âmbito da pesquisa em produtos naturais, devido a sua versatilidade, rapidez, confiabilidade e reprodutibilidade na análise de extratos brutos ou amostras semi-purificadas, de maneira a prover uma rápida priorização de extratos e frações para estudo, bem como das substâncias a serem isoladas (LANG et al., 2008; WOLFENDER, 2009).

1.5 OSMAC

OSMAC (**O**ne **S**train **M**any **C**ompounds) é uma abordagem que envolve alterações sistemáticas nas condições de cultivo, a fim de expandir a diversidade estrutural dos metabólitos produzidos a partir de uma única cepa fúngica (CHRISTIAN et al.; 2005).

Parâmetros físico-químicos tais como pH, substratos (meios de cultivo), temperatura, agitação, luz, são alterados durante a cultura da linhagem fúngica. Há relatos que tais variações podem provocar alterações no perfil metabólico de muitos micro-organismos, induzindo vias metabólicas antes silenciadas. Esta ativação pode levar a uma grande variabilidade de metabólitos, que podem ser obtidos ou terem sua produção potencializada utilizando tal abordagem.

De tal forma, OSMAC apresenta-se como uma ferramenta com grande potencial para explorar a capacidade de alteração metabólica nas linhagens em estudo, promovendo maior diversidade química dos metabólitos secundários de diversos gêneros de fungos.

A escolha do parâmetro a ser alterado, geralmente, é aleatória. Por esse motivo, tais variações são conhecidas como induções randômicas. Em geral, realiza-se uma grande quantidade de experimentos fazendo diversas alterações, de maneira sistematizada, a fim de verificar o aumento da variabilidade metabólica de determinado micro-organismo.

Visando otimizar as condições experimentais, pretende-se realizar induções não randômicas, mas sim, induções planejadas, com respaldo de ferramentas quimiométricas que possibilitem criar um desenho experimental em forma de planejamento fatorial visando maximizar a obtenção de resultados considerados positivos, como o aumento na produção metabólica acompanhado de maior variabilidade química dos metabólitos produzidos.

1.6 Quimiometria e Planejamento Experimental

Um dos grandes desafios da atualidade é dar continuidade ao desenvolvimento científico de forma que se possa diminuir ou extinguir os danos causados ao meio ambiente. Tal fato requer uma nova conduta com relação aos procedimentos químicos visando o aprimoramento e otimização dos processos, com o objetivo fundamental da geração cada vez menor de resíduos e efluentes tóxicos dentre outros procedimentos

considerados ambientalmente amigáveis (CLARK, 1999). De forma global, este é o caminho a ser prioritariamente percorrido pela química, e é denominado como química sustentável ou química verde.

Sabe-se que os micro-organismos apresentam grande importância na pesquisa de produtos naturais, não apenas pela ampla gama de metabólitos secundários produzidos, mas também, pela sustentabilidade associada à produção de matéria prima em larga escala através de processos fermentativos (COSTA-LOTUFO et al., 2009) e a manipulação de suas condições de cultivo (tempo, pH, nutrientes, temperatura e aeração) que podem ser modificadas, a fim de aumentar ou direcionar a produção de metabólitos de interesse (ALY et al., 2011).

Afim de explorar essa maquinaria genética diversos métodos tem sido aplicados aos estudos dos perfis metabólicos de micro-organismos, como por exemplo, o uso de ferramentas quimiométricas, como o planejamento experimental (do inglês *DOE*, Design of Experiments), que torna possível extrair, com alta reprodutibilidade, uma grande quantidade de informações usando um número mínimo de experimentos, permitindo, assim, estimar a totalidade das possíveis interações entre os parâmetros eleitos para a análise, bem como prever condições otimizadas para condução dos experimentos através de modelos de regressão (PILON et al., 2016).

Dentre os diversos tipos de planejamento experimental, destacam-se os sistemas de planejamento fatorial, pois permitem avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis a partir de um número reduzido de ensaios experimentais quando comparados aos processos univariados. Esta estratégia permite a obtenção de várias respostas de interesse, que eventualmente precisem ser consideradas simultaneamente (PERALTA-ZAMORA et al., 2005).

O planejamento fatorial é a primeira etapa a ser realizada quando o experimentador deseja identificar, dentre um elevado número de variáveis, aquelas que possuem maior influência ou efeito sobre a resposta esperada (GUARDIA, et al., 1999).

Na triagem inicial é preciso identificar quais variáveis serão testadas e quantos níveis são indicados, baseando as escolhas em dados da literatura, por exemplo (ORTIZ, et al., 2007).

Com o planejamento é possível:

- I) Observar interações sinérgicas ou antagônicas entre as variáveis escolhidas;

- II) Prever, antecipadamente, quantos experimentos deverão ser realizados para alcançar determinado objetivo;
- III) Gerar menos resíduos químicos, em alinhamento com os princípios da Química Verde.

Esta metodologia constitui uma poderosa ferramenta estatística e tem sido amplamente utilizada para a otimização de variáveis de bioprocessos, empregando o planejamento experimental como estratégia para resolução de problemas e otimização das condições. Adicionalmente, esta metodologia permite proporcionar uma abordagem promissora para aplicações industriais e comerciais.

Baseado no exposto, este trabalho visa a avaliação química e biológica de fungos associados as algas *Sargassum vulgare*, *Dichotomaria marginata* e *Acanthophora spicifera* na busca por compostos com atividades Antimicrobiana, Anticolinesterásico, Antitumorais e frente as doenças tropicais Leishmaniose e doença de Chagas. Além de utilização de planejamento experimental para avaliar as variações químicas e biológicas obtidas em diferentes condições de cultivo de fungos endofíticos.

2. OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Esse projeto tem como objetivo o isolamento dos fungos endofíticos associados as algas *Sargassum vulgare*, *Dichotomaria marginata* e *Acanthophora spicifera* para estudo e avaliação dos perfis químicos e biológicos dos metabólitos secundários produzidos, afim de encontrar substâncias com bioatividades relevantes e contribuir para uma melhor compreensão da relação ecológica entre os fungos endofíticos e as espécies de algas marinhas hospedeiras usadas neste estudo.

Objetivos Específicos

- Isolar, preservar e cultivar os fungos endofíticos associados às algas *A. spicifera*, *D. marginata* e *S. vulgare* no meio de cultivo líquido Malte e obter os respectivos extratos brutos.

- Identificação de todos os fungos isolados por taxonomia molecular e morfológica.

- Avaliação química dos extratos brutos obtidos através de análises de RMN de ^1H e CLAE-DAD, juntamente com triagem biológica frente aos ensaios Antimicrobiano, Anticolinesterásica, Antibiótico, Anticoagulante, Leishmanicida, Tripanocida, Citotóxico e Antídoto para veneno de cobras;

- Identificar os metabólitos produzidos pelos fungos isolados por desreplicação, através de análises do índice de retenção e comparação com padrões usando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

- Identificar metabólitos por análise qualitativa do espectro de RMN de ^1H , cromatografia líquida acoplada a espectroscopia de massas (CLAE-EM) e busca nas *MarinLit*®, *ChemSpider*®, *Antimarin*® e na literatura usando as ferramentas *SciFinder Scholar*®.

- Cultivar o fungo endofítico *Hypoxylon monticulosum* (AS 09 MQ e DM 02 MQ) em escala ampliada e realizar o isolamento, identificação e/ou determinação estrutural das substâncias majoritárias, utilizando RMN de ^1H e de ^{13}C , UV, EM e CLAE.

- Checar os dados obtidos dos dois extratos citados acima na busca pelas semelhanças e diferenças apresentadas em sua produção metabólica, para tentar compreender a relação que apresentam com cada hospedeiro.

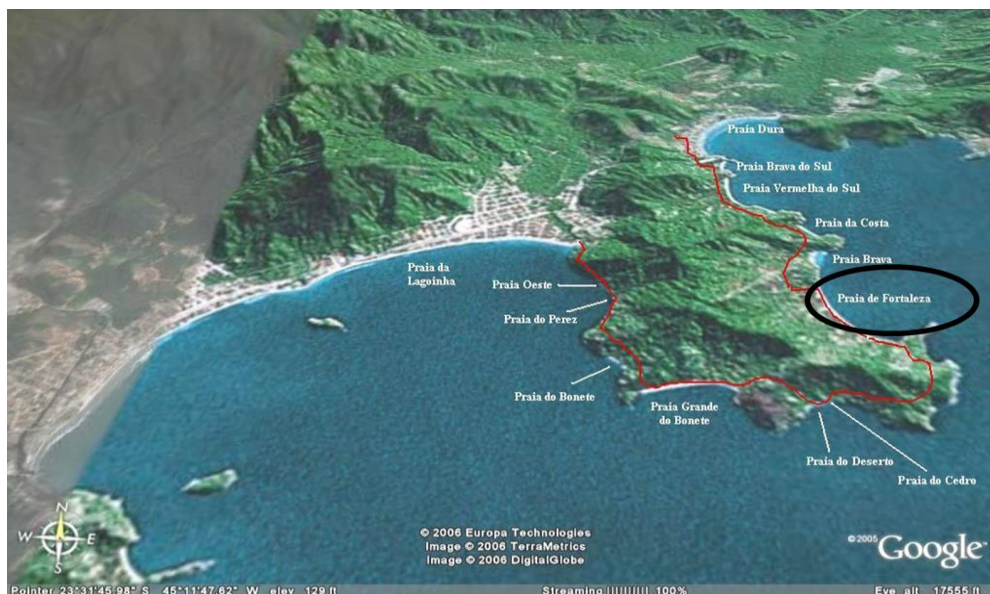
- Analisar as substâncias puras através dos ensaios biológicos, para verificar seu potencial de bioatividade isoladamente;
- Cultivar o fungo endofítico *Annulohyphomyces stygium* (AS 01 MQ) isolados da alga *A. spicifera* nos meios de cultivo líquido Czapek e Malte utilizando planejamento fatorial 2^3 com 5 réplicas no ponto central e obter os respectivos extratos brutos, afim de avaliar como as condições de cultivo, variação de pH, tempo de crescimento e tipo de água afetam sinergicamente a produção em massa e a diversidade química de seus componentes.

3. MATERIAIS E METÓDOS

3.1 Seleção e coleta das espécies vegetais

Partes saudáveis das algas foram coletadas no costão direito da Praia da Fortaleza, Ubatuba-SP (**Figura 14**), no dia 22/04/2015 por A. E. Honório. O material foi identificado pela Dra. Nair Yokoya e depositado no herbário do Instituto de Botânica de São Paulo.

Figura 14: Local de coleta das algas



Fonte: Google Maps

3.2 Obtenção e cultivo do endófito

Para o isolamento dos fungos associados, foram utilizados os seguintes procedimentos:

Método 1: a superfície do material vegetal foi esterilizada por imersão em etanol 70% por 10 segundos.

Método 2: imersão em solução de NaOCl 1% por 6 segundos e em etanol 70% por 2 segundos.

Ambos os procedimentos foram seguidos de uma dupla lavagem em água estéril por 10 minutos (SILVA, 2005).

As algas foram seccionadas com ajuda de um bisturi e inseridas em meio de cultura sólido PDA, ao qual foi adicionado, após ser auto-clavado, antibiótico (Gentamicina) para evitar o crescimento bacteriano (**Figura 15**). O crescimento dos fungos foi monitorado

até observação de pequenas colônias, sendo então retirada uma parte de cada linhagem, e inoculada separadamente em outra placa.

O crescimento dos fungos foi monitorado e repiques sucessivos foram realizados até a obtenção das 40 linhagens, que foram depositadas na micoteca do Departamento de Química Orgânica, IQ-UNESP.

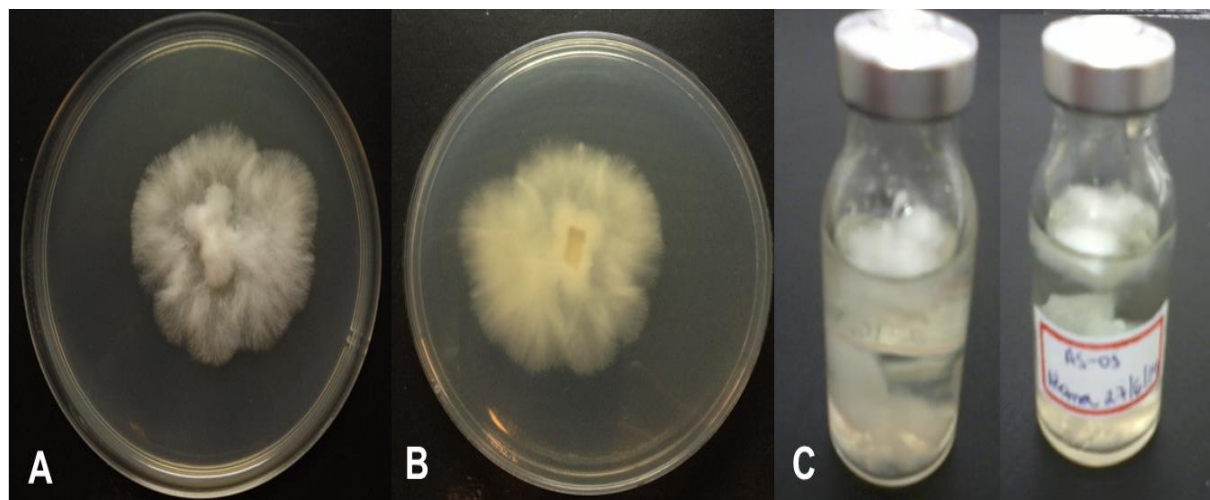
Figura 15: Metodologia de esterilização, isolamento e purificação dos endófitos.



Fonte: Elaboração própria

A avaliação da pureza das linhagens foi realizada morfologicamente (pela aparência uniforme das placas), sendo posteriormente preservadas em frascos com água esterilizada (LANDECKER, E. M., 1996) (**Figura 16**).

Figura 16: Parte superior da placa de Petri, (B) Parte inferior, (C) Preservação em slants.



Fonte: Elaboração própria

Ao todo foram isolados 01 linhagem de fungo da alga *S. vulgare* (**Figura 17**), 22 linhagens de fungos de *D. marginata* (**Figura 18**) e 17 linhagens de fungos de *A. spicifera* (**Figura 19**) através de análise visual das placas com os cultivos.

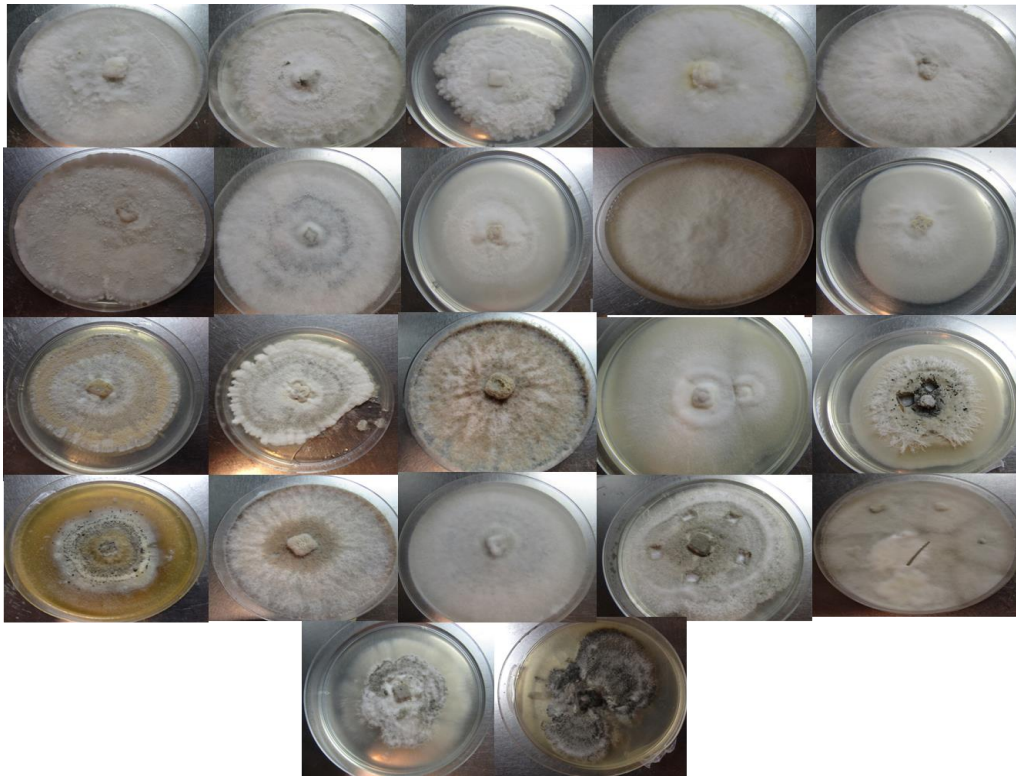
Figura 17: Fungo associado à alga *S. vulgare*



SV 01 M1 MQ

Fonte: Elaboração própria

Figura 18: Fungos associados à alga *D. marginata*



Fonte: Elaboração própria

Figura 19: Fungos associados à alga *A. spicifera*



Fonte: Elaboração própria.

3.3 Perfil Químico e Biológico em escala reduzida.

3.3.1 Perfil Químico (instrumentos e técnicas)

3.3.1.1 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Nas análises por CCDC utilizaram-se placas comerciais com fase estacionária sílica gel e fase móvel CHCl_3 :MeOH em diferentes proporções. As placas foram reveladas em câmara de UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, seguido de nebulização com anisaldeído e aquecimento.

3.3.1.2 Cromatografia em coluna (CC)

Foram utilizadas colunas de vidro, empregando como fase estacionária sílica Fase reversa do tipo octadesil silano (C-18), da marca Sorbent Technologies, porosidade 60 Å, tamanho das partículas 40-75 μm (200-400 mesh); ou Sílica gel comum da marca Sigma Aldrich porosidade 60 Å, tamanho das partículas 40-63 μm . Como fase móvel foram utilizadas misturas dos solventes AcOEt/MeOH ou MeOH/H₂O (quando utilizada fase estacionária C-18).

3.3.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

Para análises por CLAE-DAD foi utilizado o equipamento modelo Shimadzu® com duas bombas LC-6AD, comunicadora CBM-20A, injetor automático SIL-10AF e detector de arranjos de diodos SPD-M20A.

O sistema utilizado para análise em CLAE foi coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadecil silano (C-18) e eluição em gradiente H₂O/MeOH (95:05→0:100) por 40 min., permanecendo nesta condição por mais 10 min., com fluxo de 1,0 mL/min. e comparado em diferentes comprimentos de onda.

3.3.1.4 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN de ¹H e RMN de ¹³C)

Os espectros de RMN uni e bidimensionais foram obtidos em dois espectrômetros, Bruker Fourier 300 com campo magnético de 7,0 T e Bruker Ascend III 600 com campo magnético de 14,1 T. O TMS foi utilizado como referência interna. As amostras foram solubilizadas nos solventes dimetilsulfóxido-(DMSO-d₆) ou metanol-d₄.

3.3.1.5 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

Os extratos foram submetidos a análises por cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização em chama (CG-DIC) para análise preliminar e conhecimento da complexidade da amostra, e subsequentemente foi utilizado um cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM) para identificação das substâncias por desreplicação.

Inicialmente o extrato foi submetido às reações de derivatização:

Metoximação: 5-10 mg da amostra foram solubilizados em 80 µl de uma solução de metoxiamina em piridina (20 mg/ml) e em seguida adicionou-se mais 100 µl de piridina e aqueceu-se em banho-maria a 30 °C por 90 min.

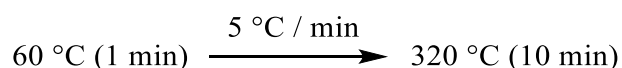
Sililação: Na amostra metoximada adicionou-se 200 µl de MSTFA [N-metil-N (trimetilsilil) trifluoroacetamida], homogeneizou-se bem e aqueceu-se a 37°C por 30 min.

Após esses procedimentos, a amostra foi filtrada com microfiltro de 0,22 µm e transferida para vial com *insert* de 350 µl.

Estas reações são necessárias para que as substâncias desconhecidas presentes se tornassem mais voláteis e com maior estabilidade térmica, permitindo a análise por CG-EM. Essa técnica consiste na substituição dos hidrogênios ativos presentes nos grupamentos –OH, –SH, –NH e –COOH por unidades de trimetilsilano (TMS) ou *tert*-butildimetilsilano (TBDMS).

Para as análises por CG-EM foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu CGMS-QP2020 equipado com injetor automático AOC-20i, com coluna capilar Restek® SH-RTx-5MS (5% difenil / 95% dimetil polisiloxano) de 30m x 0,25 mm x 0,25 µm, GCMS solution version 4.41.

A temperatura do forno foi ajustada da seguinte forma:



A temperatura do injetor foi de 270 °C em modo *splitless*, gás de arraste He (99,999%) com fluxo constante de 1 mL/min e volume de amostra injetado de 1 uL. A pressão foi de 57,4 KPa, velocidade linear de 36,5 cm/seg e fluxo total de 104 mL/min. Para as condições de detecção por EM, foi utilizada temperatura da fonte de íons de 270 °C, temperatura de interface de 280 °C e faixa da massa de aquisição de m/z 35-700 Daltons. A aquisição dos dados foi obtida e analisada pelo software CG-MS Analysis.

Para a identificação das substâncias presentes nas amostras, utilizaram-se duas metodologias para assegurar a confiabilidade dos resultados. Foram comparados os espectros de fragmentação dos extratos testados com a base de dados NIST 69™ *Library* utilizando apenas os valores encontrados acima de 80% de similaridade.

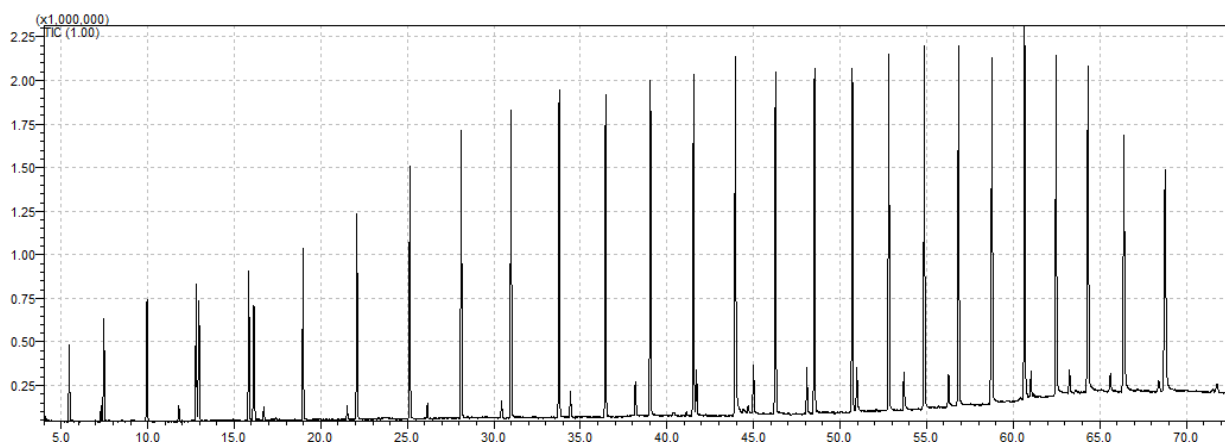
Em seguida as substâncias tiveram seus índices de retenção calculados pela equação de Van Den Dool e Kratz (**Equação 1**), através da interpolação do tempo de retenção da banda cromatográfica de interesse com as bandas imediatamente anterior e posterior da série homóloga de alcanos (C₈-C₄₀) (**Figura 20**).

Equação 1: Equação de Van Den Dool e Kratz

$$IR = 100.n + 100.\left(\frac{tRx - tRn}{tRn + 1 - tRn}\right)$$

onde n é o número de carbonos do hidrocarboneto anterior ao pico de interesse, tRx é o tempo de retenção da substância de interesse, tRn é o tempo de retenção do n -alcano eluído antes do analito e $tRn+1$ o tempo de retenção do n -alcano posterior ao pico de interesse.

Figura 20: Série homóloga de hidrocarbonetos C₈-C₄₀.



Fonte: Elaboração própria.

Os índices de retenção encontrados foram comparados com os dados de índice de retenção teórico, encontrados na literatura, confirmando ou não a presença dos compostos sugeridos pelo banco de dados.

3.3.1.6 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (CLAE-EM) Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (EM-IES)

Na ionização pelo método IES, a solução da amostra (substância) é pulverizada através de um capilar para uma câmara, gotículas carregadas são produzidas por um potencial aplicado de alguns kV, e sob o campo elétrico aplicado, são direcionadas para a região de pré-analisador. EM-IES é um método analítico versátil quando comparado ao impacto por elétrons, por exemplo, porque permite que se analisem os íons moleculares de compostos moleculares polares e massas elevadas em solução aquosa (CREWS et al., 2009).

O extrato bruto foi analisado em modo positivo. A condição de eluição aplicada aos experimentos foi gradiente exploratório H₂O/MeOH (95:05→0:100), acidificada com 0,1% CH₃COOH, por 40 min. Para aquisição dos dados foi utilizado o software Bruker Data Analysis 3.2.

Os dados adquiridos foram comparados com os bancos de dados *ChemFinder*®, *Antimarin*® e *Marinlit*® e em seguida foi realizada comparação dos hits sugeridos com dados da literatura.

3.3.2 Perfil Biológico

3.3.2.1 Atividade Antibiótica contra linhagens bacterianas resistentes

Esses testes foram realizados em parceria com a Profa. Dra. Ilana Camargo (LEMiMo) da USP-São Carlos.

3.3.2.1.1 Determinação da CIM e CBM

Todos os extratos foram submetidos ao ensaio antibiótico para determinação de CIM frente às linhagens resistentes *S. epidermidis* ATCC35984, *S. aureus* ATCC25923, *E. faecalis* ATCC29212, *E. faecium* VRE16, *K. pneumoniae* ATCC700603 e *E. coli* ATCC25922. Os compostos foram diluídos em DMSO, e foi preparada uma solução estoque 100x concentrada. Posteriormente, a solução estoque foi diluída 1:100 em caldo

Mueller Hinton Cátion Ajustado (MHCA) (BD Lot. 3322206) segundo o CLSI (2013). A partir disso cada composto foi testado a 512 µg/mL em 1% DMSO, ou na maior concentração em que foi possível dissolver o composto sem que houvesse precipitação. Para o controle negativo e positivo foram adicionados caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado 1% DMSO.

A incubação foi mantida a 37°C e a leitura visual dos resultados foi realizada após 24 horas. A triagem da atividade das amostras foi definida como: Apresentou ou não atividade na concentração testada. Quando a CIM é maior que a concentração testada esta é considerada sem atividade.

As amostras que apresentarem atividade foram testadas para avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM), sendo que os testes foram realizados em duplicata.

3.3.2.1.2 Determinação da concentração inibitória mínima

Para se determinar a CIM, utilizaram-se todas as linhagens da espécie bacteriana que se mostraram sensíveis as amostras. Dos poços do composto a 512 µg/ml partiram as diluições seriadas (1:2) até a concentração de 0,06 µg/ml. A incubação foi feita a 37°C e a leitura visual dos resultados após 24 horas, na qual observou-se até qual concentração o composto conseguia inibir o crescimento do micro-organismos.

3.3.2.1.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima

Após a leitura visual da CIM, inoculou-se 100 µL do conteúdo do poço equivalente a CIM, uma diluição acima e duas abaixo, em placa de MHCA-Ágar por técnica de microgota, sem estriar. A placa foi incubada em estufa a 37°C por 24 horas, quando foi feita a leitura visual para observar em qual concentração não houve o crescimento bacteriano. Para a determinação da atividade como bactericida ou bacteriostática, os compostos que tiveram a razão CBM/CIM menor ou igual a quatro foram considerados bactericidas, acima disso sendo consideradas bacteriostáticas (PANKEY AND SABATH, 2004).

3.3.2.1.4 Determinação da capacidade de erradicação do biofilme

Inoculou-se *S. epidermidis* ATCC 12228 (Controle negativo, má formadora de biofilme) e *S. epidermidis* ATCC 35984 (controle positivo, boa formadora de biofilme) em Caldo BHI 0,75% glicose em diversas replicatas em microplaca de 96 poços. A incubação foi feita a 37°C por 24 horas para a formação do biofilme. A capacidade de erradicação do biofilme formado foi testada após a formação do biofilme da *S. epidermidis* ATCC 35984.

Após 24 horas a 37°C, retirou-se o meio de cultura com as bactérias planctônicas e lavou-se com solução fisiológica 0,85% para que permanecesse na microplaca apenas o biofilme. Adicionou-se cada composto na maior concentração possível, diluído em DMSO a 1% quando necessário, em meio BHI 0.75% glicose fresco nos poços onde houve formação de biofilme pela *S. epidermidis* ATCC 34984. Como controle do crescimento do biofilme, 6 poços com o controle positivo e 6 com negativo receberam apenas caldo BHI 0.75% glicose, acrescido de 1% DMSO quando necessário. Incubou-se a 37°C por mais 24 horas. Essa segunda etapa permitiu a erradicação do biofilme pelo composto teste.

Após 24 horas, para quantificação do biofilme, os poços foram lavados diversas vezes e corados com cristal violeta. Após etapas de lavagens e retirada do cristal violeta em excesso, foi feita a remoção do cristal violeta com etanol:acetona (80:20), que foi transferido para uma outra microplaca para quantificação indireta do biofilme a 595 nm. O controle do ensaio foi baseado na comparação da média das absorbâncias do biofilme de *S. epidermidis* ATCC 34984 e da média das absorbâncias do biofilme de *S. epidermidis* ATCC 12228, ambos sem composto. A comparação das médias foi realizada pelo Teste-T Student, cujo valor $P < 0.05$ prova a diferença significativa entre duas médias de duas amostras diferentes. Quanto à capacidade do composto em erradicar o biofilme, a análise dos dados foi feita com base na comparação da produção de biofilme de *S. epidermidis* ATCC 34984 sem composto com aquela de *S. epidermidis* ATCC 34984 com composto. Para isso utilizou-se a média das replicatas e o desvio padrão foi feito para análise da coerência entre as replicatas. Para a análise estatística foram realizadas análises de variância (ANOVA) da média de absorbância da produção de biofilme pela linhagem *S. epidermidis* ATCC 34984 sem composto e das médias de absorbância das

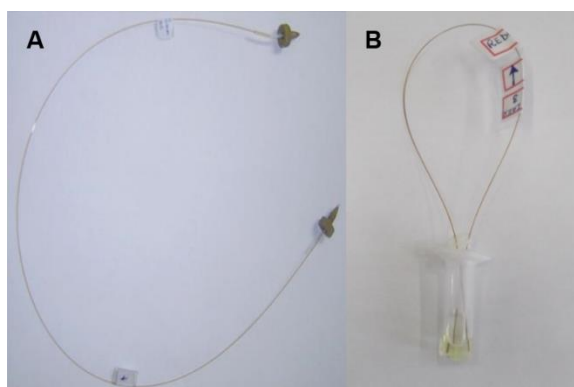
produções de biofilme pela *S. epidermidis* ATCC 34984 com cada composto teste. A análise de variância com valor de $P < 0.05$ indica uma diferença significativa entre as duas amostras.

3.3.2.2 Ensaio Anticolinesterásico

Este ensaio foi realizado em parceria com Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso (GCBPN) da USP-Ribeirão Preto.

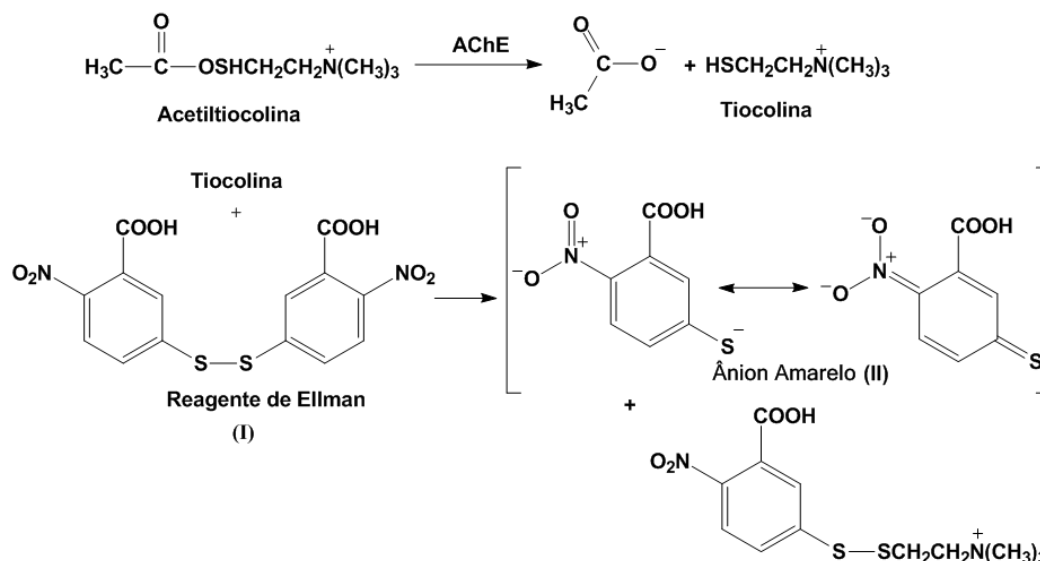
As amostras foram submetidas ao ensaio anticolinesterásico com as enzimas acetilcolinesterase humana e de enguia elétrica (AChE-hu e AChE-ee) imobilizadas em dois biorreatores denominados ICERs de 30 cm x 0,01 mm em capilar de sílica fundida (**Figura 21**).

Figura 21: Biorreator (A) e estocagem do biorreator (B).



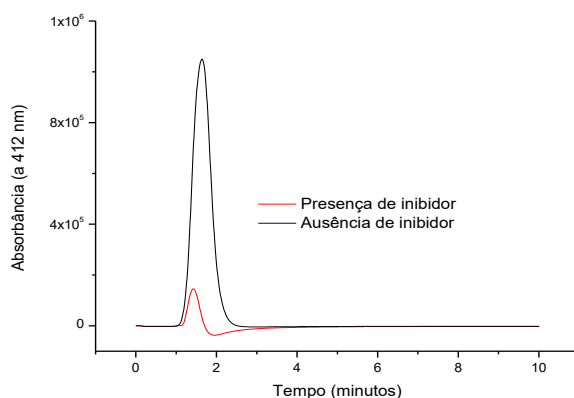
As amostras foram solubilizadas em metanol/água (1:1) e preparadas nas de acordo com o método modificado de Ellmann. Tal método baseia-se na medida da velocidade de produção da tiocolina formada através da hidrólise do análogo do substrato da AChE, a acetiltiocolina. A tiocolina formada reage com o chamado Reagente de Ellman (ácido 5,5-ditiobis[2-nitrobenzóico]) formando uma mistura de dissulfetos e um ânion amarelo com intensa absorção em 412 nm, (**Figura 22**).

Figura 22: Catálise da acetiltiocolina e reação de Ellman.



A diminuição da banda cromatográfica referente ao produto na presença e ausência do inibidor padrão pode ser observada na **Figura 23**.

Figura 23: Cromatograma ilustrando o decréscimo da atividade enzimática do ICER-AChE_{ee} na presença de inibidor padrão a $200 \mu\text{molL}^{-1}$.



Os percentuais de inibição foram obtidos comparando-se a área da atividade da enzima na presença do inibidor (A_i) com a área da atividade da enzima na ausência de inibidor (A_0), de acordo com a **Equação 2**:

$$\% \text{ de inibição} = \left[1 - \frac{A_i}{A_0} \right] \times 100$$

As amostras de extratos foram preparadas na concentração de $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$, e as frações e substâncias puras na concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ solubilizadas em 100% metanol.

A partir da diluição das soluções estoque dos extratos ($1,5 \text{ mg mL}^{-1}$) e frações puras ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) foram preparadas soluções de $300 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e $200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ contendo: $60 \text{ } \mu\text{L}$ da solução de tampão trabalho, $20 \text{ } \mu\text{L}$ da solução do extrato e fração e $20 \text{ } \mu\text{L}$ da solução de ATChI. O volume final foi de $100 \text{ } \mu\text{L}$. As soluções foram preparadas em duplicatas e alíquotas de $10 \text{ } \mu\text{L}$ foram injetadas no ICER.

3.3.2.3 Ensaio de citotoxicidade

Estes ensaios foram realizados em parceria com Prof. Dr. Diego Wilke (LBBM-NPDM) UFC-CE.

O ensaio baseia-se na medida da absorbância da formazana, que se forma após a metabolização do sal de MTT pelas células tumorais viáveis (MOSMANN, 1983).

Células tumorais de adenocarcinoma de cólon (HCT-116) cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino foram inoculadas em placas de 96 poços e expostas às amostras por 72 horas. Três horas antes do término do tempo de incubação, o sal de MTT ($0,5 \text{ mg/mL}$) foi adicionado e a absorbância, medida a 595 nm . A triagem inicial foi realizada utilizando 2 concentrações das amostras para avaliar a porcentagem de inibição do crescimento da célula tumoral (%GI). Para amostras que demonstraram inibição maior que 75%, o valor de CI_{50} foi calculado por regressão não linear utilizando o GraphPad Prism 4.0 (Intuitive Software for Science).

3.3.2.4 Ensaio Leishmanicida

Ensaio realizado em parceria com Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo (LQMC) USP-São Carlos.

As linhagens de *Leishmania*, *donovani* e *infantum* (MHOM / MA / 67 / ITMAP-263) foram mantidas em meio M199 (pH 7,4) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor e crescido a $28 \text{ } ^\circ\text{C}$ (GUPTA, S.; 2011) Os extratos foram diluídos em meio de cultura e testados a $20 \text{ } \mu\text{g / mL}$. Ensaios fluorimétricos foram realizados em placas de microtitulação de 96 poços de fundo plano, com cada poço contendo $100 \text{ } \mu\text{L}$

de meio de cultura com uma população inicial de 1.10^5 células de *L. infantum* obtidas de culturas axênicas de crescimento logarítmico. Nos poços de controlo negativo (100% de crescimento de parasitas), todos os componentes do ensaio foram adicionados exceto nos extratos. Como controle positivo, utilizou-se o medicamento de referência miltefosina ($50\mu\text{M}$). Após 72 horas de incubação, $10\ \mu\text{l}$ de Alamar Blue® (LOSET, J. R.; 2009) foram adicionados a cada poço e as placas foram incubadas por 3 horas. Este indicador permeia parasitas viáveis, onde é reduzido pelas enzimas NADPH e NADH ao composto resorufin altamente fluorescente (SHIMONY, O.; 2008). Posteriormente, as placas foram lidas com um fluorômetro de microplaca sob um comprimento de onda de excitação de 536 nm e comprimento de onda de anemissão de 588 nm (MIKUS, J., & STEVERDING, D.; 2000). A inibição do crescimento foi expressa como uma porcentagem da fluorescência dos poços de controle negativo (100% de crescimento do parasita).

3.3.2.4 Ensaio Tripanocida

Ensaio realizado em parceria com Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo (LQMC) USP-São Carlos.

Para a realização do ensaio de inibição do crescimento de *Trypanosoma cruzi*, fibroblastos humanos (HFF-1) são cultivados em meio DMEM suplementado com 10% de FCS (5% de CO_2 a 37°C). Cultura in vitro de *T. cruzi* e culturas axênicas de epimastigotas de *T. cruzi* são mantidas a 28°C em meio LIT (10% FCS).

As epimastigotas em crescimento exponencial são coletadas, centrifugadas (10 min, 250 RCF) e ressuspensas em 1 mL de Grace's Insect Medium (10% FCS). A diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos é monitorada de 5 a 14 dias. Em seguida, os parasitas são coletados e utilizados para infectar células HFF-1 em meio DMEM, sem vermelho de fenol (10% de FCS, 5% de CO_2 a 37°C).

Para realização do ensaio antiparasitário, a triagem de metabólitos contra *T. cruzi* é realizada em placas de cultura de tecidos de 96 poços. Os fibroblastos humanos HFF-1 são adicionados a 5×10^4 células / poço em 80 mL de DMEM, sem vermelho de fenol e incubados de um dia para o outro.

No dia seguinte, os tripomastigotas em Grace's Medium são adicionados a 5×10^5 células / poço. Após 24 horas, o meio é removido para limpar os parasitas não infectantes,

substituindo os poços por 100 μL de meio fresco. Em seguida, os extratos são adicionados a 20 μg / mL e as placas são incubadas durante 120 h (5% de CO_2 a 37°C).

Todas as placas incluem controles negativos e benzonidazol como controle positivo. Em seguida, 50 μL de CPRG (1mM) e Igepal CA-630 (concentração final de 0,1%) são adicionados a cada poço. Em poços com atividade de β -galactosidase, a cor do meio muda de amarelo para vermelho, e a mudança de cor é medida a 570 nm em um leitor de microplaca de absorvância. Os dados são transferidos para uma planilha do Excel e avaliados para determinar a porcentagem de inibição em relação aos controles não tratados. A inibição do crescimento é expressa como uma porcentagem da absorvância dos poços de controle negativos (100% de crescimento do parasita).

3.3.2.5 Triagem de inibidores de enzimas serino-proteases envolvidas em diferentes etiologias.

Este ensaio foi realizado em parceria com Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso (GCBPN) da USP-Ribeirão Preto.

Foi aplicado a metodologia de nanofracionamento on-line e vários ensaios (ensaio luminescente bacteriano, ensaios anticoagulantes baseados na enzima plasmina, ensaios fluorescentes baseados na enzima calicreína e bioensaios de detecção de absorvância para monitorar a inibição de proteases no plasma) para rastrear a bioafinidade do extrato, visando suas propriedades antibióticas, bem como a atividade de inibição de proteases obtidas a partir de venenos de cobras.

Os ensaios foram realizados após uma etapa de separação cromatográfica em sistema otimizado em gradiente em CL, por nano-fracionamento em placas de 384 poços. As placas foram secas em um sistema à vácuo e baixa temperatura (SpeedDryer plate) e armazenadas a -80°C até realização do ensaio. Os substratos e reagentes em cada ensaio são aplicados na placa com as amostras utilizando um robô de pipetagem e analisados em leitores de placas de alta sensibilidade, por medidas de absorvância ou fluorescência ou luminescência.

A) Plasma coagulation assay: busca por compostos inibidores da enzima envolvida no processo de coagulação do sangue.

B) Plasmin enzyme assay: busca por compostos inibidores da enzima plasmin, envolvida na fibrinólise e na cascata de coagulação do sangue.

C) Snake Venoms assay: triagem de inibidores de proteases presentes na composição dos venenos, nesse estudo 6 diferentes venenos foram utilizados na triagem. Os ensaios são colorimétricos (Plasma assay) e fluorimétricos (Plasmin e Snake Venoms assay).

3.3.2.5.1 Protocolo para Triagem de atividade de protease

Ensaio realizado em parceria com a estudante de graduação Coleen Neumann (Holanda), sob co-orientação da profa. Dra. Carmem Lúcia Cardoso.

Os extratos foram dissolvidos em 90% de metanol e 10% de água MilliQ® a uma concentração de 10 mg.mL⁻¹. Esta solução foi diluída a 1/2 e 1/25, de modo que um total de três concentrações do extrato poderia ser triado: 10, 5 e 0,4 mg.mL⁻¹.

Em seguida, adicionaram-se 5 µL de cada concentração (10, 5 ou 0,4 mg.mL⁻¹) do extrato bruto de metanol / água a uma placa. Em seguida, as concentrações finais do extrato bruto por poço foram de 1, 0,5 ou 0,04 mg.mL⁻¹. Utilizou-se a leupeptina 5 como controlo positivo para o rastreio da inibio. Para este fim, 5 µl de leupeptina 50 µM em água MilliQ® foram adicionados aos poços de controlo apropriados. Nesta fase, a placa continha leupeptina juntamente com os extratos e podia ser evaporada. As amostras testadas foram AS 01 MQ, SV 01 MQ, DM 02 MAR, DM 03 MAR e os venenos de serpente analisados foram: *E. carinatus*, *D. R. russelli*, *C. rhodostoma*, *E. Ocellatus*.

3.3.2.6 Triagem para Antibióticos

A) Triagem para atividade antibiótica contra *E. coli* modificada K12 (ensaio luminescente).

B) Atividade anti-inflamatória seletiva na presença de COX-1 e COX-2.

3.3.2.6.1 Protocolo para Bioensaio bacteriano

Preparação de meio LB: O caldo Lysogeny (LB), um meio nutricionalmente rico, é usado principalmente para cultivar bactérias.

Preparação de 1 litro de meio LB: foram medidos em um cilindro de medição de 1 L: 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura e 10 g de NaCl. Os sólidos foram suspensos em 1 L de água MilliQ®. A mistura foi deixada na placa de agitação até que tudo estivesse misturado e nenhum dos ingredientes sólidos estivesse preso às paredes do cilindro de

medição. Os ingredientes sólidos não se dissolveram completamente no líquido. Alíquotas do meio foram adicionadas em cinco frascos diferentes, que foram autoclavados a 121°C durante 20 min. O meio foi deixado esfriando à temperatura ambiente e depois o balão foi agitado para manter a mistura.

3.3.2.7 Triagem para Bioensaio de Plasma:

Este protocolo utilizou as seguintes soluções: substrato HD-Val-Leu-Lys-AMC (20 mM em DMSO), enzima plasmina (435 µg.mL⁻¹ em água / glicerol (50:50, v / v), tampão (Tris-HCl 100 mM, 0,1% BSA, pH 7,5) e inibidor padrão leupeptina (20 mM em água)

As condições de bioensaio foram HD-Val-Leu-Lys-AMC 5, plasmina 100 ng.mL⁻¹, tamp Tris-HCl 100 mM e 0,1% de BSA (pH 7,5), leupeptina 5M, volume final do bioensaio de 50mL , leitura de fluorescência (Exc / Em) a 380/460 nm e temperatura de 37 °C.

3.3.2.7.1 Protocolo para Bioensaio de Plasma

Três tubos Grainier foram preparados e rotulados S (para substrato), E (para enzima) e W (para lavagem). Os tubos S e E foram preenchidos com 15 mL do tampão e, posteriormente, foi adicionado 7,5 µL do substrato-H-D-Val-Leu-Lys-AMC ao tubo S, seguido de leve agitação. Posteriormente, foram adicionados 6,88 µL da enzima ao tubo E seguido de leve agitação. O conteúdo dos tubos S e E foram misturados e, utilizando o robô de pipetagem, a mistura do bioensaio foi pipetada sobre a placa (50 µL) que foi inserida no leitor de placas para medida de sua fluorescência.

Nesta abordagem de seleção de bioafinidade, as soluções estoque dos extratos foram preparadas a 10 mg.mL⁻¹ em ACN / H₂O 1: 1 v / v ou MeOH / H₂O 1: 1 v / v. Os ensaios de inibição foram realizados em placas de microtitulação de 384 poços utilizando o método de microdiluição em série para concentrações de 0,5, 1,0, 3,0, 5 e 10 mg.mL⁻¹ para os bioensaios enzimáticos e de 25 a 800 µg.mL⁻¹. para o ensaio bacteriano.

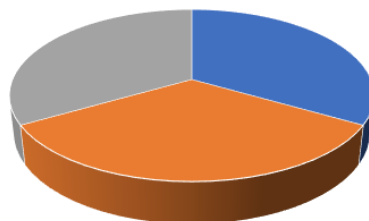
Para otimizar a separação cromatográfica das amostras, gradientes lineares foram obtidos usando Solvente A (H₂O / ACN 98: 2 e 0,1% FA ou H₂O / MeOH 98: 2 e 0,1% FA) e Solvente B (ACN / H₂O 98: 2 e 0,1% de FA ou MeOH / H₂O 98: 2 e 0,1% de FA).

3.4 Cultivo dos fungos endofíticos em escala reduzida e obtenção dos extratos brutos.

3.4.1 Metodologia utilizada para realização dos cultivos:

Todas as linhagens de fungos endofíticos isolados das algas em estudo foram repicadas para placas de Petri contendo PDA e incubadas por 7-14 dias, dependendo da espécie. A seguir cada placa foi dividida em três partes iguais (**Figura 24**) e, aproximadamente 1/3 do micélio de cada linhagem foi inoculada em 3 frascos de Erlenmeyer (500 mL) de boca larga contendo 200 mL de meio de cultivo líquido Extrato de Malte, preparado na concentração de 20 g L⁻¹, os quais foram mantidos em modo estático a 25°C por 28 dias.

Figura 24: Divisão dos micélios cultivados em BDA para posterior repique em meio líquido.



Fonte: Elaboração própria

Após esse período, o caldo fermentado foi separado do micélio por filtração a vácuo. O caldo foi submetido a partição líquido/líquido com AcOEt (3 x 300 mL) e posteriormente lavado com água (2 x 450 ml) para melhor remoção dos compostos provenientes do meio de cultura. A fração AcOEt foi então concentrada em rota-evaporador, fornecendo o extrato bruto AcOEt de cada linhagem fúngica (**Fluxograma 1**).

Estes foram submetidos a avaliação química por CCDC sobre sílica gel e fase móvel CHCl₃:MeOH (87:13 v/v), CLAE-DAD e RMN de ¹H, conforme metodologias descritas anteriormente.

3.4.2 Identificação dos fungos endofíticos

Os micro-organismos isolados apresentavam grande variação morfológica entre si. Por esse motivo, foram cultivados isoladamente até que fossem identificados corretamente.

A identificação por taxonomia molecular e morfologia, foi realizada em parceria com o Prof. Dr. Marcos Antônio Soares (UFMT, Cuiabá/MT). As cepas fúngicas foram agrupadas morfologicamente e o agrupamento foi confirmado pela análise de traços em microscópios utilizando lâminas de microcultura e posteriormente comparados com dados taxonômicos.

Os endófitos foram armazenados sob refrigeração em meio PDA e em tubos com arroz esterilizado. O DNA de cada cepa foi extraído utilizando o Kit de Isolamento de DNA Genômico (Norgen Biotek Corporation, Thorold, ON, Canadá), de acordo com o protocolo do fabricante. As seqüências obtidas foram analisadas com o Editor de Alinhamento de Seqüência BioEdit (versão 7.2.5) e comparado com seqüências depositadas no banco de dados do NCBI GenBank (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia).

A PCR para amplificação da região de codificação ITS (Internal Transcribed Sequence), que é a região mais utilizada mundialmente para identificação de fungos, foi realizada com auxílio dos primers ITS1 e ITS4 na concentração de 10 picomols. O volume final de cada amostra foi de 25 microlitros, posteriormente inserida no termociclador usando a programação abaixo:

- I) Inicialização: 94°C por 3 min.
- II) 35 ciclos: 94°C por 0:45s, 49°C por 0:45s, 72°C por 0:50s
- III) Extensão final 72°C por 10 min.

Para avaliar a eficiência do PCR, foi preparado um gel de agarose 0.85% corado com brometo de etídeo, onde foi aplicado, em cada poço, 5 microlitros da amostra junto com tampão. O gel foi submetido a eletroforese com intensidade de 90 volts durante 40 min. Em seguida, o gel foi analisado por fotodocumentador UV, para observar a formação de bandas no gel, indicando que a metodologia para o PCR foi eficiente. Com isso, esta foi submetida a sequenciamento usando os reagentes big dye, água ultrapura e big dye terminator, nas concentrações indicadas pelo fabricante, sendo então inseridas no sequenciador de Sanger modelo ABI 3500 por 12h.

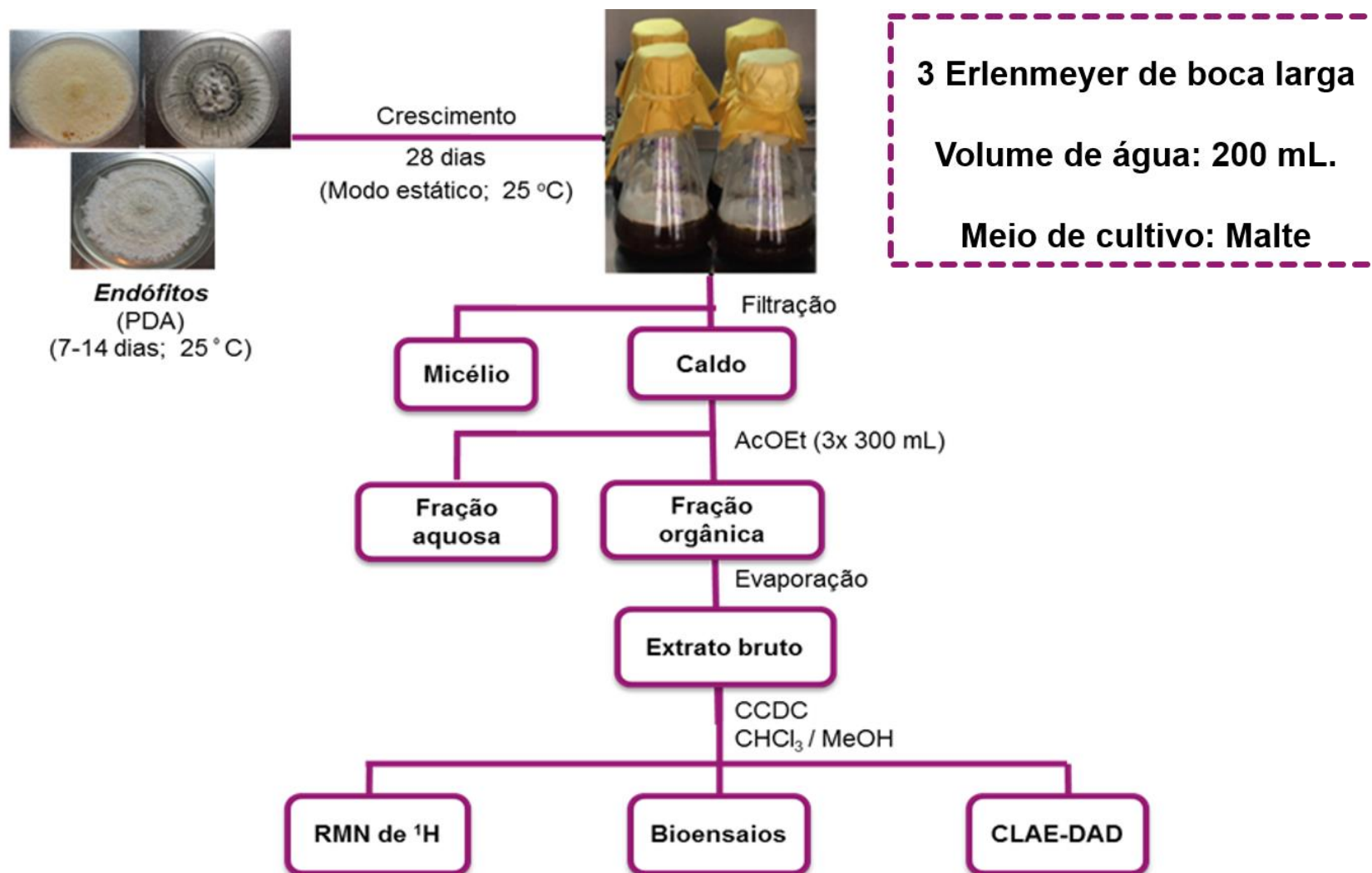
O resultado da etapa anterior é uma seqüência de nucleotídeos, com cerca de 500 pares de base (pb) por amostra. As seqüências foram visualizadas no software Bioedit e cada seqüência foi comparada com o banco de dados GenBank (ferramenta Blast), que

fornece o resultado da similaridade em forma de porcentagem, sendo considerado satisfatório as similaridades acima de 96%.

As espécies foram classificadas nas categorias fitopatógeno, saprófito, micotrófico, entomopatógeno coprófilos, de acordo com os critérios estabelecidos pelos relatórios da literatura e os Serviço de Pesquisa Agrícola do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA-ARS) banco de dados.

Posteriormente, as linhagens foram depositados na micoteca do NuBBE com os códigos AS=*Acanthophora spicifera*, DM=*Dichotomaria marginata* e SV=*Sargassum vulgare*, de acordo com as algas a que estavam associados, seguido de números de acordo com a ordem de isolamento (**Figura 25**).

Fluxograma 1: Obtenção e triagem química e biológica dos extratos brutos obtidos.



Fonte: Elaboração própria

Figura 25: Fungos identificados e seus códigos de isolamento.

FUNGO ISOLADO	CÓDIGOS
<i>Annulohyphoxylon atroroseum</i>	DM 05 M2 MAR
<i>Annulohyphoxylon stygium</i>	AS 01 M2 MQ DM 03 M2 MQ DM 06 M2 MQ
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	DM 03 M1 MAR
<i>Diaporthe terebinthifolii</i>	AS 02 M2 MQ DM 03 M1 MQ A DM 04 M1 MAR
<i>Entonoema pallida</i>	SV 01 MQ
<i>Fusarium begoniae</i>	AS 05 MQ M2 B
<i>Fusarium solani</i>	DM 08 MAR B
<i>Hypoxylon monticulosum</i>	AS 02 MAR AS 03 MAR AS 04 MQ AS 05 MQ AS 06 MQ AS 07 M1 MQ B AS 08 M2 MQ AS 09 M2 MQ DM 01 M1 MQ DM 02 M1 MQ DM 02 M1 MAR DM 06 MAR DM 07 MAR M2 B DM 08 Mar A
<i>Neopestalotiopsis natalensis</i>	AS 01 M2 MAR DM 04 M1 MAR
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	DM 01 M1 MAR
<i>Roussoella neopustulans</i>	DM 04 M2 MQ
<i>Xylaria coccophora</i>	AS 03 MQ M1

Fonte: Elaboração própria

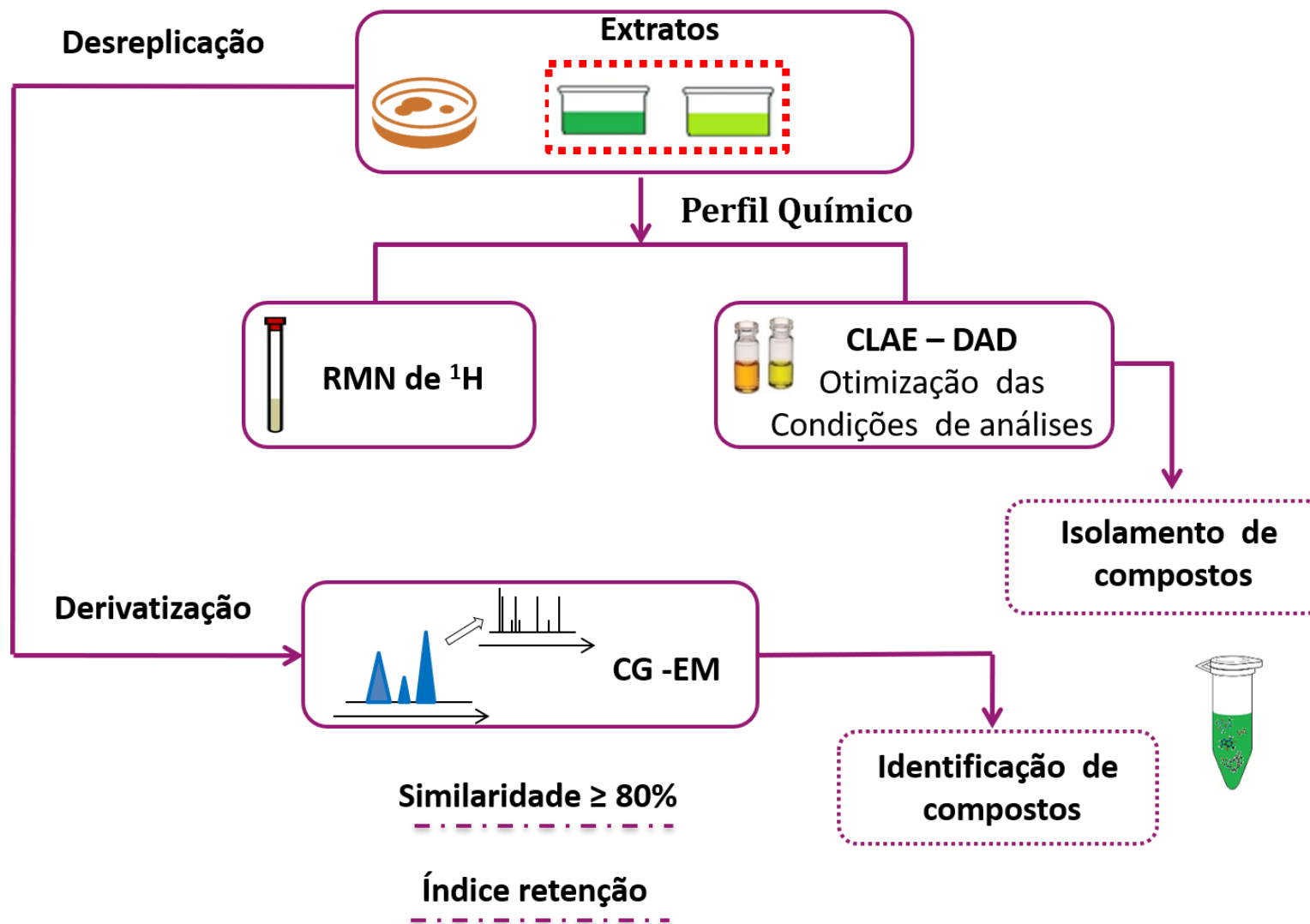
3.4.3 Escolha do meio de cultivo.

Inicialmente planejou-se que os fungos seriam inoculados em diferentes meios de cultivos para verificar a variação metabólica em diferentes meios, mas, tendo em vista a grande quantidade de linhagens isoladas, optou-se por pré-definir apenas um meio de cultivo visando reduzir o número de experimentos. Foi então selecionado o meio líquido Extrato de Malte por ser um meio de fácil obtenção no laboratório, apresentar facilidade em ser trabalhado e por ter demonstrado resultados muito satisfatórios com relação à produção metabólica em trabalhos realizados anteriormente.

3.4.4 Escolha das linhagens dos fungos endofíticos.

Todas as linhagens foram cultivadas em escala reduzida e tiveram seu perfil químico e biológico analisados. Após, foram derivatizados para identificação de seus metabólitos por CG-EM. Para prosseguir o estudo em escala ampliada, os endófitos foram avaliados e selecionados de acordo com as massas de extratos obtidas nos experimentos em escala reduzida, a quantidade de substâncias produzidas por comparação dos seus perfis químicos, bem como por apresentarem resultados promissores nos ensaios biológicos testados (**Figura 26**).

Figura 26: Metodologia de estudo das linhagens isoladas.



Fonte: Elaboração própria

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor discussão, os diferentes tópicos foram separados em capítulos.

CAPÍTULO 1. Avaliação química dos extratos brutos

4.1 Análise química dos extratos brutos

Todos os extratos produzidos foram avaliados pela quantidade de massa produzida (**Tabela 3**), perfil químico por CCDC, RMN de ^1H , CLAE-DAD e CG-EM. Em seguida, os dados foram comparados para escolha dos mais promissores para continuidade do estudo.

4.1.1 Quantidade dos extratos brutos produzidos

Tabela 3: Massas dos extratos brutos obtidas nos experimentos de escala reduzida

Extratos <i>A. spicifera</i>	Massa (mg)	Extratos <i>D. marginata</i>	Massa (mg)
AS 01 MQ	100	DM 01 MQ	136
AS 01 MQ Planej.	77	DM 01 MAR	60
AS 02 MQ	116	DM 01 MAR B	112
AS 02 MAR	158	DM 02 MQ A	294
AS 03 MQ	135	DM 02 MQ B	286
AS 03 MAR	120	DM 02 MAR A	120
AS 04 MQ	246	DM 02 MAR B	85
AS 04 MQ B	95	DM 03 MQ A	138
AS 05 MQ	703	DM 03 MAR A	78
AS 05 MQ A	30	DM 03 MAR B	140
AS 06 MQ	302	DM 04 MAR	100
AS 07 MQ B	297	DM 05 MAR	53
AS 08 MQ	255	DM 06 MQ A	64
AS 09 MQ A	712	DM 06 MQ B	51
AS 09 MQ B	698	DM 06 MAR A	262
		DM 06 MAR B	161
Extratos <i>S. vulgare</i>	Massa (mg)	DM 07 MAR A	40
SV 01 MQ	290	DM 07 MAR B	202
		DM 08 MAR A	86
		DM 08 MAR B	36

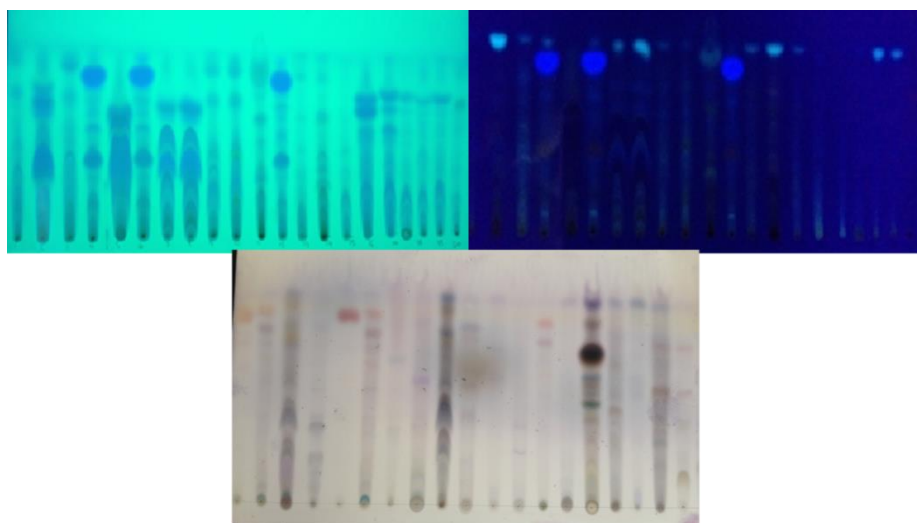
Fonte: Elaboração própria

Pode-se observar na **Tabela 3** uma grande variação na quantidade de extrato produzido quando comparamos os diferentes fungos presentes em uma mesma alga hospedeira, assim como quando comparada entre as diferentes espécies de algas.

4.1.2 Perfil Químico por CCDC dos extratos brutos

Após eluição dos extratos por CCDC estes foram analisados em 254 e 360 nm, seguido de revelação com anisaldeído, respectivamente (**Figura 27**).

Figura 27: Análise por cromatografia em camada delgada comparativa dos extratos.



Fonte: Elaboração própria.

Foi possível notar uma grande variedade de metabólitos produzidos pelas linhagens fúngicas em estudo, apresentando compostos com alta, média e baixa polaridade.

De modo geral, os espectros de RMN de ^1H evidenciaram sinais em uma ampla faixa espectral demonstrando a presença de substâncias aromáticas, sinais de hidrogênios carbinólicos, metílicos, metilênicos, metínicos, dentre outros. A diversidade de sinais ressalta a grande variabilidade química dos extratos produzidos pelos fungos em estudo. A análise comparativa dos dados evidenciou que todos os extratos apresentaram perfil químico muito diferenciado entre si, sugerindo que cada linhagem produz compostos que podem eventualmente contribuir de diferentes formas para os hospedeiros.

4.2 Análise do perfil químico dos endófitos

Após obtenção dos extratos brutos, estes foram analisados por RMN de ^1H , CLAE-DAD e derivatizados para identificação de compostos presentes no extrato, conforme demonstrados a seguir.

4.2.1 Análise química do endófito *Annulohyphoxylon atroroseum*

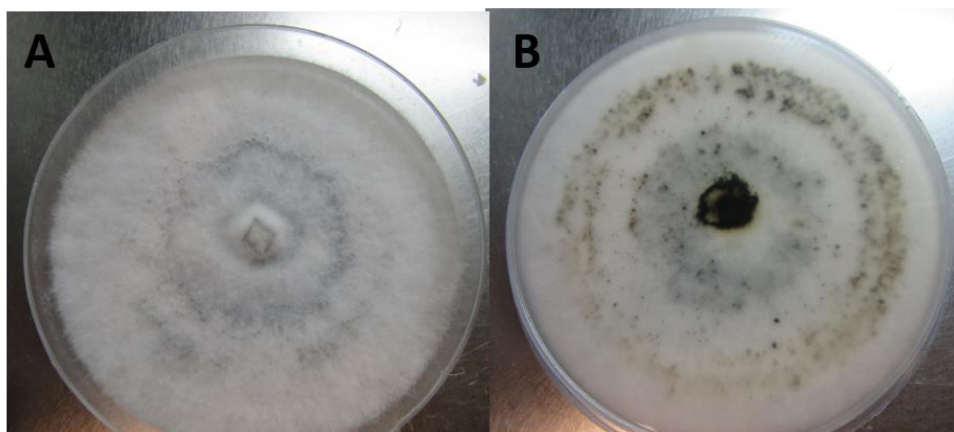
A família Xylareaceae é uma das maiores dentre as famílias dos Ascomycotas. Ela é amplamente estudada e compreende cerca de 85 gêneros (KIRK et al., 2008), com representantes distribuídos por todo o globo terrestre, embora sua maior concentração seja em regiões tropicais (ROGERS, 2000, STADLER et al., 2013).

Annulohyphoxylon foi considerado por algum tempo como uma parte do gênero *Hyphoxylon*, entretanto, devido a diferenças nas características morfológicas, taxonômicas e quimiotaxonômicas, percebeu-se que se tratava de um novo gênero (FOURNIER et al., 2010; MACIEL et al., 2018).

Pesquisas em bases de dados demonstraram que o fungo *A. atroroseum* não apresenta estudos químicos e biológicos.

O endófito foi isolado de *D. marginata* (**Figura 28**) e repicado em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA preparado com água do mar de acordo com a metodologia utilizada no seu isolamento. Posteriormente foi cultivado em escala reduzida conforme **Fluxograma 1** fornecendo 53 mg de extrato bruto. A análise por RMN de ^1H (**Figura 29**) evidenciou sinais entre 0,5 e 12,0 ppm, referentes a hidrogênios metílicos, metilênicos, metínicos, olefínicos, carbinólicos, aromáticos, fenólicos, aldeídos e ácidos carboxílicos. A análise por CLAE-DAD em 254 nm (**Figura 30**) apresentou bandas por todo cromatograma, referentes a uma ampla diversidade de compostos de alta, média e baixa polaridade.

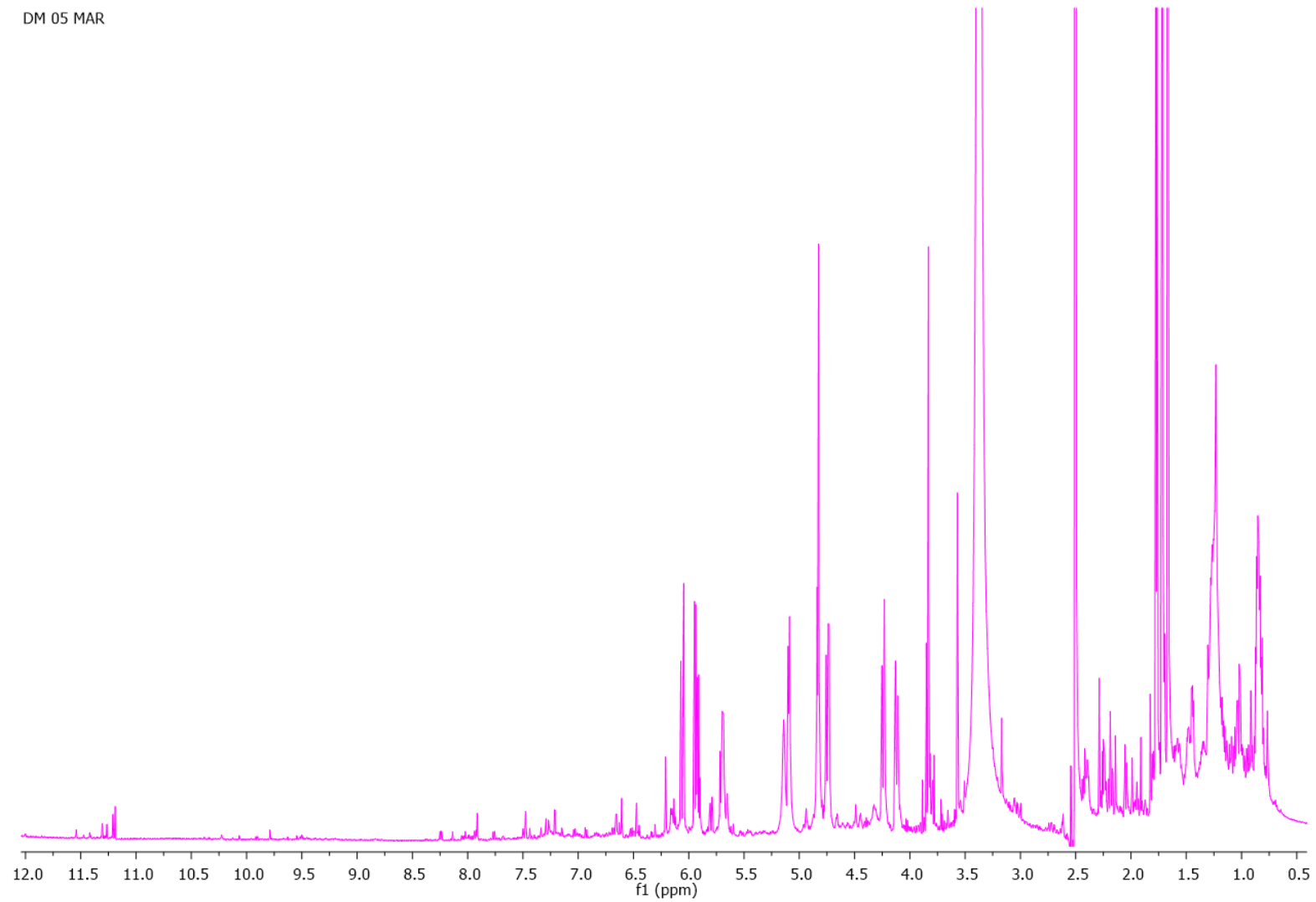
Figura 28: *A. atroroseum* isolado de *D. marginata* em água do mar: **A:** Superfície e **B:** parte inferior do endófito.



Fonte: Elaboração própria

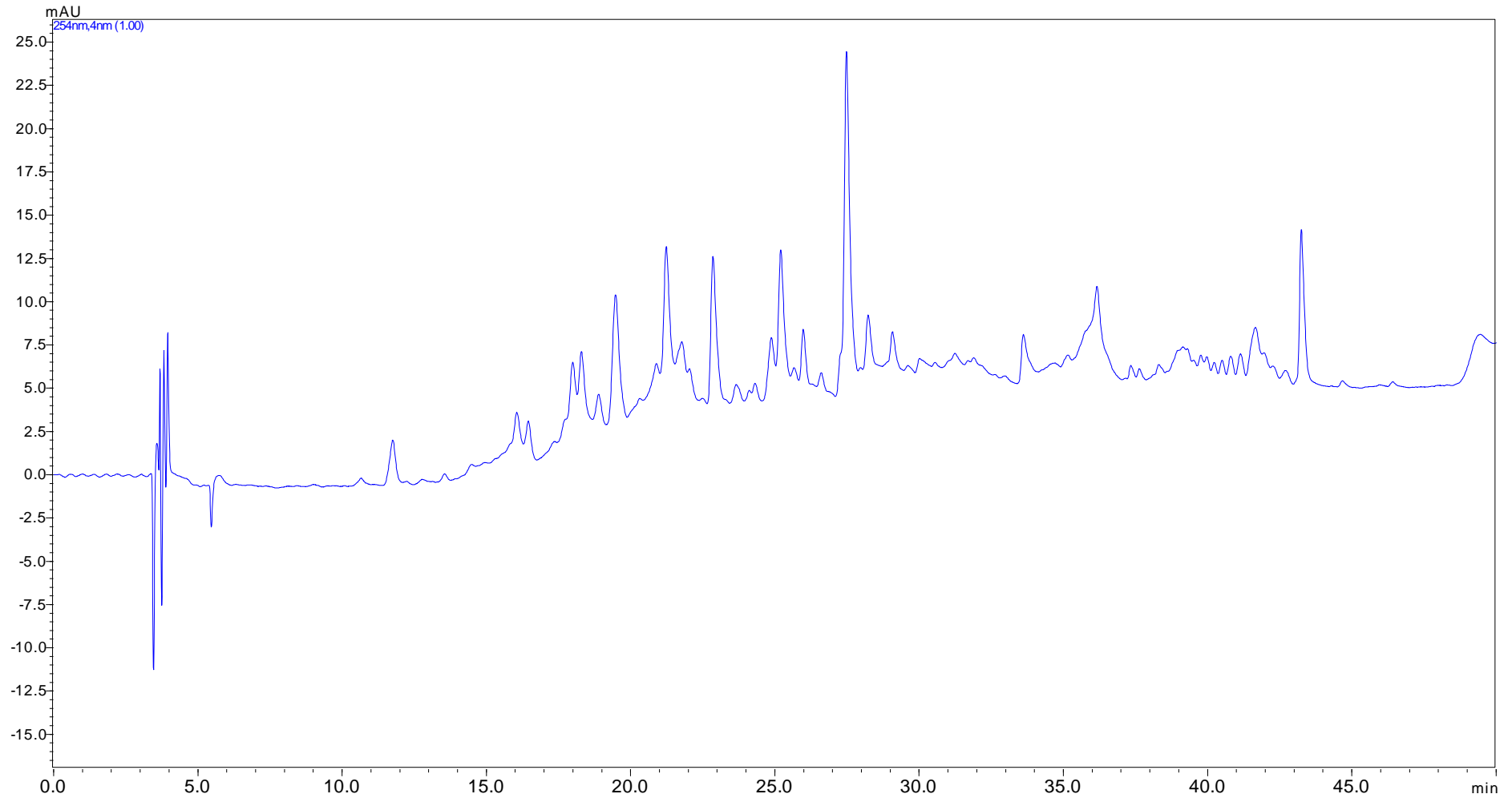
Figura 29: Espectro de RMN de ^1H do extrato de *A. atroroseum* em água do mar (DMSO- d_6 , 300 MHz).

DM 05 MAR



Fonte: Elaboração própria

Figura 30: Cromatograma da análise por CLAE-DAD – fase reversa do extrato bruto de *A. atroroseum* em modo gradiente, com detecção em 254nm.



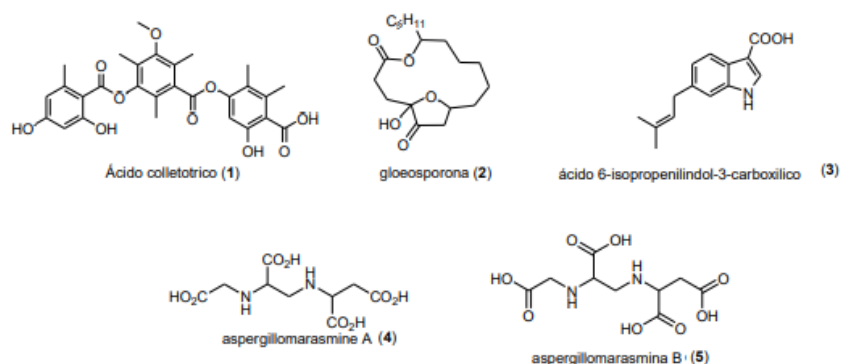
Fonte: Elaboração própria

4.2.2 Análise química do endófito *Colletotrichum gloeosporioides*.

O gênero *Colletotrichum* é membro da família Phylacoraceae e apresenta similaridade genética com taxons que compreendem endófitos, saprofíticos e fungos patogênicos de plantas. Se apresentam na maioria das vezes como fitopatógenos em regiões tropicais e subtropicais do mundo e são os causadores de uma ampla diversidade de doenças, conhecidas como antracnose (KUMAR et al., 2004; PHOTITA et al., 2004).

C. gloeosporioides é um endófito comumente isolado de uma grande variedade de espécies de plantas e, apesar de sua alta fitopatogenicidade, este endófito apresenta grande quantidade de metabolitos secundários bioativos de estruturas diversas e com alta atividade antimicrobiana (**Figura 31**), tais como ácido colletotrico (1), gloeosporona (2), ácido 6-isopropenilindol-3-carboxílico (3), aspergillomarasmina A (4) e B (5) entre outros.

Figura 31: Exemplos de metabolitos secundários bioativos isolados de *C. gloeosporioides*.



O endófito foi isolado de *D. marginata* (**Figura 32**) e repicado em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA preparado com água do mar. Posteriormente foi cultivado em escala reduzida conforme **Fluxograma 1** fornecendo 140 mg de extrato bruto. A análise por CLAE-DAD em 254 nm (**Figura 33**) evidenciou bandas por todo cromatograma, a maioria concentrado entre 15 e 30 minutos, referentes a compostos de média polaridade.

Figura 32: *C. gloeosporioides* isolado de *D. marginata* em água do mar: **A:** Superfície e **B:** parte inferior do endófito.

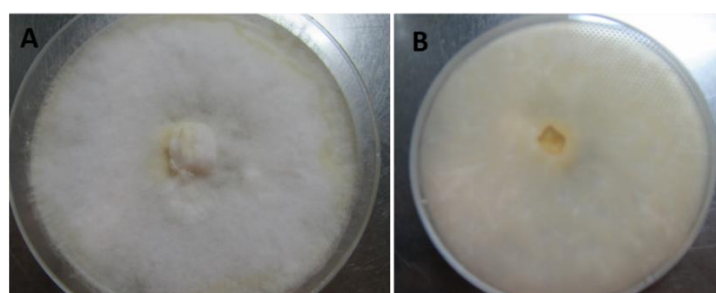
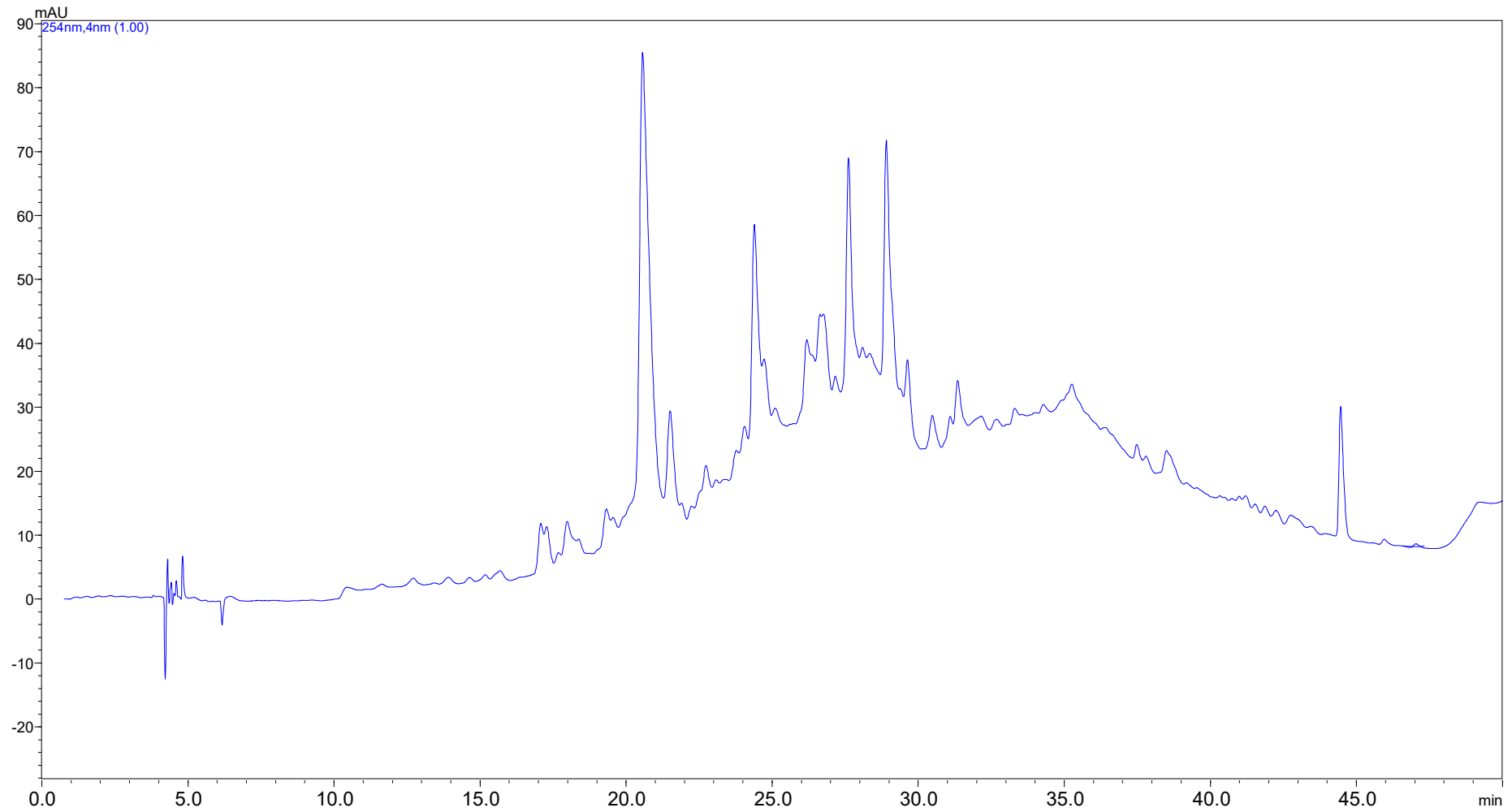


Figura 33: Cromatograma da análise por CLAE-DAD – fase reversa do extrato bruto de *C. gloeosporioides* em água do mar (modo gradiente, com detecção em 254nm).

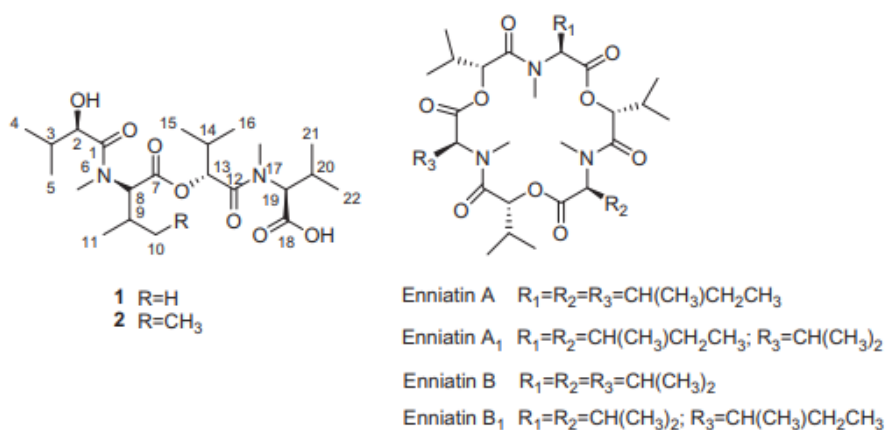


4.2.3 Análise química do endófito *Fusarium begoniae*.

Fungos do gênero *Fusarium* destacam-se pela capacidade de produzir uma variedade de micotoxinas, sendo as mais importantes os tricotecenos (vomitoxina e T-2 entre outras), as fumonisinas, a zearalenona, a moniliformina e o ácido fusárico.

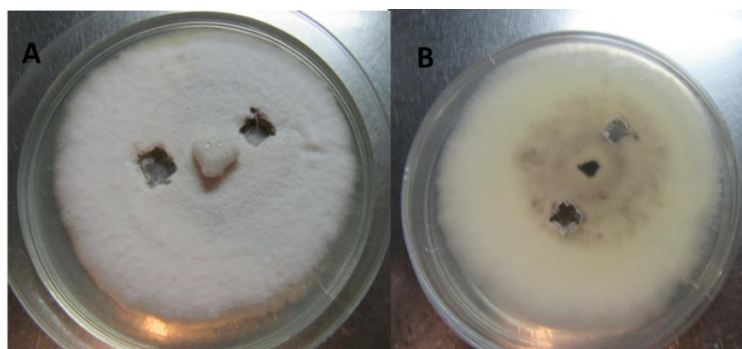
F. begoniae apresenta poucos estudo químico e biológico. Em termos estruturais, são conhecidos compostos como (3S, 6R) -3,6-diisopropil-4-metil-2,5-morfolinodiona, (3S, 6R) -3-sec-butil-6-isopropil-4-metil-2,5-morfolinodiona apresentados na **Figura 34**.

Figura 34: Exemplos de metabólitos secundários isolados de *F. Begoniae*.



O endófito foi isolado de *A. spicifera* (**Figura 35**) e repicado em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA preparado com água ultrapura. Posteriormente foi cultivado em escala reduzida conforme **Fluxograma 1** fornecendo 30 mg de extrato bruto. A análise por RMN de ¹H (**Figura 36**) evidenciou sinais entre 0,5 e 8,0 ppm, referentes a hidrogênios metílicos, metilênicos, metínicos, olefínicos, carbinólicos, aromáticos e fenólicos. A análise por CLAE-DAD em 254 nm (**Figura 37**) apresentou bandas por todo cromatograma, principalmente com tempos de retenção entre 20 e 30 minutos referentes a compostos de média polaridade.

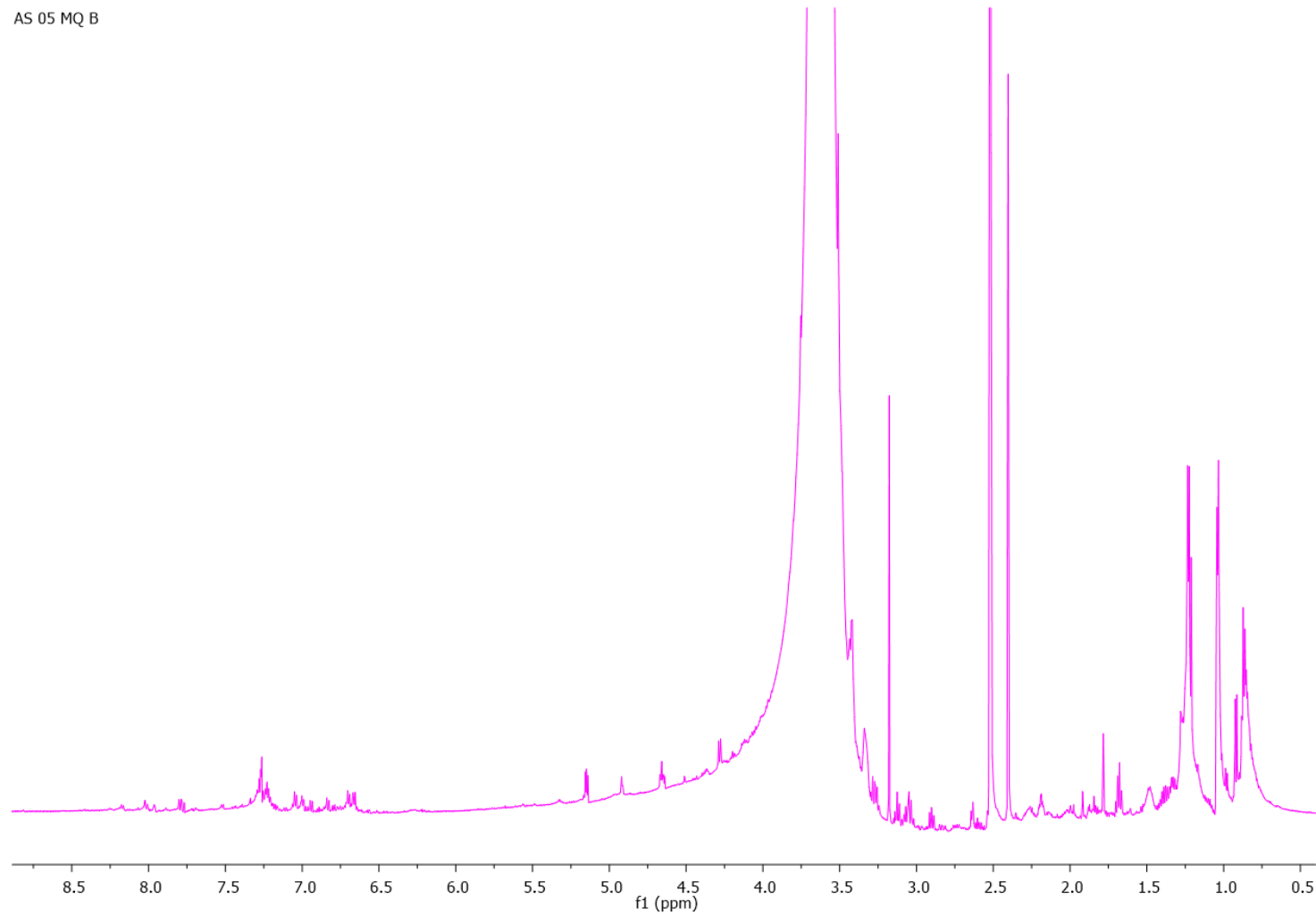
Figura 35: *F. begoniae* isolado de *A. spicifera* em água do mar: **A:** Superfície e **B:** parte inferior do endófito.



Fonte: Elaboração própria

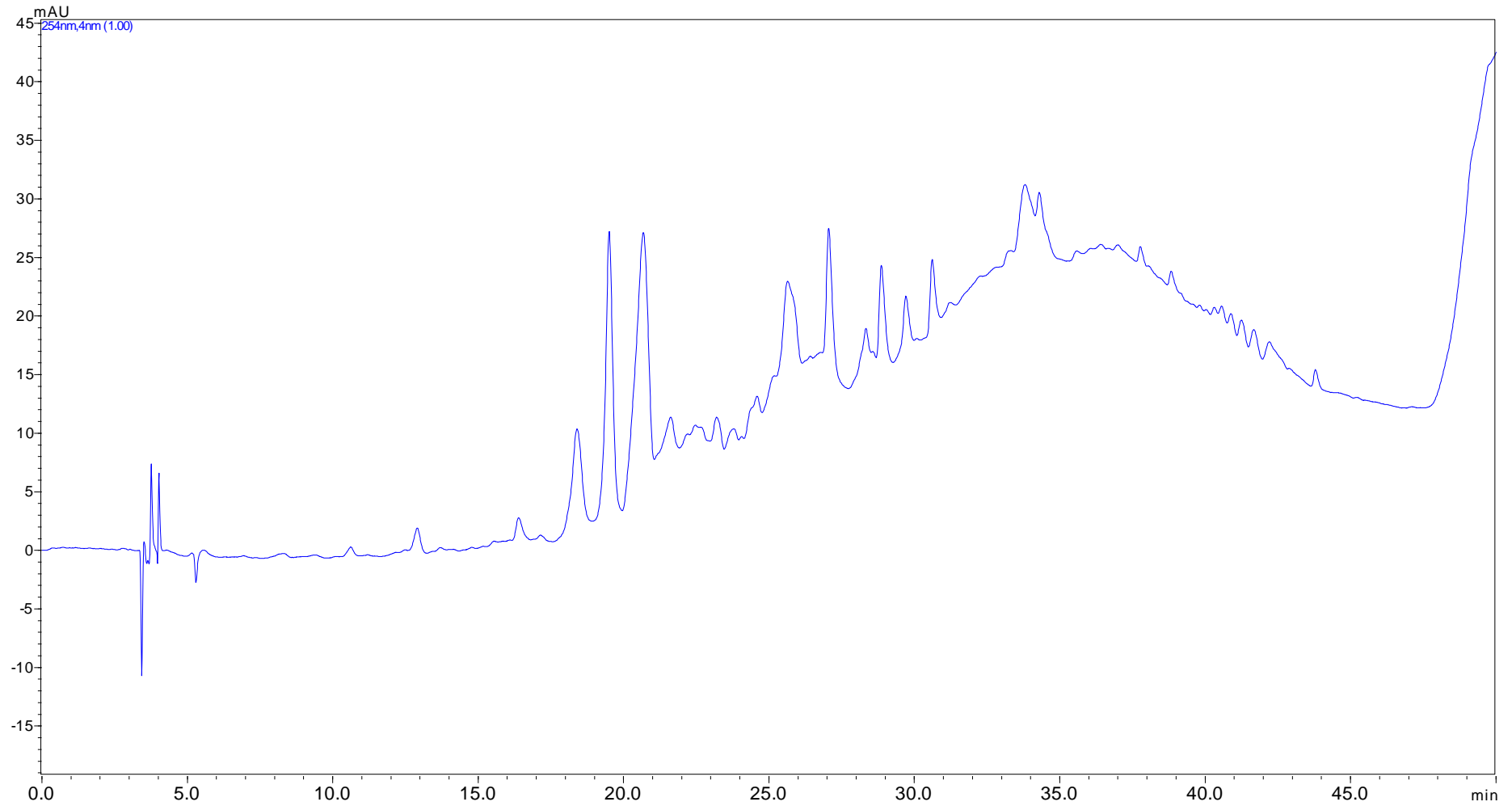
Figura 36: Espectro de RMN de ^1H do extrato de *F. begoniae* em água ultrapura (DMSO- d_6 , 300 MHz).

AS 05 MQ B



Fonte: Elaboração própria

Figura 37: Cromatograma da análise por CLAE-DAD – fase reversa do extrato bruto de *F. begoniae* em água ultrapura (modo gradiente, com detecção em 254nm).



Fonte: Elaboração própria

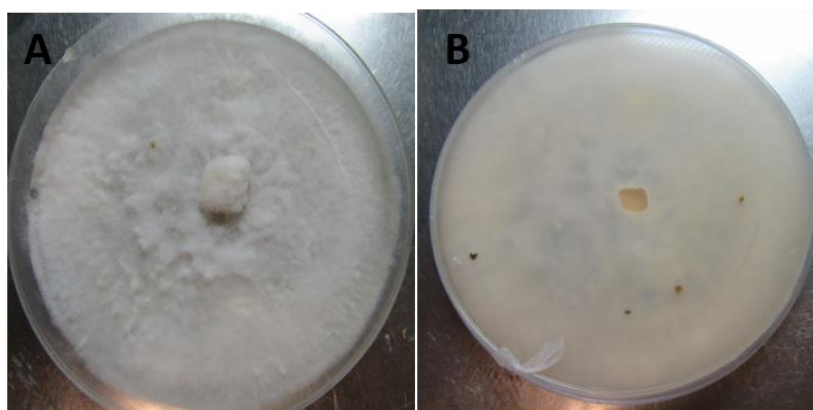
4.2.4 Análise química do endófito *Pestalotiopsis microspora*

Espécies de *Pestalotiopsis* são encontradas como parasitas ou endófitos, presentes no solo ou em ramos, folhas e sementes. São anamórficos pertencentes à ordem Melaconiales, família Amphisphariaceae.

Esse gênero apresenta grande potencial biotecnológico devido à produção de importantes metabólitos secundários, como o diterpenóide taxol, uma importante droga anticancerígena produzida por *P. guepinii*. Estes fungos também apresentam metabólitos com atividades antifúngica e antioxidante (Strobel et al., 2002).

O endófito foi isolado de *D. marginata* (**Figura 38**) e repicado em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA preparado com água do mar. Posteriormente foi cultivado em escala reduzida conforme **Fluxograma 1** fornecendo 60 mg de extrato bruto. A análise por RMN de ^1H (**Figura 39**) apresentou sinais entre 0,5 e 7,0 ppm, referentes a hidrogênios metílicos, metilênicos, metínicos, olefínicos, carbinólicos e aromáticos. A análise por CLAE-DAD em 254 nm (**Figura 40**) evidenciou bandas por todo cromatograma, principalmente com tempos de retenção entre 30 e 40 minutos referentes a compostos de baixa polaridade.

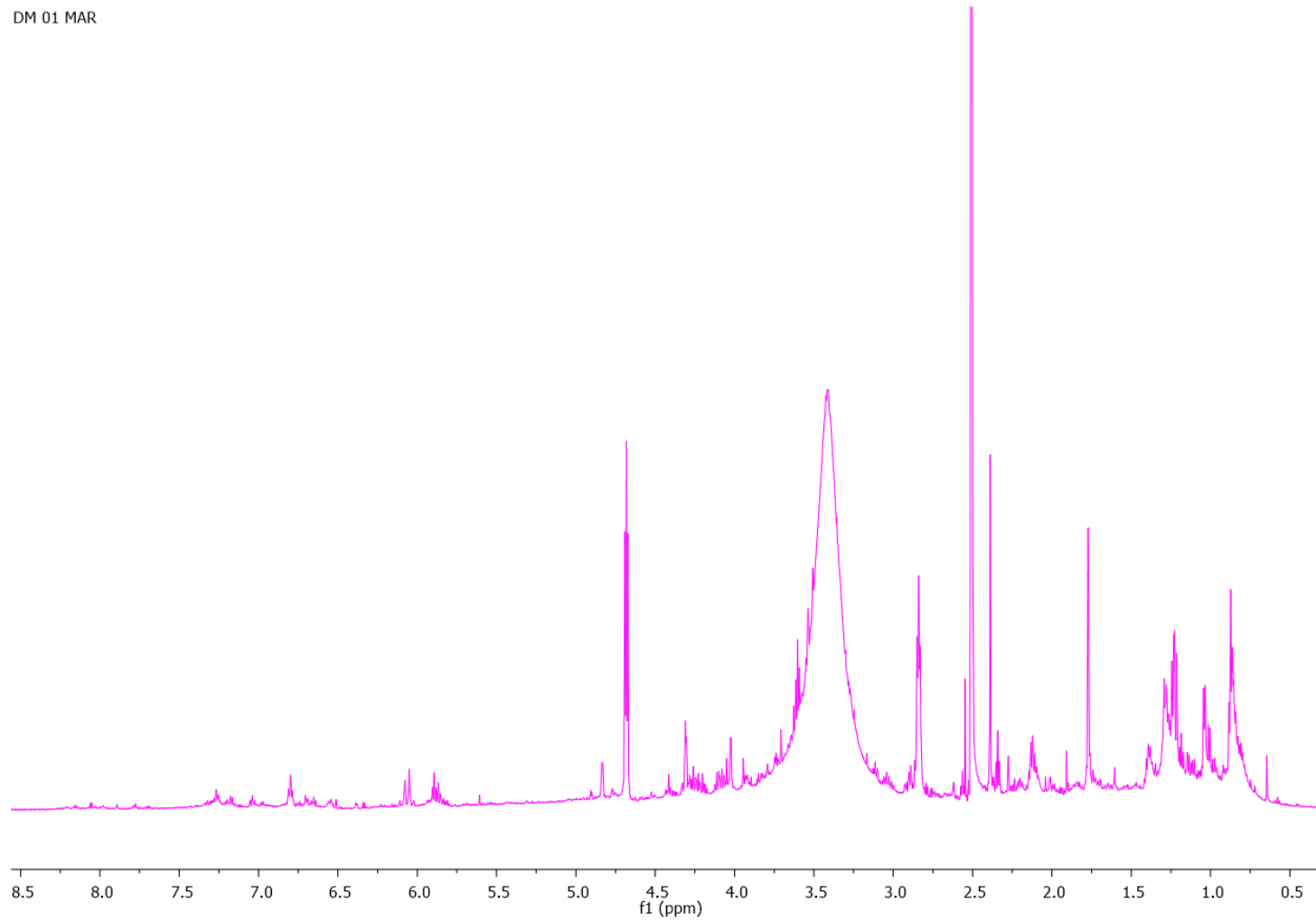
Figura 38: *P. microspora* isolado de *D. marginata* em água do mar: **A:** Superfície e **B:** parte inferior do endófito



Fonte: Elaboração própria

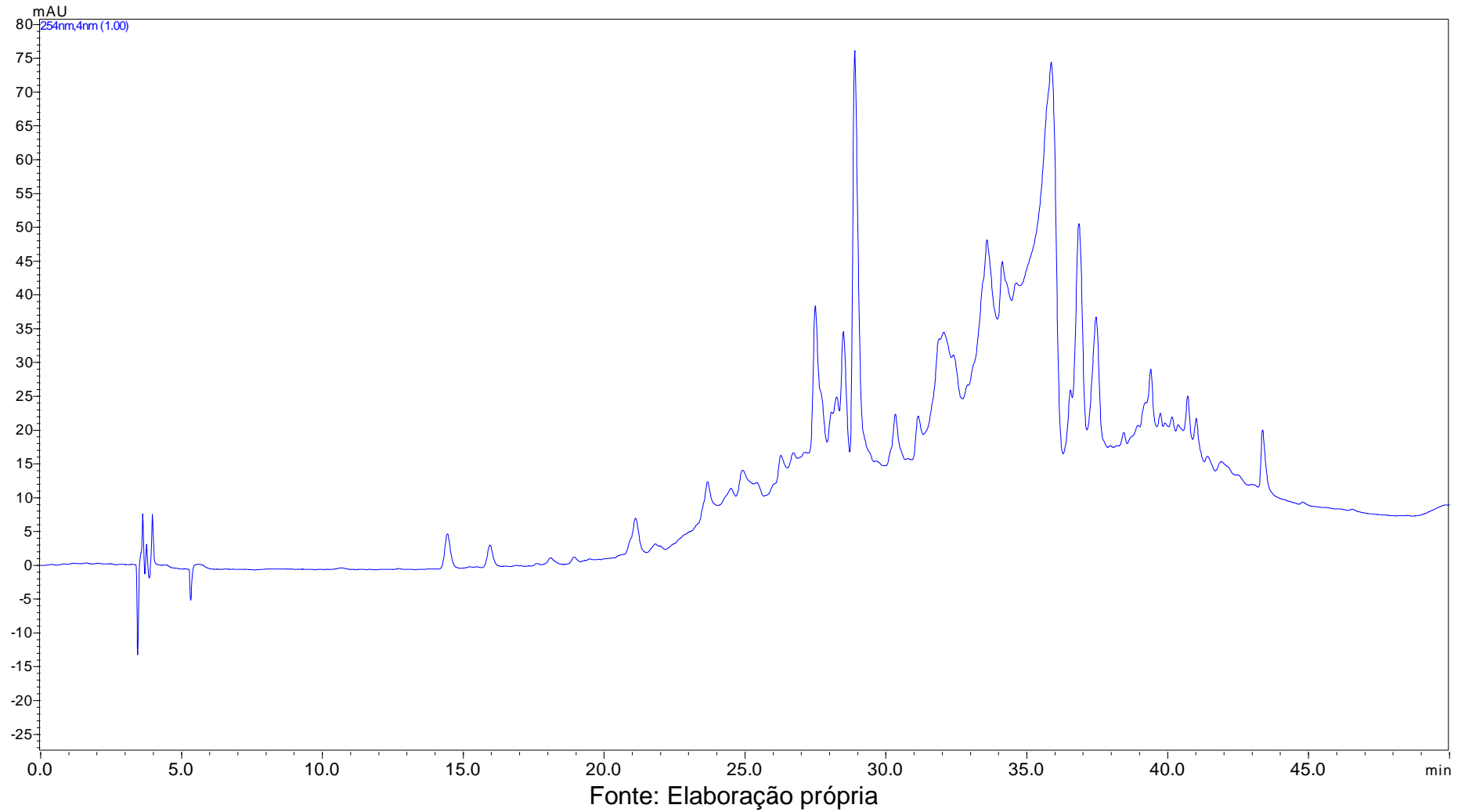
Figura 39: Espectro de RMN de ^1H do extrato de *P. microspora* em água do mar (DMSO- d_6 , 300 MHz).

DM 01 MAR



Fonte: Elaboração própria

Figura 40: Cromatograma da análise por CLAE-DAD – fase reversa do extrato bruto de *P. microspora* em água do mar (modo gradiente, com detecção em 254nm).



4.2.5 Análise química do endófito *Xylaria coccophora*

O gênero *Xylaria* pertence à ordem Xylariales e família Xylariaceae. Esta família possui cerca de 40 gêneros, encontrados como saprófitas, fitoparasitas e endofíticos. Os membros da família Xylariaceae constituem o grupo taxonômico com maior frequência de isolamento entre as espécies endofíticas isoladas de plantas tropicais (RODRIGUES, 1994).

Uma ampla diversidade de metabólitos secundários já foram descritos para fungos deste gênero, tais como: sesquiterpenóides eremofilanos, xylarenal A, xylocetal A, multiploide A, citocalasinas, epoxicitocalasinas, entre outros. Todos estes metabólitos apresentam algum tipo de bioatividade tais como, antifúngica, anticolinesterásica e citotóxica, evidenciando a potencialidade destes fungos na produção de substâncias bioativas (CAFÊU, M. C.; 2013).

O endófito foi isolado de *A. spicifera* (**Figura 41**) e repicado em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA preparado com água ultrapura de acordo com a metodologia utilizada no seu isolamento. Posteriormente foi cultivado em escala reduzida conforme **Fluxograma 1** fornecendo 135 mg de extrato bruto. A análise por RMN de ^1H (**Figura 42**) apresentou sinais entre 0,5 e 7,0 ppm, referentes a hidrogênios metílicos, metilênicos, metínicos, olefínicos, carbinólicos e aromáticos. A análise por CLAE-DAD em 254 nm (**Figura 43**) demonstrou bandas por todo cromatograma, principalmente com tempos de retenção entre 15 e 40 minutos referentes a compostos de média e baixa polaridade.

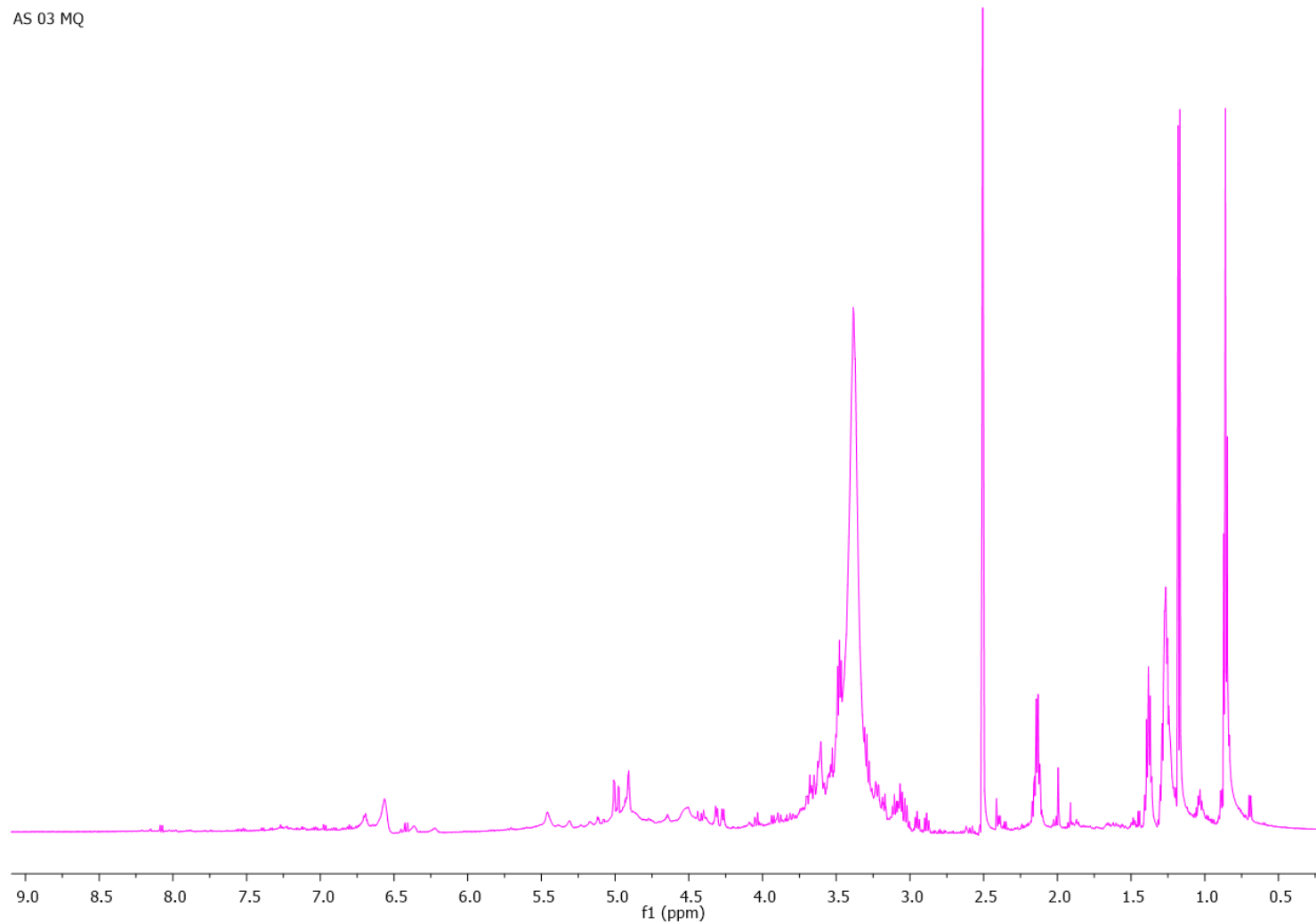
Figura 41: *X. coccophora* isolado de *A. spicifera* em água ultrapura (Superfície do endófito).



Fonte: Elaboração própria

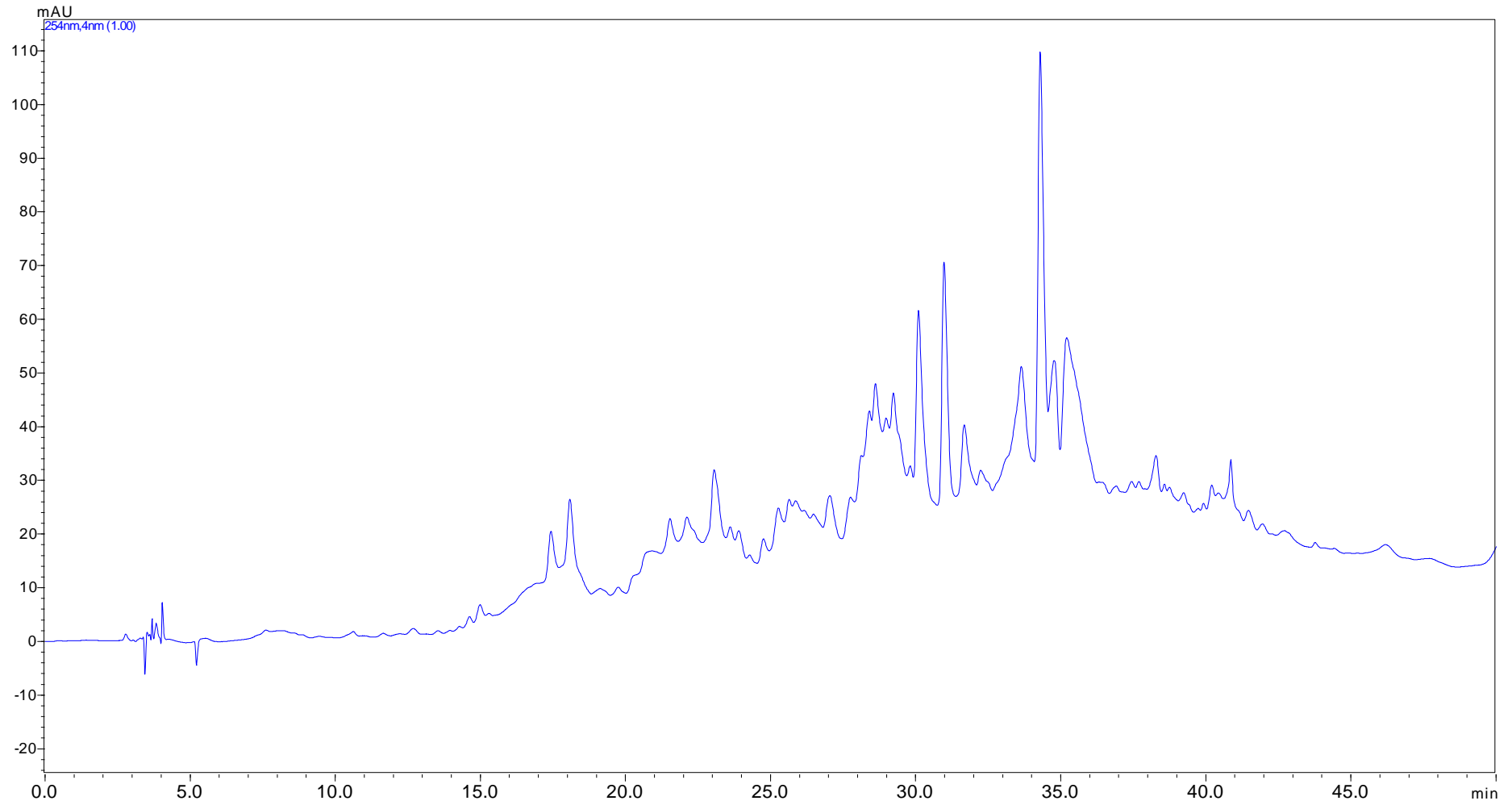
Figura 42: Espectro de RMN de ^1H do extrato de *X. coccophora* em água ultrapura (DMSO- d_6 , 300 MHz).

AS 03 MQ



Fonte: Elaboração própria

Figura 43: Cromatograma da análise por CLAE-DAD – fase reversa do extrato bruto de *X. coccophora* em água ultrapura (modo gradiente, com detecção em 254nm).



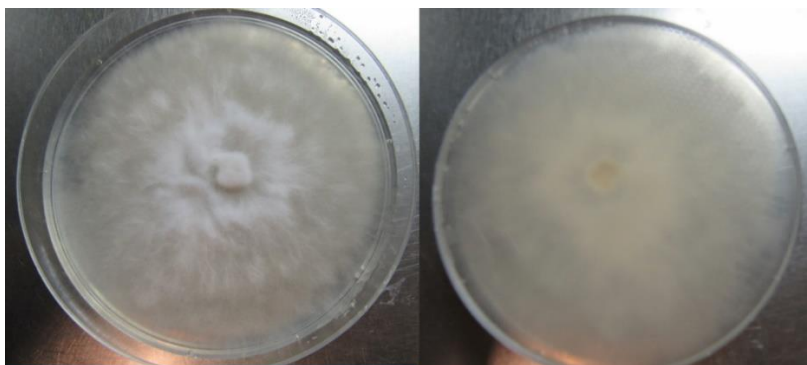
Fonte: Elaboração própria

4.2.6 Análise química do endófito *Entonoema pallida*.

Pesquisas em bases de dados evidenciaram que ainda não foram descritos estudos químicos e biológicos realizados com este endófito.

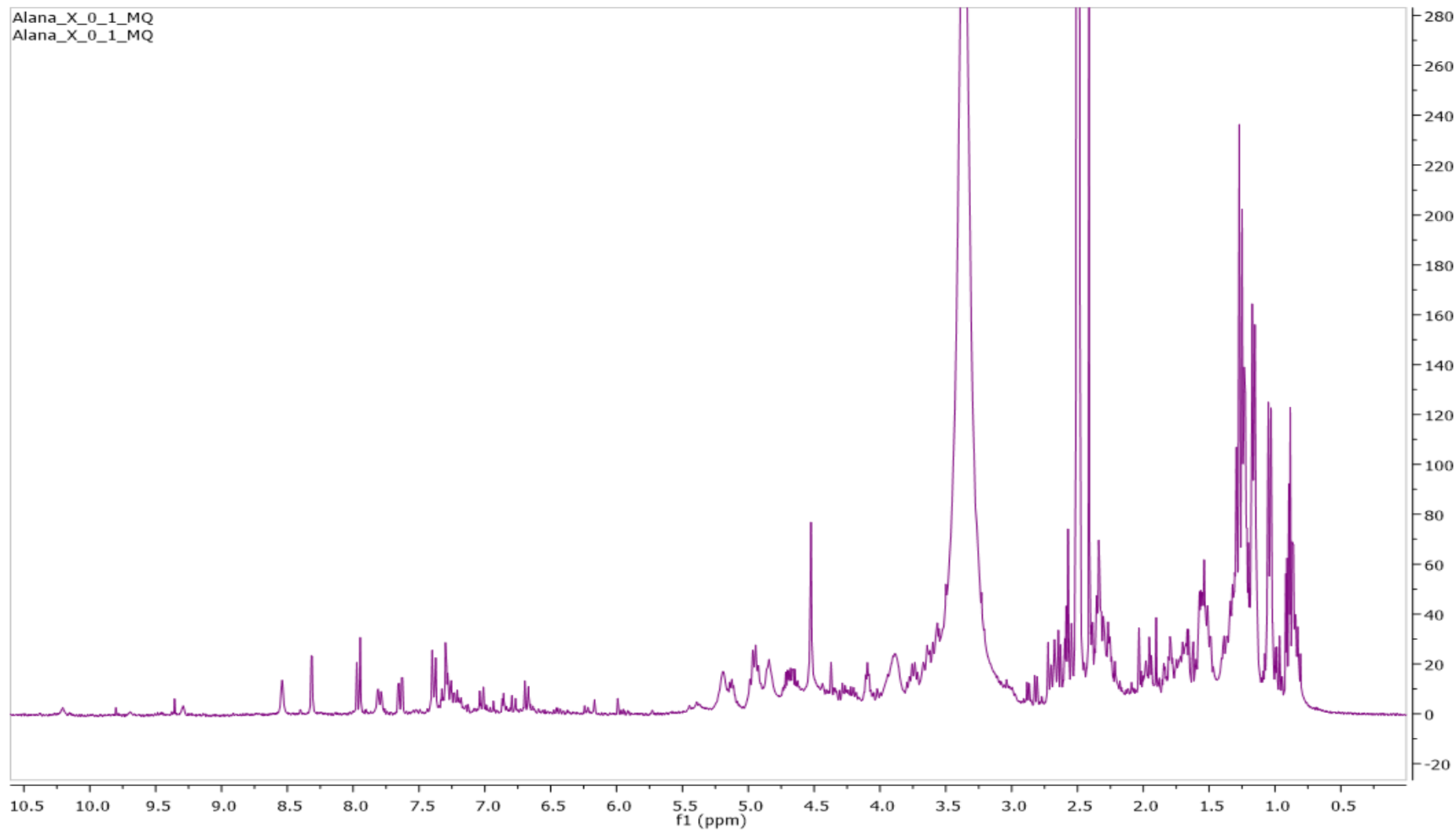
O fungo *E. pallida* foi repicado em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA (**Figura 44**) e posteriormente cultivado em escala reduzida conforme **Fluxograma 1** fornecendo 290 mg de extrato bruto. Este teve seu perfil químico avaliado através de RMN de ^1H (**Figura 45**), que mostrou sinais entre 0,5 e 8,5 ppm, referentes a hidrogênios metílicos, metilênicos, metínicos, olefínicos, carbinólicos, aromáticos e fenólicos, com sinais mais intensos na região entre 0,5 e 2,8 ppm. A análise por CLAE-DAD com detecção em 254 nm (**Figura 46**) apresentou alguns picos com tempo de retenção entre 19 e 37 minutos, referentes a compostos de média a baixa polaridade. O perfil deste extrato por CG-EM apresentou uma grande variedade de picos distribuídos por todo o cromatograma (**Figura 47**), sendo possível, considerando a similaridade e IR (**Tabela 4**), a identificação de 08 metabólitos (**Figura 48**).

Figura 44: Cultivo de *E. pallida* isolado da alga parda *S. vulgare* em meio BDA e água ultrapura: Superfície e parte inferior da placa de Petri contendo o endófito.



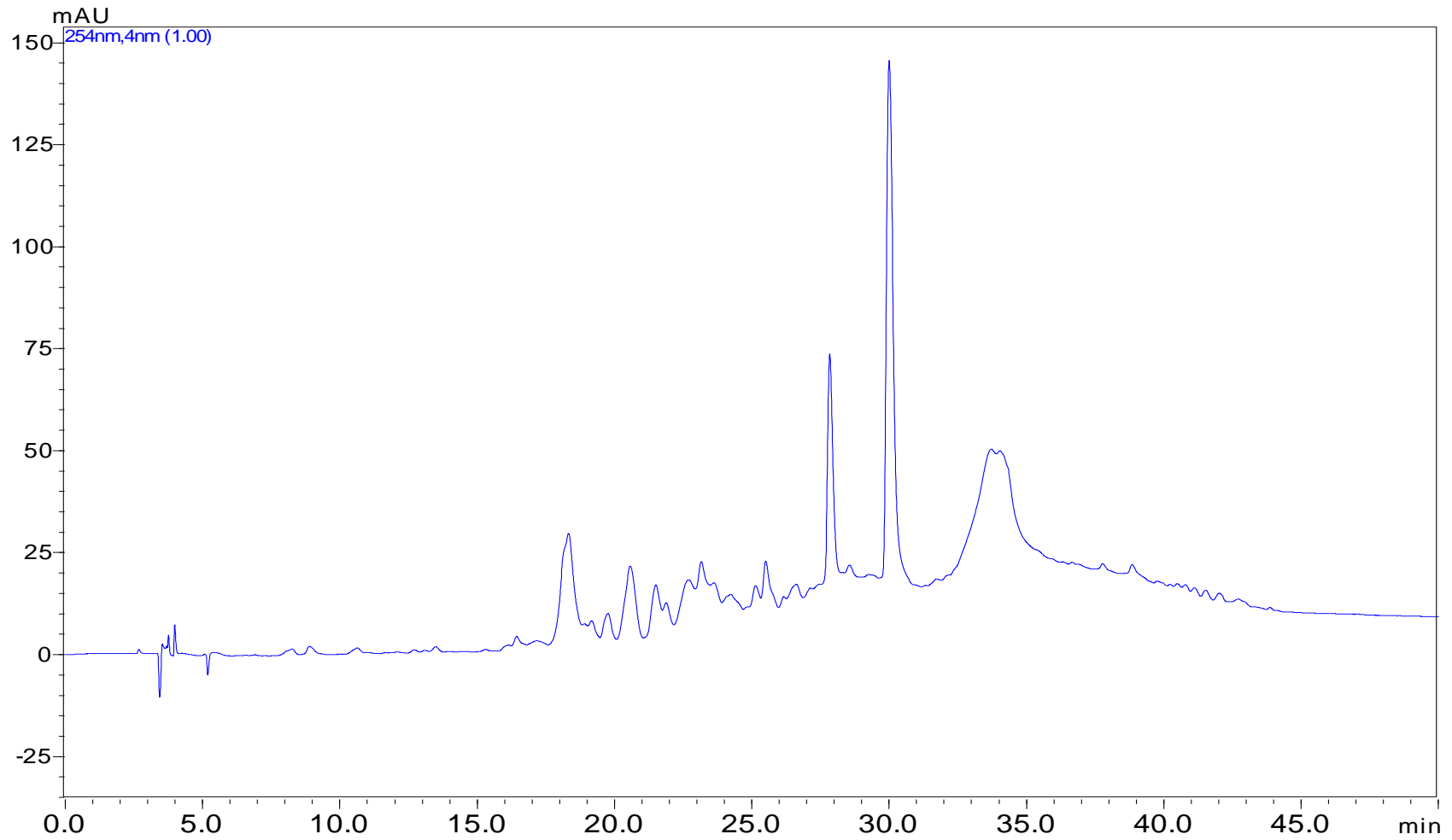
Fonte: Elaboração própria

Figura 45: Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *E. pallida* (DMSO- d_6 , 300 MHz).



Fonte: Elaboração própria

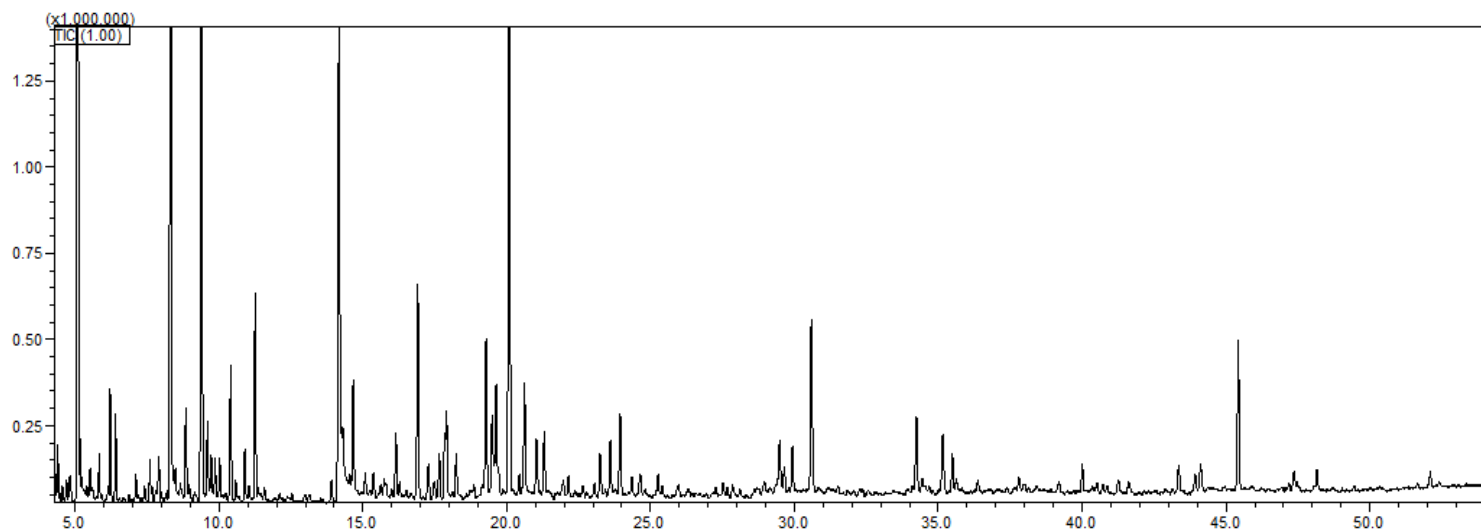
Figura 46: Cromatograma da análise por CLAE-DAD – fase reversa do extrato bruto de *E. pallida* em modo gradiente, com detecção em 254nm.



Fonte: Elaboração própria

4.2.6.1 Identificação de metabólitos produzidos por *E. pallida*

Figura 47: Perfil químico do extrato bruto de *E. pallida* por CG-EM.

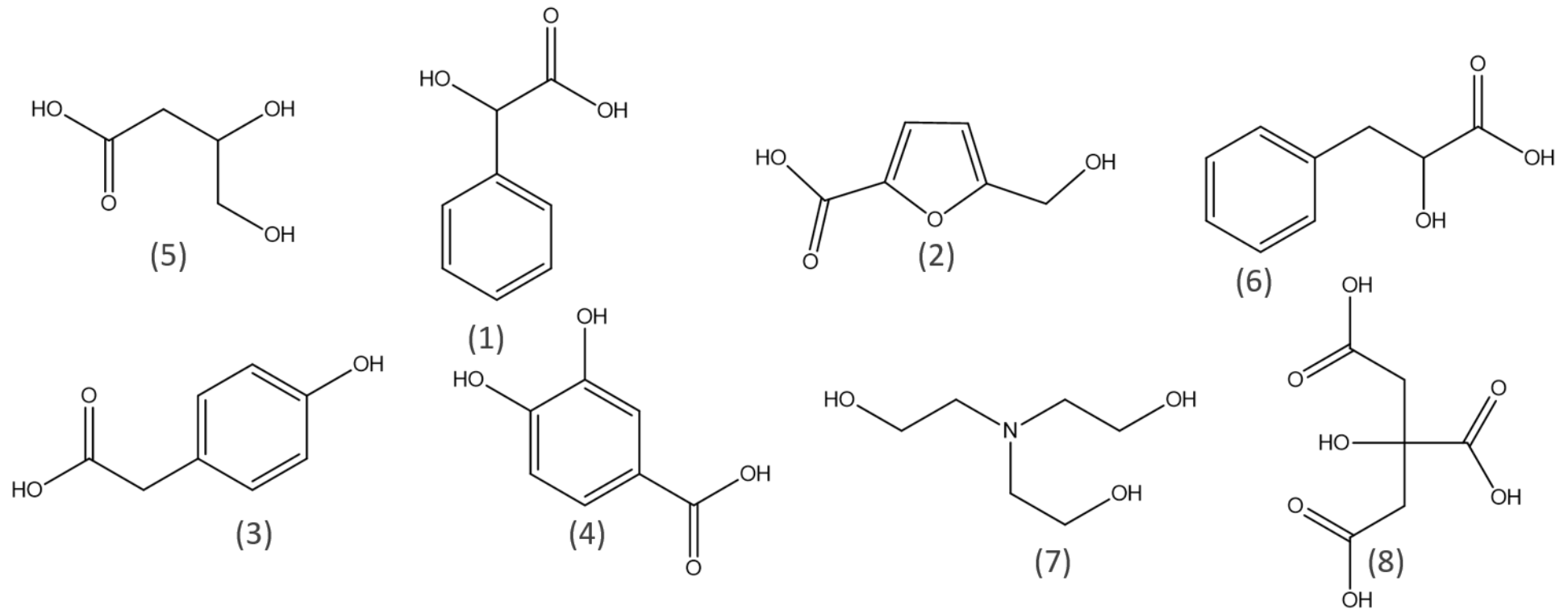


Fonte: Elaboração própria

Tabela 4: Compostos propostos pelo programa GC-MS Data Analysis.

	Nome	Tempos de retenção			Similaridade (%)	Referência
		Tr	IR teórico	IR		
1	Mandelic acid	6,22	1468	1438	84	Tret'yakov, 2008
2	5-Hydroxymethyl-2-furoic acid	8,85	1561	1555	88	Tuchman, et al., 1984
3	4-Hydroxybenzeneacetic acid	11,26	1648	1646	95	Isidorov, et al., 2005
4	Protocatechoic acid	16,91	1836	1834	94	Jaroszynska, 2003
5	Butanoic acid, 3,4-bis[(TMS)oxy]	6,14	1439	1434	91	Kimura, et al., 1999
6	3-Phenyllactic acid	9,87	1600	1596	93	Kimura, et al., 1999
7	Triethanolamine	11,03	1645	1638	83	Kostiainen, 2000
8	Citric acid	17,28	1838	1846	80	Kimura, et al., 1999

Figura 48: Compostos identificados por CG-EM no extrato de *E. pallida*.



Fonte: Elaboração própria

4.2.7 Análise química do endófito *Roussoella neopustulans*

O gênero *Roussoella*, pertencente à família Roussoellaceae, apresenta uma característica diferenciada frente à outros fungos, pois átomos de cloro são comumente encontrada em seus metabólitos secundários, como por exemplo, a produção 3,5-diclorociclopent-2- ene-1-carboxílico e grupos de policetídeos clorados. Estes compostos são descritos por sua potente atividade antibacteriana, antifúngica e citotóxica.

Roussoella neopustulans foi isolado de *D. marginata* e repicado em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA preparado com água ultrapura (**Figura 49**). Posteriormente foi cultivado em escala reduzida conforme **Fluxograma 1** fornecendo 83 mg de extrato bruto.

A análise por CLAE-DAD com detecção em 254 nm (**Figura 50**) evidenciou poucas bandas, sendo dois mais intensos na região de 20 minutos, característico de compostos de média polaridade.

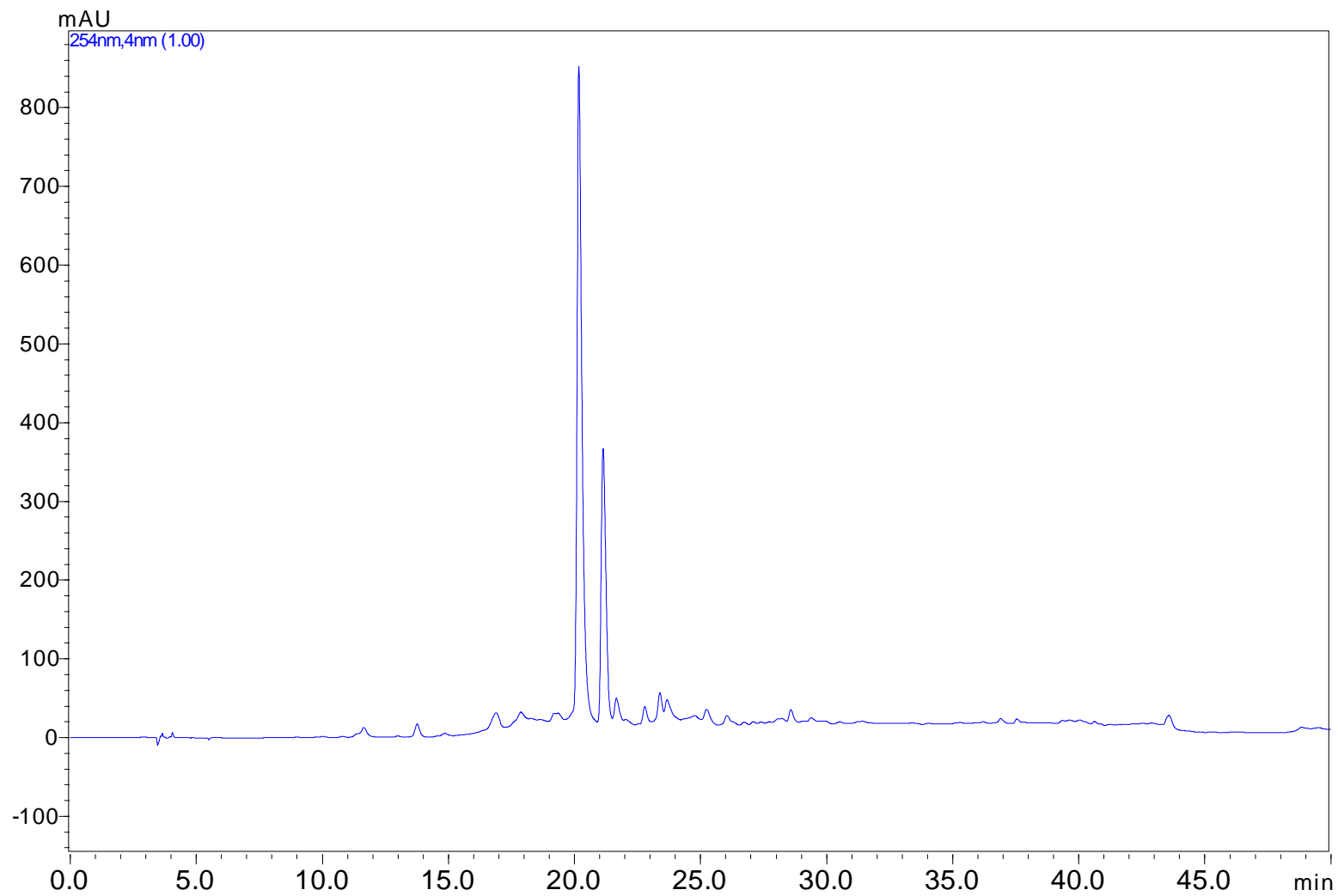
O perfil deste extrato por CG-EM apresentou uma grande variedade de picos por todo cromatograma (**Figura 51**), sendo possível, de acordo com a similaridade e IR (**Tabela 5**), a identificação de 23 metabólitos (**Figura 52**).

Figura 49: *R. neopustulans* isolado de *D. marginata* em água ultrapura: Superfície e parte inferior.



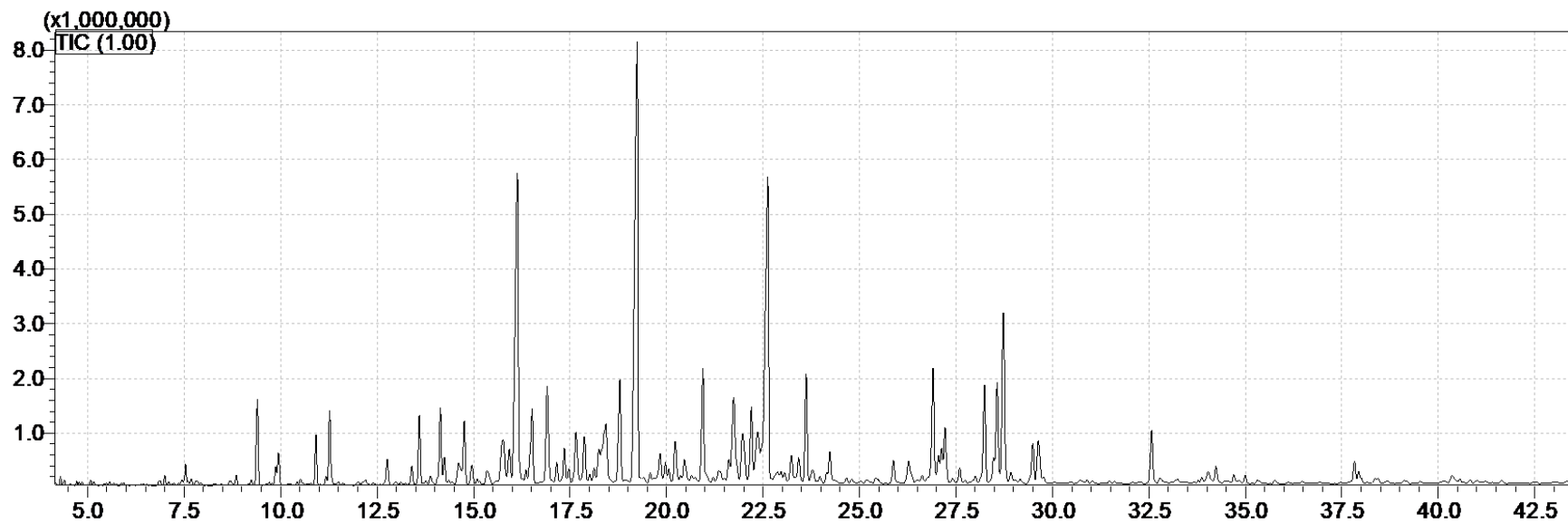
Fonte: Elaboração própria

Figura 50: Cromatograma da análise por CLAE-DAD – fase reversa do extrato bruto de *R. neopustulans* em água ultrapura (modo gradiente, com detecção em 254nm).



4.2.7.1 Identificação dos constituintes de *R. neopustulans* isolado de *D. marginata* por CG-EM

Figura 51: Perfil do extrato bruto de *R. neopustulans* em CG-EM.



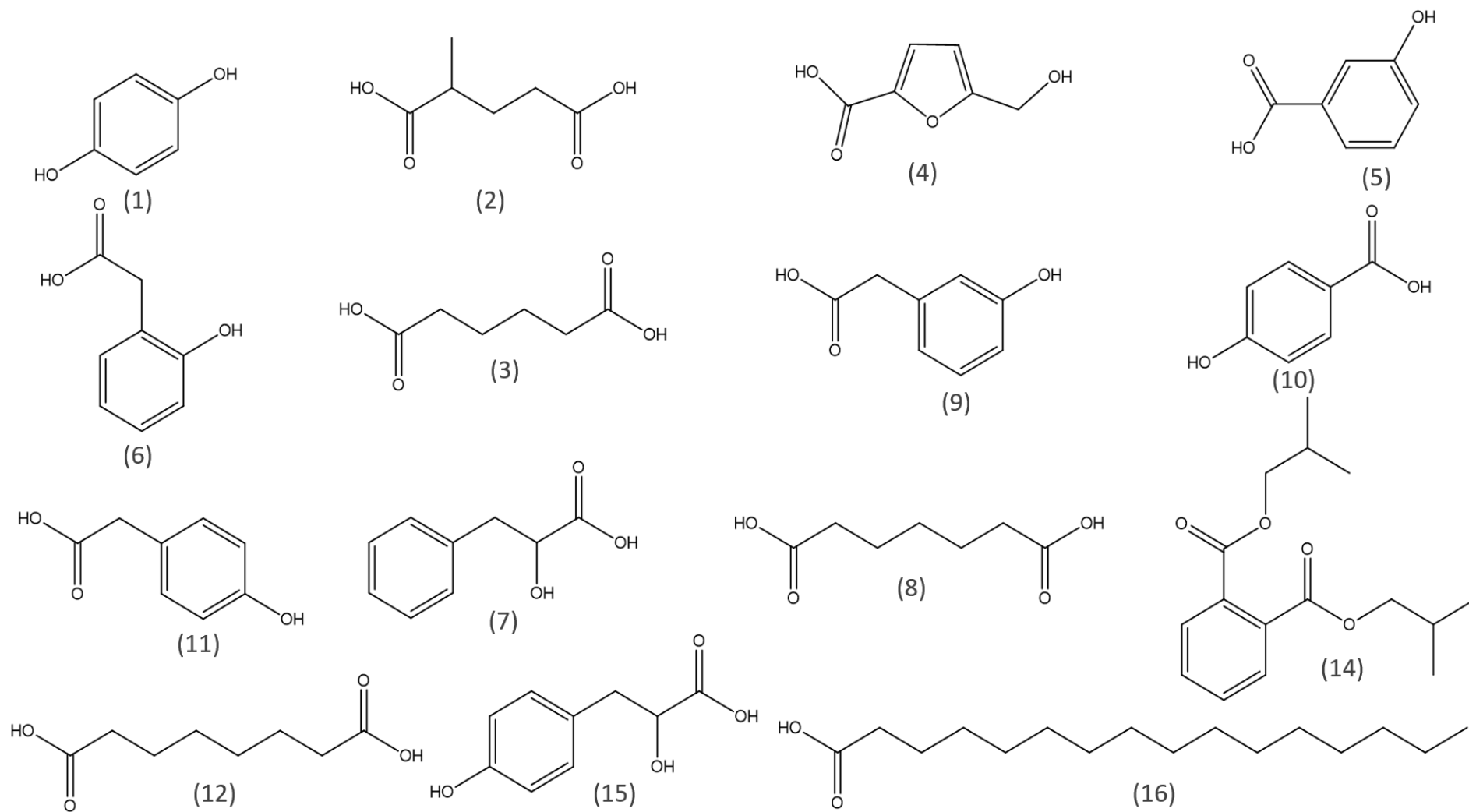
Fonte: Elaboração própria

Tabela 5: Compostos propostos pelo GC-MS Data Analysis para *R. neopustulans*.

	COMPOSTO	#CAS	Tr	IR teórico	IR	Similaridade (%)	Referência
1	Hydroquinone	2117 - 24 - 0	5,58	1409	1406	83	Jaroszynska and Ligor, 2005
2	2-Methylglutaric acid	55530 - 53 - 5	5,78	1423	1416	81	Isidorov, et al., 2005
3	Hexanedioic acid	18105 - 31 - 2	7,68	1510	1508	90	Ohie, et al., 2000
4	5-Hydroxymethyl-2-furoic acid	55517 - 40 - 3	8,85	1560	1555	85	Lefevere, et al., 1989
5	3-Hydroxybenzoic acid	3782 - 84 - 1	9,24	1573	1571	90	Todua, 2011
6	2-Hydroxybenzeneacetic acid	27750 - 52 - 3	9,39	1563.4	1577	90	Tret'yakov, 2007
7	3-Phenyllactic acid	27750 - 45 - 4	9,88	1600	1597	92	Kimura, et al., 1999
8	Pimelic acid	55530 - 58 - 0	10,21	1604.	1609	85	Kimura, et al., 1999
9	3-Hydroxyphenylacetic acid	27750 - 55 - 6	10,44	1616	1617	91	Kimura, et al., 1999
10	4-Hydroxybenzoic acid	2078 - 13 - 9	10,92	1637	1634	91	Kimura, et al., 1999
11	4-Hydroxybenzeneacetic acid	27750 - 57 - 8	11,28	1648	1646	95	
12	Suberic acid	43199 - 48 - 0	12,98	1702	1706	87	Ohie, et al., 2000
13	Vanillic Acid	2078 - 15 - 1	15,09	1779	1775	88	Jaroszynska and Ligor, 2005
14	1,2-Benzenedicarboxylic acid	84 - 69 - 5	18,13	1871.8	1873	83	Zeng, et al., 2007
15	4-Hydroxyphenyllactic acid	27750 - 67 - 0	19,58	1919	1920	86	Ohie, et al., 2000
16	Palmitic Acid	55520 - 89 - 3	23,62	2047	2050	91	Kimura, et al., 1999
17	Linoleic acid ethyl ester	544 - 35 - 4	27,05	2162.9	2164	94	Andriamaharavo, 2014
18	(E)-9-Octadecenoic acid ethyl ester	6114 - 18 - 7	27,22	2174.2	2170	89	Andriamaharavo, 2014
19	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)	56259 - 07 - 5	28,57	2208.5	2216	92	Tret'yakov, 2007
20	9-Octadecenoic acid, (E)	96851 - 47 - 7	28,73	2217.7	2221	92	Tret'yakov, 2007
21	Stearic acid	18748 - 91 - 9	29,49	2234	2248	91	Tret'yakov, 2007
22	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	117 - 81 - 7	37,83	2550	2553	95	Xian, et al., 2006
23	Behenic acid	74367 - 36 - 5	40,13	2644	2644	85	Isidorov, et al., 2008

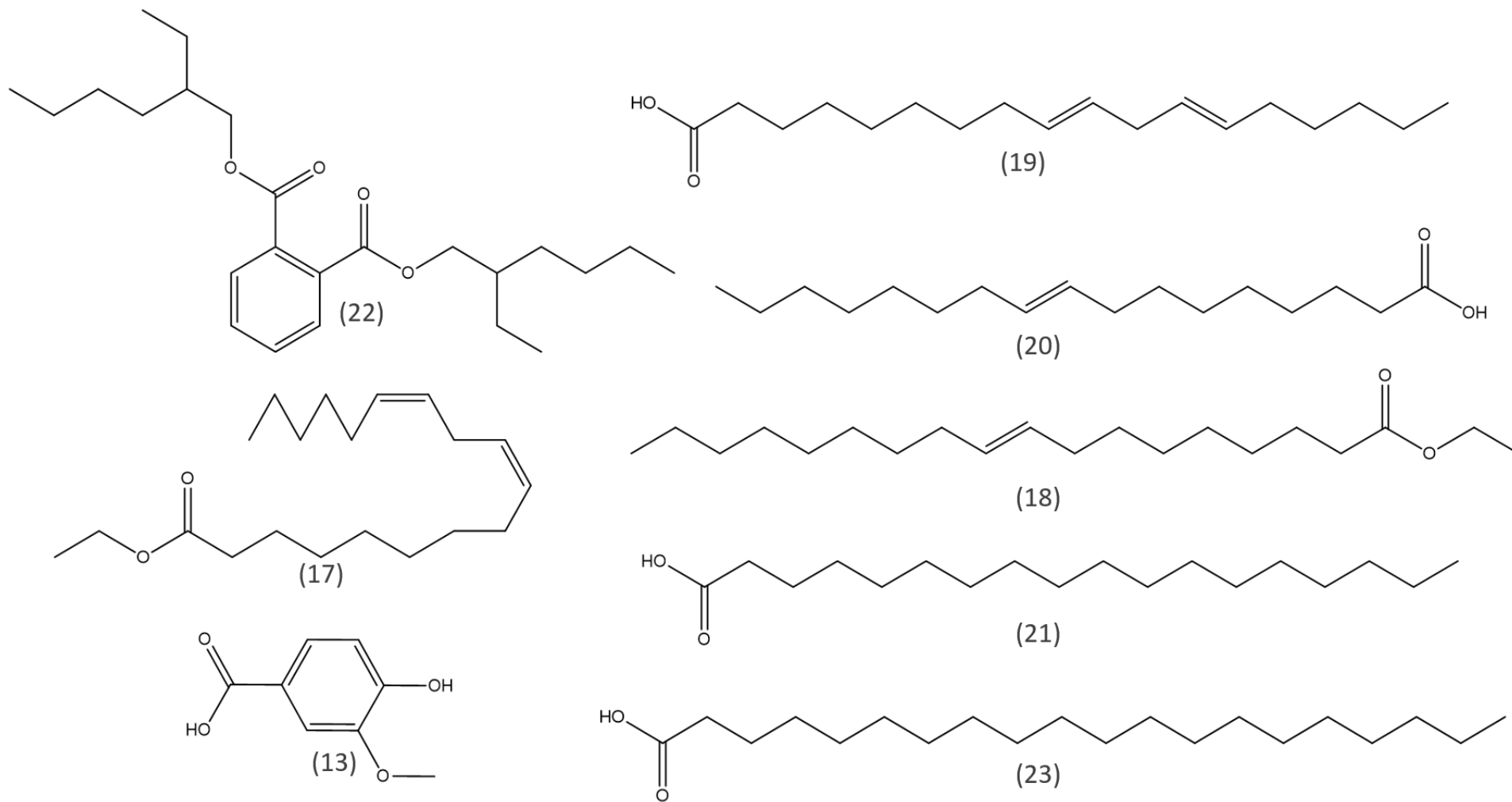
Fonte: Elaboração própria

Figura 52 A: Compostos identificados no extrato de *R. neopustulans*.



Fonte: Elaboração própria

Figura 52 B: Compostos identificados no extrato de *R. neopustulans*.



Fonte: Elaboração própria

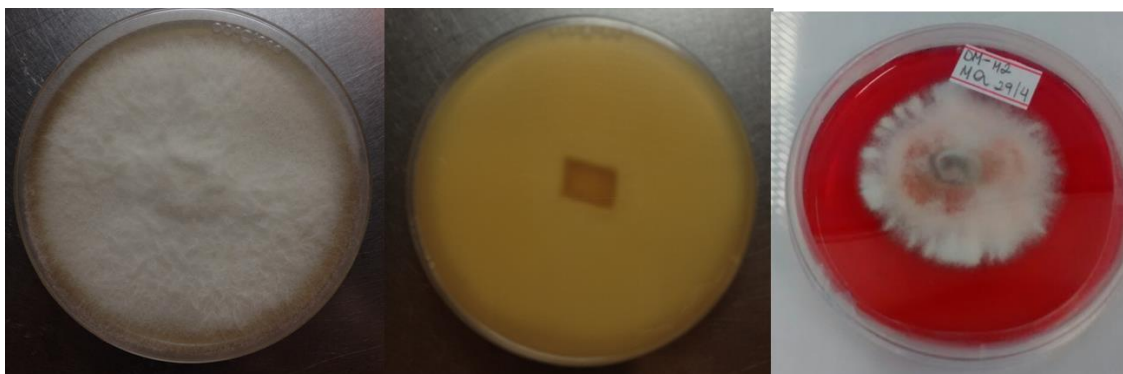
4.2.8 Análise química do endófito *Fusarium solani*

Fusarium é um gênero de fungo comumente encontrado no solo, sendo conhecido por ser patógeno a várias plantas, causando doenças de podridão de raízes em uma ampla variedade de culturas, além de ser patógeno também para o ser humano (ANTEQUERA et al., 2014). Apesar dessa característica, espécies de *Fusarium* produzem compostos de interesse farmacêutico e medicinal como anticolinesterásicos (SOLFRIZZO et al., 1994), anti-alérgicos, anti-inflamatórios (MAHAPATRA et al., 2013) entre outros. Por isso são fungos filamentosos interessantes para estudo de seus constituintes químicos na busca por moléculas bioativas.

F. solani foi isolado de *D. marginata*, repicado em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA preparado com água do mar (**Figura 53**) de acordo com a metodologia utilizada no seu isolamento. Este fungo apresenta uma característica marcante, que é a produção de pigmentos vermelho/rosa dependendo da temperatura em que se realiza o cultivo. Posteriormente foi cultivado em escala reduzida conforme o **Fluxograma 1** fornecendo 36 mg de extrato. A análise por RMN de ^1H (**Figura 54**) apresentou sinais entre 0,5 e 8,0 ppm e a análise por CLAE-DAD com detecção em 254 nm (**Figura 55**) mostrou picos por todo cromatograma, referentes a compostos de alta, média e baixa polaridade.

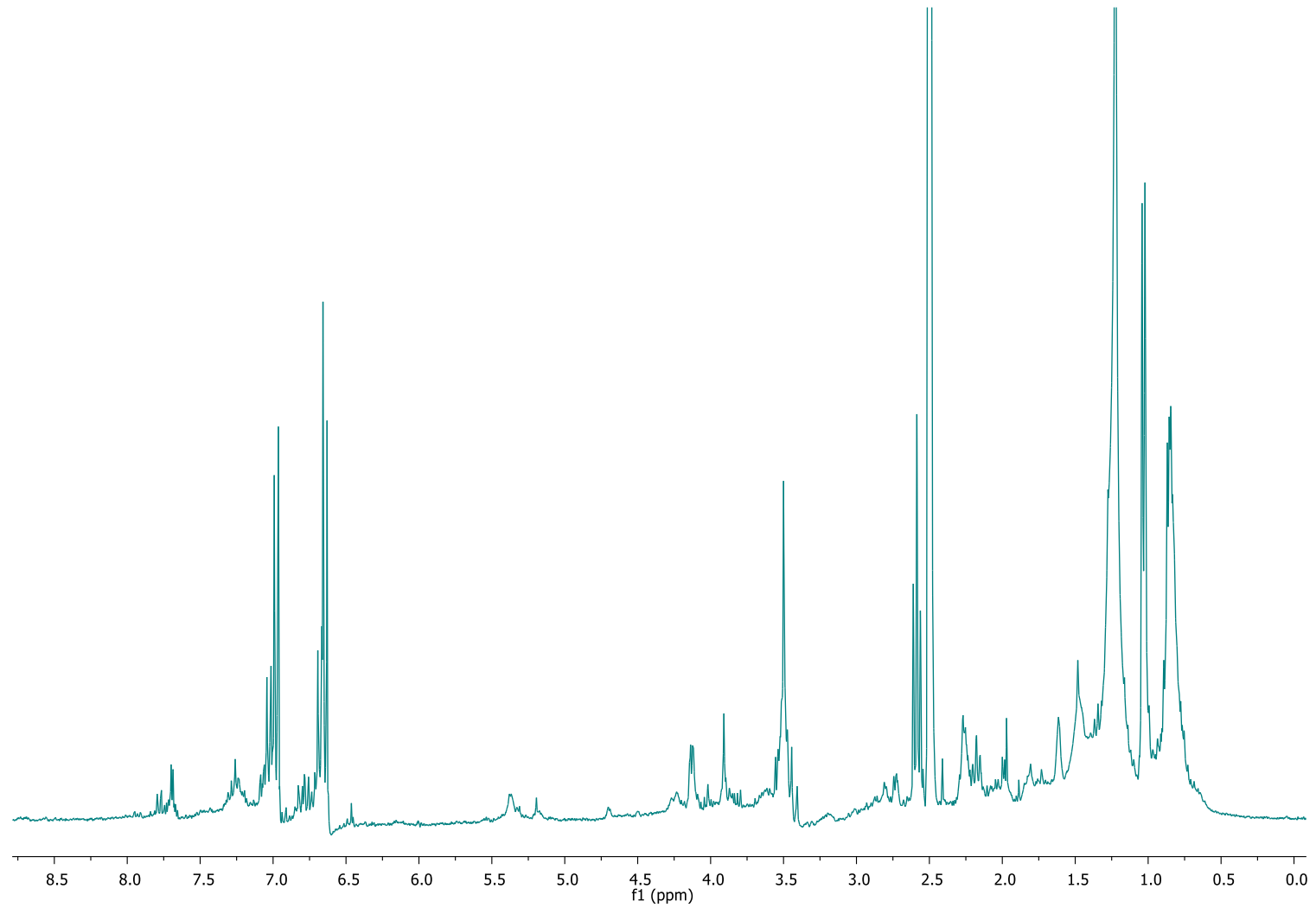
O perfil deste extrato por CG-EM apresentou uma grande variedade de picos por todo cromatograma (**Figura 56**), sendo possível, de acordo com a similaridade e IR (**Tabela 6**), a identificação de 06 metabólitos (**Figura 57**). As massas obtidas para cada pico por CLAE-EM foram comparadas com as bases de dados *MarinLit*®, *ChemSpider*®, *Antimarin*® e na análise da literatura usando as ferramentas *SciFinder Scholar*®, gerando algumas propostas de estruturas moleculares apresentadas na **Tabela 7**.

Figura 53: *F. solani* isolado de *D. marginata* em água do mar: Superfície, Parte inferior, Superfície colorida pela mudança de temperatura.



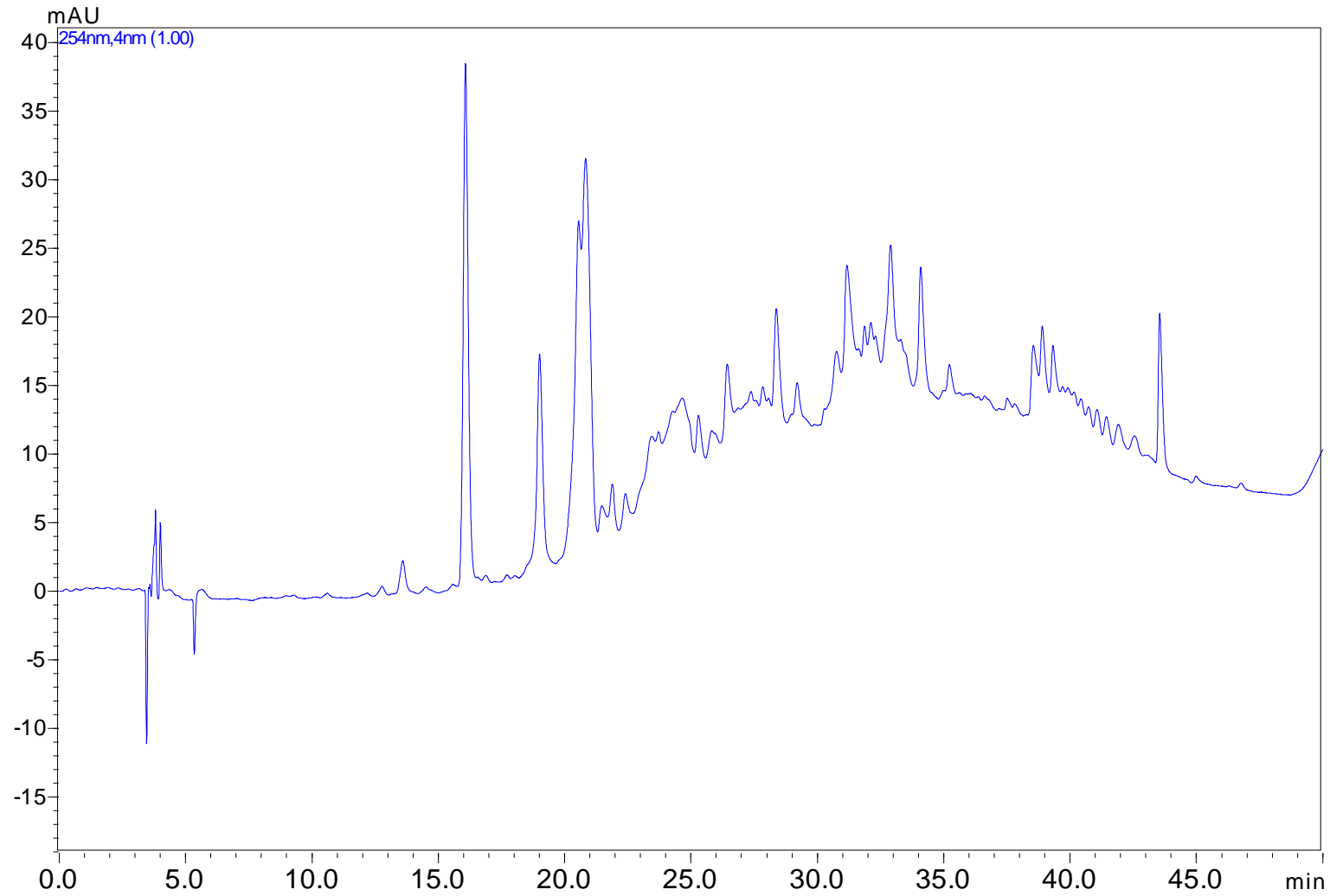
Fonte: Elaboração própria

Figura 54: Espectro de RMN de ^1H do extrato de *F. solani* isolado de *D. marginata* em água do mar (DMSO- d_6 , 300MHz).



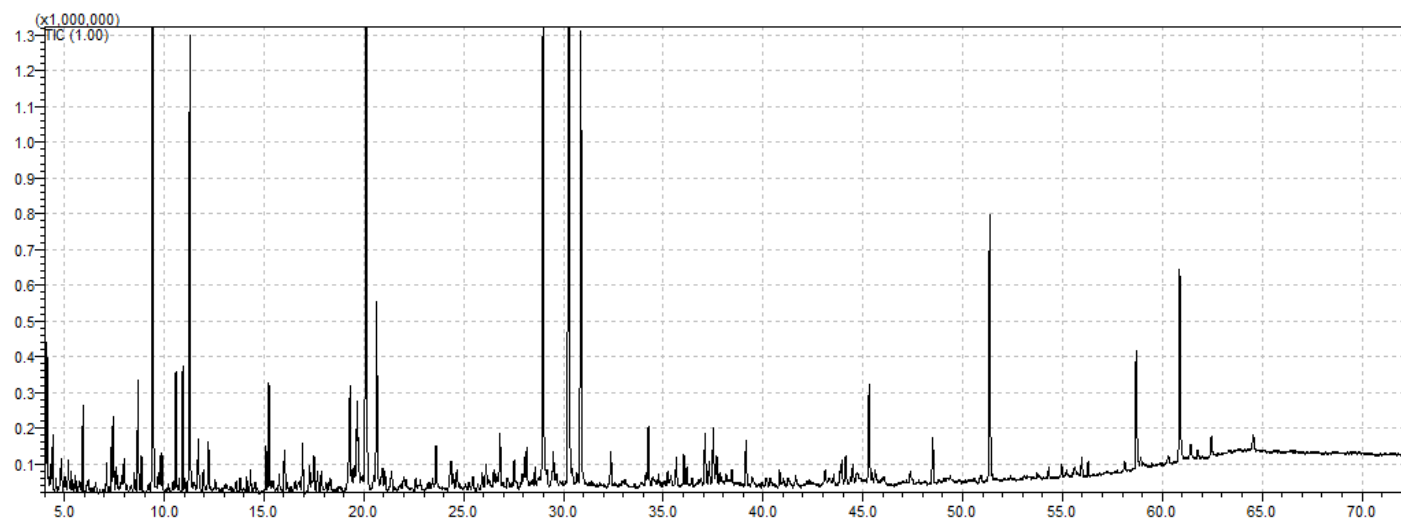
Fonte: Elaboração própria

Figura 55: Cromatograma da análise por CLAE-DAD – fase reversa do extrato bruto de *F. solani* em água do mar (modo gradiente, com detecção em 254nm).



4.2.8.1 Identificação dos constituintes de *F. solani* por CG-EM

Figura 56: Perfil do extrato bruto de *F. solani* em CG-EM

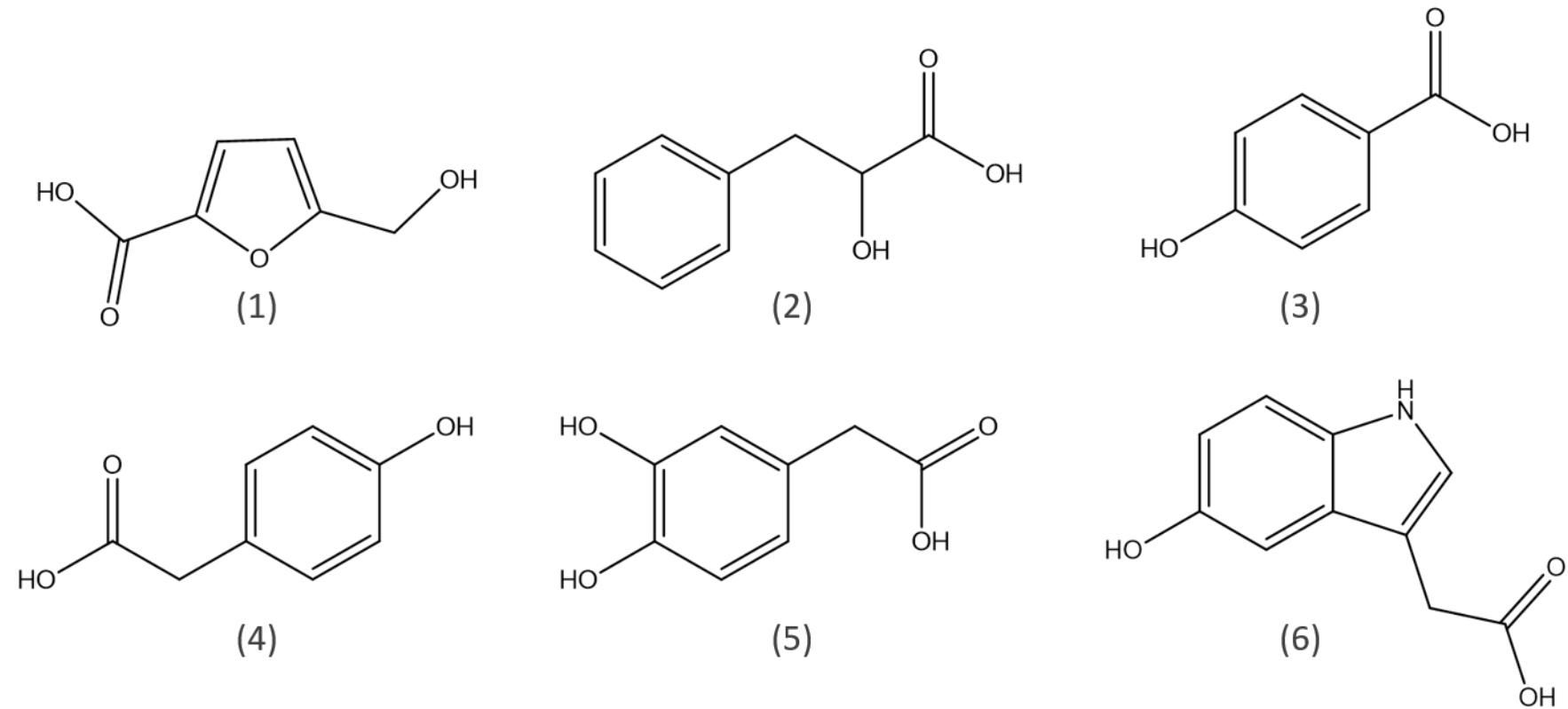


Fonte: Elaboração própria

Tabela 6: Compostos propostos pelo GC-MS Data Analysis para *F. solani*.

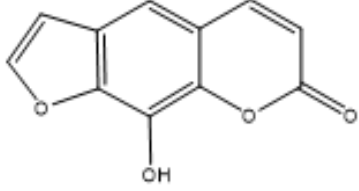
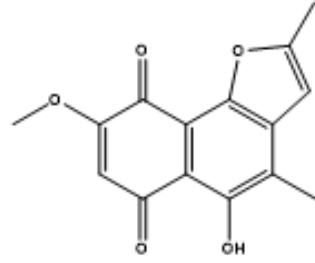
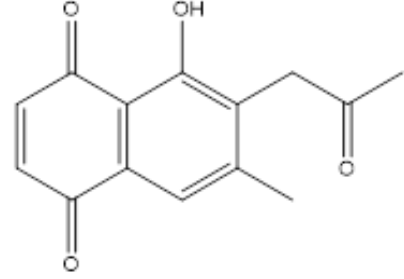
	Composto	Tr	IR teorico	IR	Similaridade	Referencia
1	5-Hydroxymethyl-2-furoic acid, 2TMS derivative	8,86	1560	1556	87	Lefevre, et al., 1989
2	3-Phenyllactic acid, 2TMS derivative	9,88	1600	1597	93	Kimura, et al., 1999
3	4-Hydroxybenzoic acid, 2TMS derivative	10,92	1629	4634	92	Jonsson, et al., 2005
4	4-Hydroxybenzeneacetic acid, 2TMS derivative	11,28	1648	1646	95	Kimura, et al., 1999
5	3,4-Dihydroxyphenylacetic Acid, 3TMS derivative	17,28	1832	1846	87	Mattsson and Petersson, 1977
6	5-Hydroxyindoleacetic acid, 3TMS derivative	28,16	2199	2201	84	Hoffmann, et al., 1989

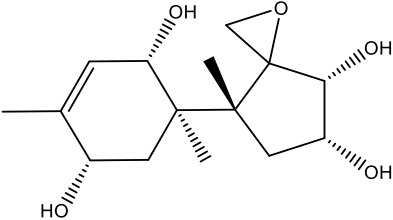
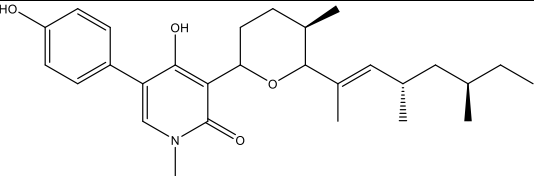
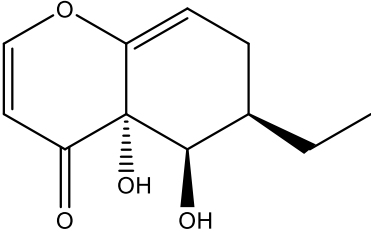
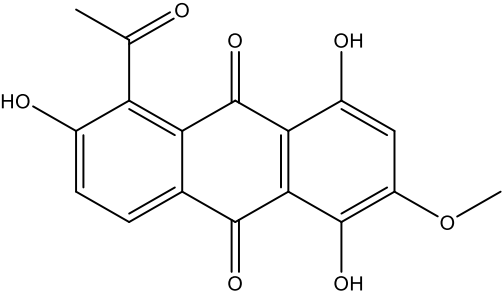
Figura 57: Compostos identificados no extrato de *F. solani*.



Fonte: Elaboração própria

Tabela 3: Compostos identificados no extrato DM 08 Mar B por CLAE-EM.

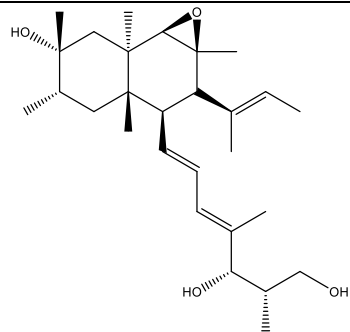
Pico	Substância	Nome	FM	MM (g/mol)
2		Xanthotoxol	C ₁₁ H ₆ O ₄	202,1613
5		Anhydrojavanicin;	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	273,1083
8		7-Acetyl-5-hydroxy-6-methyl 1,4-naphthoquinone	C ₁₄ H ₁₂ O ₄	244,2051

9		$C_{15}H_{24}O_5$	284,3461	
10		N-Demethylsambutoxi	$C_{28}H_{39}O_4N$	453,6121
12		Agistatin-D	$C_{11}H_{13}O_4$	209,2170
13		5-Acetyl-2-methoxy-1,4,6-trihydroxy-anthraquinone	$C_{17}H_{12}O_7$	328,2702

14		<p>2,3-Dihydro-5,8-dihydroxy- 6-methoxy-2-hydroxymethyl- 3-(2 hydroxypropyl) 1naphthalenedione</p>	C ₁₄ H ₁₆ O ₇	296,2698
16		<p>2,2-Dimethyl-5-amino-6-(2'E-ene 4'-hydroxybutyryl) 4-chromone</p>	C ₁₅ H ₁₇ O ₄ N	275,2982
19		<p>2,2-Dimethyl-5-amino-6-(4'- hydroxybutyryl)-4-chromone</p>	C ₁₅ H ₁₉ O ₄ N	277,3141
23			C ₂₀ H ₂₈ O ₃ N ₂	344,4476
24		Fusarin A	C ₂₄ H ₃₁ O ₅ N	413,5902

25		4-Oxododecandioic Acid	$C_{12}H_{20}O_5$	244,2822
25		7-Acetyl-5-hydroxy 6-methyl-1,4-naphthoquinone	$C_{14}H_{12}O_4$	244,2411
26		Solaniol; F-3	$C_{15}H_{16}O_6$	292,2815
26		2-Hydroxynorjavanicin 2,5,8-Trihydroxy-6-methoxy 3-(2-oxopropyl)-1,4-naphthoquinone	$C_{14}H_{12}O_7$	292,2381

27

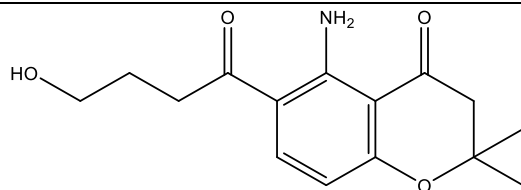


(-)-Fusarielin E

$C_{28}H_{46}O_4$

446,6608

29

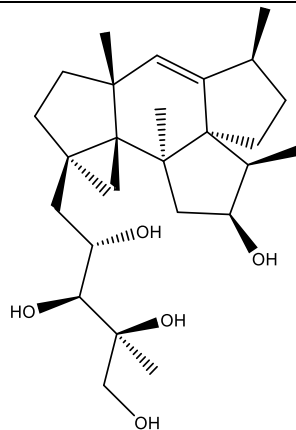


2,2-Dimethyl-5-amino 6-(4'-hydroxybutyryl) 4-chromone

$C_{15}H_{19}O_4N$

277,3141

31



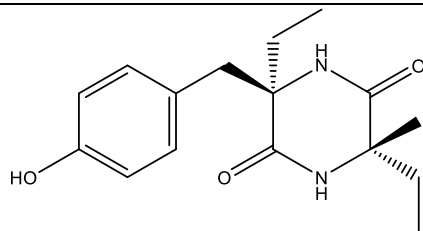
Mangicol B

$C_{27}H_{46}O_5$

450,6491

32		N-Dihydrojasmony Lsoleucine	$C_{18}H_{31}O_4N$	325,4414
32		N-[9,10-Dihydro-7-isojasmonoyl]- (S)-isoleucine	$C_{18}H_{31}O_4N$	325,4414
35		Neofusapyrone	$C_{34}H_{55}O_7$	575,7935
38		Farnesoic acid	$C_{15}H_{26}O_2$	238,3649
40		2-Acetyl-3,8-dihydroxy 6-methoxy anthraquinone	$C_{17}H_{12}O_6$	312,2712

41

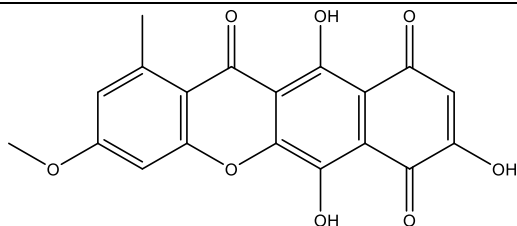


Fusaperazine A

$C_{16}H_{22}O_3N_2$

290,3563

44



Norbikaverin

$C_{19}H_{12}O_8$

368,2906

Fonte: Elaboração própria

Grande parte destas substâncias apresentam atividades biológicas promissoras, como citotóxica, antifúngica, anti-inflamatória, dentre outras, demonstrando a importância em prosseguir com o isolamento de metabólitos para busca de novas estruturas moleculares e novas aplicações.

4.3 Comparação do perfil químico de fungos de mesmo gênero e espécie associados à algas distintas.

Para este estudo foram selecionadas as algas vermelhas (Rhodophyta) *A. spicifera* **A** (Rhodomelaceae) e *D. marginata* **B** (Galaxauraceae), que ocorrem em regiões rochosas costeiras e ambientes próximos (**Figura 58**), motivo que nos despertou o interesse em analisar seus micro-organismos associados e eventualmente observar a ocorrência de fungos em comum.

Figura 58: Local onde as algas foram coletadas (muito próximas uma da outra).



Fonte: Elaboração própria

Após identificação dos fungos por morfologia e taxonomia molecular em parceria com o Prof. Dr. Marco Antônio Soares da UFMT, pudemos comprovar a suposição de que fungos do mesmo gênero e espécie se associam as diferentes espécies de algas em estudo.

O intuito desse estudo era verificar se a mudança no hospedeiro influenciaria significativamente a produção metabólica, tendo em vista que ambas as algas foram coletadas muito próximas uma da outra, não havendo, portanto, variação nos fatores externos que pudessem interferir apenas em uma espécie hospedeira.

Já é amplamente relatado que variações na metodologia de cultivo de um micro-organismo podem afetar sua produção biológica. Este fato pode ser observado ao analisarmos as características de seus micélios, a diferença na quantidade de extrato produzido, bem como na variação de seu perfil químico.

4.3.1 Análise química do endófito *Diaporthe terebinthifolii*

As espécies de *Diaporthe*, pertencentes à família Diaporthaceae, são freqüentemente relatadas como patógenos de plantas, endófitos ou não-patogênicos, comumente isolados de uma ampla gama de hospedeiros (MURALI et al., 2006; BOTELLA e DIEZ, 2011).

Fungos deste gênero são reconhecidos por atuarem como bons produtores de vários compostos bioativos (ELSAESSER et al., 2005; ZANG et al., 2012). GOMES et al. (2013) descreveu duas novas espécies, *D. terebinthifolii* e *D. endophytica*, como endófitos isolados das plantas medicinais *Schinus terebinthifolius* e *Maytenus ilicifolia*, respectivamente. Estes endófitos são capazes de produzir metabólitos secundários de interesse em várias áreas do conhecimento, como na agricultura, através da produção de compostos que atuam diretamente contra *P. citricarpa*, responsável por causar diversas doenças em frutos cítricos, no setor farmacêutico através da formação de ácido diapólico A-B, por exemplo, que apresenta excelente atividade antimicrobiana e citotóxica, entre outros.

D. terebinthifolii foi repicado em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA preparado com água ultrapura MilliQ para o endófito isolado de *A. spicifera* (**Figura 59**), enquanto o isolado de *D. marginata* foi preparado com água ultrapura MilliQ (**Figura 60**) e com água do mar (**Figura 61**), de acordo com a metodologia utilizada no seu isolamento. Posteriormente foi cultivado em escala reduzida conforme o **Fluxograma 1** fornecendo 116 mg para o extrato com água ultrapura de *A. spicifera*, 138 mg para o extrato com água ultrapura de *D. marginata* e 100 mg para o cultivo em água do mar.

A análise por RMN de ¹H (**Figura 62**) demonstrou que o fungo cultivado com água do mar apresentou sinais entre 0,5 e 8,0 ppm, referentes a hidrogênios metílicos, metilênicos, metínicos, olefínicos, carbinólicos e aromáticos. A análise por CLAE-DAD com detecção em 254 nm (**Figura 63**) apresentou picos entre 19 e 37 minutos, evidenciando uma maior produção de compostos de média e baixa polaridade.

Para este fungo foi possível observar que a mudança de hospedeiro e da água usada no cultivo não influenciaram na variação da quantidade de extrato produzido. Entretanto, ao analisarmos os perfis químicos, verificamos que houve uma grande diversidade de compostos produzidos, com poucos metabólitos em comum, mas em concentrações diferentes.

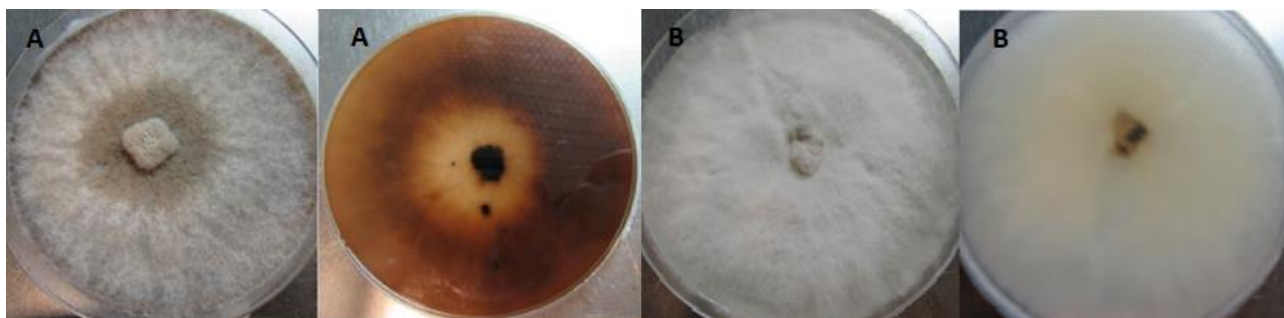
O perfil deste extrato por CG-EM apresentou uma grande variedade de picos por todo cromatograma (**Figura 64**), sendo possível, de acordo com a similaridade e IR (**Tabela 8**), a identificação de 11 metabólitos (**Figura 64**).

Figura 59: *D. terebinthifolii* isolado de *A. spicifera* em água MQ: Superfície



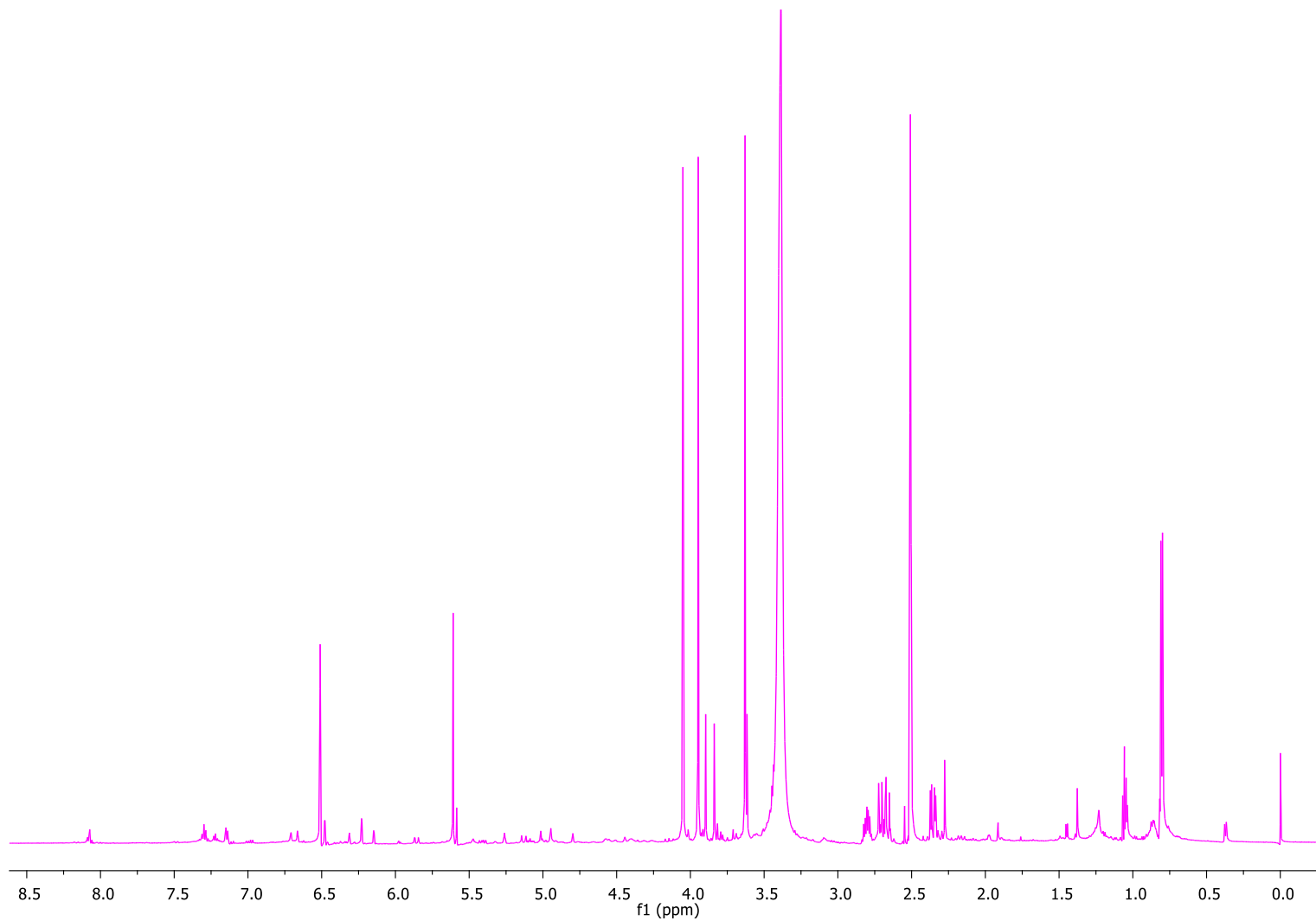
Fonte: Elaboração própria

Figura 60: *D. terebinthifolii* isolado de **A:** *D. marginata* em água MQ; **B:** *D. marginata* em água Mar (Superfície e parte inferior do endófito).



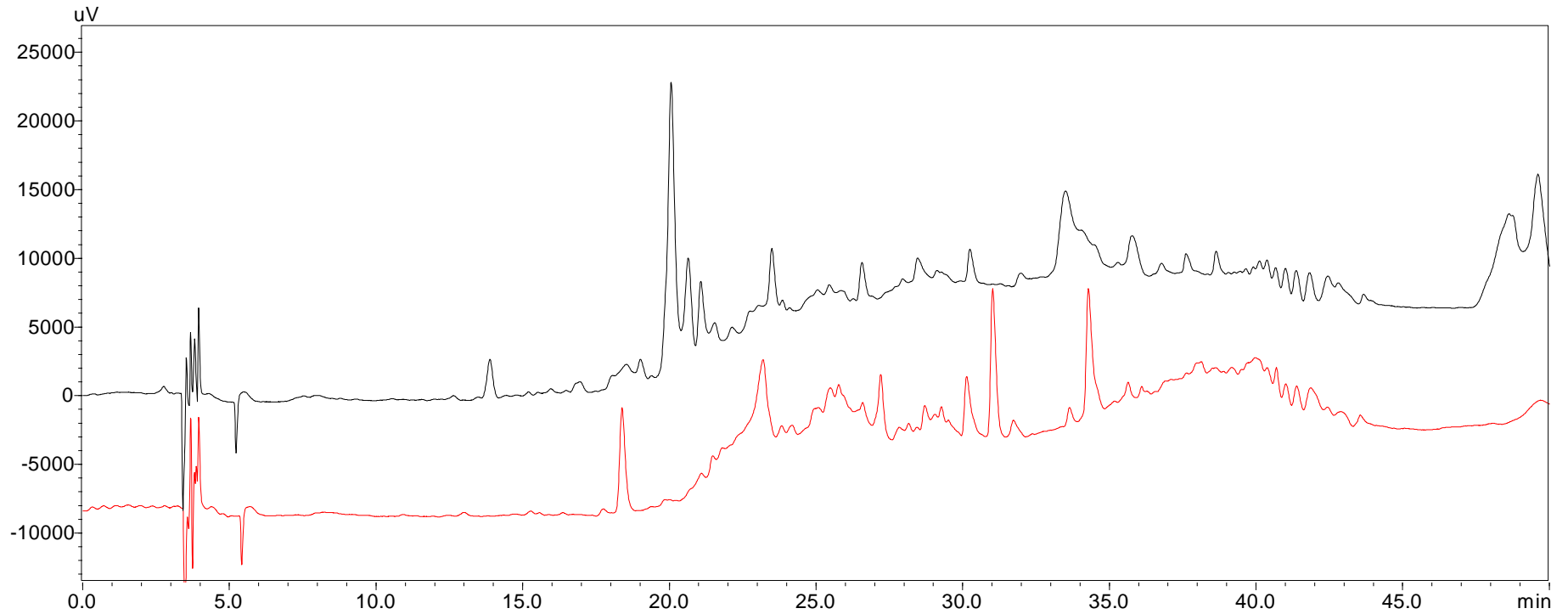
Fonte: Elaboração própria

Figura 61: Espectro de RMN de ^1H do extrato *D. terebinthifolii* isolado de *D. marginata* em água do Mar (DMSO- d_6 , 300 MHz)



Fonte: Elaboração própria

Figura 62: Comparação entre os cromatogramas das análises por CLAE-DAD – fase reversa do extrato bruto de *D. terebinthifolii* (em modo gradiente, com detecção em 254nm).



Fonte: Elaboração própria

4.3.1.1 Identificação dos constituintes de *D. terebinthifolii* isolado de *D. marginata* por CG-EM

Figura 63: Perfil do extrato bruto de *D. terebinthifolii* em CG-EM

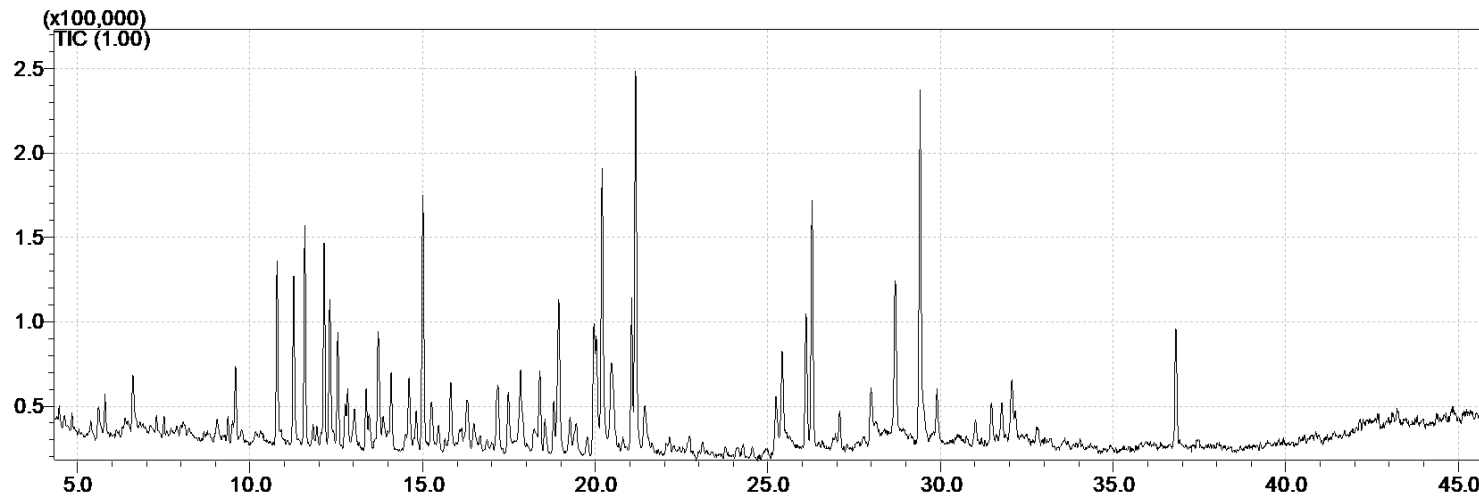
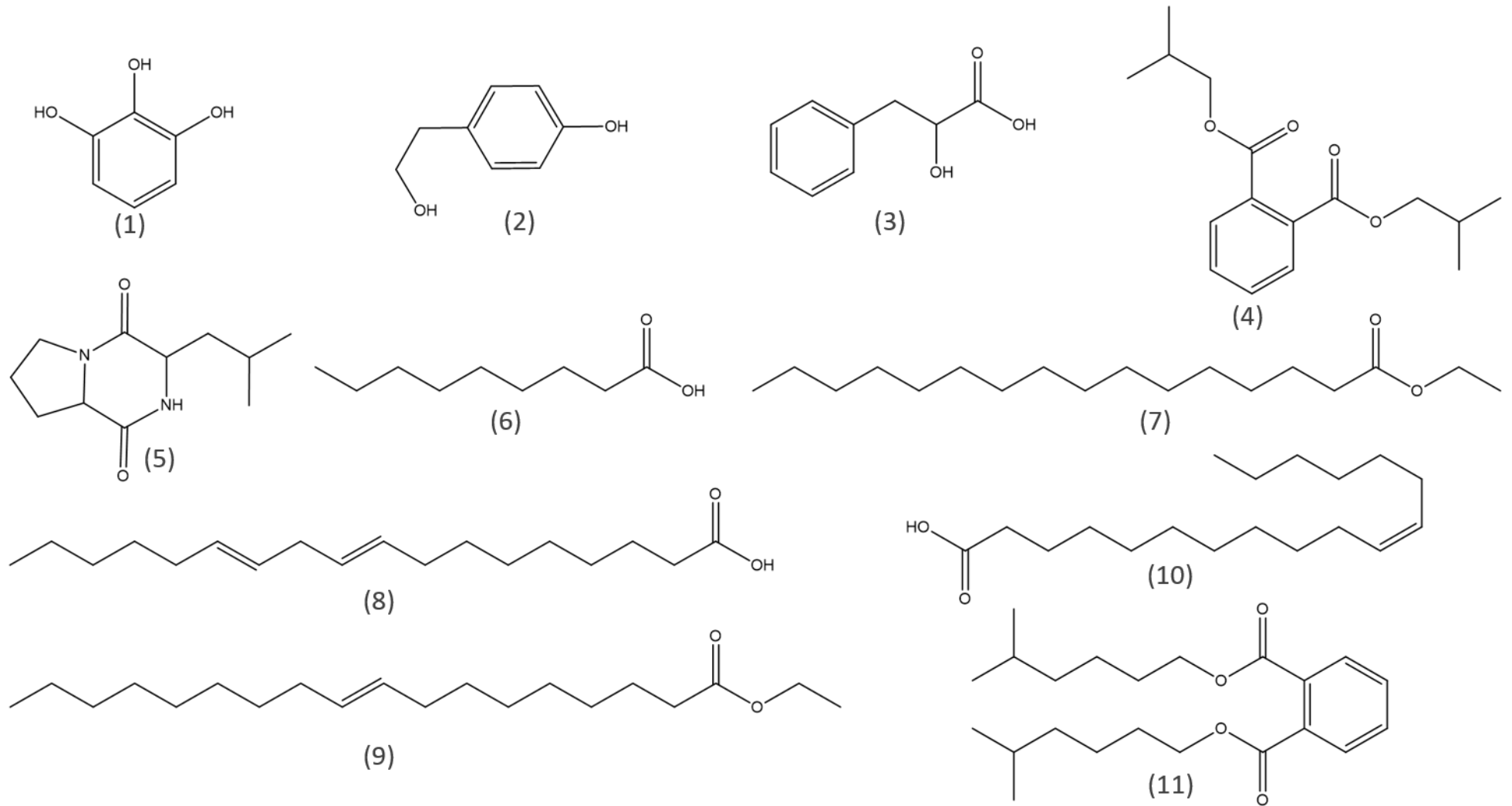


Tabela 8: Compostos propostos pelo GC-MS Data Analysis para *D. terebinthifolii*.

	COMPOSTO	#CAS	Tr	IR teórico	IR	Similaridade (%)	Referência
1	Pyrogallol	17864 - 23 - 2	8,82	1560	1554	91	Jaroszynska and Ligor, 2005
2	Tyrosol	321884 - 10 - 0	9,4	1568	1578	89	Andriamaharavo, 2014
3	3-Phenyllactic acid	27750 - 45 - 4	9,87	1600	1596	89	Kimura, et al., 1999
4	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	84 - 69 - 5	17,19	1871.8	1843	84	Zeng, et al., 2007
5	[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)	5654 - 86 - 4	18,4	1908	1882	92	Xu, et al., 2012
6	n-Hexadecanoic acid	506 - 30 - 9	20,02	1958	1934	90	Wu, et al., 2005
7	Hexadecanoic acid, ethyl ester	628 - 97 - 7	21,05	1975	1967	95	Andrade, et al., 1998
8	Linoelaidic acid	506 - 21 - 8	25,23	2104	2103	87	Saroglou, et al., 2006
9	cis-Vaccenic acid	506 - 17 - 2	25,4	2116	2109	94	Tret'yakov, 2007
10	Ethyl 9-hexadecenoate	54546 - 22 - 4	26,28	2174	2138	93	Andriamaharavo, 2014
11	Phthalic acid, bis(6-methylheptyl) esterR	117 - 84 - 0	36,82	2540	2514	96	Kotowska, et al., 2012

Figura 64: Compostos identificados no extrato de *D. terebinthifolii*.



Fonte: Elaboração própria

4.3.2 *Annulohypoxyton stygium*

Annulohypoxyton é um gênero de fungos da família Xylariaceae. Este gênero foi criado em 2005 e contém espécies anteriormente incluídas no gênero *Hypoxyton*. Existem, cerca de 27 espécies com uma distribuição amplamente disseminada.

A. stygium foi isolado do ambiente marinho, apenas recentemente, como por exemplo, associado à alga *Bostrychia radicans*. Relatos acerca deste fungo evidenciaram seu potencial em produzir metabólitos secundários com propriedades citotóxicas, antibacterianas e antioxidantes.

O endófito foi repicado em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA preparado com água ultrapura MilliQ tanto para o endófito isolado de *A. spicifera* (**Figura 65 A**) quanto para o isolado de *D. marginata* (**Figura 65 B**) de acordo com a metodologia utilizada no seu isolamento. Posteriormente foi cultivado em escala reduzida conforme o **Fluxograma 1** fornecendo 100 mg para o extrato de *A. spicifera* e 138 mg para o extrato de *D. marginata*.

A análise por RMN de ^1H (**Figura 66**) demonstrou que os dois apresentaram sinais entre 0,5 e 12,0 ppm, referentes a hidrogênios metílicos, metilênicos, metínicos, olefínicos, carbinólicos, aromáticos, fenólicos, aldeídos e ácidos carboxílicos, sendo que os sinais não apresentam os mesmos deslocamentos químicos, evidenciando a produção de metabólitos diferentes em cada cultivo e em diferentes quantidades, tendo em vista que foram preparados com a mesma concentrações.

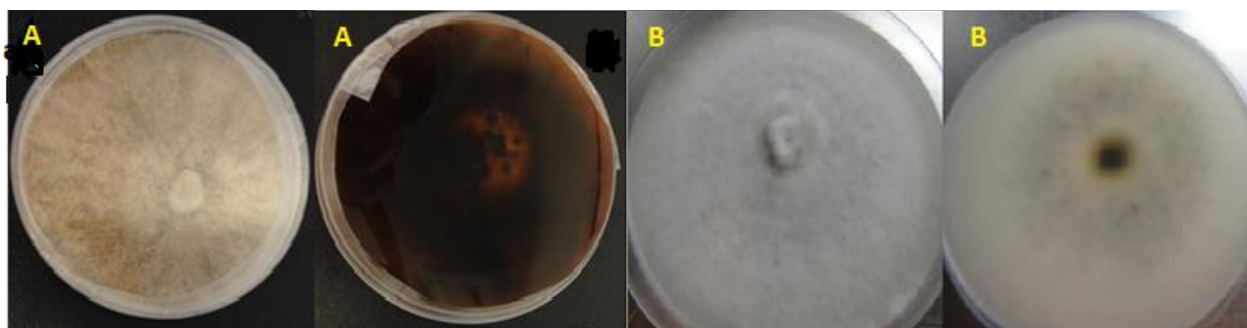
Na análise por CLAE-DAD em 254 nm (**Figura 67**) é possível observar que as bandas se concentram entre 20 e 30 minutos para o extrato de *A. spicifera*, evidenciando uma maior produção de compostos de média polaridade. Já o extrato de *D. marginata* apresentou bandas entre 20 e 35 minutos característicos de compostos de média e baixa polaridade.

Para este fungo foi possível observar que a mudança de hospedeiro não influenciou significativamente na variação da quantidade de extrato produzido. Entretanto, ao analisarmos os perfis químicos, verificamos que houve uma grande diversidade de compostos produzidos, com poucos metabólitos em comum, mas em concentrações diferentes.

Foi possível verificar que a produção foi bem diversificada entre eles, além de aumento e diminuição de alguns compostos com mesmo tempo de retenção, presentes em ambos os cromatogramas.

O perfil deste extrato por CG-EM apresentou uma grande variedade de picos por todo cromatograma (**Figura 68**), sendo possível, de acordo com a similaridade e IR (**Tabela 9**), a identificação de 10 metabólitos (**Figura 69**).

Figura 65: *A. stygium* isolado de **A:** *A. spicifera* em água ultrapura; **B:** *D. marginata* em água ultrapura (Superfície e parte inferior do endófito).



Fonte: Elaboração própria

Figura 66: Comparação dos espectros de RMN de ^1H do extrato *A. stygium* isolado de *D. marginata* (A) e *A. spicifera* (B) em água ultrapura (DMSO- d_6 , 300 MHz).

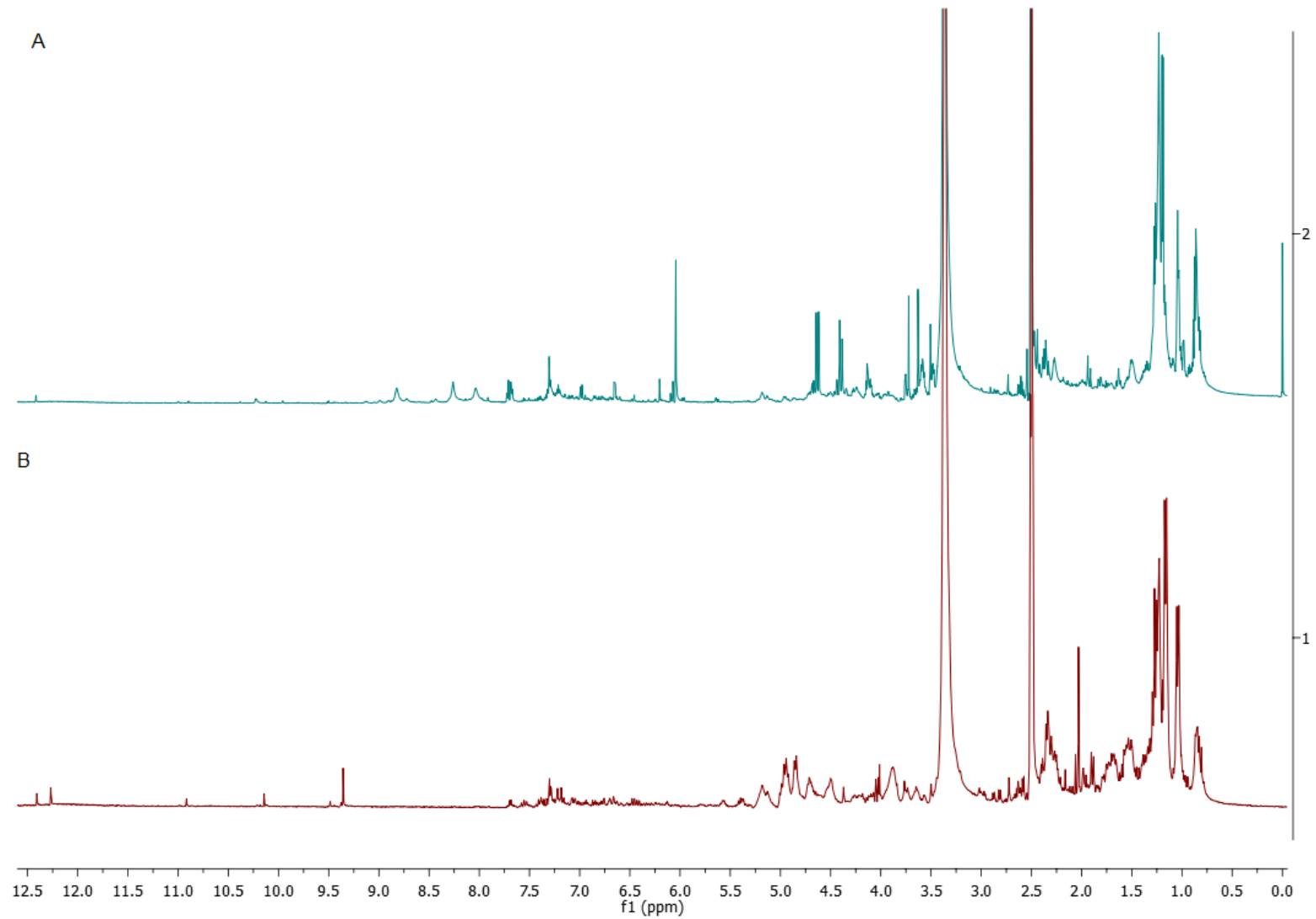
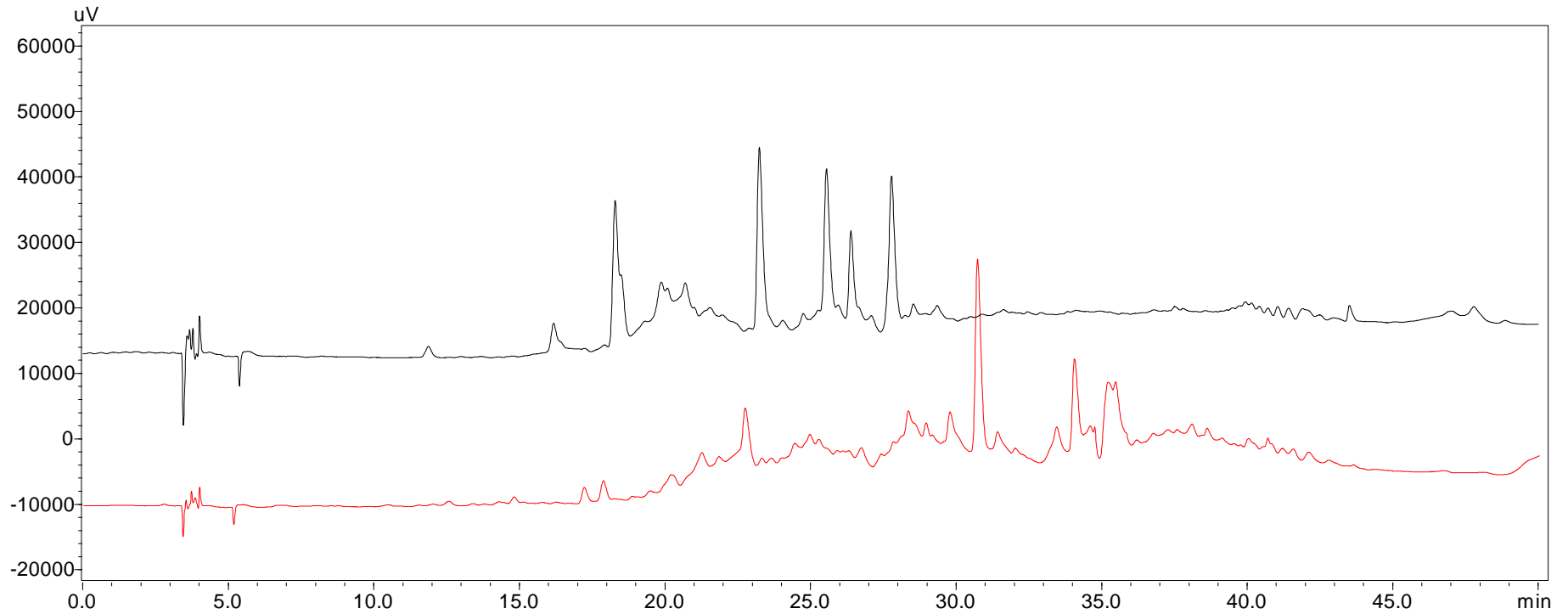


Figura 67: Comparação entre os cromatogramas das análises por CLAE-DAD – fase reversa do extrato bruto de *A. stygium* (modo gradiente, com detecção em 254nm).



Fonte: Elaboração própria

4.3.2.1 Identificação dos constituintes de *Annulohyphoxylon stygium* isolado de *D. marginata* por CG-EM

Figura 68: Perfil do extrato bruto de *A. stygium* em CG-EM.

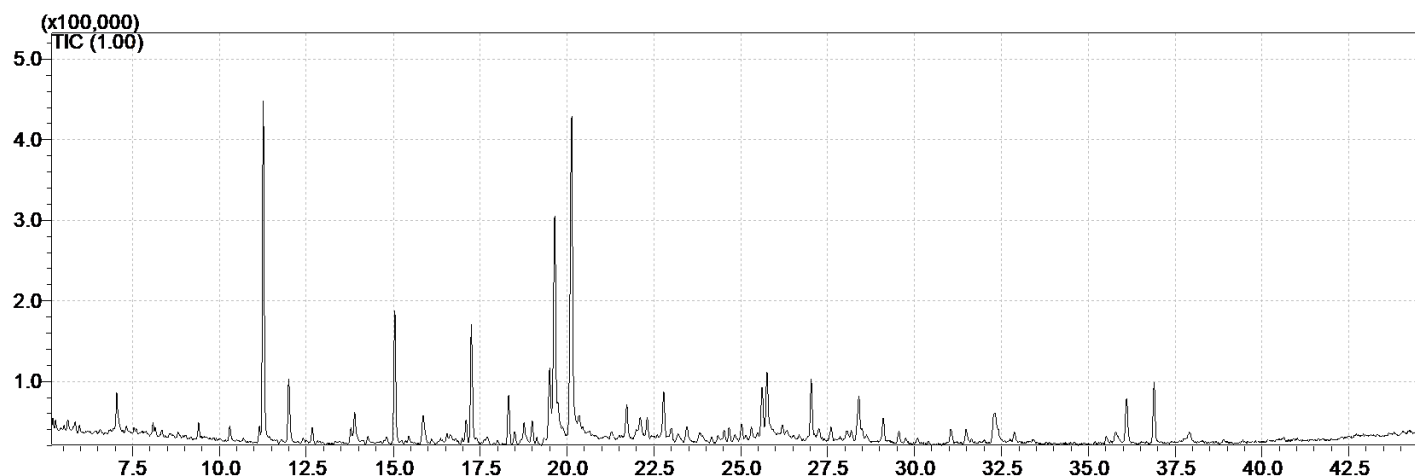
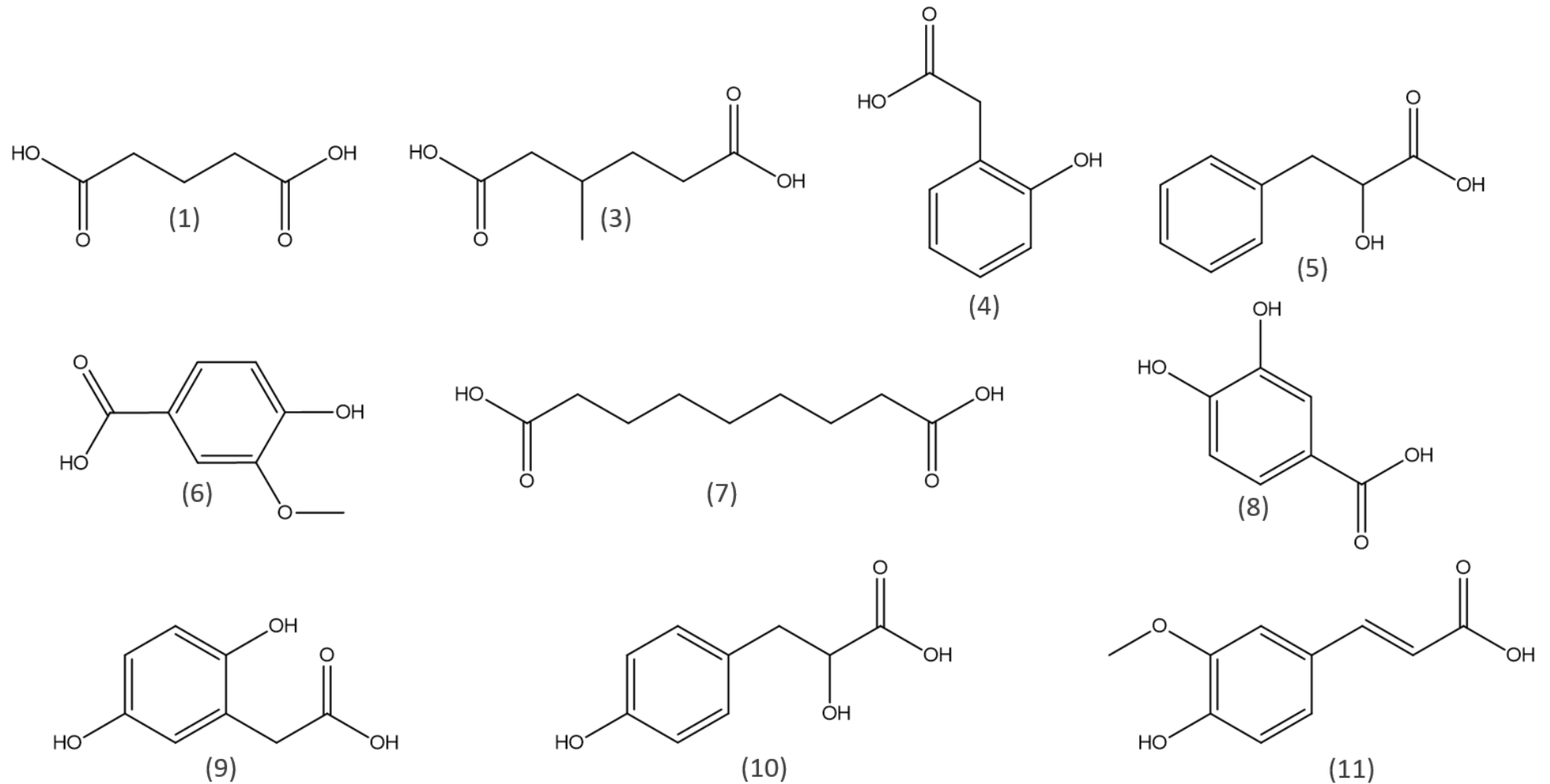


Tabela 9: Compostos propostos pelo GC-MS Data Analysis para *A. stygium*.

	COMPOSTO	#CAS	Tr	IR teórico	IR	Similaridade (%)	Referência
1	Pentanedioic acid	55494 - 07 - 0	5,53	1404	1403	88	Kimura, et al., 1999
	Hexanedioic acid	18105 - 31 - 2	7,7	1510	1509	85	Ohie, et al., 2000
2	3-Methyladipic acid	55520 - 93 - 9	8,44	1539	1534	82	Kimura, et al., 1999
3	2-Hydroxybenzeneacetic acid	27750 - 52 - 3	9,4	1564	1578	85	Tret'yakov, 2007
4	3-Phenyllactic acid	27750 - 45 - 4	9,83	1579	1595	93	Tret'yakov, 2008
5	Vanillic Acid	2078 - 15 - 1	15,09	1779	1775	89	Jaroszynska and Ligor, 2005
6	Azelaic acid	17906 - 08 - 0	16,03	1800	1806	90	Kimura, et al., 1999
7	Protocatechoic acid	2347 - 40 - 2	16,93	1836	1835	89	Jaroszynska, 2003
8	Homogentisic acid	55334 - 62 - 8	17,5	1860	1859	83	Jaroszynska and Ligor, 2005
9	4-Hydroxyphenyllactic acid	27750 - 67 - 0	19,58	1919	1920	84	Ohie, et al., 2000
10	Ferulic acid	10517 - 09 - 6	25,28	2104	2105	81	Jaroszynska and Ligor, 2005

Figura 69: Compostos identificados no extrato bruto de *A. stygium*.



Fonte: Elaboração própria

4.3.3 Análise química do endófito *Hypoxyllum monticulosum*.

Fungos do gênero *Hypoxyllon* são ascomicetos pertencentes à família Xylariaceae, uma das famílias fúngicas mais prolíficas em metabólitos secundários, com mais de 130 espécies relatadas até o momento. Micro-organismos pertencentes a este gênero colonizam vários habitats marinhos e terrestres. Até momento, cerca de 500 metabólitos secundários foram descritos para este gênero, a maioria deles exibindo relevantes atividade biológicas.

H. monticulosum foi repicado em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA preparado com água ultrapura (**Figura 70 A**) e com água do mar (**Figura 70 B**), de acordo com a metodologia utilizada no seu isolamento (pág. 35). Posteriormente foi cultivado em escala reduzida conforme o **Fluxograma 1** fornecendo 712 mg para o extrato obtido do cultivo com água ultrapura e 158 mg para o extrato obtido do cultivo em água do mar.

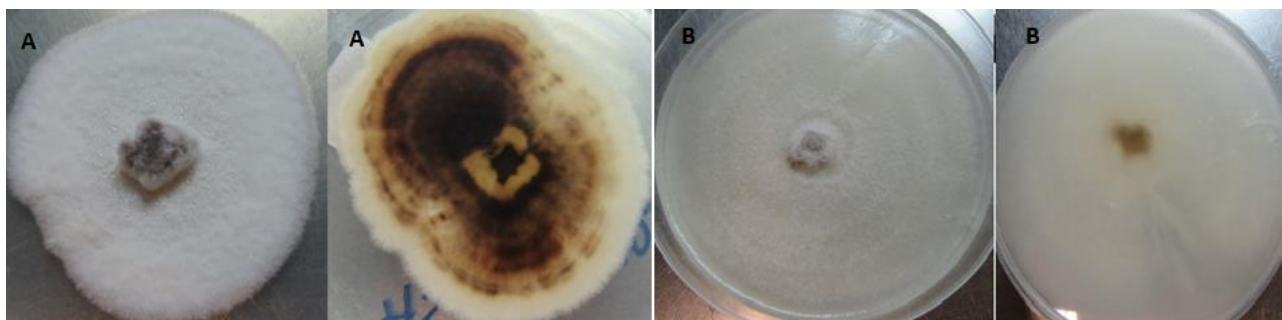
Já foi amplamente relatado que variações na metodologia de cultivo de um micro-organismo afetam sua produção biológica. Este fato pode ser observado também neste estudo, pelas características de seus micélios, pela grande diferença de quantidade de extrato produzido, bem como pela variação de seu perfil químico.

A análise por RMN de ^1H (**Figura 71**) demonstrou que o fungo cultivado com água do mar (**A**) apresentou poucos sinais entre 0,5 e 4,0 ppm, referentes a hidrogênios metílicos, metilênicos e olefínicos, enquanto o fungo cultivado com água ultrapura (**B**) apresentou produção metabólica com maior diversidade química, com sinais entre 0,5 e 8,0 ppm, referentes a hidrogênios metílicos, metilênicos, metínicos, olefínicos, carbinólicos e aromáticos. As diferenças observadas podem ser consequência de um subconjunto mais restrito de vias biossintéticas que codificam a produção de metabólitos secundários terem sido ativadas no cultivo com água do mar, ou alguns desses compostos terem sido produzidos em quantidades não detectadas, devido às condições de cultivo utilizadas, que não estimularam sua biossíntese, através de sinais químicos ou ambientais propícios para a sua produção.

A análise por CLAE-DAD com detecção em 254 nm (**Figura 72**) apresentou diversos picos por todo cromatograma, evidenciando a produção de compostos de alta, média e baixa polaridade.

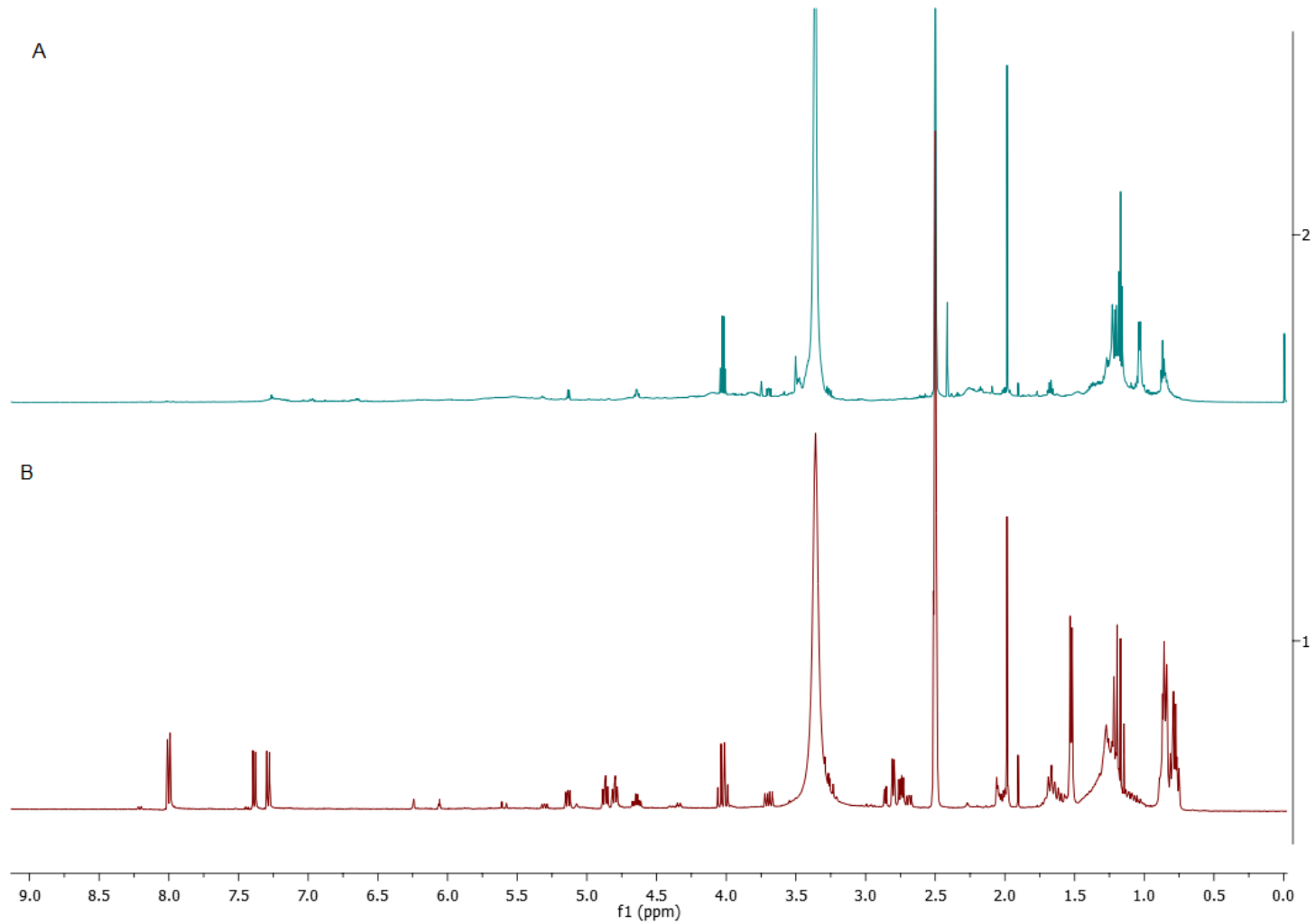
O perfil deste extrato por CG-EM apresentou uma grande variedade de picos por todo cromatograma (**Figura 73**), sendo possível, de acordo com a similaridade e IR (**Tabela 10**), a identificação de 11 metabólitos (**Figura 74**).

Figura 70: Cultivo de *H. monticulosum* isolado da alga vermelha *A. spicifera* em meio BDA em **A**: água ultrapura; **B**: água do mar (Superfície e parte inferior da placa de Petri contendo o endófito).



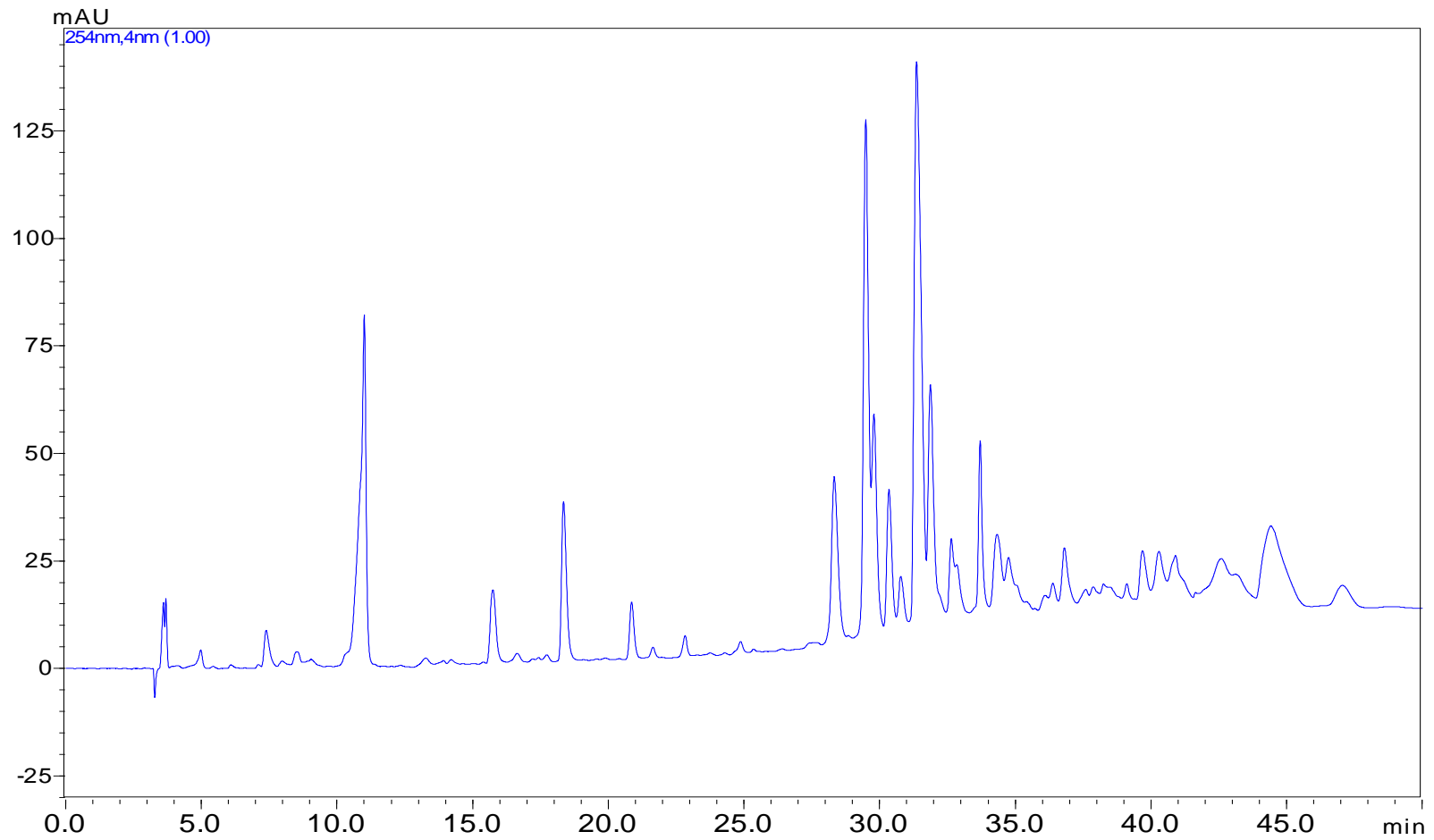
Fonte: Elaboração própria

Figura 71: Comparação dos espectros de RMN de ^1H dos extratos de *H. monticulosum* isolado de *A. spicifera* em água do mar (**A**) e ultrapura (**B**) ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz).



Fonte: Elaboração própria

Figura 72: Cromatograma da análise por CLAE-DAD – fase reversa do extrato bruto de *A. stygium* (modo gradiente, com detecção em 254 nm).



Fonte: Elaboração própria

4.3.3.1 Identificação dos constituintes de *H. monticulosum* isolado de *A. spicifera* por CG-EM

Figura 73: Perfil do extrato bruto de *H. monticulosum* isolado de *A. spicifera* por CG-EM

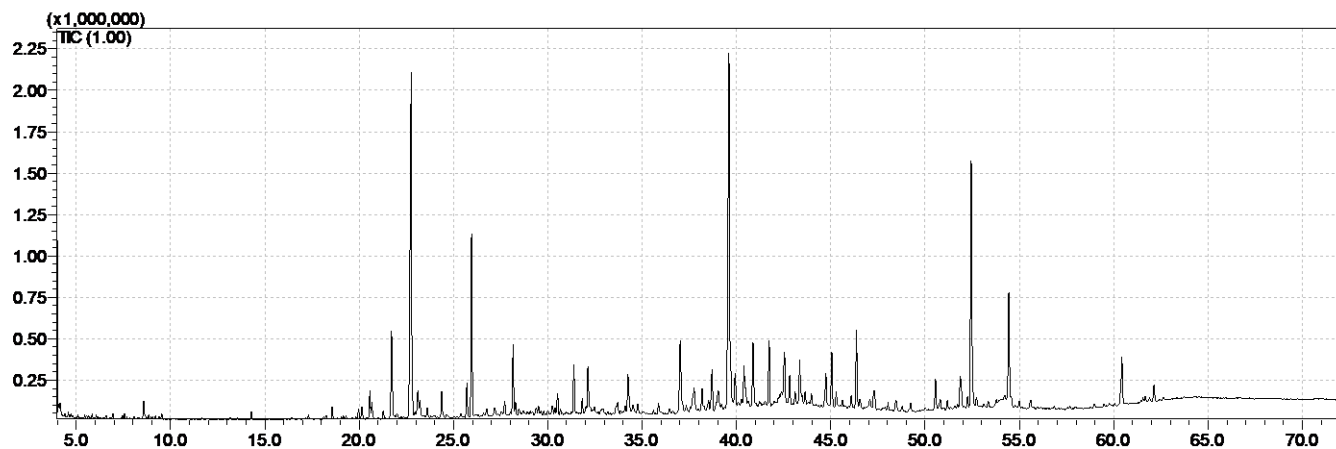
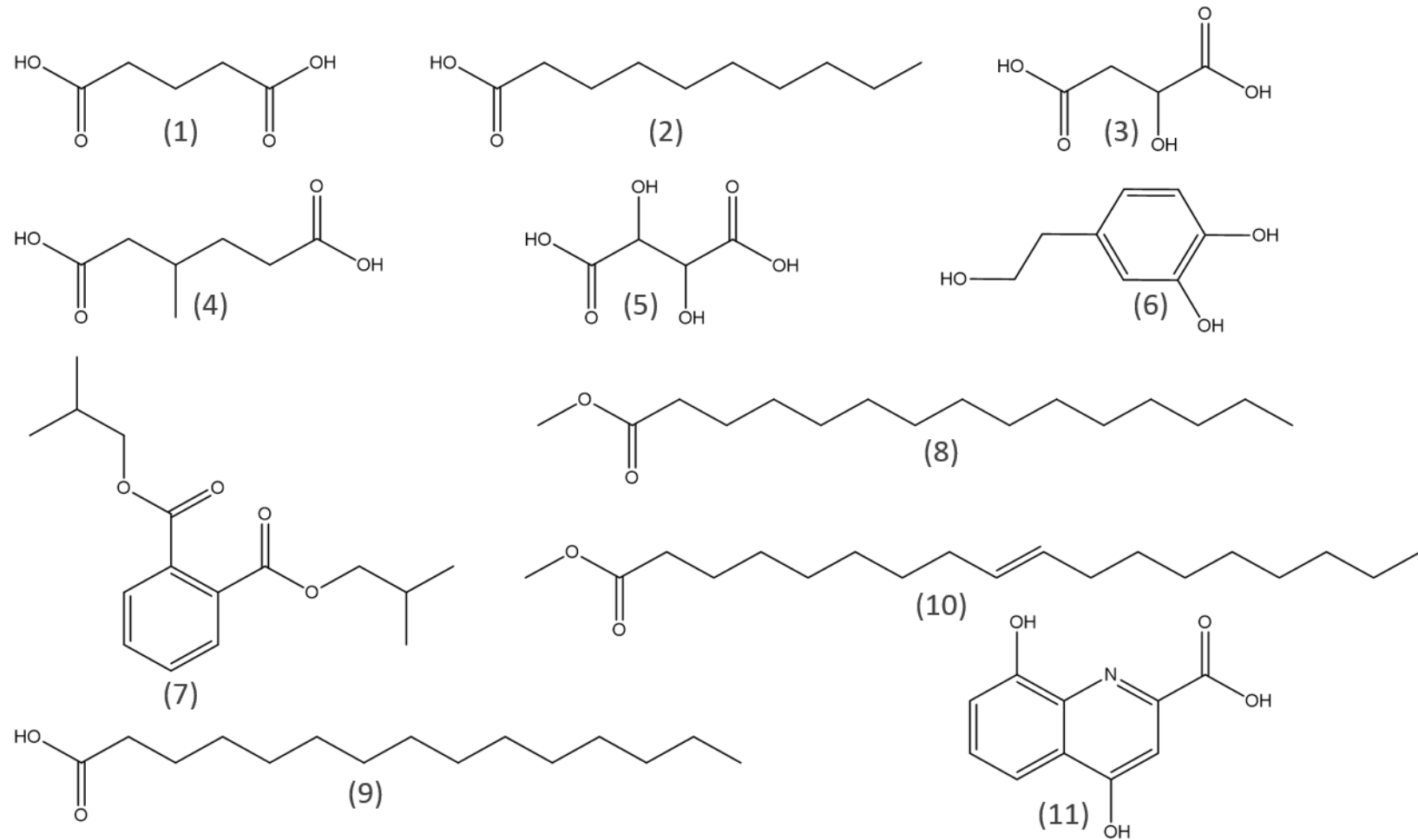


Tabela 10: Compostos propostos pelo GC-MS Data Analysis para *H. monticulosum*.

	Composto	# CAS	Tr	IR teórico	IR	Similaridade (%)	Referência
1	Pentanedioic acid	55494 - 07 - 0	5,53	1407	1403	88	Ohie, Fu, et al., 2000
2	Decanoic acid	55494 - 15 - 0	6,54	1450	1454	92	Tret'yakov, 2007
3	Malic acid	38166 - 11 - 9	7,43		1498	93	
4	3-Methyladipic acid	55520 - 93 - 9	8,43	1523	1539	87	Tret'yakov, 2007
5	Tartaric acid	18602 - 86 - 3	10,13	1665	1606	90	Lefevere, et al., 1989
6	Ethanol, (2-(3,4-dihydroxyphenyl))	68595 - 80 - 2	15,23	1756	1780	91	Andriamaharavo, 2014
7	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	84 - 69 - 5	18,12	1872	1873	91	Zeng, et al., 2007
8	Hexadecanoic acid, methyl ester	112-39-0	19,81	1926	1927	88	Quijano, et al., 2007
9	Palmitic Acid	55520 - 89 - 3	23,62	2047	2050	91	Kimura, et al., 1999
10	9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)	1937-62-8	25,39	2110	2108	84	Tret'yakov, 2007
11	Xanthurenic acid	55319 - 89 - 6	30,61	2255	2286	82	Tret'yakov, 2007

Fonte: Elaboração própria

Figura 74: Compostos identificados no extrato de *H. monticulosum* isolado de *A. spicifera*.



Fonte: Elaboração própria

A espécie fúngica *H. monticulosum* também foi isolada da alga vermelha *D. marginata*, repicada em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA preparado com água ultrapura (**Figura 75 A**) e com água do mar (**Figura 75 B**), de acordo com a metodologia utilizada no seu isolamento. Posteriormente foi cultivado em escala reduzida conforme **Fluxograma 1** fornecendo 240 mg do extrato obtido a partir do cultivo com água ultrapura e 156 mg para o extrato do cultivo em água do mar.

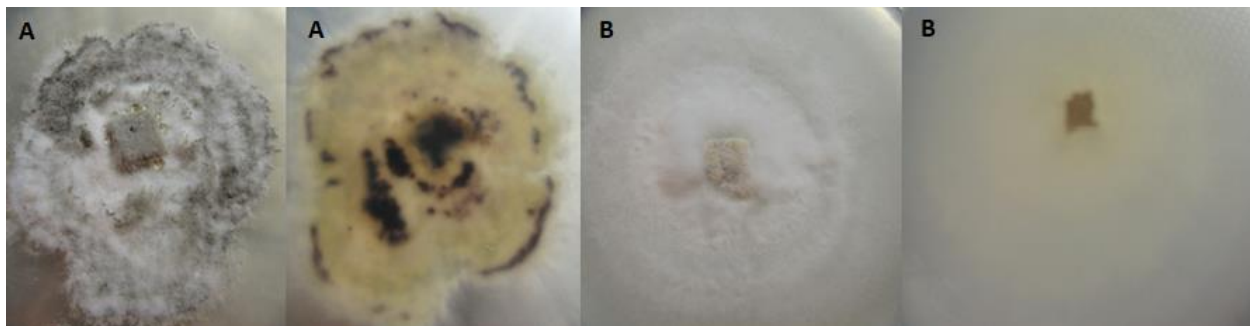
A análise por RMN de ^1H (**Figura 76**) demonstrou que o fungo cultivado com água ultrapura (**A**) apresentou uma maior diversidade química, com sinais entre 0,5 e 11,5 ppm, referentes hidrogênios metílicos, metilênicos, metínicos, olefínicos, carbinólicos, aromáticos, fenólicos, aldeídos e ácidos carboxílicos, enquanto o fungo cultivado com água do mar (**B**), apresentou menor variedade de sinais, concentrados entre 0,5 e 5,0 ppm e referentes a hidrogênios metílicos, metilênicos, metínicos e olefínicos.

A análise por CLAE-DAD em 254 nm (**Figura 77**) apresentou diversas bandas por todo cromatograma, evidenciando a produção de compostos de alta, média e baixa polaridade. É possível notar a produção de alguns compostos semelhantes, mas em diferentes concentrações, com aumento ou diminuição das bandas cromatográficas.

Para este fungo foi possível observar que a mudança de hospedeiro e da água usada no cultivo influenciaram significativamente na variação da quantidade de extrato produzido, bem como na diversidade de metabólitos produzidos. Essa diferença pode ser uma consequência de apenas um subconjunto de vias biossintéticas que codificam a produção de metabólitos secundários terem sido ativadas ou alguns desses compostos terem sido produzidos em baixas quantidades devido às condições de cultivo utilizadas, que não estimularam a biossíntese destes, através de sinais químicos ou ambientais propício para a sua produção.

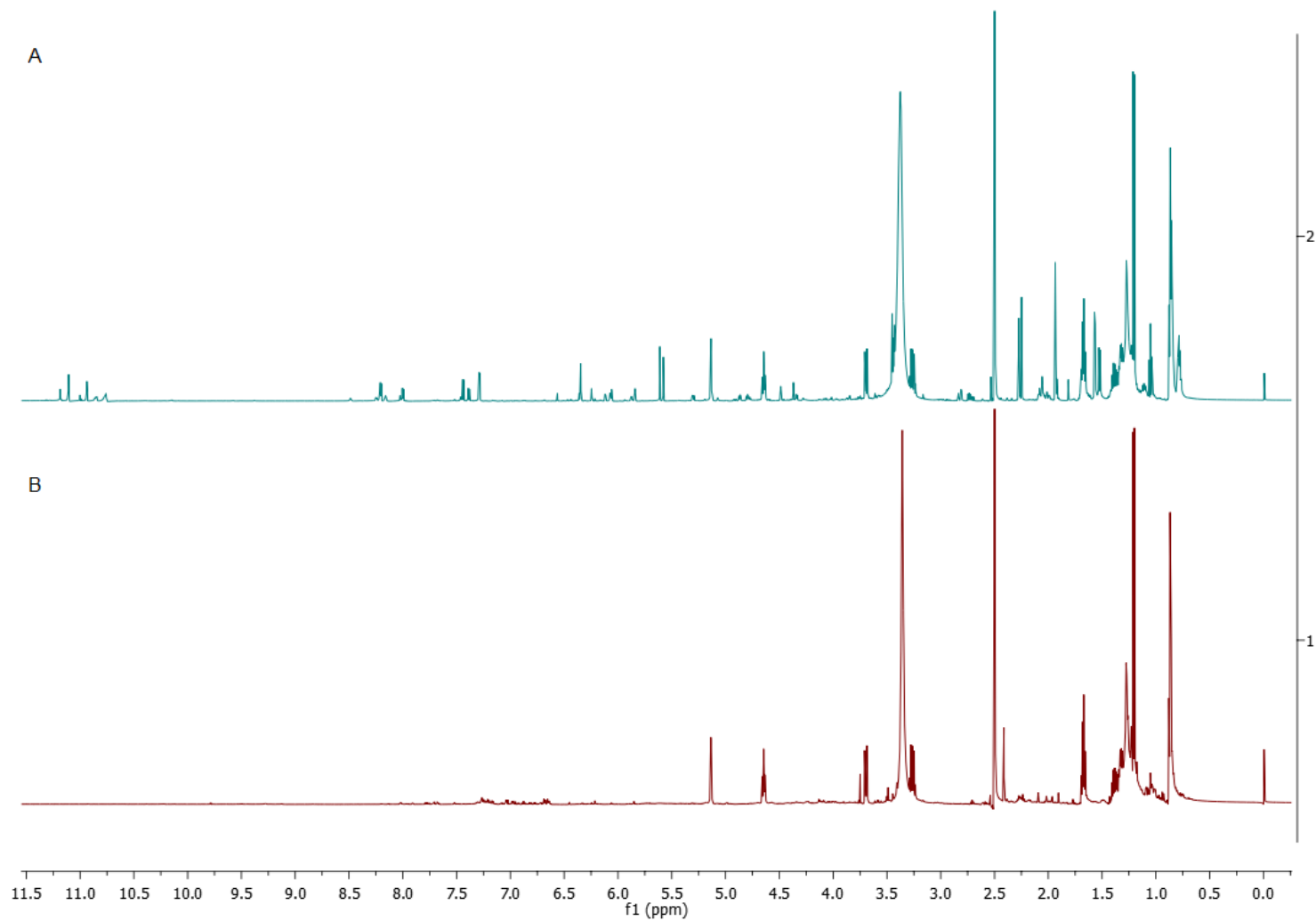
Adicionalmente, o perfil deste extrato por CG-EM apresentou uma grande variedade de picos por todo cromatograma, bem distribuídos entre 19 e 30 minutos (**Figura 78**), sendo possível, de acordo com a similaridade e IR (**Tabela 11**), a identificação de 11 metabólitos (**Figura 79**).

Figura 75: Cultivo de *H. monticulosum* isolado de *D. marginata* em meio BDA. **A:** água ultrapura; **B:** água do mar (Superfície e parte inferior da placa de Petri contendo o endófito).



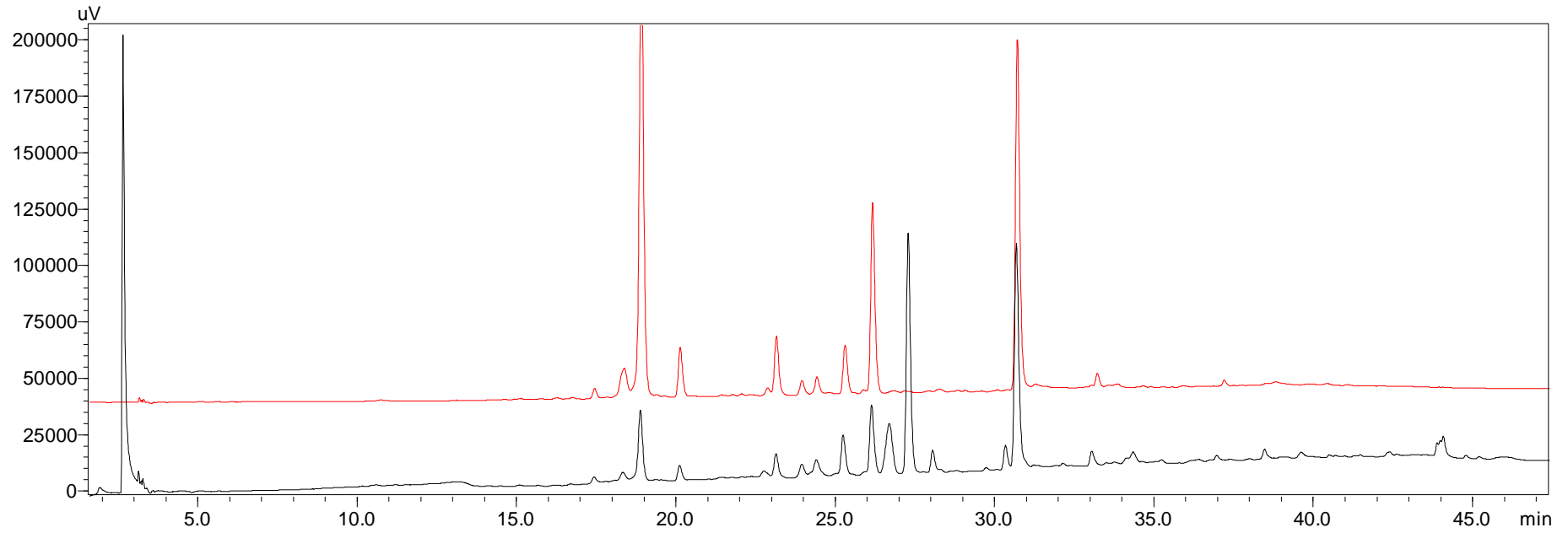
Fonte: Elaboração própria

Figura 76: Comparação dos RMN de ^1H Extrato de *H. monticulosum* isolado de *D. marginata* em água ultrapura (A) e do Mar (B) (DMSO- d_6 , 300 MHz).



Fonte: Elaboração própria

Figura 77: Cromatograma da análise por CLAE-DAD – fase reversa do extrato bruto de *H. monticulosum* isolado de *D. marginata* em modo gradiente, com detecção em 254nm.



Fonte: Elaboração própria

4.3.3.2 Identificação dos constituintes de *H. monticulosum* isolado de *D. marginata* por CG-EM

Figura 78: Perfil do extrato bruto de *H. monticulosum* isolado de *D. marginata* em CG-EM.

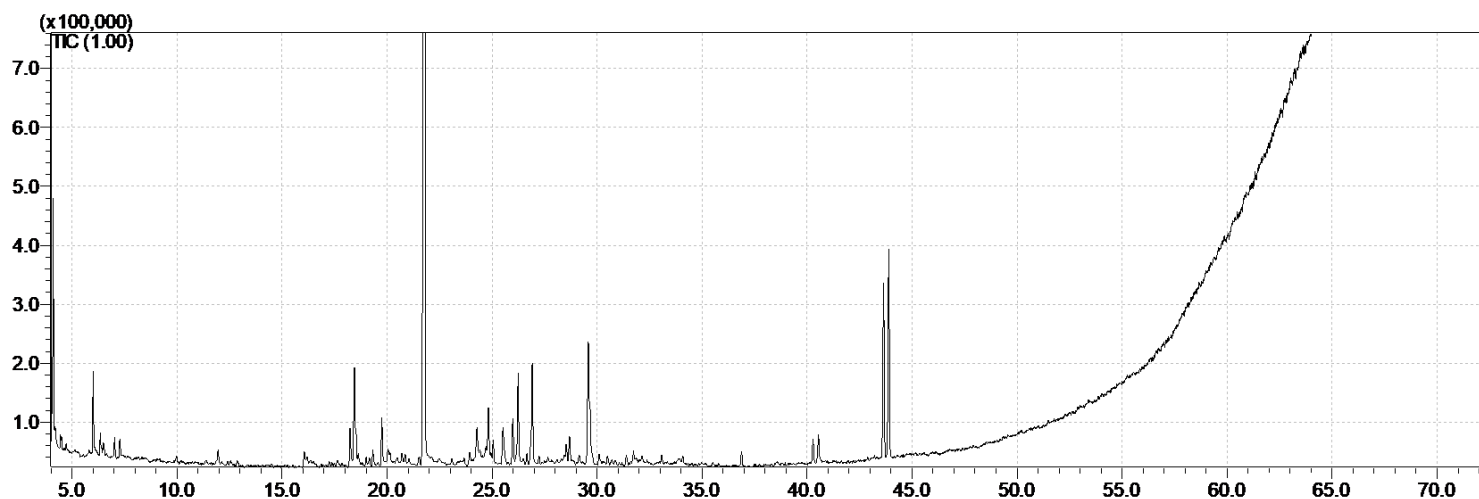
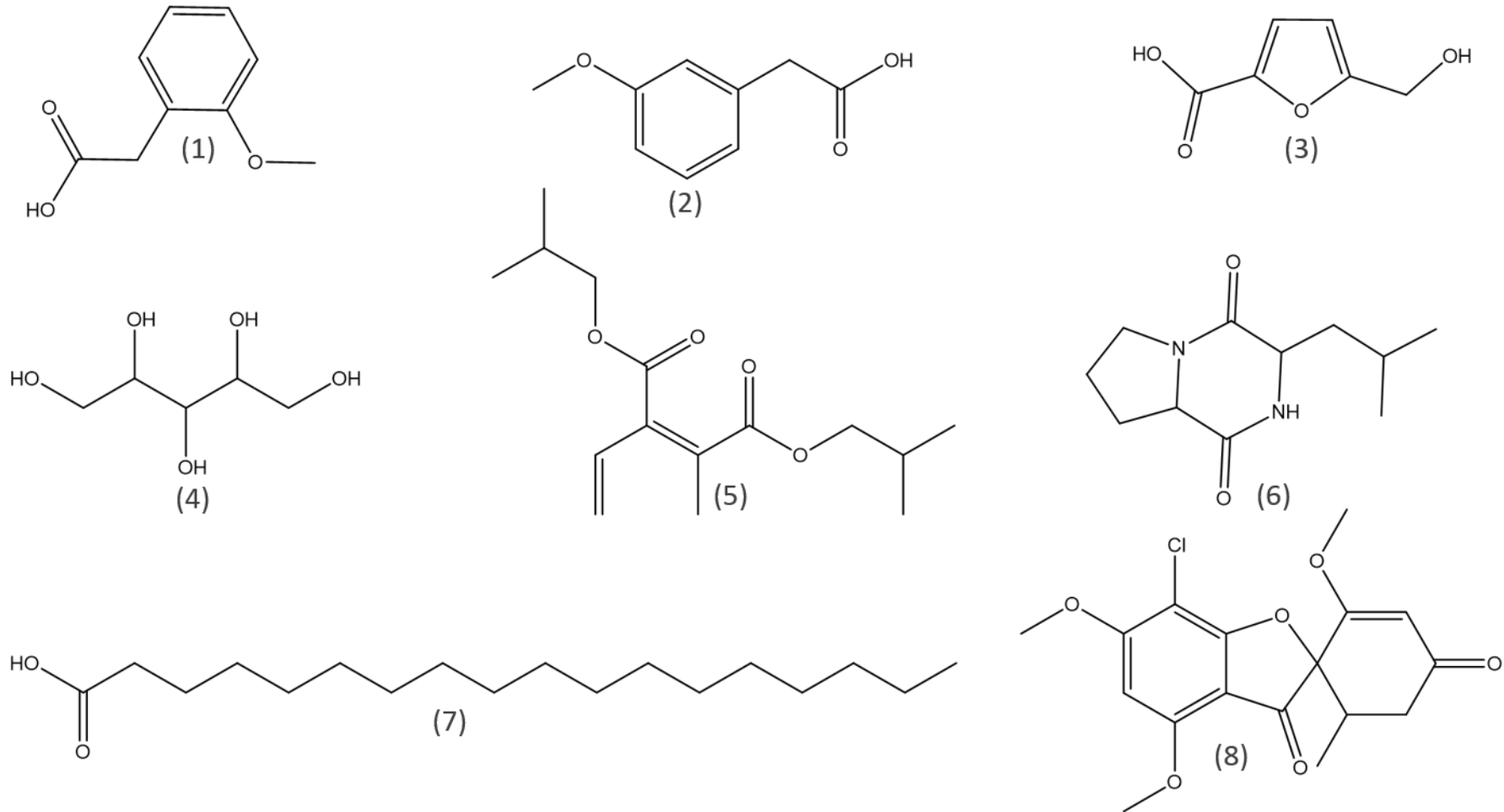


Tabela 11: Compostos propostos pelo GC-MS Data Analysis para *H. monticulosum*.

	Composto	#CAS	Tr	IR teorico	IR	Similaridade (%)	Referência
1	Benzeneacetic acid, 2-methoxy	93 - 25 - 4	6,01		1427	95	
2	3-Methoxyphenylacetic acid	27750 - 49 - 8	7,02	1496	1478	86	Butts, 1972
3	5-Hydroxymethyl-2-furoic acid	55517 - 40 - 3	8,86	1560	1556	90	Lefevere, et al., 1989
4	Xylitol	14199 - 72 - 5	14,33	1739	1750	90	Medeiros and Simoneit, 2007
5	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	84 - 69 - 5	18,12	1868	1873	90	Saroglou, et al., 2006
6	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)	5654 - 86 - 4	18,43	1908	1883	89	Xu, et al., 2012
7	Stearic acid	18748 - 91 - 9	29,51	2234	2248	90	Tret'yakov, 2007
8	Griseofulvin	126 - 07 - 8	43,2	2700	2769	91	Perrigo and Peel, 1981

Fonte: Elaboração própria

Figura 79: Compostos identificados no extrato de *H. monticulosum* isolado de *D. marginata*



Fonte: Elaboração própria

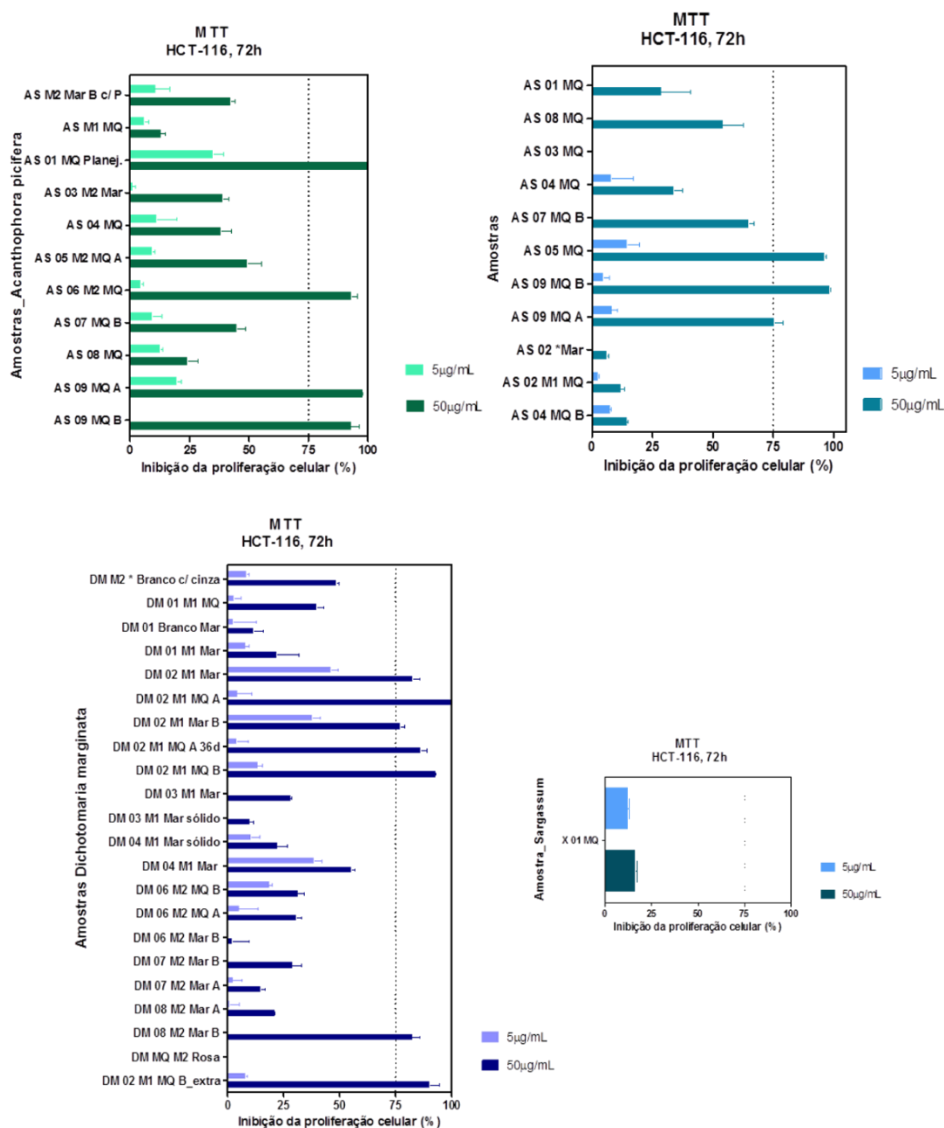
CAPÍTULO 2. PERFIL BIOLÓGICO DOS EXTRATOS

Os extratos brutos foram submetidos à avaliação citotóxica (**Figura 80**), anticolinesterásica (**Figura 81**), antimicrobiana (**Figura 82**), erradicação de biofilme (**Figura 83**), antiparasitária para doença de Chagas (**Tabela 13**) e Leishmaniose (**Tabela 14**), anti-inflamatório, anticoagulante e antídoto para veneno de cobras (**Tabela 15**) para verificar o potencial biológico de cada linhagem fúngica em estudo, contribuindo para o conhecimento da quimiodiversidade de micro-organismos de origem marinha.

4.4 Resultados dos ensaios biológicos testados

4.4.1 Atividade citotóxica

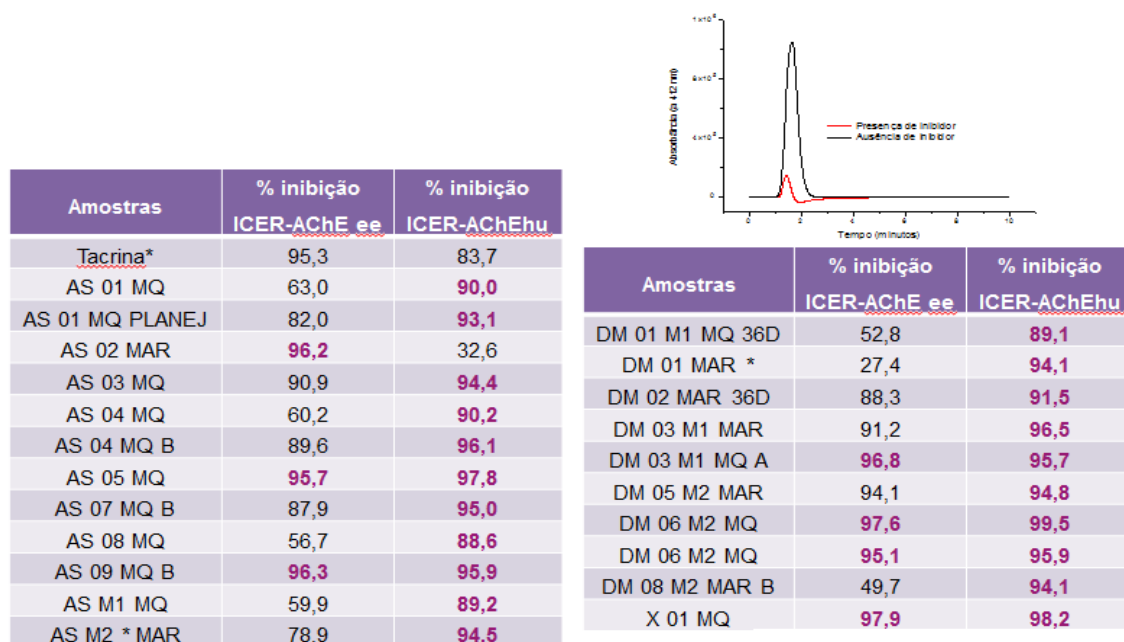
Figura 80: Atividade citotóxica dos extratos brutos dos fungos endofíticos em estudo contra linhagens de células tumorais HCT-116.



Esses resultados evidenciam que as amostras codificadas: **AS 01 MQ Planej.**, **AS 05 MQ**, **AS 06 MQ**, **AS 09 MQ A**, **AS 09 MQ B**, **DM 02 Mar**, **DM 02 MQ A**, **DM 02 MQ B** e **DM 08 Mar B** demonstraram inibição relevante da proliferação celular tumoral (>75%), e foram consideradas, portanto, citotóxicas.

4.4.2 Ensaio Anticolinesterásico

Figura 81: Resultado dos ensaios anticolinesterásico realizado com os extratos brutos.



Podemos observar que as amostras AS 01 MQ, AS 01 MQ planej AS 02 Mar, AS 03 MQ, AS 04 MQ, AS 05 MQ, AS 07 MQ, AS 08 MQ, AS 09 MQ B, AS M1 MQ, AS M2 * MAR, DM 01 M1 MQ 36d, DM 01 Mar, DM 02 Mar 36d, DM 03 M1 Mar, DM 03 M1 MQ A, DM 05 M2 Mar, DM 06 M2 MQ, DM 06 M2 MQ, DM 08 M2 Mar B e SV 01 MQ foram muito promissoras nesse ensaio biológico, evidenciando o potencial dos extratos em estudo para a descoberta de agentes inibidores de acetilcolinesterase, com destaque para as amostras que inibiram a enzima humana. Vale ressaltar que diversos extratos (grifados em roxo) se mostraram mais ativos que o padrão tacrina utilizado, indicando a presença de constituintes químicos com potencial para continuidade dos estudos, na busca por novos protótipos para o desenvolvimento de agentes terapêuticos para tratamento da doença de Alzheimer.

4.4.3 Ensaio Antimicrobiano

Os resultados da triagem para atividade antimicrobiana foram definidos pela presença ou ausência de atividade na concentração testada para cada linhagem bacteriana (**Figura 82**). Quando a CIM foi maior que a concentração testada, a amostra foi considerada inativa.

Figura 82: Atividade antimicrobiana dos extratos brutos contra linhagens bacterianas.

Linhagens bacterianas	CIM ($\mu\text{g/mL}$)																	
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18
<i>S. epidermidis</i> ATCC35984	> 512	< 512	> 512	< 512	> 512	< 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	< 512	> 512	< 512	> 512	< 512	< 512	> 512
<i>S. aureus</i> ATCC25923	> 512	< 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	< 512	< 512	> 512	> 512
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	> 512	< 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	< 512	< 512	< 512	> 512	> 512
<i>E. faecium</i> VRE16	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512
<i>K. pneumoniae</i> ATCC700603	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512
<i>E. coli</i> ATCC25922	> 512	< 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	< 512	> 512	> 512

Fonte: Elaboração própria

Códigos: **C1** (SV 01 MQ); **C2** (DM 06 MQ); **C3** (DM 08 MQ A); **C4** (DM 02 M1 MQ A); **C5** (DM 02 M1 MQ B); **C6** (DM 03 M1 Mar); **C7** (DM 02 M1 Mar B); **C8** (DM 05 M2 Mar); **C9** (DM 02 Mar 36d); **C10** (DM 04 M1 MQ); **C11** (DM 03 M1 MQ A); **C12** (AS 09 MQ A); **C13** (AS 03 M1 MQ); **C14** (AS 05 MQ); **C15** (AS 07 MQ B); **C16** (AS 04 MQ); **C17** (AS 09 MQ B); **C18** (AS 01 MQ).

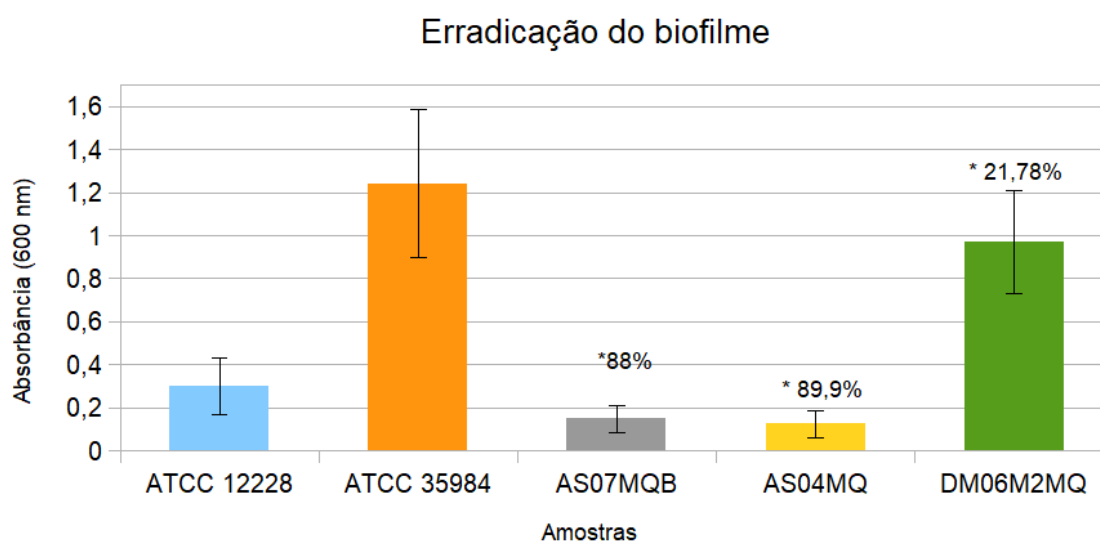
Os extratos que apresentaram atividade microbiana (CIM < 512 µg/mL) foram também testados para avaliar seu potencial na erradicação de biofilmes (**Tabela 12**).

S. epidermidis ATCC 34984 é uma linhagem boa formadora de biofilme, enquanto que *S. epidermidis* ATCC 12228 não é. A comparação da formação de biofilme entre elas apresentou diferença significativa com $p < 0,00000186$. A capacidade de erradicação do biofilme formado pela *S. epidermidis* ATCC 34984 foi analisada para os extratos: AS 07 MQ B, AS 04 MQ e DM 06 M2 MQ (**Figura 83 A**), DM 03 M1, AS 06 M2 MQ e DM 02 M1 MQ A (**Figura 83 B**), AS 05/AS 09 MQ (**Figura 83 C**) a 512 µg/mL.

Tabela 12: Capacidade de erradicação do biofilme formado por *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984:

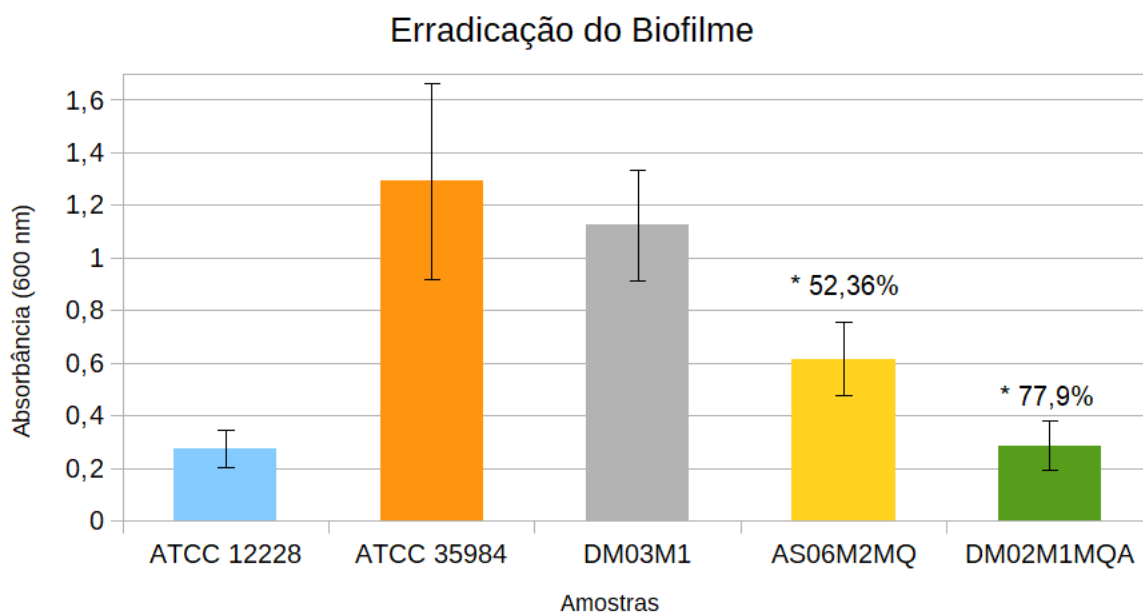
Extratos testados (concentração)	Capacidade de erradicação de biofilme
AS 07 MQ B (512 µg/ml)	Sim
AS 04 MQ (512 µg/ml)	Sim
DM 06 M2 MQ (512 µg/ml)	Sim
DM 03 M1 (512 µg/ml)	Não
AS 06 M2 MQ (512 µg/ml)	Sim
DM 02 M1 MQ A (512 µg/ml)	Sim
AS 05/AS 09 (512 µg/ml)	Sim

Figura 83 A: Quantidade de biofilme da *S. epidermidis* ATCC 35984 depois de tratado com os extratos brutos AS 07 MQ B, AS 04 MQ e DM 06 M2 MQ a 512 µg/mL



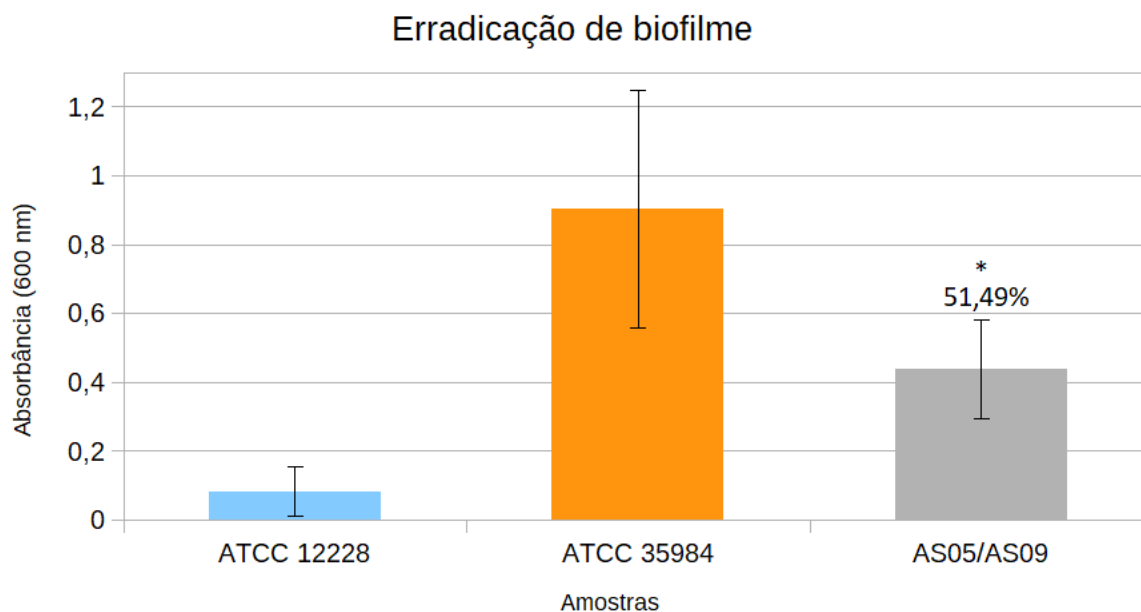
Dos compostos testados, todos os três foram capazes de erradicar significativamente o biofilme formado, com valor de p igual a 0,00000000184, 0,00000000128 e 0,04, respectivamente. A capacidade de erradicação do biofilme para cada composto é apresentada no valor de porcentagem acima de cada coluna do gráfico (88,0% para AS 07 MQ B, 89,9% para AS 04 MQ e 21,8% para DM 06 M2 MQ), evidenciando o elevado potencial dos extratos AS 07 MQ B e AS 04 MQ para a descoberta de novos agentes antibacterianos.

Figura 83 B: Quantidade de biofilme da *S. epidermidis* ATCC 35984 depois de tratado com os extratos DM 03 M1, AS 06 M2 MQ e DM 02 M1 MQ A a 512 µg/mL



S. epidermidis ATCC 34984 é uma linhagem boa formadora de biofilme, enquanto que *S. epidermidis* ATCC 12228 não é boa formadora de biofilme, a comparação da formação de biofilme entre elas apresentou diferença significativa com $p < 0,00000125$. A capacidade de erradicação do biofilme formado pela *S. epidermidis* ATCC 34984 foi analisada para os extratos. Os extratos AS 06 M2 MQ e DM 02 M1 MQ A foram capazes de erradicar significativamente o biofilme formado, com valor de p igual a 0,00000615 e 0,00000000676, respectivamente. A capacidade de erradicação do biofilme para cada composto é apresentada no valor de porcentagem acima de cada coluna do gráfico (52,36% para AS 06 M2 MQ e 77,9% para DM 02 M1 MQ A).

Figura 83 C: Quantidade de biofilme da *S. epidermidis* ATCC 35984 depois de tratado com os extratos AS 05/ AS 09 MQ a 512 µg/mL



S. epidermidis ATCC 34984 é uma linhagem boa formadora de biofilme, enquanto que *S. epidermidis* ATCC 12228 não é boa formadora de biofilme, a comparação da formação de biofilme entre elas apresentou diferença significativa com $p < 0,0000009$. A capacidade de erradicação do biofilme formado pela *S. epidermidis* ATCC 34984 foi analisada para o composto AS 05/AS 09 a 512 µg/ml. Este foi capaz de erradicar significativamente o biofilme formado com valor de p igual a 0,000278. A capacidade de erradicação do biofilme para cada composto é apresentada no valor de porcentagem acima de cada coluna do gráfico (51,49% para AS 05/AS 09).

4.4.4 Avaliação da atividade tripanocida

Os resultados da triagem dos extratos brutos para atividade frente a linhagem de *Trypanosoma cruzi* são mostrados na **Tabela 13**.

Tabela 13: % de inibição crescimento do *Trypanossoma cruzi* - 20µg/mL

EXTRATOS	INIBIÇÃO (%)
AS M2 *BR	29,3
AS 01 Mar B	61,8
AS 01 MQ	58,8

AS 02 Mar	52,4
AS 03 MQ	51,1
AS 04 MQ B	54,1
AS 06 MQ	50,2
AS 07 MQ B	52,9
AS 08 MQ	54,6
AS 09 MQ	56,2
DM M2 Rosa	62,2
DM 01 Mar	56,1
DM 01 MQ	69,0
DM 02 Mar A 36d	62,6
DM 02 MQ A	54,4
DM 02 MQ B 36d	62,4
DM 03 Mar	77,1
DM 03 MQ B	53,5
DM 04 Mar	53,4
DM 04 MQ B	53,6
DM 05 Mar	53,1
DM 06 Mar A	50,2
DM 06 Mar B	54,2
DM 06 MQ B	70,4
DM 07 Mar A	32,7
DM 08 Mar A	60,7
SV 01 MQ	59,6
Benzonidazol*	99,0

Os extratos AS 01 MAR B; DM M2 ROSA; DM 01 MQ; DM 02 MAR A; DM 02 MQ B; DM 03 MAR; DM 06 MQ B; DM 08 MAR A se mostraram promissores contra *T. cruzi*, inibindo seu crescimento em mais de 60%.

4.4.5 Avaliação da atividade leishmanicida

Os resultados da triagem dos extratos brutos para atividade frente a linhagem de *Leishmania infantum* são mostrados na **Tabela 14**.

Tabela 14: % de inibição do crescimento de *Leishmania infantum* - 20ug/mL

EXTRATO	%INIBIÇÃO
AS 06 MQ	99
DM 08 MAR B	99
MTF *	99

Fonte: Elaboração própria

Os extratos AS 06 MQ e DM 08 MAR B se mostraram muito promissores contra *L. infantum*, inibindo seu crescimento em 99%, assim como o padrão MTF utilizado.

Os resultados obtidos evidenciam que fungos associados a organismos marinhos apresentam excelente potencial para desenvolvimento de novos agentes bioativos, para tratamento de diferentes tipos de câncer, doença de Alzheimer, bactérias super resistentes, doenças tropicais negligenciadas, entre outros.

4.4.6 Avaliação das atividades antibiótica frente a *E. coli*, coagulação do sangue e inibição de veneno de cobra.

Para esta etapa do trabalho, foi realizado o crescimento em escala ampliada de acordo com Fluxograma 1, seguida de extração, partição e obtenção dos extratos brutos AS 01 MQ, AS 01 MAR, AS 03 MQ, AS 04 MQ B, AS 07 MQ B, AS 09 MQ, SV 01 MQ, DM 02 MQ, DM 02 MAR, DM 03 MQ, DM 03 MAR e DM 06 MQ, que apresentaram alta atividade anticolinesterásica nos ensaios iniciais. Os resultados da triagem dos extratos brutos são mostrados na **Tabela 15**.

Tabela 15: Resultados dos ensaios com os extratos selecionados.

AMOSTRA	<i>E. coli</i> K12	Plasma	Protease (veneno de cobra)
AS 01 MQ	*		*
AS 01 Mar	++	*	
AS 03 MQ	-	-	
AS 04 MQ	++	-	

AS 07 MQ	++++	*	
AS 09 MQ	++	*	
SV 01 MQ	ND	-	
DM 02 MQ	+++	-	
DM 02 Mar		*	++
DM 03 MQ	+	-	++
DM 03 Mar		*	++

A avaliação inicial da inibição do crescimento mostrou que os extratos AS 07 MQ e DM 02 MQ variando de 25 a 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ exibiam potencial atividade inibitória contra *E. coli*-K-12, inibindo o crescimento bacteriano significativamente em comparação com a gentamicina, evidenciando o potencial desses extratos para o desenvolvimento de novos antibióticos.

Após análise dos resultados foi possível verificar que em baixas concentrações, a amostra DM 02 Mar apresentou atividade inibitória de protease contra o veneno de serpente de *E. carinatus*, então foi avaliada a seletividade desta amostra contra a enzima protease plasmina e observamos a presença de compostos fracamente ativos. A comparação com o controle positivo indicou que existem compostos ativos nesta amostra, o que mereceu uma investigação adicional.

Estudos foram realizados com estas amostras no bioensaio de veneno de serpentes para investigar a neutralização enzimática da toxicidade de veneno, por produtos naturais.

A amostra DM 03 Mar em baixa concentração (8,32–101,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) inibiu *E. venetatus*, *C. rhodosotma* e *E. ocellatus*; A amostra DM 02 Mar em concentração baixa (~8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) inibiu o veneno de cobra de *E. carinatus*. Estes resultados fazem parte do projeto Abordagens de nanofracionamento para avaliação da atividade enzimática de componentes do veneno de serpentes e a aplicação de produtos naturais para a neutralização da toxicidade enzimática do veneno, desenvolvido pela estudante de graduação Coleen Neumann, sob co-orientação da profa. Dra. Carmem Lúcia Cardoso.

Com base nos resultados químicos e biológicos demonstrados anteriormente, foram selecionados para dar continuidade aos estudos os fungos *Annulohyphoxylon stygium* e *Hyphoxylon monticulosum*, que foram cultivados em escala ampliada como descrito a seguir.

CAPÍTULO 3. Estudo Químico e Biológico de *Hypoxylon monticulosum*

Para início do cultivo em escala ampliada foram selecionadas as algas *A. spicifera* e *D. marginata* por crescerem em ambientes muito próximos, motivo que nos levou a investigar a ocorrência de fungos de mesmo gênero e espécie associados as duas algas em questão. Os fungos codificados como AS 05 MQ, AS 09 MQ e DM 02 MQ A, foram identificados como *Hypoxylum monticulosum*, confirmando a suposição acima.

4.5 Perfil Químico

4.5.1 Variação da massa dos extratos brutos

Além da mudança morfológica dos micélios, conforme demonstrado na pág. 116 e 112, outra diferença observada foi na quantidade de extrato bruto produzido, conforme **Tabela 16**.

Tabela 16: Variação na produção de extrato bruto do fungo *H. monticulosum*.

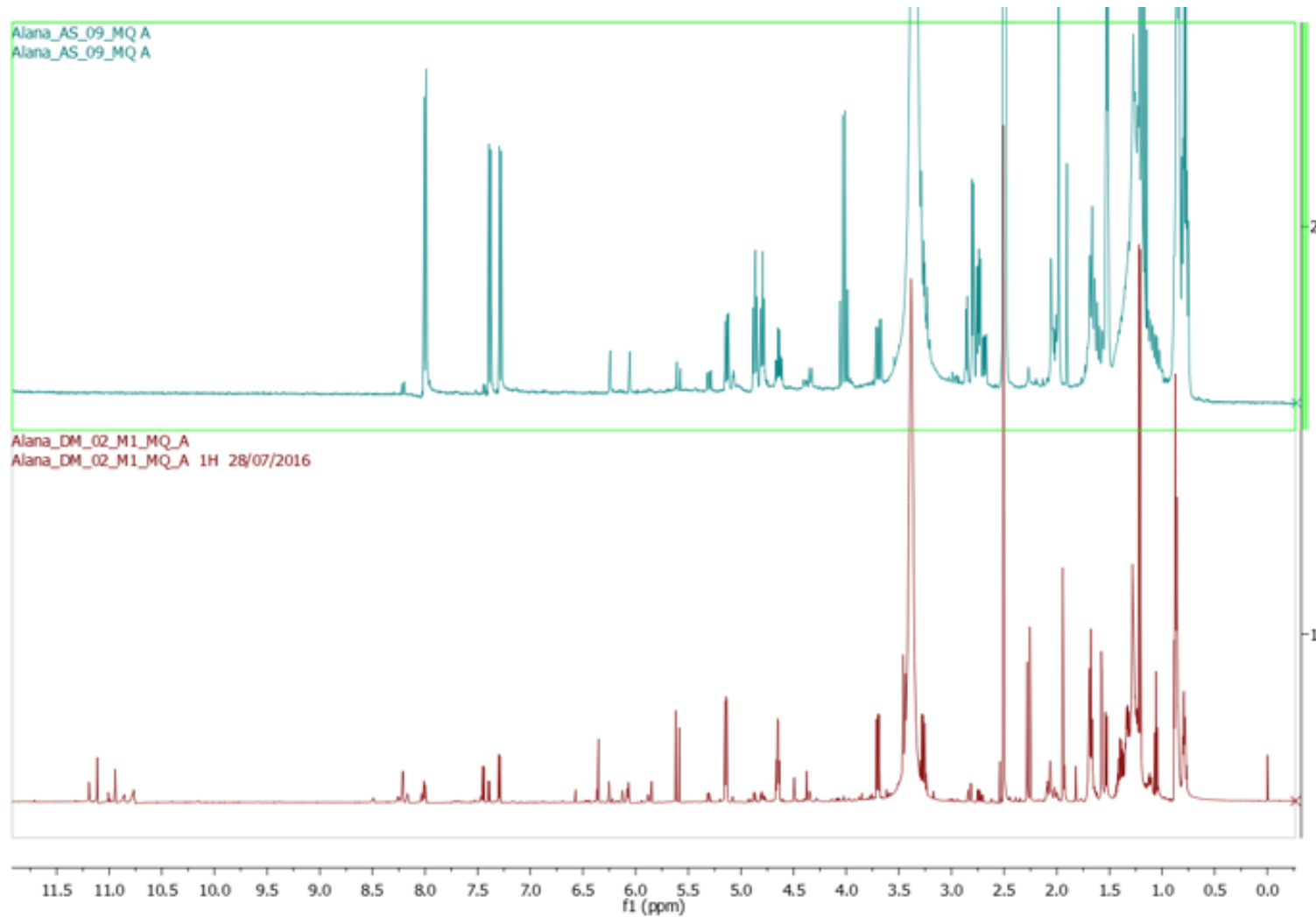
Extrato	Massa (mg)
DM 02 MQ	294
AS 09 MQ	695

Foi possível observar que a linhagem associada a *A. spicifera* produz o dobro de extrato da linhagem associada à *D. marginata*. Este fato pode estar associado aos diferentes nutrientes fornecidos pelo hospedeiro, que podem ativar diferentes vias metabólicas, originando um maior número de metabólitos ou compostos em maior quantidade. A quantidade de micro-organismos também varia em cada hospedeiro. Essa competição pode fazer com que estes micro-organismos produzam maior quantidade de metabólitos para sobreviver nesse meio.

4.5.2 RMN de ^1H dos extratos de *H. monticulosum*

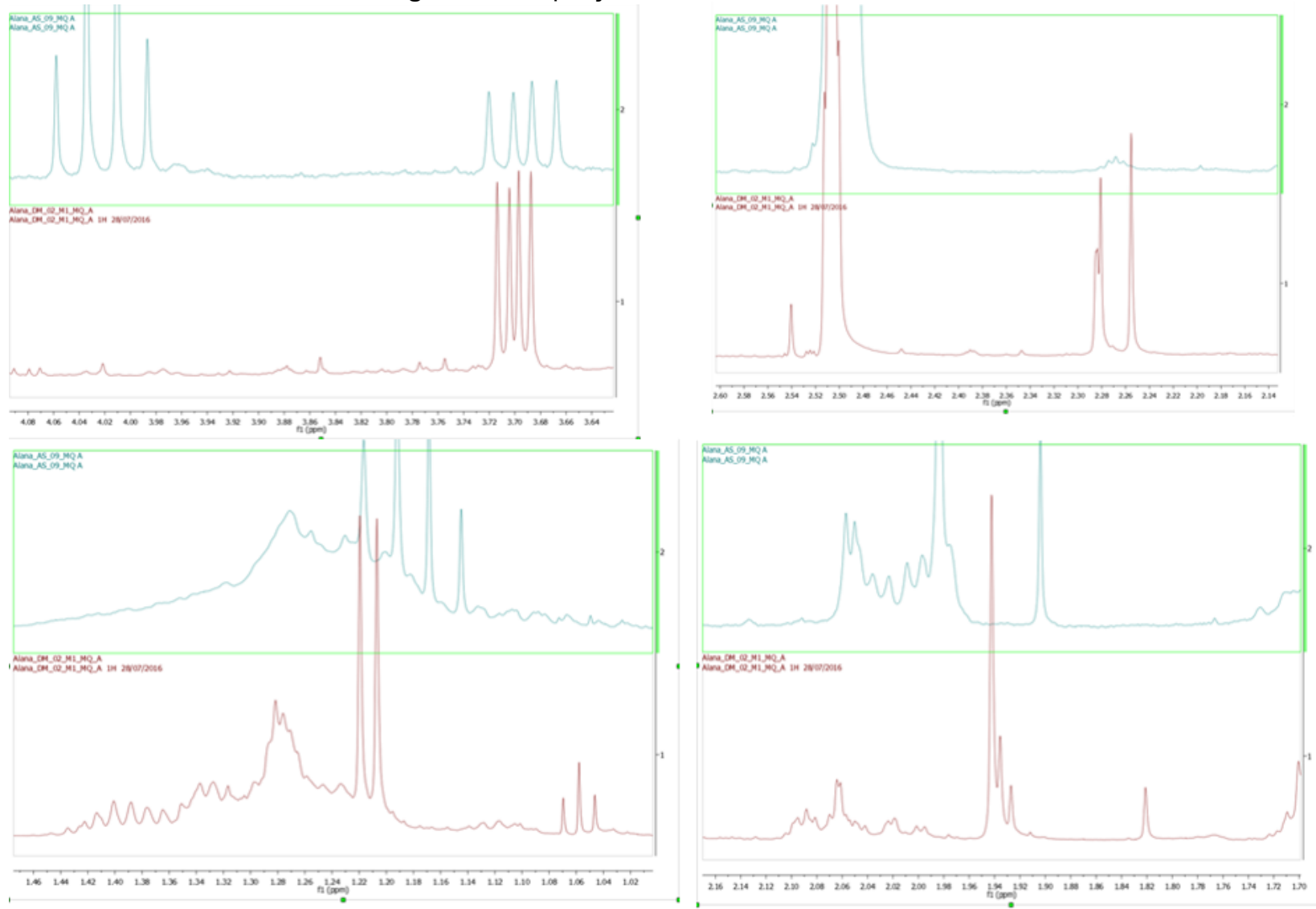
Ao compararmos os perfis químico dos extratos por RMN de ^1H (**Figura 85**) observamos que o extrato proveniente de *A. spicifera* apresentou sinais entre 0,5 e 8,0 ppm, referentes a hidrogênios metílicos, metilênicos, metínicos, carbinólicos, aromáticos e fenólicos, enquanto o extrato proveniente de *D. marginata* apresentou, além dos sinais citados, sinais de aldeídos e ácidos carboxílicos. Ao expandirmos algumas regiões (**Figura 86**) fica nítido a diferença na composição química dos extratos. Alguns sinais são semelhantes nos dois espectros, evidenciando que estas tem papel importante para ambas as algas ou que fazem parte dos metabólitos necessário para sobrevivência do endófito.

Figura 85: Comparação dos espectros de RMN de ^1H do extrato de *H. monticulosum* isolado de *A. spicifera* e *D. marginata* (DMSO- d_6 , 300MHz).



Fonte: Elaboração própria

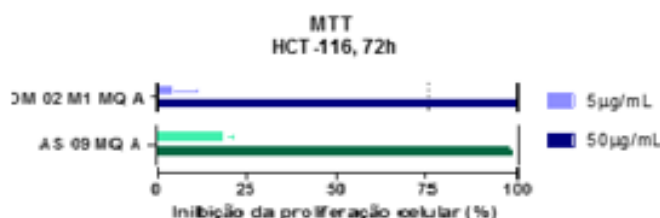
Figura 86: Ampliações dos sinais de RMN de ^1H .



4.6 Perfil Biológico

Ambos os extratos foram enviados para verificarmos suas bioatividade frente a ensaios citotóxicos (**Figura 87**) e anticolinesterásico (**Tabela 17**).

Figura 87: Comparação dos resultados para atividade Antitumoral entre os extratos de *H. monticulosum*.



De acordo com esses resultados é possível verificar que ambas as amostras demonstraram inibição relevante da proliferação celular tumoral (>75%) na linhagem celular testada, e foram consideradas, portanto, citotóxicas.

Tabela 17: Comparação dos resultados para atividade Anticolinesterásica entre os extratos de *H. monticulosum*.

Amostra	% inibição ICER-AChE ee	% inibição ICER-AChE hu
Tacrina *	95,3	83,7
AS 09 MQ	95,7	97,8
DM 02 MQ	96,8	95,7

Fonte: Elaboração própria

Podemos observar que as amostras foram muito promissoras nesse ensaio biológico, evidenciando o potencial dos extratos em estudo para a descoberta de agentes inibidores de acetilcolinesterase. Vale ressaltar que os dois extratos (grifados) se mostraram mais ativos que o padrão tacrina utilizado.

Aparentemente, cada extrato apresenta dois compostos majoritários, sendo que um deles está presente nos dois extratos. Este fatos, associado aos resultados dos ensaios biológicos pode sugerir que este metabólito seja um dos principais responsáveis pela excelente bioatividade dos extratos.

Para analisar essa suposição, as duas linhagens de *H. monticulosum*, foram cultivadas em escala ampliada, para realizarmos o isolamento dos compostos majoritários e verificar seus potenciais biológicos, conforme descrito a seguir.

4.7 Cultivo em escala ampliada de *H. monticulosum* codificado AS 09 MQ (para o isolado de *A. spicifera*) e DM 02 MQ (para o isolado de *D. marginata*).

O crescimento em escala ampliada e, posteriores trabalhos com essas linhagens, foram realizados com auxílio da aluna de iniciação científica Beatriz Rodrigues Barcellos.

4.7.1 Crescimento em escala ampliada

AS 09 MQ e DM 02 MQ A foram cultivados em meio líquido de Extrato de Malte, de acordo com a metodologia descrita no **Fluxograma 1**.

Foram cultivados 9 erlenmeyers para AS 09 MQ e 21 para DM 02 MQ, fornecendo 1,7 g e 1,5 g de extrato bruto, respectivamente.

4.7.2 Fracionamento do extrato AS 09 MQ

O extrato brutos AS 09 MQ foi analisado por RMN de ^1H e CLAE-DAD. Posteriormente, foi fracionado em CC utilizando sílica de fase reversa (C-18) como fase estacionária e uma mistura de H_2O : MeOH como eluente, em gradiente de polaridade de acordo com o **Fluxograma 2**, respectivamente.

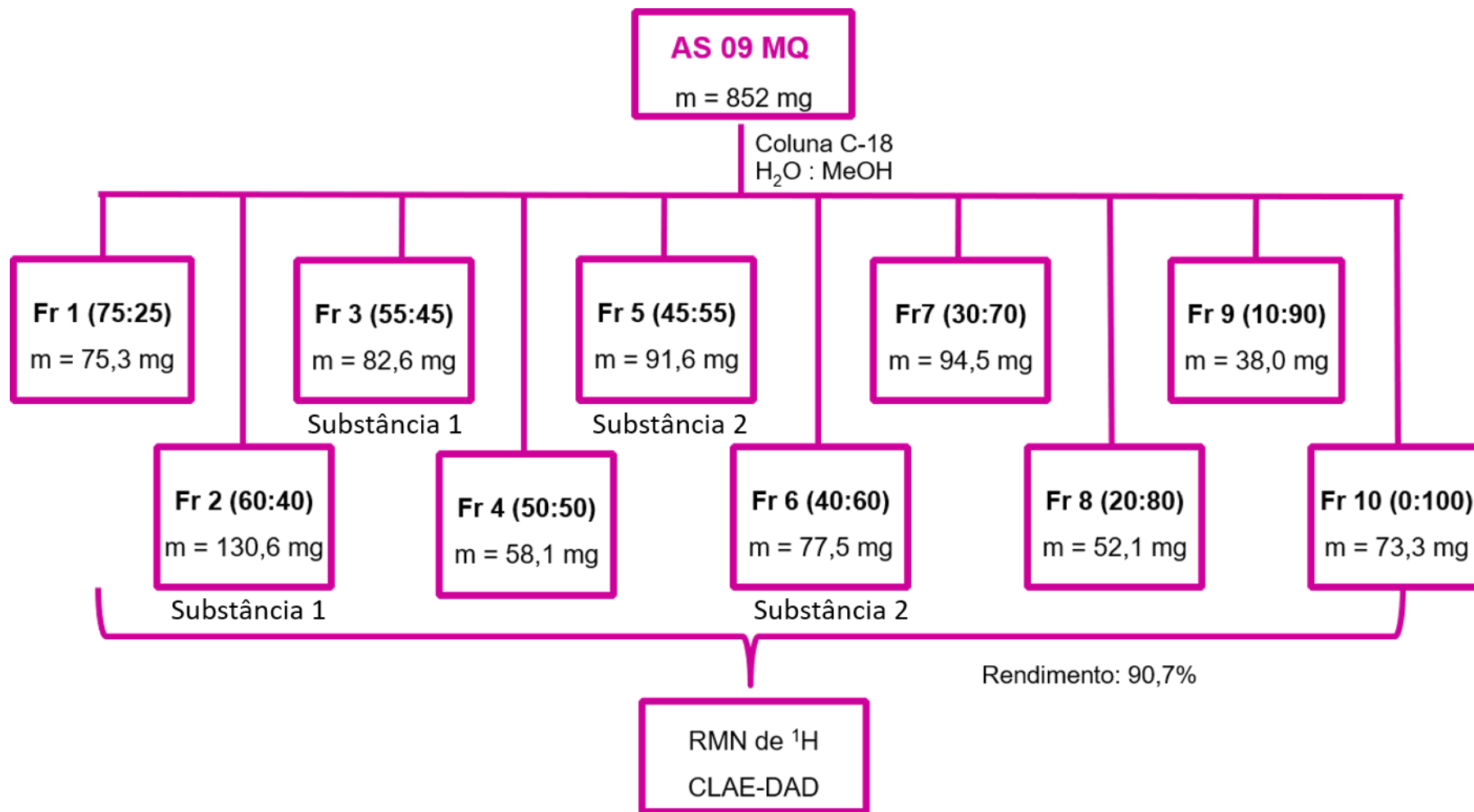
As dez frações obtidas de AS 09 MQ foram codificadas como AS 09 Fr 1 a AS 09 Fr 10, e analisadas por RMN de ^1H e CLAE-DAD para avaliação do perfil químico, utilizando coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadecil silano (C-18) e eluição em gradiente H_2O : MeOH (95:05→0:100).

4.7.3 Fracionamento dos extratos de DM 02 MQ

O extrato bruto DM 02 MQ foi analisado por RMN de ^1H e CLAE-DAD. Posteriormente, foi fracionado em CC utilizando sílica de fase reversa (C-18) como fase estacionária e uma mistura de H_2O : MeOH como eluente, em gradiente de polaridade de acordo com o **Fluxograma 3**, respectivamente.

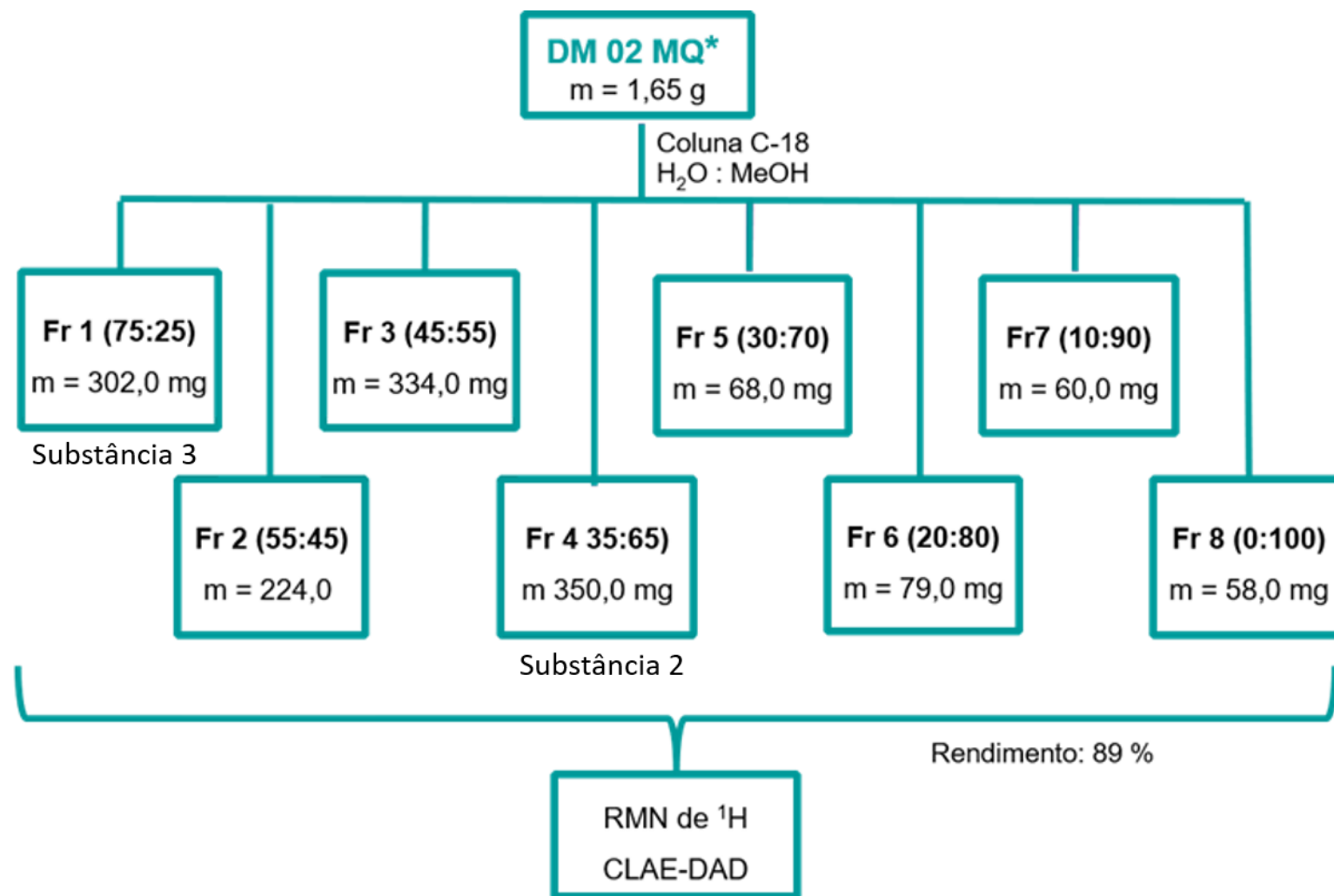
As oito frações obtidas de DM 02 MQ foram codificadas como DM 02 Fr 1 a DM 02 Fr 8, e analisadas por RMN de ^1H e CLAE-DAD para avaliação do perfil químico, utilizando coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadecil silano (C-18) e eluição em gradiente $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (95:05→0:100).

Fluxograma 2: Fracionamento do extrato AS 09 MQ por CC (fase reversa C-18) e obtenção das substâncias 1 e 2.



Fonte: Elaboração própria

Fluxograma 3: Fracionamento do extrato DM 02 MQ por CC (fase reversa C-18) e obtenção das substâncias 2 e 3.



Fonte: Elaboração própria

4.8 Determinação Estrutural das Substâncias majoritárias

4.8.1 Determinação Estrutural da Substância 2

A substância **2** apresenta-se como um dos metabólitos majoritários em ambos os extratos analisados. O espectro de RMN de ^1H (**Figura 88**) da substância **2** apresentou sinais referentes a duas metilas δ_{H} 0,92 (t, H-13) e δ_{H} 1,20 (d, H-7 α carbonílico) ambas ligadas a carbono sp^3 , cinco metilênicos δ_{H} 1,68 (q, H-8), δ_{H} 1,38 (m, H-9), δ_{H} 1,32 (H-10), δ_{H} 1,25 (m, H-11) e δ_{H} 1,28 (H-12), quatro hidrogênios metínicos, sendo dois α carbonílico δ_{H} 3,27 (m, H-2) e δ_{H} 3,70 (dd, H-3 α carbonílico) e dois oximetínicos δ_{H} 5,14 (dd, H-4) e δ_{H} 4,64 (m, H-6).

O espectro de RMN de ^{13}C com auxílio de experimento DEPT (**Figura 89**) evidenciou cinco carbonos metilênicos δ_{C} 28,32 (H-8), δ_{C} 24,92 (H-9), δ_{C} 28,45 (H-10), δ_{C} 31,10 (H-11) e δ_{C} 22,05 (H-12), quatro metílicos δ_{C} 35,89 (H-2), δ_{C} 44,61 (H-3), δ_{C} 78,64 (H-4) e δ_{C} 80,63 (H-6), duas carbonilas δ_{C} 177,12 (C-1) e δ_{C} 173,35 (C-5).

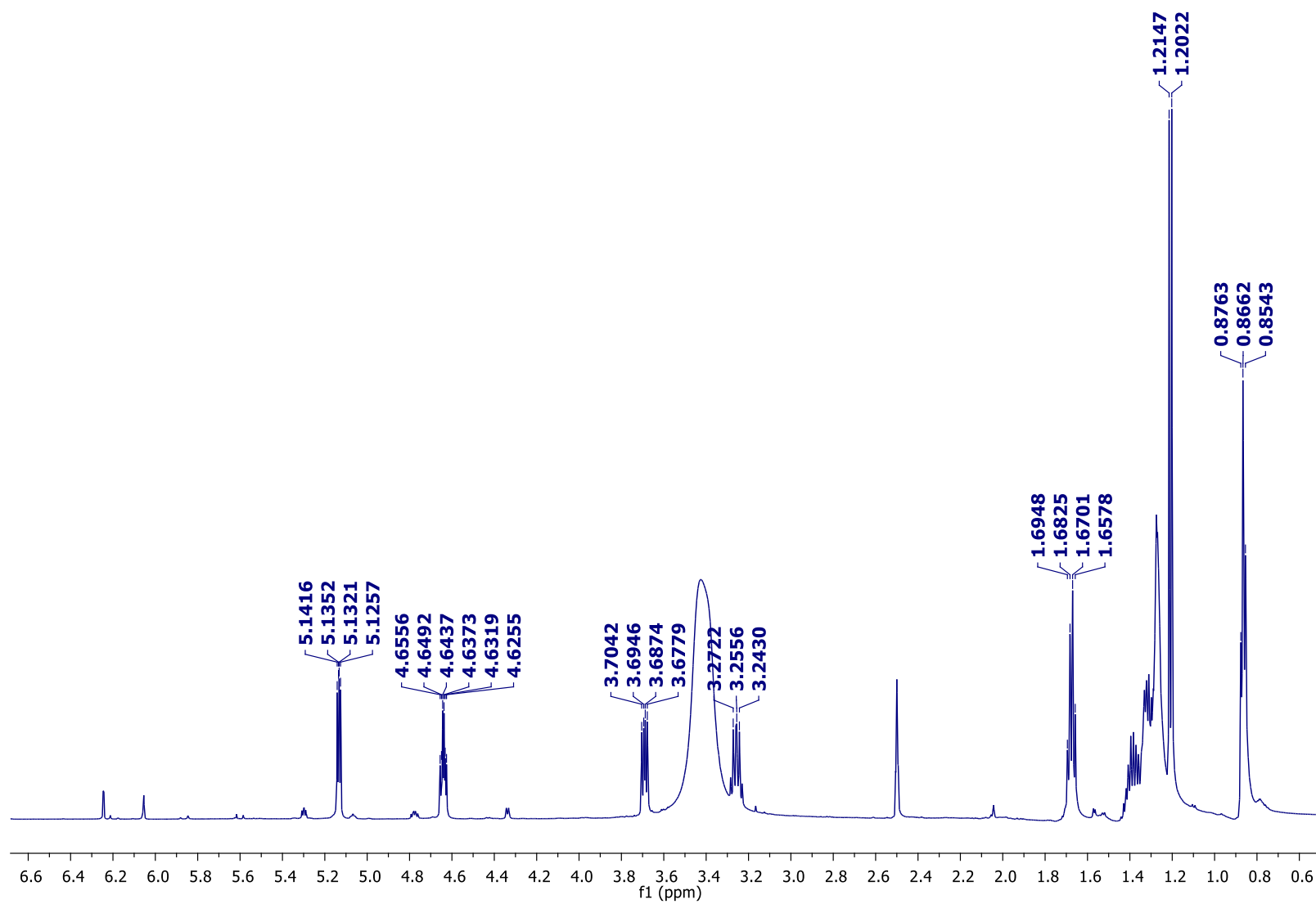
Com auxílio do experimento de HSQC (**Figura 90**) foi possível atribuir todos os átomos de hidrogênios aos respectivos carbonos.

Na análise dos mapas de correlação no experimento de HMBC (**Figura 91**), foi observado as correlações do hidrogênio H-2 com os carbonos C-1, C-3, C-5 e C-7, hidrogênio H-3 com os carbonos C-1, C-2 e C-5, hidrogênio H-4 com os carbonos C-5 e C-6, hidrogênio H-6 com o carbono C-4, C-8 e C-9, hidrogênio H-7 com o carbono C-1, C-2 e C-3, hidrogênio H-8 com os carbonos C-6, C-9 e C-10, hidrogênio H-9 com os carbonos C-8 e C-11, hidrogênio H-10 com o carbono C-9, hidrogênio H-11 com os carbonos C-10 e hidrogênio H-12 com os carbonos C-11 e C-13.

O experimento TOCSY 1D (**Figura 92**) evidenciou a presença de um sistema de spin composto por H-2, H-3, H-4, H-6, H-9 e H-13.

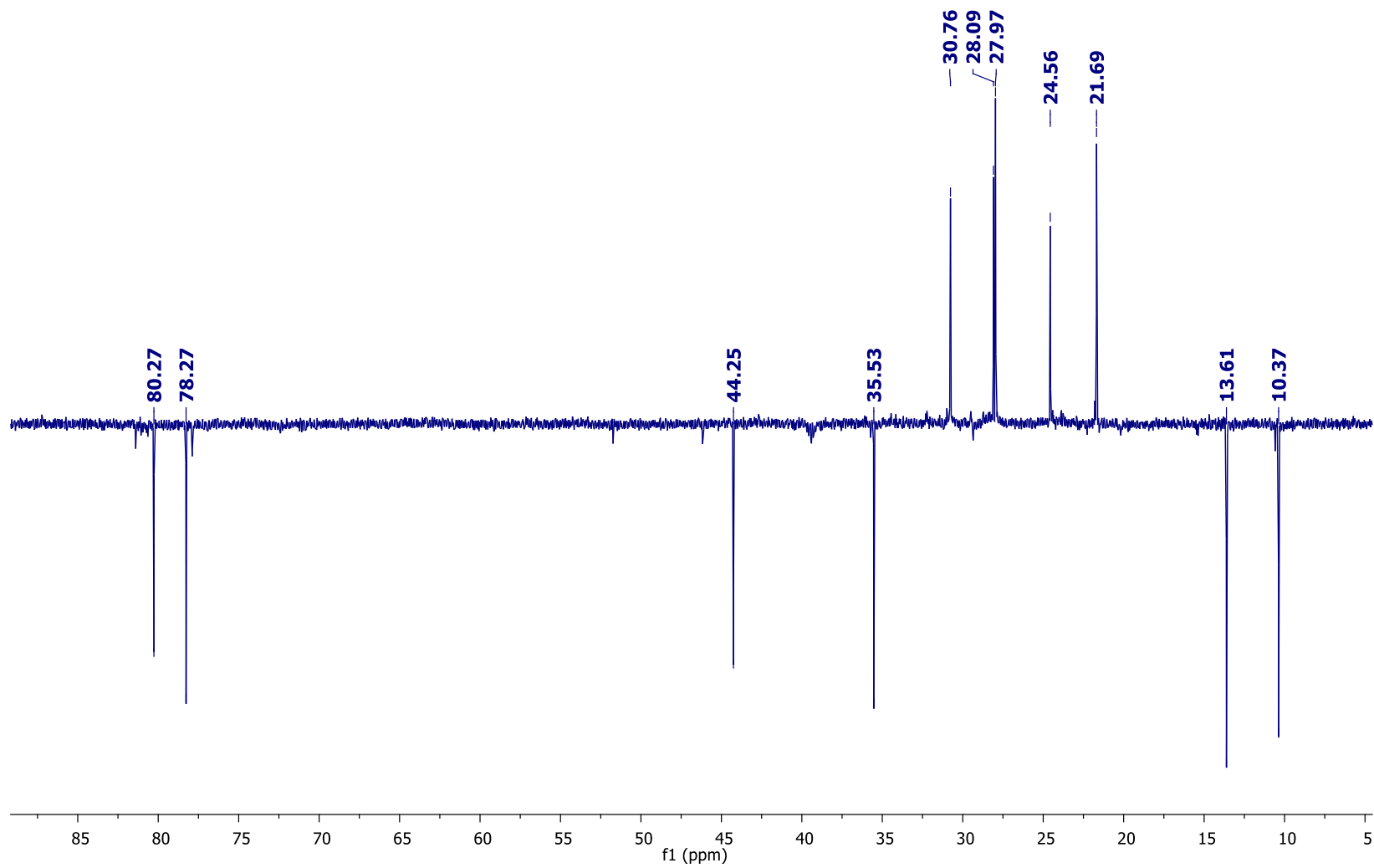
Os dados acima foram compilados numa tabela (**Tabela 18**) e, após análise destes, foi possível propor a estrutura química do composto **2** (**Figura 93**) bem como suas principais correlações por HMBC.

Figura 88: Espectro de RMN de ^1H da Substância **2** (DMSO- d_6 , 600 MHz).



Fonte: Elaboração própria

Figura 89: Espectro de DEPT da Substância **2** (DMSO- d_6 , 150 MHz).



Fonte: Elaboração própria

Figura 90: Espectro de HSQC da Substância **2** (DMSO- d₆, 150 MHz)

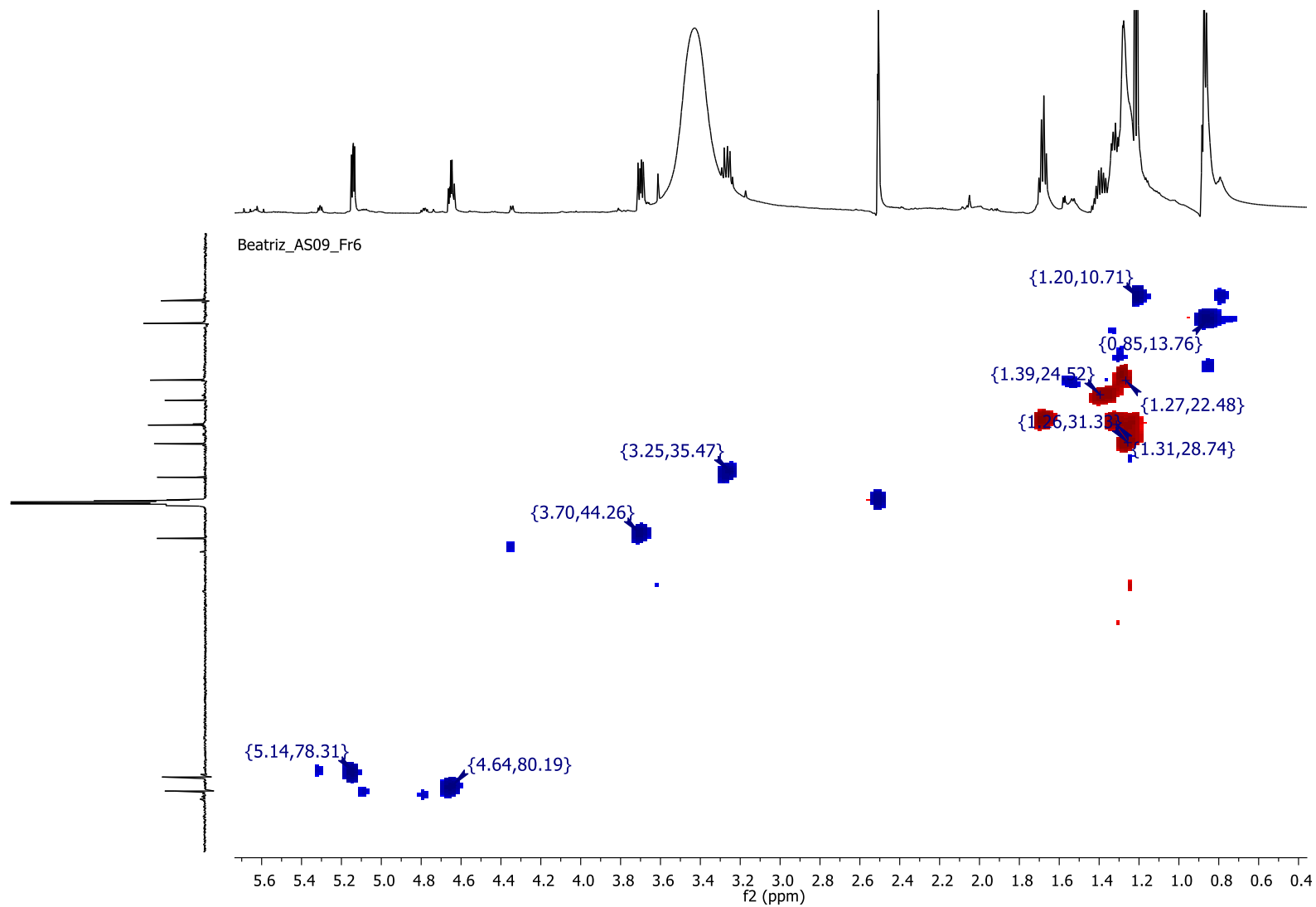
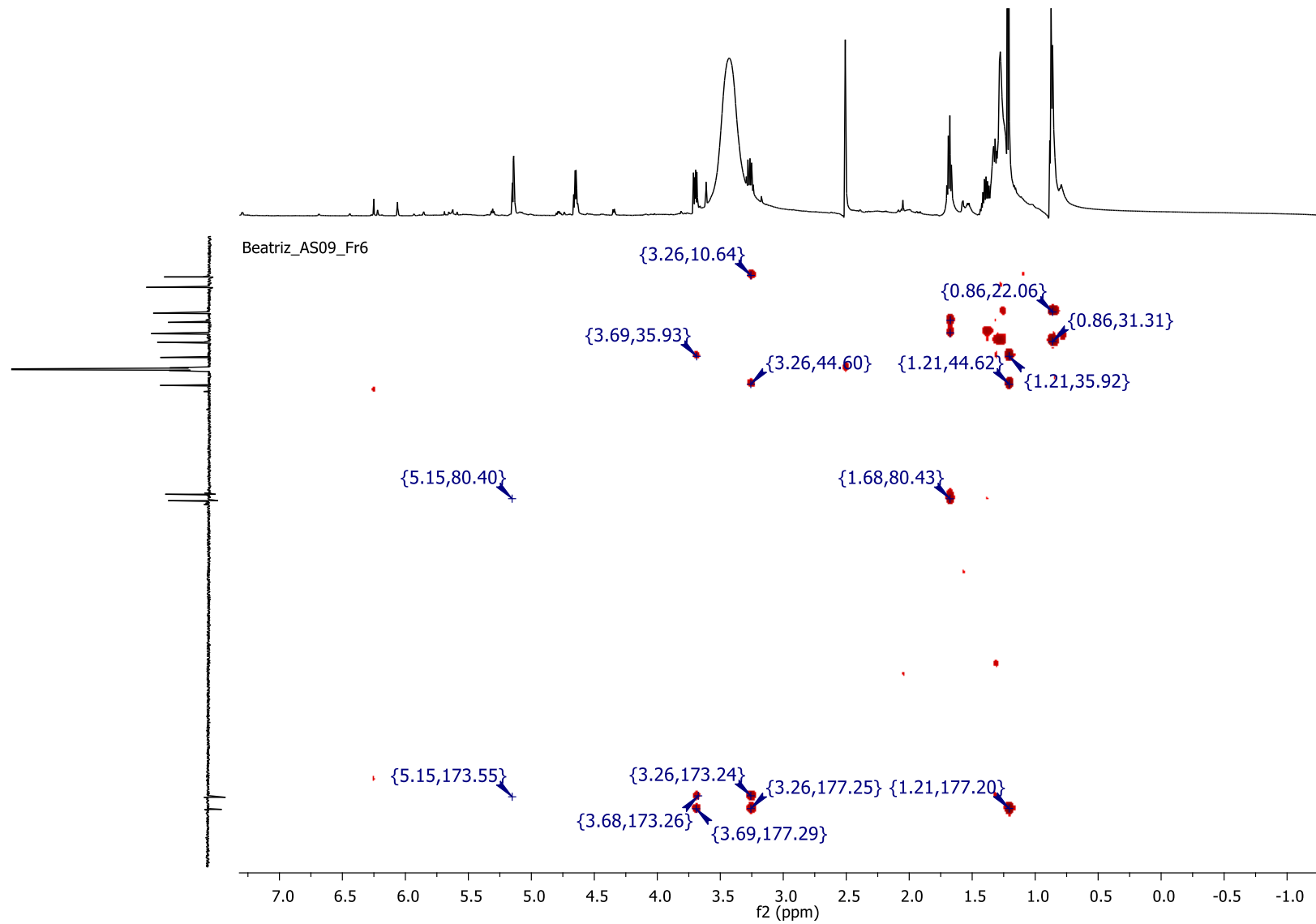


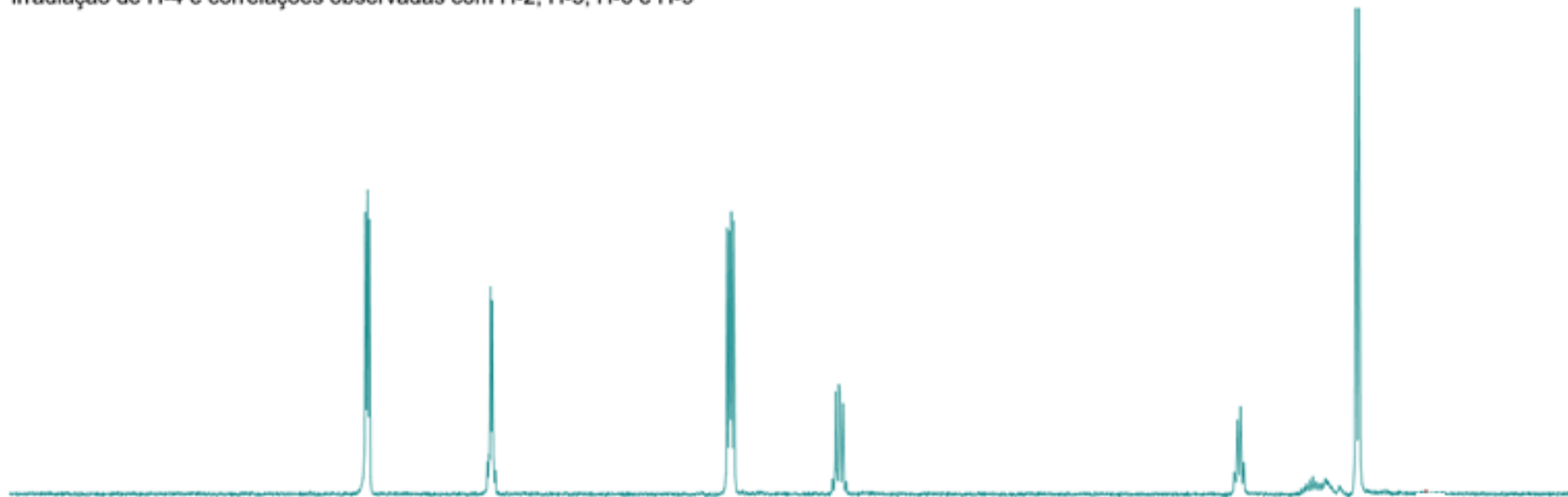
Figura 91: Espectro de HMBC da Substância **2** (DMSO- d₆, 150 MHz).



Fonte: Elaboração própria

Figura 92: Espectro de TOCSY 1D da Substância **2** (DMSO- d₆).

Irradiação de H-4 e correlações observadas com H-2, H-3, H-6 e H-9



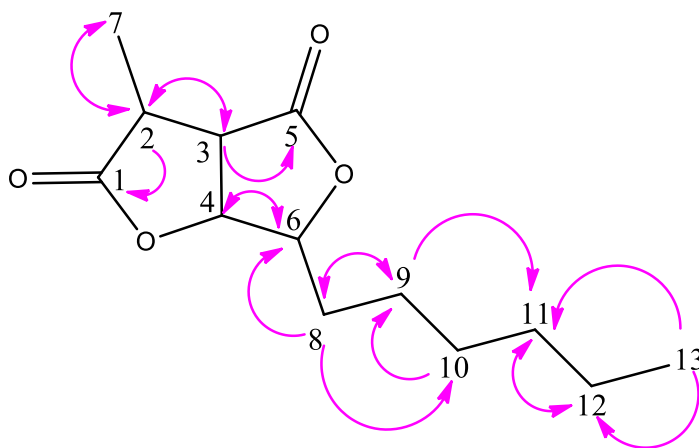
Fonte: Elaboração própria

Tabela 18: Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) da substância **2** em DMSO- d_6 .

Posição	^1H (δ)	^{13}C (δ)	gHMBC
1	-	177,12	-
2	3,27 (m)	35,89	C-1; C-3, C-5 e C-7
3	3,70 (dd)	44,61	C-1; C-2 e C-5
4	5,14 (dd)	78,64	C-5; C-6
5	-	173,35	-
6	4,64 (m)	80,63	C-4, C-8 e C-9
7	1,20 (d)	10,74	C-1, C-2 e C-3
8	1,68 (q)	28,32	C-6; C-9; C-10
9	1,38 (m)	24,92	C-8; C-11
10	1,32 (m)	28,45	C-9
11	1,25 (m)	29,8	C-10
12	1,28 (m)	22,05	C-11 e C-13
13	0,92 (t)	13,99	C-11 e C-12

Fonte: Elaboração própria

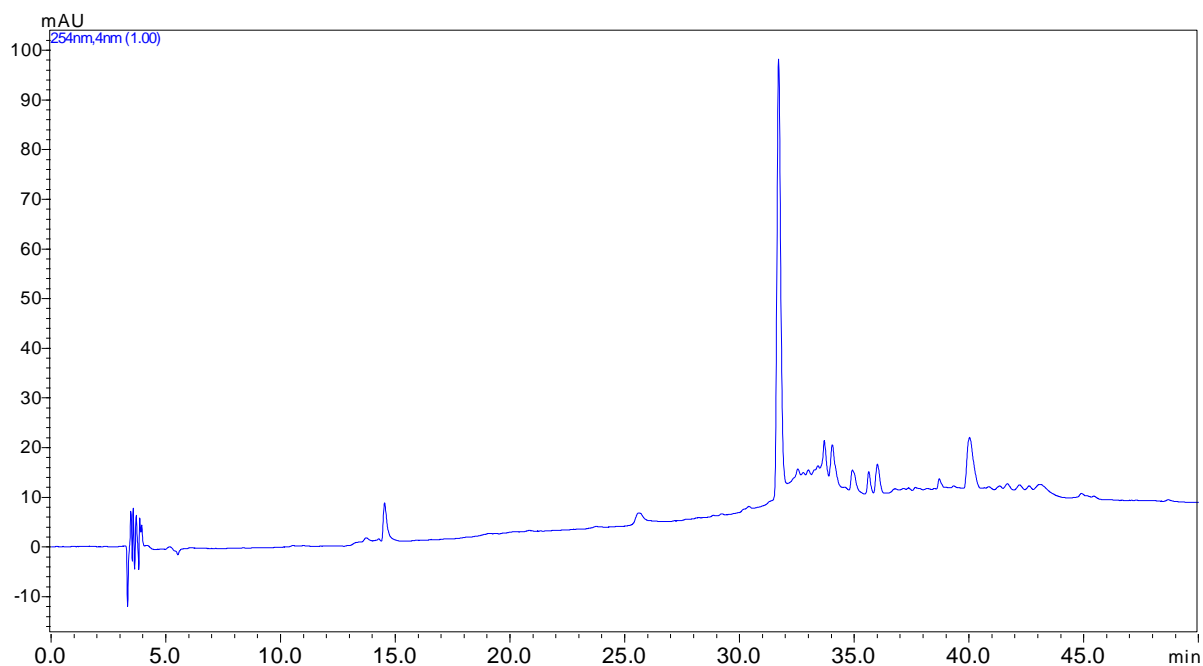
Figura 93: Substância **2** e as principais correlações em HMBC.



Fonte: Elaboração própria

O cromatograma em modo gradiente da substância **2** (**Figura 94**) evidencia que esta apresenta um tempo de retenção de 31,71 minutos característico de composto de média polaridade.

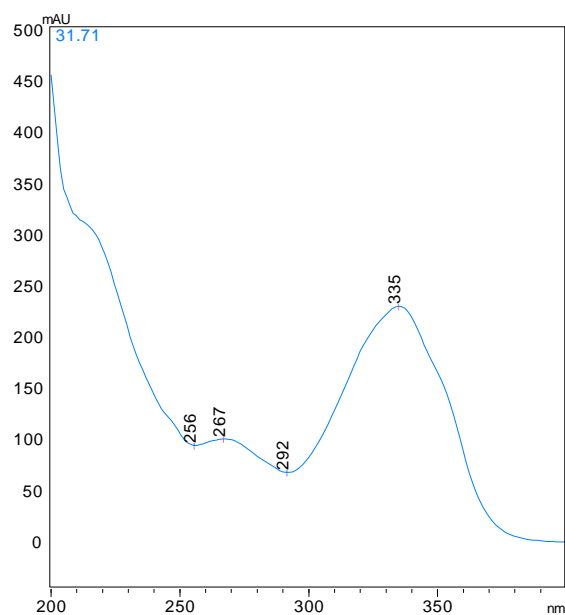
Figura 94: Cromatograma substância **2** em gradiente exploratório, modo analítico (254nm).



Fonte: Elaboração própria

No espectro de UV em MeOH grau HPLC da substância **2** (Figura 95) observamos máximos de absorção em 256, 267 e 335 nm.

Figura 95: Espectro de UV da substância **2**.



Fonte: Elaboração própria

No espectro de massas de baixa resolução da substância **2** (Figura 96) no modo positivo foi observado o sinal de m/z 241,09 e no modo negativo um sinal de m/z 239, 19

referente à formação de $[M+H]^+$ e $[M-H]^+$, respectivamente. Esse experimento ajudou a confirmar a estrutura da molécula, que apresenta fórmula molecular $C_{13}H_{20}O_4$ e massa molecular 240 g/mol.

Levantamento bibliográfico realizado na base de dados Web of Science e Scinfinder indicou que trata-se da substância Dihidroesporotriolídeo. Essa classe de compostos pertence à família das furofurandionas e são comumente relatadas para o gênero *Hypoxylon*. O esporotriolídeo foi publicado pela primeira vez como produtos naturais em 1994 e exibe atividade antifúngica.

Nem todos os metabólitos das culturas de Xylariaceae podem ser usados como marcadores quimiotaxonômicos, pois a ocorrência de certos compostos pode ser fortemente dependente das condições de cultura, e alguns metabólitos podem até ser específicos para cepas. Portanto, não podemos excluir que as cepas de outras espécies além de *H. monticulosum* estudadas anteriormente não contenham traços de esporotriolídeo. No entanto, o esporotriolídeo e alguns derivados foram produzidos sob várias condições em *H. monticulosium*, mesmo quando cultivado em meios e condições completamente diferentes. Portanto, pode ser considerado um composto marcador quimiotaxonômico específico da espécie (SURUP.; et al. 2014).

Figura 96 A: Espectro de Massas de baixa resolução da substância 2, em modo negativo.

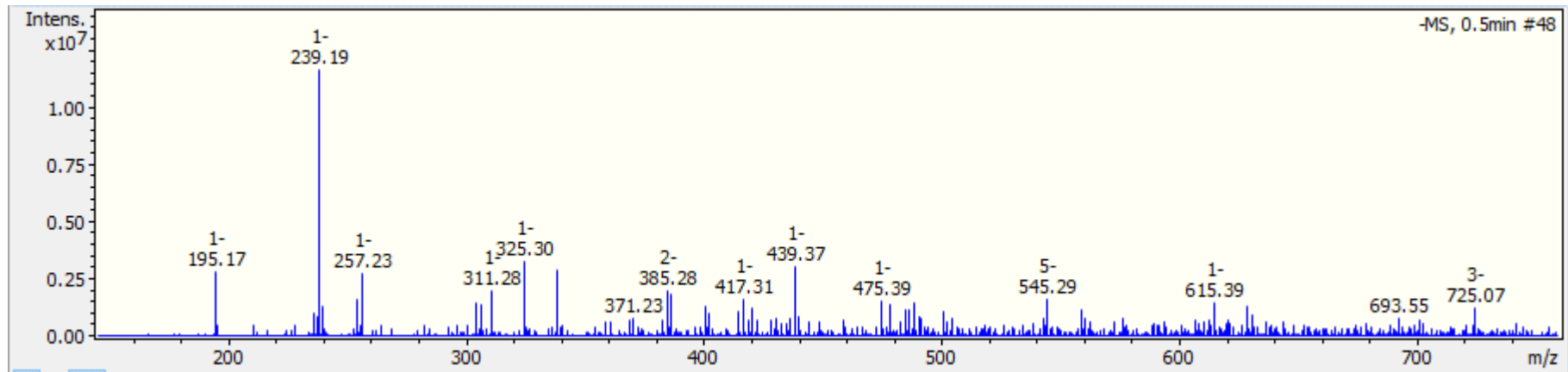
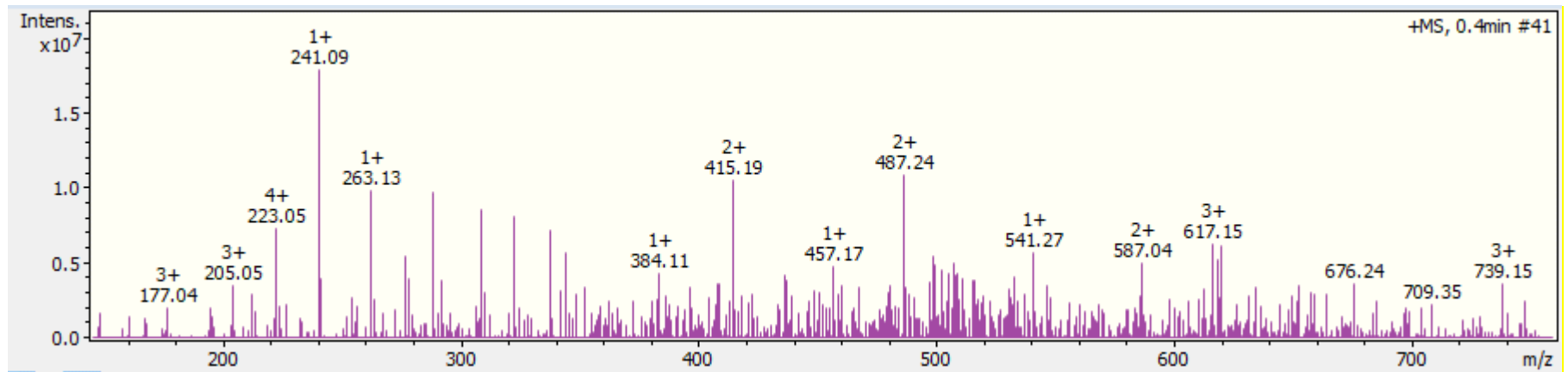


Figura 96B: Espectro de Massas de baixa resolução da substância 2, em modo positivo.



Fonte: Elaboração própria

4.8.2 Determinação Estrutural da Substância **3**

A substância **3** apresenta-se como um dos metabólitos majoritários apenas no extrato DM 02 MQ. O espectro de RMN de ^1H (**Figura 97**) da substância **3** apresentou sinais referentes a dois metil cetona δ_{H} 1,94 (s, H-11) e δ_{H} 2,31 (s, H-8), um hidrogênio hidrimetínico α carbonílico δ_{H} 4,48 (s, H-9) e três hidrogênios metínicos sendo um α dicarbonílico δ_{H} 3,45 (s, H-6) de carbono sp^3 e dois olefínicos δ_{H} 5,87 (s, H-2) e δ_{H} 6,35 (s, H-5) de carbono sp^2 .

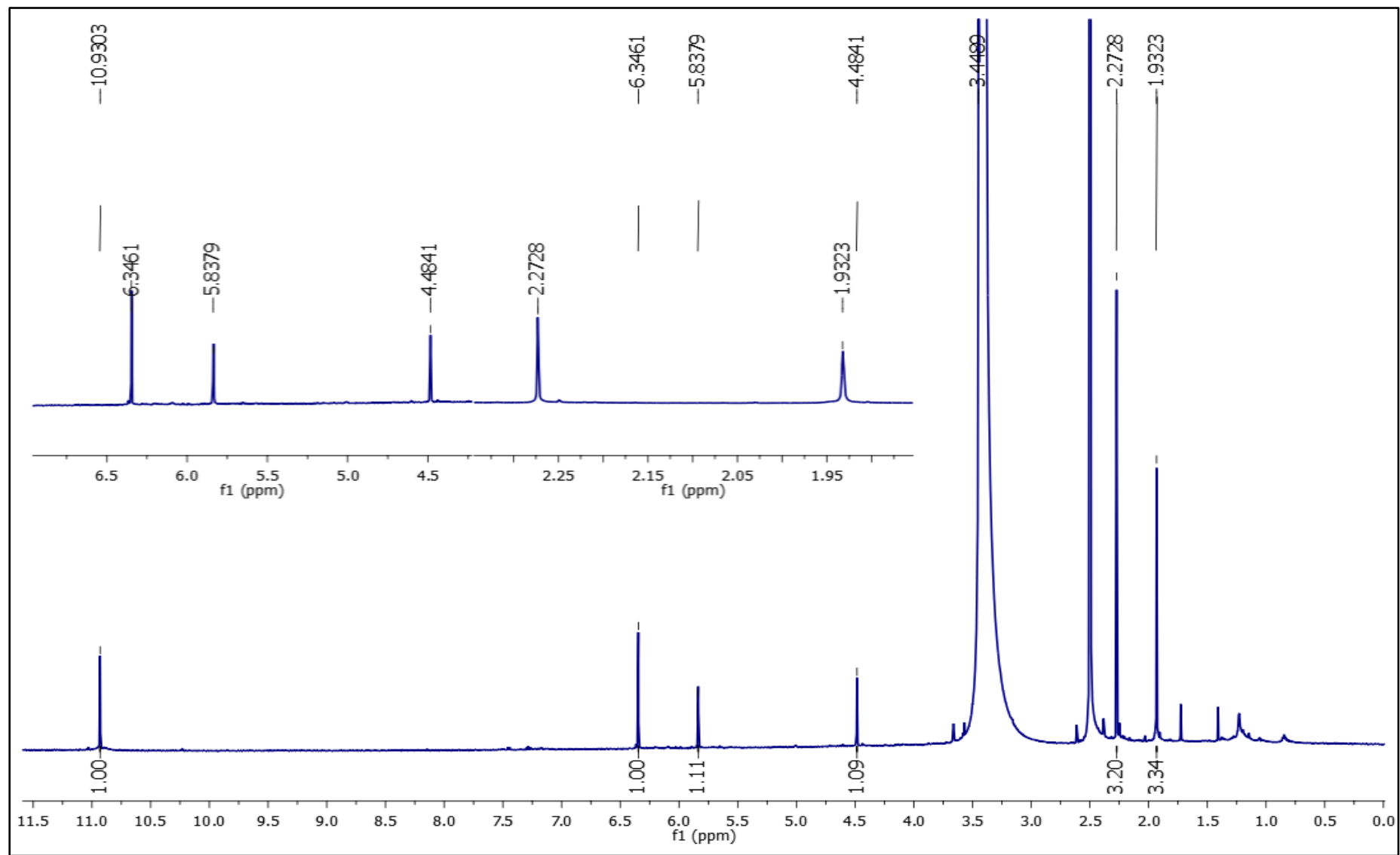
Adicionalmente, foi observado um singleto em 10,93 sem correlação no experimento de HSQC sendo, portanto, atribuído ao hidrogênio ligado ao oxigênio na hidroxila pertencente ao grupo ácido.

O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 98**) com auxílio de experimento de HSQC e HMBC evidenciou dois carbonos metílicos δ_{C} 11,2 (C-8) e δ_{C} 29,9 (C-11), três metínicos δ_{C} 101,8 (C-2), δ_{C} 101,1 (C-5), δ_{C} 56,7 (C-6), um carbinólico δ_{C} 53,1 (C-9), três carbonilas δ_{C} 162,7 (C-1), δ_{C} 164,3 (C-7), δ_{C} 203,8 (C-10), uma carboxila δ_{C} 168,4 (C-12) e dois quaternários δ_{C} 116,3 (C-3) e δ_{C} 135,7 (C-4).

Com auxílio do experimento de HSQC (**Figura 99**) foi possível atribuir todos os átomos de hidrogênios aos respectivos carbonos.

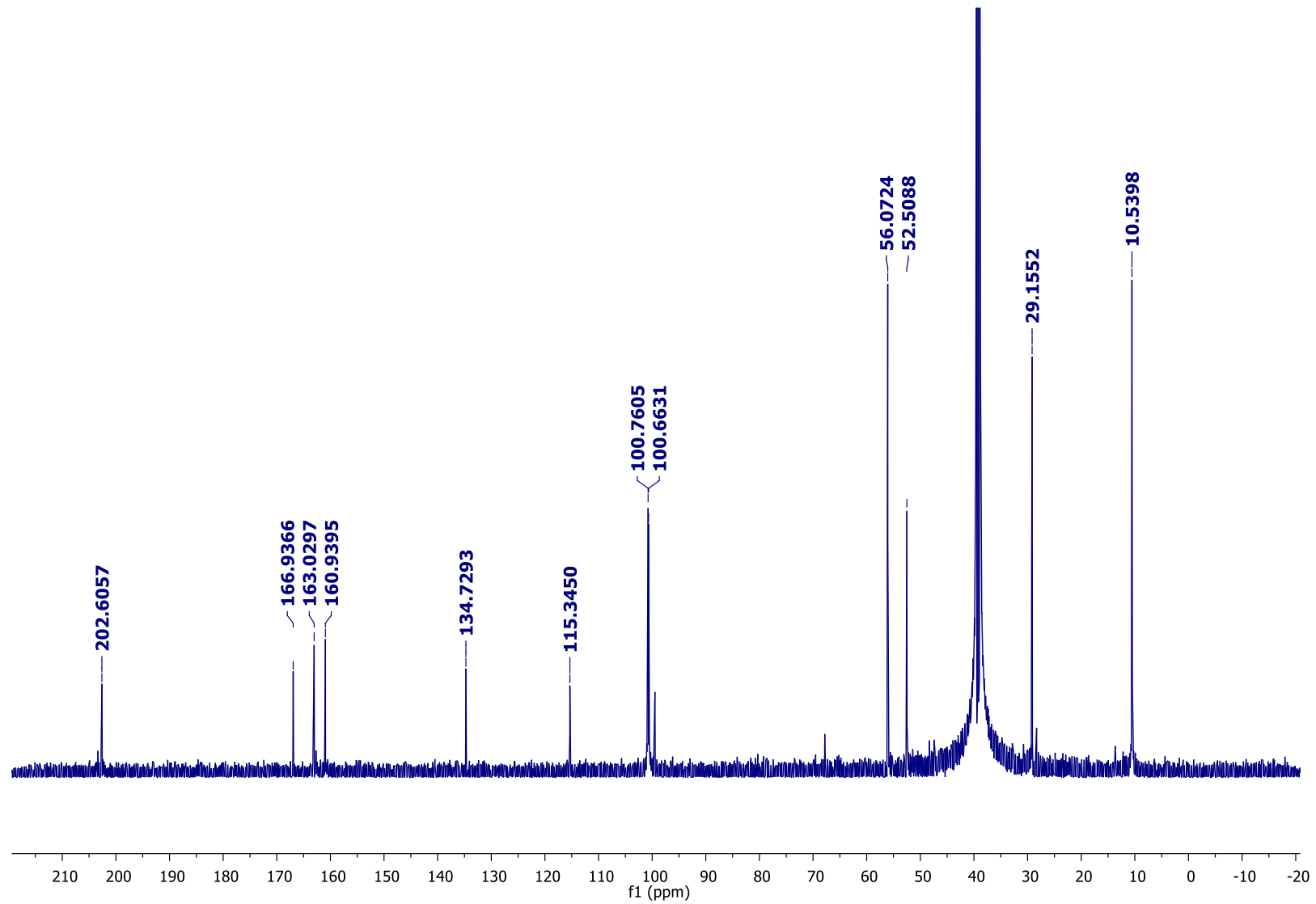
Na análise dos mapas de correlação no experimento de HMBC (**Figura 100**), foi observado a correlações dos hidrogênios H-2 com os carbonos C-5, C-3 e C-7, hidrogênio H-6 com o carbono C-2, H-8 com os carbonos C-3, C-4 e C-7, H-9 com os carbonos C-5, C-3, C-4 e C-10, H-11 com os carbonos C-3, C-4 e C-7 e também foi possível verificar a correlação da hidroxila do grupo ácido com os carbonos C-2 (**Tabela 19**), ajudando a chegar na estrutura parcial **A** (**Figura 101**).

Figura 97: Espectro de RMN de ^1H da Substância **3** (DMSO- d_6 , 600 MHz)



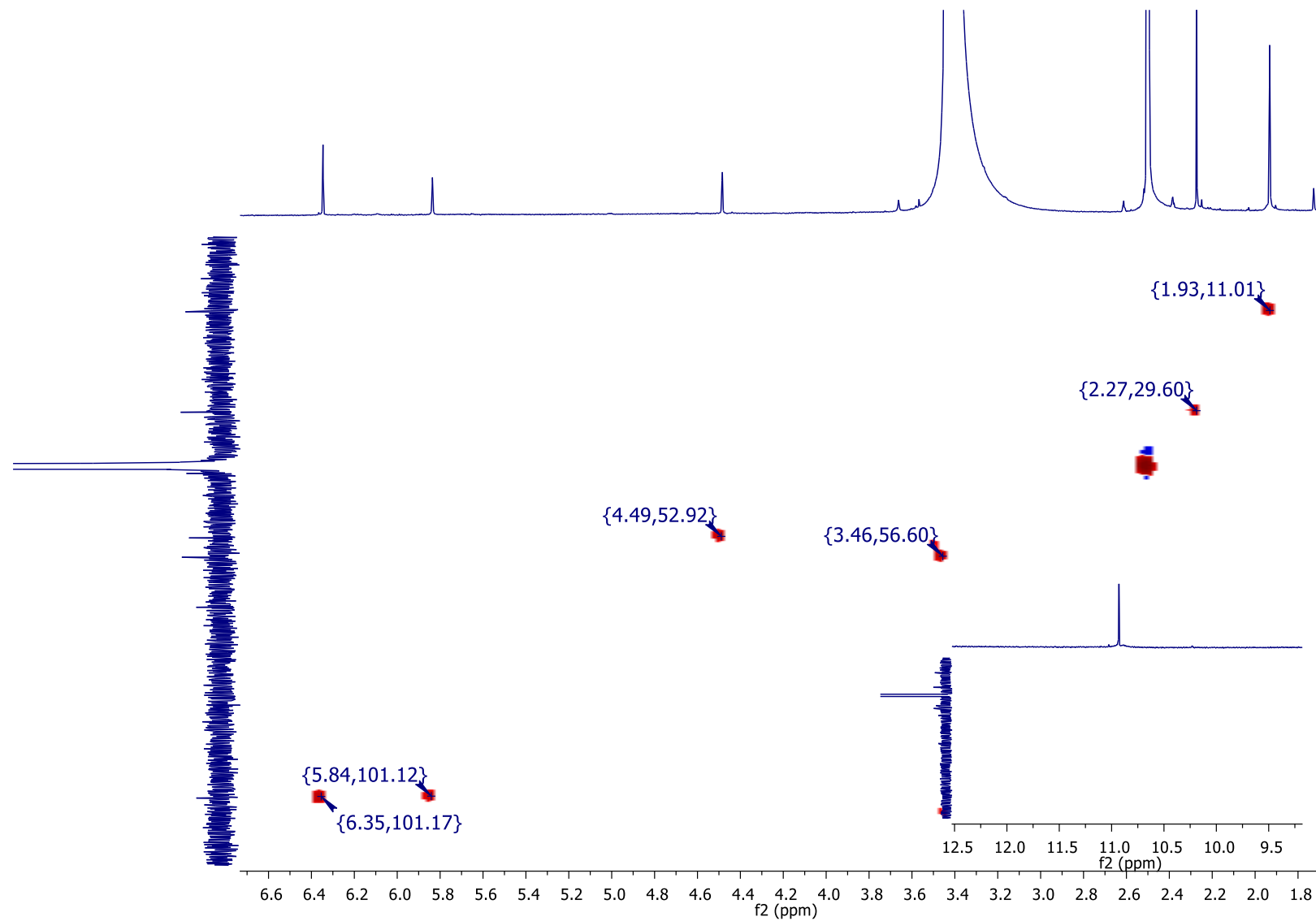
Fonte: Elaboração própria

Figura 98: Espectro de ^{13}C da Substância **3** (DMSO- d_6 , 150 MHz).



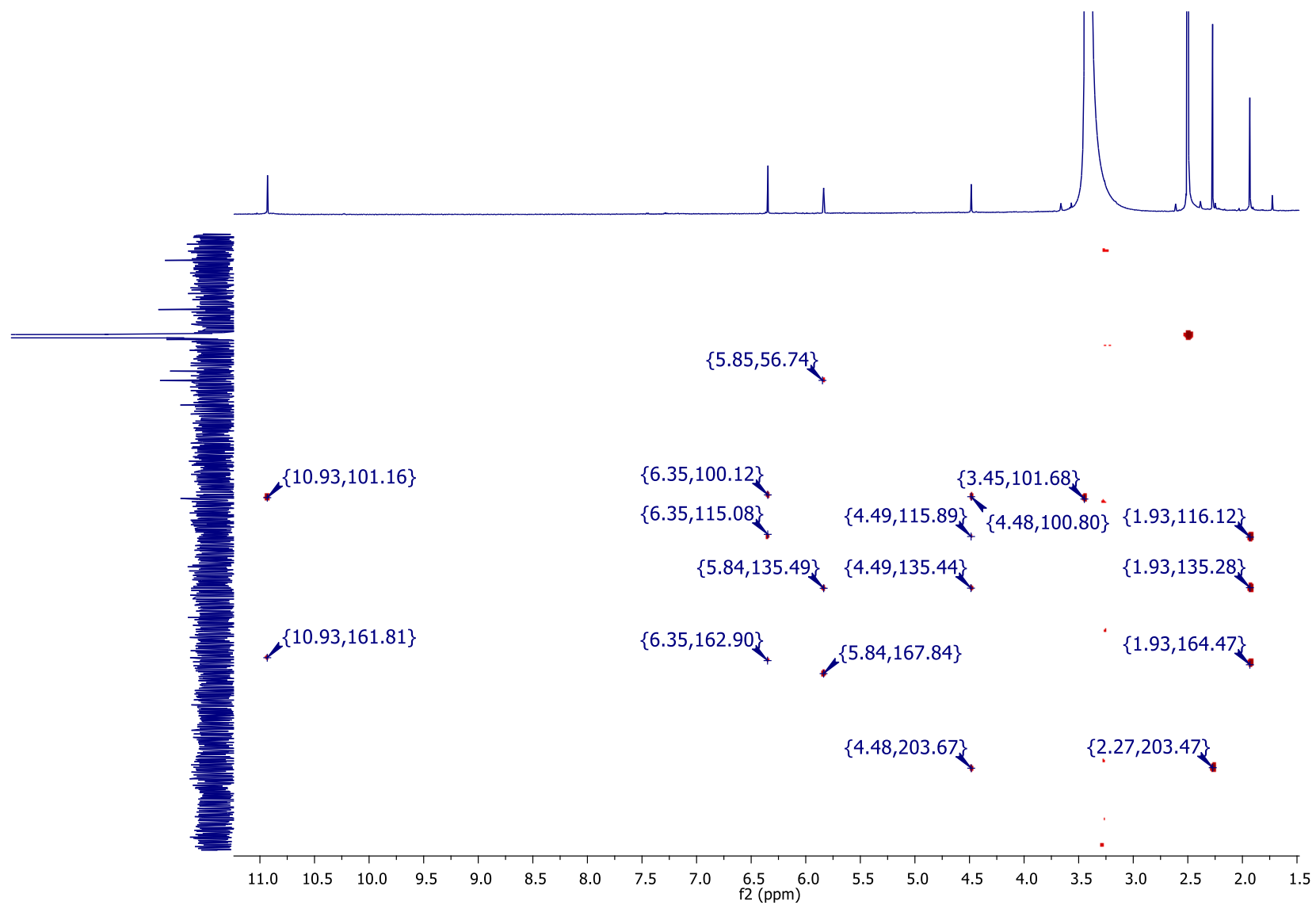
Fonte: Elaboração própria

Figura 99: Espectro de HSQC da Substância **3** (DMSO- d₆, 150 MHz).



Fonte: Elaboração própria

Figura 100: Espectro de HMBC da Substância **3** (DMSO- d₆, 150 MHz).



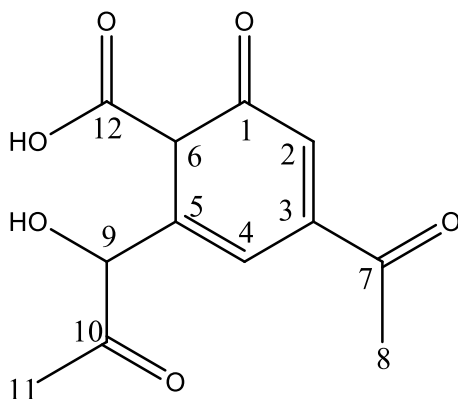
Fonte: Elaboração própria

Tabela 19: Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) da substância **3** em DMSO- d_6 .

Posição	^1H (δ)	^{13}C (δ)	gHMBC
1	-	161	-
2	6,35 (s)	101	C-5; C-1
3	-	115	-
4	5,85 (s)	100	C-6; C-12; C-4
5	-	135	C-5; C-6; C-7
6	3,46 (s)	56,5	C-2
7	-	163	-
8	2,30 (s)	29,8	C-10
9	4,49 (s)	53	C-5; C-3; C-4; C-10
10	-	203	C-8; C-9; C-11
11	1,94 (s)	11	C-3, C-4; C-7
12	-	168	-
OH	10,94 (s)	-	C-2; C-1

Fonte: Elaboração própria

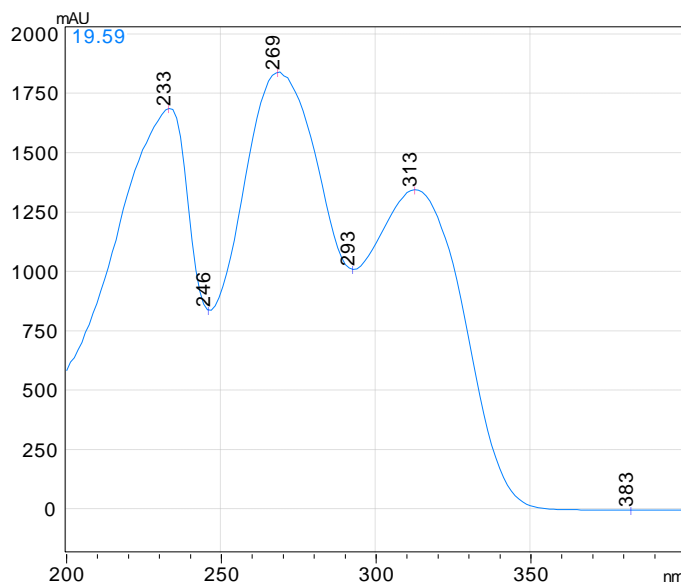
A ciclização da estrutura parcial foi realizada com base nas correlações observadas em HMBC do hidrogênio H-5 com os carbonos C-4, C-12 e C-6, (**Figura 102**) fornecendo a estrutura final da substância **3**.

Figura 102: Substância **3** e as principais correlações em HMBC.

Fonte: Elaboração própria

No espectro de UV em MeOH grau HPLC da substância **3** (**Figura 103**) observamos máximos de absorção em 233, 269 e 313 nm.

Figura 103: Espectro de UV da substância **3**.



Fonte: Elaboração própria

Com base nos experimentos de NOESY 1D (**Figura 104**) foi possível correlacionar os sinais irradiados com aqueles intensificados por NOE, demonstrados na **Tabela 20**.

Tabela 20: Correlações observadas através do experimento de Noesy 1D.

¹ H irradiado (ppm)	Sinais intensificados por NOE (ppm)
1,93 (H-8)	2,27 (H-11); 4,48 (H-9)
2,27 (H-11)	1,93 (H-8); 4,48 (H-9); 5,84 (H-5)
3,45 (H-6)	5,84 (H-5); 10,93 (OH)
4,48 (H-9)	5,84 (H-5); 2,27 (H-11); 1,93 (H-8)
5,54 (H-5)	4,48 (H-9); 2,27 (H-11)
6,34 (H-2)	1,93 (H-8); 2,27 (H-11)

Fonte: Elaboração própria

No espectro de massas de baixa resolução da substância **3** (**Figura 106**) no modo negativo um sinal de m/z 251,14 referente à formação de $[M-H]^+$. Esse experimento ajudou a confirmar a estrutura da molécula, que apresenta fórmula molecular $C_{12}H_{12}O_6$ e massa molecular 252 g/mol.

Levantamento bibliográfico realizado até o momento na Web of Science e Scinfinder indica tratar-se de uma substância inédita, portanto propomos uma numeração (que pode ser modificada) apenas para efeito de determinação estrutural.

Figura 104 A: Espectros de NOESY 1D da substância **3** (irradiação de H-5, H-9 e H-6).

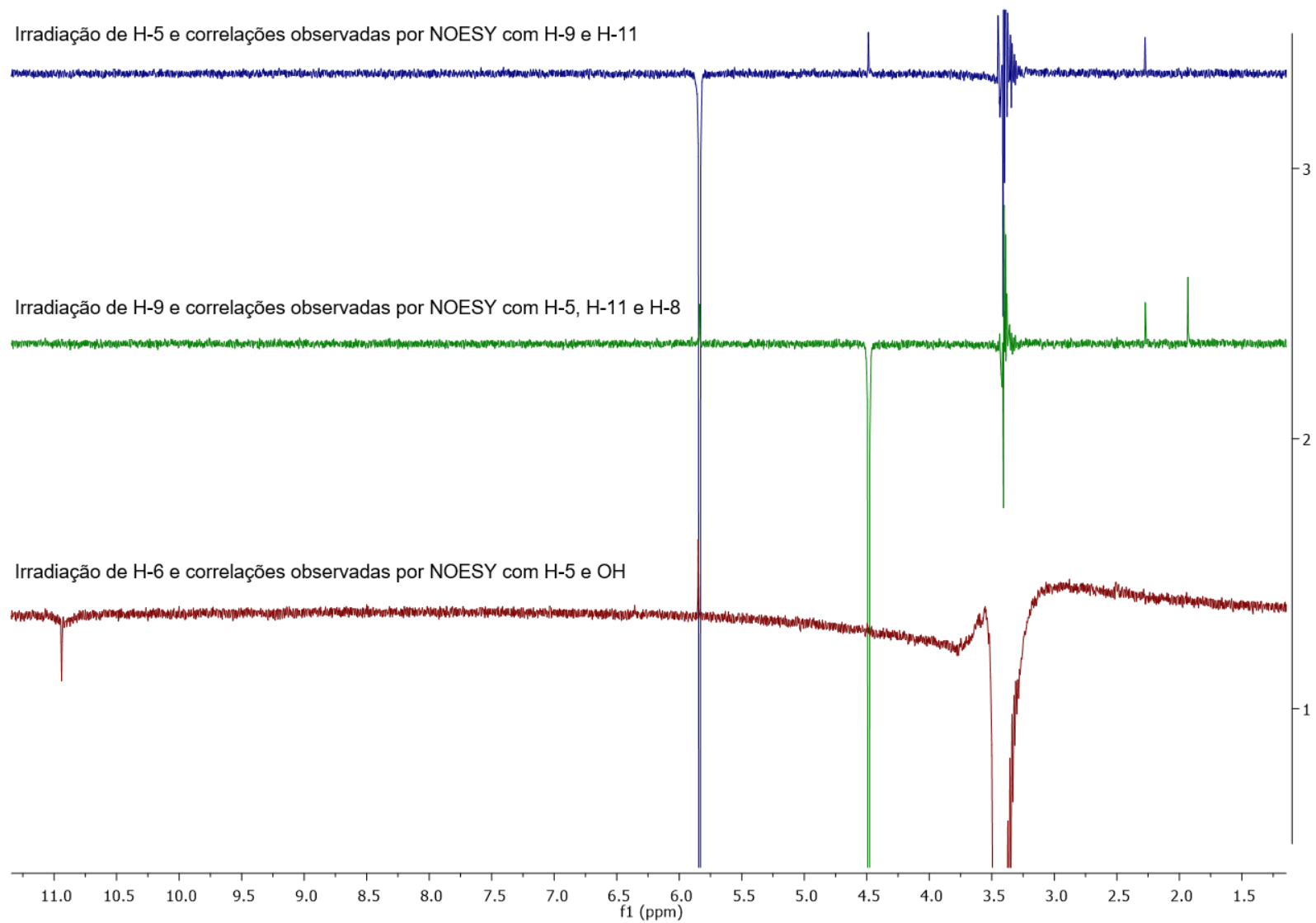
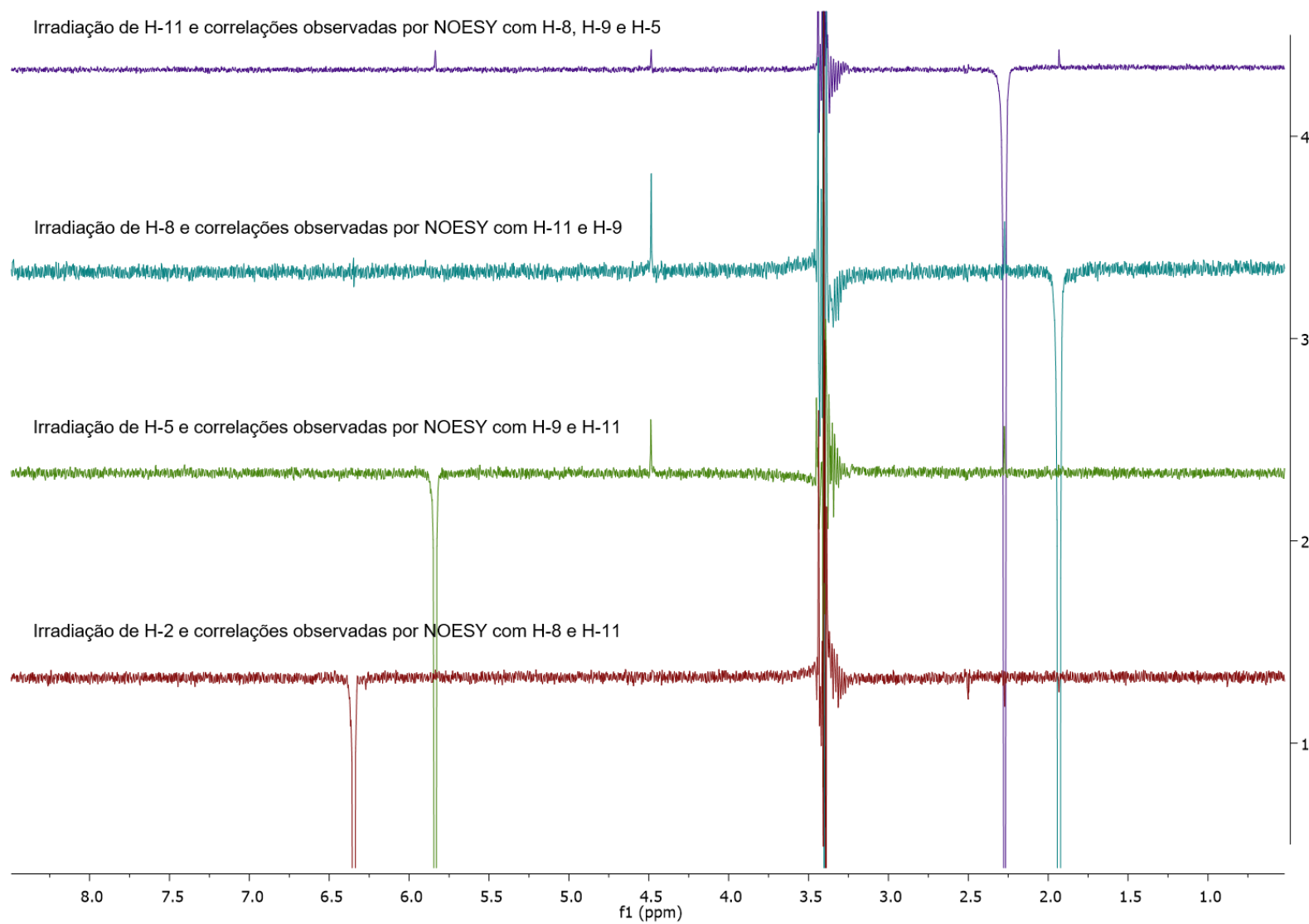
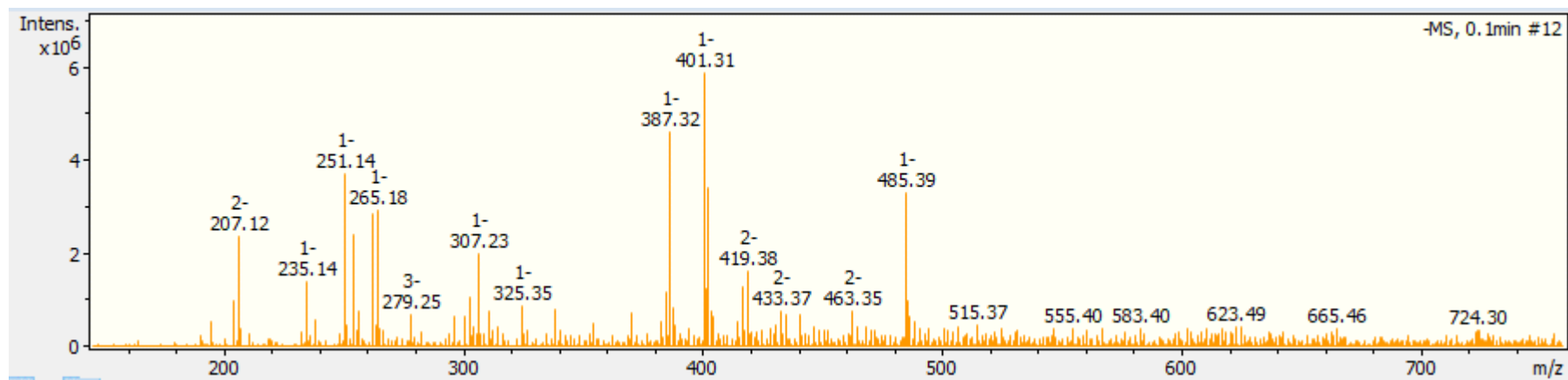


Figura 104 B: Espectros de NOESY 1D da substância **3** (irradiação de H-11, H-8, H-5 e H-2).



Fonte: Elaboração própria

Figura 105: Espectro de Massas de baixa resolução da substância **3**, em modo negativo.



Fonte: Elaboração própria

4.9 Atividade biológica das frações e substâncias isoladas

4.9.1 Resultado da atividade citotóxica.

Linhagem	MCF-7				HCT-116			
	GI (%) 5 ug/mL		GI (%) 50 ug/mL		GI (%) 5 ug/mL		GI (%) 50 ug/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
AS 09 Fr 01	13,71	5,59	12,09	6,20	3,58	1,12	1,97	4,23
AS 09 Fr 02	7,38	6,07	15,27	7,96	1,69	4,45	56,32	19,59
AS 09 Fr 03	11,72	3,03	54,46	3,26	5,24	5,05	81,79	9,32
AS 09 Fr 04	19,34	4,76	81,16	1,03	11,02	2,91	97,20	0,78
AS 09 Fr 05	16,31	6,78	27,19	4,43	6,30	1,78	16,85	9,54
AS 09 Fr 06	2,27	7,18	25,81	3,74	-0,65	6,59	39,28	16,35
AS 09 Fr 07	13,18	2,67	78,10	10,10	9,61	6,35	96,38	0,93
AS 09 Fr 08	8,54	0,77	79,08	8,74	2,67	8,15	98,81	0,70
AS 09 Fr 09	7,19	10,77	33,35	8,38	1,80	3,84	82,19	3,74
AS 09 Fr 10	-3,06	10,50	22,90	10,18	2,69	9,56	16,13	13,39
DM 02 Fr 01	8,10	9,89	15,54	2,91	3,23	10,60	10,12	10,08
DM 02 Fr 02	4,15	6,33	39,99	0,84	1,81	11,83	43,28	2,00
DM 02 Fr 04	7,77	10,63	43,15	4,62	-3,55	6,34	59,59	11,60
DM 02 Fr 05	-6,29	14,10	37,06	2,92	0,09	8,69	76,88	9,91
DM 02 Fr 06	-8,22	14,79	88,45	5,46	-1,43	13,02	91,26	6,48
DM 02 Fr 07	-4,30	7,32	18,55	9,81	1,97	8,71	14,39	8,01
DM 02 Fr 08	-9,22	16,98	3,18	20,76	-8,51	5,12	10,71	5,21

Fonte: Elaboração própria

Os compostos produzidos nas frações Fr 3, Fr 4, Fr 7, Fr 8 e Fr 9 de *A. spicifera* (AS) e Fr 5, Fr 6 de *D. marginata*, apresentaram excelentes atividades citotóxicas frente as linhagens tumorais MCF-7 e HCT-116. Estas frações foram purificadas em CLAE-DAD para obtenção dos compostos responsáveis pela atividade descrita.

4.9.2 Resultado da atividade antimicrobiana

Linhagens bacterianas	Concentração inibitória mínima dos compostos							
	DM 02 Fr 1	DM 02 Fr 2	DM 02 Fr 4	DM 02 Fr 5	DM 02 Fr 6	DM 02 Fr 7	DM 02 Fr 8	
<i>S. epidermidis</i> ATCC35984	>512	>512	≤512	>512	>512	>512	>512	
<i>S. aureus</i> ATCC25923	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	>512	>512*	>512	>512	>512	>512	>512	
<i>E. faecium</i> ATCC700221	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	
<i>K. pneumoniae</i> ATCC70060	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	
<i>E. coli</i> ATCC25922	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	

* Inibição parcial de 82% da bactéria *E. faecalis* ATCC29212 com o composto DM02-Fr2 a 512 µg/mL;

Fonte: Elaboração própria

Os compostos produzidos nas frações Fr 2 e Fr 4 de *D. marginata* apresentaram atividades antimicrobiana frente as linhagens *E. faecalis* e *S. epidermitis*, respectivamente. Estas frações foram purificadas em CLAE-DAD para obtenção dos compostos responsáveis pela atividade descrita.

Linhagens Bacterianas	Concentração inibitória mínima dos compostos [#]									
	AS 09 Fr 1	AS 09 Fr 2	AS 09 Fr 3	AS 09 Fr 4	AS 09 Fr 5	AS 09 Fr 6	AS 09 Fr 7	AS 09 Fr 8	AS 09 Fr 9	AS 09 Fr 10
<i>S. epidermidis</i> ATCC35984	>512	≤512	≤512	≤512	≤512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>S. aureus</i> ATCC25923	>512	>512	>512	>512	≤512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	>512	>512**	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>E. faecium</i> ATCC700221	>512	>512	>512	>512***	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>K. pneumoniae</i> ATCC7006C	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>E. coli</i> ATCC25922	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512

** Inibição parcial de 81,3% da bactéria *E. faecalis* ATCC29212 com o composto AS09-Fr2 a 512 µg/mL.

Fonte: Elaboração própria

Os compostos produzidos nas frações Fr 2, Fr 3, Fr 4 e Fr 5, de *A. spicifera* apresentaram atividades antimicrobiana frente as linhagens *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecolis*, *E. faecium* e, respectivamente. Estas frações foram purificadas em CLAE-DAD para obtenção dos compostos responsáveis pela atividade descrita.

Foi possível observar uma variação na produção metabólica de *H. monticulosum*, tanto no perfil químico, quanto nos resultados biológicos, dependendo do hospedeiro a que estava associado.

Esses dados contribuem para suposição de que a produção metabólica de um micro-organismo é diretamente influenciada por estes e pelos nutrientes fornecidos, fazendo com que o fungo produza ou não determinados metabólitos, justificando a variação nos dados obtidos.

CAPÍTULO 4. Utilização de planejamento experimental no cultivo de *A. stygium*.

Tendo em vista que variações no cultivo de um micro-organismo podem alterar sua produção metabólica, esta pesquisa visa comparar o perfil químico e biológico do extrato bruto obtido de acordo com o padrão adotado pelo grupo de pesquisa NuBBE, juntamente com dados obtidos a partir de mudanças no cultivo da mesma linhagem fúngica.

Na tentativa de melhorar as condições experimentais de crescimento da cepa e da produção metabólica, foi aplicado um modelo quimiométrico no cultivo de *A. stygium* visando maximizar a diversidade química e produção de compostos bioativos.

4.10 Escolha das variáveis e respostas

Os parâmetros de cultivo são fatores críticos para a produção de metabólitos secundários por um organismo. Mesmo pequenas modificações no meio de cultura podem impactar a produção de certos compostos, como também influenciar no perfil geral de seus metabólitos secundários.

Sabendo que os micro-organismos são capazes de modificar suas propriedades fisiológicas e bioquímicas de acordo com a condição nutricional a que são expostos, o rendimento de compostos bioativos, muitas vezes, pode ser substancialmente aumentado pela otimização de alguns fatores físico-químicos como temperatura, salinidade, valor de pH, luz ou por modificações nos componentes do meio, presença de precursores ou inibidores (WANG et al., 2011).

Na natureza, a síntese de metabólitos é influenciada por fatores bióticos e abióticos e está intimamente relacionada com a fisiologia do hospedeiro, já que a maioria dos endófitos coloniza os espaços no interior das células vegetais. Assim, fatores ambientais como a disponibilidade de água, nutrientes e salinidade podem levar a uma alteração do ambiente em torno dos micro-organismos, levando-os a adaptar-se para sobreviver nas novas condições. Tal ajuste, geralmente, leva à produção de diferentes compostos que auxiliam nessa adaptação (AZEVEDO J.L, et al., 2002).

Com base no exposto, para a realização desta parte do trabalho foi desenvolvido um planejamento fatorial visando avaliar como algumas mudanças na metodologia de cultivo afetam concomitantemente ao rendimento em massa e a diversidade química dos metabólitos secundários produzidos pela linhagem fúngica AS 01 MQ isolado da alga vermelha *A. spicifera*.

Esta linhagem foi selecionada por já ter sido estudada no nosso grupo de pesquisa, e com isso dispomos de dados extras que contribuiriam para a verificação da influência das variáveis de cultivo escolhidas.

Para realizar esta avaliação do processo de crescimento e produção metabólica do fungo nos meios de cultivo Malte e Czapek, foram escolhidas as seguintes variáveis: pH, tipo de água e tempo de cultivo (**Tabela 21**).

Tabela 21: Variáveis escolhidas para realização do planejamento

pH	6,5	7,5	8,5
Tempo (dias)	20	26	32
Tipo de Água	Deionizada	Torneira	Mar

Fonte: Elaboração própria

Todos os experimentos de cultivo foram realizados utilizando o tampão Tris-HCl 0,01 M, para o controle do equilíbrio ácido-base das soluções aquosas utilizadas, pois tamponava bem todos os tipos de água na faixa de pH escolhida.

4.10.1 Meio de Cultivo

A seleção do meio de cultura é um dos fatores mais influenciáveis na produção dos metabólitos secundários (compostos extracelulares secretados no meio de cultura) dos fungos, pois o endófito pode crescer ou ativar rotas biossintéticas diferentes, de acordo com a exposição aos nutrientes que lhe são oferecidos.

Sendo assim, a manipulação dos parâmetros do processo fermentativo pode alterar a expressão dos metabólitos secundários produzidos.

Com base no exposto, foram selecionados os meios de cultivo Czapek e Extrato de Malte, meios pobres e ricos em nutrientes, respectivamente.

4.10.2 Variável pH

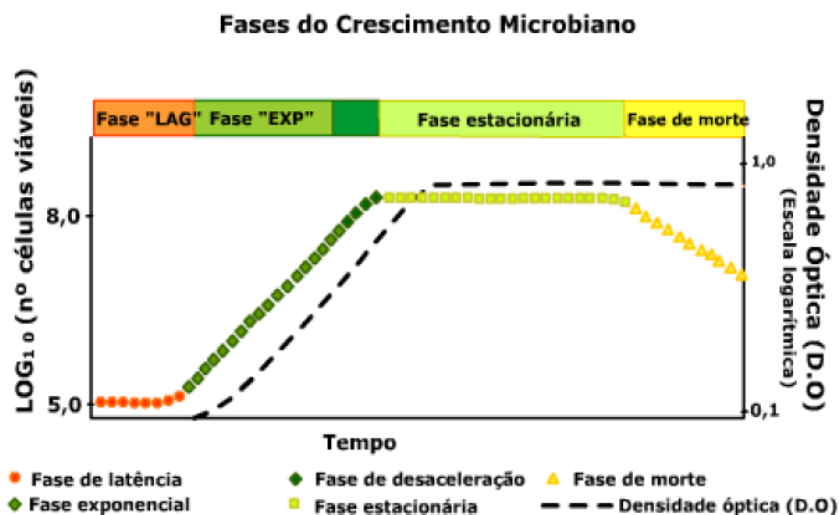
VANDERMON e colaboradores (2013) reiteram que as mudanças no pH do meio de fermentação podem afetar vários processos celulares de v, tais como regulação e biossíntese de metabólitos secundários. Vale ressaltar que em estudos realizados em frascos, onde o pH não é controlado ao longo do tempo, pode-se avaliar somente, a influência do pH inicial no crescimento e também na produção de metabólitos (FANG; ZHONG, 2002).

O pH do caldo de cultivo é um dos parâmetros mais críticos que afetam o crescimento e a biossíntese de metabólitos, e que varia com diferentes organismos, condições operacionais e meios de cultivo utilizados (LACROIX et al., 1985; YANG; LIAU, 1998), motivo que nos levou a avaliar essa variável.

4.10.3 Variável Tempo

A determinação da evolução ao longo do tempo da concentração de um componente celular, da concentração de células ou da biomassa em suspensão em meio de crescimento líquido, permite obter experimentalmente a curva de crescimento da população microbiana (**Figura 106**).

Figura 106: Curva de crescimento microbiano teórico.



Fonte: Adaptado de MADIGAN et al., 2003.

Apesar da curva de crescimento quase sempre ter esse perfil característico, não se pode estimar um valor exato para cada uma dessas etapas para todos os micro-organismos.

Dentro dos estágios de crescimento e desenvolvimento dos fungos, diferentes compostos são produzidos e degradados assim como reutilizados ao longo do seu crescimento. Em muitos casos, longos tempos de cultivo levam a um número menor de compostos finais. Isso decorre da falta de nutrientes oriundos do meio de cultura e conseqüentemente, da metabolização de compostos previamente produzidos.

Pelos padrões adotados no NuBBE, o tempo de cultivo dos endófitos varia de 21 dias para cultivos em meio sólido e 28 dias para meio líquido. Sendo assim, essa variável tem vista a necessidade de identificar esta espécie, sua curva de crescimento para que seja possível otimizar a busca pelos metabólitos secundários produzidos.

4.10.4 Variável Tipo de Água

A escolha em se variar a água do cultivo se baseou no fato de que o fungo em estudo possa não ser exclusivamente marinho, mas fungos facultativos provenientes de ambiente de água doce ou terrestre, e que sejam capazes de crescer e até mesmo esporular no ambiente marinho. Portanto, essa análise pode nos auxiliar a verificar como esse parâmetro afeta a produção e se esses dados podem nos auxiliar na identificação do tipo de fungo em estudo.

Como ponto intermediário, escolheu-se trabalhar com água de torneira, baseado, no trabalho realizado por GUNATILAKA (2007), para verificar a diversidade química de plantas associadas a micro-organismos, investigando a influência na variação das condições de cultivo das linhagens fúngicas *Paraphaeosphaeria quadrisepata* e *Chaetomium chiversii*, que resultou no isolamento de seis novos metabólitos no cultivo com água de torneira em relação a água ultrapura.

Com base no exposto, alguns cuidados foram tomados para melhor execução e padronização dos experimentos. Foram utilizados Erlenmeyer de boca larga (5 cm diâmetro) e 200 ml de volume, pois estes influenciam benéficamente o crescimento dos micro-organismos devido a uma maior capacidade de aeração do sistema e maior superfície de contato entre o micélio e o meio de cultivo, conforme observado em experimentos anteriores em nosso laboratório.

Ao todo foram realizados 13 experimentos sendo 8 ensaios sob níveis e variáveis distintas e 5 réplicas no ponto central (**Tabela 22**). Os experimentos no ponto central garantem maior eficiência no processo de modelagem (equação de regressão) e aumentam o espaço amostral avaliado.

Tabela 22: Planejamento realizado para os meios de cultivo líquidos.

Valores Reais			
# exp.	pH	Tempo (dias)	Tipo de Água
1	6,5	20	Deionizada
2	8,5	20	Deionizada
3	6,5	32	Deionizada
4	8,5	32	Deionizada
5	6,5	20	Mar
6	8,5	20	Mar
7	6,5	32	Mar
8	8,5	32	Mar
9	7,5	26	Torneira
10	7,5	26	Torneira
11	7,5	26	Torneira
12	7,5	26	Torneira
13	7,5	26	Torneira

4.11 Cultivo do endófito e obtenção dos extratos brutos

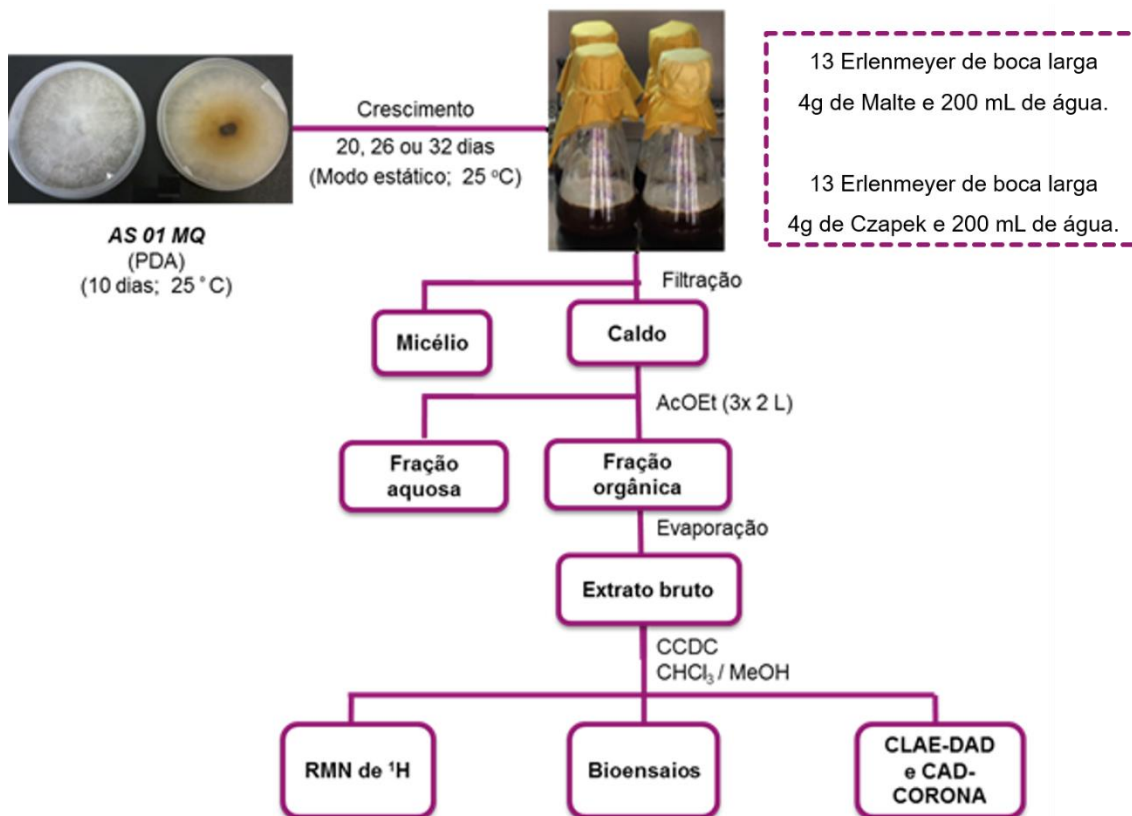
A linhagem AS 01 MQ, preservada em slants, foi repicada para placas de Petri contendo PDA preparado com os diferentes tipos de água selecionados, e incubada por dez dias a 25°C, a fim de se obter maior massa micelar.

Foi então realizado o cultivo em escala reduzida nos meios líquidos de Czapek e Extrato de Malte seguindo os experimentos indicados nas tabelas.

Estes meios foram esterilizados em autoclave a 121°C por 40 minutos. Após atingir a temperatura ambiente esses meios foram inoculados com, aproximadamente, um terço do micélio de cada placa de Petri, e mantidos a 25°C em modo estático por 20, 26 e 32 dias, conforme o planejamento.

A metodologia do cultivo do fungo AS-01 até obtenção do extrato bruto AcOEt utilizado para as análises do perfil químico e biológico está apresentada no **Fluxograma 4**.

Fluxograma 4: Metodologia de obtenção dos extratos brutos do Planejamento experimental realizado com o fungo AS-01.



Fonte: Elaboração própria

Após os períodos específicos, os meios de cultivo líquidos foram filtrados para separar o micélio do caldo fermentado, que foi então submetido à partição com AcOEt (3 vezes), fornecendo os extratos em AcOEt após evaporação do solvente. Todos os extratos foram analisados por RMN de ¹H, CLAE-DAD, CLAE-EM, CG-EM e ensaios biológicos.

4.12 RESULTADOS E DISCUSSÃO PLANEJAMENTO

Para a realização dos experimentos com o fungo *Annulohyphoxylon stygium*, alguns parâmetros foram pré-definidos, como Erlenmeyer de boca larga (5 cm diâmetro) e 200 ml de Volume, já que estes influenciam no melhor crescimento dos micro-organismos devido a maior aeração que o sistema apresenta.

Na construção do planejamento experimental, as diferentes escalas e valores das variáveis podem influenciar na criação modelo, sendo necessária a

codificação das variáveis. Por convenção foram adotados os números -1 para os níveis baixos e +1 para níveis altos, de acordo com **Tabela 23**.

A codificação é importante, sendo atribuída a mesma relevância para todas as variáveis, pois as mesmas passam a ser descritas em uma única escala entre -1 e +1, independente do valor original. A combinação destes níveis codificados geram os dados experimentais a serem realizados (**Tabela 24**).

Tabela 23: Codificação dos níveis

Codificação dos Níveis			
	Nível baixo (-1)	Ponto central (0)	Nível alto (+1)
pH	6,5	7,5	8,5
Tempo	20	26	32
Água	MQ	Torneira	Mar

Tabela 24: Configuração dos experimentos com as variáveis codificadas

# exp.	Codificação de Valores		
	pH	Tempo	Tipo de Água
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0

Fonte: Elaboração própria

É importante ressaltar que essa atribuição referente a nível baixo e alto não significa que o nível baixo seja inferior, ou vice-versa. Trata-se apenas de uma codificação sem denotar grau de inferioridade. Como descrito na **Tabela 24**, o ensaio que apresentar pH 6,5 será representado com a unidade - 1 e o pH 8,5 valor +1. O mesmo serve para a variável tempo, os ensaios com 20 dias de

cultivo, serão representados como -1, e os com 32 dias como +1. Já para o tipo de água, atribuiu-se -1 para água ultra pura e +1 para água do mar.

Outro fator a ser considerado é que pode ser realizada apenas uma réplica para cada experimento já que na grande maioria dos problemas estudados, apenas algumas variáveis serão realmente importantes e as demais poderão ser negligenciadas, pois não afetam o sistema no nível testado (LEARDI, et al., 2009 e BARROS, NETO, et al., 1996).

4.12.1 Análise Química dos Extratos brutos Planejamento

Tabela 25: Massas dos extratos brutos obtidos do Planejamento experimental realizado com a linhagem do fungo endofítico AS-01

Extrato	Massa (mg)	Extrato	Massa (mg)
Czapek Mar 8,5 20d	126	Malte Mar 8,5 20d	105
Czapek Mar 8,5 32d	65	Malte Mar 8,5 32d	52
Czapek Mar 6,5 20d	142	Malte Mar 6,5 20d	111
Czapek Mar 6,5 32d	36	Malte Mar 6,5 32d	61
Czapek MQ 8,5 20d	232	Malte MQ 8,5 20d	92
Czapek MQ 8,5 32d	205	Malte MQ 8,5 32d	56
Czapek MQ 6,5 20d	153	Malte MQ 6,5 20d	53
Czapek MQ 6,5 32d	100	Malte MQ 6,5 32d	38
Czapek Torneira 76,5 26d	53 (média)	Malte Torneira 76,5 26d	59 (média)

Fonte: Elaboração própria

4.12.1.1 Perfil Químico em CLAE-EM

Os extratos brutos obtidos dos experimentos com Malte (**Figura 107**) e Czapek (**Figura 108**) foram analisados em CLAE-EM. Uma das vantagens dessa técnica frente ao CLAE-DAD, comumente utilizado nos laboratórios, é que esta técnica permite identificar todas as substâncias ionizáveis, enquanto usando DAD apenas compostos com cromóforos são detectados.

Figura 107 A: Análise por CLAE-EM dos extratos obtidos com os experimentos para o meio de cultivo Malte (Exp. 01 e Exp. 02).

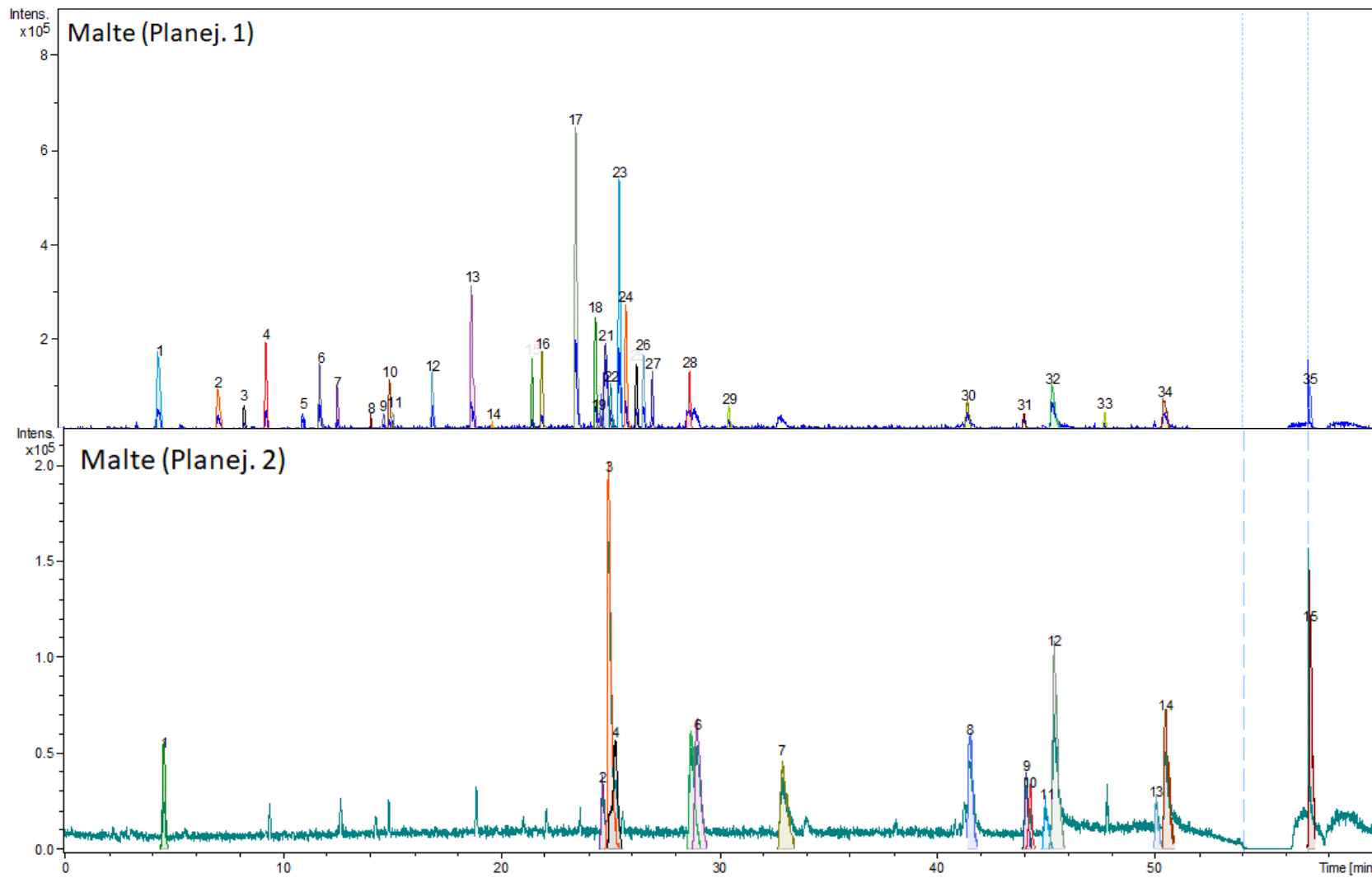


Figura 107 B: Análise por CLAE-EM dos extratos obtidos com os experimentos para o meio de cultivo Malte (Exp. 03 e Exp. 04).

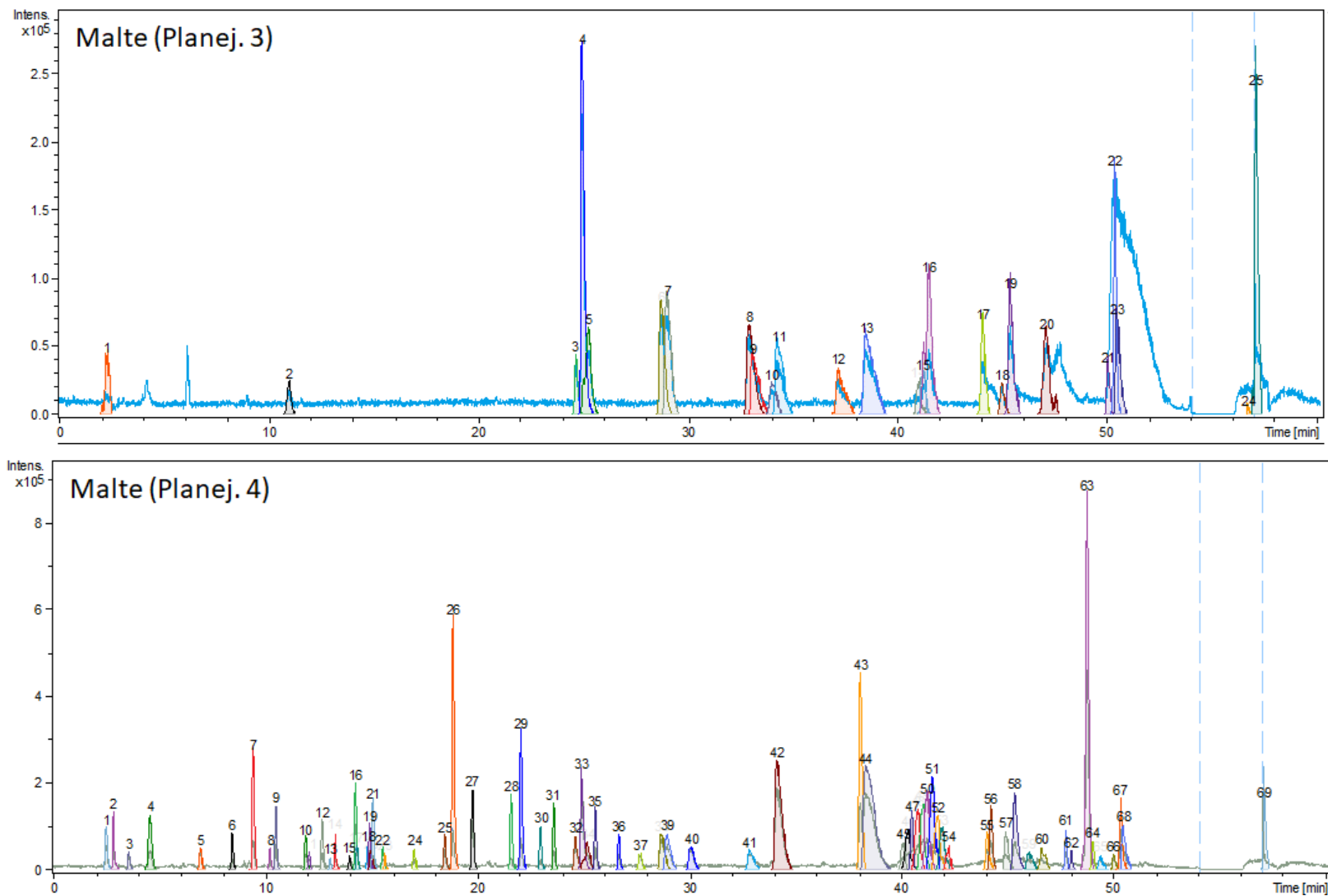


Figura 107 C: Análise por CLAE-EM dos extratos obtidos com os experimentos para o meio de cultivo Malte (Exp. 05 e Exp. 06).

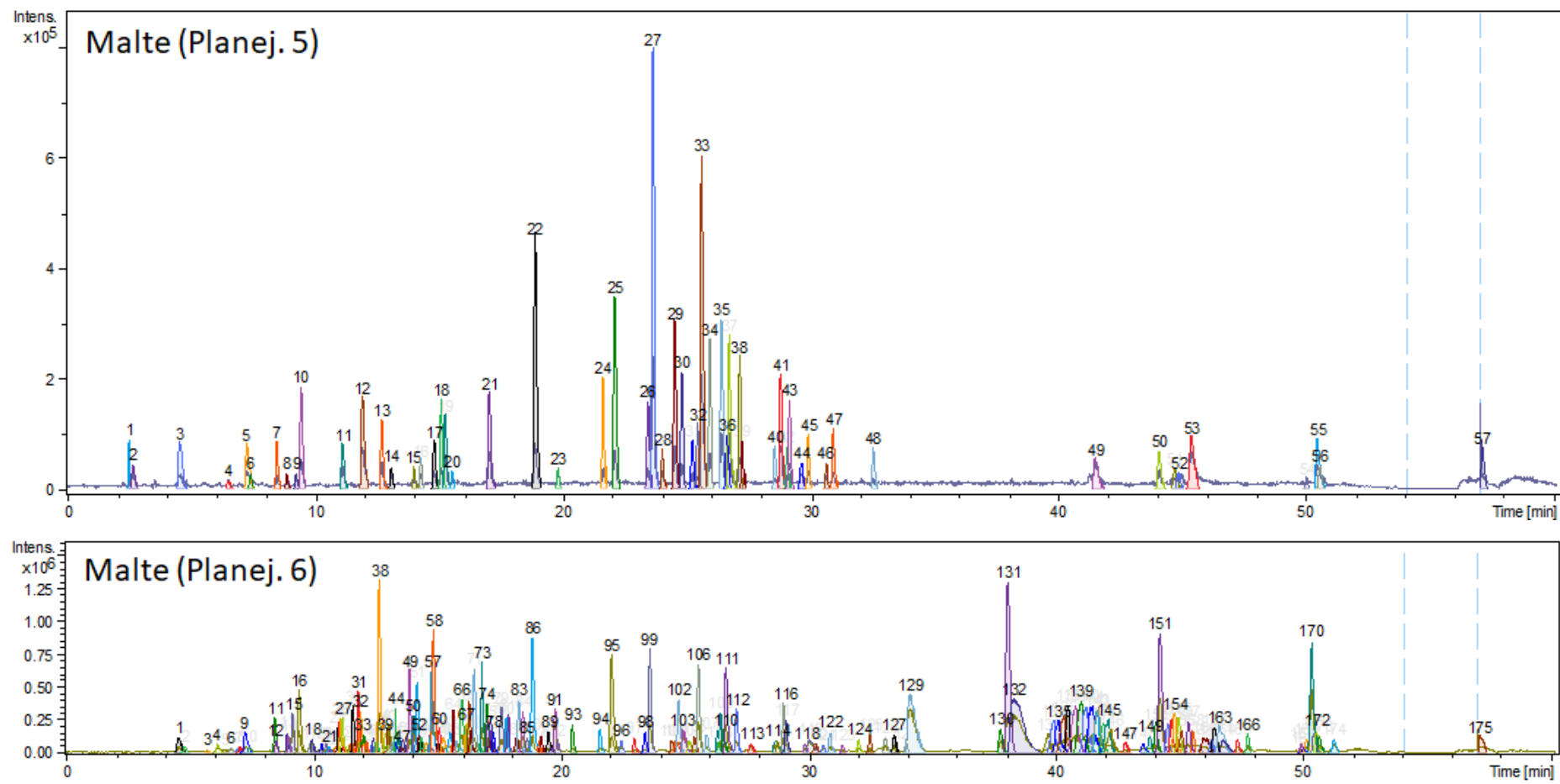


Figura 107 D: Análise por CLAE-EM dos extratos obtidos com os experimentos para o meio de cultivo Malte (Exp. 07 e Exp. 08).

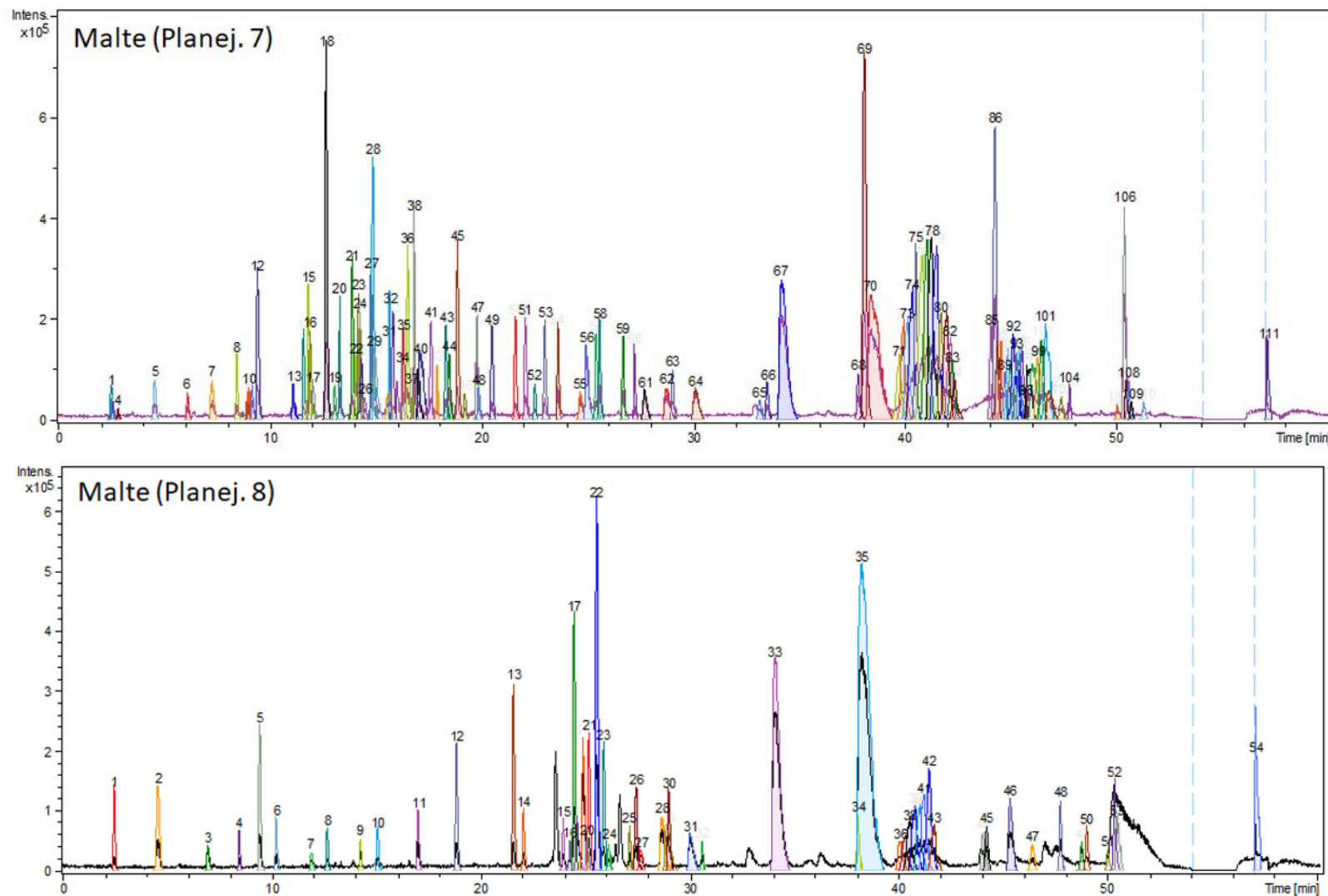
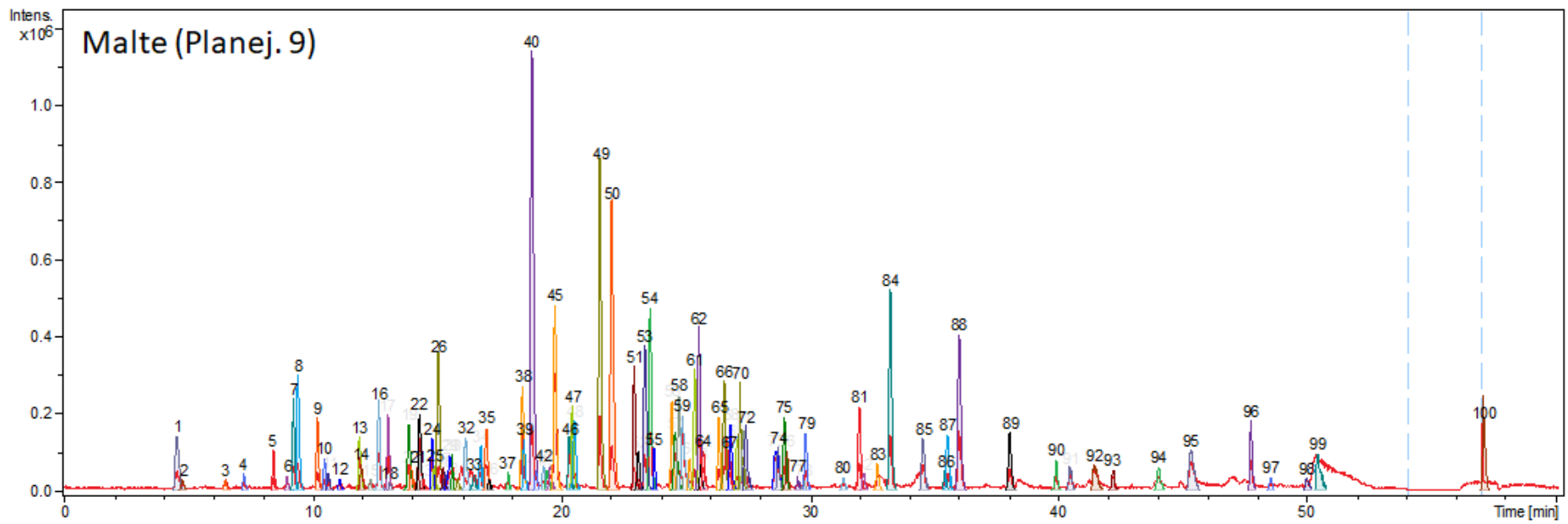


Figura 107 E: Análise por CLAE-EM dos extratos obtidos com os experimentos para o meio de cultivo Malte (Exp. 09).



Fonte: Elaboração própria

Figura 108 A: Análise por CLAE-EM dos extratos obtidos com os experimentos para o meio de cultivo CZAPEK (Exp.01 e Exp.02).

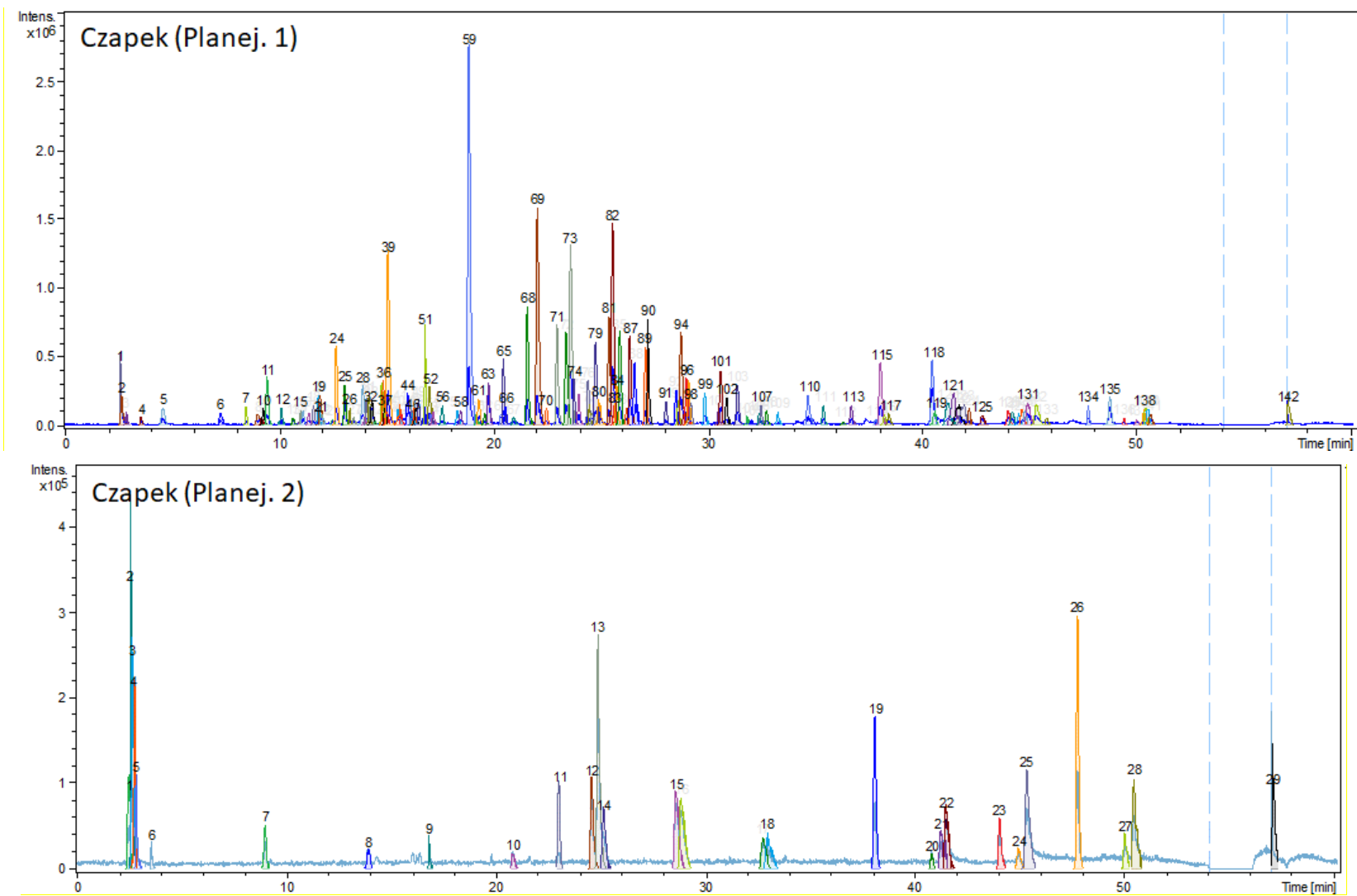


Figura 108 B: Análise por CLAE-EM dos extratos obtidos com os experimentos para o meio de cultivo CZAPEK (Exp.03 e Exp.04).

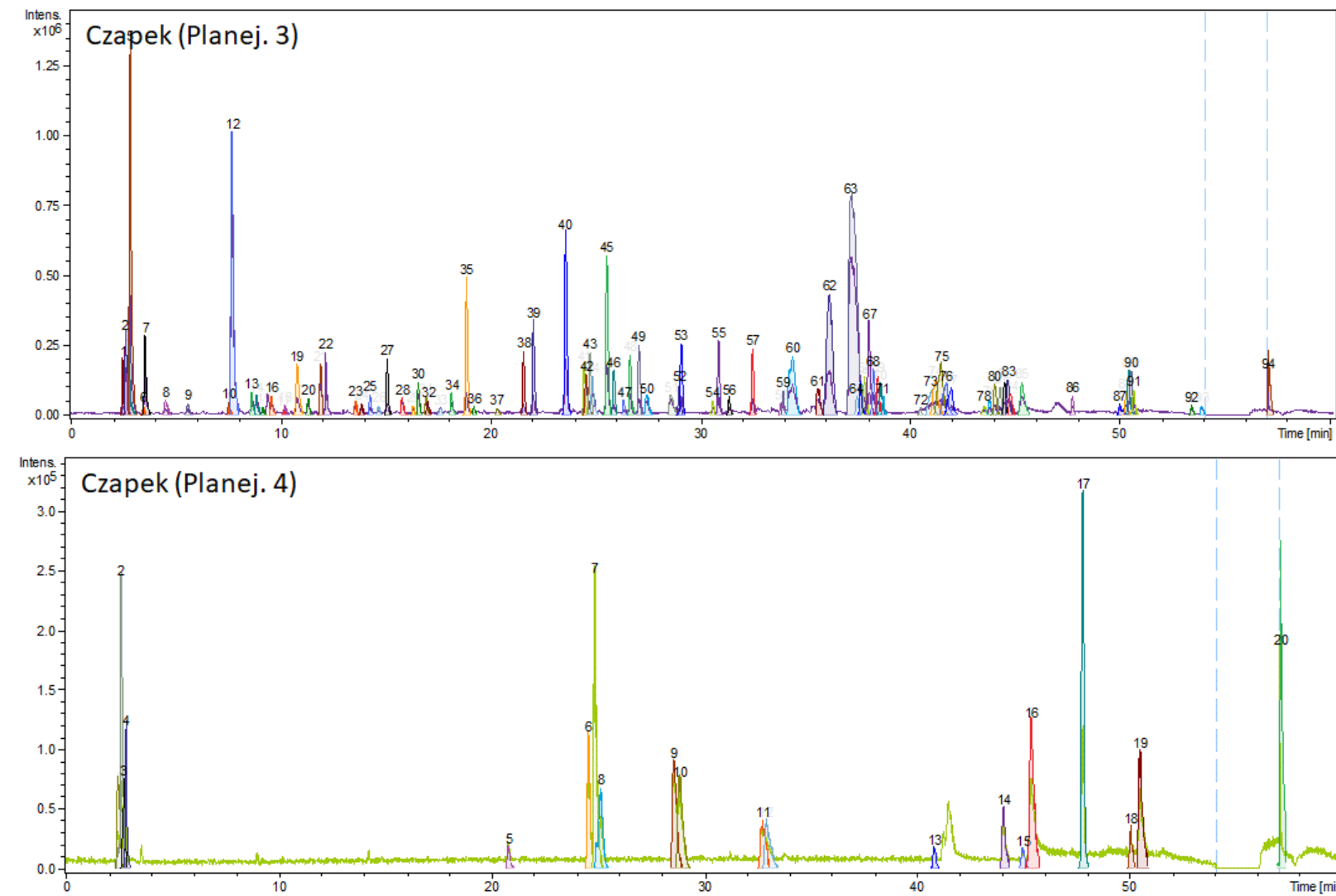


Figura 108 C: Análise por CLAE-EM dos extratos obtidos com os experimentos para o meio de cultivo CZAPEK (Exp.05 e Exp.06).

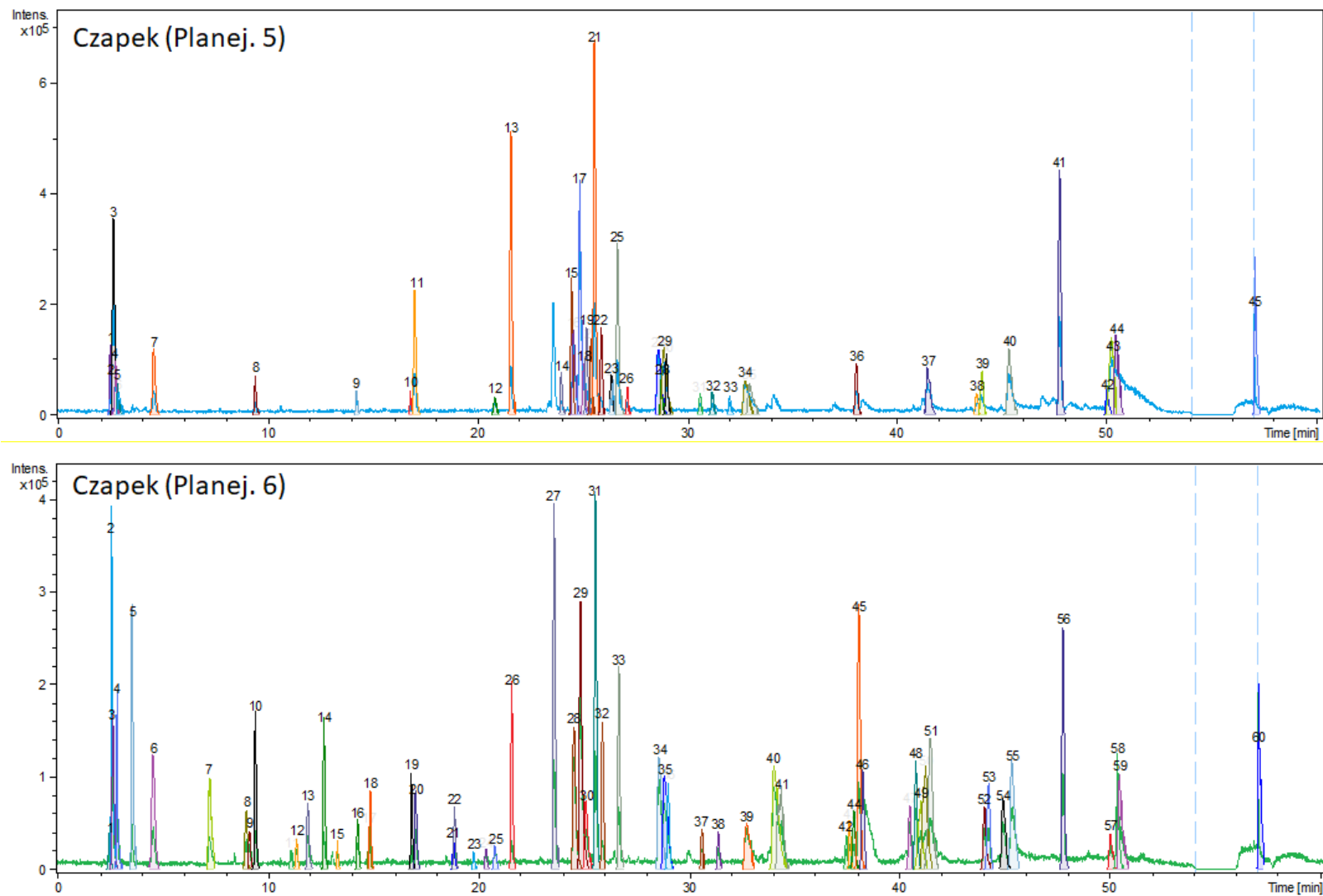


Figura 108 D: Análise por CLAE-EM dos extratos obtidos com os experimentos para o meio de cultivo CZAPEK (Exp.07 e Exp.08).

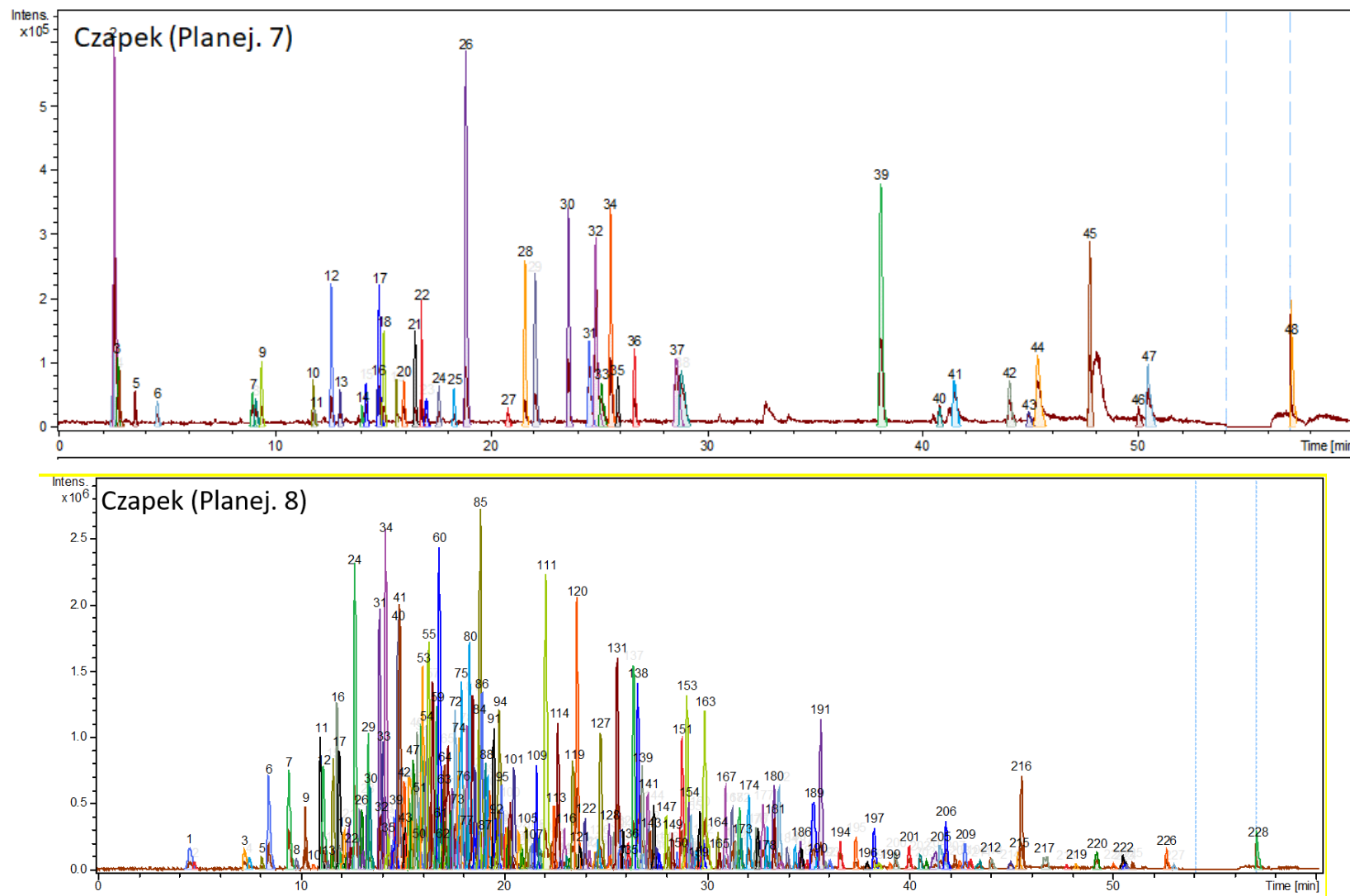
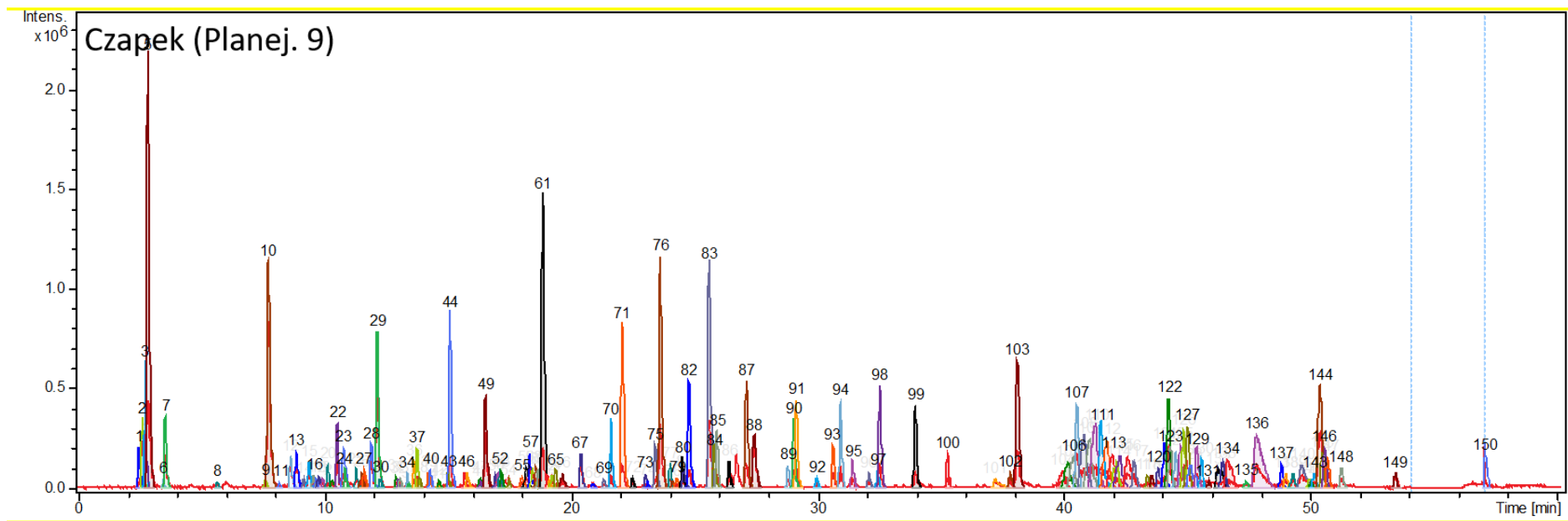


Figura 108 E: Análise por CLAE-EM dos extratos obtidos com os experimentos para o meio de cultivo CZAPEK (Exp.09).



Fonte: Elaboração própria

Esses dados reforçam a importância em utilizar diferentes técnicas nos estudos com Produtos naturais, tendo em vista a quantidade de informações que não poderiam ser obtidas utilizando apenas o CLAE-DAD.

Foi possível observar grande variação na produção metabólica de acordo com o tipo de ensaio realizado, como aumento/diminuição de algumas bandas e aparecimento/desaparecimento de outras. Esses resultados estão de acordo com o esperado e reforçam a teoria de que diferentes fatores afetam de maneiras diversas a produção metabólica de um micro-organismo.

Todos os extratos brutos foram enviados para análise biológica frente aos ensaios anticolinesterásico e citotóxico, realizados por pesquisadores colaboradores.

4.12.2 Perfil Biológico dos extratos Planejamento.

Os extratos brutos AcOEt foram submetidos à avaliação anticolinesterásica (**Tabela 26**) para verificar o potencial biológico deste fungo nos diferentes experimentos realizados.

Tabela 26: Porcentagem de inibição das enzimas ICER-AChE_{ee} e ICER-AChE_{hu} dos extratos do planejamento.

Amonstra	%inibição		Amonstra	%inibição	
	ICER-AChE _{ee}	ICER-AChE _{hu}		ICER-AChE _{ee}	ICER-AChE _{hu}
AS 01 MQ	82,0	93,1	AS 01 MQ	82,0	93,1
Czapek Mar 8,5 20d	81,2	82,9	Malte Mar 8,5 20d	60,5	84,0
Czapek Mar 8,5 32d	63,4	80,7	Malte Mar 8,5 32d	59,3	82,4
Czapek Mar 6,5 20d	71,1	82,8	Malte Mar 6,5 20d	50,4	84,9
Czapek Mar 6,5 32d	65,8	81,3	Malte Mar 6,5 32d	84,1	63,5
Czapek MQ 8,5 20d	60,4	39,9	Malte MQ 8,5 20d	70,6	84,1
Czapek MQ 8,5 32d	71,6	85,5	Malte MQ 8,5 32d	77,7	85,0
Czapek MQ 6,5 20d	58,4	49,6	Malte MQ 6,5 20d	80,7	87,1
Czapek MQ 6,5 32d	72,8	84,2	Malte MQ 6,5 32d	63,3	83,3
Czapek Torneira 76,5 26d	74,1	85,5	Malte Torneira 76,5 26d	78,1	85,7

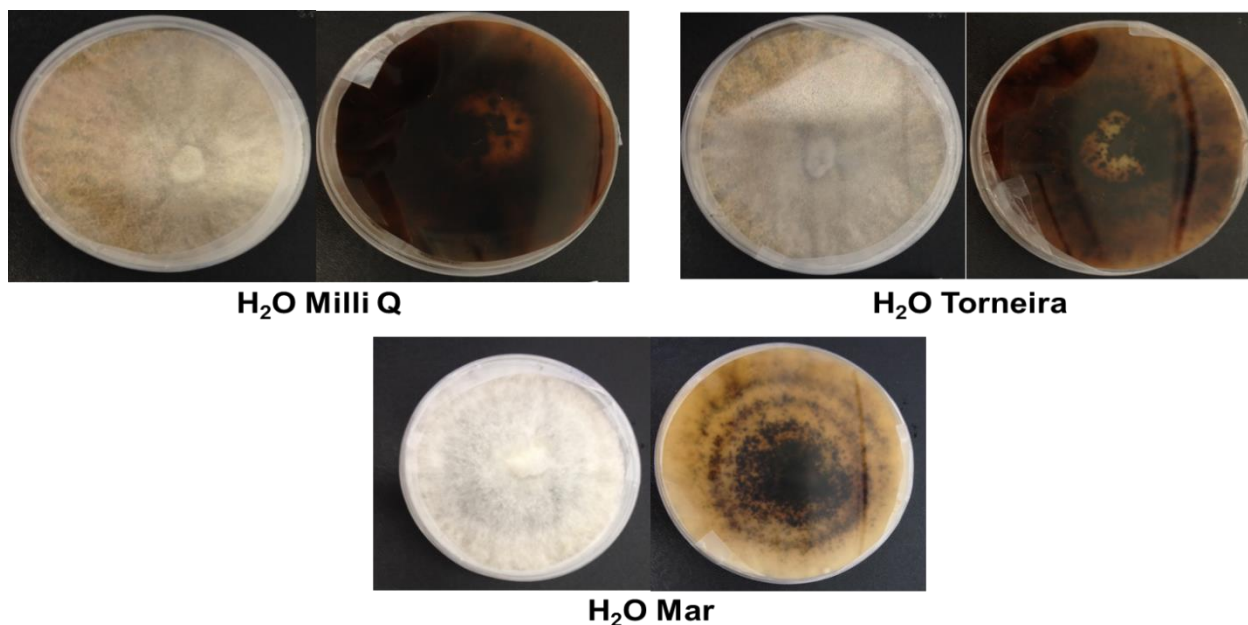
Fonte: Elaboração própria

Podemos observar que grande parte dos extratos (15/18 com inibição > 80%) apresentaram resultados promissores frente à inibição da acetilcolinesterase humana, com destaque para 9 amostras que se mostraram mais ativas que o padrão tacrina, evidenciando o potencial desses extratos em estudo para a descoberta de agentes inibidores de acetilcolinesterase e desenvolvimento de agentes terapêuticos para tratamento da Doença de Alzheimer.

4.12.3 Variações do cultivo.

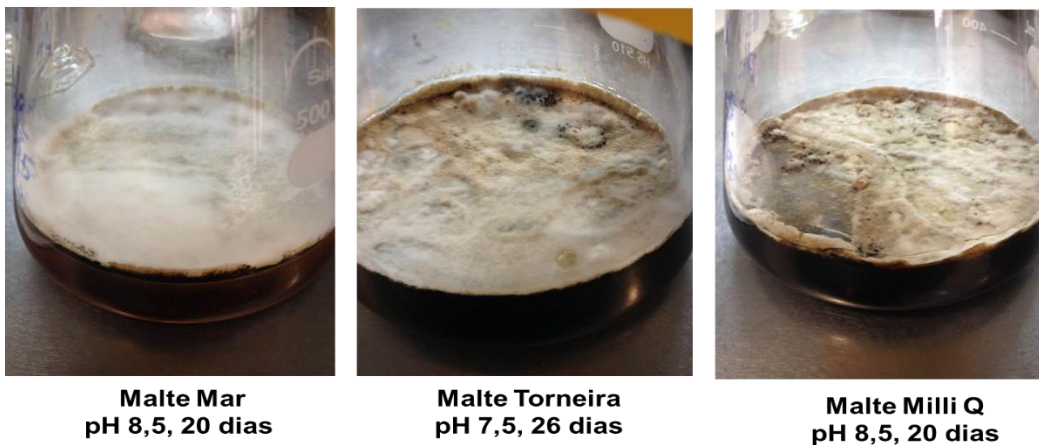
Foi possível observar também diferenças no cultivo do endófito desde o crescimento nas placas de PDA (**Figura 109**), do micélio quando cultivado no meio líquido (**Figura 110**). Após realizarmos as partições, foi possível notar variação na coloração dos extratos obtidos ao alterar o tipo de água (**Figura 111**), o pH (**Figura 112**) e os meios de cultivo (**Figura 113**) conforme mostram as imagens.

Figura 109: Vista superior e inferior das placas de cultivo da linhagem AS-01: Variação do aspecto do micélio nas placas de PDA com variação do tipo de água.



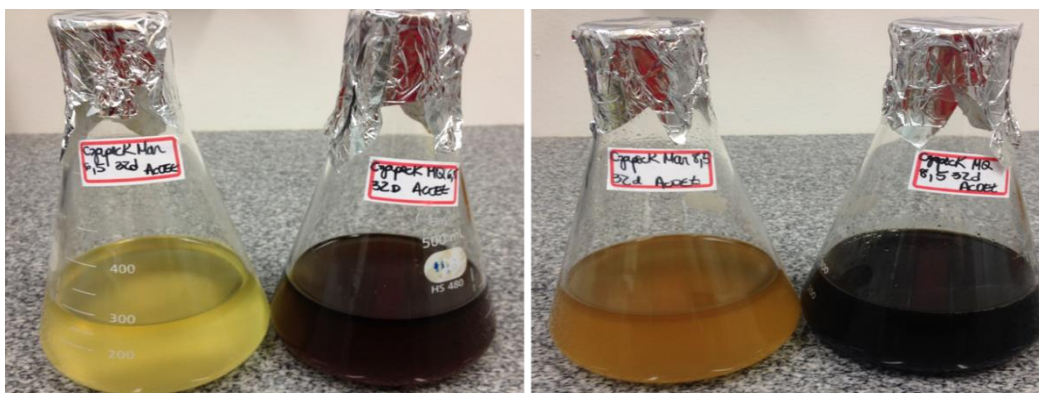
Fonte: Elaboração própria

Figura 110: Variação do aspecto do micélio e na coloração do meio de cultivo Malte ao alterar o tipo de Água.



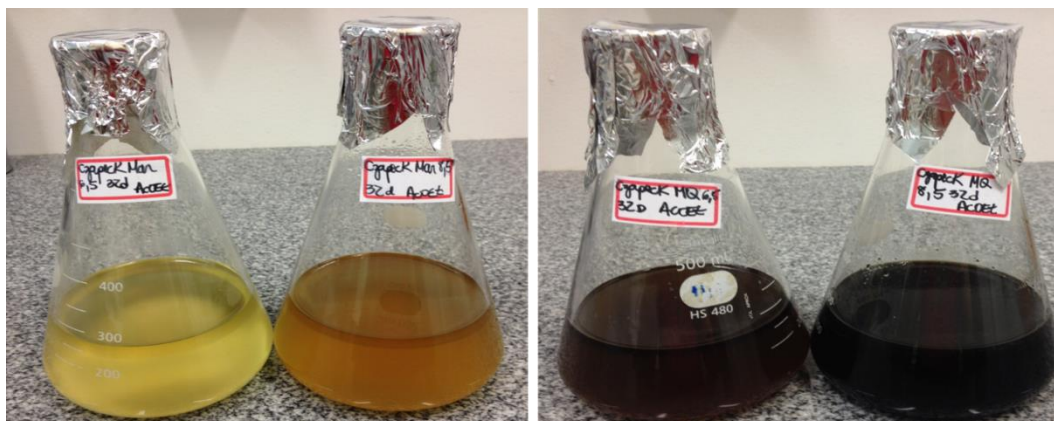
Fonte: Elaboração própria

Figura 111: Variação da coloração dos extratos ao alterar o tipo de água.



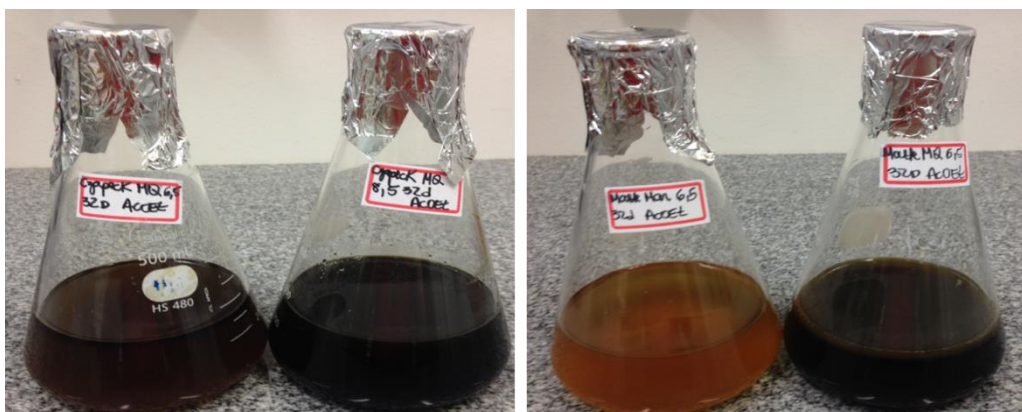
Fonte: Elaboração própria

Figura 112: Variação da coloração dos extratos ao alterar o pH.



Fonte: Elaboração própria

Figura 113: Variação da coloração dos extratos ao alterar o meio de cultivo.



Fonte: Elaboração própria

4.12.4 Influência dos efeitos nas respostas

Após a realização dos experimentos, o passo seguinte foi identificar quais as variáveis realmente importantes e que requerem maior atenção.

Para isso foi necessário realizar cálculos para verificar a influência dos Efeitos de primeira, segunda e terceira ordem, nas respostas esperadas (**Figura 114**).

Figura 114: Respostas escolhidas para análise do planejamento.

RESPOSTAS ANALISADAS
Massa (mg)
Atividade biológica (% inibição ICER-AChEee)
Atividade biológica (% inibição ICER-AChEhu)
Número de Picos (CLAE-EM)
Média Área Picos
Área Picos: Abaixo Média
Área Picos: Acima Média
#Picos 1a metade (Compostos Polares)
#Picos 2a metade (Compostos Apolares)
Média Intensidade Picos
Intensidade Picos: Abaixo Média
Intensidade Picos: Acima Média

Fonte: Elaboração própria

Diversas respostas puderam ser obtidas e consideradas simultaneamente. Estas foram escolhidas pois um maior número de picos garante a presença de maior variabilidade metabólica, podendo estar associada a aumento das atividades biológicas. No entanto, uma alta variabilidade estrutural na produção de compostos por si só não é vantajosa, pois se não apresentar quantidade significativa, fica inviável identificar e realizar testes biológicos. Portanto, essa resposta apresenta-se associada à quantidade de extrato em massa e em intensidade de picos, e evidencia quais são os metabólitos majoritários.

Essas respostas foram analisadas em conjunto para encontrar o melhor experimento que garanta variabilidade estrutural de metabólitos e massa suficiente para prosseguir os estudos.

4.12.5 Efeitos

O efeito de um fator pode ser definido como a mudança sofrida pela variável resposta quando passamos do nível baixo do fator para o nível mais alto.

Considere um experimento fatorial em que cada fator tenha dois níveis e r repetições para cada tratamento (combinações de níveis). Uma maneira especial de representar os tratamentos é usando a representação dos efeitos, como descrita abaixo:

4.12.6 Interações das variáveis selecionadas

Quando se observa que o comportamento de um fator é diferente nos dois níveis de outro fator, dizemos que existe interação entre os fatores. Calcula-se o efeito da interação entre dois fatores como sendo a metade da diferença entre os efeitos de um fator nos níveis do outro fator.

A interação ocorre entre dois ou mais fatores se o efeito de um fator na resposta depende do nível dos outros fatores.

O cálculo dos efeitos das variáveis foi realizado visando encontrar quais parâmetros mais contribuem para a indução da produção metabólica do fungo em massa, em quantidade de picos (variabilidade química) e sua bioatividade.

Algebricamente, os efeitos são obtidos como sendo a média das respostas no nível alto, menos a média das respostas no nível baixo, de acordo com a **Equação 3**.

$$\text{Efeito} = Y^{*+} - Y^{*-},$$

Em que Y^{*+} e Y^{*-} são a média das respostas quando a variável em estudo está no nível alto e baixo, respectivamente.

Dessa forma, foram calculados efeitos de primeira, segunda e terceira ordem. Efeitos de primeira ordem são referentes ao efeito de uma variável, já os de segunda ordem, efeitos causados pela combinação de 2 variáveis e por fim o de terceira ordem, que é a combinação de três variáveis.

Após o cálculo dos efeitos, foi necessário identificar quais deles foram ou não importantes para cada resposta. Um dos primeiros mecanismos utilizados foi uma análise gráfica (PARETO) que possibilitou verificar os efeitos principais e os de interações (segunda, terceira e quarta ordens). Este gráfico mostra as variáveis em ordem de importância para o modelo de regressão. A linha vertical mostra os coeficientes que são significativos ao nível de significância escolhido, de 1% (valor de p). Essa análise foi realizada pelo software STATISTICA® versão 6.0.

Outra alternativa para identificar os efeitos relevantes foi verificar a porcentagem que cada quadrado dos efeitos exerceu sobre a soma dos quadrados dos mesmos.

Para isso, elevou-se ao quadrado cada efeito, e realizou-se o cálculo da soma e, finalmente, o cálculo da contribuição que cada quadrado exerce sobre a soma, de acordo com a **Equação 4** a seguir:

$$\text{Porcentagem (Pi)} = (\text{Efeito}^2 / \text{Soma}(\text{Efeitos}^2))$$

Essa alternativa possibilitou verificar graficamente qual a contribuição de cada efeito na resposta sob avaliação.

A análise estatística do modelo foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA). A análise incluiu o teste F de Fisher (significância do modelo total), sua probabilidade associada $P(F)$, coeficiente de correlação R , e

coeficiente de determinação R^2 , que mede o ajuste do modelo de regressão, ou seja, sua reprodutibilidade.

Em muitas situações pode haver também o interesse em avaliar as relações existentes entre os principais fatores que compõem um processo e uma variável resposta de interesse. Nestas situações, o objetivo inclui determinar qual a condição de operação do processo que levará à obtenção de um valor ótimo para a variável resposta.

Uma superfície de resposta é a figura obtida quando uma variável resposta é representada graficamente em função de um ou mais fatores do processo.

Para cada variável, os modelos quadráticos foram representados por meio de gráficos de contorno (Mapa de Superfície) que ajudam a analisar dentre os experimentos realizados, os que possuem maiores influências na resposta em questão, permitindo que as variáveis do modelo sejam analisadas duas a duas a fim de produzir gráficos de superfície ou gráficos planos que mostrem a otimização das respostas, sendo a coloração vermelho/vinho indicativa de quais condições foram mais favoráveis.

4.12.7 Discussão dos efeitos sobre as respostas para experimentos com MALTE.

Todos os resultados obtidos foram compilados na **Tabela 27**. Esses dados foram utilizados para prosseguir com as análises utilizando Anova, Pareto e MSR conforme descrito a seguir.

Tabela 27: Valores das respostas obtidas após realização dos experimentos com Malte.

RESPOSTAS MALTE					
Massa (mg)	% inibição ICER-AChEee	% inibição ICER-AChEhu	#Picos	#Picos 1a metade	#Picos 2a metade
53	80,7	87,1	34	26	8
38	50,4	84,9	14	4	10
92	70,6	84,1	23	5	18
56	60,5	84	68	36	32
111	63,3	83,3	56	37	18
61	84,1	63,5	174	111	63
105	77,7	85	110	59	51
52	59,3	82,4	53	24	29
59	78,1	85,7	99	67	32
63	76,2	88,5	99	67	32
64	77,8	85,5	99	67	32
61	72,1	83,3	99	67	32
59	77,8	85,5	99	67	32

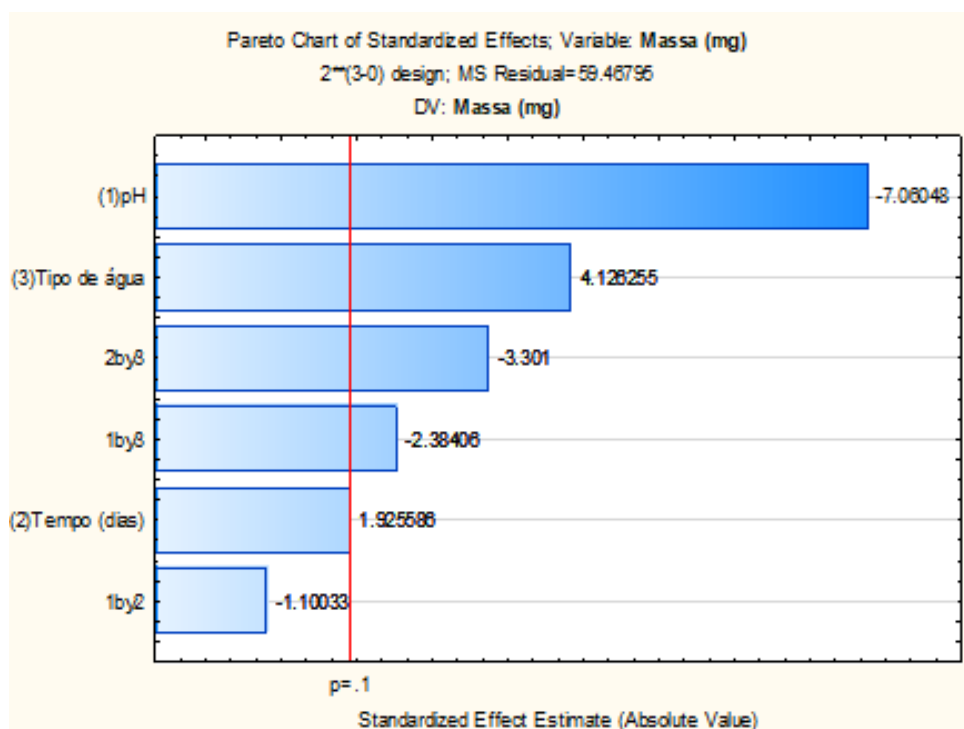
Média Área Picos	Abaixo Média	Acima Média	Média Intens. Picos	Abaixo Média	Acima Média
38,18	28	6	38,4	30	4
34,3	7	7	31,5	11	3
35,9	14	9	34,1	20	3
45	63	5	36,6	65	3
38,13	52	4	38,9	52	4
44,8	164	10	45,2	160	14
45,1	99	11	46,2	98	12
29,1	51	2	42	48	5
39,1	95	4	40	93	6
39,1	95	4	40	93	6
39,1	95	4	40	93	6
39,1	95	4	40	93	6
39,1	95	4	40	93	6
39,1	95	4	40	93	6

Fonte: Elaboração própria

4.12.7.1 Efeito na Resposta Massa

A significância dos efeitos das variáveis e das possíveis interações entre elas foi checada pela aplicação da análise de variância (ANOVA) e com base nos gráficos de Pareto (**Figura 115**) que mostra as contribuições dos efeitos para uma dada resposta, ou seja, quanto maior as barras do gráfico, maior a contribuição da variável em questão.

Figura 115: Gráfico de Pareto para a resposta Massa, mostrando as variáveis da regressão em ordem de importância para o modelo.



Fonte: Elaboração própria

De acordo com o Diagrama de Pareto foi possível observar que quase todos os efeitos apresentaram influência na resposta para o fator Massa, apresentando valores de significância acima de 90% ($p=1$), sendo a variável Var1 a mais expressiva, seguida da Var3. Esses dados evidenciam que o pH e a água são fatores determinantes para a melhora da produção de extrato.

Já a variável independente Var2 e a de interação Var12 não apresentaram influências significativas para este estudo.

Em seguida os efeitos foram avaliados utilizando análise de variância (ANOVA) para que fosse possível quantificar a parcela da variabilidade total associada a cada fator e à interação entre eles.

O gráfico abaixo mostra os resultados da análise estatística para a resposta em questão.

ANOVA; Var.: Massa (mg) ; R-sqr=.93642; Adj.:.87285 (Malte) 2**(3-0) design; MS Residual=59.46795 DV: Massa (mg)					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH	2964.500	1	2964.500	49.85038	0.000404
(2)Tempo (dias)	220.500	1	220.500	3.70788	0.102469
(3)Tipo de água	1012.500	1	1012.500	17.02598	0.006173
1 by 2	72.000	1	72.000	1.21074	0.313362
1 by 3	338.000	1	338.000	5.68373	0.054466
2 by 3	648.000	1	648.000	10.89663	0.016387
Error	356.808	6	59.468		
Total SS	5612.308	12			

A análise de variância (ANOVA) apresenta o valor calculado de F, que verifica a adequabilidade do modelo, sendo o maior valor encontrado de 49,85 para a Var1, para um intervalo de confiança de 90%. Isso mostra que o modelo é estatisticamente significativo e que as repostas obtidas para essa variável são confiáveis.

O coeficiente de determinação (R²) da resposta quantidade de extrato bruto (Massa) evidencia que 93,64% dos dados foram representados pela regressão acima e apenas 6,36% (erro) não poderão ser explicados pelo modelo. Destaca-se que ao selecionarmos menos variáveis, sempre há perda no valor de R². Entretanto esse coeficiente não foi muito baixo, mostrando ser um bom modelo de regressão para os dados.

Os mapas de superfície de resposta mostram a influência das variáveis no aumento da quantidade de extrato bruto produzido quando os níveis são alternados de -1 para +1.

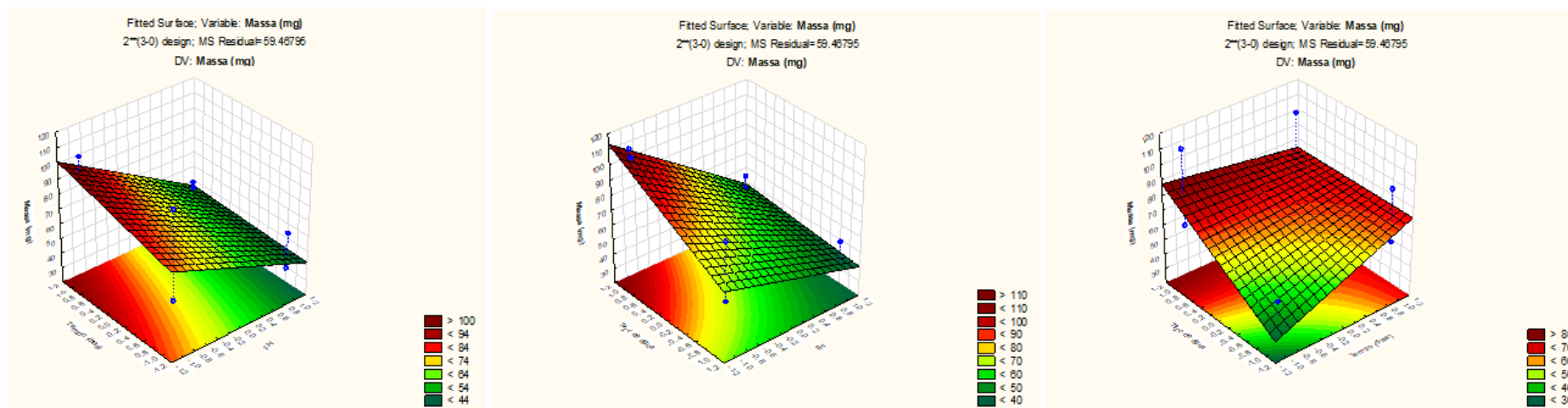
A **Figura 116 A** mostra a relação entre as variáveis independentes Var1 e Var2 (pH inicial do meio e tempo de cultivo), indicando aumento na quantidade de extrato para o meio com pH 6,5 e 32 dias de cultivo. A **Figura 116B** mostra a relação entre as variáveis Var1 e Var3 (pH inicial do meio e tipo de água), indicando maior quantidade para o meio com pH 6,5 e água do Mar. A **Figura 116C** mostra a relação entre as variáveis Var2 e Var3 (tempo de cultivo e tipo de água), indicando maior quantidade para o meio com 20 dias de cultivo utilizando água do Mar.

Após análise desses dados foi possível confirmar que o tempo de cultivo não apresentou influência significativa e que as variáveis pH e água consistiram os principais responsáveis pelo aumento da quantidade de extrato, sendo o pH 6,5 o melhor valor para essa resposta juntamente com o uso de água do Mar.

Todos os experimentos realizados foram analisados conforme descrito acima e resumidos na **Figura 117**, para facilitar a observação de todos os dados, simultaneamente.

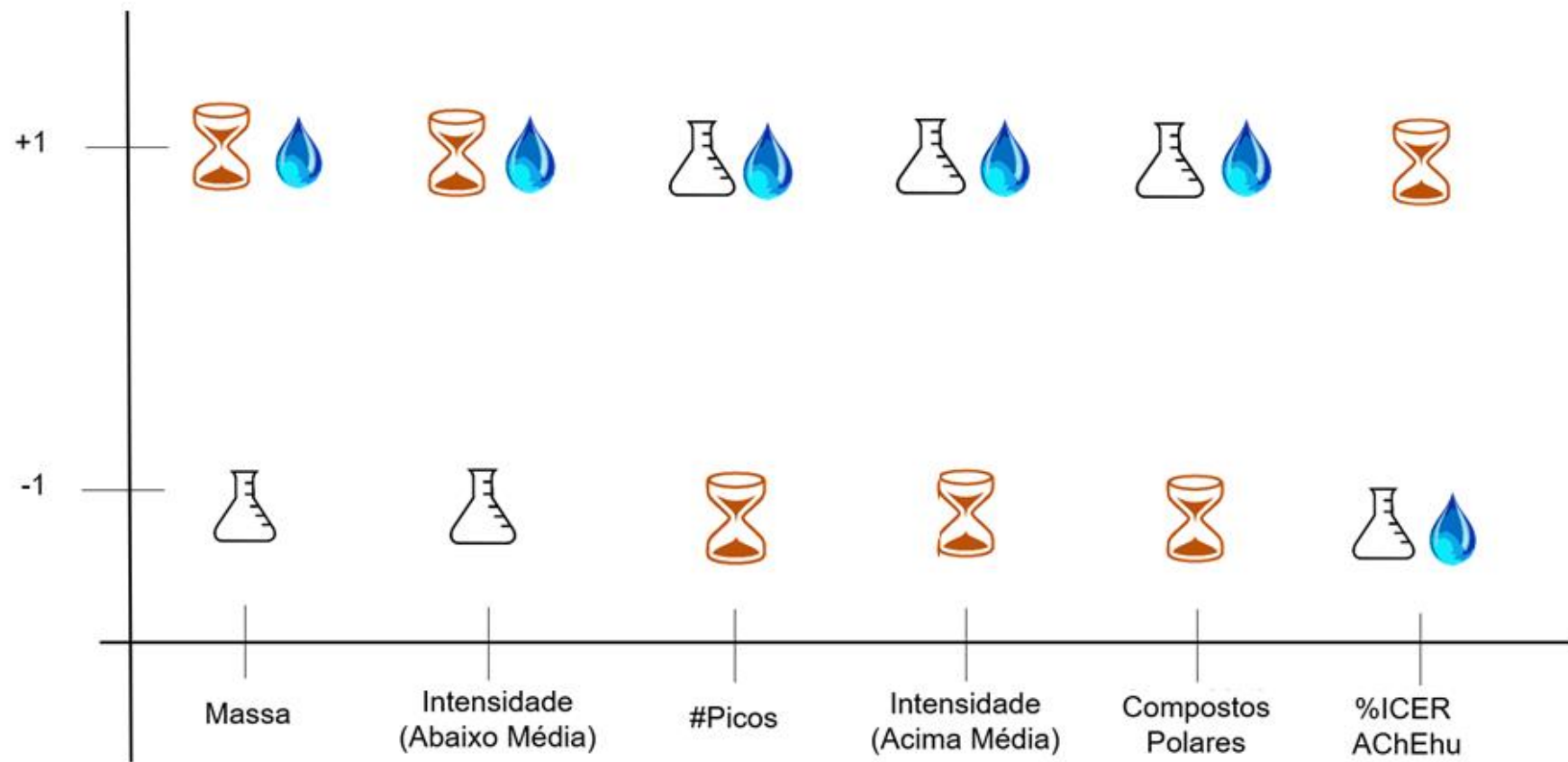
Os gráficos de Pareto, ANOVA e MSRE dos demais experimentos com Malte encontram-se no ANEXO I.

Figura 116: Superfície de resposta e gráfico plano para a resposta Massa (mg) em relação às variáveis pH, tempo de cultivo e tipo de água utilizadas neste estudo.




Fonte: Elaboração própria

Figura 117: Resumo dos resultados obtidos nos experimentos com Malte.



Fonte: Elaboração própria

 Tempo  pH  Água

4.12.7.2 Interpretação dos resultados obtidos em Malte:

Ao analisarmos a **Figura 117** observamos que a variável água é o fator determinante para melhora do cultivo do endófito.

Verificamos que os experimentos realizados com água do mar, pH 8,5 e 20 dias de cultivo são responsáveis por maior quantidade de compostos produzidos (como pode evidenciado no gráfico na resposta #picos), sendo que a maioria deles são compostos majoritários no extrato (resposta) e de caráter apolar (resposta).

Quando diminuímos o tempo de cultivo e aumentamos o pH do meio, favorecemos a produção dos compostos minoritários. Por outro lado, ao utilizarmos esse sistema com água ultrapura, foi observado aumento na inibição da AChEee. Este fato pode estar associado a maior produção de compostos polares já que estes são produzidos em maior quantidade devido a influência da variável água. A figura 117 mostrou também que água do mar favorece a produção de compostos apolares, sugerindo que água ultrapura favoreça a produção de metabólitos de maior polaridade e, como consequência, aumenta a atividade biológica avaliada. Vale ressaltar que estas considerações representam apenas uma hipótese já que o modelo não se mostrou satisfatório para permitir a análise de seu mapa de superfície.

4.12.8 Discussão dos efeitos sobre as respostas para experimentos com CZAPEK

Todos os resultados obtidos foram compilados na **Tabela 28**. Esses dados foram utilizados para prosseguir com as análises utilizando Anova, Pareto e MSR conforme descrito a seguir.

Tabela 28: Valores das respostas obtidas após realização dos experimentos com Czapek.

RESPOSTAS CZAPEK					
Massa (mg)	% inibição ICER-AChEee	% inibição ICER-AChEhu	#Picos	#Picos 1a metade	#Picos 2a metade
153	58,4	49,6	141	88	53
100	71,1	82,8	28	48	14
232	60,4	39,9	93	48	45
205	81,2	82,9	19	48	11
142	72,8	84,2	44	25	19
36	65,8	81,3	59	48	27
126	71,6	85,5	47	48	11
65	63,4	80,7	227	48	87
53	74,1	85,5	149	48	63
57	77,4	86,1	149	48	63
56	75,2	87,3	149	48	63
61	74,4	84,7	149	48	63
52	75,5	85,9	149	48	63

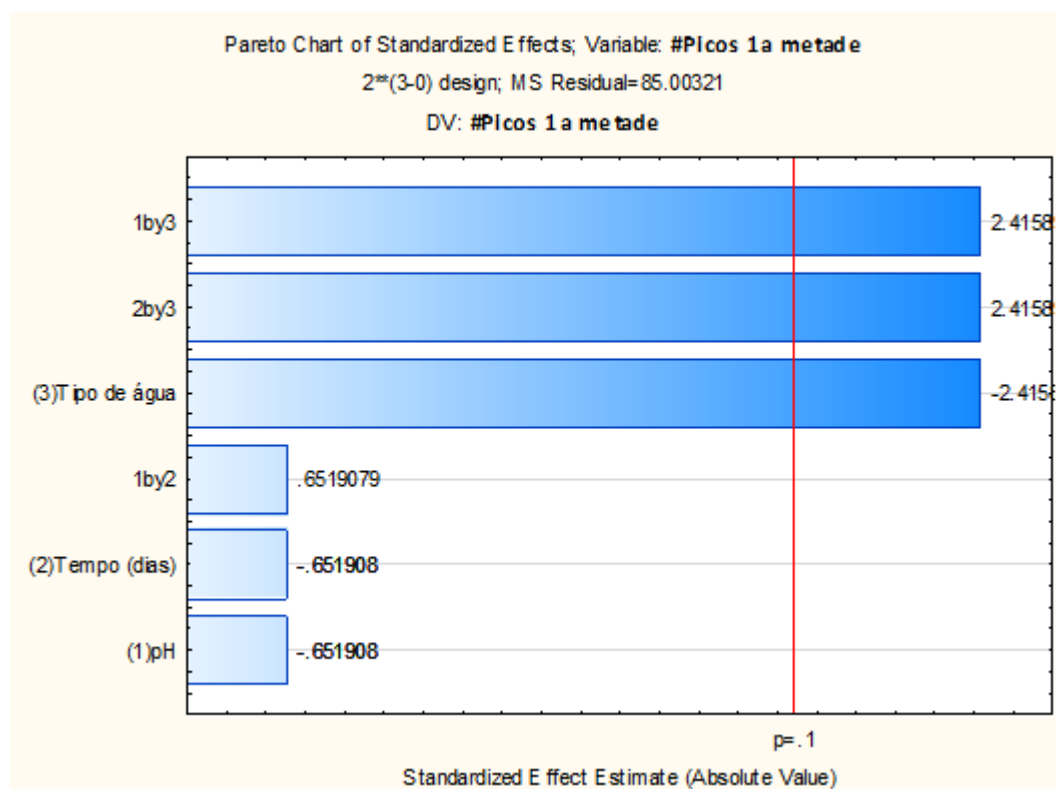
Média Área Picos	Abaixo Média	Acima Média	Média Intens. Picos	Abaixo Média	Acima Média
34,3	136	5	35,2	136	5
39,6	19	9	45,2	22	6
33,8	89	4	39,2	88	5
42,8	13	6	42,4	16	3
42,96	37	7	40,3	38	6
45,7	43	16	48,1	50	9
48,2	40	7	43,4	40	7
47,8	206	21	47,2	206	20
39,4	140	9	36,9	142	7
39,4	140	9	36,9	142	7
39,4	140	9	36,9	142	7
39,4	140	9	36,9	142	7
39,4	140	9	36,9	142	7

Fonte: Elaboração própria

4.12.8.1 Efeito na Resposta Picos 1ª metade (Polares)

A significância dos efeitos das variáveis e das possíveis interações entre elas foi checada pela aplicação da análise de variância (ANOVA) e com base nos gráficos de Pareto (**Figura 118**) que mostram as contribuições dos efeitos para uma dada resposta, ou seja, quanto maior as barras do gráfico, maior a contribuição da variável em questão.

Figura 118: Gráfico de Pareto para a resposta Compostos polares, mostrando as variáveis da regressão em ordem de importância para o modelo.



Fonte: Elaboração própria

De acordo com o Diagrama de Pareto foi possível observar que quase todos os efeitos apresentaram influência na resposta, apresentando valores de significância acima de 90% ($p=1$), sendo a variável Var3 a que apresentou efeito mais expressivo, tanto na forma independente Var3 quanto nas de interação Var13 e Var23. Por outro lado, a Var1 não apresentou influência significativa para este estudo.

Em seguida os efeitos foram avaliados utilizando análise de variância ANOVA para permitir quantificar a parcela da variabilidade total que é devida a cada fator e à interação entre eles.

O gráfico abaixo mostra os resultados da análise estatística para a resposta em questão.

ANOVA; Var.: #Picos 1a metade ; R-sqr=.75791; Adj.:.51583 (CZAPECK 2**(3-0) design; MS Residual=85.00321 DV: #Picos 1a metade					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH	36.125	1	36.1250	0.424984	0.538616
(2)Tempo (dias)	36.125	1	36.1250	0.424984	0.538616
(3)Tipo de água	496.125	1	496.1250	5.836545	0.052154
1 by 2	36.125	1	36.1250	0.424984	0.538616
1 by 3	496.125	1	496.1250	5.836545	0.052154
2 by 3	496.125	1	496.1250	5.836545	0.052154
Error	510.019	6	85.0032		
Total SS	2106.769	12			

A análise de variância (ANOVA) apresenta o valor calculado de F, que verifica a adequabilidade do modelo, sendo o maior valor encontrado de 5,836 para a variável independente Var3 e suas interações, para um intervalo de confiança de 90%. Isso mostra que modelo é estatisticamente significativo e que as repostas obtidas para as variáveis foram confiáveis.

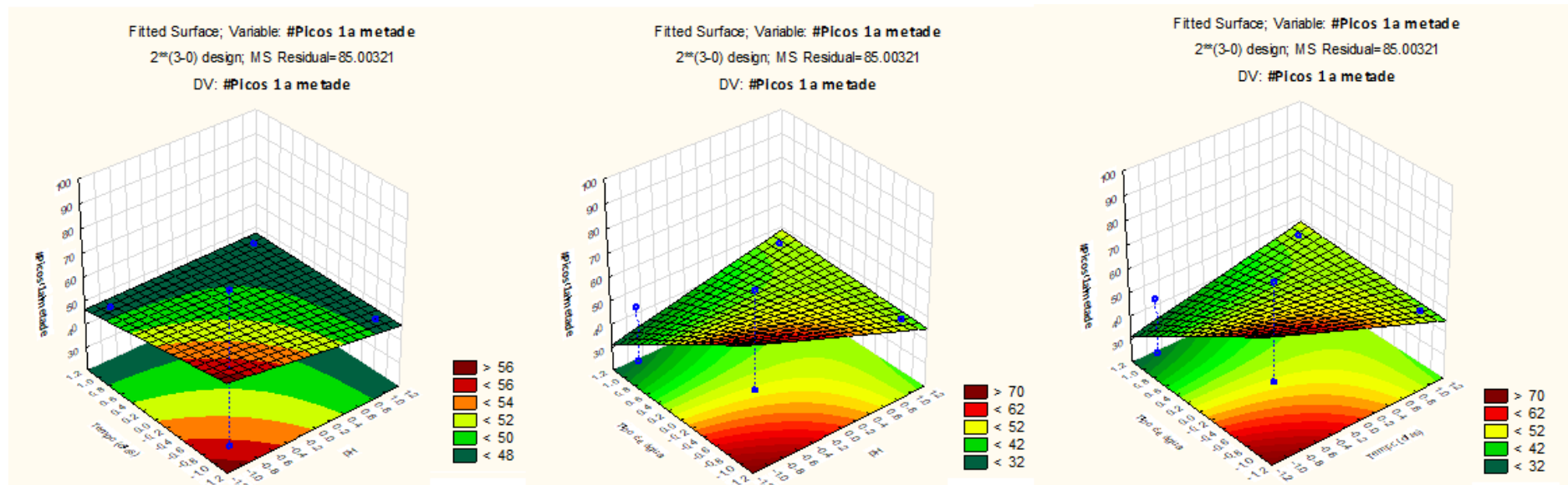
O coeficiente de determinação (R²) da resposta número de picos na primeira metade do cromatograma (Polares) evidencia que 75,79% dos dados foram representados pela regressão acima.

Os mapas de superfície de resposta mostram a influência das variáveis no aumento da produção de compostos polares quando os níveis são alternados de -1 para +1.

A **Figura 119A** mostra a relação entre as variáveis independentes Var1 e Var2 (pH inicial do meio e tempo de cultivo), indicando aumento na quantidade de extrato para o meio com pH 6,5 e 20 dias de cultivo. A **Figura 119B** mostra a relação entre as variáveis Var1 e Var3 (pH inicial do meio e tipo de água), indicando maior quantidade para o meio com pH 6,5 e água ultrapura. A **Figura 119C** mostra a relação entre as variáveis Var2 e Var3 (tempo de cultivo e tipo de água), indicando maior quantidade para o meio com 20 dias de cultivo utilizando água ultrapura.

Após análise desses dados verificamos que a produção de compostos com alta polaridade foi favorecida pelo uso de água ultrapura, com pH 6,5 e 20 dias de cultivo.

Figura 119: Superfície de resposta e gráfico plano para a resposta #Picos 1ª Metade (Polares) em relação às variáveis em estudo.

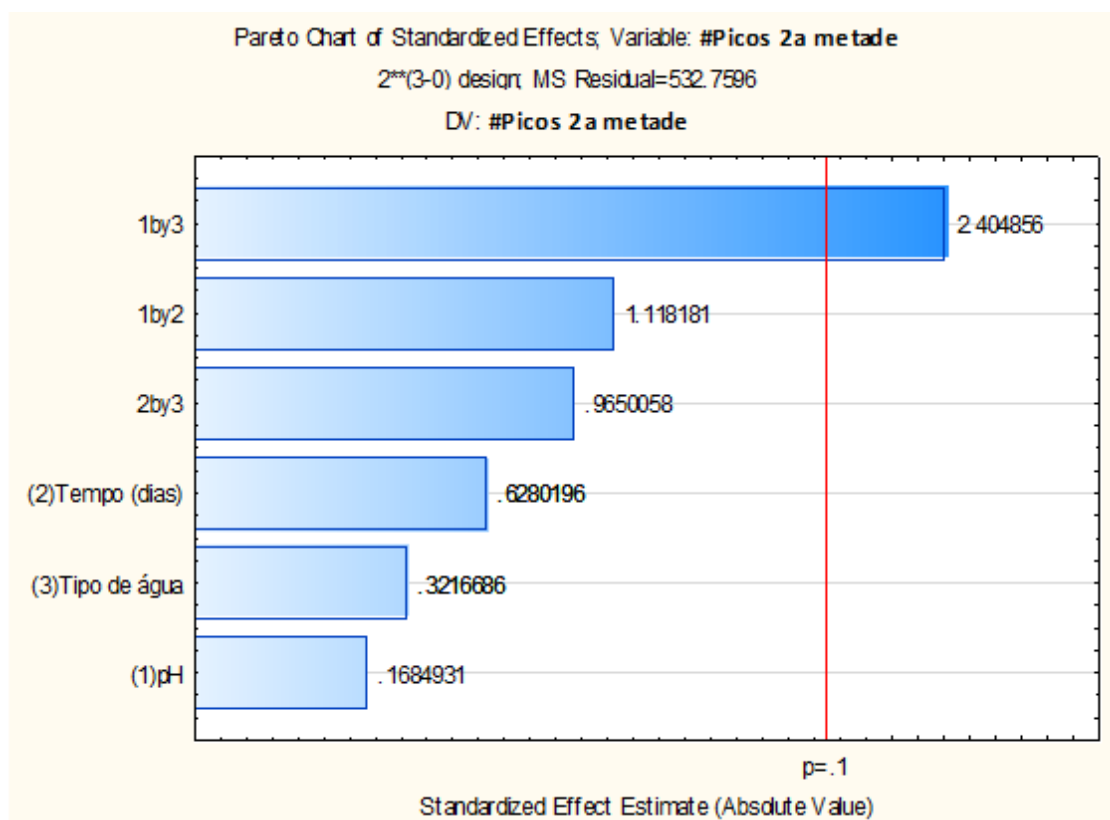


Fonte: Elaboração própria

4.12.8.2 Efeito na Resposta Picos 2ª metade (Apolares)

A significância dos efeitos das variáveis e das possíveis interações entre elas foi checada pela aplicação da análise de variância (ANOVA) e com base nos gráficos de Pareto (**Figura 120**).

Figura 120: Gráfico de Pareto para a resposta compostos apolares, mostrando as variáveis da regressão em ordem de importância para o modelo.



Fonte: Elaboração própria

Através da análise gráfica das contribuições foi possível observar que a variável de interação Var13 apresentou efeito mais expressivo. Por outro lado, as variáveis independentes não apresentaram influência significativa para este estudo.

Em seguida os efeitos foram avaliados utilizando ANOVA para permitir quantificar a parcela da variabilidade total devida a cada fator e à interação entre eles.

O gráfico abaixo mostra os resultados da análise estatística para a resposta em questão.

ANOVA; Var.: #Picos 2a metade ; R-sqr=.58595; Adj.:.17191 (CZAPECK 2**(3-0) design; MS Residual=532.7596 DV: #Picos 2a metade					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH	15.125	1	15.125	0.028390	0.871732
(2)Tempo (dias)	210.125	1	210.125	0.394409	0.553128
(3)Tipo de água	55.125	1	55.125	0.103471	0.758615
1 by 2	666.125	1	666.125	1.250329	0.306250
1 by 3	3081.125	1	3081.125	5.783331	0.052944
2 by 3	496.125	1	496.125	0.931236	0.371809
Error	3196.558	6	532.760		
Total SS	7720.308	12			

A análise de variância (ANOVA) apresentou o valor calculado de F, que verifica a adequabilidade do modelo, sendo o maior valor encontrado de 5,78 para a variável de interação Var13, para um intervalo de confiança de 90%. Isso mostra que modelo é estatisticamente significativo e que as respostas obtidas para as variáveis foram confiáveis.

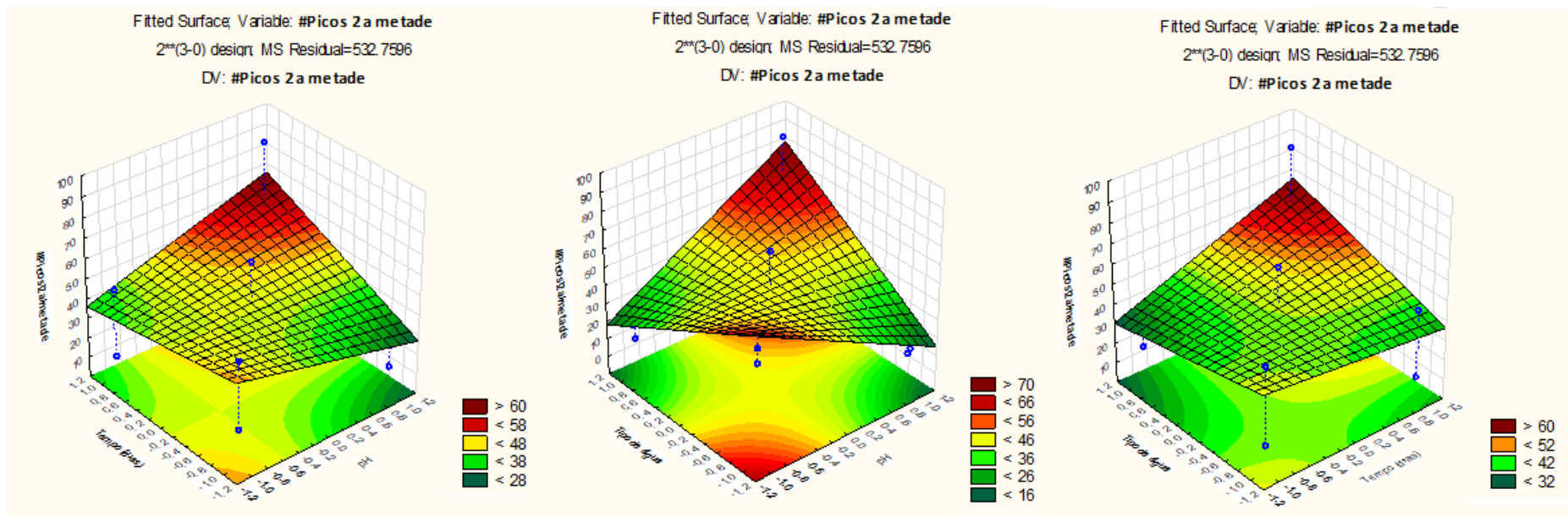
O coeficiente de determinação (R²) da resposta número de picos na segunda metade do cromatograma (Apolares) evidencia que 58,59% dos dados foram representados pela regressão acima.

Os mapas de superfície de resposta mostram a influência das variáveis no aumento da produção de compostos apolares quando os níveis são alternados de -1 para +1.

A **Figura 121A** mostra a relação entre as variáveis independentes Var1 e Var2 (pH inicial do meio e tempo de cultivo), indicando aumento na quantidade de extrato para o meio com pH 8,5 e 32 dias de cultivo. A **Figura 121B** mostra a relação entre as variáveis Var1 e Var3 (pH inicial do meio e tipo de água), indicando maior quantidade para o meio com pH 8,5 e água do mar. A **Figura 121C** mostra a relação entre as variáveis Var2 e Var3 (tempo de cultivo e tipo de água), indicando maior quantidade para o meio com 32 dias de cultivo utilizando água do mar.

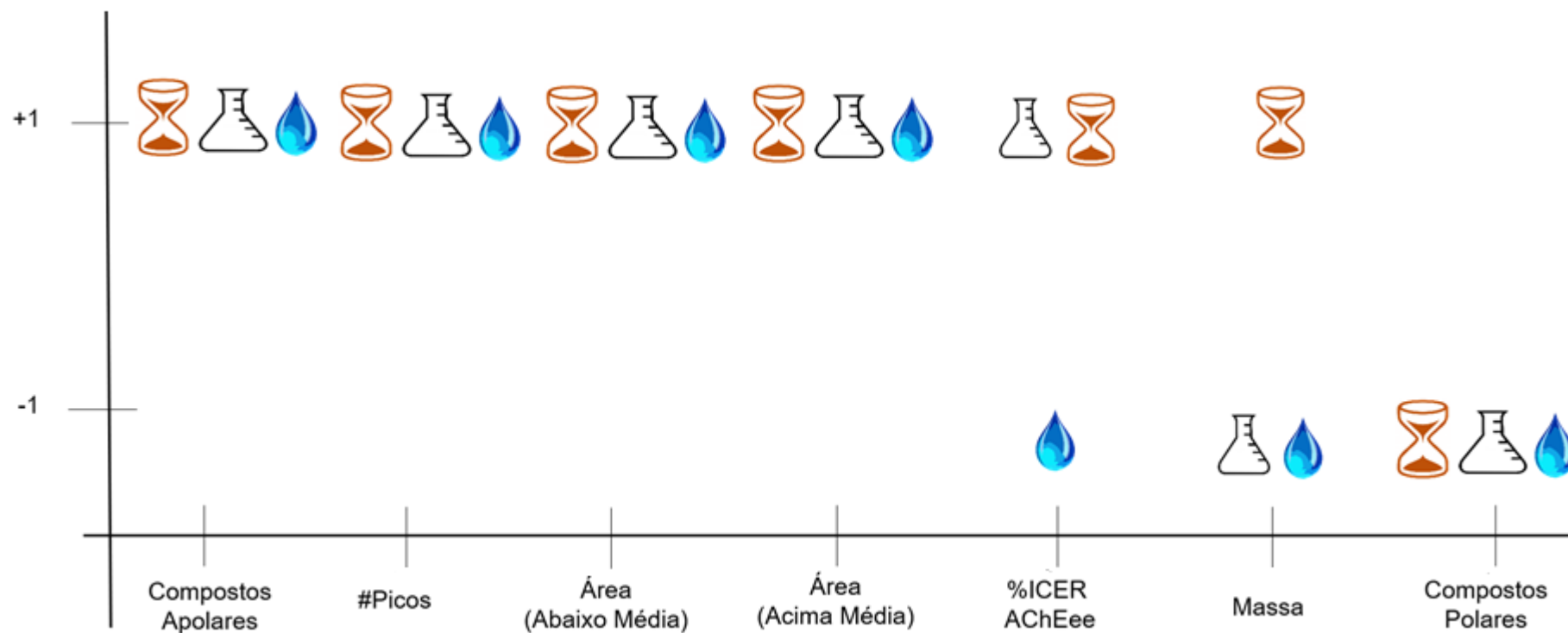
Após análise desses dados verificamos que a produção de compostos com baixa polaridade foram favorecidas pelo uso de água do mar, com pH 8,5 e 32 dias de cultivo. Todos os experimentos realizados foram analisados conforme descrito acima e resumidos na **Figura 122**, para facilitar a observação de todos os dados simultaneamente. Os gráficos de Pareto, ANOVA e MSRE dos demais experimentos com Malte encontram-se no ANEXO II.

Figura 121: Superfície de resposta e gráfico plano para a resposta #Picos 2ª Metade (Apolares) em relação às variáveis em estudo.



Fonte: Elaboração própria

Figura 122: Resumo dos resultados obtidos nos experimentos com Czapek.



Fonte: Elaboração própria

4.12.8.3 Interpretação dos resultados gerais:

Ao analisarmos a **Figura 122** observamos que a variável tempo representou o fator determinante para melhora do cultivo do endófito.

Verificamos que os experimentos realizados com 32 dias de cultivo seguido de pH 8,5 e água do mar foram responsáveis por maior quantidade de compostos produzidos, aumentando a produção dos compostos majoritários e dos minoritários, sendo a maioria de caráter apolar.

Por outro lado, o uso de água ultrapura provocou aumento na produção de compostos polares e aumento na inibição da AChEe.

4.13 Análise por CG-EM de extratos oriundos do planejamento

O extrato Czapek Mar e Malte Torneira foram derivatizados e analisados por CG-EM a fim de identificarmos seus constituintes químicos por desreplicação.

O perfil do extrato Czapek Mar por CG-EM apresentou uma grande variedade de picos, bem distribuído por todo cromatograma (**Figura 123**), sendo possível, de acordo a similaridade e IR (**Tabela 29**), a identificação de 4 compostos (**Figura 124**).

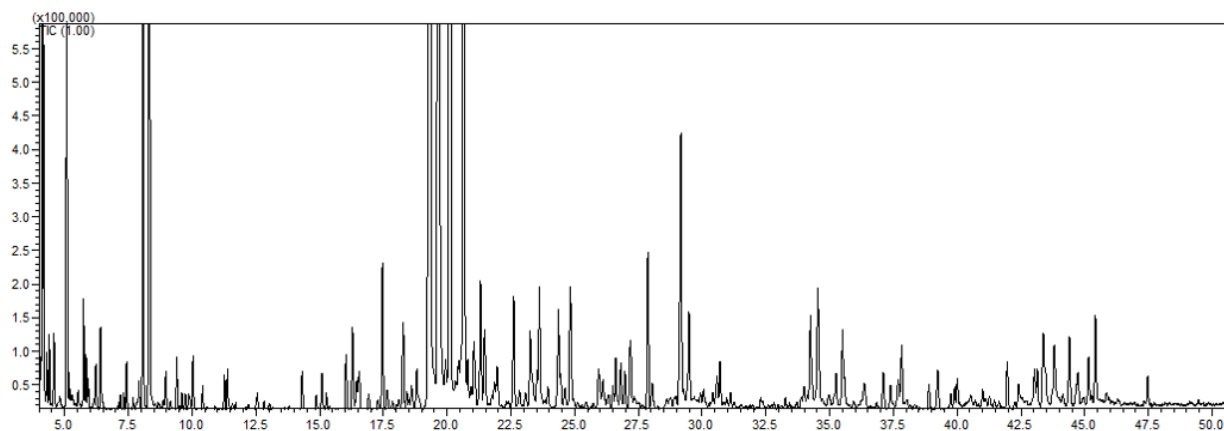
Grande parte destas moléculas apresentam aplicações promissoras, como na indústria alimentícia, de cosméticos, como aditivos, entre outras, demonstrando a importância em prosseguir com o isolamento de metabólitos para busca de novos compostos e de novas aplicações.

Já o extrato Malte Torneira apresentou uma grande variedade de picos, concentrados entre 1 e 30 minutos (**Figura 125**), sendo possível, de acordo a similaridade e IR (**Tabela 30**), a identificação de 16 compostos (**Figura 126**).

Grande parte destas substâncias apresentam atividades biológicas promissoras, como nematicida, citotóxica, antifúngica, antimicrobiana, anti-séptica, pesticida, dentre outras, demonstrando a importância das atividades de bioprospecção e em prosseguir com o isolamento de metabólitos para busca de novos compostos e de novas aplicações.

4.13.1 Identificação de metabólitos por Desreplcação utilizando CG-EM

Figura 123: Perfil do extrato Czapek Mar em CG-EM.

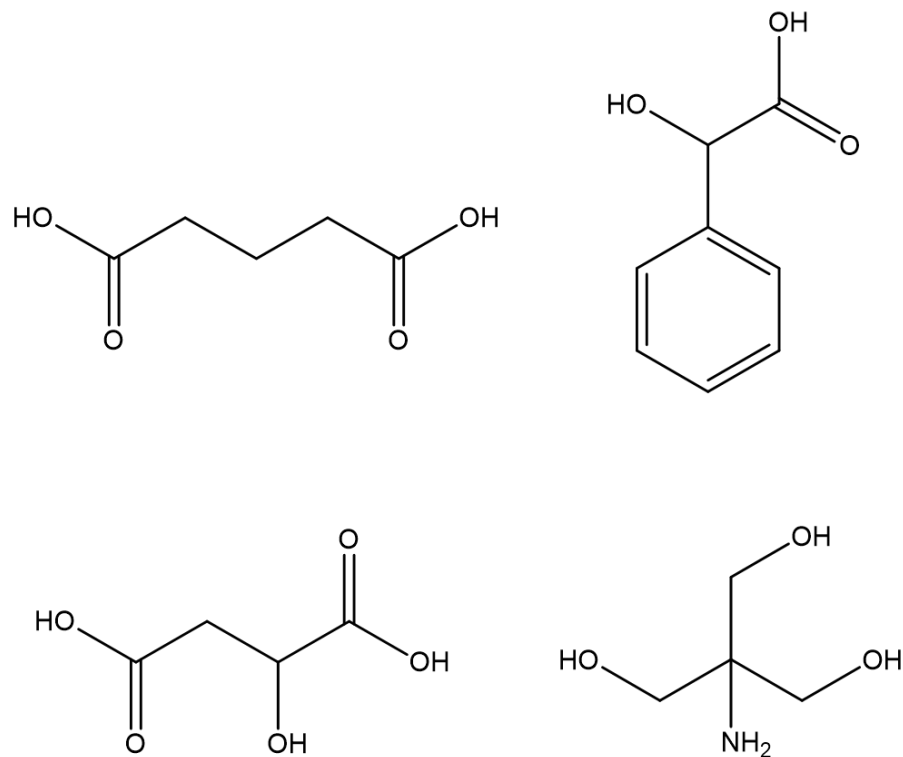


Fonte: Elaboração própria

Tabela 29: Compostos propostos pelo GC-MS Data Analysis a partir da análise por GC-MS do extrato Czapek Mar do fungo *A. stygium*.

#Pico	Nome	Tempos de retenção			Similaridade
		Tr	IR teorico	IR	
9	Pentanedioic acid, 2TMS derivative	5,53	1407	1403	80
13	Mandelic acid, 2TMS derivative	6,23	1468	1438	83
15	Malic acid, 3TMS derivative	7,43		1498	94
17	Tromethamine, 4TMS derivative	8,08		1524	95

Figura 124: Compostos identificados no extrato Czapek Mar por desreplicação.



Fonte: Elaboração própria

4.13.2 Identificação de metabólitos por Desreplicação utilizando CG-EM

Figura 125: Perfil do extrato Malte torneira em CG-EM

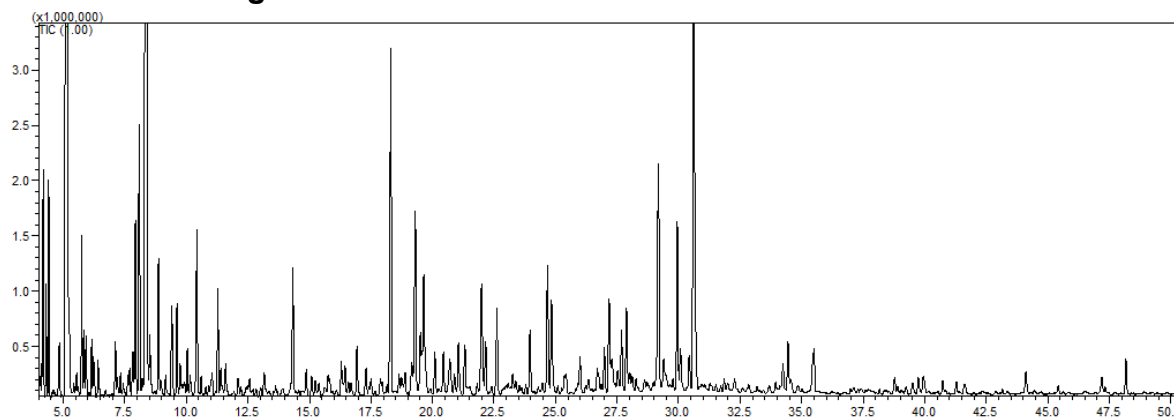
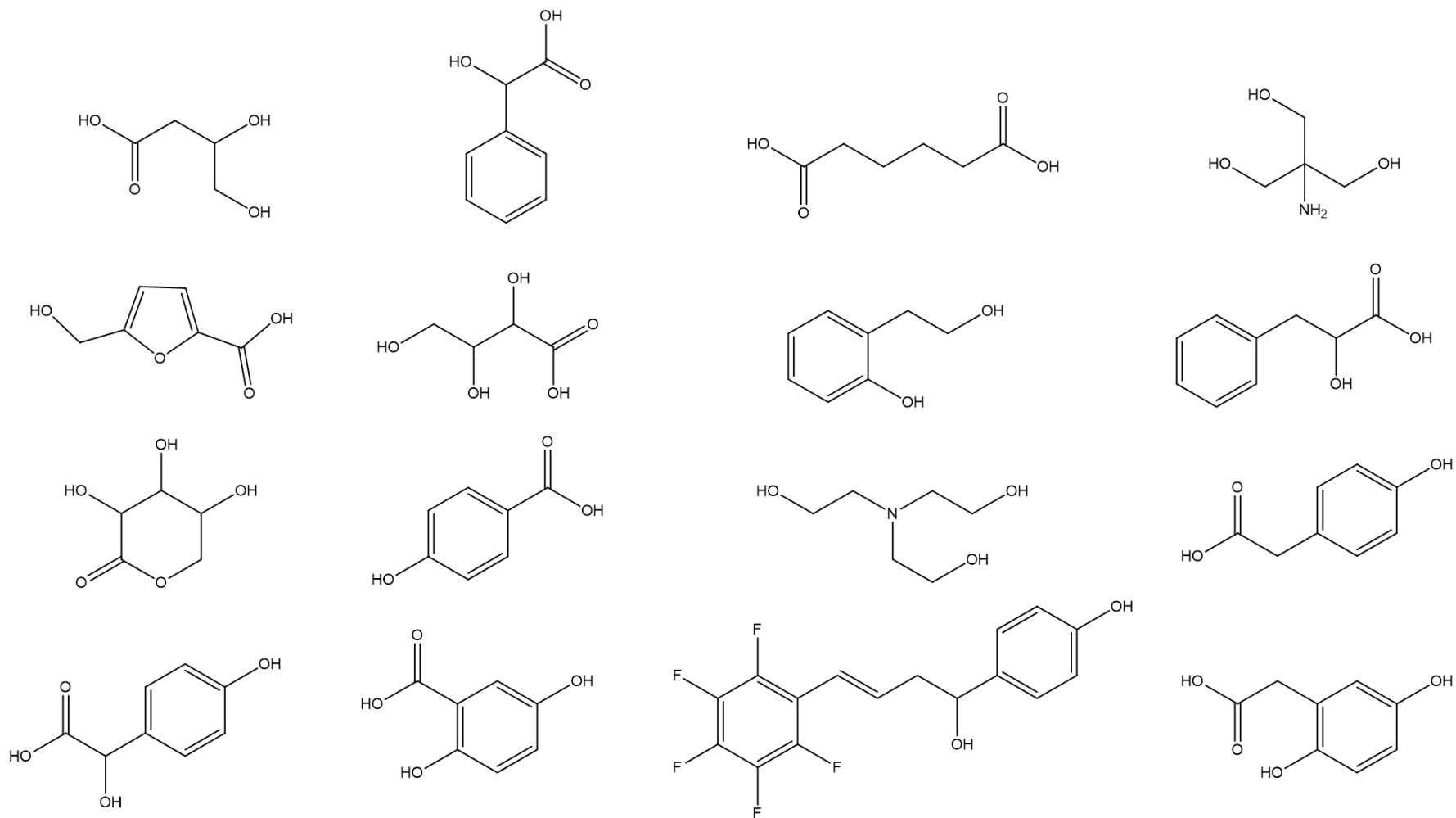


Tabela 30: Compostos propostos pelo GC-MS Data Analysis para extrato Malte torneira.

#Pico	Nome	Tempos de retenção			Similaridade	Referência
		Tr	IR teórico	IR		
17	Butanoic acid, 3,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	6,16	1439	1435	92	Kimura, et al., 1999
18	Mandelic acid, 2TMS derivative	6,23	1468.1	1438	85	Tret'yakov, 2008
27	Hexanedioic acid, 2TMS derivative	7,69	1510	1509	88	Ohie, et al., 2000
30	Tromethamine, 4TMS derivative	8,08		1524	94	
36	5-Hydroxymethyl-2-furoic acid, 2TMS derivative	8,87	1560	1556	86	Lefevere, et al., 1989
37	2,3,4-Trihydroxybutyric acid tetrakis(trimethylsilyl) deriv	8,98		1561	90	
39	2-Hydroxyphenethyl alcohol, 2TMS derivative	9,41		1578	83	
43	3-Phenyllactic acid, 2TMS derivative	9,88	1600	1597	89	Kimura, et al., 1999
46	Xylonic acid, 2,3,4-tris-O-(trimethylsilyl)-, delta.-lactone	10,16		1607	82	
50	4-Hydroxybenzoic acid, 2TMS derivative	10,92	1637	1634	89	Kimura, et al., 1999
52	Triethanolamine, 3TMS derivative	11,05		1638	92	
53	4-Hydroxybenzeneacetic acid, 2TMS derivative	11,28	1644	1646	95	Isidorov and Vinogorova, 2003
72	4-Hydroxymandelic acid, 3TMS derivative	14,23	1802	1747	84	Lee, et al., 2002
78	2,5-Dihydroxybenzoic acid, 3TMS derivative	15,61	1798	1792	87	Jaroszynska and Ligor, 2005
80	Benzeneethanamine, N-[(pentafluorophenyl)methylene]-, beta.	15,83		1800	80	
88	Homogentisic acid, 3TMS derivative	17,51	1860	1853	90	Jaroszynska and Ligor, 2005

Figura 126: Compostos identificados no extrato Malte Torneira por desreplcação.



Fonte: Elaboração própria

CONCLUSÃO

No estudo químico e biológico dos fungos associados as algas *A. spicifera*, *D. marginata* e *S. vulgare*, demonstrado no **Capítulo 5**, foi possível observar uma variação na produção metabólica de *H. monticulosum*, tanto no perfil químico, quanto nos resultados biológicos, dependendo do hospedeiro a que estava associado. Os extratos e frações se mostraram extremamente ativos nos ensaios realizados. Nos dois cultivos houve a produção de dois compostos majoritários, sendo observado a presença do composto Diidroesporotriolídeo em ambos, composto amplamente conhecido para esse gênero, como um marcador taxonomico.

Esses dados confirmam que a produção metabólica de um micro-organismo é diretamente influenciada por estes e pelos nutrientes fornecidos, fazendo com que o fungo produza ou não determinados metabólitos, justificando a variação nos dados obtidos.

A triagem da atividade de bioafinidade realizada no **Capítulo 6** mostrou que os extratos AS 07 MQ e DM 02 MQ tem ótima ação na inibição do crescimento bacteriano, enquanto DM 02 MAR e DM 03 MAR inibem a atividade de protease. Utilizando uma abordagem inovadora, obtivemos ótimos resultados iniciais no bioensaio de protease de veneno de serpente, durante o qual usamos venenos de cobra como um alvo para avaliar as propriedades anti-veneno dos extratos brutos analisados. Esta é a primeira vez que esta atividade é relacionada à *Psychotria carthagenensis*. Outros estudos envolvendo análises espectrais de HSMS e correlação com a bioafinidade do cromatograma estão em andamento para todos os extratos promissores com vistas a identificar os compostos ativos.

Através da elaboração de um Planejamento fatorial, discutido no **Capítulo 7**, foi possível analisar como alguns parâmetros (pH, Tempo de cultivo, Tipo de água) afetam o cultivo e a produção metabólica do endófito *A. stygium* isolado da alga vermelha *A. spicifera*.

Embora um número reduzido experimentos não permita analisar de maneira completa uma região significativa no espaço das variáveis, foi possível observar tendências importantes com relação aos resultados de rendimento e de variabilidade química dos extratos produzidos, importantes para a realização de estudos posteriores.

Considerando o meio de cultivo Malte, foi possível verificar que a variável água foi o fator determinante para melhora dos resultados com o fungo *A. stygium*.

O uso de água do mar forneceu boas respostas para a maioria dos experimentos. Adicionalmente, o uso de pH 8,5 e 20 dias de cultivo permitiu obter uma variabilidade estrutural maior dos compostos produzidos, sendo a maioria deles majoritários no extrato e apresentando caráter de baixa polaridade. O uso de pH levemente ácido induziu uma maior quantidade em massa de extrato.

Por outro lado, o uso de água ultrapura favoreceu a produção de compostos de polaridade mais alta, eventualmente associados ao aumento da atividade biológica frente a inibição de acetilcolinesterase.

Para o meio de cultivo Czapek foi possível verificar que a variável tempo de cultivo foi o fator determinante para melhora do estudo com o fungo *A. stygium*.

O uso de tempo maior de cultivo, no caso 32 dias, forneceu boas respostas para a maioria dos experimentos realizados, enquanto o tipo de água utilizado apresentou menor influência para este meio de cultivo.

Ao utilizarmos experimentos com todos os níveis altos, ou seja, água do mar, juntamente com pH 8,5 e 32 dias de cultivo, foi possível obter uma quantidade maior de compostos, distribuídos entre majoritários e minoritários no extrato, sendo a maioria de caráter de baixa polaridade.

Por outro lado, quando realizamos experimentos com todos os níveis baixos, ou seja, água ultrapura, pH 6,5 e 20 dias de cultivo, foi observado o favorecimento da produção de compostos mais polares, que podem estar associados a uma maior atividade biológica frente a inibição de acetilcolinesterase.

Os resultados encontrados neste estudo confirmaram a expectativa de que as condições de cultivo podem modificar, aumentar ou direcionar a produção de metabólitos secundários, sendo possível planejar e direcionar os experimentos de acordo com as respostas desejadas.

Vale ressaltar ainda que cada linhagem de fungo se comporta de maneira diferente frente a essas mudanças, e que existem diversas outras variáveis a serem testadas para aperfeiçoamento das respostas relativas à produção metabólica desejada.

Vale lembrar, também, que o cultivo de micro-organismo em laboratório requer o cuidado de sempre se procurar simular e manter condições similares de sobrevivência que o micro-organismo tem em seu habitat natural.

Com isso concluímos que ainda que se tenha conseguido melhorar as condições de crescimento e produção de metabólitos secundários pela linhagem do fungo *A. stygium*, não se avaliou neste trabalho possíveis interações simbióticas ou competitivas comuns no habitat natural entre este fungo e outros que foram isolados de *A. spicifera*.

Portanto podemos afirmar que o planejamento fatorial não é conclusivo para a determinação de valores ótimos em uma única etapa, porém este procedimento indica satisfatoriamente o caminho metodológico a ser seguido para que se possa atingir o objetivo proposto, por exemplo, no controle da produção metabólica da linhagem fúngica em estudo.

De acordo com os resultados obtidos, reforçamos a necessidade de um estudo prévio para melhora ou otimização das condições de cultivo de fungos na busca por metabólitos secundários bioativos no contexto da pesquisa de bioprospecção, para evitar uma vasta quantidade de experimentos e assim viabilizar diminuição nos custos, privilegiando procedimentos sustentáveis e caracterizando trabalhos mais interligados com os princípios da química verde.

Por fim, os dados obtidos neste trabalho ressaltam a importância da investigação dos organismos marinhos, com destaque para os micro-organismo, uma vez que estes apresentam enorme quimiodiversidade, representando importante fonte de substâncias com potencial terapêutico. Esses estudos fornecem, ainda, informações relevantes para o melhor entendimento das relações simbióticas entre os micro-organismo e seus hospedeiros, tendo em vista que esta é uma pesquisa praticamente inexistente no país.

BIBLIOGRAFIA

ABDELMOHSEN, U. R., et al. Potential of marine natural products against drug-resistant fungal, viral, and parasitic infections. **The lancet Infectious Diseases**, v. 17, p. 30-41, 2017.

ALY, H. A.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 90, p. 1829-1845, 2011.

ANNANG, F., et al. Contribution of natural products to drug discovery in tropical diseases. **Drug Discovery in Infectious Diseases**, (Comprehensive Analysis of Parasite Biology), v. 7, p. 75-104, 2016.

ANTEQUERA, P., et al. **Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología**. V. 90, p. 382-384, 2015.

AZEVEDO, J. L.; et al. Micro-organismo endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: AZEVEDO, J. L.; SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: Ed. UCS, 2003. p. 269-294.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R. E. Planejamento e otimização de experimentos. 2ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1996. 299p.
BERLINCK, RGS, ET AL., Natural products from marine invertebrates and microorganisms in Brazil between 2004 and 2017: still the challenges, more rewards. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, V. 29, P. 998-1031, 2018.

BOTELLA L, DIEZ J.J. Phylogenic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. **Fungal Divers** v. 47, p. 9–18, 2011.

BRANQUINHO, M. R., et al. Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a Vigilância Sanitária. **Vigilância Sanitária em Debate**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 4, p. 4-11, 2014.

BLUNT, et al. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v. 30, p. 237-323, 2012.

BLUNT, et al. REVIEW: Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v. 32, p. 116–211, 2015.

BLUNT, et al. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v. 34, p. 235-294, 2017.

BLUNT, et al. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v. 35, p. 8-53, 2018.

CABRITA, M. T.; et al. Review: Halogenated Compounds from Marine Algae. **Mar. Drugs**, v. 8, p. 2301-2317, 2010.

CAFEU, M., et al. J. Griseofulvin, Diketopiperazines and Cytochalasins from Endophytic Fungi *Colletotrichum crassipes* and *Xylaria* sp., and their Antifungal, Antioxidant and Anticholinesterase Activities. **Braz. Chem. Soc.**, v. 29, p. 1707-1713, 2018.

CHRISTIAN, O. E.; et al. Using jasplakinolide to turn on pathways that enable the isolation of new chaetoglobosins from *Phomopsis asparagi* **Nat. Prod.** v. 68, p. 1592-1597. 2005

CLARK, J. H. Green Chemistry: challenges and opportunities. **Green Chemistry**, v. 1, p. 1-8, 1999.

CORDELL, G. A.; et al. Finding the needle in the haystack. The dereplication of natural product extracts. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, p. 1089–1094, 2009.

COSTA-LOTUFO, et. al. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico e perspectivas. **Química Nova**, v.32, n. 3, p. 703-716, 2009.

CREWS. B.; et al. Variability Analysis of Human Plasma and Cerebral Spinal Fluid Reveals Statistical Significance of Changes in Mass Spectrometry-Based Metabolomics Data. **Anal. Chem.** v. 81, p. 8538-8544, 2009.

CROFT and YARDLEY. Drug sensitivity of *Leishmania* species: some unresolved problems. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 127– 129, 2002.

da SILVA, J. I; et al. AchE-ICER and in vitro Ellman's modified method of simplified analogs 3-O-acetyl-N-benzyl piperidine of Donepezil. **Rev. Virtual Quim.**, v. 7, p. 2334-2346, 2015.

ELLMAN, G. L.; et al. "A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity". **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-90, 1961.
ELSAESSER, B., et al. X-ray structure determination, absolute configuration and biological activity of phomoxanthone A. **Eur. J. Org. Chem.**, v. 21, p. 4563-4570, 2005.

FOLMER et.al. Photosynthetic marine organisms as a source of anticancer compounds. **Phytochemistry Reviews**, v.9, p. 557-579, 2010.

FOURNIER et al., The new genus *Rostrohypoxylon* and two new *Annulohypoxylon* species from Northern Thailand, **Fungal Diversity**, v. 40, p. 23–36, 2010.

GERWICK & MOORE. Review Lessons from the Past and Charting the Future of Marine Natural Products Drug Discovery and Chemical Biology. **Chemistry & Biology**, v. 19, p. 1631, 2012.

GUARDIA, M.; et al. An integrated approach of analytical chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, p. 429-437, 1999.

GOMES, R.R. Filogenia e taxonomia do gênero *Diaporthe* e sua aplicação no controle biológico da mancha preta dos citros. **TESE**. Univ. Fed. Do Paraná, 2012.

GUIRY, M. D. **AlgaeBase**. Galway: National University of Ireland, c1996. Disponível em: <<http://www.algaebase.org>>. Acesso em: 10 out. 2014.

<http://marinepharmacology.midwestern.edu/clinPipeline.htm> (Acesso em Março/2018).

KILDGAARD, S.; et al. Accurate dereplication of bioactive secondary metabolites from marine-derived fungi by UHPLC-DAD-QTOFMS and a MS/HRMS library. **Marine Drugs**, v. 12, p. 3681-3705, 2014.

KIRK, P.F., et al. **Dictionary of the Fungi**, 10th edn. CABI Publishing, Egham, 2008.

KOHLMEYER, J.; KOHLMEYER, E. Marine Mycology. The Higher Fungi. Academic Press, New York, 1979.

KUMAR et al. Microbially induced defense related proteins against postharvest anthracnose infection in mango. **Crop Protection**. V. 23, p. 1061-1067, 2004.

LANDECKER, E. M. **Fundamental of the fungi**. 4th ed. Upper Saddle River: Prentice hall, 1996. 574 p.

LANG, G.; et al. Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1595-1599, 2008.

LEAL, M. C.; et al. Biogeography and biodiscovery hotspots of macroalgal marine natural products. **Journal of Natural Products**, v. 30, p. 1380-1390, 2013.

LEARDI, R. Experimental design in chemistry: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 652, p. 161-172, 2009.

LEE, Y. P.; LEE, I. K. Notes on Galaxaura (Rhodophyta) from Cheju Island, Korea. **Journal of Phycology**, v. 4, p. 1-9, May 1989.

MACIEL, 2018 Photoprotective potential of metabolites isolated from algae-associated fungi *Annulohyphoxylon stygium*. **Journal of Photochemistry & Photobiology**, B: Biology, v. 178, p. 316–322, 2018.

MADIGAN, M. T.; et al. Microbiologia de Brock. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004, p. 624.

MAYER et al. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in Pharmacological Sciences** v. 31, p. 255-265, 2010.

MAHAPATRA et al. Evaluation of in vitro antioxidant potency of exopolysaccharide from endophytic *Fusarium solani* SD5. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 53, p. 62–66, 2013.

MARTINEZ-KLIMOVA. Review Endophytes as sources of antibiotics. **Biochemical Pharmacology**, v. 134, p. 1–17, 2017.

MOLINSKI, T. F. NMR of natural products at the “nanomole-scale”. **Natural Products Reports**, v. 27, p. 321-329, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, vol. 16, pg. 55 - 63, 1983.

MURALI, T. S., et al. Endophytic *Phomopsis* species: host range and implications for diversity estimates. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 673-680, 2006.

MUTHURAMAN, S. M.; et al. In vitro cytotoxicity and molecular docking studies on *Acanthophora spicifera*. **Der Pharma Chemica**, v. 6, p. 411-417, 2014.

NG, J.; et al. Dereplication and De Novo sequencing of nonribosomal peptides. **Nature Methods**, v. 6, p. 596-599, 2009.

OLIVEIRA, A. L. Algas e micro-organismos marinhos como fonte de substâncias bioativas: química e biologia de *Bostrychia radicans* e fungos endofíticos associados. TESE. Univ. de São Paulo, Campus Ribeirão Preto, 2013.

ORTIZ, M. C. **Ensino de Quimiometria**. Anal. Bioanal Chem, Vol 388, 1557-1560, 2007.

PARKER and SETHI. Chagas Disease: Coming to a Place Near You. **Dermatol Clin**, v. 29, p. 53–62, 2011.

PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 864–870, 2004.

PAULA & OLIVEIRA FILHO. Aspectos fenológicos de duas populações de *Sargassum Cymosum* (Phaeophyta-Fucales) do litoral de São Paulo, Brasil. **Bol. Botânico**, Univ. S. Paulo, v.8, p. 21-39, 1980.

PEIXOTO NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Micro-organismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.29, p.62-76, 2002.

PERALTA-ZAMORA, P.; et al. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v.10, n.2, p.106-110, 2005.

PILON, A. C. Estudo de *Jatropha gossypifolia* e *J. multifida* (Euphorbiaceae) aplicando métodos analíticos in silico e de desreplicação, visando a detecção e elucidação in situ dos constituintes micromoleculares com atividades acetilcolinesterásicas e antioxidantes. 2016

PLOUGUERNÉ, E., et al. Antiviral Sulfoquinovosyldiacylglycerols (SQDGs) from the Brazilian Brown Seaweed *Sargassum vulgare*. **Mar. Drugs**, v. 11, p. 4628-4640, 2013.

PHOTITA et al. Morphological and molecular discrimination of *Colletotrichum truncatum* causing anthracnose on lentil in Canada. **Australasian Plant Pathology**, v. 33, p. 559–569, 2004.

PUPO, M. T, et al. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Quim. Nova**, v. 30, p. 1446-1455, 2007.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1996. 724 p.

RODRIGUES, K. F. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. **Mycologia**, v. 86, p. 376–385, 1994.

ROGERS, J. D. Thoughts and musings on tropical Xylariaceae. **Mycol. Res.** V. 104, p. 1412–1420, 2000.

SAKAI, R.; et al. Cellular and subcellular localization of kainic acid in the marine red alga *Digenea simplex*. **Cell and Tissue Research**, v. 322, p. 491–502, 2005.

SHEU, J. H.; et al. Study on Cytotoxic Oxygenated Desmosterols Isolated from the Red Alga *Galaxaura marginata*. **J. Nat. Prod.** v. 60, p. 900-903, 1997.

SMIT, A. J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. **Journal of Applied Phycology**, v. 16, p. 245–262, 2004.

SOUZA, M. V. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Quim. Nova**, v. 27, p. 308-312, 2004.

SOLFRIZZO et al., Isolation, Characterization, and Biological Activity of Visoltricin, a Novel Metabolite of *Fusarium tricinctum*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, p. 195-199, 1994.

STADLER, M. et al. The Xylariaceae as model example for a unified nomenclature following the “One Fungus-One Name” (1F1N) concept. **Mycology**, v. 4, p. 5-21, 2013.

STROBEL et al. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**, v. 60, p. 179–183, 2002.

SURUP.; et al. Sporothriolide derivatives as chemotaxonomic markers for *Hypoxylon monticulosum*. **Mycology**, v 3; p. 110–119, 2014.

TAKAHASHI et al. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Quim. Nova**, v. 31, p. 1807-1813, 2008.

TORRES, V. R.; et al. An Updated Review on Marine Anticancer Compounds: The Use of Virtual Screening for the Discovery of Small-Molecule Cancer Drugs. **Molecules**, v. 22, p. 1037, 2017.

WANG, L., Y.; et al. Conjunctively screening of biocontrol agents (BCAs) against fusarium root rot and fusarium head blight caused by *Fusarium graminearum*. **Microbiological Research**, v.177, p. 34-42, 2015.

WOLFENDER, J-L. HPLC in natural product analysis: the detection issue. **Planta Medica**, v. 75, p. 719-734, 2009.

Y.-W. Liu et al. Acetylcholinesterase inhibition effects of marine fungi. **Pharm Biol**, v. 52, p. 539–543, 2014.

ZANG et al. Sesquiterpenoids from the Mangrove-Derived Endophytic Fungus *Diaporthe* sp. **J. Nat. Prod.**, v. 75, p. 1744–1749, 2012.

ZENG et al. Flavonoids from the red alga *Acanthophora spicifera*. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 19, p. 1097-1100, 2001.

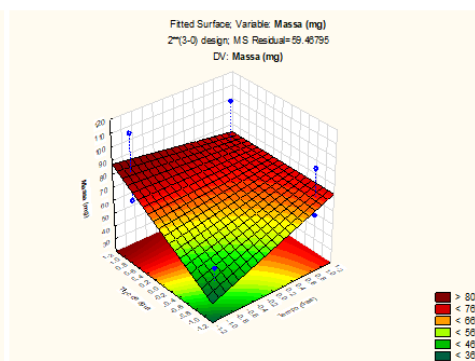
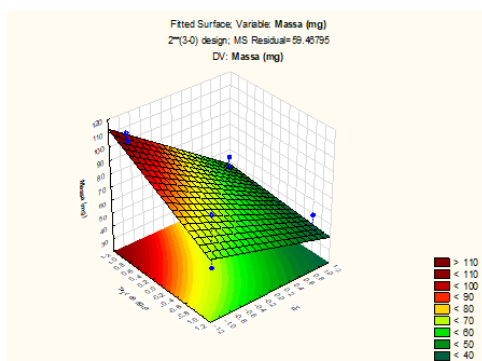
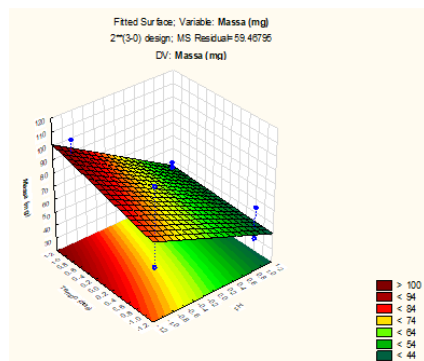
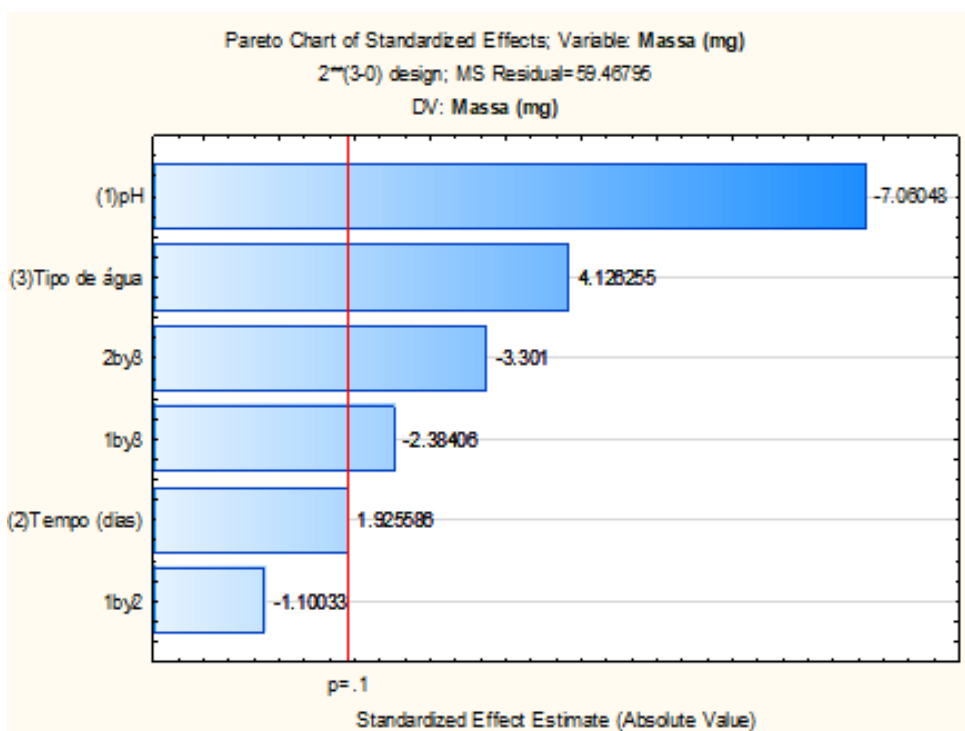
ZHANG, P.; et al. Varioxepine A, a 3*H*-Oxepine-Containing Alkaloid with a New Oxa-Cage from the Marine Algal-Derived Endophytic Fungus *Paecilomyces variotii*. **Org. Lett.** v. 16, p. 4834-4837, 2014.

ZHANG, et al. Secondary Metabolites from the Marine Algal-Derived Endophytic Fungi: Chemical Diversity and Biological Activity. **Planta Med**, v. 82, p. 832–842, 2016.

ANEXO I Respostas para experimentos com MALTE

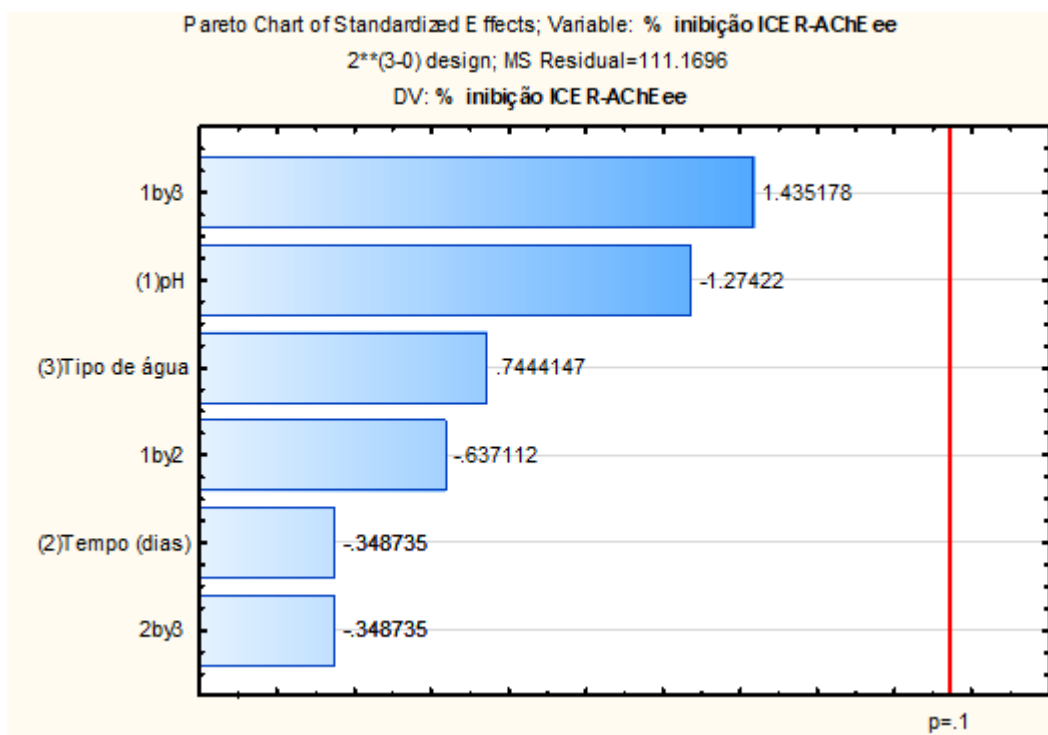
I) Efeito na Resposta Massa

ANOVA; Var.: Massa (mg) ; R-sqr=.93642; Adj:.87285 (Malte) 2**(3-0) design; MS Residual=59.46795 DV: Massa (mg)					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH	2964.500	1	2964.500	49.85038	0.000404
(2)Tempo (dias)	220.500	1	220.500	3.70788	0.102469
(3)Tipo de água	1012.500	1	1012.500	17.02598	0.006173
1 by 2	72.000	1	72.000	1.21074	0.313362
1 by 3	338.000	1	338.000	5.68373	0.054466
2 by 3	648.000	1	648.000	10.89663	0.016387
Error	356.808	6	59.468		
Total SS	5612.308	12			



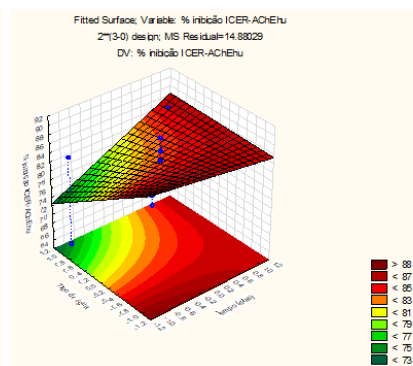
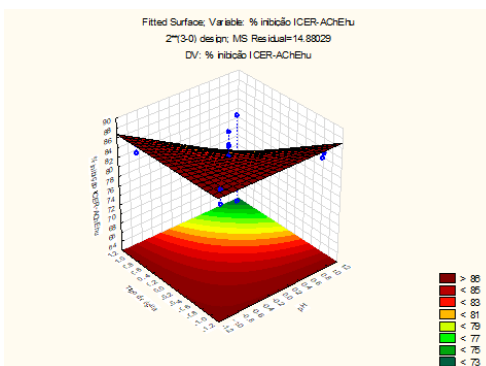
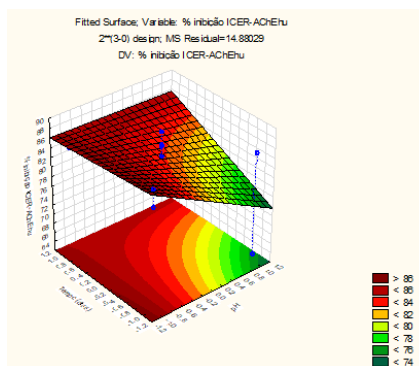
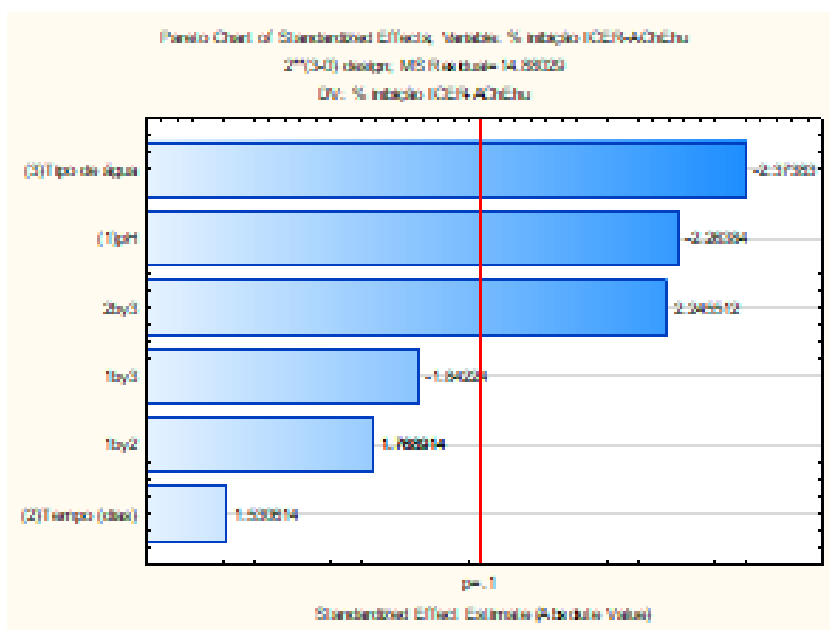
II) Efeito na Resposta %Inibição AChEee

ANOVA; Var.: %inibição ICER-AChEee; R-sqr=.44887; Adj:0. (Malte) 2**(3-0) design; MS Residual=111.1696 DV: %inibição ICER-AChEee					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH	180.500	1	180.5000	1.623645	0.249711
(2)Tempo (dias)	13.520	1	13.5200	0.121616	0.739200
(3)Tipo de água	61.605	1	61.6050	0.554153	0.484749
1 by 2	45.125	1	45.1250	0.405911	0.547576
1 by 3	228.980	1	228.9800	2.059735	0.201244
2 by 3	13.520	1	13.5200	0.121616	0.739200
Error	667.018	6	111.1696		
Total SS	1210.268	12			



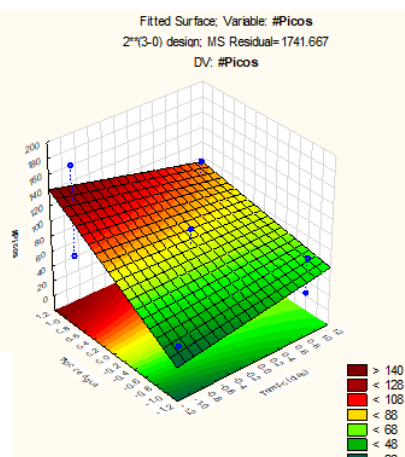
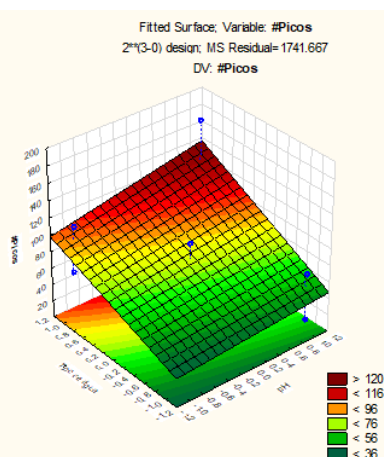
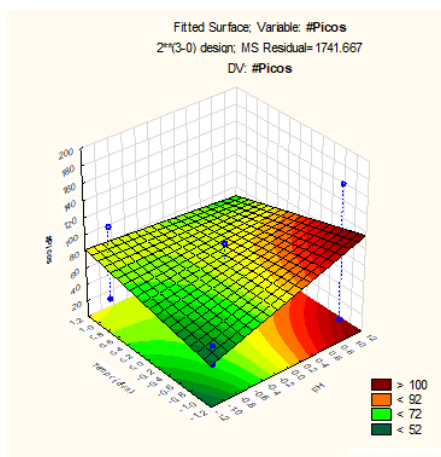
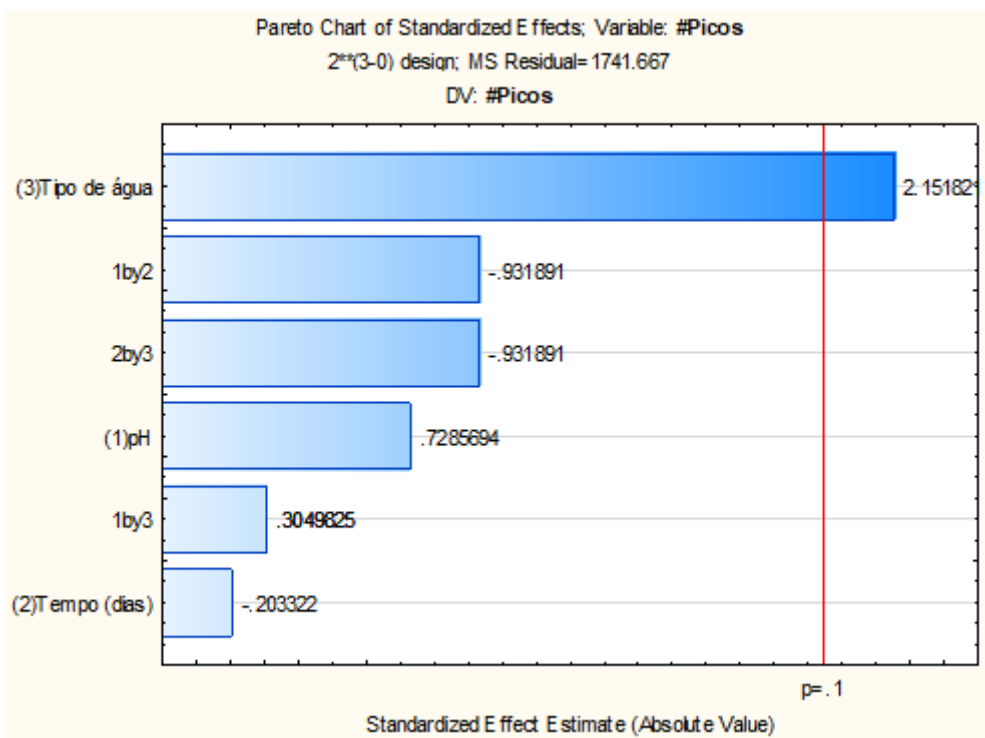
III) Efeito na Resposta %Inibição AChEhu

ANOVA; Var.:% inibição ICER-AChEhu; R-sqr=.80436; Adj.:60871 (Malte)					
2**(3-0) design; MS Residual=14.88029					
DV: % inibição ICER-AChEhu					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH	76.2612	1	76.2612	5.12498	0.064208
(2)Tempo (dias)	34.8613	1	34.8612	2.34278	0.176741
(3)Tipo de água	83.8512	1	83.8512	5.63505	0.055231
1 by 2	46.5613	1	46.5612	3.12905	0.127315
1 by 3	50.5013	1	50.5012	3.39383	0.115021
2 by 3	75.0313	1	75.0312	5.04232	0.065846
Error	89.2817	6	14.88029		
Total SS	456.3492	12			

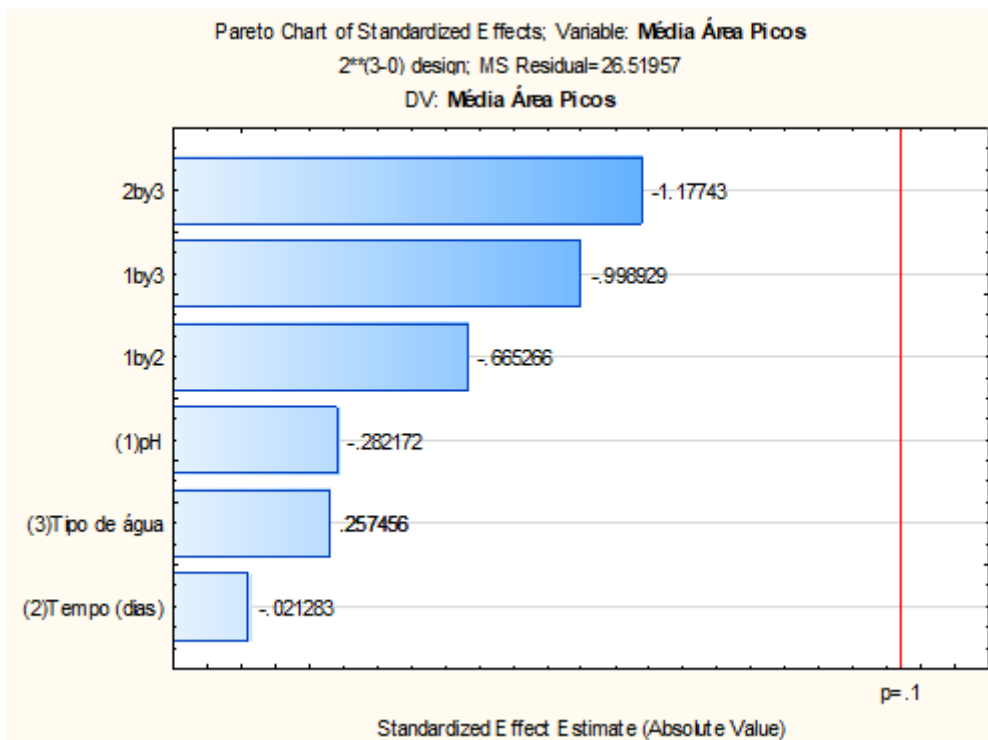


IV) Efeito na Resposta Número de picos no CLAE-EM

ANOVA; Var.:#Picos R-sqr=.53961; Adj.:.07921 (Malte) 2**(3-0) design; MS Residual=1741.667 DV: #Picos					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH	924.50	1	924.500	0.530813	0.493708
(2)Tempo (dias)	72.00	1	72.000	0.041340	0.845604
(3)Tipo de água	8064.50	1	8064.500	4.630335	0.074918
1 by 2	1512.50	1	1512.500	0.868427	0.387355
1 by 3	162.00	1	162.000	0.093014	0.770682
2 by 3	1512.50	1	1512.500	0.868427	0.387355
Error	10450.00	6	1741.667		
Total SS	22698.00	12			

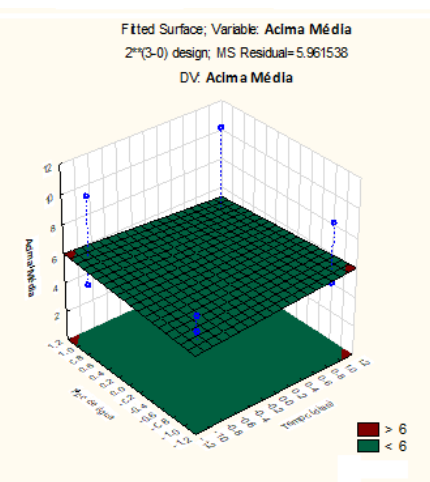
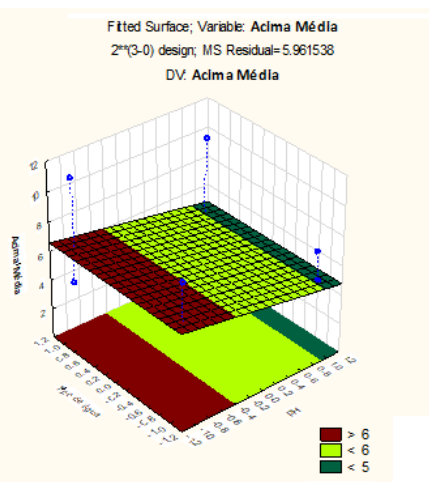
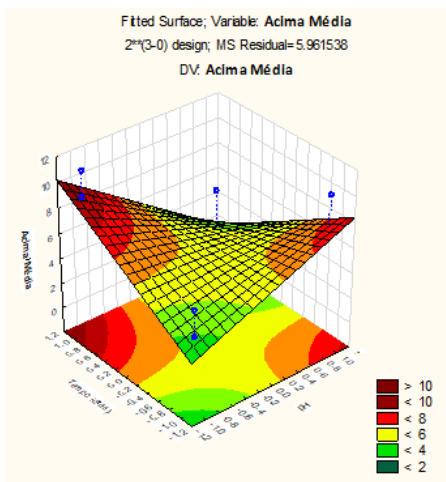
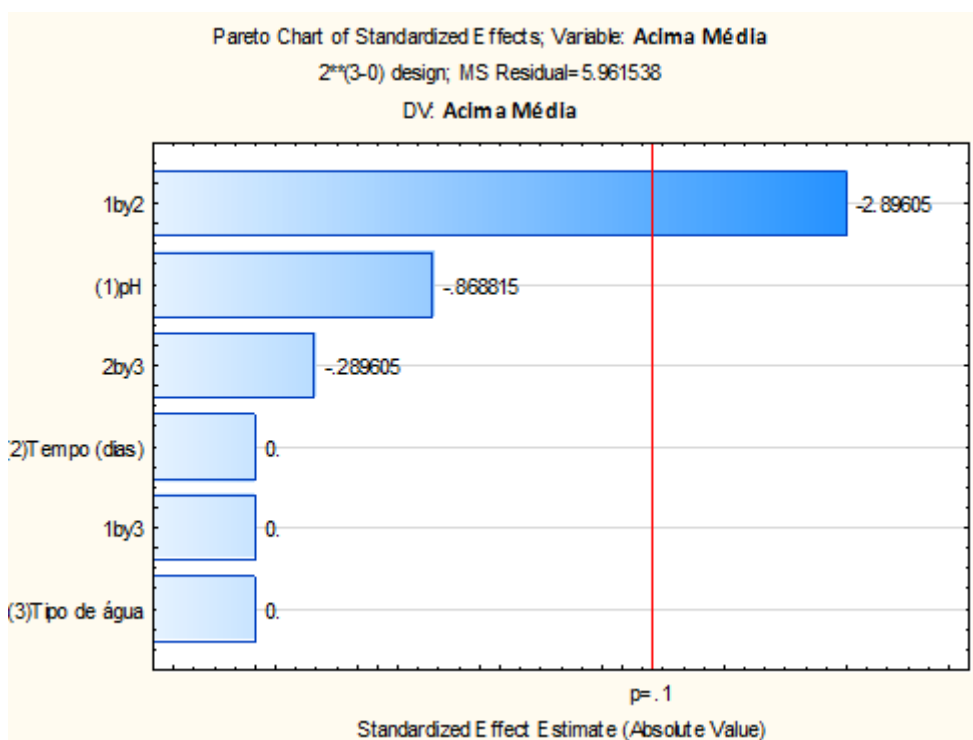


V) Efeito na Resposta Área dos picos observados por CLAE-EM.



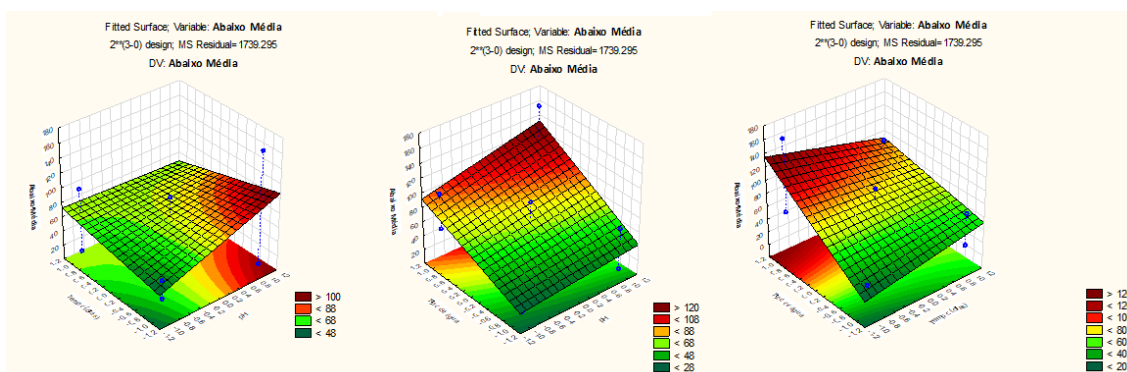
VI) Efeito na Resposta Área dos picos (Acima da média) observados por CLAE-EM.

ANOVA; Var.: Acima Média ; R-sqr=.60593; Adj:.21186 (Malte 2**(3-0) design; MS Residual=5.961538					
DV: Acima Média					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH	4.50000	1	4.50000	0.754839	0.418341
(2)Tempo (dias)	0.00000	1	0.00000	0.000000	1.000000
(3)Tipo de água	0.00000	1	0.00000	0.000000	1.000000
1 by 2	50.00000	1	50.00000	8.387097	0.027476
1 by 3	0.00000	1	0.00000	0.000000	1.000000
2 by 3	0.50000	1	0.50000	0.083871	0.781866
Error	35.76923	6	5.96154		
Total SS	90.76923	12			



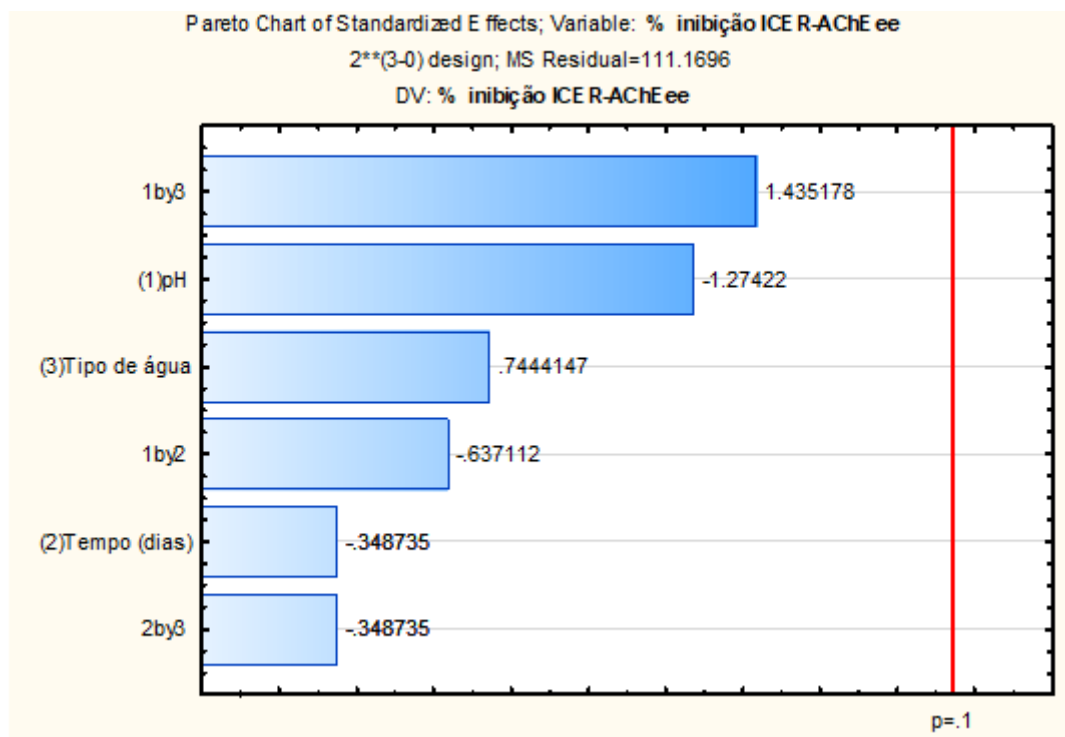
VII) Efeito na Resposta Área dos picos (Abaixo da Média) no CLAE-EM.

ANOVA; Var.: Abaixo Média ; R-sqr=.53125; Adj:.06249 (Malte 2**(3-0) design; MS Residual=1739.295 DV: Abaixo Média					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH	1058.00	1	1058.000	0.608292	0.465076
(2)Tempo (dias)	72.00	1	72.000	0.041396	0.845500
(3)Tipo de água	8064.50	1	8064.500	4.636649	0.074766
1 by 2	1012.50	1	1012.500	0.582132	0.474397
1 by 3	162.00	1	162.000	0.093141	0.770531
2 by 3	1458.00	1	1458.000	0.838271	0.395199
Error	10435.77	6	1739.295		
Total SS	22262.77	12			



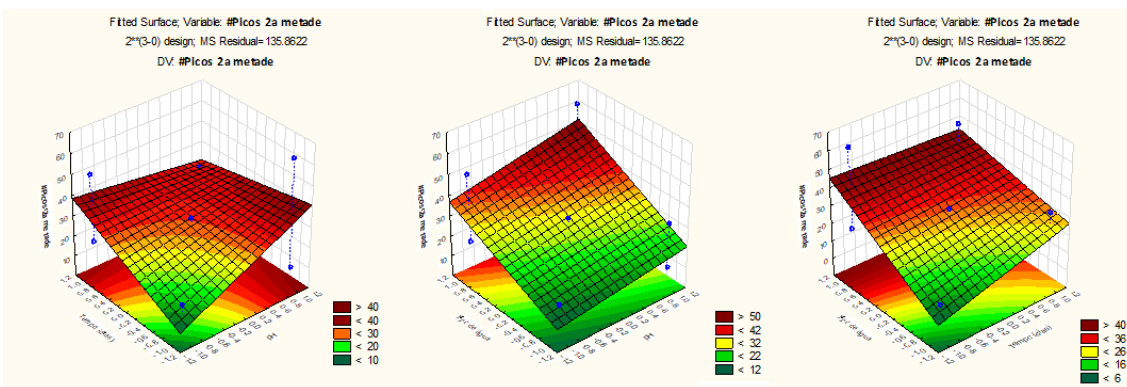
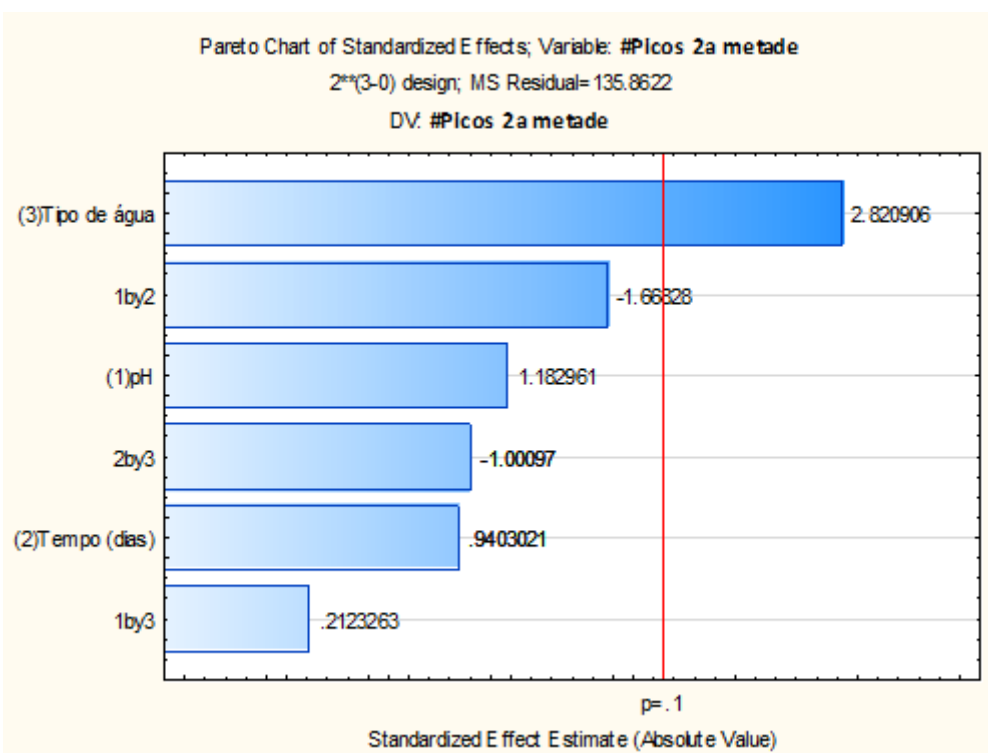
VIII) Efeito na Resposta Número de picos na 1ª metade (Polares) CLAE-EM.

ANOVA; Var.: %inibição ICER-AChEee; R-sqr=.44887; Adj:0. (Malte)					
2**(3-0) design; MS Residual=111.1696					
DV: %inibição ICER-AChEee					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH	180.500	1	180.5000	1.623645	0.249711
(2)Tempo (dias)	13.520	1	13.5200	0.121616	0.739200
(3)Tipo de água	61.605	1	61.6050	0.554153	0.484749
1 by 2	45.125	1	45.1250	0.405911	0.547576
1 by 3	228.980	1	228.9800	2.059735	0.201244
2 by 3	13.520	1	13.5200	0.121616	0.739200
Error	667.018	6	111.1696		
Total SS	1210.268	12			



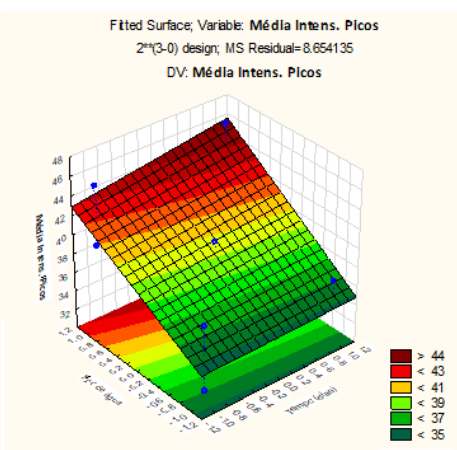
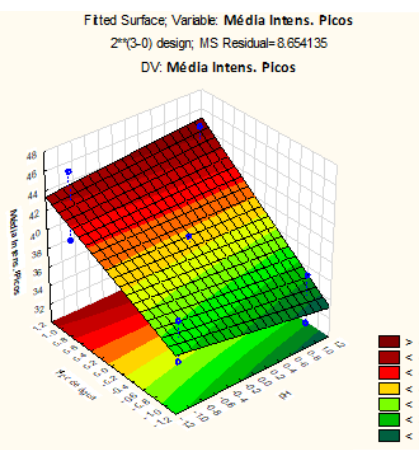
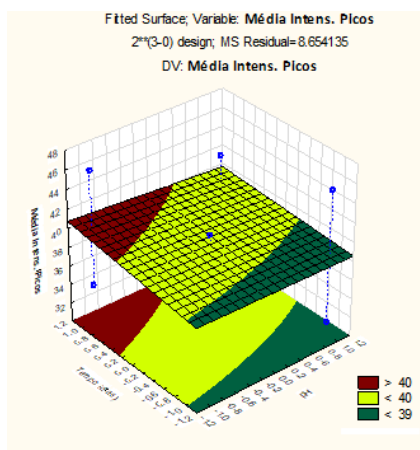
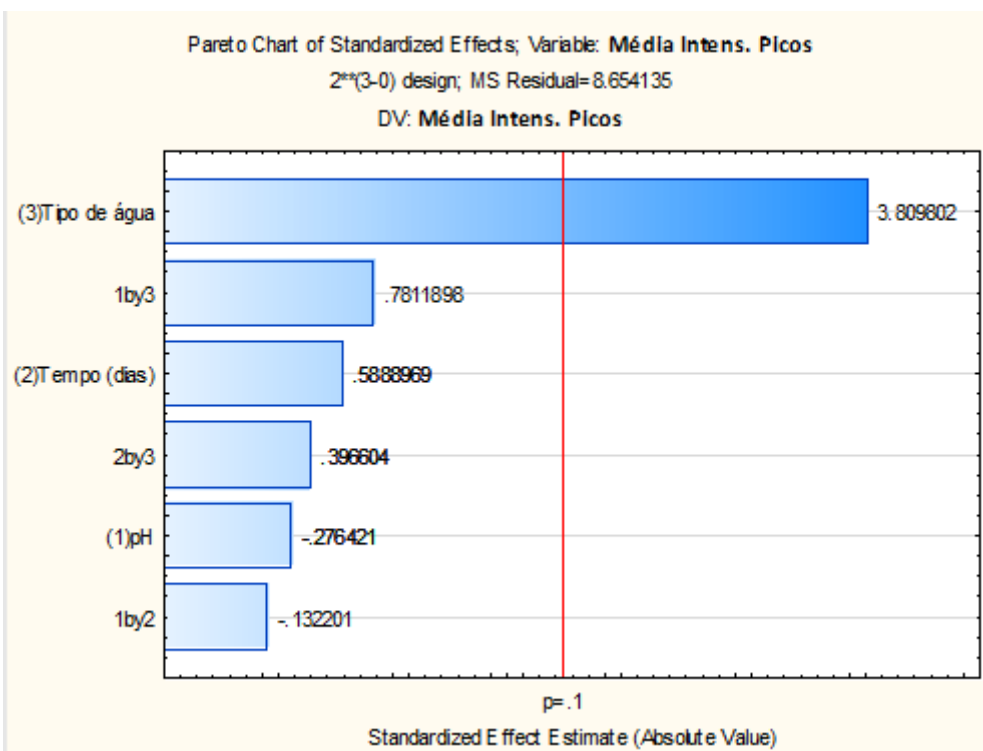
IX) Efeito na Resposta Número de picos na 2ª metade (Apolares) observados no CLAE-EM.

ANOVA; Var.: #Picos 2a metade ; R-sqr=.70106; Adj:.40213 (Malte 2**(3-0) design; MS Residual=135.8622					
DV: #Picos 2a metade					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH	190.125	1	190.125	1.399396	0.281570
(2)Tempo (dias)	120.125	1	120.125	0.884168	0.383359
(3)Tipo de água	1081.125	1	1081.125	7.957513	0.030318
1 by 2	378.125	1	378.125	2.783151	0.146304
1 by 3	6.125	1	6.125	0.045082	0.838882
2 by 3	136.125	1	136.125	1.001934	0.355486
Error	815.173	6	135.862		
Total SS	2726.923	12			



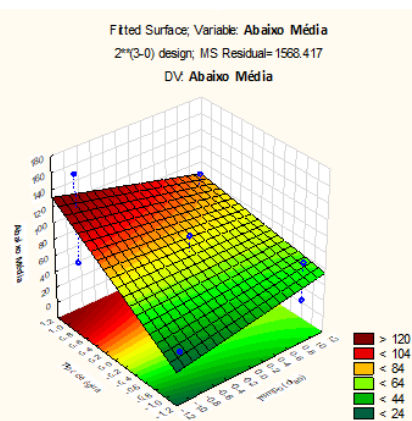
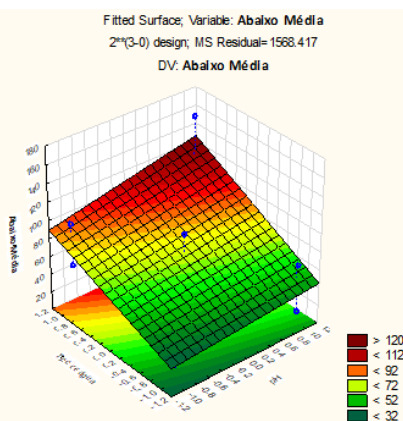
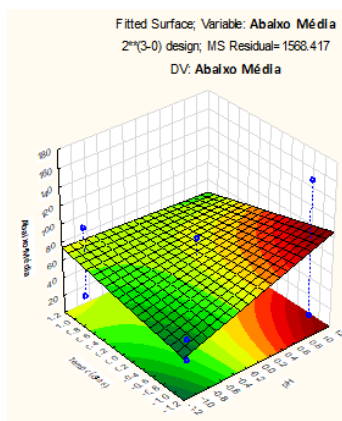
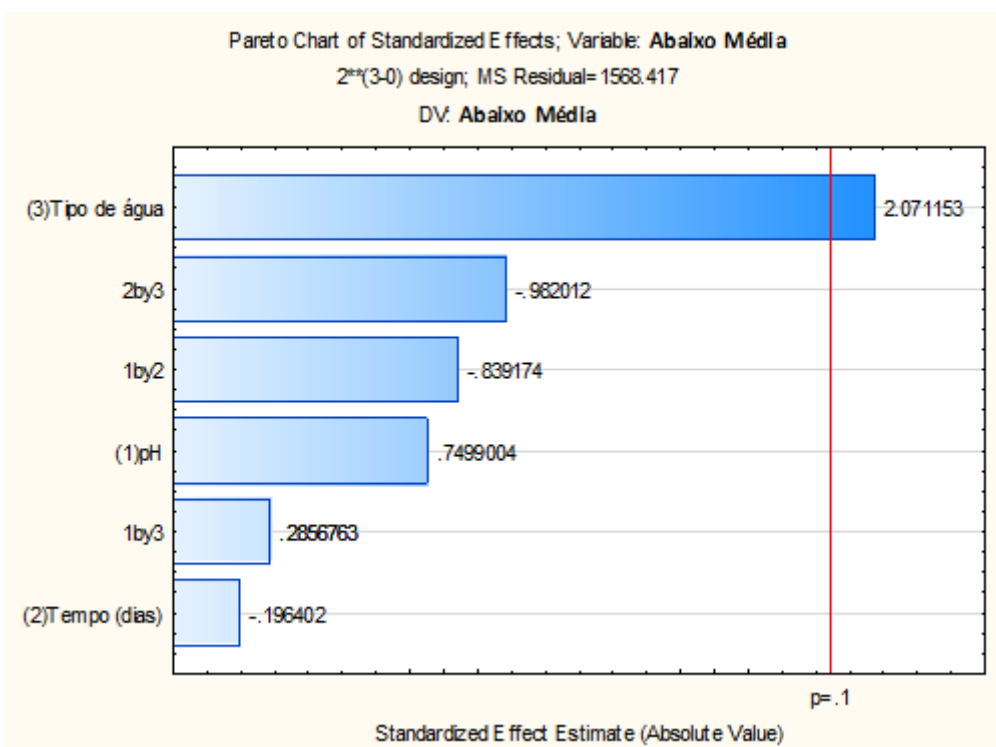
X) Efeito na Resposta Intensidade dos picos no CLAE-EM

ANOVA; Var.: Média Intens. Picos ; R-sqr=.72379; Adj:.44759 (Malte 2**(3-0) design; MS Residual=8.654135					
DV: Média Intens. Picos					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH	0.6613	1	0.6613	0.07641	0.791500
(2)Tempo (dias)	3.0012	1	3.0012	0.34680	0.577413
(3)Tipo de água	125.6112	1	125.6112	14.51459	0.008866
1 by 2	0.1513	1	0.1513	0.01748	0.899147
1 by 3	5.2813	1	5.2813	0.61026	0.464389
2 by 3	1.3613	1	1.3613	0.15729	0.705381
Error	51.9248	6	8.6541		
Total SS	187.9923	12			



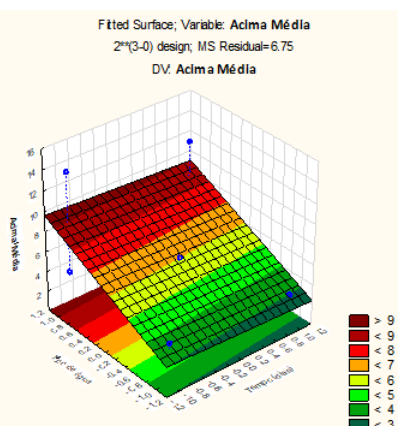
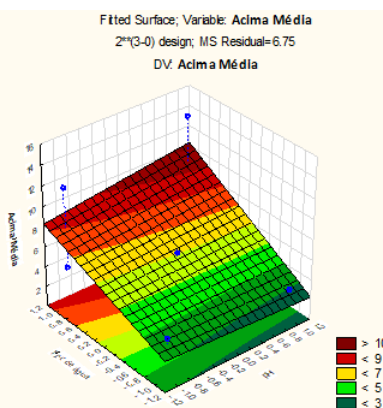
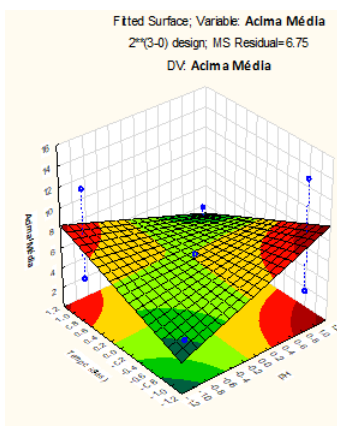
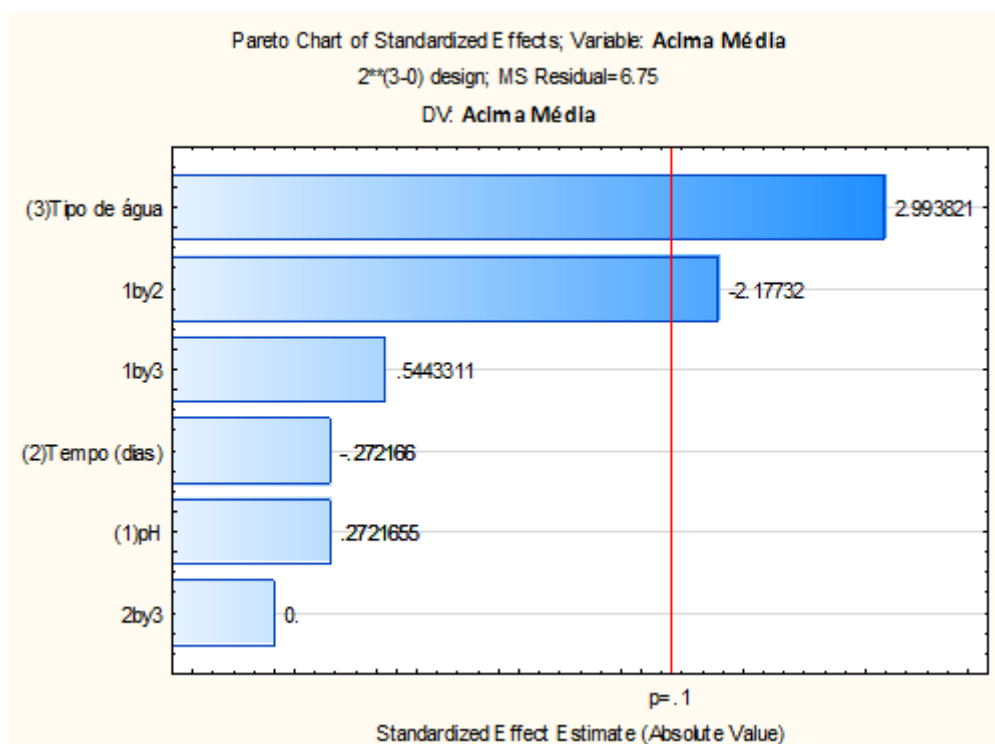
XI) Efeito na Resposta Intensidade de picos (Abaixo da média) no CLAE-EM.

ANOVA; Var.: Abaixo Média ; R-sqr=.52535; Adj:.05069 (Malte 2**(3-0) design; MS Residual=1568.417 DV: Abaixo Média)					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH	882.00	1	882.000	0.562351	0.481674
(2)Tempo (dias)	60.50	1	60.500	0.038574	0.850779
(3)Tipo de água	6728.00	1	6728.000	4.289676	0.083754
1 by 2	1104.50	1	1104.500	0.704213	0.433527
1 by 3	128.00	1	128.000	0.081611	0.784732
2 by 3	1512.50	1	1512.500	0.964348	0.364018
Error	9410.50	6	1568.417		
Total SS	19826.00	12			



XII) Efeito na Resposta Intensidade dos picos (Acima da média) no CLAE-EM

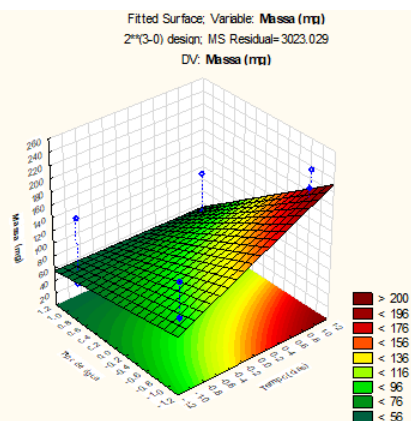
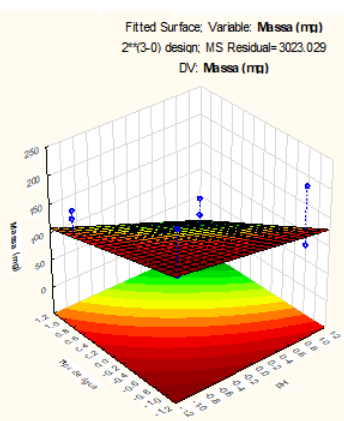
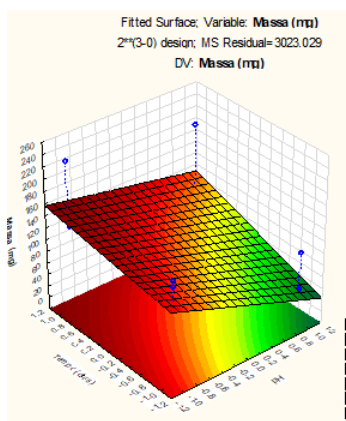
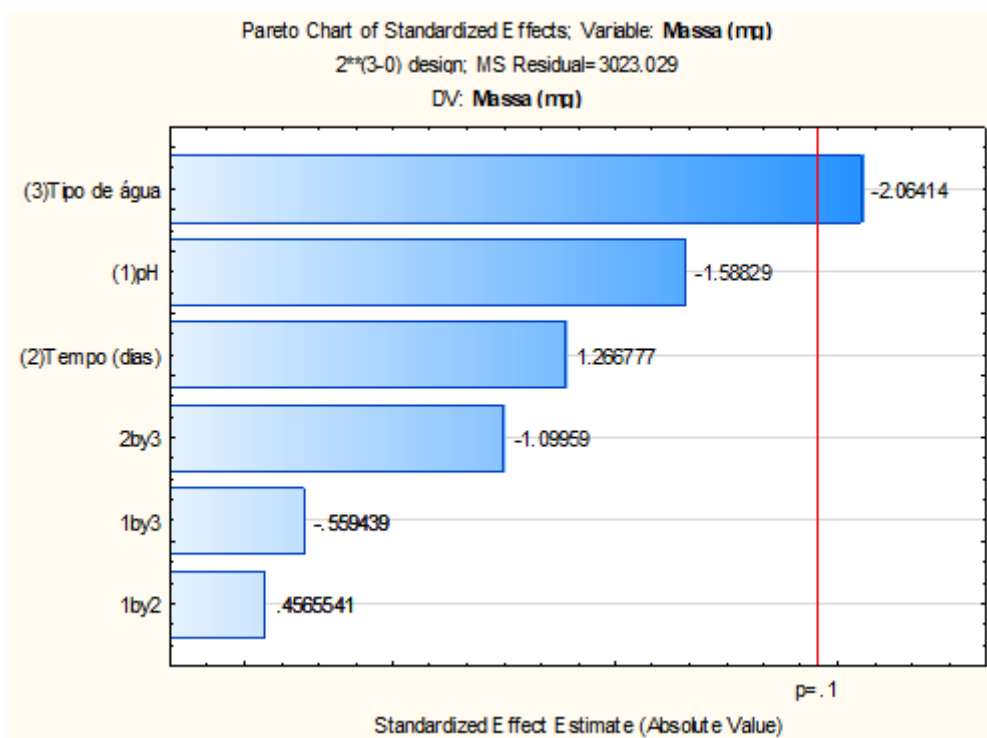
ANOVA; Var.: Acima Média ; R-sqr=.70221; Adj:.40441 (Malte) 2**(3-0) design; MS Residual=6.75 DV: Acima Média					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH	0.5000	1	0.50000	0.074074	0.794618
(2)Tempo (dias)	0.5000	1	0.50000	0.074074	0.794618
(3)Tipo de água	60.5000	1	60.50000	8.962963	0.024200
1 by 2	32.0000	1	32.00000	4.740741	0.072328
1 by 3	2.0000	1	2.00000	0.296296	0.605836
2 by 3	0.0000	1	0.00000	0.000000	1.000000
Error	40.5000	6	6.75000		
Total SS	136.0000	12			



ANEXO II Discussão dos efeitos sobre as respostas para experimentos com CZAPEK

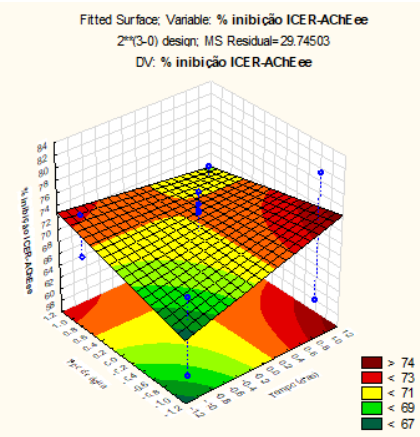
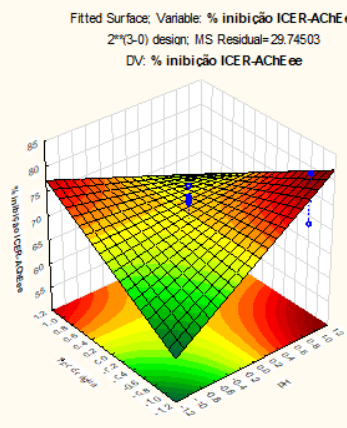
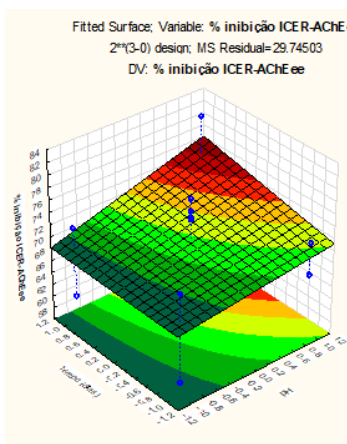
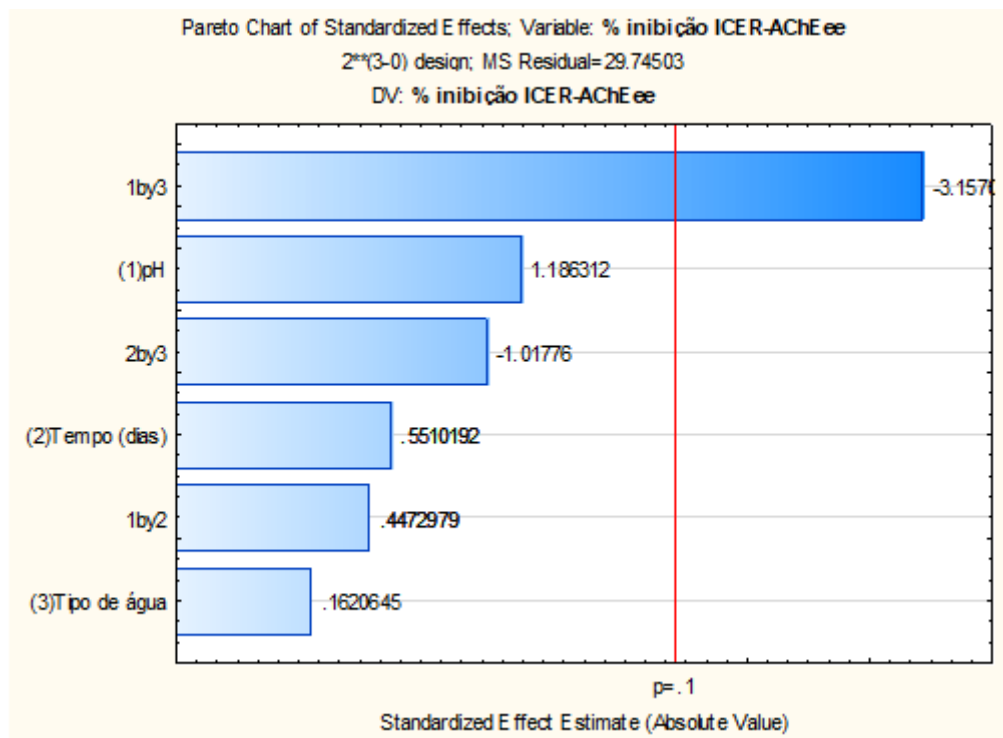
I) Efeito na Resposta Massa

ANOVA; Var.: Massa (mg) ; R-sqr=.62776; Adj.:.25552 (CZAPEK) 2**(3-0) design; MS Residual=3023.029 DV: Massa (mg)					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH	7626.13	1	7626.13	2.522677	0.163319
(2)Tempo (dias)	4851.12	1	4851.12	1.604723	0.252186
(3)Tipo de água	12880.13	1	12880.13	4.260669	0.084571
1 by 2	630.12	1	630.12	0.208442	0.664053
1 by 3	946.13	1	946.13	0.312973	0.596111
2 by 3	3655.13	1	3655.13	1.209094	0.313662
Error	18138.17	6	3023.03		
Total SS	48726.92	12			



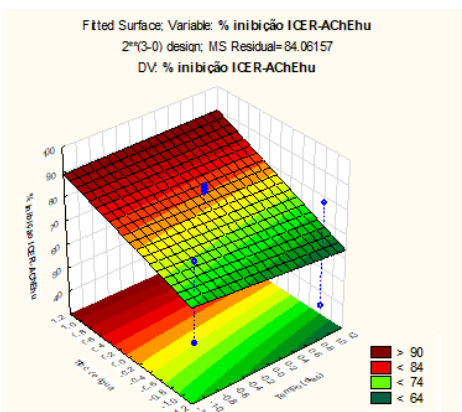
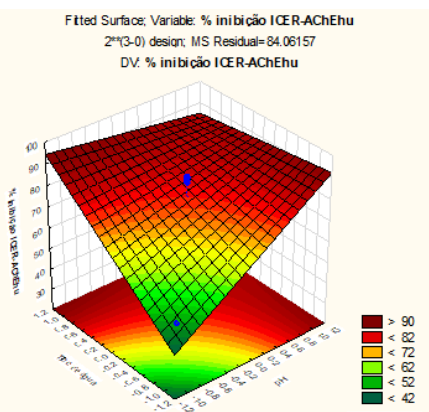
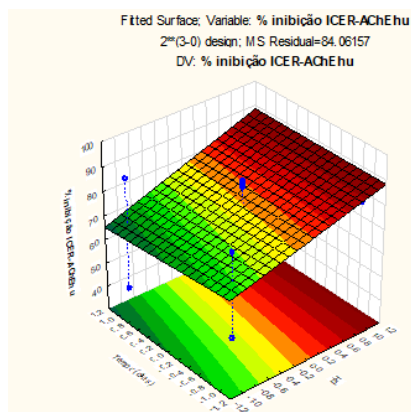
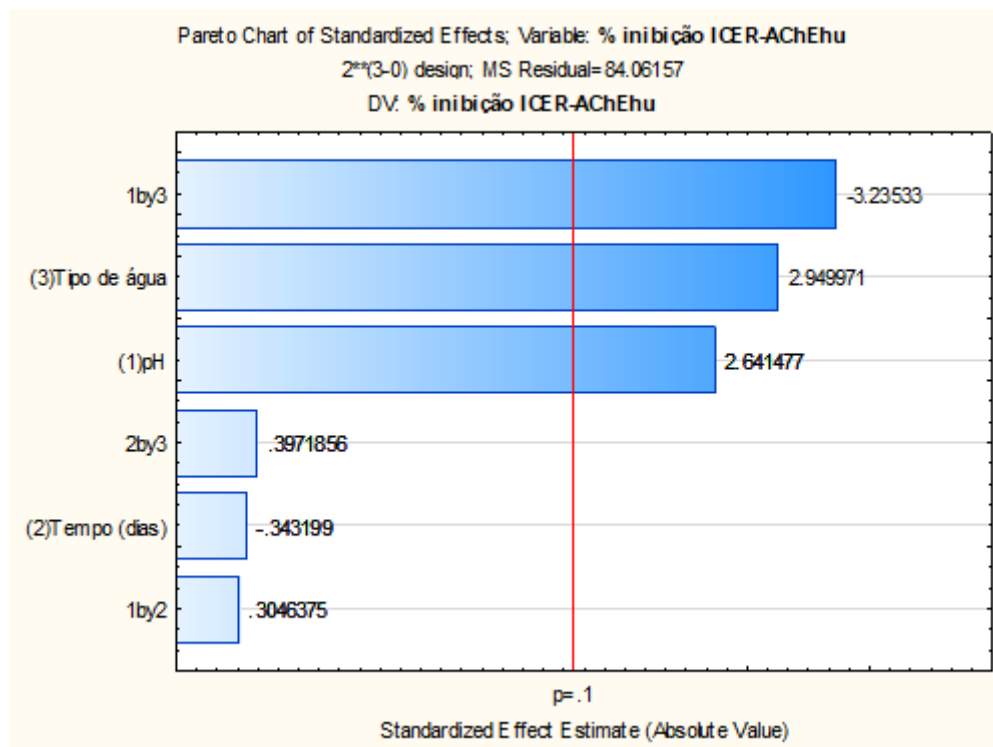
II) Efeito na Resposta %Inibição AChEee no CLAE-EM

ANOVA; Var.: %inibição ICER-AChEee; R-sqr=.68321; Adj.:.36642 (CZAPEC 2**(3-0) design; MS Residual=29.74503 DV: %inibição ICER-AChEee					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH	41.8613	1	41.8613	1.407336	0.280340
(2)Tempo (dias)	9.0313	1	9.0313	0.303622	0.601520
(3)Tipo de água	0.7812	1	0.7812	0.026265	0.876575
1 by 2	5.9513	1	5.9513	0.200075	0.670355
1 by 3	296.4612	1	296.4612	9.966748	0.019639
2 by 3	30.8112	1	30.8112	1.035845	0.348060
Error	178.4702	6	29.7450		
Total SS	563.3677	12			



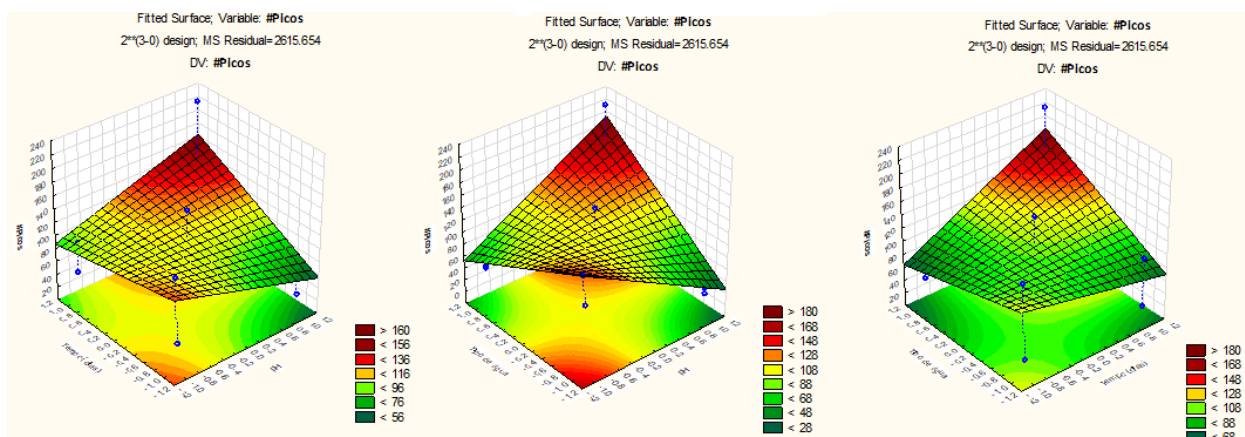
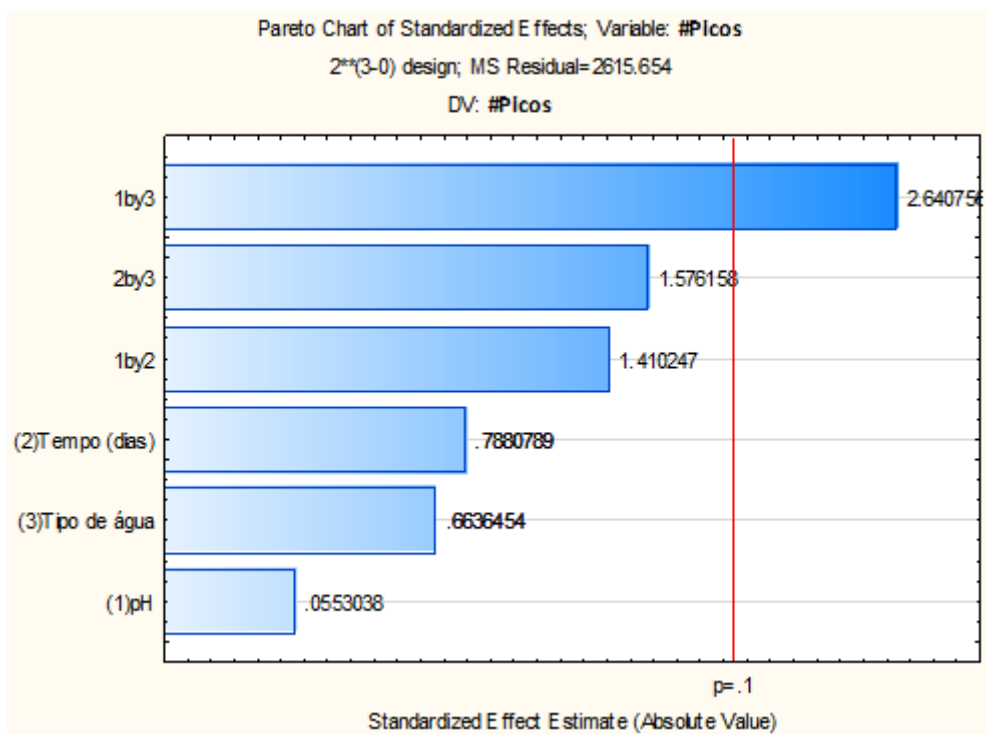
III) Efeito na Resposta % Inibição de AChEhu no CLAE-EM

ANOVA; Var.: %inibição ICER-AChEhu ; R-sqr=.81547; Adj:.63094 (CZAPEC 2**(3-0) design; MS Residual=84.06157 DV: %inibição ICER-AChEhu					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH	586.531	1	586.5313	6.97740	0.038464
(2)Tempo (dias)	9.901	1	9.9013	0.11779	0.743154
(3)Tipo de água	731.531	1	731.5312	8.70233	0.025614
1 by 2	7.801	1	7.8013	0.09280	0.770932
1 by 3	879.901	1	879.9013	10.46734	0.017791
2 by 3	13.261	1	13.2613	0.15776	0.704974
Error	504.369	6	84.0616		
Total SS	2733.297	12			



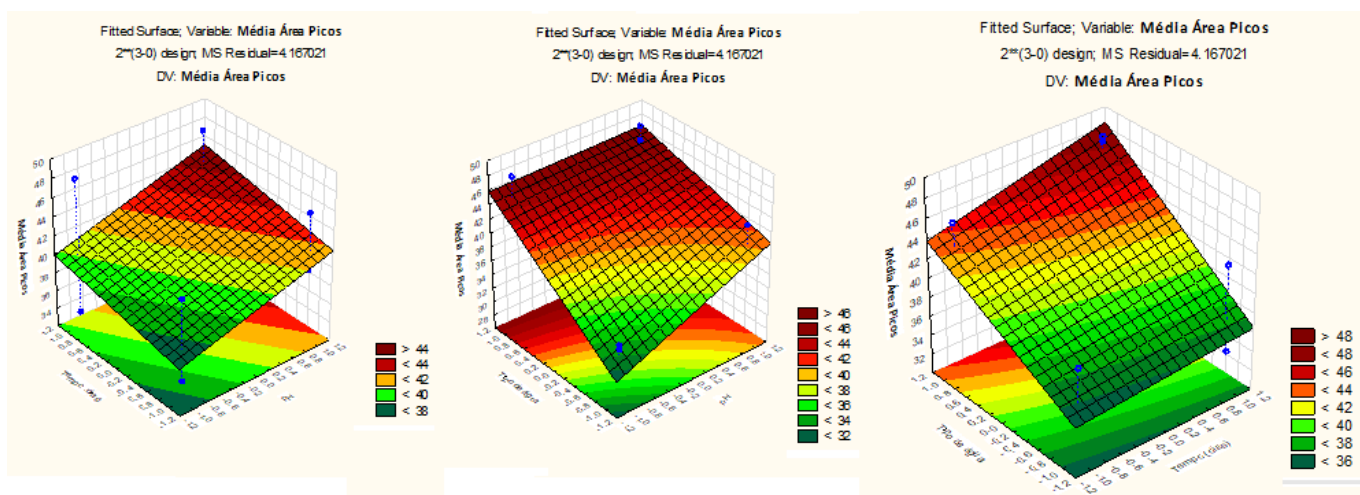
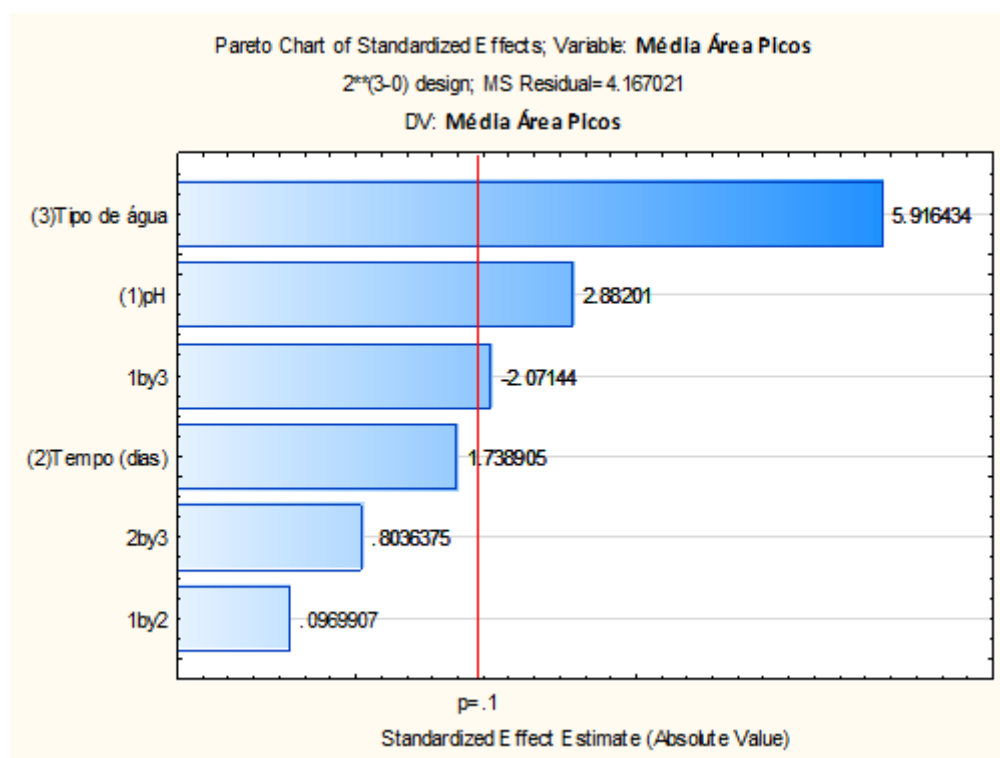
IV) Efeito na Resposta Número de picos observados no CLAE-EM.

ANOVA; Var.:#Picos; R-sqr=.67587; Adj.:.35174 (CZAPECK)					
2**(3-0) design; MS Residual=2615.654					
DV: #Picos					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH	8.00	1	8.00	0.003059	0.957692
(2)Tempo (dias)	1624.50	1	1624.50	0.621068	0.460643
(3)Tipo de água	1152.00	1	1152.00	0.440425	0.531574
1 by 2	5202.00	1	5202.00	1.988795	0.208143
1 by 3	18240.50	1	18240.50	6.973591	0.038502
2 by 3	6498.00	1	6498.00	2.484274	0.166061
Error	15693.92	6	2615.65		
Total SS	48418.92	12			



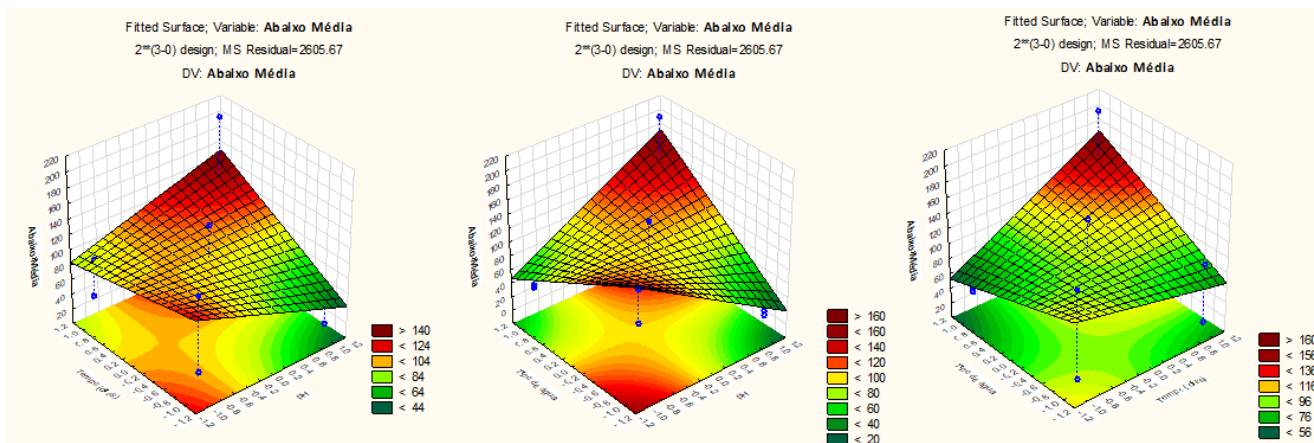
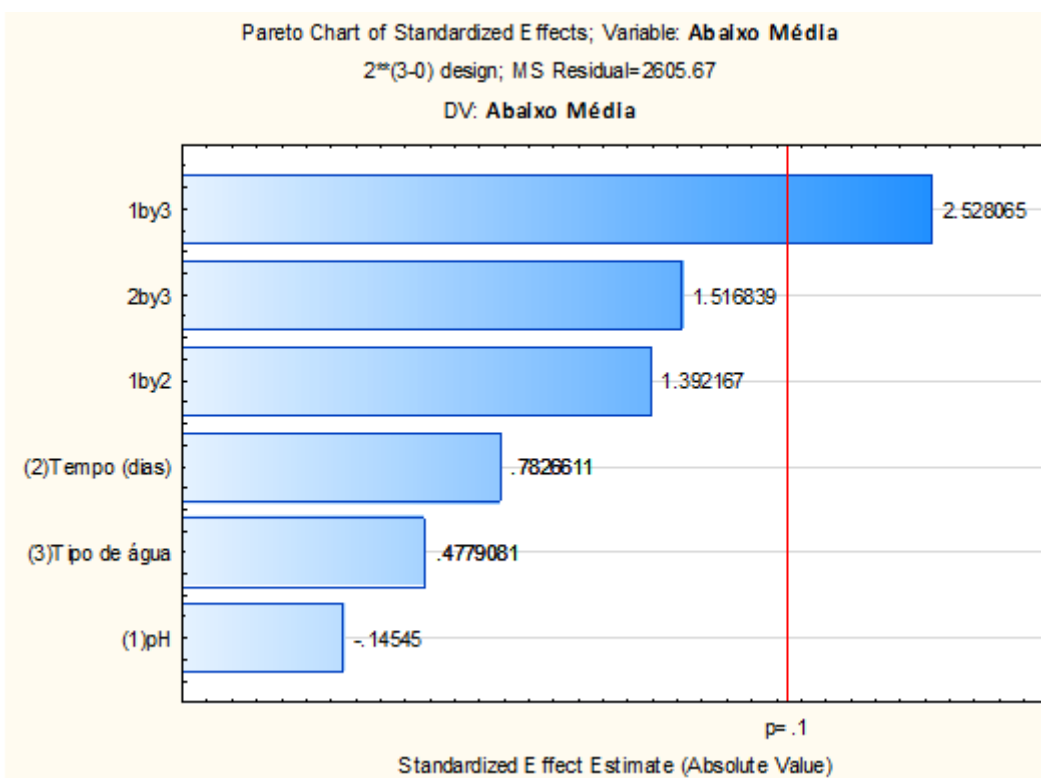
V) Efeito na Resposta Área dos picos observados por CLAE-EM.

ANOVA; Var.: Média Área Picos R-sqr=.89525; Adj.:.7905 (CZAPECK) 2**(3-0) design; MS Residual=4.167021 DV: Média Área Picos					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH	34.6112	1	34.6112	8.3059	0.027984
(2)Tempo (dias)	12.6002	1	12.6002	3.0237	0.132711
(3)Tipo de água	145.8632	1	145.8632	35.0042	0.001038
1 by 2	0.0392	1	0.0392	0.0094	0.925892
1 by 3	17.8802	1	17.8802	4.2908	0.083720
2 by 3	2.6912	1	2.6912	0.6458	0.452261
Error	25.0021	6	4.1670		
Total SS	238.6872	12			



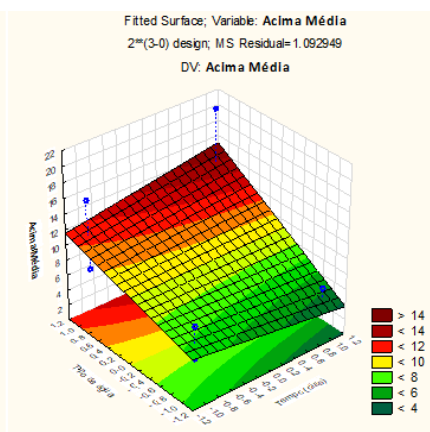
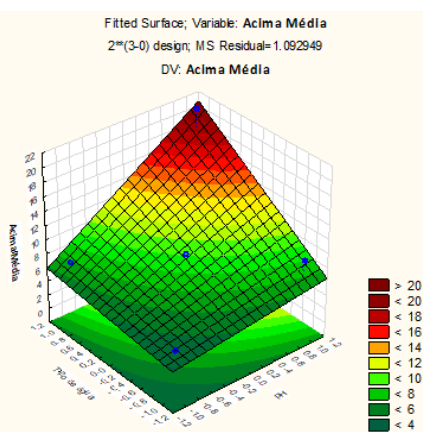
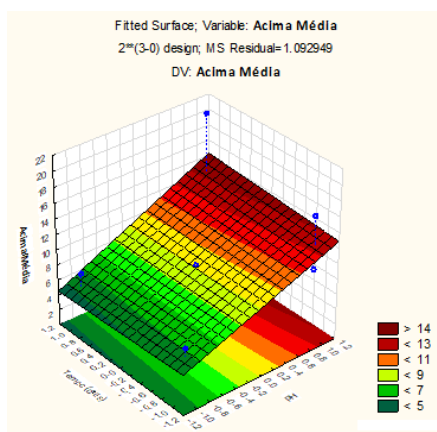
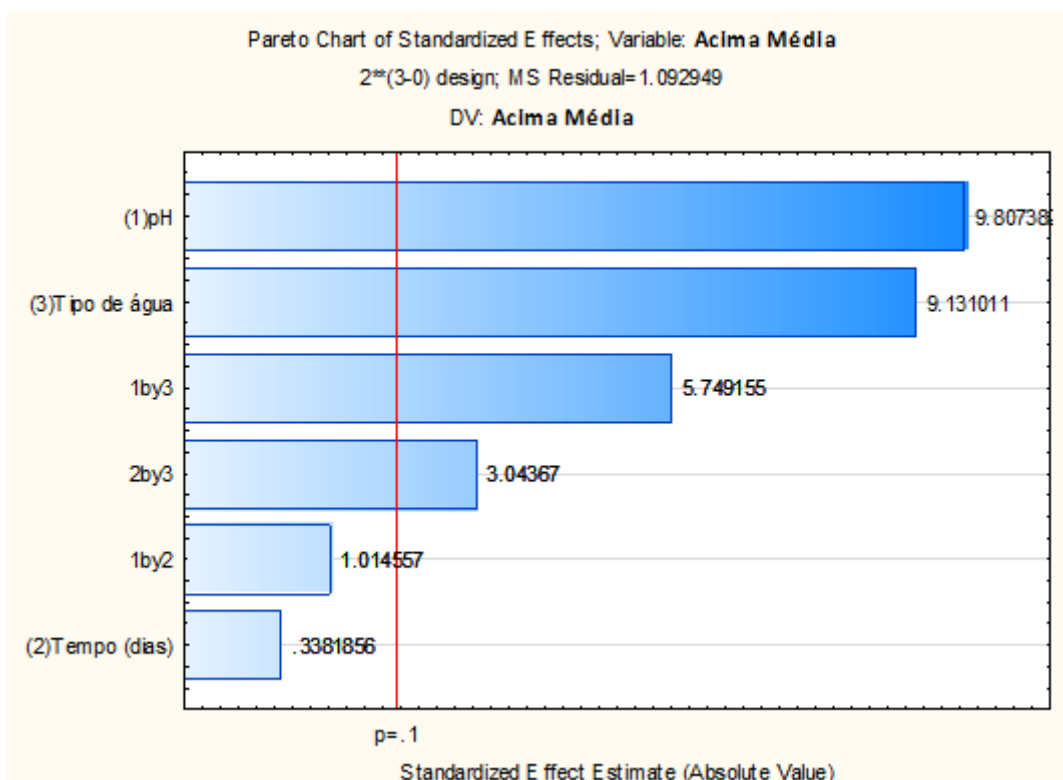
VI) Efeito na Resposta Área dos picos (Abaixo da Média) no CLAE-EM.

ANOVA; Var.: Abaixo Média ; R-sqr=.65699; Adj.:.31398 (CZAPECK 2**(3-0) design; MS Residual=2605.67 DV: Abaixo Média					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH	55.13	1	55.13	0.021156	0.889119
(2)Tempo (dias)	1596.13	1	1596.13	0.612558	0.463587
(3)Tipo de água	595.13	1	595.13	0.228396	0.649629
1 by 2	5050.13	1	5050.13	1.938129	0.213282
1 by 3	16653.13	1	16653.13	6.391111	0.044797
2 by 3	5995.13	1	5995.13	2.300800	0.180097
Error	15634.02	6	2605.67		
Total SS	45578.77	12			



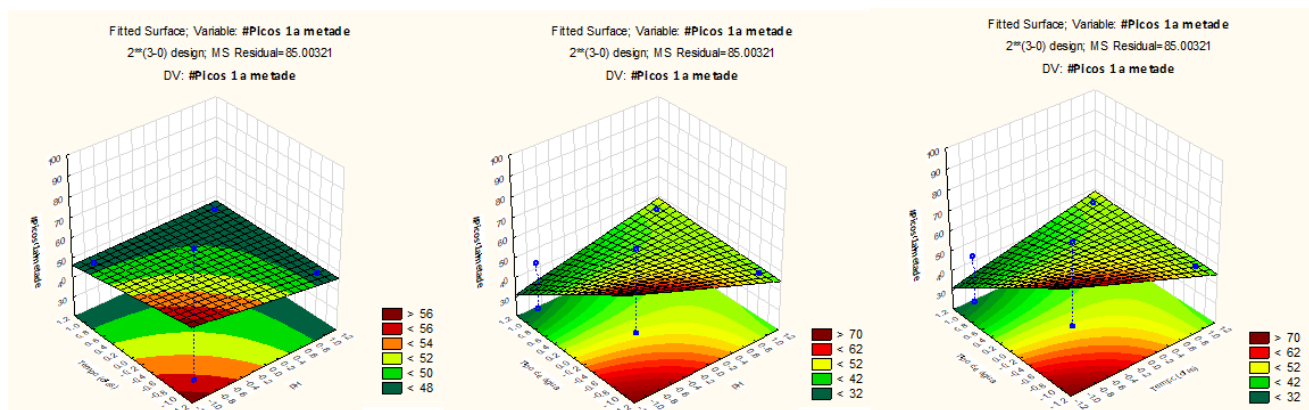
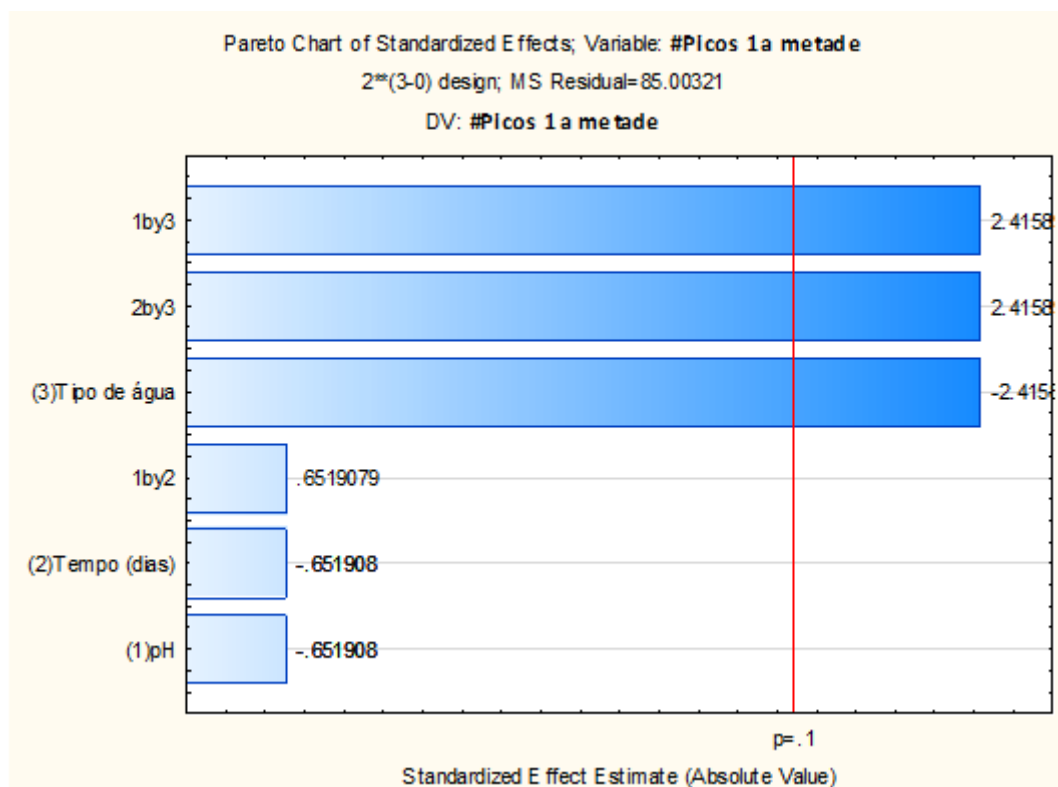
VII) Efeito na Resposta Área dos picos (Acima da média) observados por CLAE-EM.

ANOVA; Var.: Acima Média ; R-sqr=.9738; Adj.:.9476 (CZAPECK 2**(3-0) design; MS Residual=1.092949 DV: Acima Média					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH	105.1250	1	105.1250	96.18475	0.000065
(2)Tempo (dias)	0.1250	1	0.1250	0.11437	0.746743
(3)Tipo de água	91.1250	1	91.1250	83.37537	0.000097
1 by 2	1.1250	1	1.1250	1.02933	0.349468
1 by 3	36.1250	1	36.1250	33.05279	0.001205
2 by 3	10.1250	1	10.1250	9.26393	0.022696
Error	6.5577	6	1.0929		
Total SS	250.3077	12			



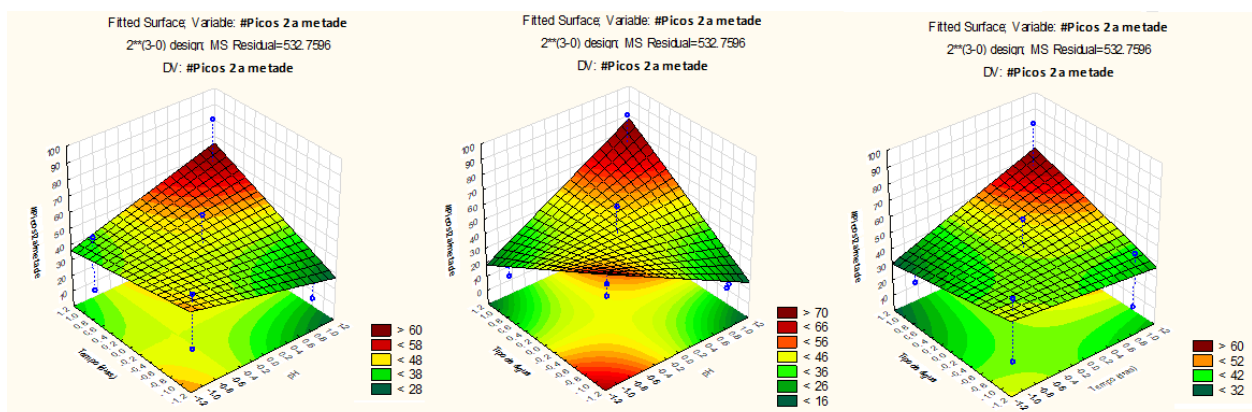
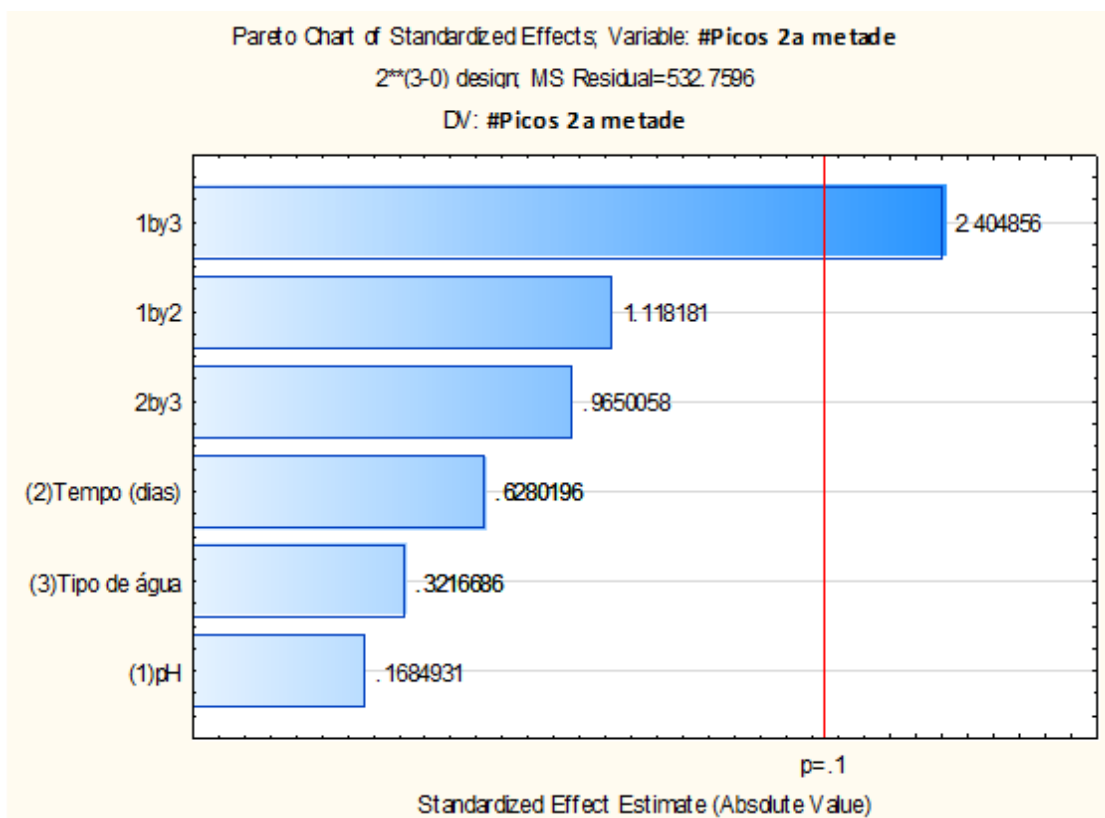
VIII) Efeito na Resposta Número de picos na 1ª metade (Polares) CLAE-EM.

ANOVA; Var.: #Picos 1a metade ; R-sqr=.75791; Adj:.51583 (CZAPECK) 2**(3-0) design; MS Residual=85.00321 DV: #Picos 1a metade					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH	36.125	1	36.1250	0.424984	0.538616
(2)Tempo (dias)	36.125	1	36.1250	0.424984	0.538616
(3)Tipo de água	496.125	1	496.1250	5.836545	0.052154
1 by 2	36.125	1	36.1250	0.424984	0.538616
1 by 3	496.125	1	496.1250	5.836545	0.052154
2 by 3	496.125	1	496.1250	5.836545	0.052154
Error	510.019	6	85.0032		
Total SS	2106.769	12			



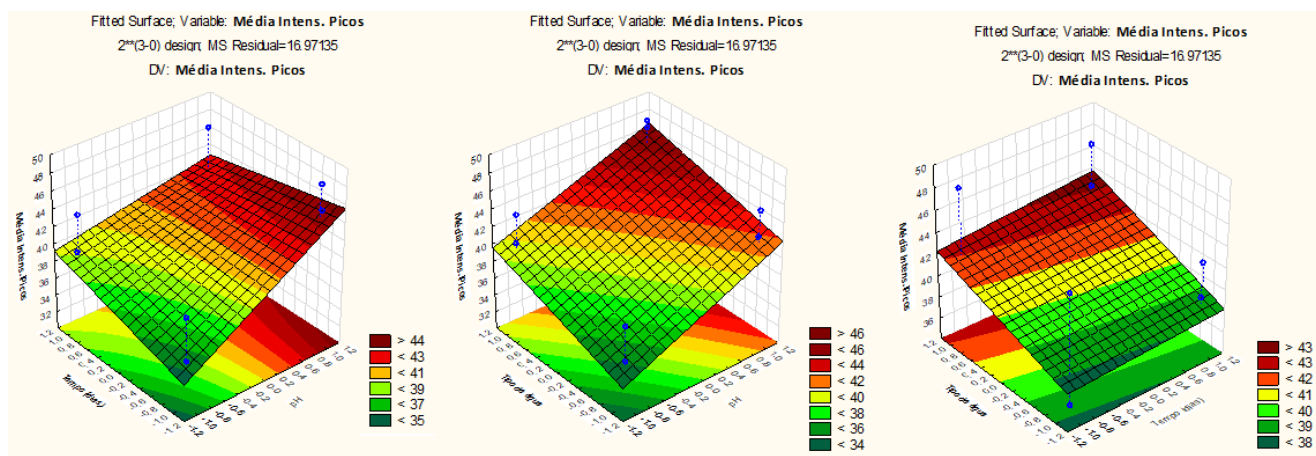
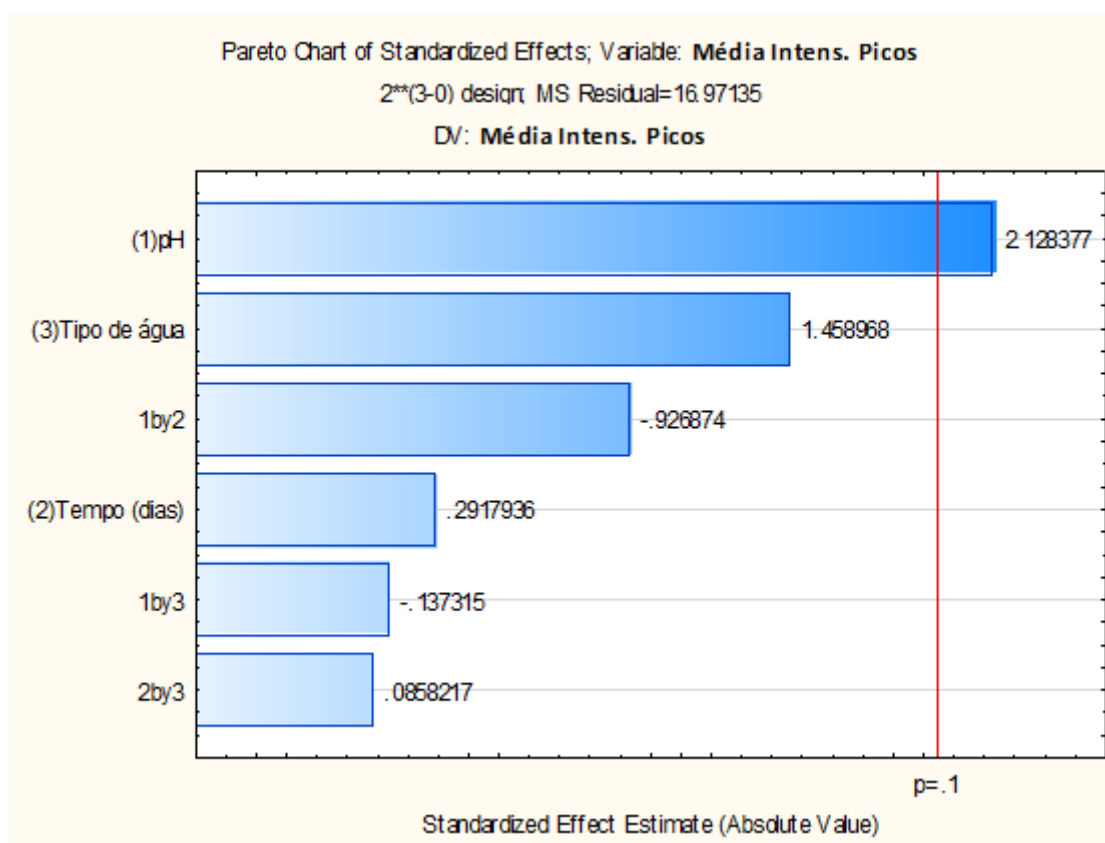
IX) Efeito na Resposta Número de picos na 2ª metade (Apolares) observados no CLAE-EM.

ANOVA; Var.: #Picos 2a metade ; R-sqr=.58595; Adj.:.17191 (CZAPECK) 2**(3-0) design; MS Residual=532.7596 DV: #Picos 2a metade					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH	15.125	1	15.125	0.028390	0.871732
(2)Tempo (dias)	210.125	1	210.125	0.394409	0.553128
(3)Tipo de água	55.125	1	55.125	0.103471	0.758615
1 by 2	666.125	1	666.125	1.250329	0.306250
1 by 3	3081.125	1	3081.125	5.783331	0.052944
2 by 3	496.125	1	496.125	0.931236	0.371809
Error	3196.558	6	532.760		
Total SS	7720.308	12			



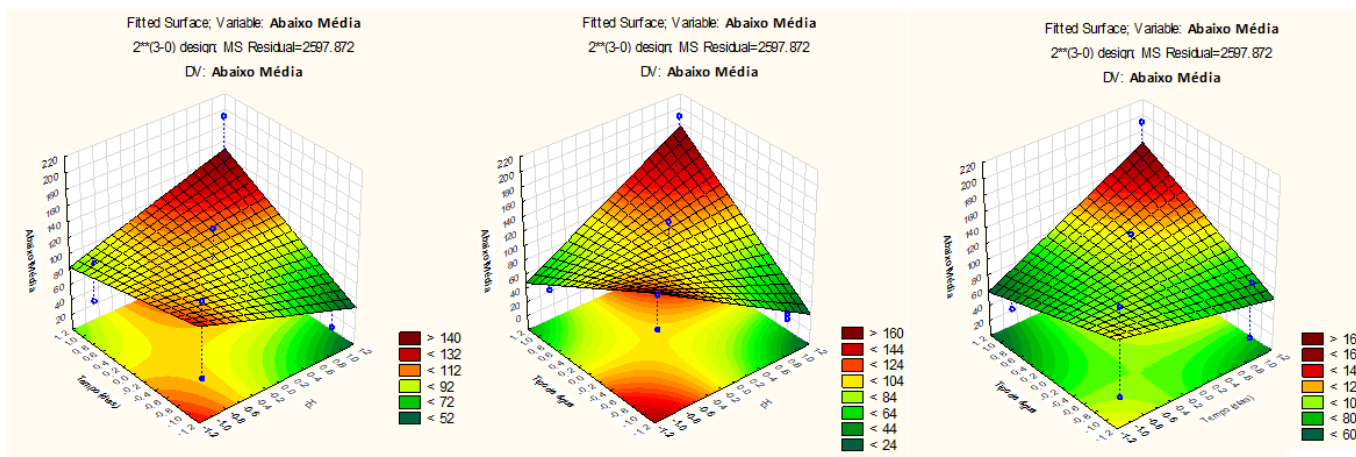
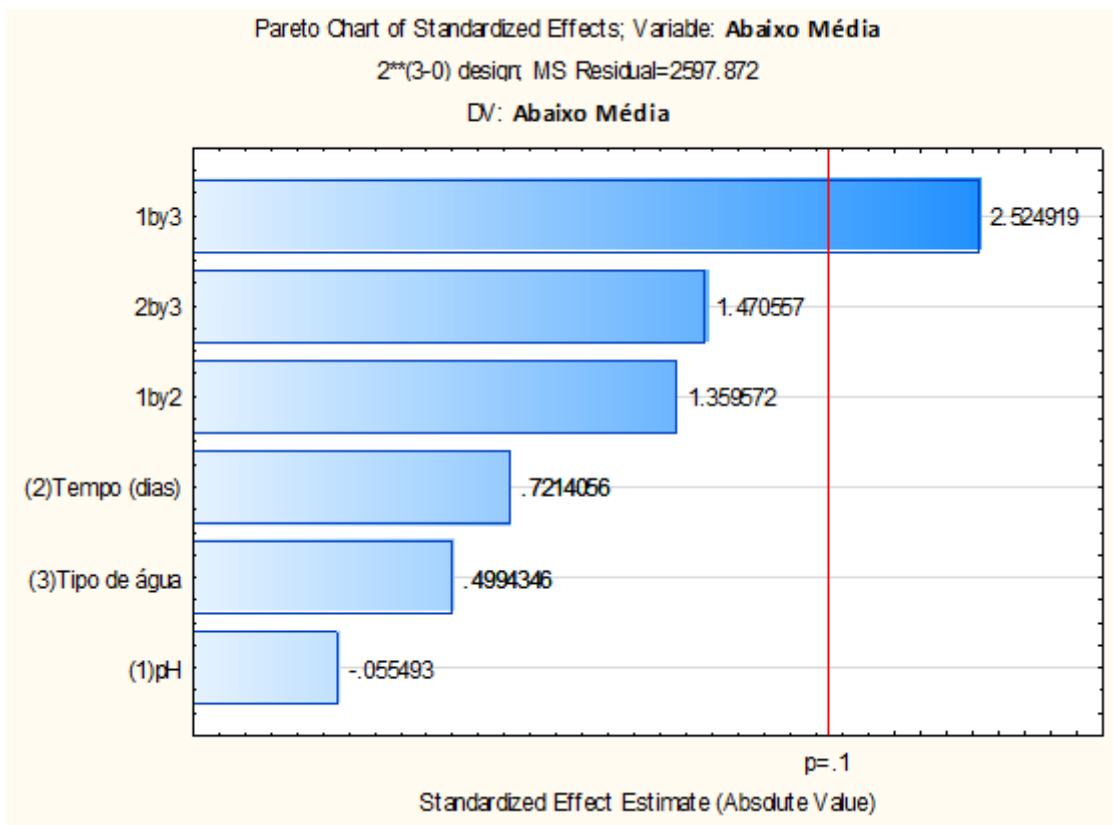
X) Efeito na Resposta Intensidade dos picos no CLAE-EM

ANOVA; Var.: Média Intens. Picos ; R-sqr=.55976; Adj.:1.1953 (CZAPECK 2**(3-0) design; MS Residual=16.97135 DV: Média Intens. Picos					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH	76.8800	1	76.88000	4.529988	0.077383
(2)Tempo (dias)	1.4450	1	1.44500	0.085144	0.780270
(3)Tipo de água	36.1250	1	36.12500	2.128588	0.194857
1 by 2	14.5800	1	14.58000	0.859095	0.389753
1 by 3	0.3200	1	0.32000	0.018855	0.895274
2 by 3	0.1250	1	0.12500	0.007365	0.934400
Error	101.8281	6	16.97135		
Total SS	231.3031	12			



XI) Efeito na Resposta Intensidade de picos (Abaixo da média) no CLAE-EM.

ANOVA; Var.: Abaixo Média ; R-sqr=.65033; Adj.:.30066 (CZAPECK 2**(3-0) design; MS Residual=2597.872 DV: Abaixo Média					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH	8.00	1	8.00	0.003079	0.957548
(2)Tempo (dias)	1352.00	1	1352.00	0.520426	0.497796
(3)Tipo de água	648.00	1	648.00	0.249435	0.635255
1 by 2	4802.00	1	4802.00	1.848436	0.222838
1 by 3	16562.00	1	16562.00	6.375218	0.044987
2 by 3	5618.00	1	5618.00	2.162539	0.191814
Error	15587.23	6	2597.87		
Total SS	44577.23	12			



XII) Efeito na Resposta Intensidade dos picos (Acima da média) no CLAE-EM.

ANOVA; Var.: Acima Média ; R-sqr=.88671; Adj:.77342 (CZAPECK 2**(3-0) design; MS Residual=3.721154 DV: Acima Média					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH	28.1250	1	28.12500	7.55814	0.033327
(2)Tempo (dias)	10.1250	1	10.12500	2.72093	0.150134
(3)Tipo de água	66.1250	1	66.12500	17.77003	0.005589
1 by 2	6.1250	1	6.12500	1.64599	0.246832
1 by 3	36.1250	1	36.12500	9.70801	0.020696
2 by 3	28.1250	1	28.12500	7.55814	0.033327
Error	22.3269	6	3.72115		
Total SS	197.0769	12			

