



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“Júlio de Mesquita Filho”  
Instituto de Química



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

**Fungos endofíticos associados à *Platonia insignis* Mart.: estudo dos metabólitos voláteis e não voláteis de *Diaporthe hongkongensis* e *Phyllosticta elongata***

Isabella Cristhina Gonçalves Costa

Araraquara

2019

ISABELLA CRISTHINA GONÇALVES COSTA

Fungos endofíticos associados à *Platonia insignis* Mart.: estudo dos metabólitos voláteis e não voláteis de *Diaporthe hongkongensis* e *Phyllosticta elongata*

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

Orientadora: Profa. Dra. Angela Regina Araujo  
Co-orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro

Araraquara  
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

C837f Costa, Isabella Cristhina Gonçalves  
Fungos endofíticos associados à *Platonia insignis* Mart.: estudo dos metabólitos voláteis e não voláteis de *Diaporthe hongkongensis* e *Phyllosticta elongata* / Isabella Cristhina Gonçalves Costa. – Araraquara : [s.n.], 2019  
251 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química

Orientador: Angela Regina Araujo

Coorientador: Alberto José Cavalheiro

1. Produtos naturais. 2. Fungos endofíticos. 3. Metabólitos.  
4. Compostos orgânicos voláteis. 5. Bacuri. I. Título.

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Fungos endofíticos associados à *Platonia insignis* Mart.: estudo dos metabólitos voláteis e não voláteis de *Diaporthe hongkongensis* e *Phyllosticta elongata*"

**AUTORA: ISABELLA CRISTHINA GONÇALVES COSTA**

**ORIENTADORA: ANGELA REGINA ARAUJO**

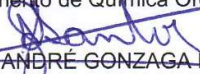
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ANGELA REGINA ARAUJO  
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



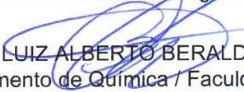
Profª. Drª. ISABELE RODRIGUES NASCIMENTO  
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS  
Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Profª. Drª. TAÍCIA PACHÊCO FILL  
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNICAMP - Campinas



Prof. Dr. LUIZ ALBERTO BERALDO DE MORAES  
Departamento de Química / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto

Araraquara, 16 de dezembro de 2019



## DADOS CURRICULARES

### Dados Pessoais

**Nome:** Isabella Cristhina Gonçalves Costa

**Nome em citações bibliográficas:** COSTA, I. C. G.

### Endereço Profissional

NuBBE “Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais”  
Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara –  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-Unesp, Araraquara-SP.  
Rua Prof. Francisco Degni, 55 – Araraquara-SP, CEP: 14081-970, SP – Brasil.

**e-mail:** isabelacgc@hotmail.com

### Formação Acadêmica

#### **2007-2011**

Graduação: Bacharelado em Química

Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina-PI.

#### **2012-2015**

Mestrado em Química - Área de concentração: Química Orgânica

Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina-PI.

Título: Constituintes químicos e potencial farmacológico das cascas do caule de  
*Platonia insignis* Mart. (clusiaceae).

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Helena Chaves

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES.

#### **2015-2019**

Doutorado em Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Instituto de  
Química, Araraquara-SP.

Orientadora: Profa. Dra. Angela Regina Araujo

Co-orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPE.

## **Produção Bibliográfica**

### **Artigos completos publicados em periódicos**

- a) SOUZA, A. C.; ALVES, M. M. M.; BRITO, L. M.; OLIVEIRA, L. G. C.; SOBRINHO-JÚNIOR, E. P. C.; **COSTA, I. C. G.**; FREITAS, S. D. L.; RODRIGUES, K. A. F.; CHAVES, M. H.; ARCANJO, D. D. R.; CARVALHO, F. A. A. *Platonia insignis* Mart., a Brazilian Amazonian Plant: The Stem Barks Extract and Its Main Constituent Lupeol Exert Antileishmanial Effects Involving Macrophages Activation. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1-12, 2017.
- b) PIAULINO, C. A.; LOPES, E. M.; MARTINS JUNIOR, L. L.; XAVIER, L. G. L.; **COSTA, I. C. G.**; CHAVES, M. H.; BRITO, S. M. R. C. Avaliação da atividade antinociceptiva da casca do fruto de *Platonia insignis* MART. (BACURI) em modelo de neuropatia induzida pela constrição do nervo ciático. **Revista Interdisciplinar Ciências e Saúde**, v. 4, p. 22-26, 2017.

### **Trabalhos publicados em anais de eventos científicos**

- a) **COSTA, I. C. G.**; CAMARGO, I. L. B. C; SOMENSI, A.; BOLZANI, V. S ARAUJO, A. R. Chemical constituents of *Phyllosticta elongata*, an endophytic fungus from *Platonia insignis* Mart. In: IX Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2019, Rio Claro-SP, Brasil.
- b) **COSTA, I. C. G.**; ARAUJO, A. R.; CAMARGO, I. L. B. C; BOLZANI, V. S. Secondary metabolites of *Diaporthe hongkongensis*, an endophytic fungus from *Platonia insignis* Mart. In: 6th BCNP Brazilian Conference on Natural Products/XXXII RESEM, 2017, Vitória-ES, Brasil.
- c) FREITAS, S. D. L.; **COSTA, I. C. G.**; CHAVES, M. H.; Vieira Júnior, G. M.; FERREIRA, P. M. P.; PESSOA, C. O. Chemical constituents and pharmacological potential of stem bark of *Platonia insignis* Mart.. In: 6th BCNP

Brazilian Conference on Natural Products/XXXII RESEM, 2017, Vitória-ES, Brasil.

- d) PIAUILINO, C. A.; LOPES, E. M.; MARTINS JÚNIOR, L. L.; XAVIER, L. G. L.; **COSTA, I. C. G.**; CHAVES, M. H.; BRITO, S. M. R. C. Avaliação da atividade antinociceptiva da casca do fruto de *Platonia insignis* Mart. (bacuri) em modelo de neuropatia induzida pela constrição do nervo ciático In: II Simpósio Nordeste de Recursos Naturais e Potencialidades Terapêuticas (II RENAPTE), 2017, Teresina-PI, Brasil.

### **Participações em eventos científicos**

- a) IX Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2019, Rio Claro-SP, Brasil.
- b) Comissão organizadora das atividades relacionadas ao INCTBioNat, no contexto da Semana Nacional da Ciência e Tecnologia (SNCT), 2018, Araraquara.
- c) Evento “Oficina sobre o cadastro no SISGEN”, organizado pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP, 2018, Araraquara-SP, Brasil.
- d) 9ª Reunião de Avaliação do PROGRAMA BIOTA-FAPESP, 2017, São Pedro-SP.
- e) 6th BCNP Brazilian Conference on Natural Products/XXXII RESEM, 2017, Vitória-ES, Brasil.
- f) 1º Workshop de Inovação e Empreendedorismo do Instituto de Química, 2016, Araraquara-SP, Brasil.

### **Participações em cursos de curta duração**

- a) Participação no curso: “**Ecologia microbiana: diversidade genética e funcional de fungos na decomposição vegetal**” (carga horária: 8 horas) no IX Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2019, Rio Claro, SP, Brasil.

- b) Participação no curso: “**Aplicação da Espectrometria de Massas em Interações Ecológicas**”, com duração de 8 horas, durante a 9ª Reunião de Avaliação do PROGRAMA BIOTA–FAPESP, 2017, São Pedro, SP.

### **Supervisão Científica**

- a) Karolini Starnino Berssan, graduanda em Química. Projeto: Fungos endofíticos: recursos renováveis na produção de metabólitos secundários novos e bioativos.  
Iniciação Científica 2017-2018. IQ/Unesp, Araraquara-SP, CNPq.

*Dedico esta tese*

*À minha mãe, Isabel e aos meus irmãos, Bruno e Maria Isabel, por todo apoio e incentivo nesta caminhada.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo seu amor e proteção, por ser minha fortaleza e permitir concluir mais um ciclo na minha vida.

À minha família, em especial à minha mãe e irmãos, por todo apoio e incentivo. Mãe, obrigada por acreditar nos meus sonhos e me proporcionar incondicionalmente todos os requisitos necessários para chegar até aqui. A senhora é a minha maior inspiração.

À minha orientadora, professora Angela Regina Araujo, por ter aceito orientar a minha tese de doutorado. Obrigada por todos os ensinamentos, paciência, amizade e por me apresentar esse mundo fascinante dos fungos endofíticos.

Às amigas Andressa e Carol, pela amizade, por todo conhecimento transmitido e pela grande ajuda durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos do IQ, em especial aos do Departamento de Química Orgânica e NuBBE, com os quais convivi durante o doutorado. Obrigada, pela amizade, troca de conhecimentos e momentos de alegrias compartilhados.

Aos professores Lourdes Campaner e André Gonzaga por terem participado do meu exame de qualificação e pelas valiosas contribuições.

Ao meu co-orientador Alberto José Cavalheiro, pelas sugestões e ensinamentos transmitidos.

Ao Dr. Nivaldo Boralle, pela amizade, paciência e conhecimentos transmitidos em cada análise de RMN realizada.

Aos docentes do Departamento de Química Orgânica, pela amizade e conhecimentos passados.

Aos técnicos João Bronzel, Juliana Rodrigues e Lucineia pelo auxílio durante as análises, ensinamentos e pela amizade.

Ao Marquinhos pelos inúmeros auxílios durante o desenvolvimento dos experimentos.

À minha aluna de Iniciação Científica, Karolini Berssan, pela amizade e constante apoio.

À Profa. Dra. Ilana L. B. C. Camargo, Dra. Karina Fraige, Profa. Dra. Letícia V. C. Lotufo e Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo pelos ensaios biológicos.

A todos os funcionários do Instituto de Química de Araraquara, por sempre serem prestativos e pela dedicação.

Às agências de fomento CAPES, FAPESP, CNPq e INCT pelo apoio financeiro.

Por fim, agradeço aos amigos de longas datas, e aos novos que Araraquara e São Carlos me proporcionaram, por todo carinho, amizade, apoio e momentos de alegrias compartilhados.

*“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.*

*Fernando Pessoa*



## RESUMO

Os fungos endofíticos, representam uma fonte promissora na descoberta de produtos naturais. Estes endófitos têm se revelado pela alta capacidade na produção de diversas classes de metabólitos secundários com uma ampla variedade de atividades biológicas, tais como: antimicrobiana, citotóxica, antioxidante, ansiolítica e inseticida. Estas observações motivaram o desenvolvimento do presente estudo, o qual visou a prospecção química e biológica dos fungos endofíticos associados à *Platonia insignis* Mart. O isolamento dos fungos endofíticos resultou em dezoito linhagens puras, sendo estes cultivados em meio líquido de MDB, para obtenção dos respectivos extratos brutos. Estes foram avaliados quanto ao perfil químico e biológico, os quais demonstram ser promissores para produção de substâncias bioativas. A prospecção inicial conduziu a seleção de dois fungos endofíticos, identificados como *Diaporthe hongkongensis* e *Phyllosticta elongata* para desenvolvimento do trabalho. Duas abordagens foram aplicadas a fim de verificar a influência da composição nutricional frente a produção metabólica de *D. hongkongensis* e *P. elongata*: cultivo em meio de MDB e cultivo em meio sólido de milho. O estudo de *D. hongkongensis*, cultivado em MDB, resultou no isolamento de uma dicetopiperazina, ariletilamida, acetilriptamina e o acetato de metila-[2-oxo-2-(feniletilamino)], sendo o primeiro relato de isolamento deste composto como produto natural. Do cultivo deste endófito, em meio de milho, foram isolados o alternariol, um éster de ácido graxo e 4 esteroides, que se encontram em fase de determinação estrutural. O cultivo de *P. elongata* em meio MDB, conduziu ao isolamento de três dicetopiperazinas, uma isoflavona (daidzeína), tirosol, ácido 4-hidroxibenzoico e dois meroterpenoides. A partir do cultivo desta linhagem em meio de milho, foram isolados os enantiômeros enantio-flavipesina B e flavipesina B e novamente o meroterpeno guignardona A. As substâncias flavipesina B e guignardona A foram testadas frente a bactérias resistentes e à cepa de *Trypanosoma cruzi*, respectivamente, as quais apresentaram atividade significativas. Estes dois endófitos também foram investigados quanto à produção de compostos orgânicos voláteis (COVs), em diferentes condições de cultivo, no qual utilizou-se dois meios de cultivo sólido, sendo o BDA e o milho, e dois períodos de incubação distintos (7 e 14 dias). Os resultados obtidos mostraram que estes fungos representam uma fonte promissora de COVs, e que mudanças nas condições de cultivo, bem como experimentos de co-cultivo podem levar a produção diferentes COVs. Portanto, esses resultados ressaltam a importância do estudo da diversidade metabólica de fungos endofíticos, sugerindo um papel ecológico destes endófitos quando associados à espécie vegetal. Além disso, este é o primeiro relato de estudo químico de *D. hongkongensis* e *P. elongata*.

Palavras-chave: *Platonia insignis* Mart. Fungos endofíticos. *Diaporthe hongkongensis*. *Phyllosticta elongata*.

## ABSTRACT

Endophytic fungi represent a promising source for the discovery of natural products. These endophytes have been shown to be highly capable of producing various classes of secondary metabolites with a wide variety of biological activities such as antimicrobial, cytotoxic, antioxidant, anxiolytic and insecticide. These observations motivated the development of the present study, which aimed at the chemical and biological prospecting of endophytic fungi associated with *Platonia insignis* Mart. The isolation of endophytic fungi resulted in eighteen pure strains, which were cultivated in liquid medium of PDB, to obtain the respective crude extracts. These extracts were evaluated for chemical and biological profile, which show promise for bioactive substances production. The initial prospecting led to the selection of two endophytic fungi, identified as *Diaporthe hongkongensis* and *Phyllosticta elongata* to develop the work. Two approaches were applied to verify the influence of nutritional composition on the metabolic production of *D. hongkongensis* and *P. elongata*: cultivation in PDB medium and cultivation in solid corn medium. The study of *D. hongkongensis* grown in PDB resulted in the isolation of a diketopiperazine, arylethylamide, acetyltryptamine and methyl [2-oxo-2-(phenylethylamino)] acetate, being the first report of isolation of this compound as a natural product. From the cultivation of this endophyte in corn medium, alternariol, a fatty acid ester and four steroids, which are in the structural determination phase, were isolated. Cultivation of *P. elongata* in PDB medium led to the isolation of three diketopiperazines, one isoflavone (daidzein), tyrosol, 4-hydroxybenzoic acid and two meroterpenoids. From the cultivation of this strain in corn medium, the enantiomers enanti-flavipesin B and flavipesin B were isolated and again the meroterpene guignardone A. The compounds flavipesin B and guignardone A were tested against resistant bacteria and *Trypanosoma cruzi* strain, respectively, which showed significant activity. These two endophytes were also investigated for the production of volatile organic compounds (VOCs) under different cultivation conditions, using two solid culture media, BDA and maize, and two distinct incubation periods (7 and 14 days). The results showed that these fungi represent a promising source of VOCs, and that changes in cultivation conditions as well as co-cultivation experiments can lead to different production of VOCs. Therefore, these results underscore the importance of studying the metabolic diversity of endophytic fungi, suggesting an ecological role of these endophytes when associated with plant species. Also, this is the first chemical study report of *D. hongkongensis* and *P. elongata*.

Keywords: *Platonia insignis* Mart. Endophytic fungi. *Diaporthe hongkongensis*. *Phyllosticta elongata*.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Estruturas químicas dos anticancerígenos taxol e camptotecina.....  | 28 |
| <b>Figura 2.</b> Substâncias produzidas por fungos endófiticos com atividade antibacteriana e antibiofilme.....  | 31 |
| <b>Figura 3.</b> <i>Platonia insignis</i> , folhas e frutos.....   | 36 |
| <b>Figura 4.</b> Substâncias produzidas por espécies pertencentes ao gênero <i>Diaporthe</i> .....   | 37 |
| <b>Figura 5.</b> Substâncias produzidas por espécies pertencentes ao gênero <i>Phyllosticta</i> .....  | 39 |
| <b>Figura 6.</b> Fungos endófiticos <i>Diaporthe hongkongensis</i> (a) e <i>Phyllosticta elongata</i> (b) cultivados em BDA em placa de Petri.....   | 40 |
| <b>Figura 7.</b> Etapas de isolamento das linhas fúngicas.....   | 48 |
| <b>Figura 8.</b> Cultivo e obtenção dos extratos brutos em MDB.....  | 50 |
| <b>Figura 9.</b> Fracionamento por CC do extrato bruto de <i>Diaporthe hongkongensis</i> (PI_G_13) obtido em escala ampliada.....  | 52 |
| <b>Figura 10.</b> Fracionamento por CC do extrato bruto de <i>Phyllosticta elongata</i> (PI_F_2) obtido em escala ampliada.....  | 52 |
| <b>Figura 11.</b> Isolamento das substâncias da fração PI_G13_Fr3, produzidas por <i>Diaporthe hongkongensis</i> .....   | 53 |
| <b>Figura 12.</b> Fracionamento em coluna de PI_F2_Fr2.....  | 54 |
| <b>Figura 13.</b> Isolamento das substâncias da fração PI_F2_Fr2_I, produzidas por <i>Phyllosticta elongata</i> .....  | 54 |
| <b>Figura 14.</b> Isolamento das substâncias da fração PI_F2_Fr3, produzidas por <i>Phyllosticta elongata</i> .....  | 55 |
| <b>Figura 15.</b> Isolamento das substâncias da fração PI_F2_Fr4, produzidas por <i>Phyllosticta elongata</i> .....  | 56 |
| <b>Figura 16.</b> Cultivo e obtenção do extrato bruto de <i>D. hongkongensis</i> e <i>P. elongata</i> em meio de cultivo Milho.....  | 57 |
| <b>Figura 17.</b> Fracionamento do extrato bruto de <i>D. hongkongensis</i> obtido em meio de cultivo milho.....   | 58 |
| <b>Figura 18.</b> Fracionamento do extrato bruto de <i>P. elongata</i> obtido em meio de cultivo milho.....  | 58 |
| <b>Figura 19.</b> Isolamento das substâncias da fração PI-G13-Mi-52-66.....  | 59 |
| <b>Figura 20.</b> Isolamento das substâncias da fração PI-F2-Mi-65-84.....   | 60 |
| <b>Figura 21.</b> Experimento para determinação dos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por <i>D. hongkongensis</i> e <i>P. elongata</i> por HS-SPME.....   | 67 |
| <b>Figura 22.</b> Fungos endófiticos isolados dos galhos de <i>P. insignis</i> .....   | 71 |
| <b>Figura 23.</b> Fungos endófiticos isolados das folhas e fruto de <i>P. insignis</i> .....   | 71 |
| <b>Figura 24.</b> Cromatogramas dos extratos brutos dos fungos endófiticos isolados dos galhos de <i>P. insignis</i> , em coluna C18, gradiente linear H <sub>2</sub> O/MeOH 95:05 à 00:100 em 40 min, $\lambda=254$ nm..... | 73 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 25.</b> Cromatogramas dos extratos brutos dos fungos endofíticos isolados das folhas de <i>P. insignis</i> em coluna C18, gradiente linear H <sub>2</sub> O/MeOH 95:05 à 00:100 em 40 min, $\lambda=254$ nm.....                    | 75 |
| <b>Figura 26.</b> Cromatograma do extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto de <i>P. insignis</i> em coluna C18, gradiente linear H <sub>2</sub> O/MeOH 95:05 à 00:100 em 40 min, $\lambda=254$ nm. ....                             | 75 |
| <b>Figura 27.</b> Espectros de RMN de <sup>1</sup> H dos extratos brutos obtidos em MDB dos fungos endofíticos isolados dos galhos de <i>P. insignis</i> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 300 MHz).....   | 77 |
| <b>Figura 28.</b> Espectros de RMN de <sup>1</sup> H dos extratos brutos obtidos em MDB dos fungos endofíticos isolados das folhas de <i>P. insignis</i> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 300 MHz).....   | 78 |
| <b>Figura 29.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do extrato bruto obtido em MDB do fungo endofítico isolado do fruto de <i>P. insignis</i> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 300 MHz) .....   | 79 |
| <b>Figura 30.</b> Avaliação dos extratos brutos a 512 $\mu\text{g mL}^{-1}$ frente à capacidade de erradicação de biofilme formado por <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984.....  | 82 |
| <b>Figura 31.</b> Percentual de inibição dos extratos brutos na formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs) .....   | 84 |
| <b>Figura 32.</b> Regressão não linear do controle positivo doxorrubicina nas concentrações de 0,0032 a 10 $\mu\text{M}$ frente às linhagens de carcinoma cólon-retal (HCT-116) e adenocarcinoma de mama (MCF-7) (média $\pm$ SEM) (n=2)..... | 88 |
| <b>Figura 33.</b> Cromatograma do extrato bruto de <i>D. hongkongensis</i> - MDB, em coluna C18, gradiente linear H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> OH 95:05 à 00:100 em 40 min, mais 10 min de limpeza, em 254 nm.....                        | 91 |
| <b>Figura 34.</b> Cromatograma do extrato bruto de <i>D. hongkongensis</i> - Milho, em coluna C18, gradiente linear H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> OH 95:05 à 00:100 em 40 min, mais 10 min de limpeza, em 254 nm.....                      | 91 |
| <b>Figura 35.</b> Cromatograma do extrato bruto de <i>P. elongata</i> - MDB, em coluna C18, gradiente linear H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> OH 95:05 à 00:100 em 40 min, mais 10 min de limpeza, em 254 nm.....                             | 92 |
| <b>Figura 36.</b> Cromatograma do extrato bruto de <i>P. elongata</i> - Milho, em coluna C18, gradiente linear H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> OH 95:05 à 00:100 em 40 min, mais 10 min de limpeza, em 254 nm.....                           | 92 |
| <b>Figura 37.</b> Espectros de RMN de <sup>1</sup> H dos extratos brutos de <i>D. hongkongensis</i> em MDB (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 300 MHz) .....  | 93 |
| <b>Figura 38.</b> Espectros de RMN de <sup>1</sup> H dos extratos brutos de <i>D. hongkongensis</i> em milho (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 300 MHz) .....  | 94 |
| <b>Figura 39.</b> Espectros de RMN de <sup>1</sup> H do extrato bruto de <i>P. elongata</i> em MDB (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 300 MHz) .....  | 94 |
| <b>Figura 40.</b> Espectros de RMN de <sup>1</sup> H do extrato bruto de <i>P. elongata</i> em milho (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 300 MHz) .....  | 95 |
| <b>Figura 41.</b> Avaliação dos extratos PI-G13-MDB e PI-F2-MDB frente à capacidade de erradicação de biofilme formado por <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984.....  | 96 |
| <b>Figura 42.</b> Avaliação dos extratos PI-G13-Mi e PI-F2-Mi frente à capacidade de erradicação de biofilme formado por <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984.....  | 96 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 43.</b> Substâncias produzidas por <i>D. hongkongensis</i> cultivado em MDB e milho.....                   | 98  |
| <b>Figura 44.</b> Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC da substância <b>1</b> .....  | 100 |
| <b>Figura 45.</b> Espectro de massas (+)-ESI-MS da substância <b>1</b> .....   | 102 |
| <b>Figura 46.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>1</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).....    | 103 |
| <b>Figura 47.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>1</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 150 MHz)..... | 104 |
| <b>Figura 48.</b> Mapa de contorno HSQC da substância <b>1</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150 MHz).....        | 105 |
| <b>Figura 49.</b> Mapa de contorno HMBC da substância <b>1</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150MHz).....         | 106 |
| <b>Figura 50.</b> Mapa de contorno COSY da substância <b>1</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).....              | 107 |
| <b>Figura 51.</b> Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC da substância <b>2</b> .....  | 108 |
| <b>Figura 52.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>2</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz) .....   | 110 |
| <b>Figura 53.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>2</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 150 MHz)..... | 111 |
| <b>Figura 54.</b> Mapa de contorno HSQC da substância <b>2</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150 MHz).....        | 112 |
| <b>Figura 55.</b> Mapa de contorno HMBC da substância <b>2</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150 MHz).....        | 113 |
| <b>Figura 56.</b> Mapa de contorno COSY da substância <b>2</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).....              | 114 |
| <b>Figura 57.</b> Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC da substância <b>3</b> .....  | 116 |
| <b>Figura 58.</b> Espectro de massas (+)-ESI-MS da substância <b>3</b> .....   | 117 |
| <b>Figura 59.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>3</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).....    | 118 |
| <b>Figura 60.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>3</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 150 MHz)..... | 119 |
| <b>Figura 61.</b> Mapa de contorno HSQC da substância <b>3</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150 MHz).....        | 120 |
| <b>Figura 62.</b> Mapa de contorno HMBC da substância <b>3</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150 MHz).....        | 121 |
| <b>Figura 63.</b> Mapa de contorno COSY da substância <b>3</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).....              | 122 |
| <b>Figura 64.</b> Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC da substância <b>4</b> .....            | 124 |
| <b>Figura 65.</b> Espectro de massas (+)-ESI-MS da substância <b>4</b> .....   | 125 |
| <b>Figura 66.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>4</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).....    | 126 |
| <b>Figura 67.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>4</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz)..... | 127 |
| <b>Figura 68.</b> Mapa de contorno HSQC da substância <b>4</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150 MHz).....        | 128 |
| <b>Figura 69.</b> Mapa de contorno HMBC da substância <b>4</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150 MHz).....        | 129 |
| <b>Figura 70.</b> Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC da substância <b>12</b> .....           | 131 |
| <b>Figura 71.</b> Espectro de massas (+)-ESI-MS da substância <b>12</b> .....  | 132 |
| <b>Figura 72.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>12</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).....   | 133 |
| <b>Figura 73.</b> Espectro de DEPTQ da substância <b>12</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ;150 MHz).....                  | 134 |
| <b>Figura 74.</b> Mapa de contorno HSQC da substância <b>12</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150 MHz)....        | 135 |
| <b>Figura 75.</b> Mapa de contorno HMBC da substância <b>12</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150 MHz)....        | 136 |
| <b>Figura 76.</b> Principais correlações observadas em HMBC para a unidade A da estrutura de <b>13</b> .....         | 138 |
| <b>Figura 77.</b> Principais correlações observadas em HMBC para a unidade B da estrutura de <b>13</b> .....         | 138 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 78.</b> Correlação observada em HMBC, correspondente à conexão das unidades A e B da substância <b>13</b> ..... | 139 |
| <b>Figura 79.</b> Espectro de massas de alta resolução da substância <b>13</b> (ESI-Qq-TOF).....                          | 141 |
| <b>Figura 80.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>13</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).....        | 142 |
| <b>Figura 81.</b> Espectro de DEPTQ da substância <b>13</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 150 MHz).....                      | 143 |
| <b>Figura 82.</b> Mapa de contorno HSQC da substância <b>13</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150 MHz)....             | 144 |
| <b>Figura 83.</b> Mapa de contorno HMBC da substância <b>13</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150 MHz)....             | 145 |
| <b>Figura 84.</b> Mapa de contorno COSY da substância <b>13</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).....                  | 146 |
| <b>Figura 85.</b> Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC da substância <b>14</b> .....                | 148 |
| <b>Figura 86.</b> Principais correlações observadas no mapa de contorno COSY da substância <b>14</b> .....                | 148 |
| <b>Figura 87.</b> Espectro de massas de alta resolução da substância <b>14</b> (ESI-Qq-TOF).....                          | 150 |
| <b>Figura 88.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>14</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).....        | 151 |
| <b>Figura 89.</b> Espectro de DEPTQ da substância <b>14</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 150 MHz).....                      | 152 |
| <b>Figura 90.</b> Mapa de contorno HSQC da substância <b>14</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150 MHz)...              | 153 |
| <b>Figura 91.</b> Mapa de contorno HMBC da substância <b>14</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150 MHz)....             | 154 |
| <b>Figura 92.</b> Mapa de contorno COSY da substância <b>14</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150 MHz)....             | 155 |
| <b>Figura 93.</b> Substâncias produzidas por <i>P. elongata</i> cultivado em MDB e milho.....                             | 156 |
| <b>Figura 94.</b> Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC da substância <b>5</b> .....       | 157 |
| <b>Figura 95.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>5</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).....         | 159 |
| <b>Figura 96.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>5</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).....      | 160 |
| <b>Figura 97.</b> Mapa de contorno HSQC da substância <b>5</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150 MHz)....              | 161 |
| <b>Figura 98.</b> Mapa de contorno HMBC da substância <b>5</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150 MHz)....              | 162 |
| <b>Figura 99.</b> Mapa de contorno COSY da substância <b>5</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).....                   | 163 |
| <b>Figura 100.</b> Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC da substância <b>6</b> .....      | 165 |
| <b>Figura 101.</b> Espectro de massas (+)-ESI-MS da substância <b>6</b> .....   | 166 |
| <b>Figura 102.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>6</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ ; 600 MHz).....             | 167 |
| <b>Figura 103.</b> Espectro de DEPTQ da substância <b>6</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ ; 150 MHz).....                           | 168 |
| <b>Figura 104.</b> Mapa de contorno HSQC da substância <b>6</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ ; 600 e 150 MHz).....                 | 169 |
| <b>Figura 105.</b> Mapa de contorno HMBC da substância <b>6</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ ; 600 e 150 MHz).....                 | 170 |
| <b>Figura 106.</b> Mapa de contorno COSY da substância <b>6</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ ; 600 MHz).....                       | 171 |
| <b>Figura 107.</b> Experimento de NOESY-1D da substância <b>6</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ ; 600 MHz).....                     | 172 |
| <b>Figura 108.</b> Principais correlações observadas em HMBC para os anéis C e D da substância <b>7</b> .....             | 174 |
| <b>Figura 109.</b> Principais correlações observadas em HMBC para os anéis A, B e C da substância <b>7</b> .....          | 174 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 110.</b> Correlações observadas em HMBC para a cadeia lateral ligada a C-14 da substância <b>7</b> .....  | 175 |
| <b>Figura 111.</b> Espectro de dicroísmo circular eletrônico da substância <b>7</b> (200-400 nm).....   | 176 |
| <b>Figura 112.</b> Espectro de massas de alta resolução da substância <b>7</b> (ESI-Qq-TOF).....  | 178 |
| <b>Figura 113.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>7</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).....  | 179 |
| <b>Figura 114.</b> Mapa de contorno HSQC da substância <b>7</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150 MHz)....   | 180 |
| <b>Figura 115.</b> Mapa de contorno HMBC da substância <b>7</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150 MHz)....   | 181 |
| <b>Figura 116.</b> Mapa de contorno COSY da substância <b>7</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).....  | 182 |
| <b>Figura 117.</b> Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC da substância <b>8</b> .....  | 184 |
| <b>Figura 118.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>8</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).....  | 186 |
| <b>Figura 119.</b> Mapa de contorno HSQC da substância <b>8</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150 MHz)....   | 187 |
| <b>Figura 120.</b> Mapa de contorno HMBC da substância <b>8</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150 MHz)....   | 188 |
| <b>Figura 121.</b> Mapa de contorno COSY da substância <b>8</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).....  | 189 |
| <b>Figura 122.</b> Principais correlações observadas em HMBC para a cadeia lateral da substância <b>9</b> .....   | 191 |
| <b>Figura 123.</b> Espectro de dicroísmo circular eletrônico da substância <b>9</b> (200-400 nm).....   | 191 |
| <b>Figura 124.</b> Espectro de massas de alta resolução da substância <b>9</b> (ESI-Qq-TOF).....  | 194 |
| <b>Figura 125.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>9</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).....  | 195 |
| <b>Figura 126.</b> Mapa de contorno HSQC da substância <b>9</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150 MHz)....   | 196 |
| <b>Figura 127.</b> Mapa de contorno HMBC da substância <b>9</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150 MHz)....   | 197 |
| <b>Figura 128.</b> Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC da substância <b>10</b> .....   | 198 |
| <b>Figura 129.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>10</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).....   | 100 |
| <b>Figura 130.</b> Mapa de contorno HSQC da substância <b>10</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150 MHz)..  | 201 |
| <b>Figura 131.</b> Mapa de contorno HMBC da substância <b>10</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150 MHz)..  | 202 |
| <b>Figura 132.</b> Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC da substância <b>11</b> .....   | 203 |
| <b>Figura 133.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>11</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).....   | 205 |
| <b>Figura 134.</b> Mapa de contorno HSQC da substância <b>11</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150 MHz)..  | 206 |
| <b>Figura 135.</b> Mapa de contorno HMBC da substância <b>11</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 e 150 MHz).....   | 207 |
| <b>Figura 136.</b> Principais correlações observadas em HMBC para <b>15</b> .....   | 209 |
| <b>Figura 137.</b> Cromatograma das substâncias <b>15a</b> e <b>15b</b> , em coluna CHIRALCEL-OD-RH, eluição isocrática $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (53:47 v/v; $1\text{ mL min}^{-1}$ ) por 15 min, em 280 nm.... | 210 |
| <b>Figura 138.</b> Espectro de massas de alta resolução da substância <b>15</b> (ESI-Qq-TOF).....   | 213 |
| <b>Figura 139.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ das substâncias <b>15a</b> e <b>15b</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 Mz)..   | 214 |
| <b>Figura 140.</b> Espectro de DEPTQ das substâncias <b>15a</b> e <b>15b</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 150 Mz).....  | 215 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 141.</b> Mapa de contorno HSQC das substâncias <b>15a</b> e <b>15b</b> (CD <sub>3</sub> OD; 600 e 150 Mz).....   | 216 |
| <b>Figura 142.</b> Mapa de contorno HMBC das substâncias <b>15a</b> e <b>15b</b> (CD <sub>3</sub> OD; 600 e 150 Mz).....   | 217 |
| <b>Figura 143.</b> Mapa de contorno COSY das substâncias <b>15a</b> e <b>15b</b> (CD <sub>3</sub> OD; 600 Mz).....   | 218 |
| <b>Figura 144.</b> Comparação dos perfis cromatográfico dos COVs de <i>D. hongkongensis</i> cultivado em BDA e analisado após 7 e 14 dias.....   | 221 |
| <b>Figura 145.</b> Comparação dos perfis cromatográfico dos COVs de <i>D. hongkongensis</i> cultivado em milho e analisado após 7 e 14 dias.....   | 221 |
| <b>Figura 146.</b> Comparação dos perfis cromatográfico dos COVs de <i>P. elongata</i> cultivado em BDA e analisado após 7 e 14 dias.....  | 224 |
| <b>Figura 147.</b> Comparação dos perfis cromatográfico dos COVs de <i>P. elongata</i> cultivado em milho e analisado após 7 e 14 dias.....  | 224 |
| <b>Figura 148.</b> Comparação dos perfis cromatográfico dos COVs obtidos do co-cultivo de <i>D. hongkongensis</i> e <i>P. elongata</i> , cultivados em BDA e analisado após 7 e 14 dias.....   | 226 |
| <b>Figura 149.</b> Comparação dos perfis cromatográfico dos COVs obtidos do co-cultivo de <i>D. hongkongensis</i> e <i>P. elongata</i> , cultivados em milho e analisado após 7 e 14 dias..... | 227 |



## LISTA DE TABELAS

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabela 1.</b> Meios de cultura utilizados para o cultivo dos fungos endofíticos.....  | 44  |
| <b>Tabela 2.</b> Equipamentos para o desenvolvimento do projeto.....   | 47  |
| <b>Tabela 3.</b> Tempo de esterilização dos galhos, folhas e frutos.....   | 48  |
| <b>Tabela 4.</b> Massa dos extratos brutos obtida do cultivo dos endófitos em MDB (escala reduzida).....   | 72  |
| <b>Tabela 5.</b> Resultado da atividade antibacteriana dos extratos brutos frente às linhagens resistentes. ....   | 80  |
| <b>Tabela 6.</b> Percentual de inibição da enzima acetilcolinesterase frente aos extratos/padrões. ....  | 85  |
| <b>Tabela 7.</b> Inibição do crescimento celular (%) dos extratos brutos frente às linhagens de carcinoma cólon-retal (HCT-116) e adenocarcinoma de mama (MCF-7), nas concentrações de 5 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (média $\pm$ SEM) (n=2)..... | 87  |
| <b>Tabela 8.</b> Inibição do crescimento celular (%) dos extratos frente às linhagens de carcinoma cólon-retal (HCT-116) e adenocarcinoma de mama (MCF-7), nas concentrações de 5 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (média $\pm$ SEM) (n=2).....        | 97  |
| <b>Tabela 9.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , HMBC e COSY ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 150 MHz) de <b>1</b> ( $\delta$ em ppm e $J$ em Hz).....  | 101 |
| <b>Tabela 10.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , HMBC e COSY ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 150 MHz) de <b>2</b> ( $\delta$ em ppm e $J$ em Hz).....   | 109 |
| <b>Tabela 11.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , HMBC e COSY ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 150 MHz) de <b>3</b> ( $\delta$ em ppm e $J$ em Hz).....   | 116 |
| <b>Tabela 12.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , HMBC e COSY ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) de <b>4</b> ( $\delta$ em ppm e $J$ em Hz).....   | 124 |
| <b>Tabela 13.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , HMBC e COSY ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 150 MHz) de <b>12</b> ( $\delta$ em ppm e $J$ em Hz).....  | 132 |
| <b>Tabela 14.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e HMBC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 150 MHz) de <b>13</b> ( $\delta$ em ppm e $J$ em Hz).....   | 140 |
| <b>Tabela 15.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , HMBC e COSY ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 150 MHz) de <b>14</b> ( $\delta$ em ppm e $J$ em Hz).....  | 149 |
| <b>Tabela 16.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , HMBC e COSY ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 150 MHz) de <b>5</b> ( $\delta$ em ppm e $J$ em Hz).....   | 158 |
| <b>Tabela 17.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , HMBC e COSY ( $\text{DMSO-}d_6$ , 600 e 150 MHz) de <b>6</b> ( $\delta$ em ppm e $J$ em Hz).....  | 166 |
| <b>Tabela 18.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e HMBC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 150 MHz) de <b>7</b> ( $\delta$ em ppm e $J$ em Hz).....  | 177 |
| <b>Tabela 19.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , HMBC e COSY ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 150 MHz) de <b>8</b> ( $\delta$ em ppm e $J$ em Hz).....   | 185 |
| <b>Tabela 20.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e HMBC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 150 MHz) de <b>9</b> ( $\delta$ em ppm e $J$ em Hz).....  | 193 |
| <b>Tabela 21.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e HMBC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 150 MHz) de <b>10</b> ( $\delta$ em ppm e $J$ em Hz).....   | 199 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabela 22.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e HMBC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 150 MHz) de <b>11</b> ( $\delta$ em ppm e $J$ em Hz).....               | 204 |
| <b>Tabela 23.</b> Resultado da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) para a substância <b>15a</b> .....                                   | 211 |
| <b>Tabela 24.</b> Resultado da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) para a substância <b>15b</b> .....                                   | 211 |
| <b>Tabela 25.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e HMBC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 150 MHz) de <b>15a</b> e <b>15b</b> ( $\delta$ em ppm e $J$ em Hz)..... | 212 |
| <b>Tabela 26.</b> Compostos orgânicos voláteis identificados de <i>D. hongkongensis</i> em diferentes condições de cultivo.....  | 222 |
| <b>Tabela 27.</b> Compostos orgânicos voláteis identificados de <i>P. elongata</i> em diferentes condições de cultivo.....   | 225 |
| <b>Tabela 28.</b> Compostos orgânicos voláteis identificados no co-cultivo de <i>D.hongkongensis</i> e <i>P. elongata</i> em diferentes condições de cultivo.....                | 228 |

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

|                        |   |
|------------------------|---|
| CLAE                   | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  |
| DAD                    | Detector de Arranjo de Diodos   |
| UV                     | Ultravioleta  |
| BDA                    | Batata Dextrose Agar  |
| MDB                    | Meio de Dextrose e Batata   |
| C18                    | Sílica gel de fase reversa tipo Octadecil silano  |
| CC                     | Cromatografia em coluna   |
| CCDC                   | Cromatografia em Camada Delgada Comparativa   |
| ESI-EM                 | Espectrometria de Massas-Ionização por <i>electrospray</i>  |
| Qq-TOF                 | Quadrupole-Time-of-Flight   |
| HS-SPME                | Headspace-Solid Phase Microextraction   |
| RMN de <sup>1</sup> H  | Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio   |
| RMN de <sup>13</sup> C | Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13   |
| NOESY                  | Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy  |
| HSQC                   | Heteronuclear Multiple Quantum Coherence  |
| HMBC                   | Heteronuclear Multiple Bond Coherence   |
| COSY                   | Correlation Spectroscopy  |
| TOCSY                  | Total Correlated Spectroscopy   |
| DEPTQ                  | Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer<br>(including detection of quaternary nuclei) |
| ppm                    | Partes por milhão   |
| NuBBE                  | Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de<br>Produtos Naturais                         |
| Phe                    | Fenilalanina  |
| Tyr                    | Tirosina  |
| Pro                    | Prolina   |
| Val                    | Valina  |
| Sub                    | Substância  |
| $\delta$               | Deslocamento químico  |
| $\lambda$              | Comprimento de onda   |
| [M+H] <sup>+</sup>     | Molécula protonada  |

|            |                          |
|------------|--------------------------|
| $[M+Na]^+$ | Molécula sodiada         |
| $J$        | Constante de acoplamento |
| $t_R$      | Tempo de retenção        |
| $s$        | Simpleto                 |
| $d$        | Dupleto                  |
| $dd$       | Duplo dupleto            |
| $t$        | Tripleto                 |
| $m$        | Multipleto               |
| $m/z$      | Relação massa-carga      |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. Introdução</b> .....   | 27 |
| <b>1.1 Fungos endofíticos e suas interações ecológicas</b> .....   | 27 |
| <b>1.2 Metabólitos não voláteis de fungos endofíticos</b> .....  | 29 |
| <b>1.3 Compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por fungos endofíticos</b> ..  | 33 |
| <b>1.4 <i>Platonia insignis</i> Mart., espécie vegetal hospedeira</b> .....  | 34 |
| <b>1.5 Gêneros: <i>Diaporthe</i> e <i>Phyllosticta</i></b> .....   | 36 |
| <b>2. Objetivo geral</b> .....   | 42 |
| <b>2.1 Objetivos específicos</b> .....   | 42 |
| <b>3. Materiais e Métodos</b> .....  | 44 |
| <b>3.1 Materiais</b> .....   | 44 |
| 3.1.1 Meios de cultivo.....  | 44 |
| 3.1.2 Solventes.....   | 44 |
| 3.1.3 Cromatografia em Coluna.....   | 44 |
| 3.1.4 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC).....  | 45 |
| 3.1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD).....                                   | 45 |
| 3.1.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....   | 45 |
| 3.1.7 Dicroísmo circular eletrônico.....   | 45 |
| 3.1.8 Rotação óptica específica.....   | 46 |
| 3.1.9 Espectrometria de Massas.....  | 46 |
| 3.1.10 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).....   | 46 |
| 3.1.11 Outros equipamentos.....  | 47 |
| <b>3.2 Métodos</b> .....   | 47 |
| 3.2.1 Obtenção das linhagens fúngicas.....   | 47 |
| 3.2.2 Identificação das linhagens.....   | 48 |
| 3.2.3 Obtenção dos extratos brutos das linhagens fúngicas em MDB (escala reduzida).....  | 49 |
| 3.2.4 Variações no meio de cultivo de <i>Diaporthe hongkongensis</i> e <i>Phyllosticta elongata</i> .....                          | 50 |
| 3.2.4.1 Obtenção dos extratos brutos de <i>Diaporthe hogkongensis</i> e <i>Phyllosticta elongata</i> em MDB (escala ampliada)..... | 51 |
| 3.2.4.1.1 Fracionamento dos extratos brutos obtidos em PDB (escala ampliada).....  | 51 |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2.4.1.2 Isolamento das substâncias produzidas por <i>Diaporthe hongkongensis</i> (PI_G_13).....   | 52        |
| 3.2.4.1.3 Isolamento das substâncias produzidas por <i>Phyllosticta elongata</i> (PI-F-2).....  | 53        |
| 3.2.4.2 Obtenção dos extratos brutos de <i>D. hongkongensis</i> e <i>P. elongata</i> em meio sólido de milho.....                             | 56        |
| 3.2.4.2.1 Fracionamento dos extratos brutos obtidos do cultivo em meio sólido de milho.....   | 57        |
| 3.2.4.2.2 Isolamento das substâncias produzidas por <i>D. hongkongensis</i> .....   | 58        |
| 3.2.4.2.3 Isolamento das substâncias produzidas por <i>P. elongata</i> .....  | 59        |
| 3.2.5 Ensaio Biológicos.....  | 60        |
| 3.2.5.1. Avaliação da atividade antibacteriana <sup>1</sup> .....   | 60        |
| 3.2.5.2 Determinação da capacidade de erradicação do biofilme <sup>2</sup> .....  | 62        |
| 3.2.5.3 Avaliação da atividade anti-glicação.....   | 63        |
| 3.2.5.4 Avaliação da atividade anticolinesterásica <sup>3</sup> .....   | 64        |
| 3.2.5.5 Avaliação da atividade citotóxica <sup>4</sup> .....  | 64        |
| 3.2.5.6 Ensaio frente a cepa de <i>Trypanosoma cruzi</i> <sup>5</sup> .....   | 65        |
| 3.2.6 Determinação dos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por <i>Diaporthe hongkongensis</i> e <i>Phyllosticta elongata</i> ..... | 66        |
| 3.2.6.1 Cultivos dos fungos endofíticos e extração dos COVs por HS-SPME (Microextração em Fase Sólida por Headspace).....                     | 66        |
| 3.2.6.2 Tratamento e análise dos dados.....   | 67        |
| <b>4. Bioprospecção dos fungos endofíticos associados à <i>Platonia insignis</i> Mart.</b> .....  | <b>70</b> |
| <b>4.1 Isolamento das cepas fúngicas</b> .....  | <b>70</b> |
| <b>4.2 Prospeção química dos fungos endofíticos isolados</b> .....  | <b>71</b> |
| <b>4.3 Prospeção biológica dos fungos isolados</b> .....  | <b>79</b> |
| 4.3.1 Avaliação da atividade antibacteriana.....  | 79        |
| 4.3.2 Determinação da capacidade de degradação de biofilme.....   | 80        |
| 4.3.3 Avaliação da atividade anti-glicação.....   | 83        |
| 4.3.4 Avaliação da atividade anticolinesterásica.....   | 84        |
| 4.3.5 Atividade citotóxica.....   | 86        |
| <b>5. Estudo do perfil metabólico de <i>Diaporthe hongkongensis</i> e <i>Phyllosticta elongata</i></b> .....                                  | <b>90</b> |

|   |     |
|---|-----|
| <b>5.1 Influência da composição do meio de cultivo na produção metabólica de <i>D. hongkongensis</i> e <i>P. elongata</i></b> ..... | 90  |
| <b>5.2 Identificação estrutural das substâncias produzidas por <i>D. hongkongensis</i></b> .....                                    | 98  |
| 5.2.1 Identificação estrutural da substância 1.....   | 99  |
| 5.2.2 Identificação estrutural da substância 2.....   | 108 |
| 5.2.3 Identificação estrutural da substância 3.....   | 115 |
| 5.2.4 Identificação estrutural da substância 4.....   | 123 |
| 5.2.5 Identificação estrutural da substância 12.....  | 130 |
| 5.2.6 Proposta estrutural para substância 13.....   | 137 |
| 5.2.7 Identificação estrutural da substância 14.....  | 147 |
| <b>5.3 Identificação estrutural das substâncias produzidas por <i>P. elongata</i></b> .....   | 156 |
| 5.3.1 Identificação estrutural da substância 5.....   | 157 |
| 5.3.2 Identificação estrutural da substância 6.....   | 164 |
| 5.3.3 Identificação estrutural da substância 7.....   | 173 |
| 5.3.4 Identificação estrutural da substância 8.....   | 183 |
| 5.3.5 Identificação estrutural da substância 9.....   | 190 |
| 5.3.6 Identificação estrutural da substância 10.....  | 198 |
| 5.3.7 Identificação estrutural da substância 11.....  | 203 |
| 5.3.8 Identificação estrutural das substâncias 15a e 15b.....   | 208 |
| <b>6. Identificação dos compostos orgânicos voláteis (COVs) de <i>D. hongkongensis</i> e <i>P. elongata</i></b> .....               | 219 |
| 6. 1 Análise dos COVs de <i>D. hongkongensis</i> .....  | 219 |
| 6. 2 Análise dos COVs de <i>P. elongata</i> .....   | 223 |
| 6. 3 Análise dos COVs do co-cultivo.....  | 225 |
| <b>7. Conclusões</b> .....  | 230 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 233 |
| <b>APÊNDICE</b> .....   | 248 |

## ***Introdução***



## 1. Introdução

### 1.1 Fungos endofíticos e suas interações ecológicas

Fungos endofíticos são microrganismos que habitam diferentes órgãos vegetais (raiz, caule, folha, frutos e sementes) das plantas hospedeiras, principalmente espaços inter ou intra-celular, em pelo menos uma fase do seu ciclo de vida, sem causar dano aparente ao hospedeiro (ZHENG et al., 2016). A existência de cerca de 300 mil espécies de plantas no planeta, associada ao fato de que estas podem hospedar pelo menos um fungo endofítico, tornam a diversidade destes microrganismos enorme. Entretanto, apenas alguns destes endófitos foram estudados, indicando que a oportunidade de encontrar fungos endofíticos promissores em plantas de diferentes ecossistemas e nichos é ampla (STROBEL; DAISY, 2003; ZHENG et al., 2016).

As interações estabelecidas pelos endófitos podem variar desde mutualismo (endófito e planta hospedeira obtém vantagens) até parasitismo (apenas o endófito é beneficiado). Na relação mutualística, o endófito recebe nutrientes e proteção da planta hospedeira, enquanto o endófito produz metabólitos secundários que auxiliam as plantas na absorção de nutrientes, promoção do crescimento, tolerância a estresses bióticos e abióticos, e na proteção contra patógenos (BAE et al., 2009; SANTOYO et al., 2016; LARRAN et al., 2016). Um estudo realizado com modelos *in vitro*, mostrou que os extratos de plantas do mangue e dos seus fungos endofíticos apresentaram potencial antioxidante relevante, o que ajuda a compreender a associação entre plantas e seus endófitos, contra vários estresses abióticos que possam afetar o desenvolvimento de ambos (RAVINDRAN et al., 2012).

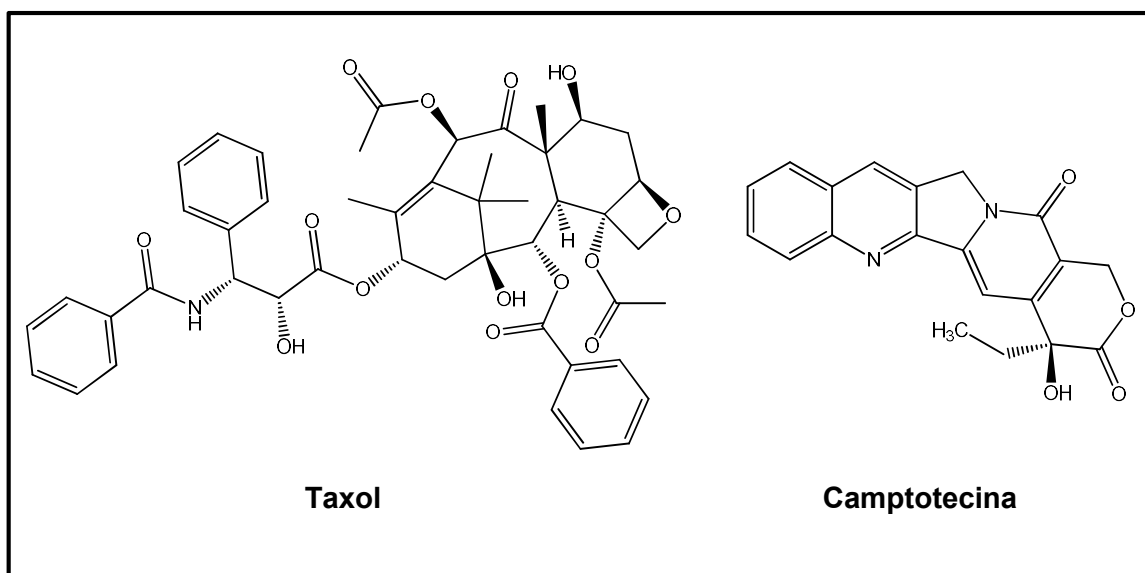
Acredita-se que a relação endófito-planta possa ter evoluído ao mesmo tempo em que as plantas superiores se originaram, há milhões de anos. Esta hipótese, por sua vez, é apoiada pelo fato de que os endófitos foram identificados em tecidos fossilizados de plantas. Portanto, é considerável que devido a essa relação ecológica de longa data, muitos endófitos podem ter desenvolvido um complexo sistema de comunicação envolvendo cruzamento de informações genéticas entre endófitos e com a planta hospedeira (BAILEY et al., 2006; TAWFIKE et al., 2017). E como resultado dessas interações, muitas características evolucionárias surgem, as quais variam

desde a produção de substâncias antimicrobianas para defesa, ativação de rotas biossintéticas, produção de precursores e moléculas sinalizadoras de *quórum sensing*, até interações físicas com outros microrganismos (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012; KUSARI; SINGH; JAYABASKARAN, 2014).

Contudo, essa interação entre fungos endofíticos e plantas é questionada, pois a adaptação em seu hospedeiro depende do genótipo da planta e do endófito, de outras espécies que interagem direta ou indiretamente com o hospedeiro, além de fatores abióticos (MULLER; KRAUSS, 2005; FAETH, 2002).

Alguns relatos sugerem que a colonização assintomática é resultado de um equilíbrio entre a virulência do fungo endofítico e as respostas de defesa da planta. Esta balança é dinâmica e pode ser modificada sob condições de *stress* do hospedeiro ou alterações fisiológicas em um dos organismos envolvidos (SCHULZ; BOYLE, 2005). Entretanto, sabe-se que alguns endófitos são capazes de produzir os mesmos metabólitos que a planta hospedeira, como exemplo, os anticancerígenos taxol e camptotecina (Figura 1). Desta forma, pode-se inferir que a interação endófito-planta pode não ser apenas o equilíbrio entre a virulência e as respostas de defesa, mas uma interação mais complexa (KUSARI et al., 2009; ALVIN et al., 2014).

**Figura1.** Estruturas químicas dos anticancerígenos taxol e camptotecina.



Como descrito anteriormente, as plantas são colonizadas por diversos microrganismos endofíticos, os quais podem interagir direto ou indiretamente com outros endófitos. Essas interações podem desempenhar um papel importante na

produção de metabólitos por bactérias e fungos endofíticos (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012), uma vez que podem envolver moléculas sinalizadoras de *quórum sensing* ou outros elicitores, que podem ativar rotas biossintéticas silenciosas. A sobrevivência em um ambiente competitivo certamente exige estratégias que provavelmente resultam na produção de substâncias que podem estar relacionadas à ecologia dos organismos produtores (RAJAMANIKYAM et al., 2017; BRAKHAGE; SCHROECKH, 2011).

## 1.2 Metabólitos não voláteis de fungos endofíticos

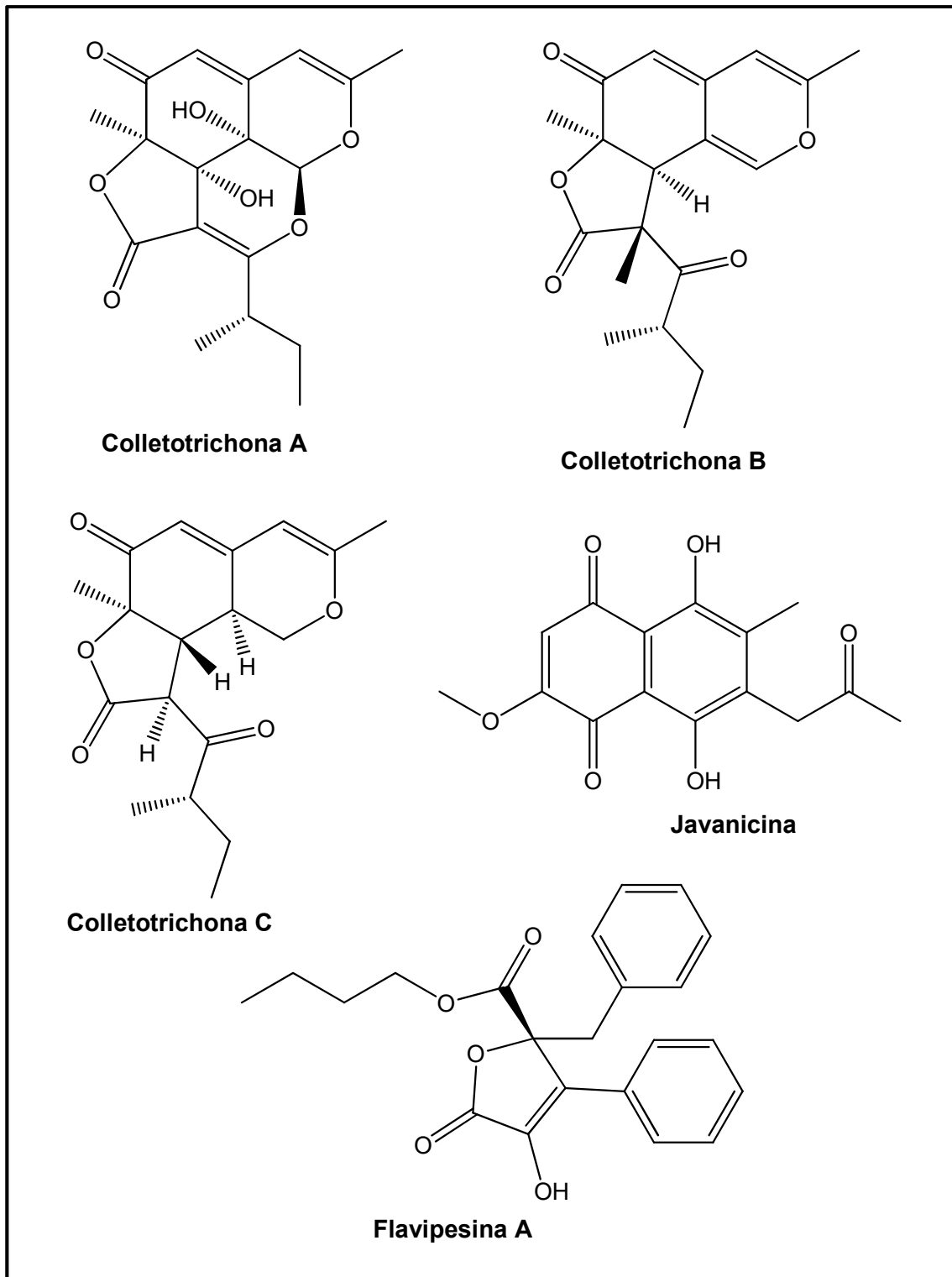
Os microrganismos endofíticos associados a plantas, especialmente os fungos endofíticos, representam uma fonte promissora na descoberta de produtos naturais. Estes endófitos têm se revelado pela alta capacidade na produção de diversas classes de metabólitos secundários com uma ampla variedade de atividades biológicas, tais como: antimicrobiana, citotóxica, antioxidante, ansiolítica, inseticida, entre outras. Portanto, a bioprospecção de fungos endofíticos tem oferecido uma grande promessa na descoberta de novos produtos naturais com valor terapêutico (XIONG et al., 2013; XIÃO et al., 2014; KUSARI; SPITELLER, 2011; ANDRÉS et al., 2017).

Um grande número de espécies de endófitos já foi isolado de diversas plantas, bem como uma diversidade de moléculas potencialmente bioativas, como: a tricodermina e cercosporamida, isoladas de endófitos pertencente ao gênero *Phoma*, os quais apresentaram fortes atividades antitumorais e antifúngicas (WANG et al., 2012); a 10-hidroxicamptotecina, um poderoso agente antineoplásico, isolado do fungo endofítico *Fusarium solani* (SHWETA et al., 2010); pestalafones J e K, dois meroterpenoides com potencial citotóxico, isolados da espécie *Pestalotiopsis fici* (WANG et al., 2016); cercosporina produzida por *Mycosphaerella* sp., que possui ação antiparasitária (MORENO et al., 2011); subglutínois A e B, dois agentes imunossupressores, produzidos pelo endófito *Fusarium subglutinans* (GUO et al., 2008); e a eremofortina F e o micoepoxidieno isolados do fungo endofítico *Diaporthe pseudomangiferae*, os quais apresentaram atividade citotóxica (MANDAVID et al., 2015). Recentemente, isolou-se do endófito *Fusarium* sp. associado à espécie vegetal *Mentha longifolia*, o fusaristerol, um derivado do ergosterol, que demonstrou forte atividade antifúngica e citotóxica (IBRAHIM et al., 2018).

Atualmente, há uma busca constante por novos antibióticos que sejam eficazes e com reduzida toxicidade. Essa busca tem sido realizada devido ao contínuo desenvolvimento da resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis. Neste contexto, muitas pesquisas também estão sendo direcionadas à bioprospecção de fungos endofíticos na busca por produtos naturais com potencial antimicrobiano, frente a linhagens de bactérias resistentes e formadoras de biofilme (KLIMOVA et al., 2017).

No estudo realizado por Wang e colaboradores (2016) foi relatado a produção dos colletotrichonas A, B e C, a partir do fungo endofítico *Colletotrichum* sp., os quais demonstraram atividade antibacteriana frente as linhagens *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente. A javanicina, um policetídeo produzido pelo endófito *Fusarium* sp., mostrou forte atividade inibitória contra *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium phlei* (ALVIN et al., 2016). A partir do fungo endofítico *Aspergillus flavipes*, associado à espécie vegetal *Acanthus ilicifolius*, foi isolado a flavipesina A, que exibiu atividade frente as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, além de atividade antibiofilme, formado pela bactéria *S. aureus* (BAI et al., 2014) (Figura 2).

**Figura 2.** Substâncias produzidas por fungos endofíticos com atividade antibacteriana e antibiofilme.



É relatado que apenas alguns genes envolvidos na biossíntese de produtos naturais, dos endófitos, sejam expressos sob condições de cultivo laboratoriais, resultando assim, numa produção limitada de metabólitos secundários. Neste contexto, muitas pesquisas tem buscado alternativas para obter acesso a este reservatório de metabólitos bioativos, e assim explorar ao máximo toda a complexidade e diversidade estrutural que esses organismos biossintetizam (SCHERLACH; HERTWECK, 2009; CICHEWICZ, 2010; BRAKHAGE; SCHROECKH, 2011). Assim, modificações nos parâmetros de cultivo, como por exemplo, mudanças no meio de cultura e o co-cultivo de microrganismos, dentre outros, se apresentam como metodologias alternativas para a exploração de substâncias potencialmente ativas e estratégias para induzir a expressão de vias silenciosas em microrganismos (BODE et al., 2002; BERTRAND et al., 2013).

Estudos têm demonstrado que os microrganismos são sensíveis aos meios de cultivo na produção de metabólitos, e que mudanças do meio de cultivo podem levar a alterações no perfil metabolômico dos mesmos (DING et al., 2012). E, como exemplo desta observação, destaca-se o estudo realizado com o fungo endofítico *Nodulisporium* sp., que quando cultivado em meio de cultivo de arroz, produziu os nodulisporisteriodes A e B, dois esteroides do tipo 4-metil-progesteroides, raramente obtidos na natureza (ZHENG et al., 2013). Contudo, no trabalho realizado por Zhao et al., 2015, com o mesmo endófito, sendo este cultivado em meio de MDB, observou-se a produção de dez análogos do 4-metilprogesteroides, evidenciando que a mudança nos parâmetros de cultivo pode aumentar a diversidade metabólica.

Estes estudos comprovam que os fungos endofíticos são uma fonte prolífica de novos compostos bioativos com potencial para exploração em uma grande variedade de áreas, como a medicina, agricultura e indústria (principalmente na alimentícia e farmacêutica). A constatação da diversidade metabólica apresentada por estes endófitos associada à necessidade da descoberta de novas substâncias com valor biotecnológico, estimula o estudo deste nicho de microrganismos, uma vez que em países tropicais, como o Brasil, existe uma enorme biodiversidade a ser explorada. Além disso, as poucas investigações dos diferentes aspectos da relação entre endófitos e hospedeiros ainda não são claras, o que motiva e constitui base para pesquisas futuras (NISA et al., 2015; AZEVEDO, 2010).

### 1.3 Compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por fungos endofíticos

Os compostos orgânicos voláteis referem-se, de modo geral, às substâncias com massa molecular pequena, de baixa polaridade, que exibem alta pressão de vapor (MANSUROVA et al., 2018). Devido à sua volatilidade, esses compostos podem transpor as membranas com facilidade e serem liberados na atmosfera ou no solo, na ausência de uma barreira de difusão. Além disso, também podem ser transportados através do fluxo em massa de água pelo perfil do solo (PICHERSKY; NOEL; DUDAREVA, 2006)

Na natureza, os COVs são produzidos por diversos organismos vivos e sob o aspecto da ecologia química, estão envolvidos na comunicação química inter e intraespecífica. Nesse contexto, os microrganismos, especialmente os fungos endofíticos, tem se destacado por se mostrarem em muitos estudos como uma fonte promissora desse tipo de substâncias (YAN et al., 2018; MANSUROVA et al., 2018).

Do ponto de vista biotecnológico, os compostos voláteis produzidos por fungos endofíticos apresentam diferentes propriedades físico-químicas e biológicas. Atividades como antimicrobiana, fitotóxica e nematicida já foram relatadas para os COVs produzidos por esses endofitos, tornando-os úteis tanto na indústria quanto na agricultura. Técnicas de microextração em fase sólida por headspace (HS-SPME) e análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) tem sido bastante utilizada para analisar o perfil desses compostos voláteis produzidos por esses microrganismos (KANCHISWAMY; MALNOY; MAFFEI, 2015; LIARZI et al., 2016; YAN et al., 2018)

No estudo realizado por Singh et al., 2011, o fungo endofítico *Phomopsis* sp., isolado de *Odontoglossum* sp., produziu uma mistura de COVs, composta por sabineno, 2-propanona, 3-metilbutanol, 2-metilpropanol e 2-feniletanol, os quais exibiram atividade antifúngica contra vários fungos fitopatogênicos pertencentes aos gêneros: *Pythium*, *Phytophthora*, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Verticillium* e *Colletotrichum*.

Ensaio *in vitro* com o endófito *Nodulisporium* sp. revelaram que os COVs produzidos por este, inibiram e/ou mataram fungos fitopatogênicos de 12 plantas diferentes. Os resultados de ensaios *in vivo* também foram satisfatórios, uma vez que foi realizado micofumigação para o controle de doenças de pós-colheita em espécies

de *Citrus* causadas pelos fungos *Penicillium digitatum* e *Penicillium expansum* (SUWANNARACH et al., 2013).

O fungo endofítico *Xylaria* sp. também produziu uma série de compostos orgânicos voláteis, os quais apresentaram efeitos fitotóxicos significativos contra *Amaranthus hypochondriacus* e *Solanum lycopersicum*, caracterizado pela inibição do alongamento das raízes e germinação destas espécies. Essas plantas têm sido comumente usadas em bioensaios fitotóxicos. Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que os COVs produzidos por este endófito, apresentam-se como candidatos ao controle biológico de plantas daninhas (SANCHEZ-ORTIZ et al., 2016).

Estes estudos comprovam que os fungos endofíticos representam uma fonte prolífica de compostos orgânicos voláteis, os quais tem sido cada vez mais analisados sob diversos aspectos. Além disso, as atividades relatadas para estes compostos estimulam pesquisas futuras a fim de que estes COVs possam ser aplicados na indústria e na agricultura, como por exemplo, no controle de pragas.

#### **1.4 *Platonia insignis* Mart., espécie vegetal hospedeira**

A família Clusiaceae é composta por plantas tropicais e abrange cerca de 30 gêneros e 1150 espécies. Esta família engloba árvores, arbustos, ervas e lianas de interesse econômico pela produção de frutos comestíveis, madeiras e derivados químicos de interesse industrial e farmacêutico (FERREIRA; CARVALHO; SILVA, 2012; GASPARATTO JUNIOR et al., 2005).

Investigações fitoquímicas realizadas com plantas da família Clusiaceae mostraram a presença de benzofenonas poliisopreniladas (LOKVAM et al., 2000), xantonas, triterpenos (SOBRAL et al., 2009), esteroides TEIXEIRA et al., 2006), flavonoides, biflavonoides (ITO et al., 2013), cumarinas (REYES-CHILP et al., 2004) e derivados de floroglucinol (NGUYEN et al., 2012). Atividades biológicas como antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, citotóxica e anti-HIV já foram comprovadas em extratos, frações e substâncias isoladas de espécies pertencentes a esta família (SOBRAL et al., 2009; CHIANG et al., 2003; WENG et al., 2003; ZHANG et al., 2010; HUERTA-REYES et al., 2004).

A *Platonia insignis* Mart. (Figura 3), pertencente à família Clusiaceae, é uma espécie frutífera e madeireira com centro de origem no estado do Pará, que se dispersou em direção aos estados da região norte, Maranhão, Piauí, Mato Grosso,



Tocantins, além de outros países como Peru, Venezuela, Colômbia e Guiana Francesa. Seu fruto é comestível e conhecido popularmente como bacuri (LIMA, 2007; NASCIMENTO; CARVALHO; MÜLLER, 2007). A resina proveniente da casca do fruto e o óleo extraído das sementes são usados na medicina popular no tratamento de herpes e eczemas (AGRA et al., 2007). Estudos fitoquímicos realizados com as sementes da *P. insignis*, levaram ao isolamento de dois isômeros de acilfloroglucinois policíclicos poliprenilados: garcinieliptona FC, os quais apresentaram atividade antioxidante (COSTA JUNIOR et al., 2011), citotóxica, leishmanicida (COSTA JUNIOR et al., 2013) e vasorrelaxante (ARCANJO et al., 2014). Em estudos realizados com as cascas do fruto desta espécie também foram isolados e identificados uma mistura dos esteroides sitosterol e estigmasterol, um derivado de floroglucinol e o ácido betulínico. Neste mesmo estudo, extratos de cascas dos frutos obtidos com solventes de diferentes polaridades apresentaram atividades antioxidante e citotóxica (SOUSA, 2012).

Estudos realizados com as cascas do caule de *P. insignis* demonstraram, ainda, a presença dos tripterpenoides: lupeol, betulina e betulinaldeído, mistura dos esteroides: sitosterol, estigmasterol e campesterol e de dois derivados de floroglucinol. O extrato etanólico e as frações provenientes da partição líquido-líquido do extrato apresentaram potencial efeito protetor por meio da determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Além disto, apresentaram atividade citotóxica, leishmanicida anticolinesterásica e um forte potencial antioxidante frente ao ensaio com o DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila), por meio da capacidade de remoção dos radicais hidroxila e óxido nítrico, como também pelo método potencial redutor (COSTA, 2015; SOUZA et al., 2017).

A potencialidade química e biológica apresentada pela espécie *P. insignis* associada ao fato de que os fungos endofíticos apresentam uma enorme capacidade de produzir substâncias potencialmente bioativas, motivou o estudo de prospecção química e biológica dos fungos endofíticos associados a esta espécie vegetal, para o entendimento da interação ecológica endófito-hospedeiro e a utilização das substâncias produzidas por estes endófitos nas áreas de interesse, como na agricultura e indústria farmacêutica.

**Figura 3.** *Platonia insignis* Mart., folhas e frutos.



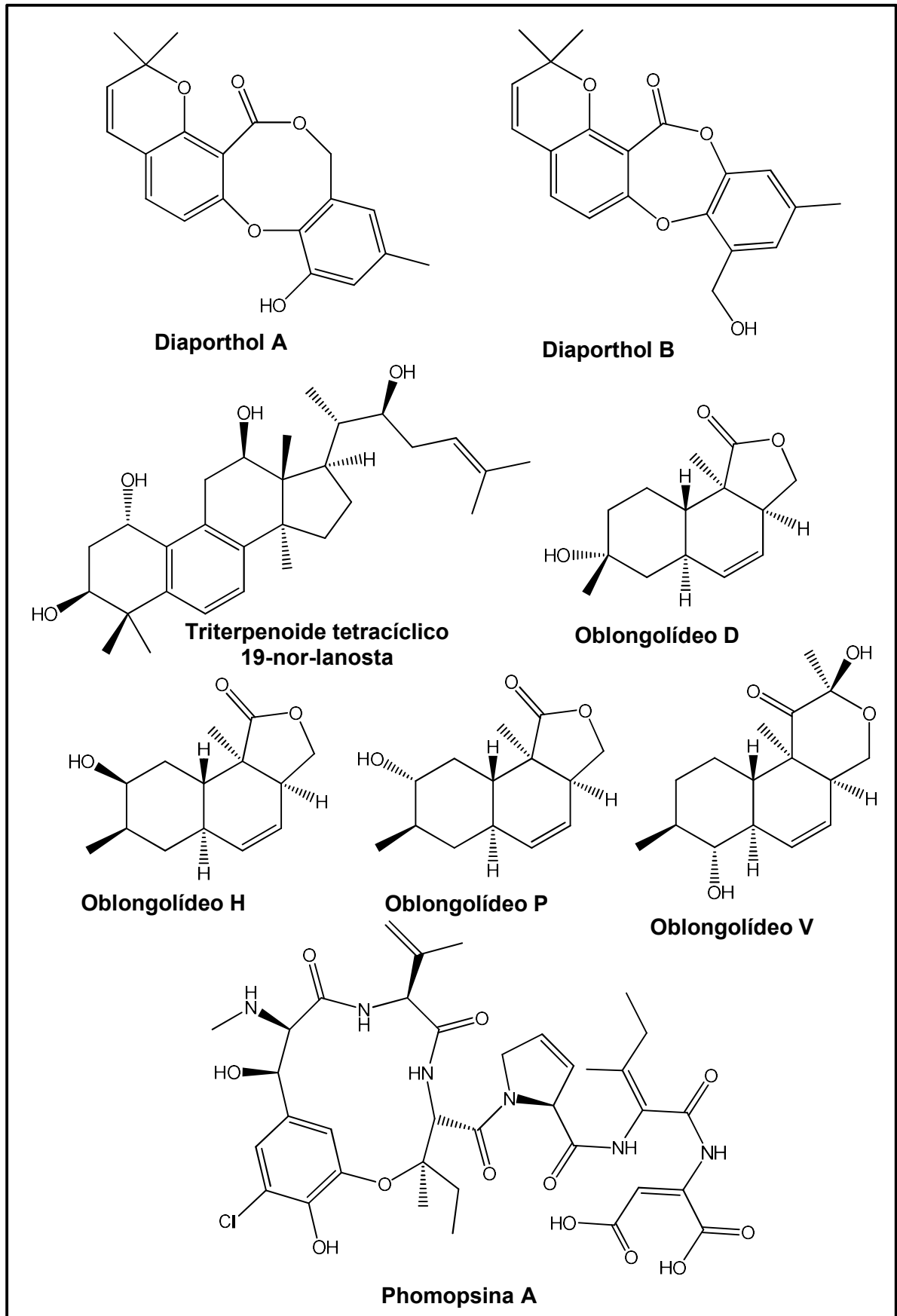
Fonte: Autor

### 1.5 Gêneros: *Diaporthe* e *Phyllosticta*

O gênero *Diaporthe* (forma assexuada do *Phomopsis*) compreende várias espécies endofíticas, conhecidas por produzir metabólitos secundários com diversas atividades biológicas. Estudos realizados por Li et al. (2015) com o fungo *Diaporthe* sp.LG23 conduziu ao isolamento de um novo triterpenoide tetracíclico, o qual exibiu atividade antibacteriana frente a bactérias Gram-positivas e negativas, especialmente a *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Destaca-se o isolamento de dois policetídeos, diaporthol A e B, deste endófito, os quais apresentaram atividade anticâncer, uma vez que inibiram o desenvolvimento de células tumorais mamárias (NAKASHIMA et al., 2018). O endófito *Diaporthe* sp., isolado da espécie vegetal *Camptotheca acuminata*, produziu quatro análogos da lovastatina, um importante redutor do colesterol (Figura 4) (LIU et al., 2013).

Entretanto, algumas espécies deste gênero se destacam por colonizarem espécies de leguminosas, produzindo micotoxinas. O fungo *Diaporthe toxica* por exemplo, produz a Phomopsina A (Figura 4), um polipeptídeo responsável por provocar doenças hepáticas em animais (SCHLOB et al., 2017).

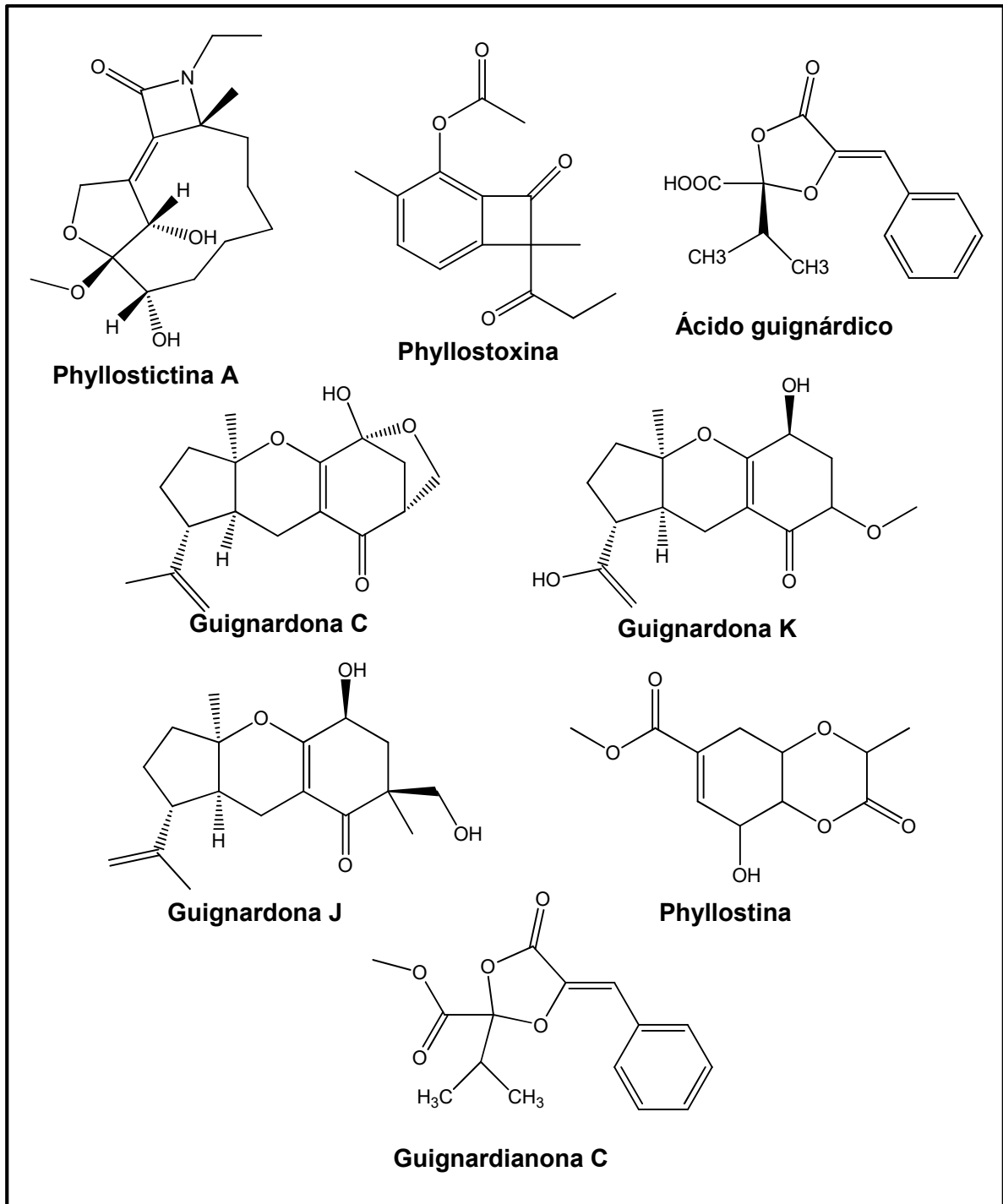
**Figura 4.** Substâncias produzidas por espécies pertencentes ao gênero *Diaporthe*.



O gênero *Phyllosticta*, cuja forma sexuada corresponde ao gênero *Guignardia*, abrange espécies conhecidas pelo seu potencial fitopatogênico, mas que se destacam por produzir metabólitos bioativos. As fitotoxinas phyllostina, phyllostoxina e phyllostictina A (Figura 5), por exemplo, produzidas por *P. cirsii*, apresentam atividade micoherbicida (EVIDENTE et al., 2008a; EVIDENTE et al., 2008b). Um estudo realizado por Kumaran et al. (2008) resultou no isolamento do taxol, um poderoso agente anticancerígeno, a partir do fitopatógeno *P. citricarpa*.

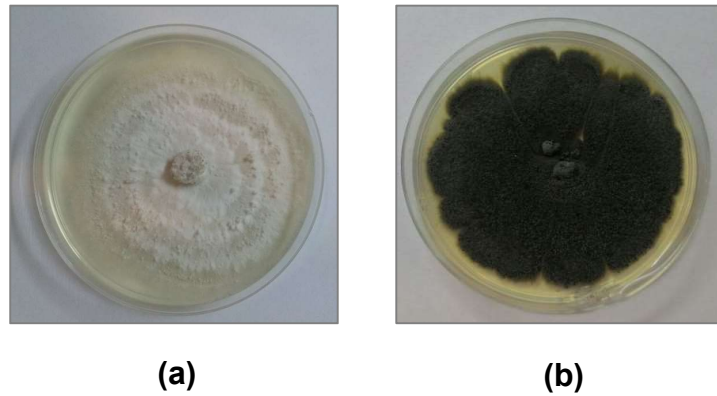
Os fungos desse gênero também podem apresentar comportamento endofítico, dependendo do hospedeiro e das condições ambientais prevalecentes (WIKKEE et al., 2011), destacando a *Phyllosticta capitalensis*, a espécie endofítica mais frequentemente isolada em uma ampla gama de hospedeiros, que produz o ácido guignárdico e guignardianona C, os quais se destacam por apresentar atividade fitotóxica, além dos meroterpenoides guignardona F, C e M (Figura 5) (MA et al., 2019; BUCKEL et al., 2013; WIKKEE et al., 2013). Wijeratne et al. (2008) descreveram o isolamento de cinco quinonas sequiterpênicas, a partir do endófito *Phyllosticta spinarum*, isolado de *Platyclusus orientalis*.

**Figura 5.** Substâncias produzidas por espécies pertencentes ao gênero *Phyllosticta*.



Em uma pesquisa realizada na base de dados SciFinder não foram encontrados estudos químicos e biológicos para as espécies *Diaporthe hongkongensis* e *Phyllosticta elongata* (Figura 6). Esta informação associada a grande diversidade e potencialidade biológica destes gêneros, confirma a necessidade de estudos destes endófitos, uma vez que podem ser uma fontes promissoras de novos metabólitos bioativos.

**Figura 6.** Fungos endofíticos *Diaporthe hongkongensis* (a) e *Phyllosticta elongata* (b) cultivados em BDA em placa de Petri.



## ***Objetivos***

## 2. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo realizar a prospecção química e biológica dos fungos endofíticos associados à *Platonia insignis* Mart. e estudar o perfil metabólito de *Diaporthe hongkongensis* e *Phyllosticta elongata*.

### 2.1 Objetivos específicos

- Isolar, purificar e preservar os fungos endofíticos associados à *Platonia insignis* Mart;
- Cultivar as linhagens isoladas em MDB (escala reduzida) para obtenção dos respectivos extratos brutos;
- Realizar a triagem química dos extratos brutos obtidos por RMN de  $^1\text{H}$ , CLAE-DAD e CCDC;
- Realizar triagem biológica dos extratos brutos obtidos, pela avaliação das atividades antibacteriana, erradicação de biofilme, antiglicante, anticolinesterásica, citotóxica e frente à cepa de *Trypanosoma cruzi*.
- Selecionar os fungos mais promissores quanto ao potencial metabólico e biológico;
- Realizar o cultivo em meio líquido (MDB) e sólido (milho) dos endófitos selecionados para obtenção dos respectivos extratos brutos;
- Submeter os extratos obtidos ao processo de fracionamento e isolamento das substâncias produzidas por técnicas cromatográficas;
- Elucidar ou determinar as estruturas das substâncias isoladas por técnicas espectrométricas de RMN uni e bidimensionais, EM, UV e IV;
- Avaliar as substâncias puras isoladas frente à ensaios biológicos;
- Identificar e analisar os compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos pelos endófitos selecionados, em cultura simples e co-cultura.



## ***Materiais e Métodos***

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Meios de cultivo

**Tabela 1.** Meios de cultura utilizados para o cultivo dos fungos endofíticos.

| Meios de cultura | [ ]g L <sup>-1</sup> | Composição   | Fabricante |
|------------------|----------------------|--|------------|
| BDA              | 39                   | Fécula de batata (4g), dextrose (20g) e ágar (15g) | Acumedia   |
| MDB              | 24                   | Fécula de batata (4g) e dextrose (20g)             | Acumedia   |
| Milho            | 1200                 | -  | Yoki       |

##### 3.1.2 Solventes

Para a obtenção dos extratos brutos em escala reduzida e ampliada, assim como para cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), separações cromatográficas em coluna (CC) e em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foram utilizados solventes padrões analíticos (PA) como metanol (MeOH), acetato de etila (AcOEt) e hexano e solventes de grau CLAE como acetonitrila e metanol das seguintes marcas: Merck, J. T. Baker e Qhemis. Em análises de ressonância magnética nuclear (RMN) uni e bidimensional (1D e 2D), utilizou-se os solventes deuterados: DMSO-*d*<sub>6</sub> e CD<sub>3</sub>OD (Aldrich, CIL e Deutero)

##### 3.1.3 Cromatografia em Coluna

As separações cromatográficas em coluna foram realizadas em colunas de vidro, utilizando como fase estacionária sílica de fase reversa do tipo octadesil silano (C-18), da marca Sorbent Technologies, com porosidade de 60 Å e tamanho de partículas de 40-75 µm (200-400 mesh) e sílica gel da marca Aldrich, com porosidade de 60 Å e tamanho de partículas de 63-200 µm (70-230 mesh). As dimensões das colunas utilizadas variaram de acordo com o perfil e massa de cada amostra.

### *3.1.4 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)*

Nas análises por CCDC foram utilizadas placas de sílica gel 60 F254 analíticas, 0,20 mm de espessura (Macherey-Nagel).

### *3.1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)*

As análises por CLAE-DAD analítico foram realizadas em equipamento Shimadzu com detector ultravioleta em arranjo de diodos (SPD-M20A), degaseificador DGU-20A<sub>3</sub> e injetor automático Shimadzu SIL-20A. Foi utilizadas coluna analítica Phenomenex Luna com sílica tipo octadesil silano (C-18) (250 x 4,60 mm; 5 µm) e coluna CHIRALCEL OD-RH (150 x 4,6 mm), constituída pelo derivado tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose recobrimdo partículas de sílica de 5 µm. O tratamento dos dados foi realizado através do software Shimadzu LC solution (versão 1.25 SP2).

Os fracionamentos cromatográficos por CLAE-DAD preparativo foram realizados em equipamento Shimadzu com detector ultravioleta em arranjo de diodos (SPD-M20A), degaseificador, injetor manual e software Shimadzu LC solution (versão 1.25 SP4). Foi utilizado uma coluna semi-preparativa Phenomenex Luna, sílica C-18 (250 x 10,0 mm; 5 µm).

### *3.1.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)*

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H (300 e 600 MHz) e <sup>13</sup>C (75 e 150 MHz) 1D e 2D foram obtidos em espectrômetro Bruker Fourier 300 com campo magnético de 7,1 T e Bruker Ascend 600 com campo magnético de 14,1 T e criosonda TCI (Triple Chanel Inverse) de 5 mm.

### *3.1.7 Dicroísmo circular eletrônico*

Os espectros de dicroísmo circular eletrônico (DCE) foram obtidos em espectropolarímetro JASCO (J 815). Para as medidas, utilizou-se uma cubeta de 0,2 mm, e a varredura foi efetuada de 200 a 400 nm.

### *3.1.8 Rotação óptica específica*

As medidas de rotação óptica específica,  $[\alpha]_D$ , foram realizadas em polarímetro digital Perkin Elmer™ 341 LC, com filtro de sódio (589 nm) e cela de quartzo com caminho óptico de 1,00 dm.

### *3.1.9 Espectrometria de Massas*

Para as análises de Espectrometria de Massas (EM) de baixa resolução foi utilizado um espectrômetro da Bruker, modelo Amazon SL, equipado com electrospray (ESI) como fonte de ionização e analisador ionTrap.

As análises de Espectrometria de Massas (EM) de alta resolução foram realizadas em espectrômetro da Waters, modelo Xevo G2-XS, equipado com eletrospray (ESI) como fonte de ionização e analisador quadrupolo-tempo de voo (Qq-TOF)

### *3.1.10 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)*

As análises de CG-EM foram realizadas em um cromatógrafo a gás Shimadzu (Kyoto, Japão), modelo QP2020 com fonte de ionização do tipo ionização por elétrons (EI). Foi utilizado hélio como gás de arraste e a separação cromatográfica foi realizada em coluna da marca Shimadzu, modelo SH-Rtx-5MS (5% difenil/95% dimetilpolisiloxano) com dimensões de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e espessura do filme de 0,25 mm. A temperatura do forno foi programada iniciando em 30 °C, permanecendo por 3 minutos e em seguida subindo em uma taxa de 5 °C por minuto até 250 °C, a temperatura do injetor foi de 220 °C, com modo de injeção Split (1:5), gás de arraste hélio a um fluxo constante de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, pressão de 45,8 kPa, velocidade linear de 35,9 cm sec<sup>-1</sup>, fluxo total de 9,0 mL min<sup>-1</sup>.

As condições do espectrômetro foram: temperatura da fonte de íons e interface de 250 °C, energia de colisão utilizada foi de 70 eV, faixa de massas de aquisição de  $m/z$  de 40-450.

### 3.1.11 Outros equipamentos

**Tabela 2.** Equipamentos para o desenvolvimento do projeto

| <b>Equipamento</b>       | <b>Fabricante</b>              |
|--------------------------|--------------------------------|
| Autoclave vertical       | Quimis e Phoenix Luferco       |
| Câmara de fluxo laminar  | Pachane PA-310                 |
| Balança analítica        | Mettler Toledo AG 245 e AG 204 |
| Rotaevaporador           | BUCHI                          |
| Ultrapurificador de água | Millipore                      |

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Obtenção das linhagens fúngicas

A coleta de galhos, folhas e frutos jovens e saudáveis de *Platonia insignis* Mart. foi realizada na cidade de Timon-MA (latitude: 4° 50' 56,6" Sul e longitude: 42° 05' 04,8" Oeste). A exsicata da espécie vegetal encontra-se depositada no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí, com o código TEPB 20701(Registro de acesso ao SisGen AA65371).

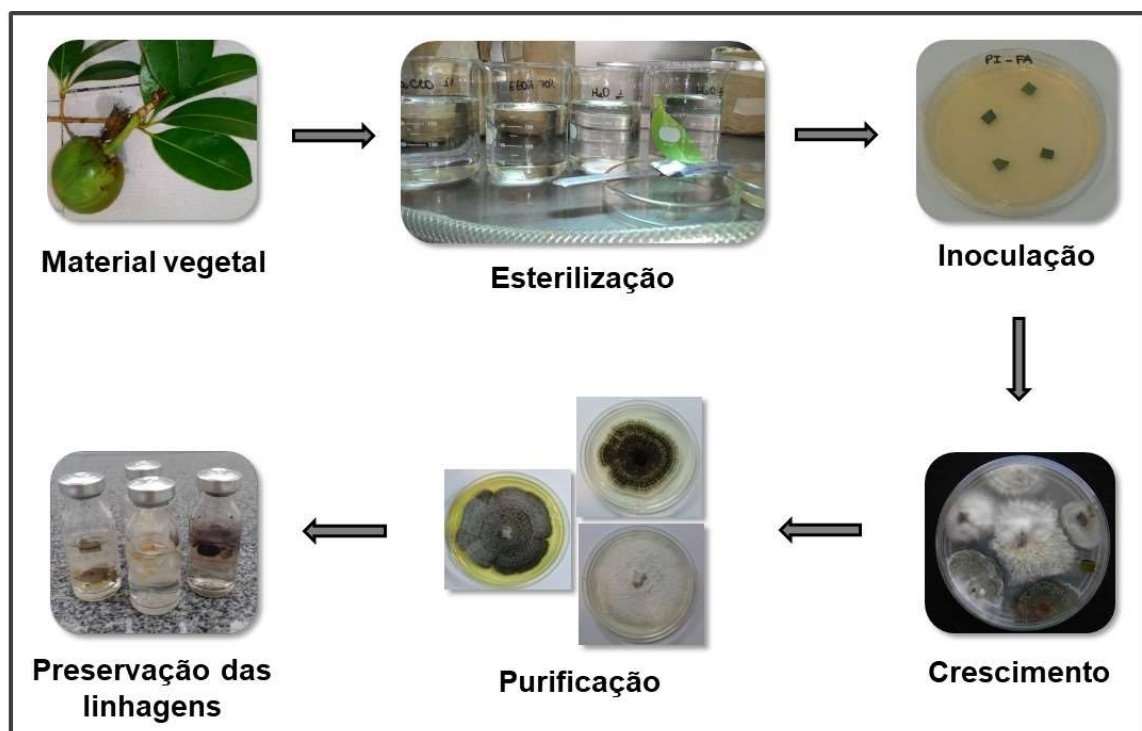
O isolamento dos endófitos iniciou-se com a lavagem da superfície do material vegetal em água corrente, e esterilização por imersão em NaClO 1% e em etanol 70%, seguida de uma dupla lavagem em água estéril (Tabela 3) (SILVA, 2005). Após o processo de esterilização, os galhos, folhas e fruto foram seccionados assepticamente (3 a 4) e incubados em placas de Petri contendo batata-dextrose-ágar (PDA), ao qual foi adicionado, após esterilização em autoclave, o antibiótico clorafenicol (20 µg mL<sup>-1</sup>) ao meio de cultivo para inibir o crescimento bacteriano. O crescimento dos fungos foi

monitorado diariamente e repiques sucessivos foram realizados até a obtenção das linhagens puras (Figura 7). As linhagens foram avaliadas quanto à pureza, através da aparência uniforme nas placas, sendo posteriormente preservadas em água estéril (*slants*).

**Tabela 3.** Tempo de esterilização dos galhos, folhas e fruto.

| Orgãos        | NaClO 1% | Etanol 70% | Água de lavagem |
|---------------|----------|------------|-----------------|
| <b>Galhos</b> | 5 min    | 1 min      | 10 min total    |
| <b>Folhas</b> | 5 min    | 1 min      | 10 min total    |
| <b>Fruto</b>  | 5 min    | 5 min      | 10 min total    |

**Figura 7.** Etapas de isolamento das linhas fúngicas.



Fonte: Autor

### 3.2.2 Identificação das linhagens

Após isolamento, os fungos endofíticos foram depositados na Micoteca do Departamento de Química Orgânica do IQ/Ar-UNESP, e os endófitos selecionados

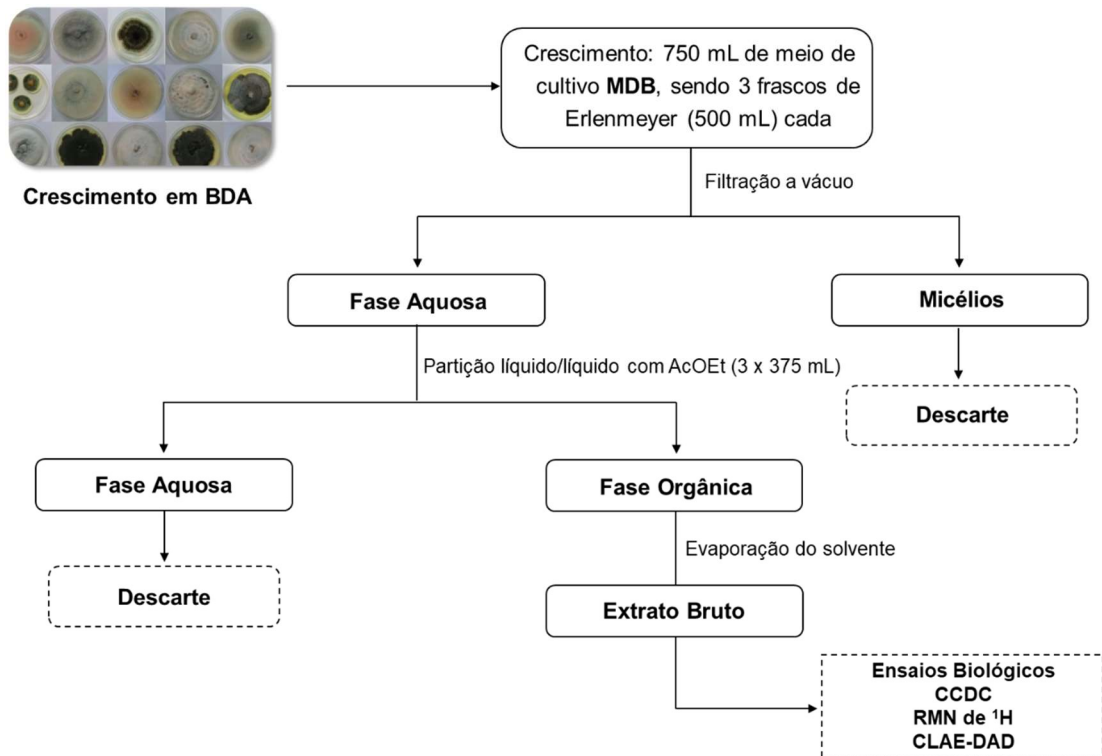
para estudo químico foram identificados por morfologia e biologia molecular, pela empresa Genotyping (Botucatu-SP).

A identificação foi realizada por meio do sequenciamento Sanger de regiões específicas do DNA do microrganismo. O sequenciamento foi feito automaticamente por eletroforese capilar no equipamento ABI 350 Genetic Analyer (Applied Biosystems) e o alinhamento das sequências de nucleotídeos produzidas foi comparado com as sequências de referência depositadas no GenBank.

### *3.2.3 Obtenção dos extratos brutos das linhagens fúngicas em MDB (escala reduzida)*

Os fungos endofíticos isolados e preservados foram primeiramente cultivados em placas de Petri contendo BDA, a 28°C. Após o crescimento desses endófitos, aproximadamente um terço de micélio de cada placa de Petri foi inoculado em meio líquido de batata-dextrose (MDB), previamente esterilizado, (3 frascos de Erlenmeyer contendo 250 mL de meio líquido), por 28 dias a 25°C, em modo estático. Após 28 dias de incubação, o caldo fermentado foi separado do micélio por filtração a vácuo e submetido à partição líquido/líquido com AcOEt (3x 375 mL). O solvente foi evaporado, obtendo-se os extratos brutos (Figura 8). Paralelamente foi realizado o branco MDB (sem a inoculação dos endófitos), seguindo a mesma metodologia.

**Figura 8.** Cultivo e obtenção dos extratos brutos em MDB.



Fonte: Autor

Os extratos obtidos foram submetidos a ensaios biológicos e à análise por RMN de  $^1\text{H}$  e CLAE-DAD modo analítico. Antes das análises por CLAE-DAD, as amostras (3,5 mg) foram solubilizadas em 1 mL de solução  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (95:05) e submetidas a um pré-tratamento utilizando cartuchos de sílica C-18 (Mackerey-Nagel Chomabond<sup>®</sup>) acoplado a membrana Millipore<sup>®</sup> (0,2  $\mu\text{m}$ ). Após este procedimento, as amostras foram injetadas em CLAE-DAD, utilizando uma coluna analítica Phenomenex Luna tipo octadecil silano (C-18), com injeção de 20  $\mu\text{L}$  e eluição em gradiente exploratório  $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH}$  (95:05) v/v) à (0:100 v/v) por 40 min, permanecendo nesta condição por mais 10 min, numa vazão de 1 mL  $\text{min}^{-1}$  e faixa de detecção de 200-800 nm.

### 3.2.4 Variações no meio de cultivo de *Diaporthe hongkongensis* e *Phyllosticta elongata*

Após análise detalhada dos perfis químicos e biológicos dos extratos obtidos a partir do crescimento dos fungos endofíticos isolados, as linhagens fúngicas codificadas como PI-G-13 (*D. hongkongensis*) e PI-F-2 (*P. elongata*) foram



selecionadas para estudo químico e biológico. Estas foram cultivadas em duas condições de crescimento distintas, alterando-se o meio de cultivo (MDB e Milho).

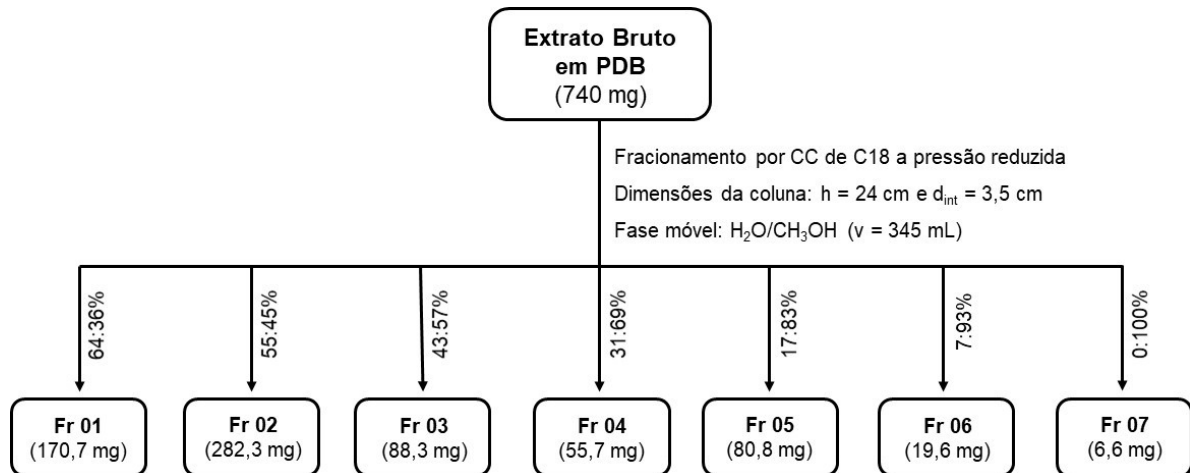
#### *3.2.4.1 Obtenção dos extratos brutos de *Diaporthe hongkongensis* e *Phyllosticta elongata* em MDB (escala ampliada)*

Para obtenção dos extratos brutos em escala ampliada, os fungos endofíticos *Diaporthe hongkongensis* (PI\_G\_13) e *Phyllosticta elongata* (PI\_F\_2) foram cultivados, separadamente, em 50 frascos de Erlenmeyer (12,5 L), todos contendo meio de cultivo PDB. A metodologia de crescimento e extração foi a mesma utilizada para a preparação dos extratos em escala reduzida (item 3.2.3). O solvente foi evaporado, obtendo-se assim os extratos brutos, os quais foram submetidos a análise do perfil químico por RMN de  $^1\text{H}$  e CLAE-DAD nas mesmas condições descritas no item 3.2.3.

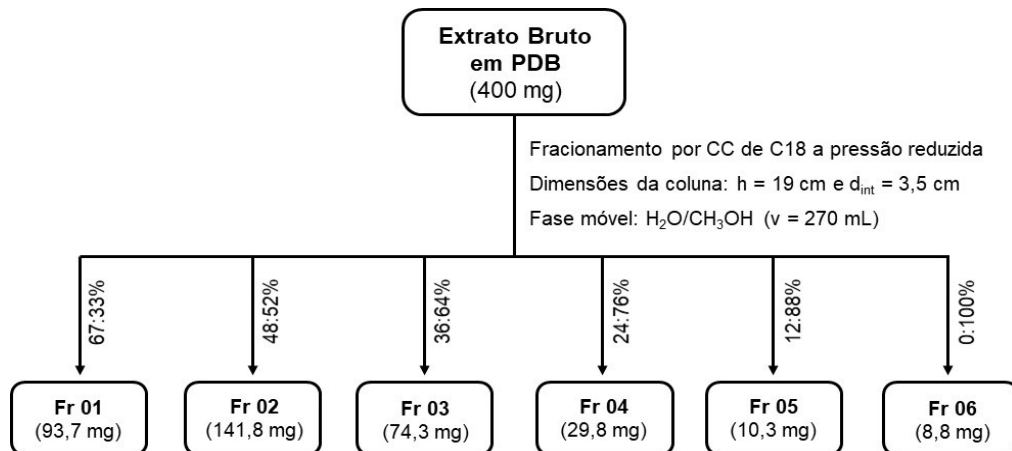
##### *3.2.4.1.1 Fracionamento dos extratos brutos obtidos em PDB (escala ampliada)*

Após as análises do perfil obtido por CLAE-DAD em modo analítico e CCDC dos extratos brutos de *D. hongkongensis* e *P. elongata*, realizou-se o fracionamento dos extratos por cromatografia em coluna (CC) a pressão reduzida, utilizando como fase estacionária sílica de fase reversa (C18) e como fase móvel o sistema de eluentes em gradiente (Figuras 9 e 10), resultando em 7 e 6 frações, respectivamente. As frações obtidas foram submetidas a análise por RMN de  $^1\text{H}$  e CLAE-DAD nas mesmas condições descritas no item 3.2.3.

**Figura 9.** Fracionamento por CC do extrato bruto de *Diaporthe hongkongensis* (PI\_G\_13) obtido em escala ampliada.



**Figura 10.** Fracionamento por CC do extrato bruto de *Phyllosticta elongata* (PI\_F\_2) obtido em escala ampliada.

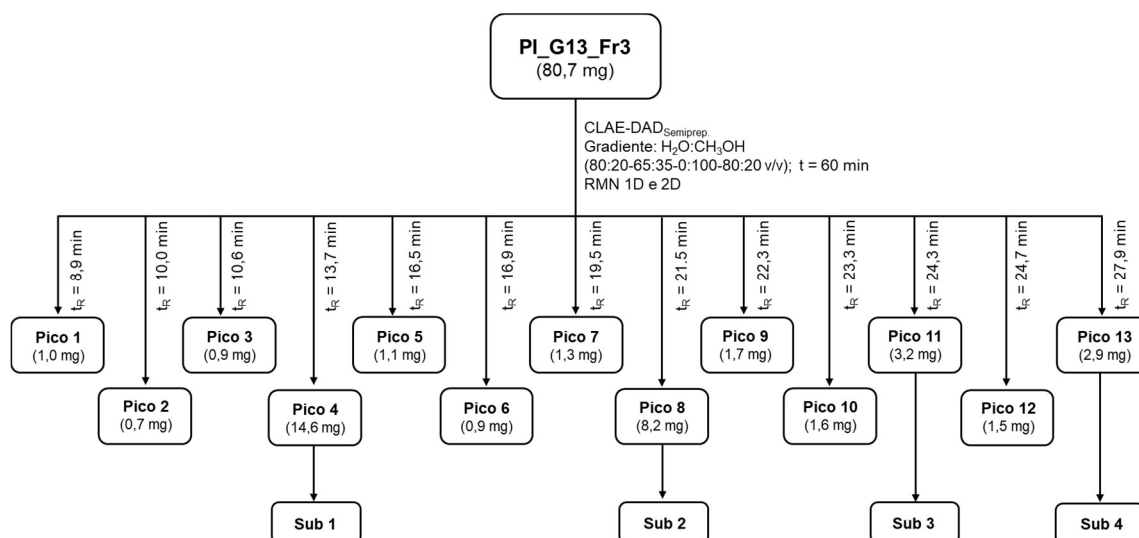


### 3.2.4.1.2 Isolamento das substâncias produzidas por *Diaporthe hongkongensis* (PI\_G\_13)

A fração Fr-3, codificada como PI\_G13\_Fr3, foi analisada e otimizada em CLAE-DAD modo analítico, utilizando uma coluna C18 (Phenomenex Luna; 250 x 4,60 mm; 5 µm) e como fase móvel o sistema de eluentes em gradiente (H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN). Após otimização, a amostra foi submetida a fracionamento em CLAE-DAD em escala

semi-preparativa, no qual utilizou-se coluna C18 (Phenomenex Luna; 250 x 10; 5  $\mu\text{m}$ ), eluição em gradiente ( $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ ), vazão de 4,0  $\text{mL min}^{-1}$ , volume de injeção de 200  $\mu\text{L}$  e monitoramento em 254 nm. Esta separação cromatográfica forneceu 13 subfrações, as quais foram submetidas a análise por RMN, resultando no isolamento e identificação de quatro substâncias (Figura 11).

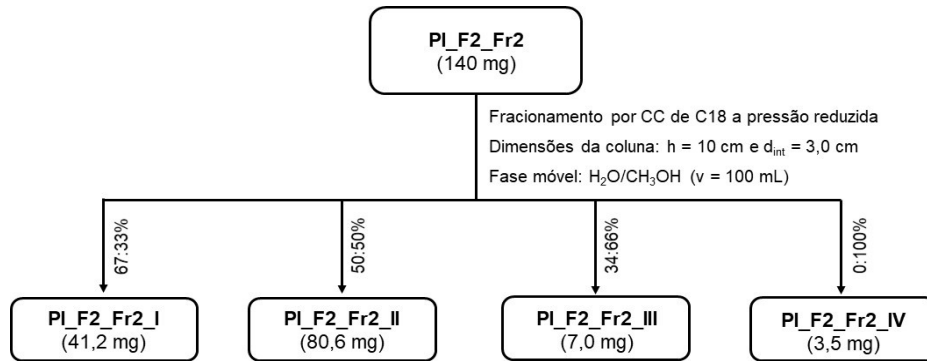
**Figura 11.** Isolamento das substâncias da fração PI\_G13\_Fr3, produzidas por *Diaporthe hongkongensis*.



### 3.2.4.1.3 Isolamento das substâncias produzidas por *Phyllosticta elongata* (PI-F-2)

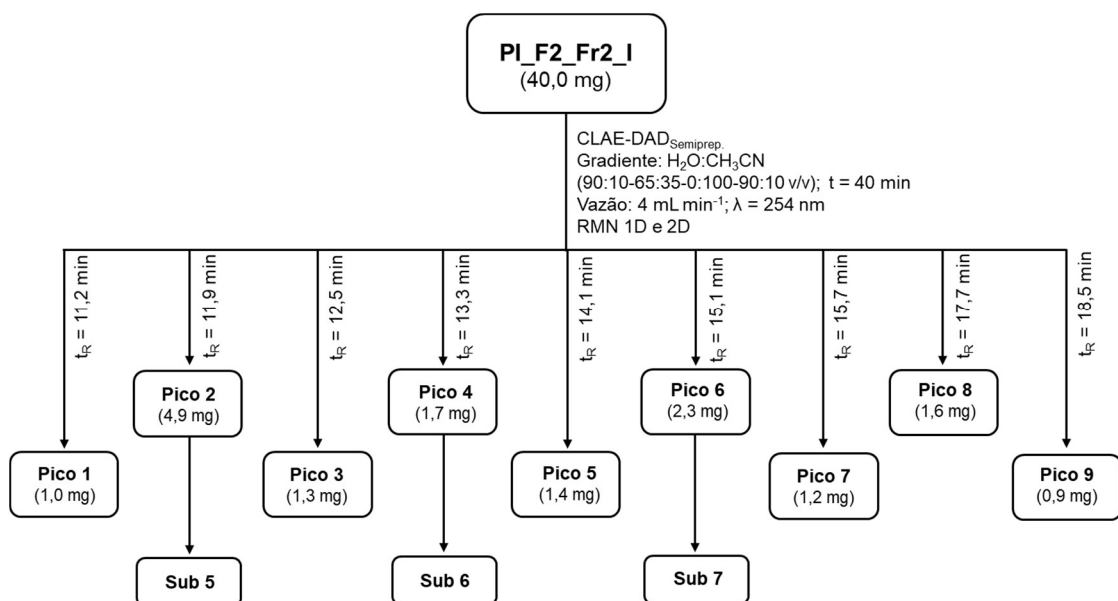
Inicialmente a fração Fr2, codificada como PI\_F2\_Fr2 foi fracionada por cromatografia em coluna a pressão reduzida, utilizando como fase estacionária sílica de fase reversa (C18) e como fase móvel o sistema de eluentes em gradiente, resultando em 4 frações (Figura 12).

**Figura 12.** Fracionamento em coluna de PI\_F2\_Fr2.



A separação cromatográfica de PI\_F2\_Fr2\_I foi otimizada em CLAE-DAD analítico utilizando uma coluna de C18 (Phenomenex Luna; 250 x 4,60 mm; 5  $\mu$ m) e como fase móvel o sistema de eluentes em gradiente (H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN). Após otimizações, a amostra foi fracionada em CLAE-DAD em escala semi-preparativa, no qual utilizou-se coluna C18 (Phenomenex Luna; 250 x 10; 5  $\mu$ m) e eluição em gradiente (H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN). Esta separação cromatográfica forneceu 9 subfrações, as quais foram submetidas a análise por RMN, resultando no isolamento e identificação de três substâncias (Figura 13)

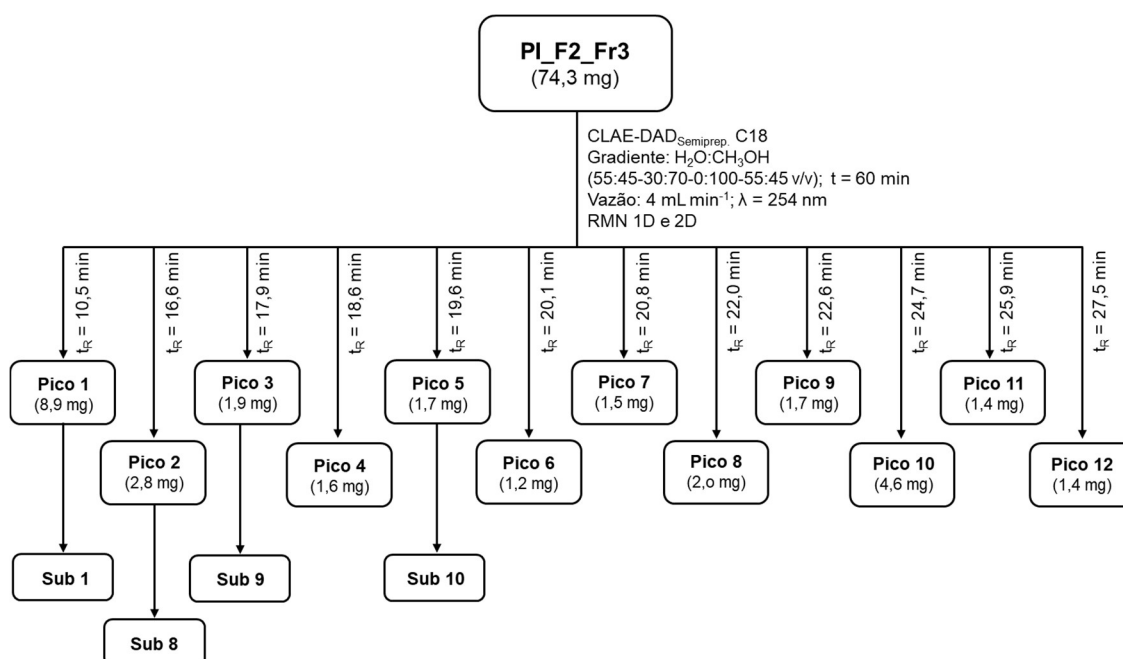
**Figura 13.** Isolamento das substâncias da fração PI\_F2\_Fr2\_I, produzidas por *Phyllosticta elongata*.



As frações Fr3 e Fr4, codificadas como PI\_F2\_Fr3 e PI\_F2\_Fr4, respectivamente, foram analisadas e otimizadas em CLAE-DAD analítico utilizando uma coluna C18 (Phenomenex Luna; 250 x 4,60 mm; 5  $\mu$ m) e eluição em gradiente (H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>OH; H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN). Após as otimizações, as amostras foram fracionadas em CLAE-DAD preparativo para isolamento das substâncias.

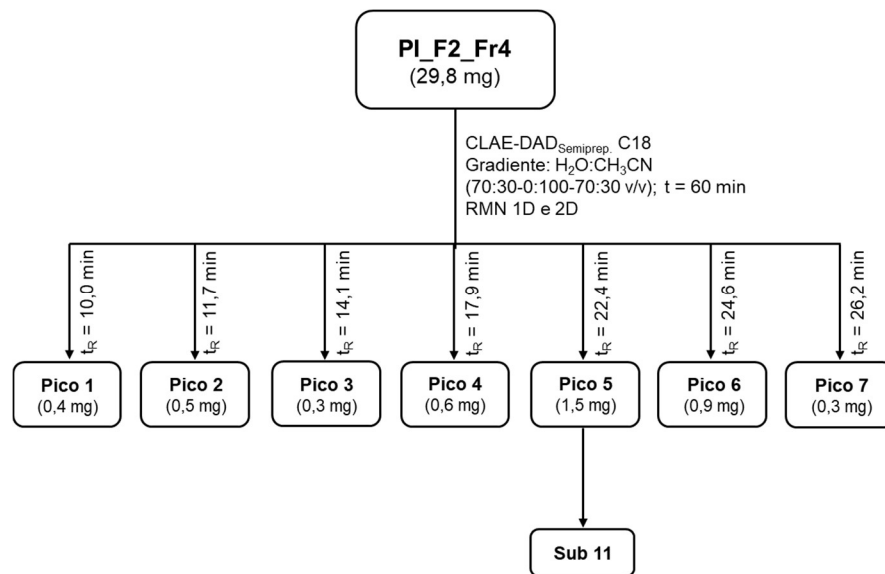
Para a separação cromatográfica de PI\_F2\_Fr3 em CLAE-DAD em escala semipreparativa, utilizou-se uma coluna C-18 (Phenomenex Luna; 250 x 10; 5  $\mu$ m), eluição em gradiente (H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>OH), vazão de 4,0 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 200  $\mu$ L e monitoramento em 254 nm. Esta separação forneceu 12 subfrações, as quais foram analisadas por RMN, resultando no isolamento e identificação de quatro substâncias (Figura 14).

**Figura 14.** Isolamento das substâncias da fração PI\_F2\_Fr3, produzidas por *Phyllosticta elongata*.



A separação cromatográfica de PI\_F2\_Fr4 foi realizada em CLAE-DAD em escala semipreparativa, no qual foi usado uma coluna C-18 (Phenomenex Luna; 250 x 10; 5  $\mu$ m), eluição em gradiente (H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN), vazão de 4,0 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 200  $\mu$ L e monitoramento em 254 nm, fornecendo 7 subfrações, as quais foram analisadas por RMN (Figura 15).

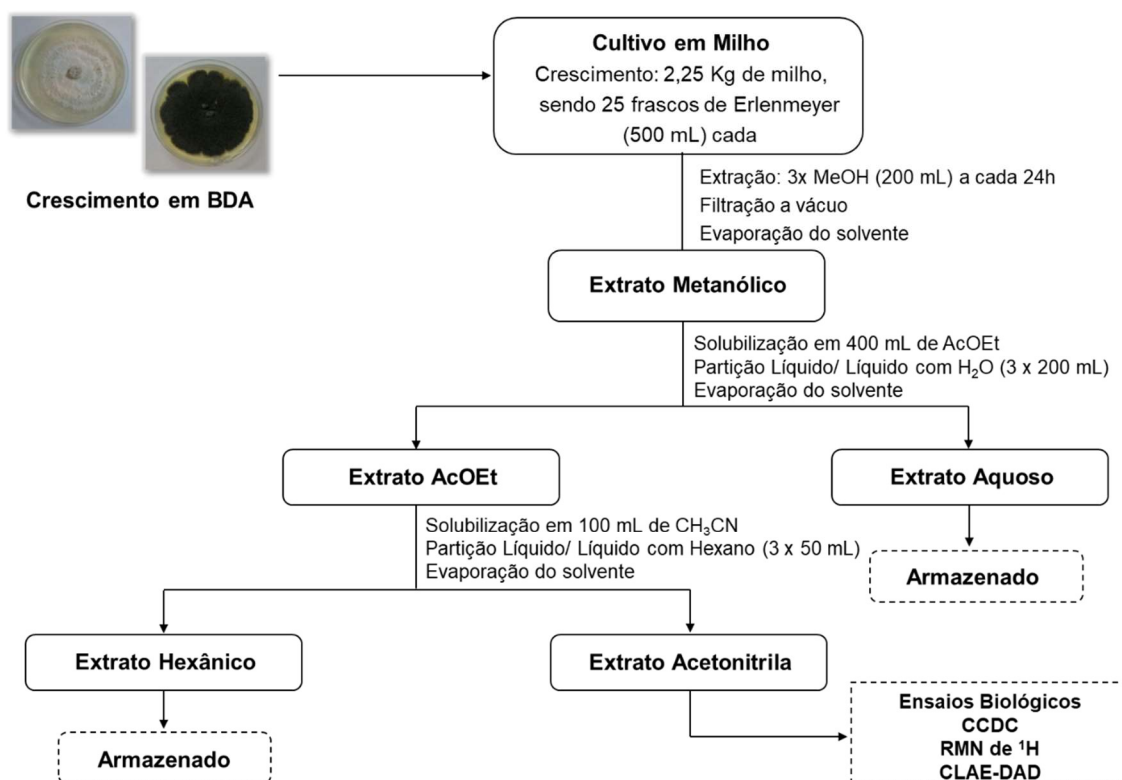
**Figura 15.** Isolamento das substâncias da fração PI\_F2\_Fr4, produzidas por *Phyllosticta elongata*.



### 3.2.4.2 Obtenção dos extratos brutos de *D. hongkongensis* e *P. elongata* em meio sólido de milho

As linhagens endofíticas, preservadas em slants, foram cultivadas em placas de Petri preparadas com meio BDA, a 28°C. Após o crescimento desses endófitos, aproximadamente um terço de micélio de cada placa de Petri foi inoculado em milho, previamente esterilizado, por 21 dias, a 25°C. Finalizado o período de incubação, realizou-se o processo descrito na Figura 16. Paralelamente, foi realizado um branco milho (sem a inoculação do endófito), seguindo a mesma metodologia.

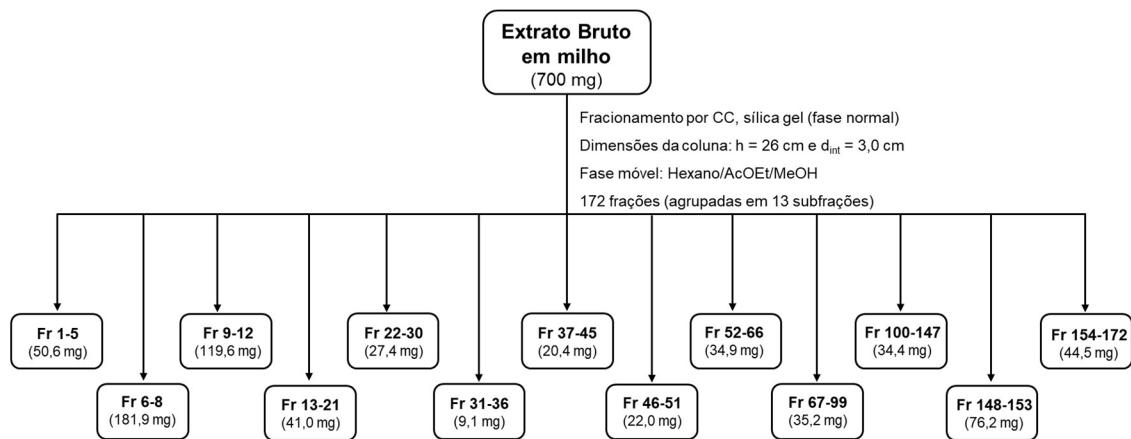
**Figura 16.** Cultivo e obtenção do extrato bruto de *D. hongkongensis* e *P. elongata* em meio de cultivo Milho.



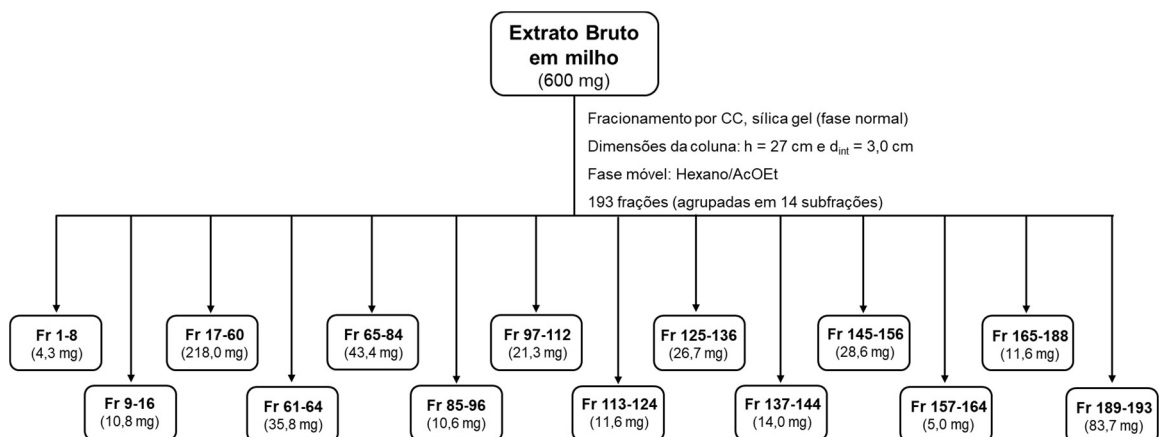
### 3.2.4.2.1 Fracionamento dos extratos brutos obtidos do cultivo em meio sólido de milho

A análise do perfil obtido por CLAE-DAD em modo analítico e CCDC dos extratos brutos (extrato acetonitrila) de *D. hongkongensis* e *P. elongata*, conduziu ao fracionamento dos extratos por cromatografia em coluna com sílica gel 60H, utilizando como fase móvel o sistema de eluentes em gradiente, em ordem crescente de polaridade (Figuras 17 e 18), resultando em 172 e 200 frações, respectivamente. Estas foram submetidas a análise por RMN de <sup>1</sup>H e CLAE-DAD nas mesmas condições descritas no item 3.2.3.

**Figura 17.** Fracionamento do extrato bruto de *D. hongkongensis* obtido em meio de cultivo milho.



**Figura 18.** Fracionamento do extrato bruto de *P. elongata* obtido em meio de cultivo milho.



### 3.2.4.2.2 Isolamento das substâncias produzidas por *D. hongkongensis*

As frações Fr 37-45 e Fr 52-66, codificadas como PI-G13-Mi-37-45 e PI-G13-Mi-52-66, respectivamente, foram analisadas e otimizadas em CLAE-DAD modo analítico, utilizando uma coluna C18 (Phenomenex Luna; 250 x 4,60 mm; 5  $\mu$ m) e eluição em gradiente (H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN).

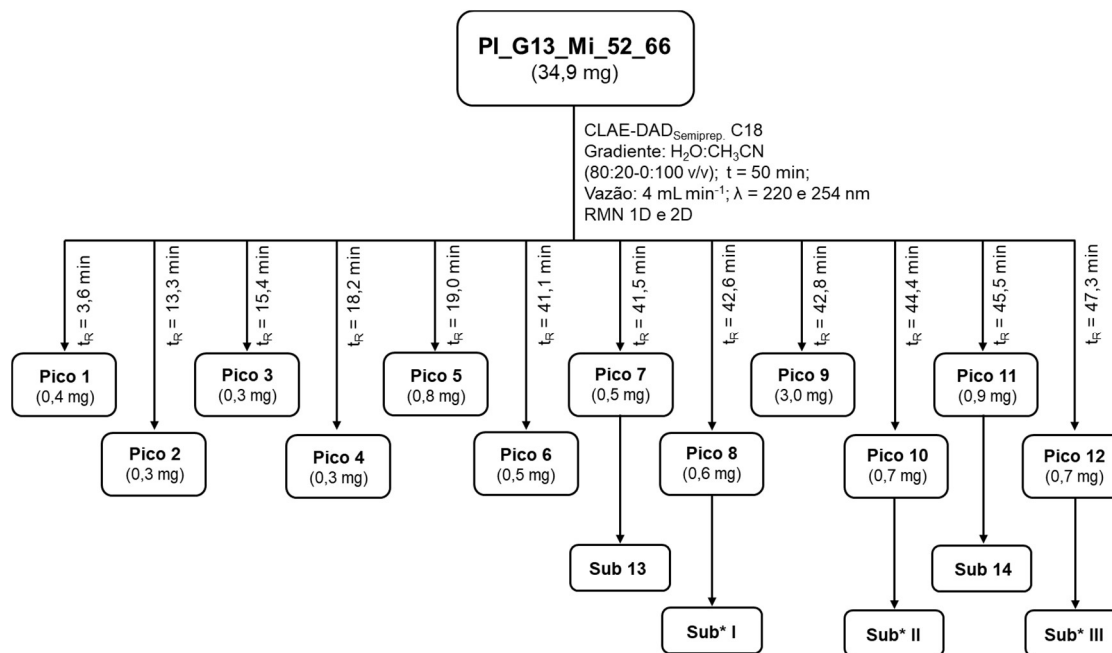
Após análise por CLAE-DAD analítico, a subfração PI-G13-Mi-37-45 mostrou a presença de uma única banda cromatográfica, sendo posteriormente submetida à análise por RMN, resultando na identificação da substância **12**.

A partir da análise e otimização em CLAE-DAD analítico, a fração PI-G13-Mi-52-66 foi submetida a fracionamento em CLAE-DAD em escala semi-preparativa, no



qual utilizou-se coluna C18 (Phenomenex Luna; 250 x 10; 5  $\mu\text{m}$ ), eluição em gradiente ( $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ ), vazão de 4,0  $\text{mL min}^{-1}$ , volume de injeção de 100  $\mu\text{L}$  e monitoramento em 220 e 254 nm (Fluxograma 4), fornecendo 12 subfrações, as quais foram analisadas por RMN, resultando no isolamento e identificação de seis substâncias (Figura 19).

**Figura 19.** Isolamento das substâncias da fração PI-G13-Mi-52-66.



**Sub\*:** substâncias que se encontram em fase de determinação estrutural (espectros de RMN de  $^1\text{H}$  encontram-se nos apêndices 1-3).

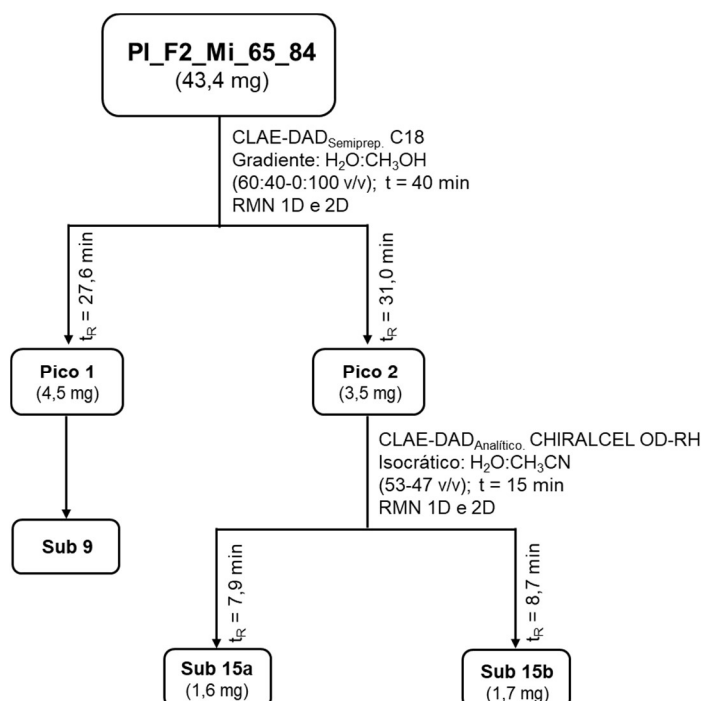
### 3.2.4.2.3 Isolamento das substâncias produzidas por *P. elongata*

A fração Fr 65-84, codificada como PI-F2-Mi-65-84, foi analisada e otimizada em CLAE-DAD modo analítico, utilizando uma coluna C18 (Phenomenex Luna; 250 x 4,60 mm; 5  $\mu\text{m}$ ) e eluição em gradiente ( $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ ). Após otimizações, a amostra foi fracionada em CLAE-DAD em escala semi-preparativa, no qual utilizou-se coluna C18 (Phenomenex Luna; 250 x 10,0; 5  $\mu\text{m}$ ) e eluição em gradiente ( $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH}$ ). Esta separação cromatográfica forneceu duas subfrações, as quais foram submetidas a análise por RMN, resultando no isolamento de duas substâncias aparentemente (Figura 20)

A segunda subfração obtida foi submetida a CLAE-DAD modo analítico, utilizando uma coluna de sílica CHIRALCEL OD-RH (150 x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ) e eluição

isocrática H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (53:47 v/v; 1 mL min<sup>-1</sup>) por 15 min. Após análise do perfil cromatográfico pode-se observar a presença de duas bandas com tempos de retenção distintos entre si (Figura 20). Estas por sua vez, foram separadas, seguindo a mesma análise e otimização em CLAE-DAD analítico descrito anteriormente, resultando no isolamento de dois enantiômeros.

**Figura 20.** Isolamento das substâncias da fração PI-F2-Mi-65-84.



### 3.2.5 Ensaios Biológicos

#### 3.2.5.1. Avaliação da atividade antibacteriana<sup>1</sup>

Os extratos foram testados frente às bactérias Gram positivas (*S. epidermidis* ATCC 35984, *S. aureus* ATCC25923, *E. faecalis* ATCC29212, *E. faecium* VRE16) e Gram negativas (*K. pneumoniae* ATCC700603 e *E. coli* ATCC 25922).

Neste ensaio, cada extrato foi diluído em DMSO para a preparação de uma solução estoque 100x concentrada. Posteriormente, a solução estoque foi diluída 1:100 em caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado (MHCA) (BD). A partir disso, cada amostra foi testada a 512 µg/mL a 1% DMSO, ou na maior concentração em que foi

possível dissolver o composto sem que houvesse precipitação, de acordo com o preconizado pelo CLSI (2013). A adição do inóculo foi realizada de acordo com CLSI (2013) para o método de microdiluição em caldo. Para o controle positivo foi adicionado caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado 1% DMSO com as bactérias testadas e para controle negativo utilizou-se apenas caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado 1% DMSO, sem bactéria, para mostrar que não houve contaminação do mesmo.

A incubação foi realizada a 37°C e a leitura visual dos resultados foi feita após 24h. Quando não houve crescimento bacteriano, a triagem foi considerada positiva e indica que houve atividade antibacteriana na concentração testada. Neste caso, a concentração inibitória mínima pode ser 512 µg/mL ou menos ( $\leq 512 \mu\text{g/mL}$ ). Quando houve crescimento bacteriano, a triagem foi considerada negativa e indicou que não houve atividade antibacteriana na concentração testada. A triagem negativa não exclui a possibilidade da amostra apresentar atividade antibacteriana em concentrações maiores, por isso, os resultados foram expresso como “> 512 µg/mL”. O ensaio foi realizado em duplicata.

As substâncias puras foram testadas frente às bactérias Gram positivas (*S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* ATCC 700221) e Gram negativas (*A. baumannii* ATCC 1906, *K. pneumoniae* ATCC 700603 e *P. aeruginosa* ATCC 27853). Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), cada amostra foi diluída em DMSO e preparado uma solução estoque 100x concentrada. Posteriormente, a solução estoque foi diluída 1:100 em caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado (MHCA) (BD) segundo o CLSI (2013). A partir disso, cada substância foi testada em 256 µg/ml a 1% DMSO. Dos poços de cada amostra a 256 µg/ml partiram as diluições seriadas (1:2) até a concentração de 0,06 µg/ml. Posteriormente, seguiu-se o mesmo procedimento descrito para os extratos.

Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), 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; SABATH, 2004).

<sup>1</sup>Ensaio realizado sob responsabilidade da Prof.<sup>a</sup> Dra. Ilana L. B. C. Camargo, Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular (LEMiMo), IFSC-USP.

### 3.2.5.2 Determinação da capacidade de erradicação do biofilme<sup>2</sup>

Inoculou-se *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (controle negativo, má formadora de biofilme) e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (controle positivo, boa formadora de biofilme) em Caldo BHI (Brain Heart Infusion) 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 degradação do biofilme formado foi posteriormente testada após a formação do biofilme da *S. epidermidis* ATCC 35984.

Após o período de 24 horas, retirou-se o meio de cultura com as bactérias planctônicas, seguida de lavagem com solução fisiológica 0,85% para que permaneça na microplaca apenas o biofilme. Em seguida adicionou-se cada extrato, na concentração de 512 µg mL<sup>-1</sup>, diluído em DMSO a 1% quando necessário, em meio BHI 0,75% glicose fresco nos poços onde há formação de biofilme pela *S. epidermidis* ATCC 35984. 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. A incubação foi realizada à 37°C por mais 24 horas. Essa segunda etapa permitiu a degradação de biofilme pelo composto.

Após as 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 realizada a remoção do cristal violeta com etanol:acetona (80:20) o qual 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 35984 e da média das absorbâncias do biofilme de *S. epidermidis* ATCC 12228, ambos sem amostra. 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 extrato em degradar o biofilme, a análise dos dados foi feita com base na comparação da produção de biofilme de *S. epidermidis* ATCC 35984 com e sem extrato. 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 absorvância da produção de biofilme pela linhagem *S. epidermidis* ATCC 35984 sem amostra e das médias de absorvância das produções de biofilme pela *S. epidermidis* ATCC 35984 com cada extrato. Quando a análise de variância apresentar valor de  $P < 0.05$ , indica uma diferença significativa entre as duas amostras.

<sup>2</sup>Ensaio realizado sob responsabilidade da Prof.<sup>a</sup> Dra. Ilana L. B. C. Camargo, Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular (LEMiMo), IFSC-USP.

### 3.2.5.3 Avaliação da atividade anti-glicação

A atividade anti-glicação foi determinada segundo o método descrito por Lunceford e Gugliucci (2005), com algumas modificações (FRAIGE et al., 2018), a fim de avaliar a capacidade de inibição da formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs).

O ensaio se baseia na capacidade de inibição que muitas substâncias têm na reação de glicação entre a proteína albumina de soro bovino (BSA) com o metilglioxal (MGO), uma espécie reativa, dicarbonílica, com potente ação de glicação. A BSA ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foi preparada em  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão fosfato, pH 7,4, contendo  $150 \text{ mmol L}^{-1}$  de cloreto de sódio. O inibidor aminoguanidina ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foi solubilizado em tampão fosfato e os extratos em DMSO/tampão 1:1. O MGO ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e os extratos ( $150 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram adicionados à solução de BSA, e posteriormente incubados à  $37^\circ\text{C}$  por 72h. Foram preparados o branco contendo tampão e BSA, o controle negativo com tampão, BSA e MGO e controle positivo contendo tampão, BSA, aminoguanidina e MGO.

Após a incubação, a fluorescência das amostras foi medida no máximo de excitação de 370 nm e máxima emissão de 440 nm, usando o *software* de análises de dados Gen 5. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A porcentagem de inibição de formação de AGES foi calculada usando a seguinte equação:

$$\% \text{Inibição} = [(FL_{CN} - FL_{bCN}) - (FL_s - FL_{bs})] / (FL_{CN} - FL_{bCN}) \times 100$$

onde,  $FL_{CN}$  e  $FL_{bCN}$  corresponde às intensidades de fluorescência do controle negativo e seu branco, respectivamente, e  $FL_s$  e  $FL_{bs}$  são as intensidades de fluorescência de cada extrato e o seu branco, respectivamente.

### 3.2.5.4 Avaliação da atividade anticolinesterásica<sup>3</sup>

A atividade enzimática da acetilcolinesterase foi determinada em microplacas, pelo método espectrofotométrico de Ellman, modificado por Rhee et al. (2001). Neste ensaio, a enzima acetilcolinesterase hidrolisa o substrato iodeto de acetilcolina resultando no produto tiocolina, que reage com o 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) para produzir o 5-tio-2-nitrobenzoato e 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina, os quais podem ser detectados a 405 nm. Em cada poço das microplacas (placas foram adicionados 25 µL do substrato acetilcolina (15 mM), 125 µL de DTNB, 50 µL de tampão Tris-HCl (50 mM, pH 8,0), contendo 0,1% de BSA (Albumina de Soro Bovino) e 25 µL de amostra (20 mg mL<sup>-1</sup> de extrato dissolvido em MeOH, diluídos 10 vezes em tampão Tris-HCl, para dar a concentração final de 1 mg mL<sup>-1</sup>). A absorbância foi medida 4 vezes a 405 nm, utilizando leitor de microplaca da Biotek, modelo Synergy HT, com intervalos de 5 min. Após essas leituras foram adicionados em cada poço 25 µL da enzima acetilcolinesterase (0,2 U mL<sup>-1</sup>). As absorbâncias foram medidas novamente a 405 nm, com intervalos de 5 min. Foram preparados o branco contendo metanol e tampão Tris-HCl e como inibidor padrão, utilizou-se a tacrina e galantamina.

Aumentos na absorbância devido à hidrólise espontânea do substrato foram corrigidos, subtraindo os valores de absorbância obtidos após adição da enzima pelos valores antes da adição da enzima. Assim, a porcentagem de inibição foi calculada usando a seguinte equação:

$$\%_{\text{Inibição}} = 100\% - [(Abs_A \times 100)/Abs_B]$$

onde,  $Abs_A$  e  $Abs_B$  correspondem à média da absorbância da amostra e do branco, respectivamente.

<sup>3</sup>Ensaio realizado sob responsabilidade da Dra. Karina Fraige, Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE), IQ-UNESP.

### 3.2.5.5 Avaliação da atividade citotóxica<sup>4</sup>

A atividade citotóxica *in vitro* dos extratos brutos foi determinada pelo método MTT, frente a duas linhagens de células tumorais: HCT-116 (carcinoma cólon-retal) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama). Este método analisa a viabilidade e o estado metabólico da célula, e consiste na análise colorimétrica baseada na conversão do sal

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes nas células metabolicamente ativas (BERRIDGE, 1996).

Neste ensaio, as células foram plaqueadas  $1 \times 10^4$  cél/poço, em placas de 96 poços ( $5 \times 10^4$  cel/ml em 200  $\mu$ L de meio). Após 24 horas, os extratos foram adicionados em concentrações de 5  $\mu$ M e 50  $\mu$ M e incubados por 72 horas. Após esse período, o sobrenadante foi substituído por meio de cultura contendo MTT (0,5 mg/mL), e incubou-se novamente as placas por 3 horas. Em seguida, o sobrenadante foi removido, e após secagem da placa, o precipitado contendo azul de formazan de MTT foi dissolvido em 150  $\mu$ L de DMSO, e a absorbância foi medida a 570 nm (Mosmann, 1983). As amostras foram dissolvidas em DMSO e cada concentração foi analisada em duplicata. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo e DMSO como controle negativo. Os valores de concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>) juntamente com intervalos de confiança de 95% foram calculados por regressão não linear usando GraphPad Prism 5 com concentração da doxorrubicina de 0,00032 a 10  $\mu$ M.

<sup>4</sup>Ensaio realizado sob responsabilidade da Profa. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo; Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais Marinhos, ICB-USP.

### 3.2.5.6 Ensaio frente a cepa de *Trypanosoma cruzi*<sup>5</sup>

Neste ensaio, utilizou-se cepas Tulahuen de *T. cruzi*, parasitas geneticamente modificados para expressar o gene lacZ, sendo este responsável por codificar a enzima  $\beta$ -galactosidase de *E. coli*, que catalisa uma reação colorimétrica com o vermelho de clorofenol  $\beta$ -D-galactopiranosídeo (CPRG, Sigma Chemical Co., St Louis, MO) como substrato. A cepa Tulahuen de *T. cruzi* foi fornecida por Frederick S. Buckner (Universidade de Washington, Seattle, WA). As formas tripomastigotas foram cultivadas em monocamadas de fibroblastos humanos (HFF1) e as epimastigotas foram cultivadas em triptona de fígado (LIT) com soro fetal bovino a 10%, penicilina e estreptomicina. As culturas avaliadas quanto à atividade de  $\beta$ -galactosidase foram cultivadas em meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol acrescido de soro fetal bovino a 10%, penicilina e estreptomicina (BUCKNER et al. 1996).

O ensaio foi realizado em placas para cultura de tecidos de 96 poços (Becton Dickinson). Os fibroblastos humanos (HFF1) foram semeados a  $2 \times 10^3$  por poço em volumes de 80  $\mu$ L (RPMI 1640 sem vermelho de fenol) e incubados overnight. No dia

seguinte, os trypomastigotas, que expressam  $\beta$ -galactosidase (cepa Tulahuen) foram adicionados a  $1,0 \times 10^4$  por poço em volumes de 20  $\mu$ L (RPMI 1640 sem vermelho de fenol). Após 24 h, as amostras foram adicionadas em diluições seriadas em volumes de 50  $\mu$ L, a fim de obter concentrações na faixa de 300 a 0,4  $\mu$ M, sendo que cada diluição foi avaliada em triplicata. Anteriormente, as soluções estoque foram preparadas em DMSO e diluídas em meio RPMI 1640, sem vermelho de fenol. Após 72 h de incubação, as placas foram inspecionadas em um microscópio invertido para garantir o crescimento dos controles e a esterilidade. Em seguida, 50  $\mu$ L do substrato contendo CPRG e Nonidet P-40 (concentração final de 0,1%) foram adicionados a todos os poços. Em poços com atividade de  $\beta$ -galactosidase, houve mudança da cor amarela para vermelho e esta mudança foi medida a 570 nm em um leitor de microplacas automatizado. Os dados foram então analisados no Software Sigma Plot e posteriormente determinado os valores de  $IC_{50}$ . O fármaco benznidazol (BZ; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) foi usado como controle positivo e culturas de parasitas não tratadas foram utilizadas como controle negativo.

<sup>5</sup>Ensaio realizado sob responsabilidade do Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo, Laboratório de Química Medicinal e Computacional (LQMC-IFSC-USP).

### *3.2.6 Determinação dos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por Diaporthe hongkongensis e Phyllosticta elongata*

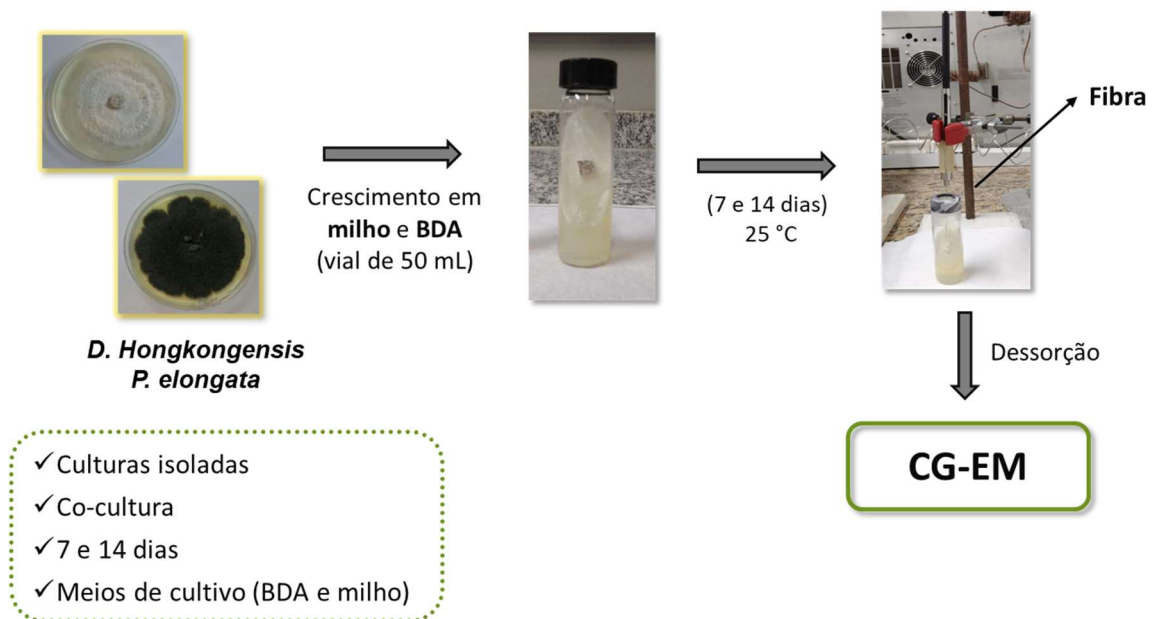
#### *3.2.6.1 Cultivos dos fungos endofíticos e extração dos COVs por HS-SPME (Microextração em Fase Sólida por Headspace)*

Inicialmente, cada endófito foi inoculado em placas de Petri, contendo meio MDA e incubada durante 7 dias a 25°C. Para culturas simples, um disco de 5 mm de diâmetro, referente a cada microrganismo, foi inoculado no centro dos vials (50 mL), contendo 20 mL de meio BDA ou milho (16,5 g) e imediatamente selados com tampas contendo septos de Teflon<sup>®</sup>. Similarmente, realizou-se experimentos de co-cultura, no qual dois discos de 5 mm de diâmetro, referente aos dois endófitos, foram inoculados em lados opostos dos vials. O período de incubação, para ambos cultivos, foi 7 e 14 dias a 25°C sob condições estáticas. Após esse período, os COVs foram extraídos durante 50 min por HS-SPME, utilizando uma fibra extratora de revestimento triplo DVB/CAR/PMDS (divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano 50/30  $\mu$ m, Supelco)



colocada acima (cerca de 1 cm) da superfície da cultura fúngica. Em seguida, a fibra foi removida e inserida no CG-EM por 3 min para dessorção dos voláteis (Figura 21). Utilizou-se como controle (branco) os vials contendo apenas os meios de cultivo sem adição do fungo.

**Figura 21.** Experimento para determinação dos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por *D. hongkongensis* e *P. elongata* por HS-SPME.



Fonte: Autor

### 3.2.6.2 Tratamento e análise dos dados

Os cromatogramas obtidos das análises por CG-EM foram integrados e os  $t_R$  (tempo de retenção) e áreas dos picos tabulados. O cálculo do índice de retenção linear foi calculado utilizando uma série homóloga de *n*-alcanos C<sub>8</sub>-C<sub>40</sub> (Sigma-Aldrich). O índice de retenção do analito é obtido por interpolação, relacionando o tempo de retenção do analito com o tempo de retenção de dois padrões (séries homólogas de hidrocarbonetos), sendo estes eluídos antes e após o pico do composto de interesse (VAN DEN DOOL AND KRATZ, 1963). Para o cálculo do índice de retenção linear foi utilizada a equação de Van Den Dool e Kratz:

$$IR = 100.n + 100. (t_{Rx} - t_{Rn} / t_{Rn+1} - t_{Rn})$$

Na qual,  $n$  é o número de carbonos do  $n$ -alcano anterior ao analito,  $t_{R_x}$  é o tempo de retenção do analito de interesse,  $t_{R_n}$  é o tempo de retenção do  $n$ -alcano eluído antes do analito e  $t_{R_{n+1}}$  é tempo de retenção do  $n$ -alcano eluído após o analito. Os índices de retenção calculados (**IR**) foram comparados com o banco de dados NIST.

***Bioprospecção dos fungos endofíticos  
associados à *Platonia insignis* Mart.***

## 4. Bioprospecção dos fungos endofíticos associados à *Platonia insignis* Mart.

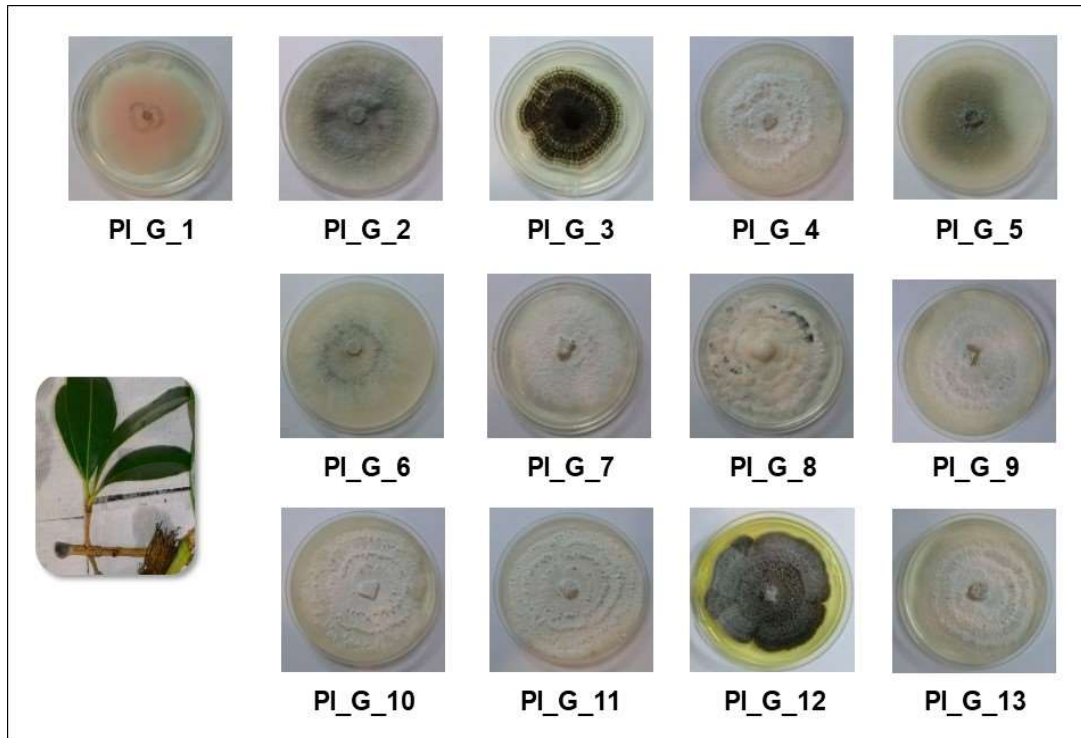
### 4.1 Isolamento das cepas fúngicas

A metodologia empregada no isolamento dos fungos endofíticos de *Platonia insignis* Mart. possibilitou o isolamento de 18 linhagens puras (Figuras 22 e 23), codificadas como PI\_G\_1, PI\_G\_2, PI\_G\_3, PI\_G\_4, PI\_G\_5, PI\_G\_6, PI\_G\_7, PI\_G\_8, PI\_G\_9, PI\_G\_10, PI\_G\_11, PI\_G\_12, PI\_G\_13, PI\_F\_1, PI\_F\_2, PI\_F\_3, PI\_F\_4 e PI\_Fr\_1 (PI = *Platonia insignis*; G = galhos; F = folha; Fr = fruto) sendo, posteriormente, preservadas em “*slants*” (método Castelani) e depositadas na micoteca do Departamento de Química Orgânica, IQ-UNESP/Ar.

O estudo do perfil químico e biológico de fungos endofíticos requer o isolamento destes microrganismos em meios de cultura e sob condições controladas. Neste trabalho, o meio de cultivo utilizado para isolamento dos endófitos foi o BDA, pois trata-se de um meio rico em nutrientes primários essenciais para o crescimento de fungos. Entretanto, deve-se considerar que algumas espécies de microrganismos necessitam de condições e nutrientes específicos para se desenvolver, o que poderia ter interferido no crescimento de outras linhagens, impedindo, assim, o seu isolamento. Desta forma, os fungos isolados foram os que mais se adaptaram as condições de crescimento empregados.

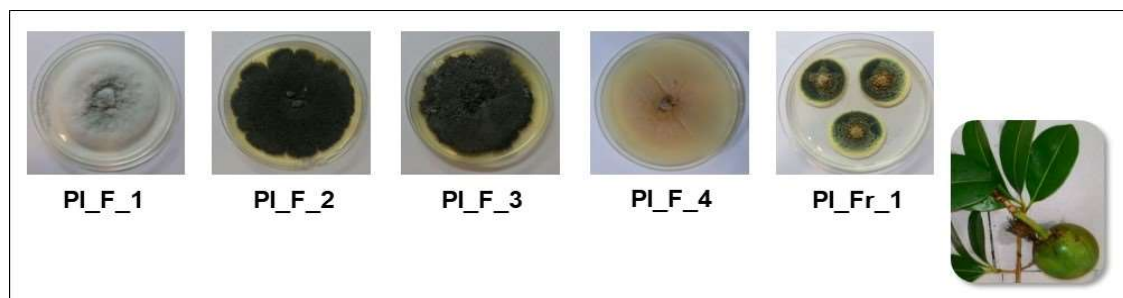
A avaliação da pureza das linhagens foi realizada por estrias paralelas e diferenças macroscópicas observadas em cada cultura, como: coloração, características da colônia (pigmentação, forma, superfície e borda) e taxa de crescimento, foram adotadas como critérios de seleção. Essa classificação preliminar permitiu uma melhor coleta de informações, a fim de evitar o isolamento de uma mesma espécie repetidamente.

**Figura 22.** Fungos endofíticos isolados dos galhos de *P. insignis*.



Fonte: Autor

**Figura 23.** Fungos endofíticos isolados das folhas e fruto de *P. insignis*.



Fonte: Autor

#### 4.2 Prospecção química dos fungos endofíticos isolados

As linhagens fúngicas isoladas foram cultivadas em meio líquido MDB (escala reduzida) para obtenção dos extratos brutos, conforme metodologia descrita no item 3.2.3. As massas dos extratos obtidas foram consideradas satisfatórias (Tabela 4), com destaque para os fungos PI-G-1, PI-G-3, PI-G-8 e PI-F-1 que apresentaram as

maiores quantidades. Essa variação da quantidade de massa de extrato observada para os endófitos pode ser justificada pelo fato de que cada microrganismo necessita de diferentes condições de cultivo, assim como, nutrientes específicos, destacando que neste trabalho foi empregado a mesma metodologia de cultivo para todos os fungos endofíticos.

**Tabela 4.** Massa dos extratos brutos obtida do cultivo dos endófitos em MDB (escala reduzida).

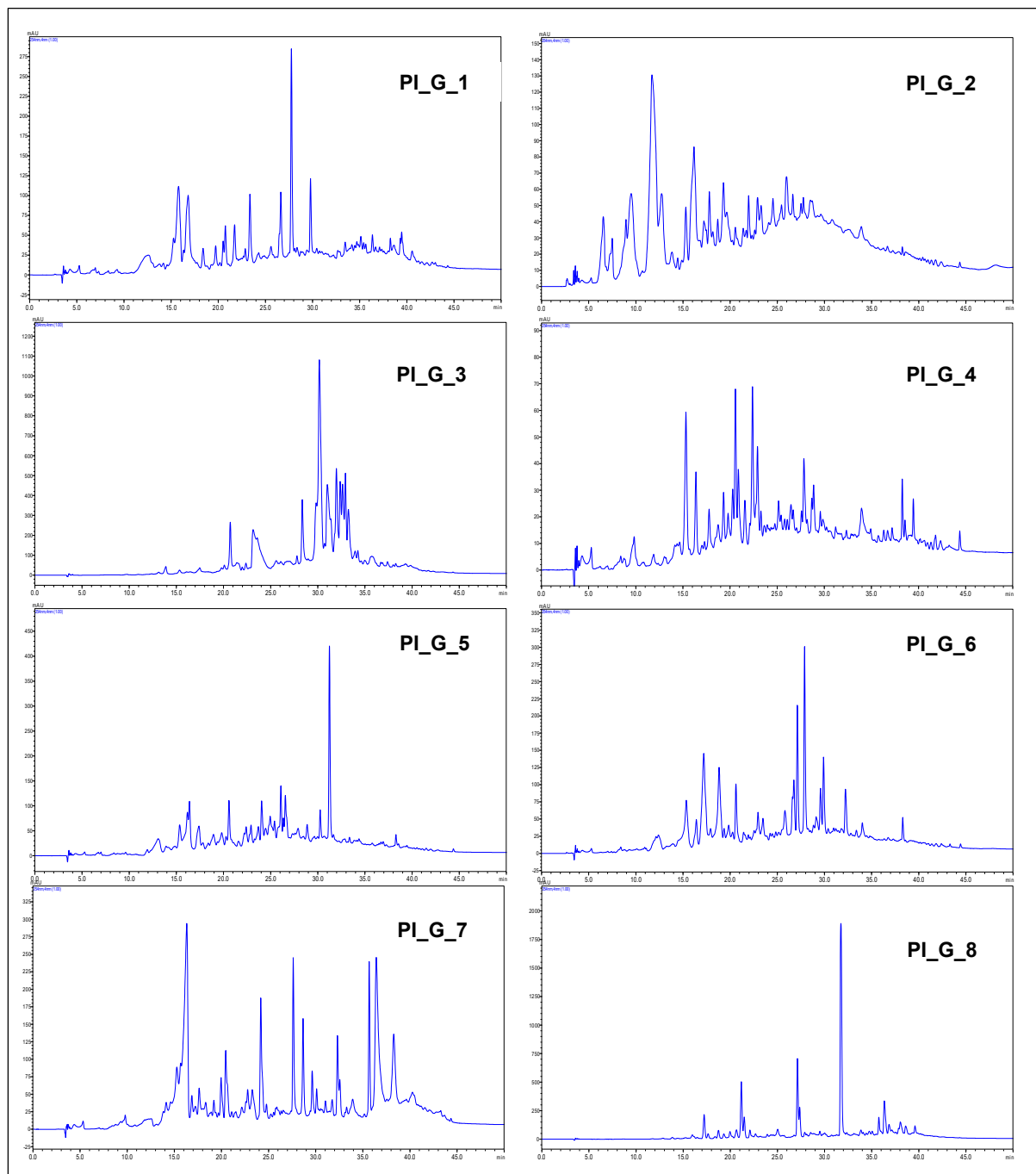
| <b>Fungos endofíticos</b> | <b>Massa dos extratos (mg)</b> |
|---------------------------|--------------------------------|
| PI_G_1                    | <b>64,3</b>                    |
| PI_G_2                    | 48,6                           |
| PI_G_3                    | <b>54,8</b>                    |
| PI_G_4                    | 15,3                           |
| PI_G_5                    | 28,3                           |
| PI_G_6                    | 27,6                           |
| PI_G_7                    | 27,3                           |
| PI_G_8                    | <b>85,2</b>                    |
| PI_G_9                    | 44,3                           |
| PI_G_10                   | 33,7                           |
| PI_G_11                   | 17,8                           |
| PI_G_12                   | 32,9                           |
| PI_G_13                   | 35,2                           |
| PI_F_1                    | <b>86,7</b>                    |
| PI_F_2                    | 34,0                           |
| PI_F_3                    | 26,2                           |
| PI_F_4                    | 28,5                           |
| PI_Fr_1                   | 26,4                           |

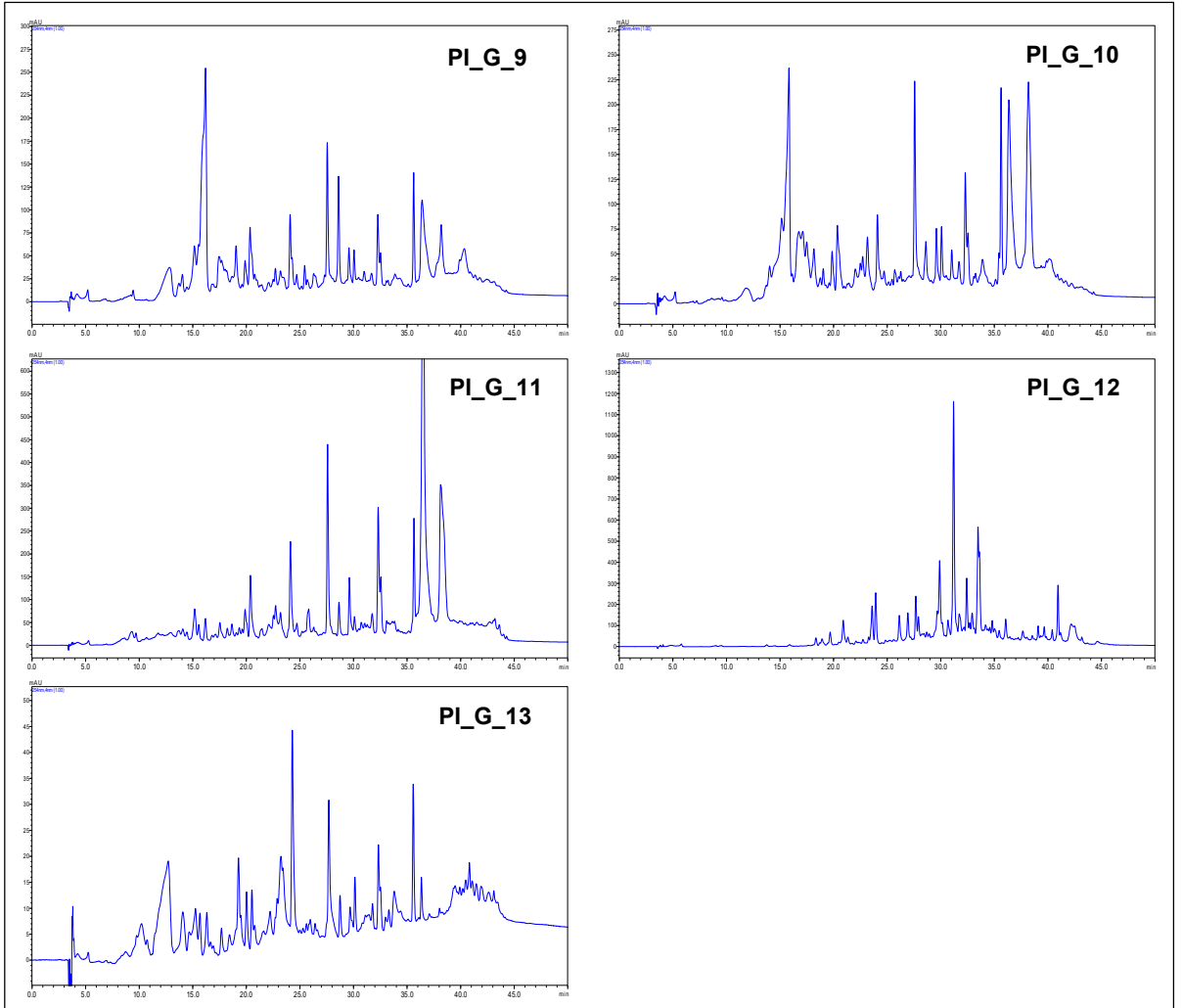
Os extratos brutos foram submetidos a uma análise do perfil químico por CLAE-DAD e RMN de  $^1\text{H}$ , a fim de obter informações, preliminares, sobre a produção metabólica de cada endófito.

Os cromatogramas dos extratos foram obtidos conforme metodologia descrita no item 3.2.3 e estão apresentados nas Figuras 24-26. Ao analisá-los foi possível

observar um perfil químico com grande variedade metabólica para todos os extratos dos fungos isolados. Esta diversidade de metabólitos foi avaliada quanto ao número de bandas apresentadas nos cromatogramas, uma vez que, observou-se bandas com diferentes absorvâncias, entre média e alta polaridade, além de uma boa resolução cromatográfica.

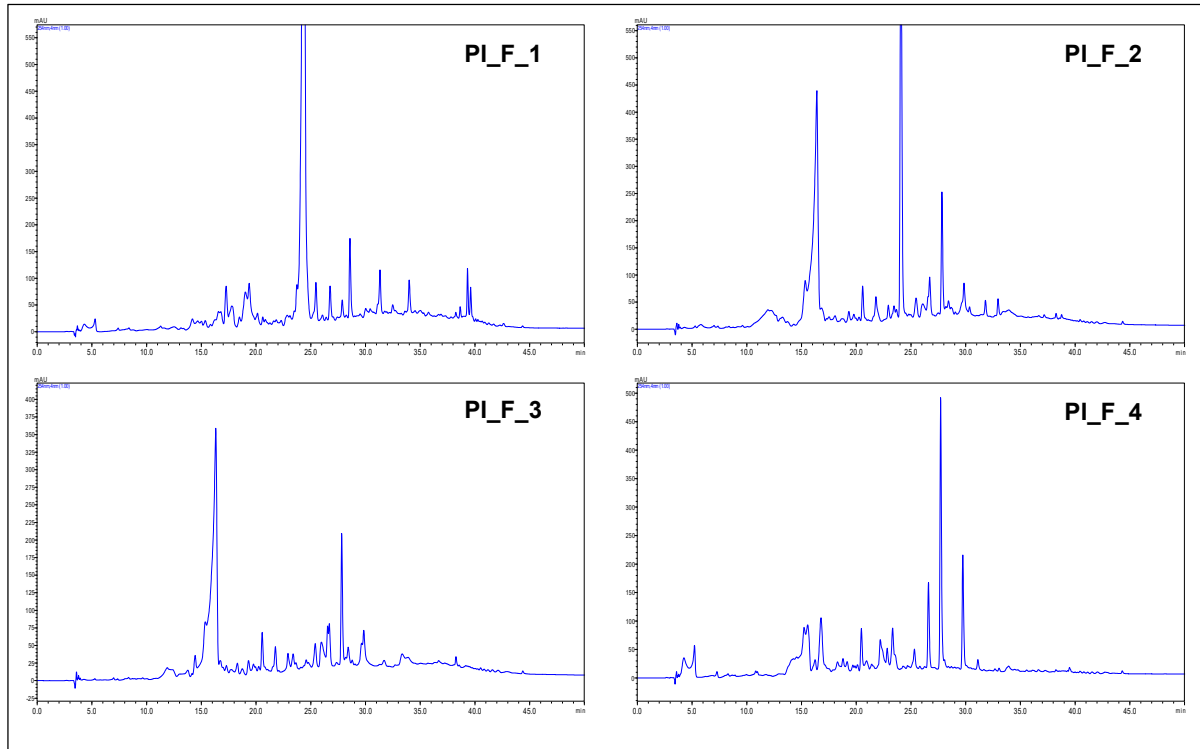
**Figura 24.** Cromatogramas dos extratos brutos dos fungos endofíticos isolados dos galhos de *P. insignis*, em coluna C18, gradiente linear H<sub>2</sub>O/MeOH 95:05 à 00:100 em 40 min,  $\lambda=254$  nm.



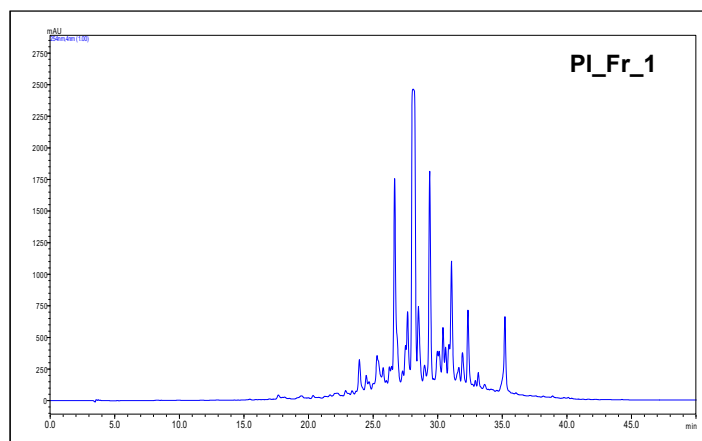




**Figura 25.** Cromatogramas dos extratos brutos dos fungos endofíticos isolados das folhas de *P. insignis* em coluna C18, gradiente linear H<sub>2</sub>O/MeOH 95:05 à 00:100 em 40 min,  $\lambda=254$  nm.



**Figura 26.** Cromatograma do extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto de *P. insignis* em coluna C18, gradiente linear H<sub>2</sub>O/MeOH 95:05 à 00:100 em 40 min,  $\lambda=254$  nm.



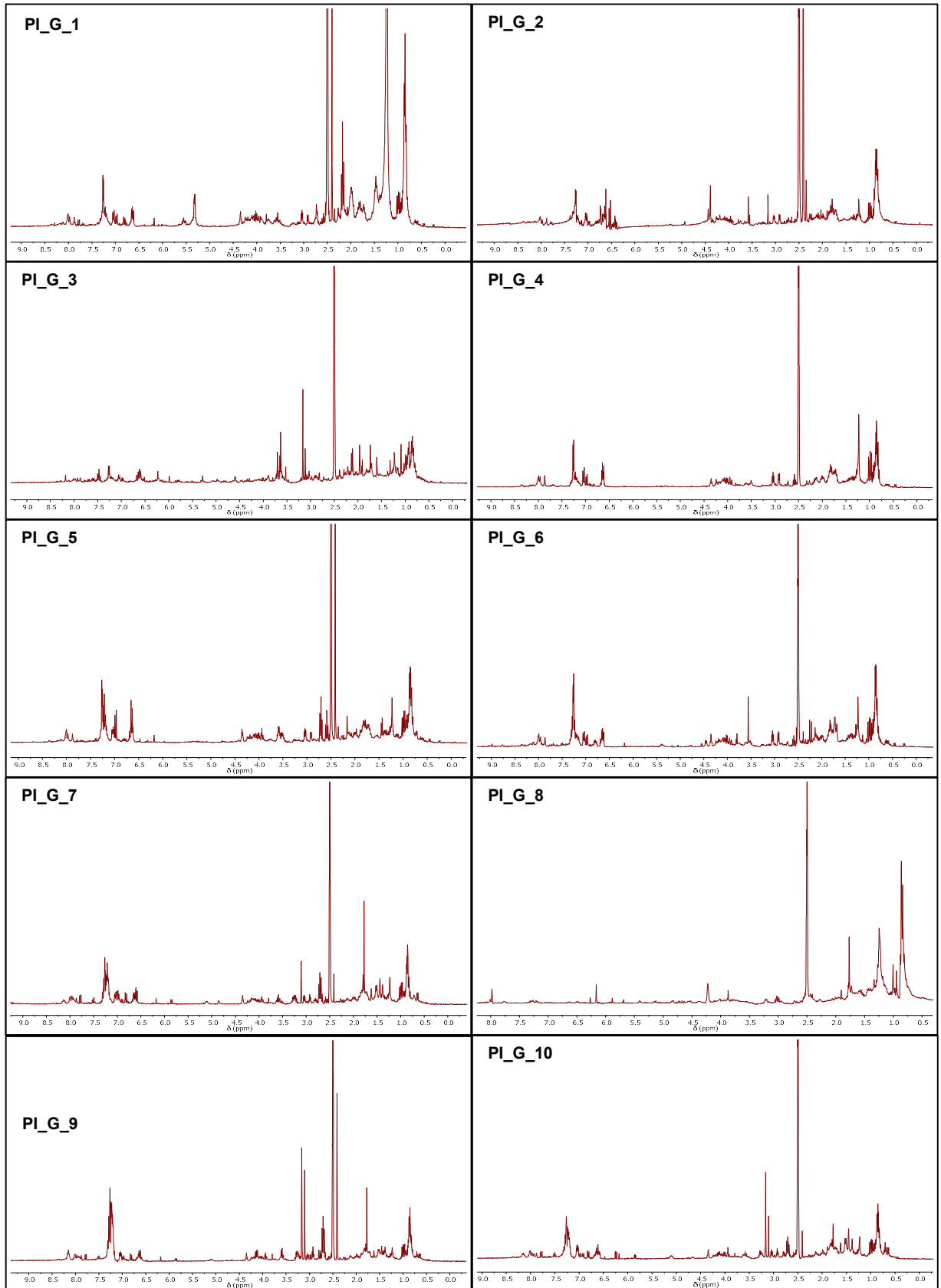
Todos os cromatogramas foram comparados com o controle (meio de cultivo sem inoculação do fungo), revelando a ausência de bandas com o mesmo tempo de retenção e absorções no ultravioleta semelhantes ao do controle, evidenciando que as bandas observadas são provenientes das substâncias produzidas pelos fungos endofíticos.

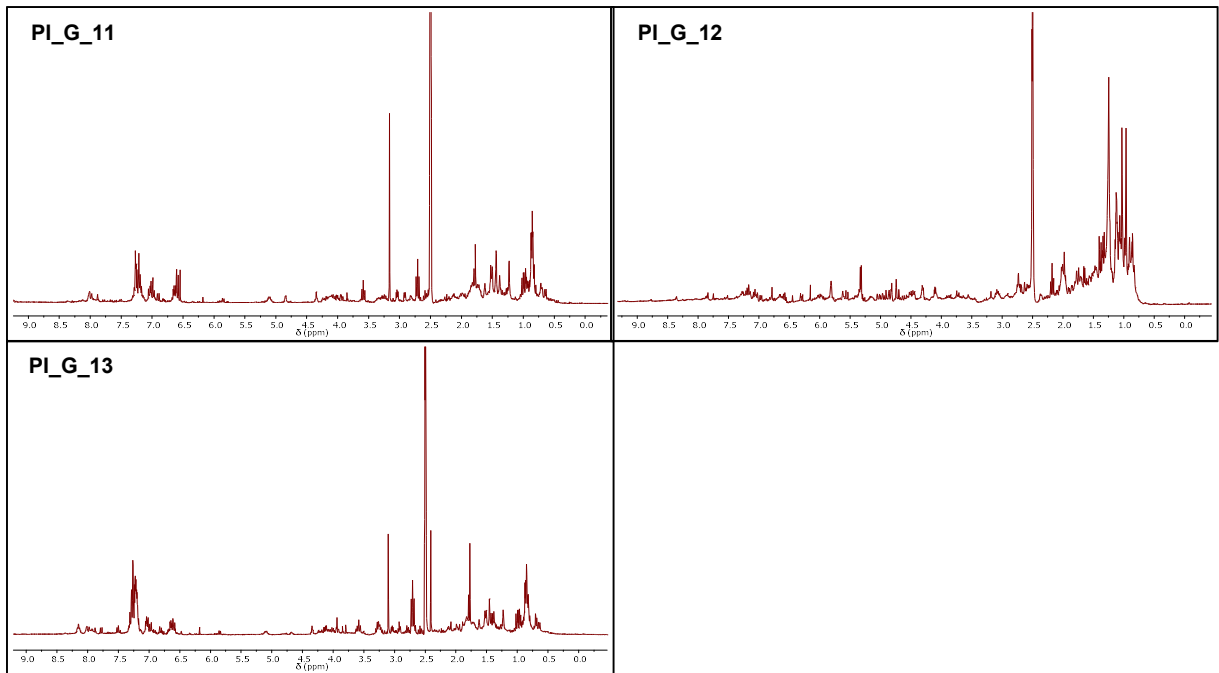
Os extratos brutos foram submetidos a análise por RMN de  $^1\text{H}$  com a finalidade de obter um perfil sobre a natureza química dos hidrogênios presentes nos compostos produzidos por cada endófito.

Ao analisar os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos (Figuras 27-29) foi possível verificar a presença de sinais por toda faixa espectral ( $\delta_{\text{H}}$  0,5-10,9), sendo observados diversos sinais de hidrogênio na região dos carbinólicos ( $\delta_{\text{H}}$  3,0 - 4,0 ppm), sinais de hidrogênios olefínicos ( $\delta_{\text{H}}$  4,5 - 6,0 ppm), aromáticos ( $\delta_{\text{H}}$  6,5 - 8,0 ppm), metilênicos e metílicos ( $\delta_{\text{H}}$  0,5 - 3,0 ppm).

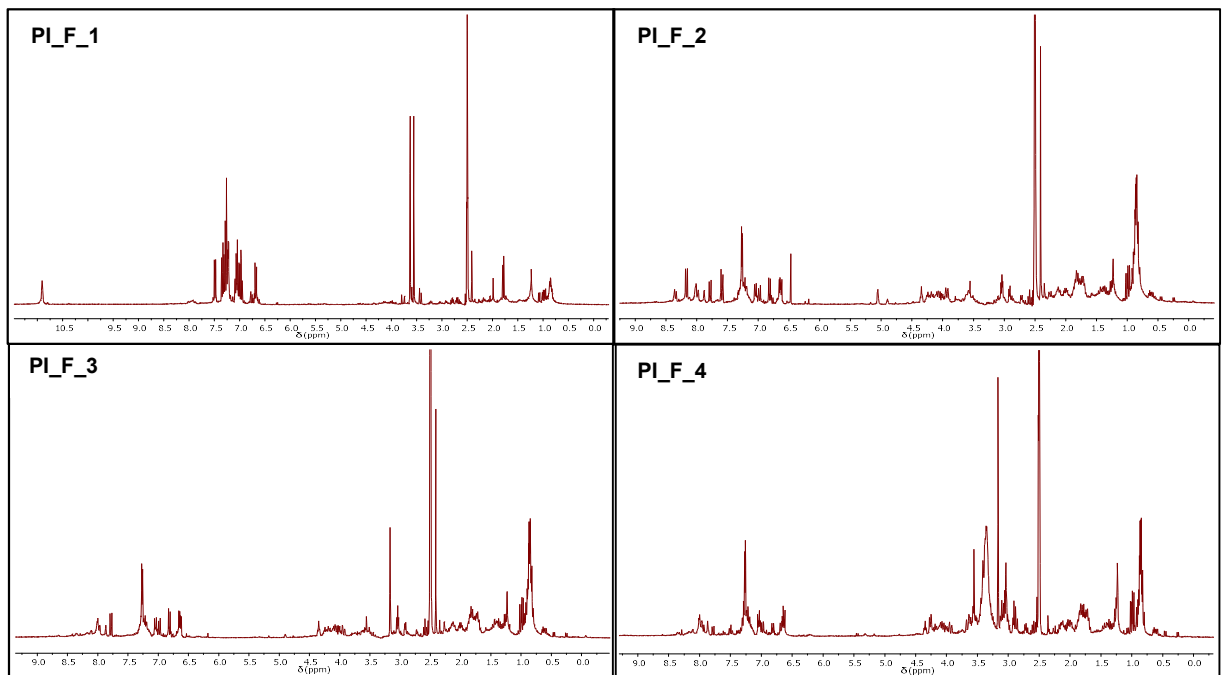
De um modo geral, esta diversidade de sinais sugere a possibilidade de diferentes classes de metabólitos secundários e ressalta a grande diversidade química dos extratos produzidos pelos fungos endofíticos isolados.

**Figura 27.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos brutos obtidos em MDB dos fungos endofíticos isolados dos galhos de *P. insignis* (DMSO- $d_6$ , 300 MHz).

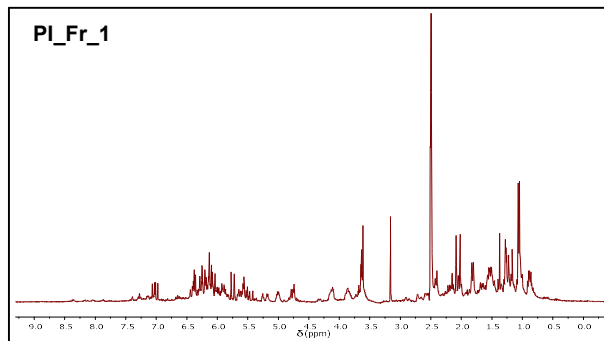




**Figura 28.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos brutos obtidos em MDB dos fungos endofíticos isolados das folhas de *P. insignis* ( $\text{DMSO-}d_6$ , 300 MHz).



**Figura 29.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto obtido em MDB do fungo endofítico isolado do fruto de *P. insignis* (DMSO- $d_6$ , 300 MHz).



### 4.3 Prospecção biológica dos fungos isolados

#### 4.3.1 Avaliação da atividade antibacteriana

Atualmente a resistência bacteriana aos antibióticos constitui um dos problemas de saúde pública mais relevantes, resultando em consequências clínica e econômica. O desenvolvimento dessa resistência é um fenômeno natural resultante da pressão seletiva exercida pelo uso de antibióticos, mas que tem sofrido uma expansão elevada devido ao uso inadequado destes fármacos, uma vez que, é observado uma correlação entre um maior consumo de antibióticos e níveis mais elevados de resistência microbiana (LOUREIRO et al., 2016).

Devido a esse rápido surgimento e disseminação de patógenos resistentes a antibióticos, a busca por novos agentes terapêuticos antibacterianos está se tornando cada vez mais urgente, e os fungos endofíticos representam uma importante fonte para obtenção de novas substâncias (KLIMOVA et al., 2017).

Desta forma, a atividade antibacteriana dos extratos brutos foi avaliada frente às bactérias Gram positivas (*S. epidermidis* ATCC 35984, *S. aureus* ATCC25923, *E. faecalis* ATCC29212, *E. faecium* VRE16) e Gram negativas (*K. pneumoniae* ATCC700603 e *E. coli* ATCC 25922). Os extratos PI\_F\_2 e PI\_Fr\_1 apresentaram atividade contra todas as bactérias Gram positivas, enquanto que PI\_G\_2 foi ativo somente para a *S. epidermidis* ATCC 35984, *E. faecalis* ATCC29212, *E. faecium*

VRE16. Além disso, o extrato PI\_F\_2 também apresentou atividade frente à bactéria Gram negativa *E. coli* ATCC 25922. Esses resultados demonstram que esses endófitos apresentam potencial na produção de substâncias com atividade antibacteriana (Tabela 5).

**Tabela 5.** Resultado da atividade antibacteriana dos extratos brutos frente às linhagens resistentes.

| Extratos | Bactérias                          |                               |                                 |                            |                                    |                             |
|----------|------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
|          | <i>S. epidermidis</i><br>ATCC35984 | <i>S. aureus</i><br>ATCC25923 | <i>E. faecalis</i><br>ATCC29212 | <i>E. faecium</i><br>VRE16 | <i>K. pneumoniae</i><br>ATCC700603 | <i>E. coli</i><br>ATCC25922 |
| PI_G_1   | > 512                              | > 512                         | > 512                           | > 512                      | > 512                              | > 512                       |
| PI_G_2   | < 512                              | > 512                         | < 512                           | < 512                      | > 512                              | > 512                       |
| PI_G_3   | > 512                              | > 512                         | > 512                           | > 512                      | > 512                              | > 512                       |
| PI_G_4   | > 512                              | > 512                         | > 512                           | > 512                      | > 512                              | > 512                       |
| PI_G_5   | > 512                              | > 512                         | > 512                           | > 512                      | > 512                              | > 512                       |
| PI_G_6   | > 512                              | > 512                         | > 512                           | > 512                      | > 512                              | > 512                       |
| PI_G_7   | > 512                              | > 512                         | > 512                           | > 512                      | > 512                              | > 512                       |
| PI_G_8   | > 512                              | > 512                         | > 512                           | > 512                      | > 512                              | > 512                       |
| PI_G_9   | > 512                              | > 512                         | > 512                           | > 512                      | > 512                              | > 512                       |
| PI_G_10  | > 512                              | > 512                         | > 512                           | > 512                      | > 512                              | > 512                       |
| PI_G_11  | > 512                              | > 512                         | > 512                           | > 512                      | > 512                              | > 512                       |
| PI_G_12  | > 512                              | > 512                         | > 512                           | > 512                      | > 512                              | > 512                       |
| PI_G_13  | > 512                              | > 512                         | > 512                           | > 512                      | > 512                              | > 512                       |
| PI_F_1   | > 512                              | > 512                         | > 512                           | > 512                      | > 512                              | > 512                       |
| PI_F_2   | < 512                              | < 512                         | < 512                           | < 512                      | > 512                              | < 512                       |
| PI_F_3   | > 512                              | > 512                         | > 512                           | > 512                      | > 512                              | > 512                       |
| PI_F_4   | > 512                              | > 512                         | > 512                           | > 512                      | > 512                              | > 512                       |
| PI_Fr_1  | < 512                              | < 512                         | < 512                           | < 512                      | > 512                              | > 512                       |

CIM > 512  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (sem atividade); CIM < 512  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (com atividade).

#### 4.3.2 Determinação da capacidade de degradação de biofilme

Biofilme refere-se a uma comunidade composta por uma ou várias espécies de microrganismos que crescem aderidos a uma superfície e são revestidos por uma

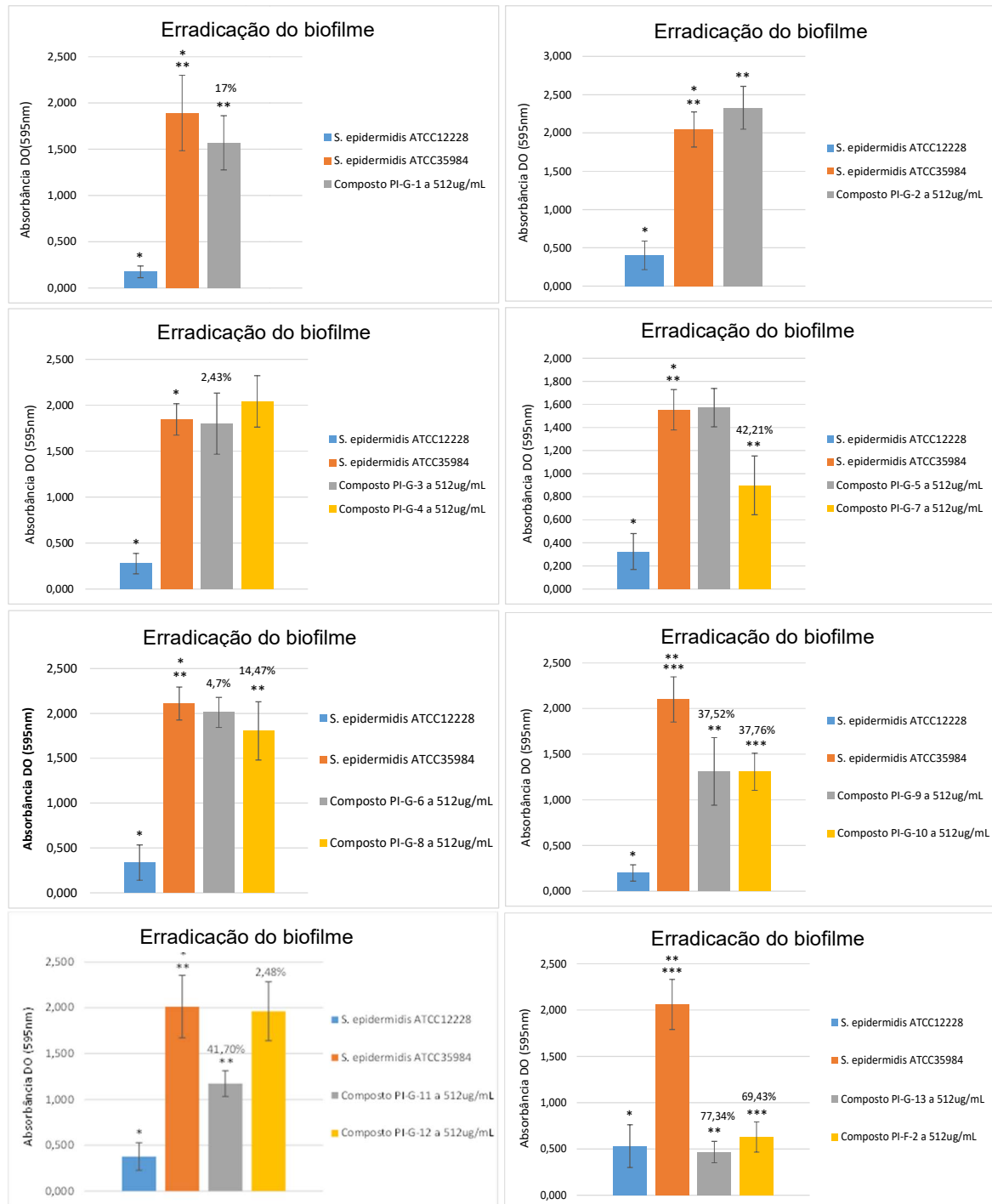
matriz extracelular, constituída por substâncias poliméricas, produzidas pelos próprios microrganismos (AZMAN et al., 2019).

Os biofilmes bacterianos e a sua inerente resistência à maioria dos antibióticos disponíveis, representam um dos grandes desafios atuais da saúde pública. Estima-se que 80% das infecções humanas estejam associadas a biofilmes bacterianos, dentre as quais se destacam aquelas que envolvem dispositivos biomédicos como próteses, cateteres e sondas (NEIDELL et al., 2012; TRENTIN et al., 2013).

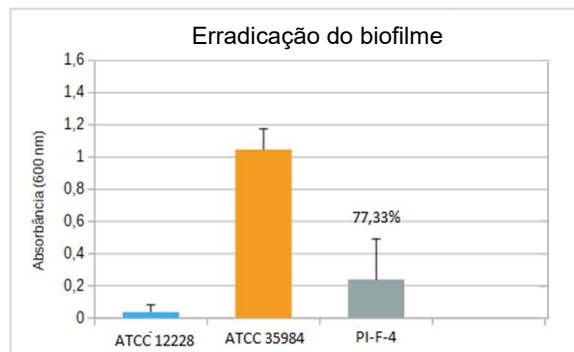
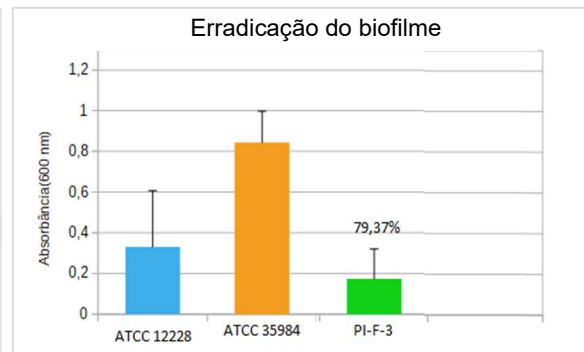
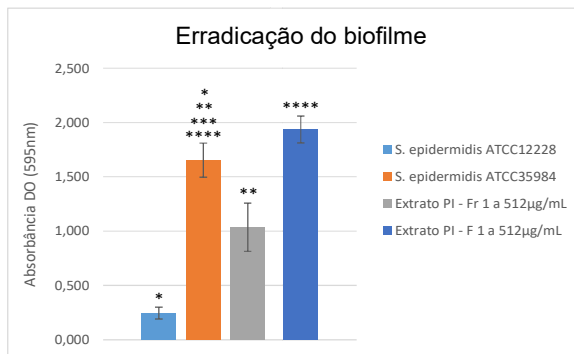
Um outro fato importante é que as células existentes em um biofilme podem se tornar 10-1000 vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos, principalmente através da produção de matriz polimérica extracelular que dificulta o acesso dos antibióticos às células bacterianas. Nesse sentido, grandes esforços são destinados à busca de terapias, capazes de prevenir ou erradicar biofilmes patogênicos, incluindo a pesquisa de novos compostos, novos mecanismos de ação e a criação de materiais com superfícies anti-infectivas (KANAAAN et al., 2017; TRENTIN et al., 2013).

A capacidade de erradicação do biofilme formado pela *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 foi analisada para os extratos brutos a  $512 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 30). Foram observados erradicação do biofilme para os extratos PI\_G\_7, PI\_G\_9, PI\_G\_10, PI\_G\_11, PI\_G\_13, PI\_F\_2, PI\_F\_3, PI\_F\_4, os quais apresentaram percentual de erradicação de 42,21; 37,52; 37,76; 41,70; 77,34; 69,43; 79,37; 77,33%. Os extratos PI\_G\_13, PI\_F\_2, PI\_F\_3 e PI\_F\_4 merecem destaque, pois demonstraram maior atividade neste ensaio. O extrato PI\_Fr\_1 também apresentou capacidade de erradicação do biofilme significativa, entretanto para o mesmo, não foi calculado o valor do percentual de erradicação.

**Figura 30.** Avaliação dos extratos brutos a  $512 \mu\text{g mL}^{-1}$  frente à capacidade de erradicação de biofilme formado por *S. epidermidis* ATCC 35984.







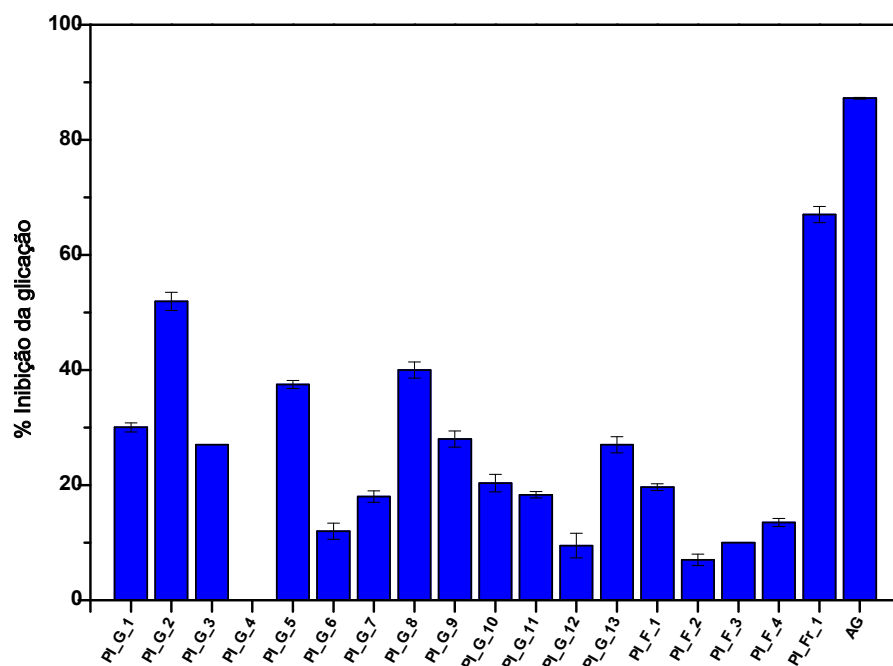
#### 4.3.3 Avaliação da atividade anti-glicação

Os produtos finais da glicação avançada (AGEs) constituem uma grande variedade de substâncias, formadas a partir da reação não enzimática entre açúcares redutores e grupos amina de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, dando origem a espécies dicarbonílicas intermediárias altamente reativas, como o glioxal (GO) e metilglioxal (MGO). Estes, por sua vez, interagem com grupos amina, sulfidrilas, guanidinas de proteínas, resultando na formação dos AGEs. Considerados importantes mediadores de complicações diabéticas, os AGEs são capazes de modificar irreversivelmente as propriedades químicas e funcionais de diversas estruturas biológicas (SINGH et al., 2001; PENG et al., 2011).

Os extratos brutos foram avaliados quanto à atividade antiglicante, por meio da capacidade de inibição da formação de AGEs, e os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de inibição da glicação (Figura 31). Todos os extratos exibiram atividade antiglicante, com destaque para PI\_G\_2 e PI\_Fr-1, que apresentaram os maiores percentuais de inibição (51,9 e 67%, respectivamente),

quando comparado ao padrão aminoguanidina (AG) (87,2%), sugerindo novas fontes naturais de metabólitos secundários com potencial antiglicante. Entretanto, é importante destacar que este ensaio foi realizado para extratos brutos, sendo estas matrizes complexas, os quais foram comparados com uma substância pura.

**Figura 31.** Percentual de inibição dos extratos brutos na formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs).



#### 4.3.4 Avaliação da atividade anticolinesterásica

A doença de Alzheimer é complexa, progressiva e neurodegenerativa, caracterizada por uma alteração do sistema colinérgico. Atualmente inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) têm sido utilizados no tratamento dessa patologia, por meio da modulação da atividade das enzimas que degradam a acetilcolina (MARQUES et al., 2013).

A fim de descobrir novos inibidores desta enzima, realizou-se o ensaio em microplaca para os extratos brutos. Os resultados obtidos mostraram que todos os extratos apresentam potencial para inibição da enzima acetilcolinesterase,

evidenciado por percentuais de inibição que variaram de moderada a fraca, quando comparados aos padrões tacrina e galantamina (Tabela 6).

**Tabela 6.** Percentual de inibição da enzima acetilcolinesterase frente aos extratos/padrões.

| Extratos/Padrões | % de inibição |
|------------------|---------------|
| PI_G_1           | 19,2          |
| PI_G_2           | 26,8          |
| PI_G_3           | 17,5          |
| PI_G_4           | 29,3          |
| PI_G_5           | 24,1          |
| PI_G_6           | 11,5          |
| PI_G_7           | 7,5           |
| PI_G_8           | 19,3          |
| PI_G_9           | 2,0           |
| PI_G_10          | 13,0          |
| PI_G_11          | 22,6          |
| PI_G_12          | <b>41,0</b>   |
| PI_G_13          | 16,2          |
| PI_F_1           | 12,9          |
| PI_F_2           | 12,2          |
| PI_F_3           | 17,5          |
| PI_F_4           | 16,7          |
| PI_Fr_1          | 25,9          |
| Tacrina          | 96,9          |
| Galantamina      | 72,0          |

Concentrações testadas: extratos: 200 µg mL<sup>-1</sup>; padrões: 1,56 µg mL<sup>-1</sup>; Potencial forte (>50% de inibição), moderado (30-50% de inibição) e fraco (<30% de inibição).

#### 4.3.5 Atividade citotóxica

Os fungos endofíticos têm se mostrado uma fonte promissora de substâncias com notável atividade antitumoral, e como exemplo, destaca-se o taxol, um importante fármaco utilizado no tratamento do câncer, sendo este isolado pela primeira vez do fungo endofítico *Taxomyces andreanae* (STIERLE et al.,1993). Desta forma, os extratos brutos foram submetidos ao ensaio de citotoxicidade *in vitro* a fim de avaliar o potencial citotóxico dos mesmos, frente a duas linhagens de células tumorais: carcinoma cólon-retal (HCT-116) e adenocarcinoma de mama (MCF-7).

Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar a atividade citotóxica: amostras sem atividade, com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), com atividade moderada (inibição de crescimento variando de 50 a 75%) e com atividade alta (inibição de crescimento variando de 75 a 100%) (ALMEIDA et al., 2014), além disso, também foram comparados com o padrão doxorubicina (Figura 32 e Tabela 7).

Os resultados obtidos mostraram que somente os extratos PI-G-8 e PI-Fr-1 exibiram alto potencial citotóxico (inibição >75%) frente a linhagem HCT-116, na maior concentração testada. Entretanto, observou-se que a maioria dos extratos, exceto PI-F-2 e PI-F-3, apresentaram atividade moderada (50 à 75%) frente a linhagem MCF-7, na concentração de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Na menor concentração (5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), os extratos apresentaram pouca ou nenhuma atividade frente as duas linhagens.

Ao comparar os resultados obtidos com o padrão doxorubicina, observa-se que os extratos mais ativos apresentam atividade inferior a 80%, mesmo na maior concentração testada (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), entretanto, é necessário considerar que os extratos são matrizes complexas. Desta forma, um estudo bio guiado dos extratos mais promissores, em busca das substâncias bioativas, se torna uma opção.

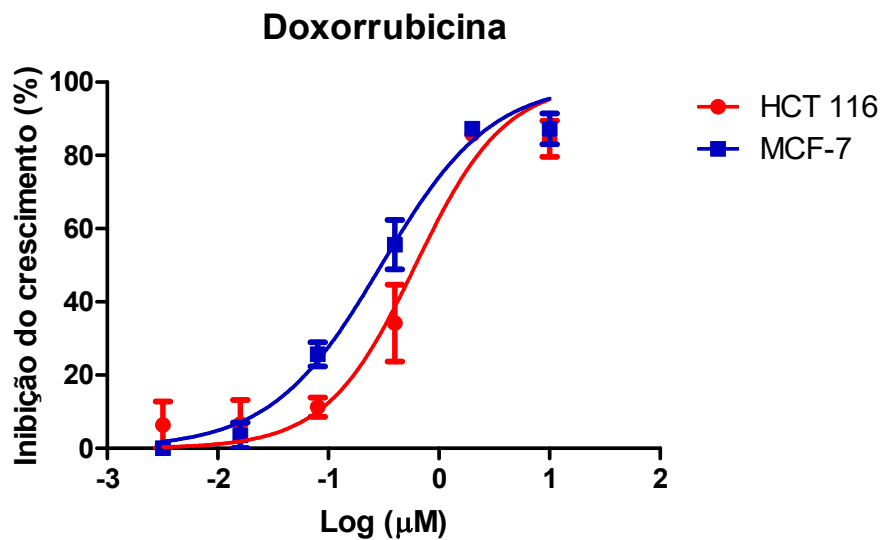
**Tabela 7.** Inibição do crescimento celular (%) dos extratos brutos frente às linhagens de carcinoma cólon-retal (HCT-116) e adenocarcinoma de mama (MCF-7), nas concentrações de 5 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (média $\pm$ SEM) (n=2).

| Amostra        | HCT-116                 |       |                          |              | MCF-7                   |       |                          |       |
|----------------|-------------------------|-------|--------------------------|--------------|-------------------------|-------|--------------------------|-------|
|                | 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ |       | 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ |              | 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ |       | 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ |       |
|                | Média                   | SEM   | Média                    | SEM          | Média                   | SEM   | Média                    | SEM   |
| <b>PI-G-1</b>  | 5,14                    | 4,35  | -1,77                    | 3,38         | 4,09                    | 6,54  | 63,62                    | 22,13 |
| <b>PI-G-2</b>  | -22,70                  | 11,28 | -9,71                    | 5,05         | 17,43                   | 9,70  | 71,87                    | 4,45  |
| <b>PI-G-3</b>  | -4,38                   | 6,54  | 29,10                    | 10,97        | 25,55                   | 7,50  | 63,28                    | 1,67  |
| <b>PI-G-4</b>  | 17,57                   | 10,36 | 44,08                    | 11,15        | 30,67                   | 9,38  | 51,29                    | 2,46  |
| <b>PI-G-5</b>  | 0,63                    | 3,17  | -10,43                   | 10,37        | -9,71                   | 4,14  | 68,78                    | 27,69 |
| <b>PI-G-6</b>  | -26,81                  | 19,13 | -6,23                    | 15,68        | 4,70                    | 7,23  | 56,06                    | 17,70 |
| <b>PI-G-7</b>  | -18,62                  | 14,24 | 14,07                    | 5,26         | 10,14                   | 3,76  | 69,25                    | 10,47 |
| <b>PI-G-8</b>  | 4,90                    | 5,81  | <b>77,97</b>             | <b>11,85</b> | 24,15                   | 12,47 | 72,43                    | 10,37 |
| <b>PI-G-9</b>  | -0,46                   | 2,47  | -2,29                    | 7,93         | 9,05                    | 3,48  | 69,01                    | 15,03 |
| <b>PI-G-10</b> | -9,28                   | 7,41  | 9,30                     | 5,68         | 20,02                   | 8,16  | 58,85                    | 5,94  |
| <b>PI-G-11</b> | -18,44                  | 13,66 | 7,84                     | 3,80         | 15,48                   | 1,57  | 63,41                    | 12,39 |
| <b>PI-G-12</b> | 9,70                    | 5,78  | 64,71                    | 8,03         | 34,55                   | 13,60 | 64,47                    | 13,03 |
| <b>PI-G-13</b> | 10,26                   | 9,93  | 9,78                     | 5,32         | 23,68                   | 1,98  | 67,59                    | 6,63  |
| <b>PI-F-1</b>  | -14,98                  | 10,37 | -21,66                   | 17,71        | 14,85                   | 2,47  | 60,08                    | 12,85 |
| <b>PI-F-2</b>  | -20,54                  | 9,64  | 10,30                    | 4,49         | 21,69                   | 2,65  | 46,41                    | 16,16 |
| <b>PI-F-3</b>  | 3,68                    | 6,05  | 17,91                    | 12,67        | 9,31                    | 4,00  | 48,74                    | 21,59 |
| <b>PI-F-4</b>  | 17,52                   | 11,05 | 19,02                    | 6,81         | 12,49                   | 4,41  | 50,78                    | 17,05 |
| <b>PI-Fr-1</b> | 9,88                    | 6,41  | <b>86,27</b>             | <b>9,11</b>  | 35,73                   | 17,08 | 61,88                    | 15,67 |

**Figura 32.** Regressão não linear do controle positivo doxorrubicina nas concentrações de 0,0032 a 10  $\mu\text{M}$  frente às linhagens de carcinoma cólon-retal (HCT-116) e adenocarcinoma de mama (MCF-7) (média $\pm$ SEM) (n=2).

|      |         |        |
|------|---------|--------|
|      | HCT 116 | MCF-7  |
| IC50 | 0.6138  | 0.3011 |

|      |                  |                  |
|------|------------------|------------------|
|      | HCT 116          | MCF-7            |
| IC50 | 0.3860 to 0.9759 | 0.2186 to 0.4146 |



|                |         |        |
|----------------|---------|--------|
|                | HCT 116 | MCF-7  |
| R <sup>2</sup> | 0.9348  | 0.9763 |

A avaliação preliminar do perfil químico por CLAE-DAD e RMN de <sup>1</sup>H e potencial biológico do extrato bruto de cada linhagem isolada forneceu resultados relevantes, reforçando a potencialidade desses microrganismos como fonte de substâncias bioativas. Além disso, ao analisar os resultados obtidos para as cinco atividades biológicas realizadas para cada extrato, observou-se, de maneira geral, resultados distintos para os mesmos. Esses resultados aliados à ideia de que o ambiente em que esses microrganismos estão inseridos (planta hospedeira) seja competitivo e dinâmico (interação ecológica microbiana), e que foram isolados de diferentes partes da planta, é desejável que os mesmos produzam substâncias em resposta a algum tipo de interação ecológica, e consequentemente apresentem algum tipo de atividade, em sua maioria antagônica, o que pode explicar os resultados obtidos para cada extrato.

***Estudo do perfil químico de Diaporthe hongkongensis e Phyllosticta elongata***

## **5. Estudo do perfil metabólico de *Diaporthe hongkongensis* e *Phyllosticta elongata***

A análise detalhada dos perfis químico e biológico dos extratos brutos obtidos a partir do crescimento dos fungos endofíticos isolados, permitiu selecionar dois endófitos para desenvolvimento deste trabalho, sendo eles: PI-G-13 e PI-F-2, os quais foram identificadas pelo método de sequenciamento Sanger como: *Diaporthe hongkongensis* e *Phyllosticta elongata*, respectivamente.

### **5.1 Influência da composição do meio de cultivo na produção metabólica de *D. hongkongensis* e *P. elongata***

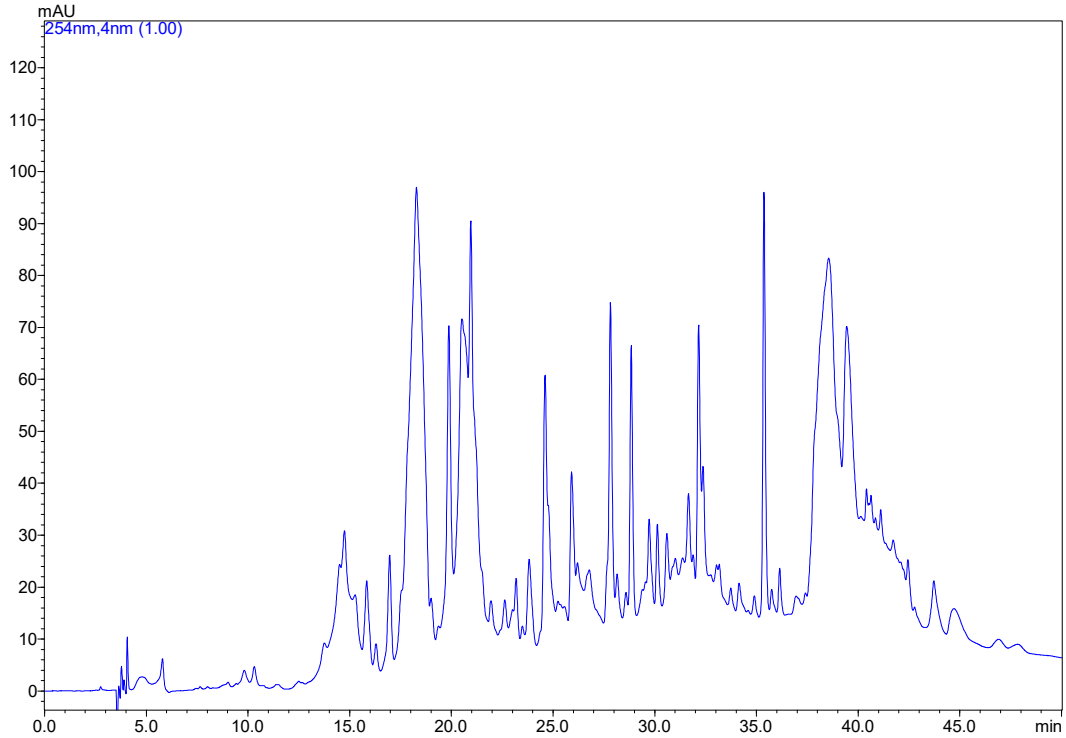
Uma busca realizada em diferentes bases de dados, mostrou que não há relatos na literatura de estudo químico para esses microrganismos. Dentro da perspectiva de exploração por novas fontes de metabólitos secundários bioativos, bem como compreender a metabolômica de cada microrganismo, com o objetivo de enriquecer as informações sobre a comunicação química entre endófito e hospedeiro, realizou-se o isolamento e a elucidação estrutural das substâncias produzidas por cada fungo endofítico.

Desta forma, duas abordagens foram aplicadas a fim de verificar a influência da composição nutricional frente a produção metabólica de *D. hongkongensis* e *P. elongata*: (1) cultivo em meio de MDB e (2) cultivo em meio sólido de milho.

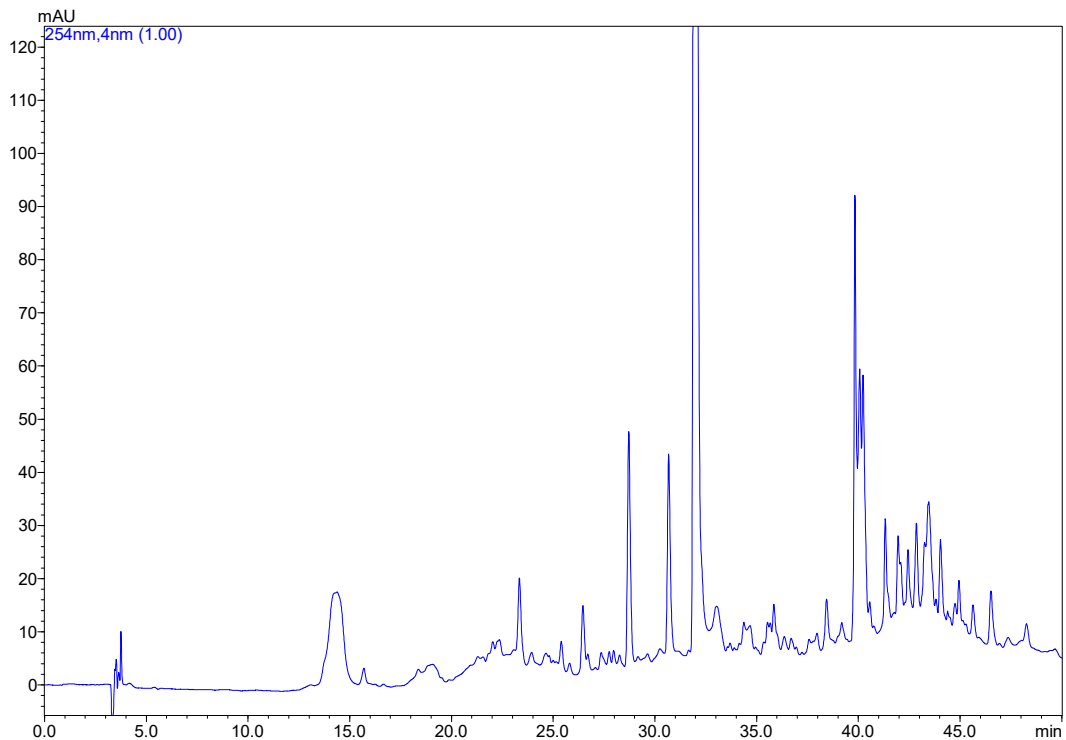
Primeiramente, analisou-se o perfil cromatográfico dos extratos de *D. hongkongensis*-MDB (PI-G13-MDB), *D. hongkongensis*-Milho (PI-G13-Mi), *P. elongata*-MDB (PI-F2-MDB) e *P. elongata*-Milho (PI-F2-Mi), obtidos por CLAE-DAD, os quais indicaram a presença de bandas, com diferentes intensidades, ao longo de todo o gradiente exploratório, evidenciando para todos os extratos a produção de substâncias dentro de uma ampla faixa de polaridade (Figuras 33-36). Além disso, foi possível verificar diferenças quando comparado os cromatogramas dos extratos em MDB e milho de cada endófito, comprovando que houve uma variação significativa nos perfis frente a variação da composição nutricional.



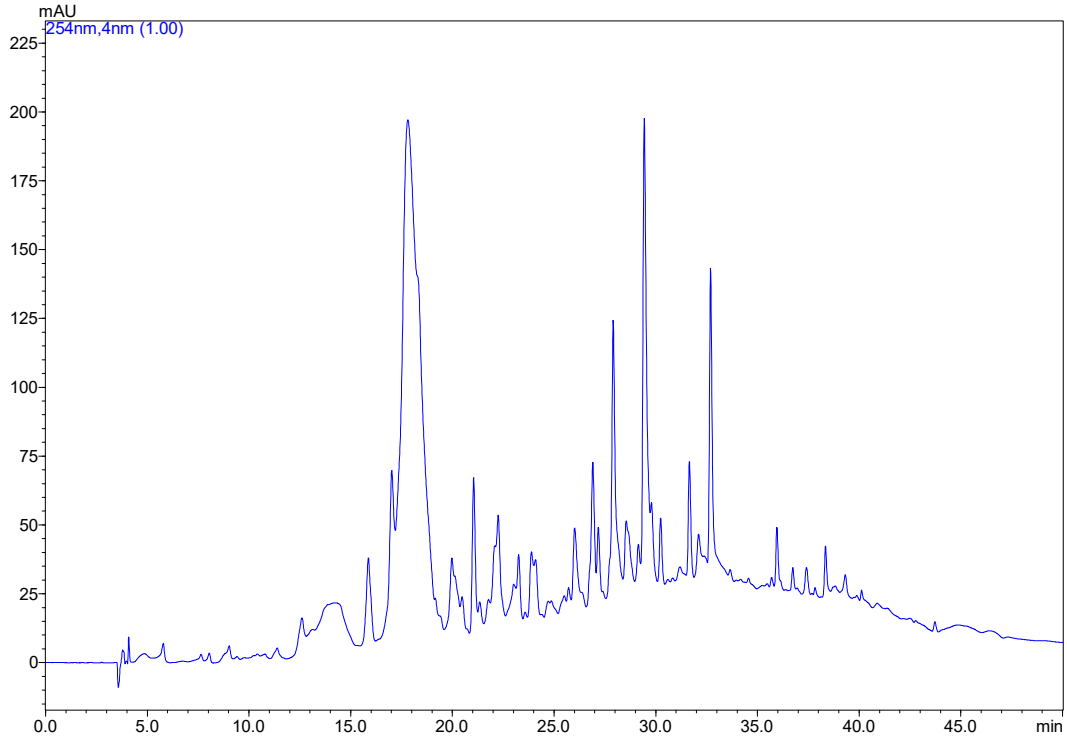
**Figura 33.** Cromatograma do extrato bruto de *D. hongkongensis* - MDB, em coluna C18, gradiente linear H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH 95:05 à 00:100 em 40 min, mais 10 min de limpeza, em 254 nm.



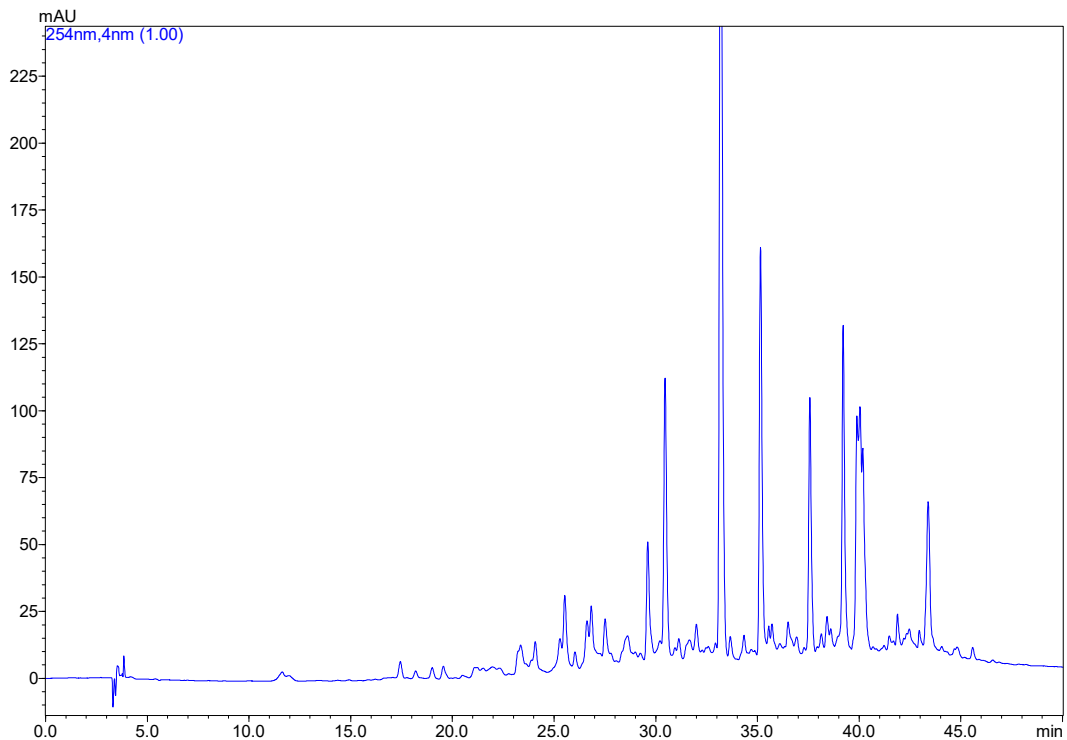
**Figura 34.** Cromatograma do extrato bruto de *D. hongkongensis* - Milho, em coluna C18, gradiente linear H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH 95:05 à 00:100 em 40 min, mais 10 min de limpeza, em 254 nm.



**Figura 35.** Cromatograma do extrato bruto de *P. elongata* - MDB, em coluna C18, gradiente linear H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH 95:05 à 00:100 em 40 min, mais 10 min de limpeza, em 254 nm.



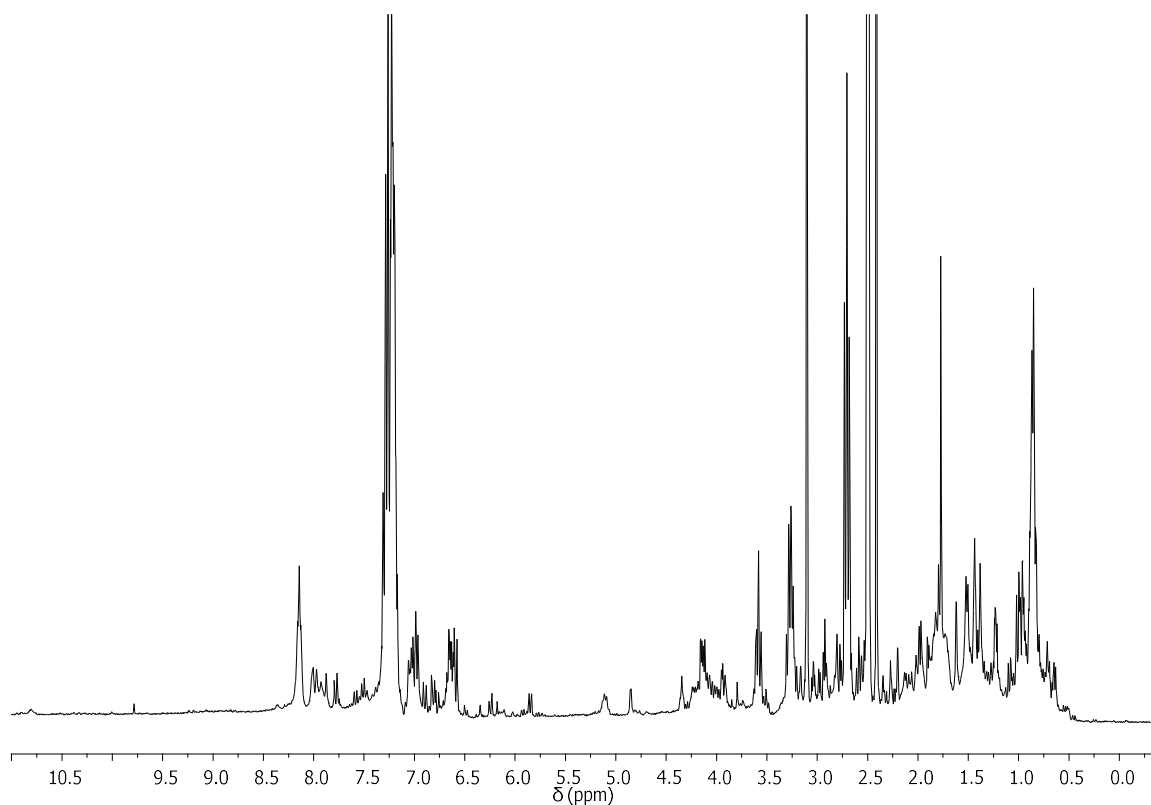
**Figura 36.** Cromatograma do extrato bruto de *P. elongata* - Milho, em coluna C18, gradiente linear H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH 95:05 à 00:100 em 40 min, mais 10 min de limpeza, em 254 nm.



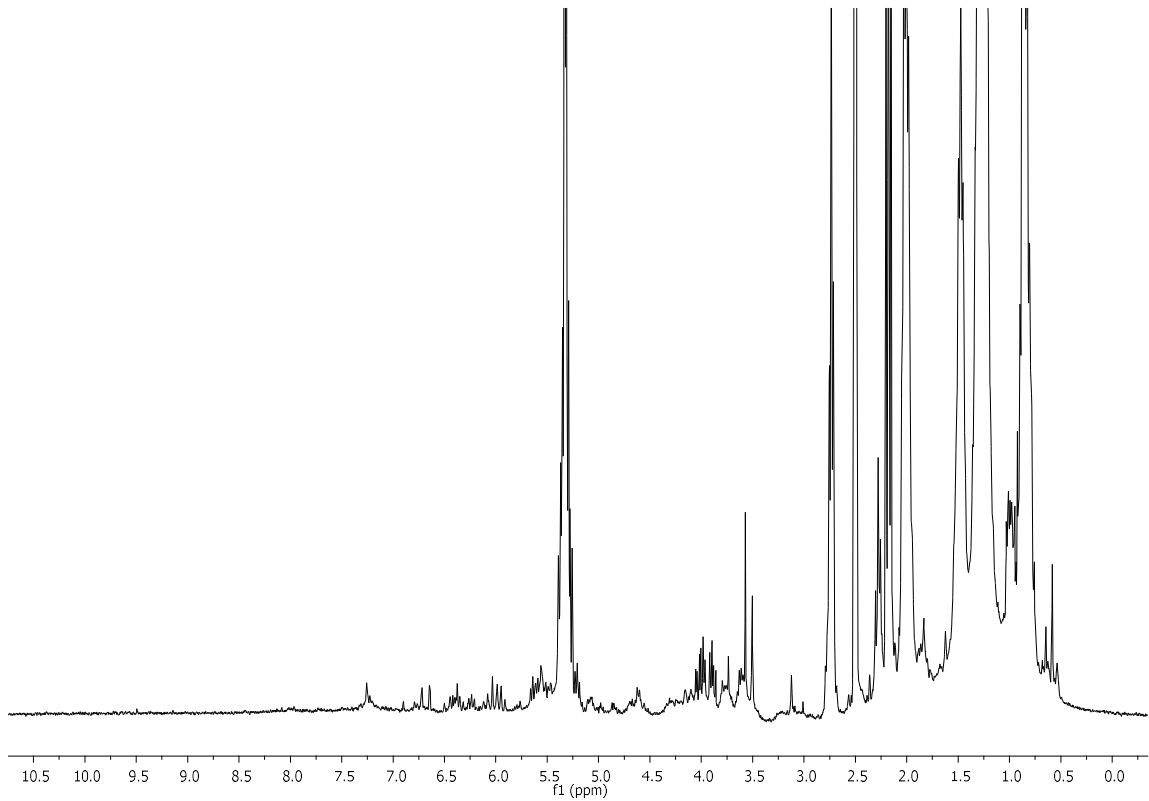
Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 37-40) observou-se sinais por toda a faixa espectral variando de  $\delta_{\text{H}}$  0,3 a 9,8, destacando esses extratos como promissores para a produção de metabólitos secundário. Além disso, verificou-se novamente diferença nos espectros dos extratos em MDB e milho de cada endófito, confirmando a proposição de que o meio de cultivo influencia na produção metabólica.

Estes resultados ressaltam a potencialidade e importância do estudo da química desses microrganismos, uma vez que, estes podem produzir uma variedade de substâncias com diversas atividade biológicas, por meio de alterações no meio de cultivo.

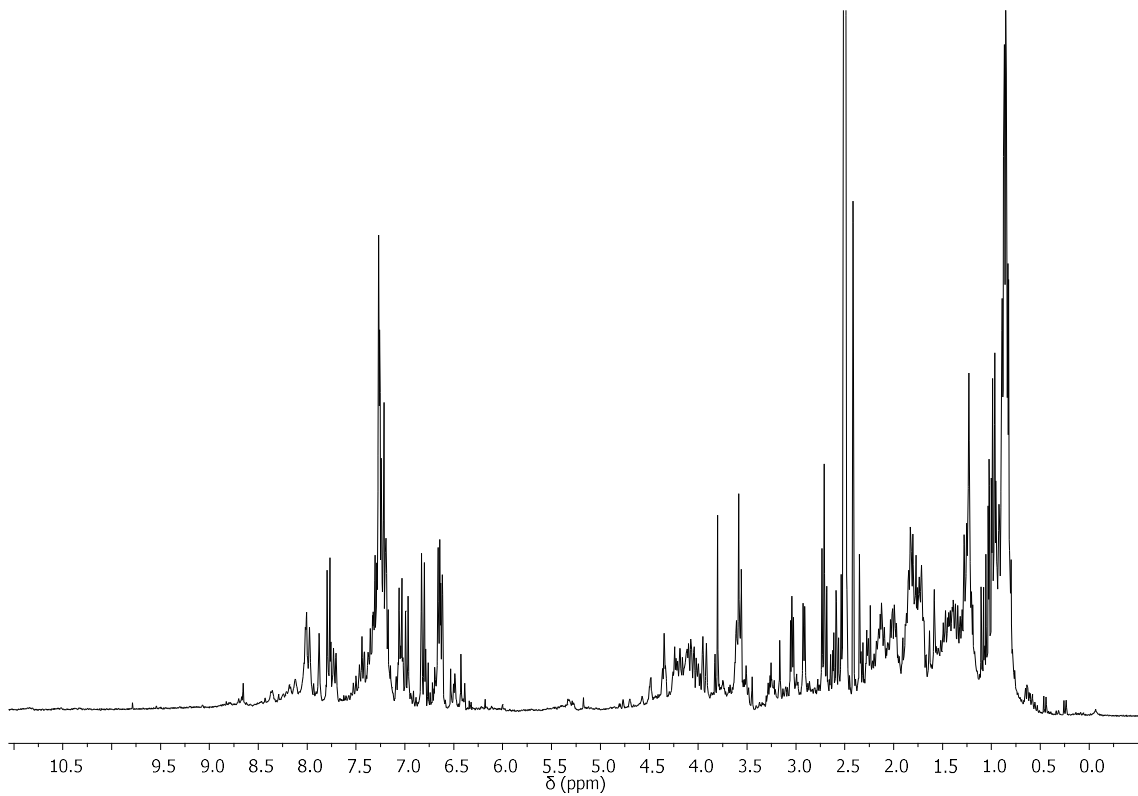
**Figura 37.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos brutos de *D. hongkongensis* em MDB (DMSO- $d_6$ , 300 MHz).



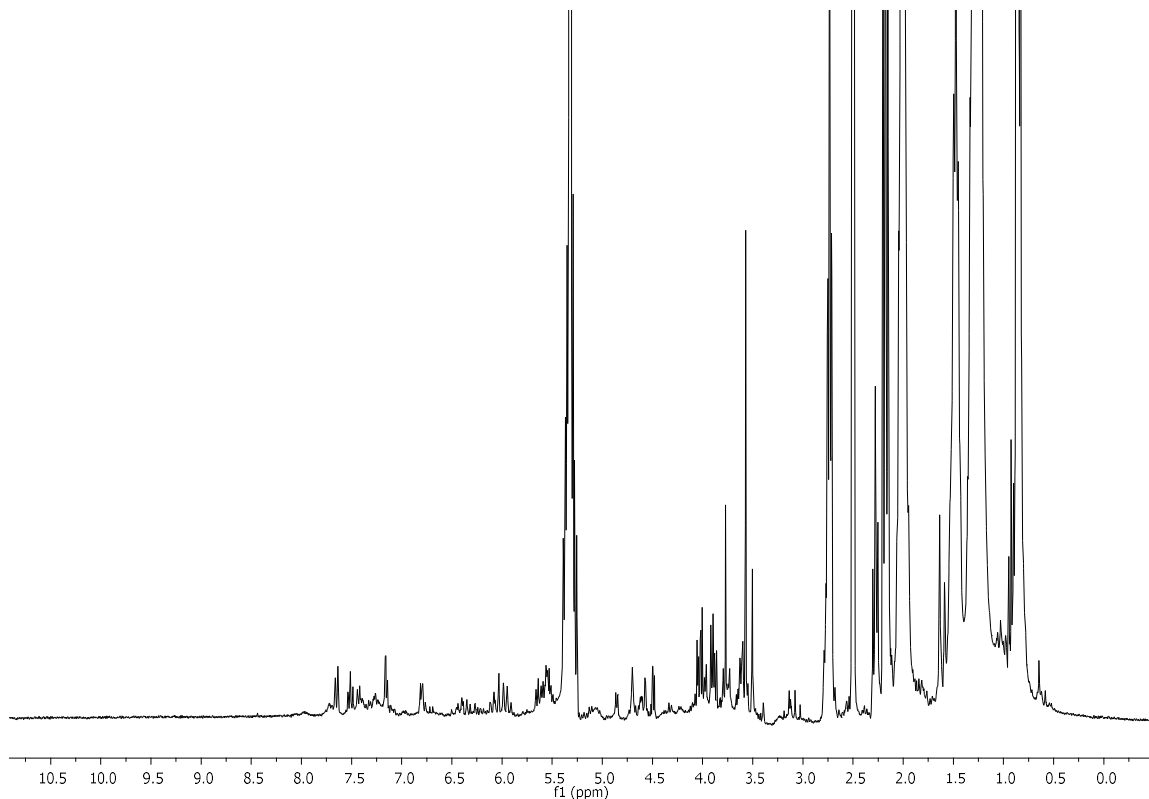
**Figura 38.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos brutos de *D. hongkongensis* em milho (DMSO- $d_6$ , 300 MHz).



**Figura 39.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto de *P. elongata* em MDB (DMSO- $d_6$ , 300 MHz).



**Figura 40.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto de *P. elongata* em milho (DMSO- $d_6$ , 300 MHz).



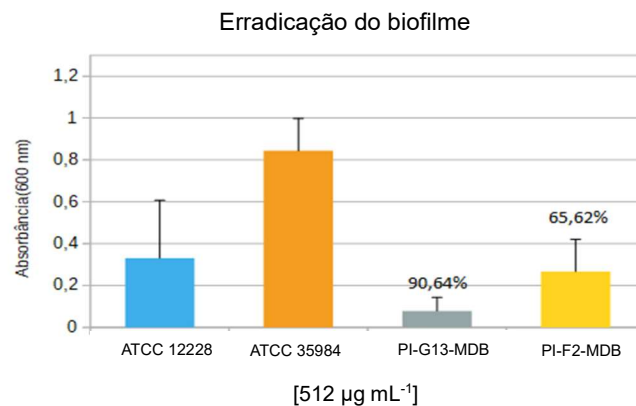
Os extratos brutos produzidos por *D. hongkongensis* e *P. elongata* em MDB e milho foram avaliados, frente às bactérias Gram positivas (*S. epidermidis* ATCC 35984, *S. aureus* ATCC25923, *E. faecalis* ATCC29212, *E. faecium* VRE16) e Gram negativas (*K. pneumoniae* ATCC700603, *E. coli* ATCC 25922 e *A. baumannii* ACI 50) e pelo ensaio de determinação da capacidade de erradicação do biofilme formado pelas bactérias *S. epidermidis* ATCC35984 (boa formadora de biofilme) e *S. epidermidis* ATCC12228 (má formadora de biofilme).

Foi observado uma atividade significativa para os extratos de *D. hongkongensis* (PI-G13-MDB) e *P. elongata* (PI-F2-MDB) frente as bactérias testadas, uma vez que, houve inibição parcial de algumas bactérias pelos extratos a  $512 \mu\text{g mL}^{-1}$ , e assim, foi calculado a porcentagem de inibição do crescimento de cada bactéria. O extrato de PI-G13-MDB inibiu parcialmente as bactérias *E. faecalis* ATCC29212 e *S. epidermidis* ATCC 35984, com percentual de inibição de 85,6% e 84,12%, respectivamente. Enquanto que para PI-F2-MDB foi observado percentuais de inibição de 52,27 % para

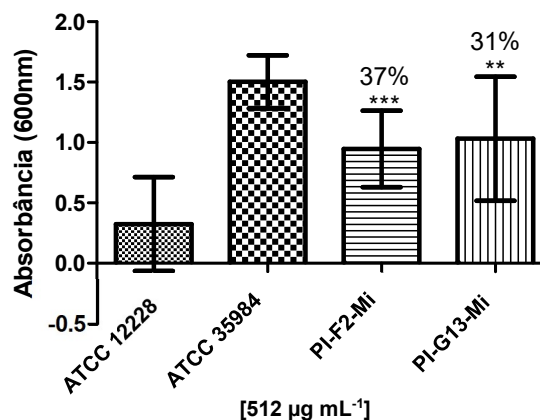
*E. faecalis* ATCC29212, 86,53 % para *E. faecium* VRE16 e de 90,64 % para *A. baumannii* ACI 50. Contudo, não foi observado atividade para os extratos PI-G13-Mi e PI-F2-Mi na concentração testada.

A capacidade de erradicação do biofilme formado por *S. epidermidis* ATCC35984 foi analisada a  $512 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figuras 41 e 42), e os extratos PI-G13-MDB, PI-G13-Mi, PI-F2-MDB e PI-F2-Mi foram capazes de erradicar o biofilme, os quais apresentaram percentuais de erradicação de 90,64; 31,0; 65,62 e 37,0%, respectivamente. Os extratos PI-G13-MDB e PI-F2-MDB merecem destaque, pois demonstraram maior atividade neste ensaio, corroborando com os resultados obtidos em escala reduzida.

**Figura 41.** Avaliação dos extratos PI-G13-MDB e PI-F2-MDB frente à capacidade de erradicação de biofilme formado por *S. epidermidis* ATCC 35984.



**Figura 42.** Avaliação dos extratos PI-G13-Mi e PI-F2-Mi frente à capacidade de erradicação de biofilme formado por *S. epidermidis* ATCC 35984.



Os extratos também foram submetidos ao ensaio de citotoxicidade *in vitro* frente a duas linhagens de células tumorais: HCT-116 (carcinoma cólon-retal) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama). Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar a atividade citotóxica: amostras sem atividade, com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), com atividade moderada (inibição de crescimento variando de 50 a 75%) e com atividade alta (inibição de crescimento variando de 75 a 100%) (ALMEIDA et al., 2014).

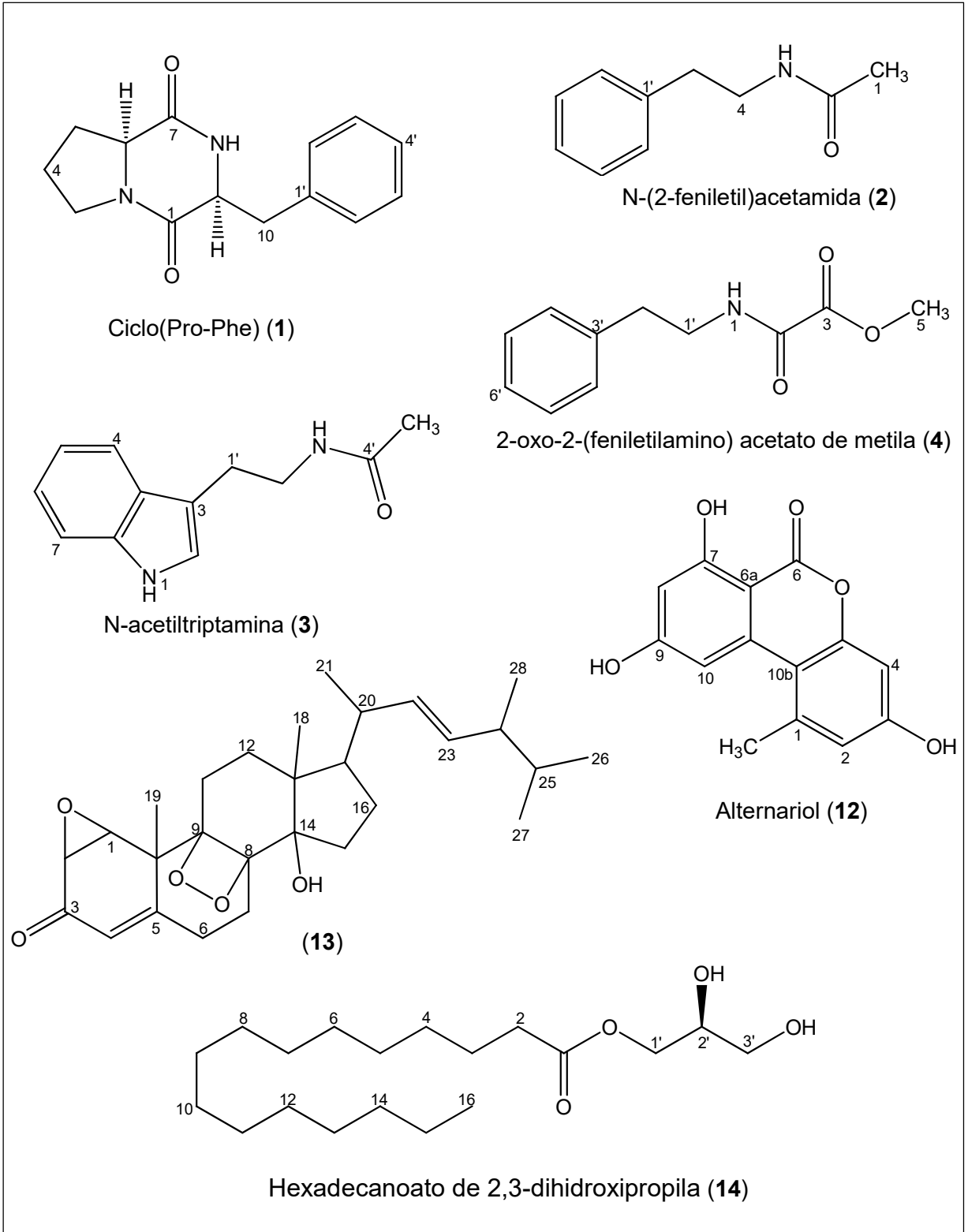
Os resultados obtidos mostraram que o extrato PI-G13-Mi exibiu alto potencial citotóxico (inibição >75%) frente as duas linhagens testadas, na concentração de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto que os extratos PI-F2-Mi e PI-G13-MDB apresentaram atividade alta apenas para a linhagens HCT-116 e MCF-7, respectivamente. Foi observado também atividade moderada (50 à 75%) para os extratos PI-F2-MDB e PI-F2-Mi frente a linhagem MCF-7 e para PI-G13-MDB contra HCT-116, somente na concentração de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Na menor concentração (5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), os extratos apresentaram pouca ou nenhuma atividade frente as duas linhagens. Na Tabela 8 estão apresentados os resultados para as amostras testadas.

**Tabela 8.** Inibição do crescimento celular (%) dos extratos frente às linhagens de carcinoma cólon-retal (HCT-116) e adenocarcinoma de mama (MCF-7), nas concentrações de 5 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (média $\pm$ SEM) (n=2).

| Amostra           | HCT-116                 |      |                          |             | MCF-7                   |      |                          |             |
|-------------------|-------------------------|------|--------------------------|-------------|-------------------------|------|--------------------------|-------------|
|                   | 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ |      | 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ |             | 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ |      | 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ |             |
|                   | Média                   | SEM  | Média                    | SEM         | Média                   | SEM  | Média                    | SEM         |
| <b>PI-G13-MDB</b> | 8,31                    | 8,55 | 73,68                    | 9,32        | 13,35                   | 4,05 | <b>75,92</b>             | <b>2,43</b> |
| <b>PI-G13-Mi</b>  | 24,83                   | 5,83 | <b>91,88</b>             | <b>2,57</b> | 3,39                    | 1,53 | <b>87,18</b>             | <b>4,45</b> |
| <b>PI-F2-MDB</b>  | 13,14                   | 9,87 | 21,80                    | 12,32       | 6,54                    | 2,41 | 56,86                    | 19,31       |
| <b>PI-F2-Mi</b>   | 5,12                    | 6,29 | <b>94,13</b>             | <b>2,51</b> | -7,60                   | 4,48 | 67,12                    | 6,32        |

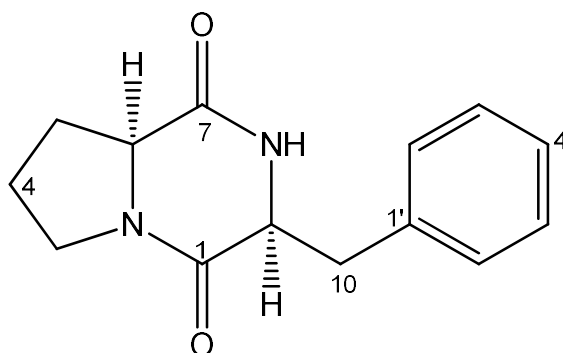
## 5.2 Identificação estrutural das substâncias produzidas por *D. hongkongensis*

**Figura 43.** Substâncias produzidas por *D. hongkongensis* cultivado em MDB e milho.





### 5.2.1 Identificação estrutural da substância 1



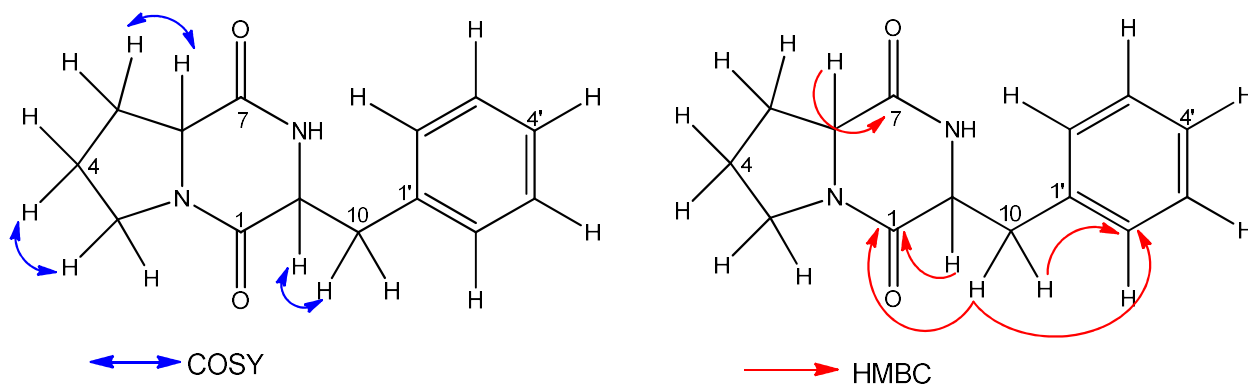
A análise dos dados de espectrometria de massas, ESI-EM (Figura 45), modo positivo, apresentou para a substância **1** a molécula protonada de  $m/z$  245,06  $[M+H]^+$  e a formação da molécula sodiada de  $m/z$  267,05  $[M+Na]^+$ , que associado aos dados de RMN uni e bidimensionais permitiram propor a fórmula molecular  $C_{14}H_{16}N_2O_2$ .

O espectro de RMN de  $^1H$  (Figura 46) apresentou na região de alifáticos, multipletos em  $\delta_H$  3,36-3,54 ( $m$ , 2H, H-3),  $\delta_H$  1,79 ( $m$ , 2H, H-4) e  $\delta_H$  1,20-2,09 ( $m$ , 2H, H-5), correspondentes a hidrogênios metilênicos.

Na região de hidrogênios aromáticos foram observados sinais  $\delta_H$  7,23-7,24 ( $m$ , 3H, H-2', H-4', H-6') e  $\delta_H$  7,28 ( $m$ , 2H, H-3', H-5'), sugerindo um anel aromático monossustituído. Adicionalmente, verificou-se dois duplos dupletos em  $\delta_H$  3,14 ( $dd$ , 1H,  $J = 14,0$  e  $5,0$  Hz) e 3,18 ( $dd$ , 1H,  $J = 14,0$  e  $5,0$  Hz), os quais mostraram correlação por HMBC (Figuras 44 e 49) com o carbono aromático em C-2' ( $\delta_C$  131,0) evidenciando a presença de um sistema benzílico na estrutura e sugerindo uma unidade de aminoácido fenilalanina.

Foram observados ainda a presença dos sinais em  $\delta_H$  4,06 ( $ddd$ , 1H,  $J = 10,8$ ; 6,4 e 1,9 Hz, H-6,  $\delta_C$  60,0) e  $\delta_H$  4,44 ( $m$ , 1H, H-9,  $\delta_C$  57,7), e que pela análise do mapa de contorno HMBC (Figura 49) mostraram correlações a longa distância com os carbonos em 170,9 (C-7) e 166,9 (C-1), respectivamente. No mapa de contorno COSY (Figura 50) foram observadas correlações entre H-3 $\leftrightarrow$ H-4 $\leftrightarrow$ H-5 $\leftrightarrow$ H-6 e H-9 $\leftrightarrow$ H-10, confirmando a presença de um anel dicetopiperazínico (Figura 44).

**Figura 44.** Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC da substância **1**.



A configuração relativa de C-6 e C-9 foi definida com base nos valores de deslocamento químico de RMN de  $^1\text{H}$  e comparação com a literatura (WANG et al., 2010). Quando os valores de H-6 e H-9 encontram-se na faixa de  $\delta_{\text{H}}$  3,90-4,30 indicam que estes estão no mesmo plano da molécula, portanto configuração relativa *cis*. No caso da substância **1** os valores encontrados foram de  $\delta_{\text{H}}$  4,06 e 4,44, respectivamente e nos permitem atribuir a configuração *cis* para **1**.

A comparação dos dados espectrais obtidos (Tabela 9) com os descritos na literatura (FURTADO et al., 2005; WANG et al., 2010), permitiu identificar a substância **1** como ciclo(Pro-Phe). Esta dicetopiperazina se destaca por apresentar forte atividade antibacteriana frente a *Vibrio anguillarum*, *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus* (FURTADO et al., 2005, FDHILA et al., 2003).

As dicetopiperazinas são peptídeos cíclicos, biossintetizados a partir da condensação de dois ou mais aminoácidos. Essa classe de metabólitos é comumente produzida por esponjas e microrganismos, sendo frequentemente isolada de fungos, e tem se destacado por apresentarem uma ampla gama de atividades biológicas, tais como: atividade antiviral, citotóxica, antimutagênica, antimicrobiana e inibidora de biofilme. As principais características estruturais das dicetopiperazinas consistem no seu esqueleto comum quiral, funcionalizado e com rigidez conformacional, o que torna sua estereoquímica bem definida e controlada. Além disso, possuem grupos doadores e receptores de prótons, fazendo com que estas substâncias interajam com diferentes

alvos biológicos (FURTADO et al., 2007; EL-GENDY; RATEB, 2015; CARVALHO; ABRAHAM, 2012).

**Tabela 9.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC e COSY ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 150 MHz) de **1** ( $\delta$  em ppm e  $J$  em Hz).

| Posição        | $\delta_{\text{H}}$                              | $\delta_{\text{C}}$ | HMBC            | COSY     |
|----------------|--|---------------------|-----------------|----------|
| <b>1</b>       | -  | 166,9               | -               | -        |
| <b>2</b>       | -  | -                   | -               | -        |
| <b>3</b>       | 3,36; 3,54 ( <i>m</i> )                          | 45,9                | C4; C6          | H-4      |
| <b>4</b>       | 1,79 ( <i>m</i> )                                | 22,7                | C5; C3;C6       | H-3; H-5 |
| <b>5</b>       | 1,20; 2,09 ( <i>m</i> )                          | 29,4                | C4; C6; C7      | H-4; H-6 |
| <b>6</b>       | 4,06 ( <i>ddd</i> ; $J = 10,8; 6,4$ e<br>1,9 Hz) | 60,0                | C5; C7          | H-5      |
| <b>7</b>       | -  | 170,9               | -               | -        |
| <b>8</b>       | -  | -                   | -               | -        |
| <b>9</b>       | 4,44 ( <i>m</i> )                                | 57,7                | C10; C1'; C1    | H10      |
| <b>10</b>      | 3,14 ( <i>dd</i> ; $J = 14,0$ e 5,0 Hz)          | 38,3                | C2';C6';C1'; C1 | H9       |
|                | 3,18 ( <i>dd</i> ; $J = 14,0$ e 5,0 Hz)          |                     | C2';C6';C1'; C1 | -        |
| <b>1'</b>      | -  | 137,3               | -               | -        |
| <b>2' e 6'</b> | 7,24 ( <i>m</i> )                                | 131,0               | C10; C4'        | -        |
| <b>3' e 5'</b> | 7,28 ( <i>m</i> )                                | 129,5               | C1'             | -        |
| <b>4'</b>      | 7,23 ( <i>m</i> )                                | 128,1               | C2'; C6'        | -        |

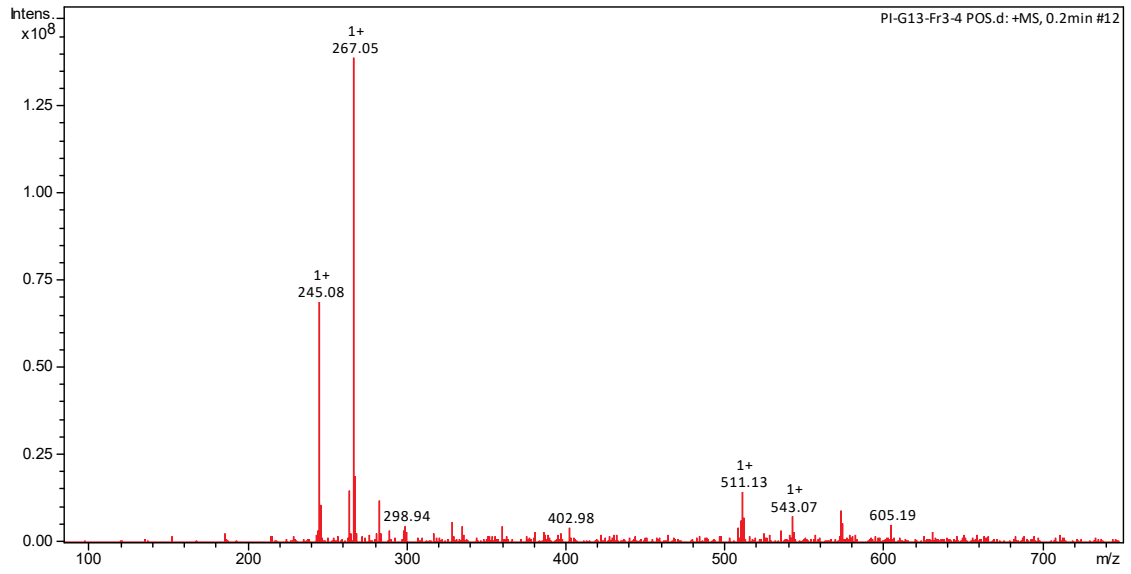
**Figura 45.** Espectro de massas (+)-ESI-MS da substância 1.

Figura 46. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **1** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).

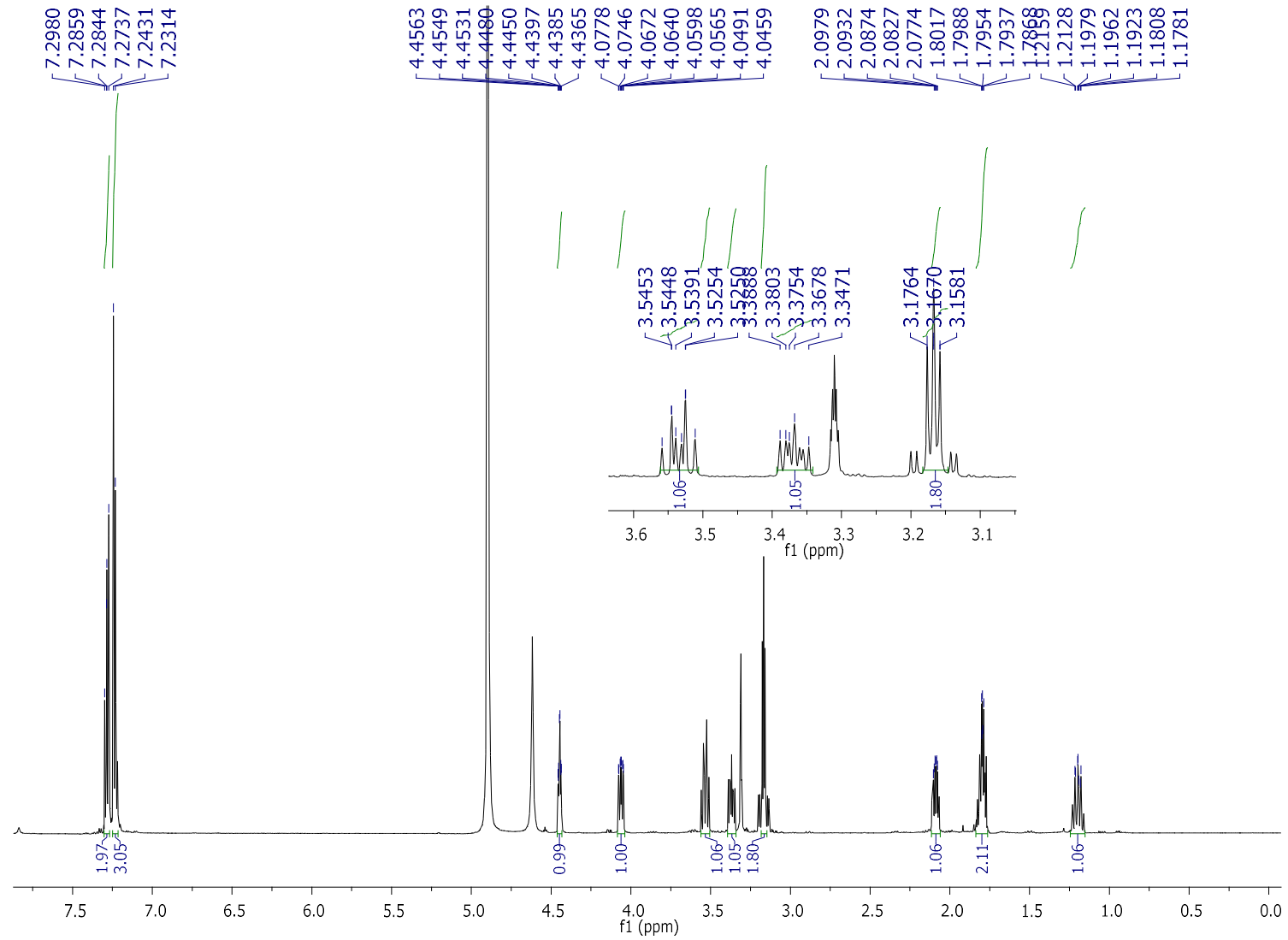


Figura 47. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **1** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 150 MHz).

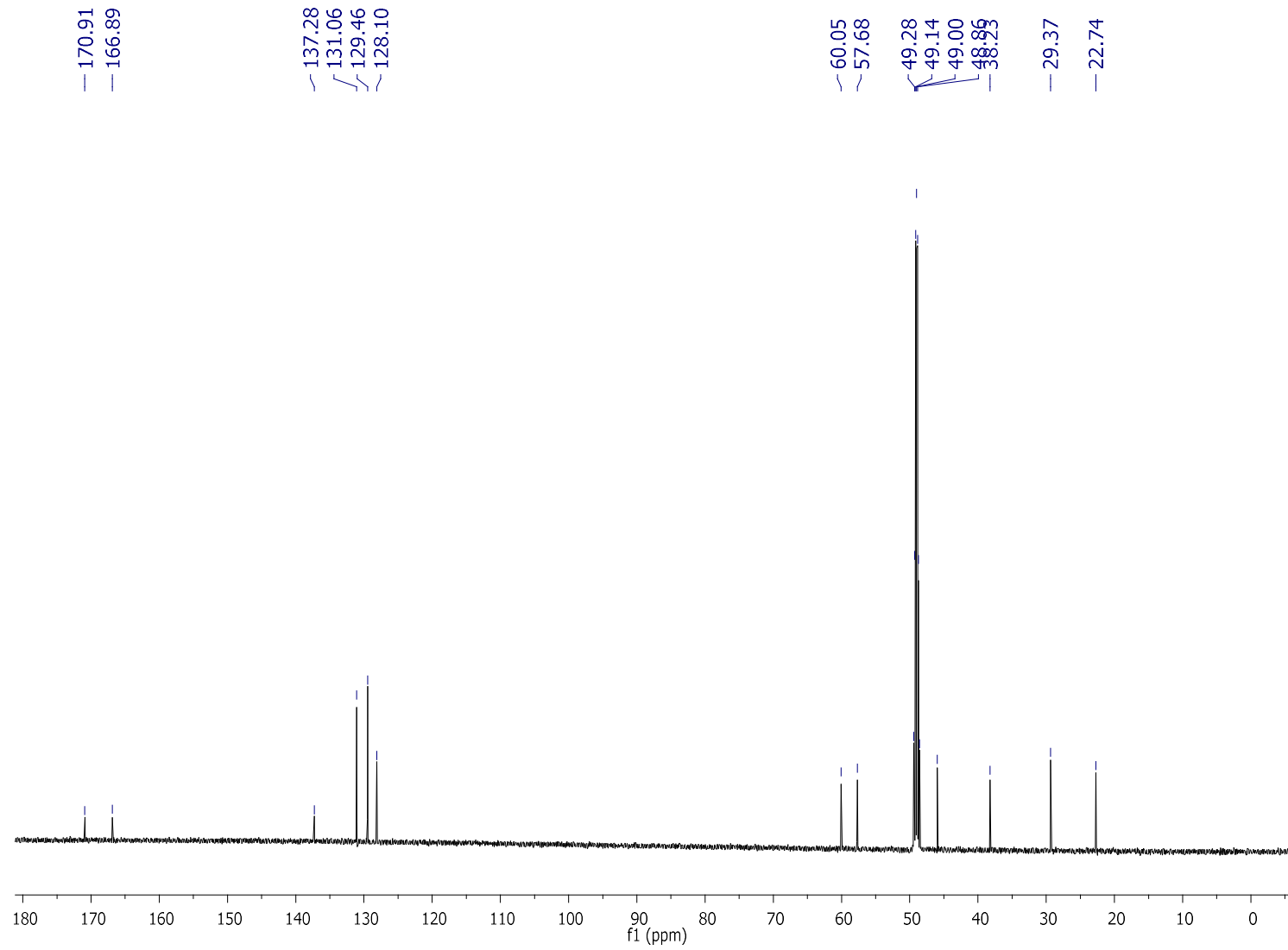
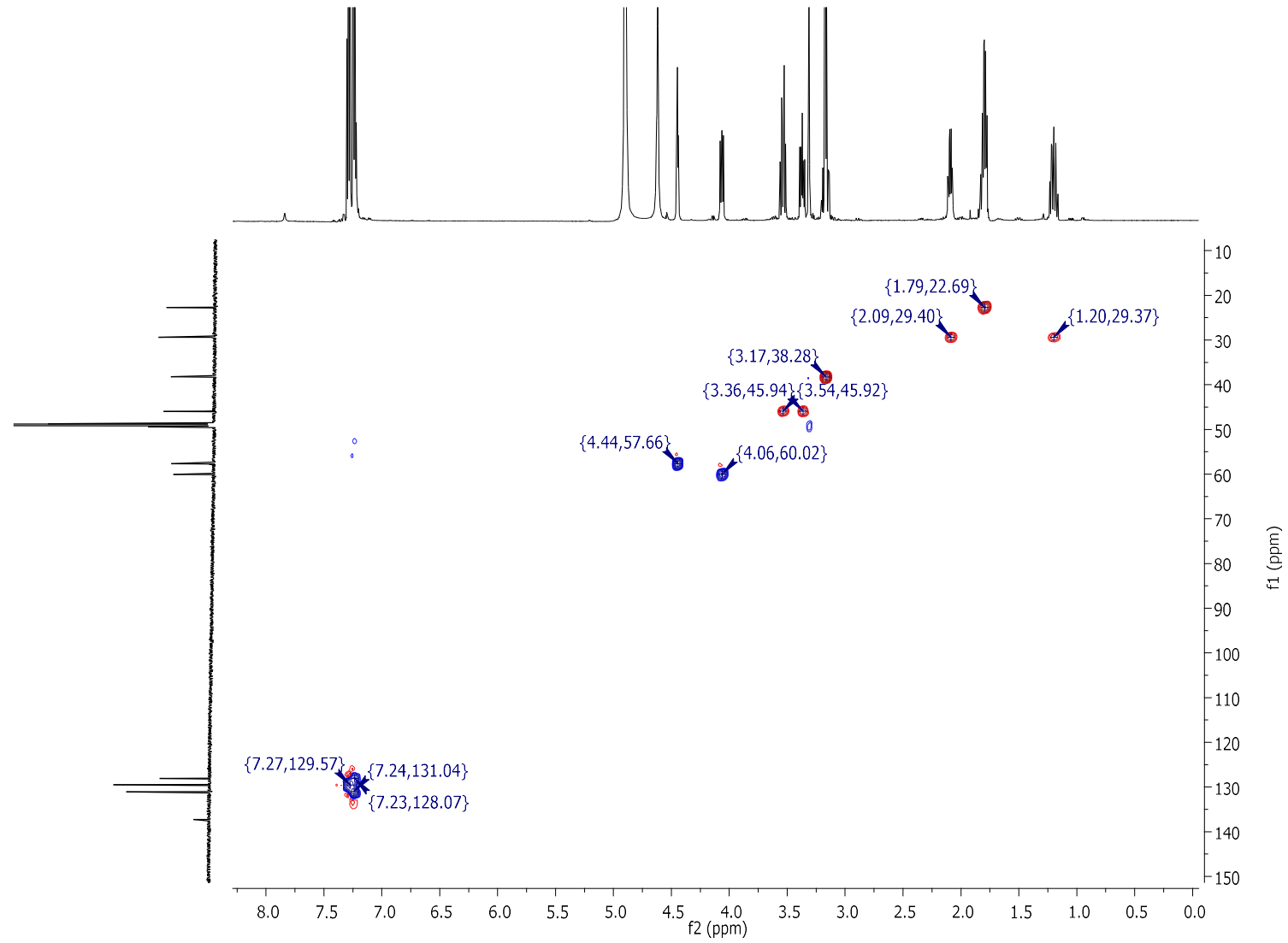


Figura 48. Mapa de contorno HSQC da substância 1 (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).



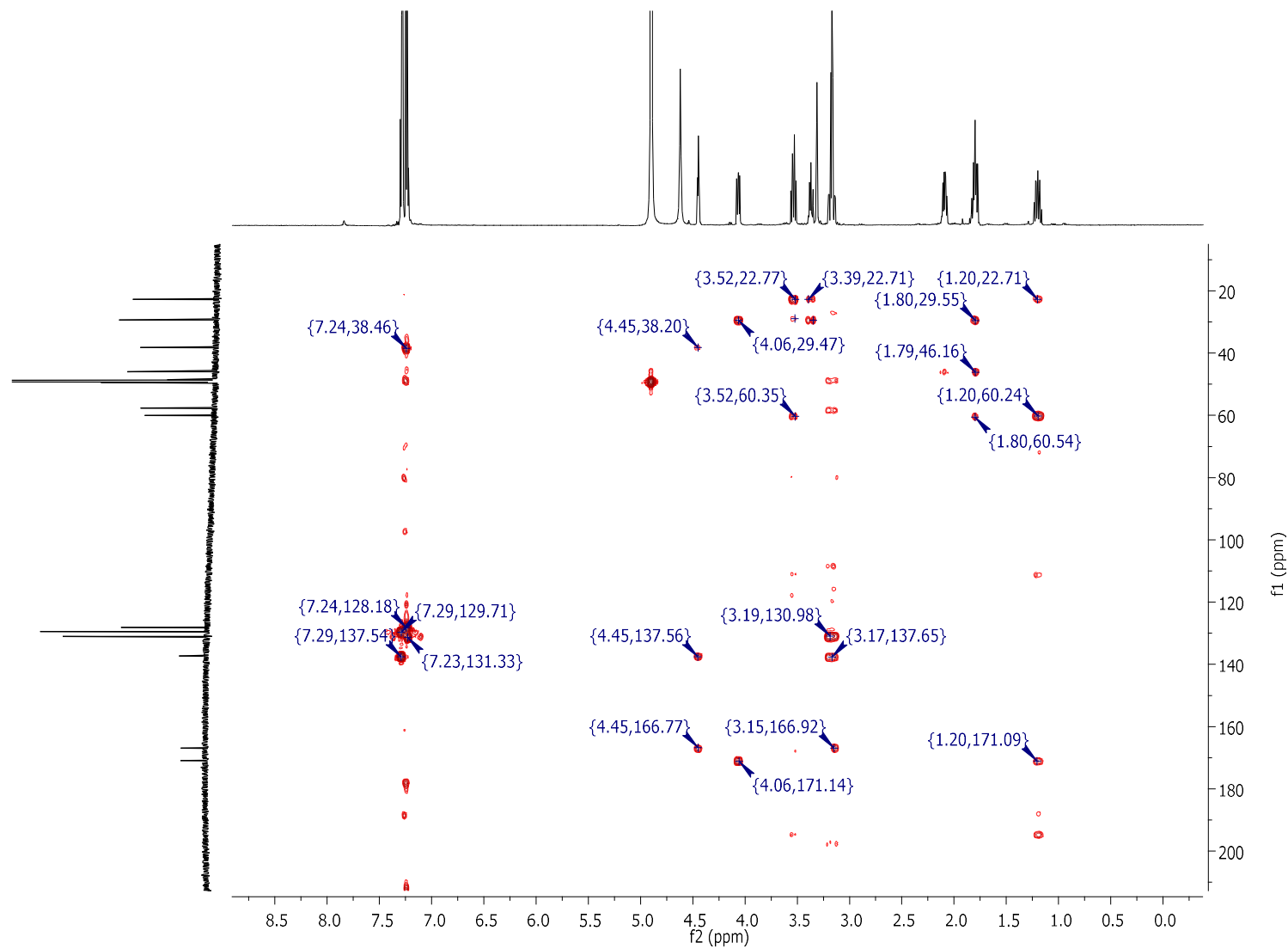
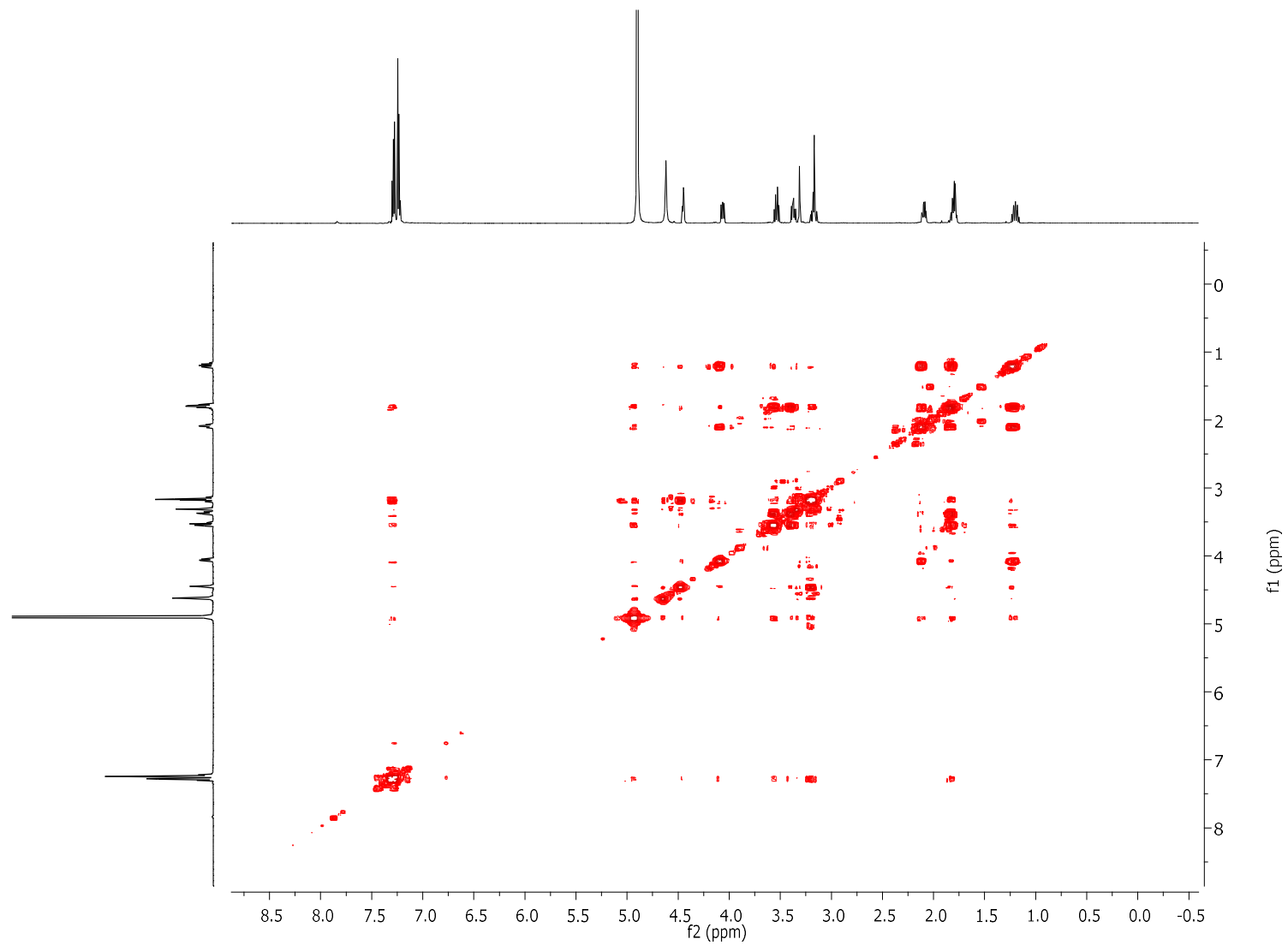
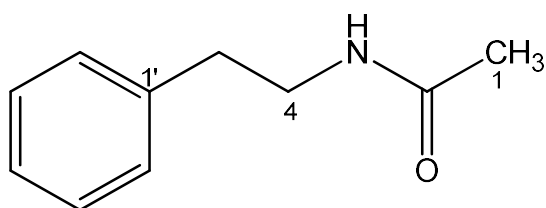
**Figura 49.** Mapa de contorno HMBC da substância 1 (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).



Figura 50. Mapa de contorno COSY da substância 1 (CD<sub>3</sub>OD; 600 MHz).



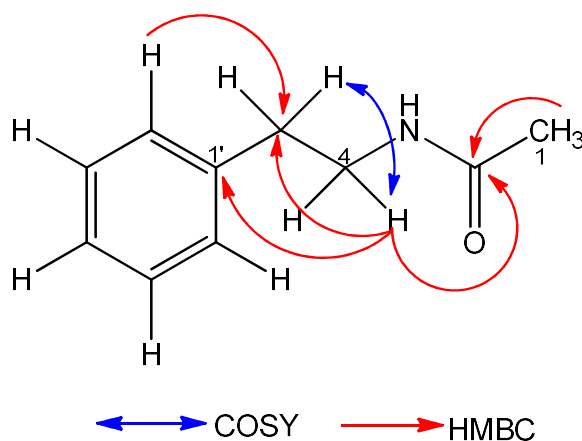
### 5.2.2 Identificação estrutural da substância 2



A análise em conjunto dos dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HSQC (Figuras 52-54) da substância **2** permitiu identificar um anel aromático monossustituído em  $\delta_{\text{H}}$  7,19-7,22 (*m*, 3H, H-2', H-4' e H-6'),  $\delta_{\text{H}}$  7,27 (*m*, 2H, H-3' e H-5'), uma metila em  $\delta_{\text{H}}$  1,90 (*s*, 3H, H-1,  $\delta_{\text{C}}$  22,5) e uma carbonila ( $\delta_{\text{C}}$  173,3), além de dois tripletos em  $\delta_{\text{H}}$  3,38 (*t*, 2H,  $J = 7,3$  Hz, H-4,  $\delta_{\text{C}}$  42,1) e 2,78 (*t*, 1H,  $J = 7,3$  Hz, H-5,  $\delta_{\text{C}}$  36,5) (Tabela 10).

A correlação observada em COSY (Figura 56) entre H-4 $\leftrightarrow$ H-5 permitiu definir uma unidade etilênica e sua conexão ao anel aromático foi realizada com a observação da correlação em HMBC (Figura 55) entre H-4 $\leftrightarrow$ C-1'. O valor do deslocamento químico de C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  42,1) evidencia que este está ligado a um átomo de nitrogênio e não de oxigênio, indicando a presença de uma amida. As correlações em HMBC entre H-1/H-4 $\leftrightarrow$ C-2 permitiu posicionar a carbonila (Figura 51). Os dados obtidos (Tabela 10) e comparados com a literatura (CAFÊU, 2007; MASKEY et al., 2002) conduziram a identificação da substância **2** como a N-(2-feniletil)acetamida. As ariletilamidas se destacam por apresentarem potencial antimicrobiano (MASKEY et al., 2002).

**Figura 51.** Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC da substância **2**.



**Tabela 10.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC e COSY ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 150 MHz) de **2** ( $\delta$  em ppm e  $J$  em Hz).

| Posição        | $\delta_{\text{H}}$  | $\delta_{\text{C}}$ | HMBC            | COSY |
|----------------|----------------------|---------------------|-----------------|------|
| <b>1</b>       | 1,90 (s)             | 22,5                | C2              | -    |
| <b>2</b>       | -                    | 173,3               | -               | -    |
| <b>3</b>       | *                    | -                   | -               | -    |
| <b>4</b>       | 3,38 (t; $J=7,3$ Hz) | 42,1                | C5; C2; C1'     | H-5  |
| <b>5</b>       | 2,78 (t; $J=7,3$ Hz) | 36,5                | C4; C1';C2';C6' | H-4  |
| <b>1'</b>      | -                    | 140,5               | -               | -    |
| <b>2' e 6'</b> | 7, 22 (m)            | 129,8               | C5;C4'          | *    |
| <b>3' e 5'</b> | 7, 27 (m)            | 129,5               | C1'             | *    |
| <b>4'</b>      | 7, 19 (m)            | 127,3               | C2'; C6'        | *    |

\*Sinal não observado

Figura 52. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **2** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).

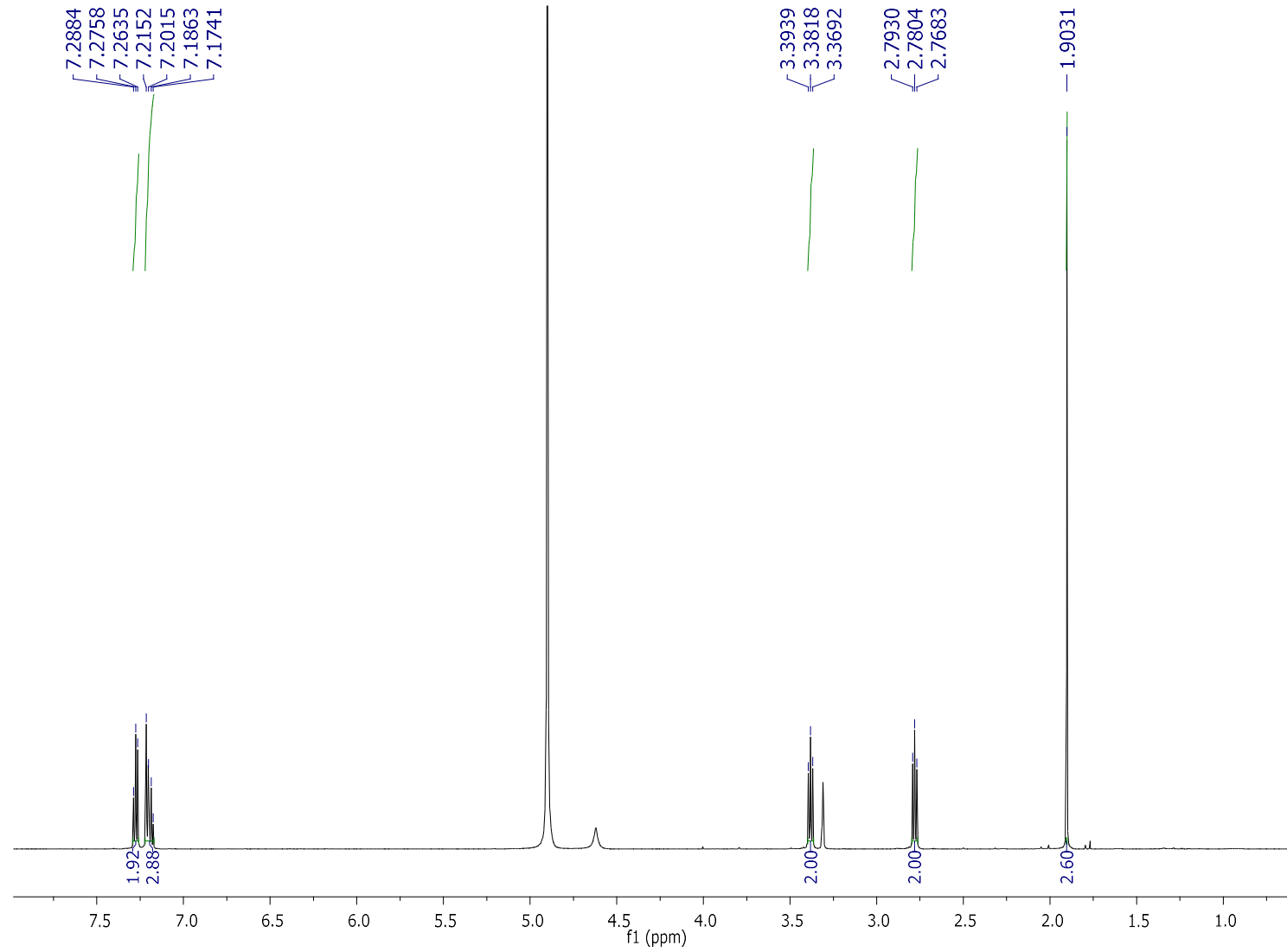


Figura 53. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **2** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 150 MHz).

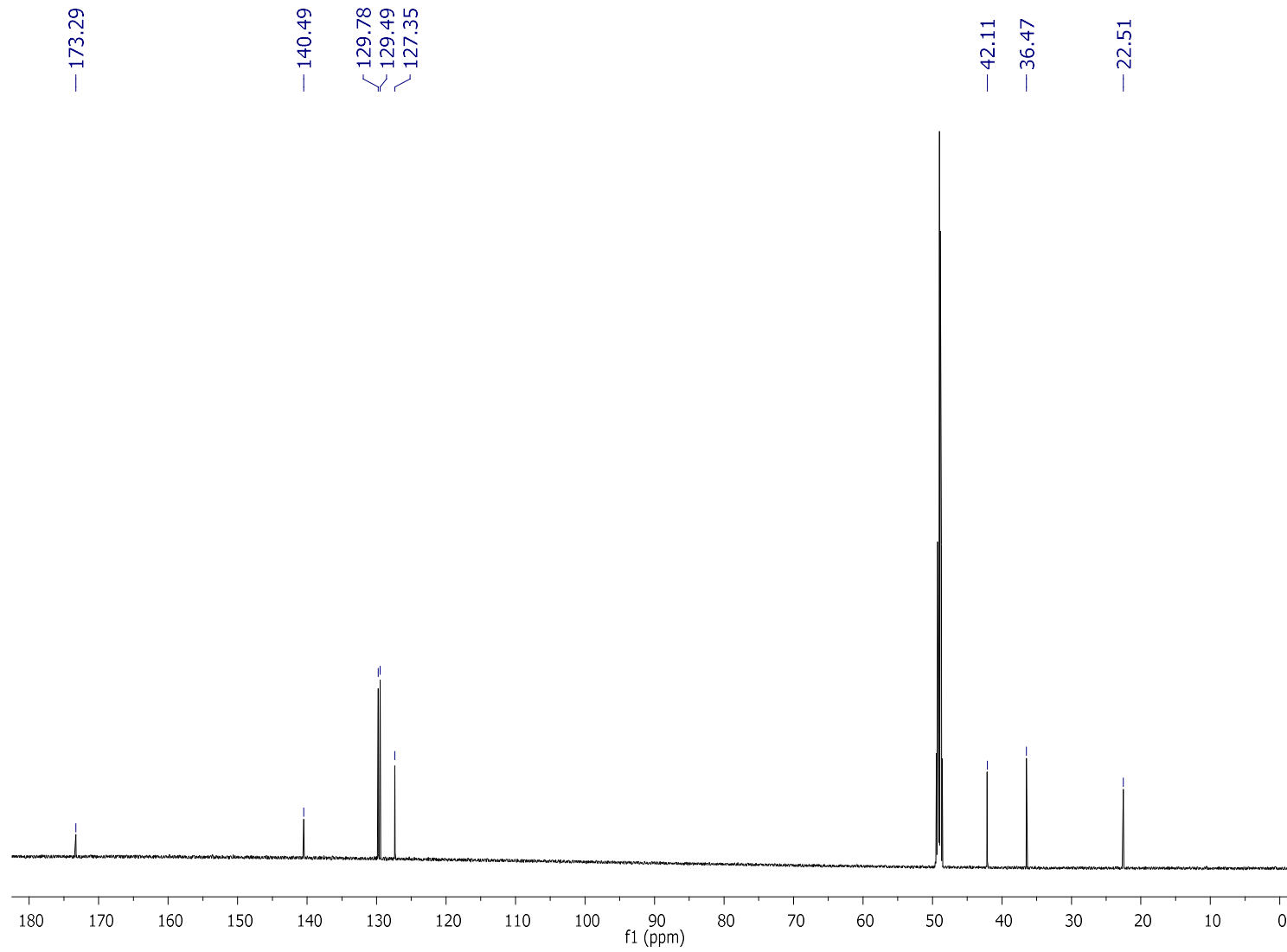


Figura 54. Mapa de contorno HSQC da substância 2 (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).

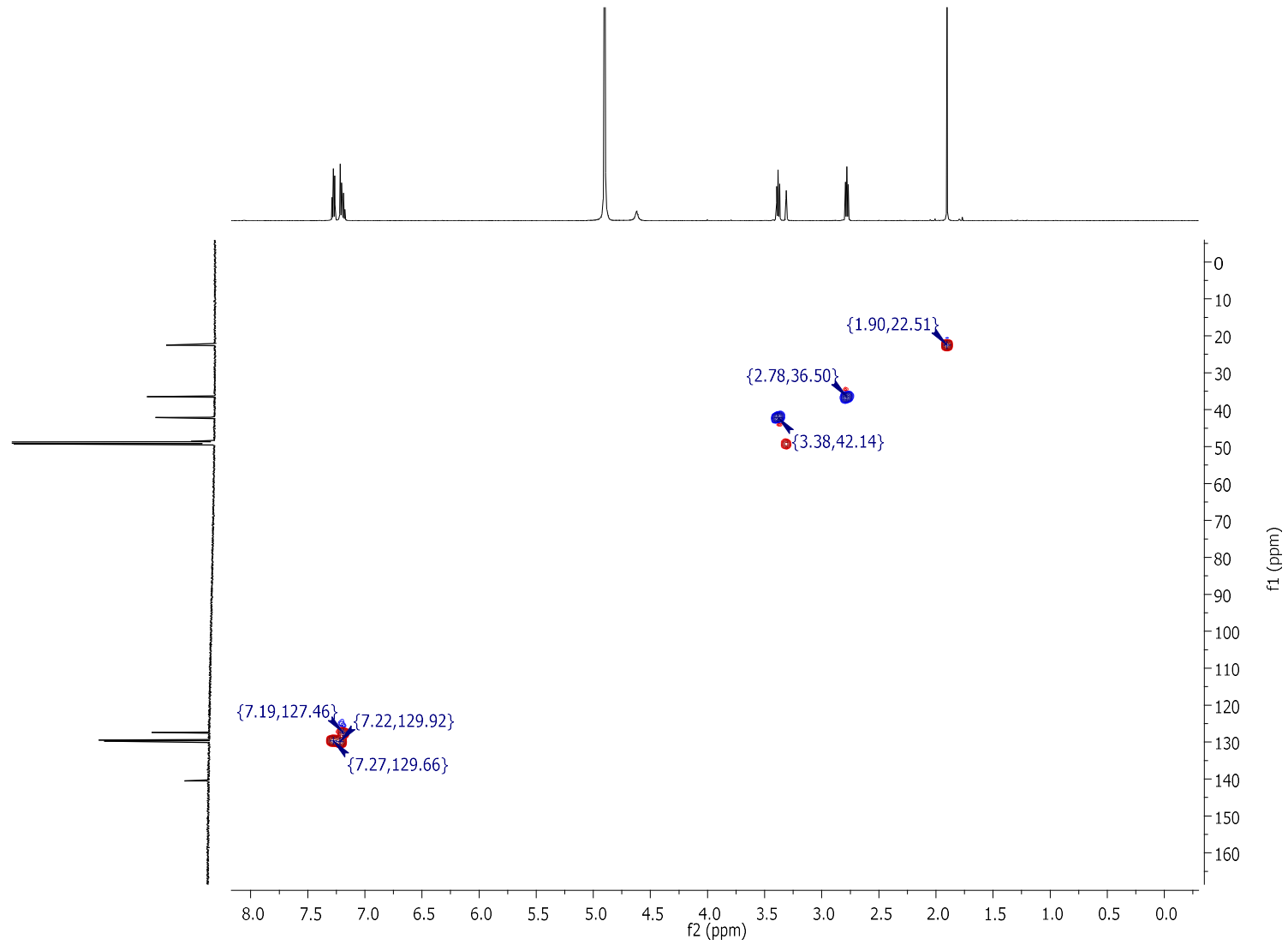


Figura 55. Mapa de contorno HMBC da substância 2 (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).

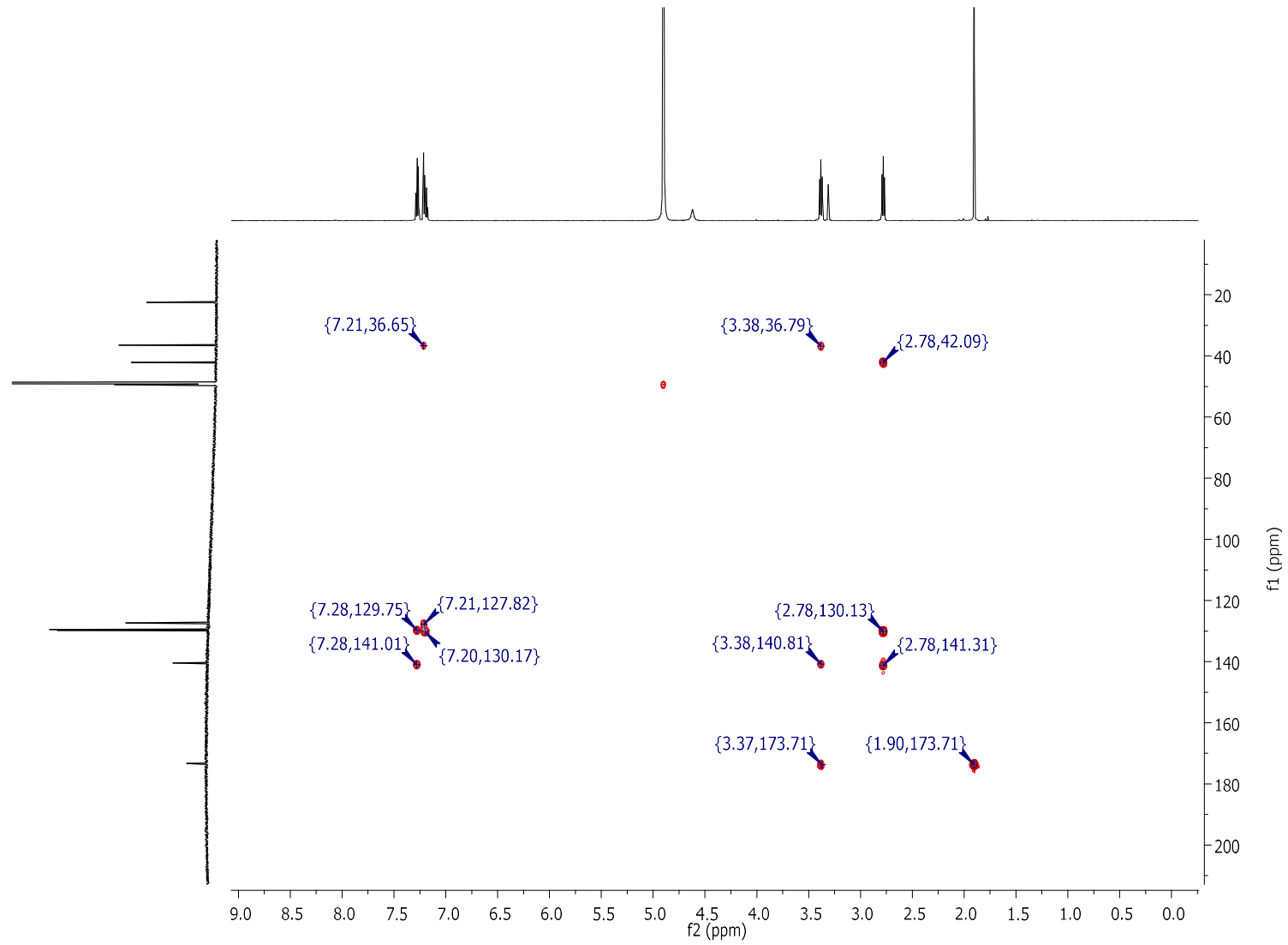
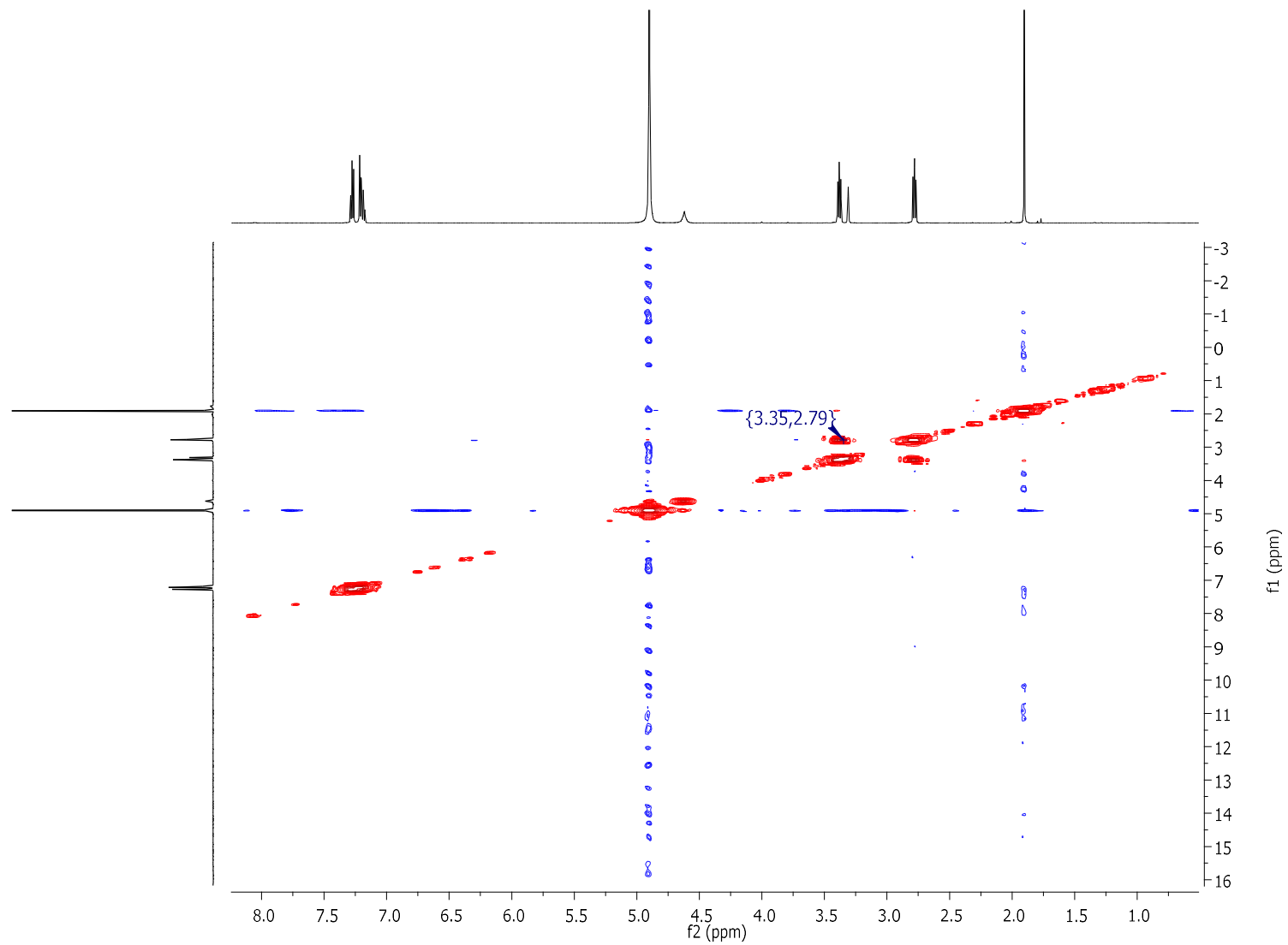
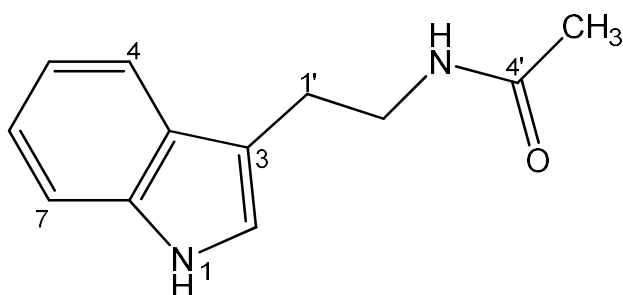


Figura 56. Mapa de contorno COSY da substância **2** (CD<sub>3</sub>OD; 600 MHz).





### 5.2.3 Identificação estrutural da substância 3

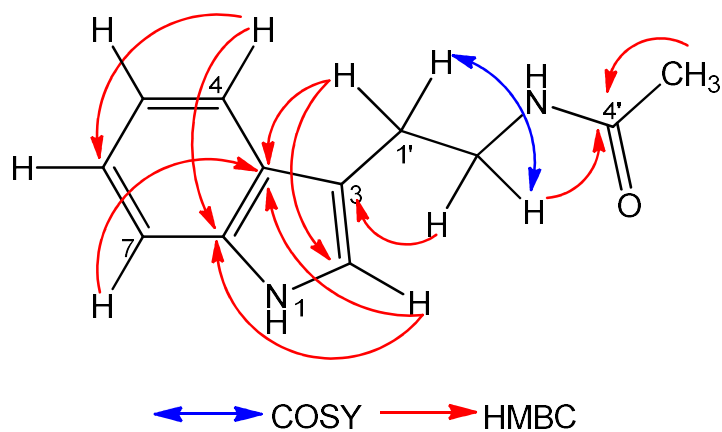


A estrutura de **3** foi definida após análise por ESI-EM, pela presença da molécula protonada em  $m/z$  203,05  $[M+H]^+$  e a formação da molécula sodiada de  $m/z$  225,04  $[M+Na]^+$  (Figura 58) que, associado aos dados de RMN uni e bidimensionais permitiu propor a fórmula molecular  $C_{12}H_{14}N_2O$ .

O espectro de RMN de  $^1H$  (Figura 59) da substância **3** apresentou um perfil espectroscópico semelhante ao da substância **2**, sendo que a única diferença observada foi a presença de um núcleo indólico ao invés, do sistema benzênico monossustituído. Esta suposição foi confirmada pela presença dos sinais em  $\delta_H$  6,99 (*ddd*; 1H;  $J = 8,0; 7,0$  e  $1,0$  Hz; H-5),  $\delta_H$  7,06-7,09 (*m*; 2H; H-2, H-6),  $\delta_H$  7,32 (*dt*, 1H,  $J = 8,0$  e  $1,0$  Hz; H-7) e  $\delta_H$  7,54 (*dt*, 1H,  $J = 8,0$  e  $1,0$  Hz; H-4), referentes aos hidrogênios do núcleo indólico (Figura 59 e Tabela 11).

As correlações observadas em HMBC (Figuras 57 e 62) entre  $H-1' \leftrightarrow C-2/C-3a$  permitiram estabelecer a conexão da unidade etilênica com o anel indólico. Foram observados também correlações entre  $H-2'/H-5' \leftrightarrow C-4'$  que, associado às correlações visualizadas em COSY (Figuras 57 e 63) e comparação com dados da literatura (NAGIA et al., 2012) permitiram identificar a substância **3** como N-acetiltryptamina.

**Figura 57.** Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC da substância **3**.



**Tabela 11.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC e COSY ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 150 MHz) de **3** ( $\delta$  em ppm e  $J$  em Hz).

| Posição   | $\delta_{\text{H}}$                             | $\delta_{\text{C}}$ | HMBC             | COSY |
|-----------|---|---------------------|------------------|------|
| <b>1</b>  | *   | -                   | -                | *    |
| <b>2</b>  | 7,06 ( <i>m</i> )                               | 123,3               | C3; C3a; C7a     | *    |
| <b>3</b>  | -   | 113,2               | -                | -    |
| <b>3a</b> | -   | 128,8               | -                | -    |
| <b>4</b>  | 7,54 ( <i>dd</i> ; $J = 8,0; 1,0$<br>Hz)        | 119,6               | C6; C7a          | H-5  |
| <b>5</b>  | 6,99 ( <i>ddd</i> ; $J = 8,0;$<br>7,0 e 1,0 Hz) | 119,2               | C3a; C7          | H-4  |
| <b>6</b>  | 7,08 ( <i>m</i> )                               | 122,3               | C5               | H-7  |
| <b>7</b>  | 7,32 ( <i>dd</i> ; $J = 8,0$ e<br>1,0 Hz)       | 112,2               | C3a; C4          | H-6  |
| <b>7a</b> | -   | 138,1               | -                | -    |
| <b>1'</b> | 2,93 ( <i>t</i> ; $J = 7,3$ Hz)                 | 26,2                | C2'; C2; C3; C3a | H-2' |
| <b>2'</b> | 3,45 ( <i>t</i> ; $J = 7,3$ Hz)                 | 41,6                | C1'; C3; C4'     | H-1' |
| <b>3'</b> | *   | -                   | *                | *    |
| <b>4'</b> | -   | 173,3               | -                | -    |
| <b>5'</b> | 1,91 ( <i>s</i> )                               | 22,6                | C4'              | *    |

\* Sinal não observado

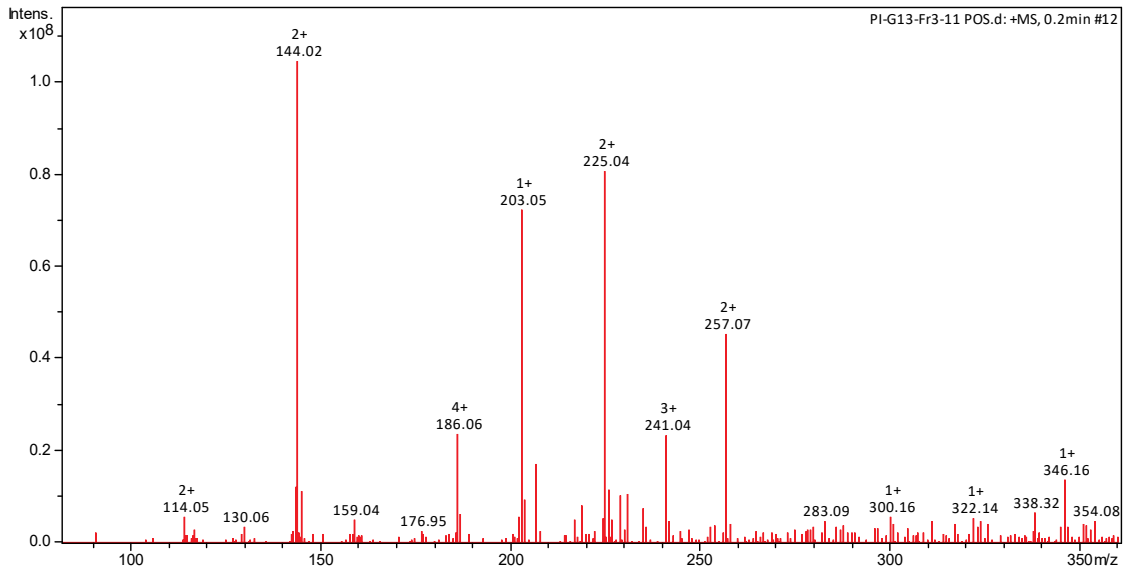
**Figura 58.** Espectro de massas (+)-ESI-MS da substância **3**.

Figura 59. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **3** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).

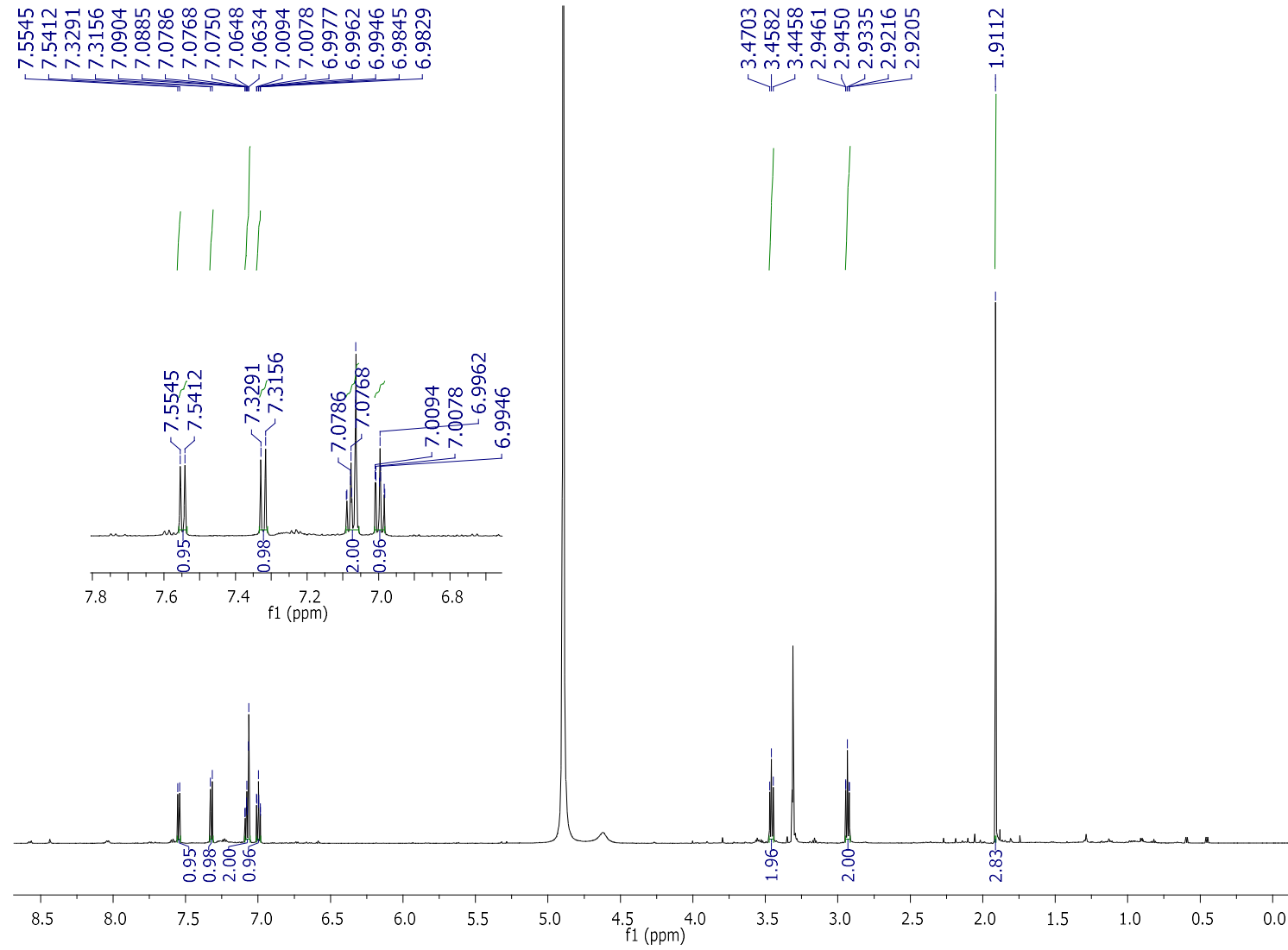


Figura 60. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **3** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 150 MHz).

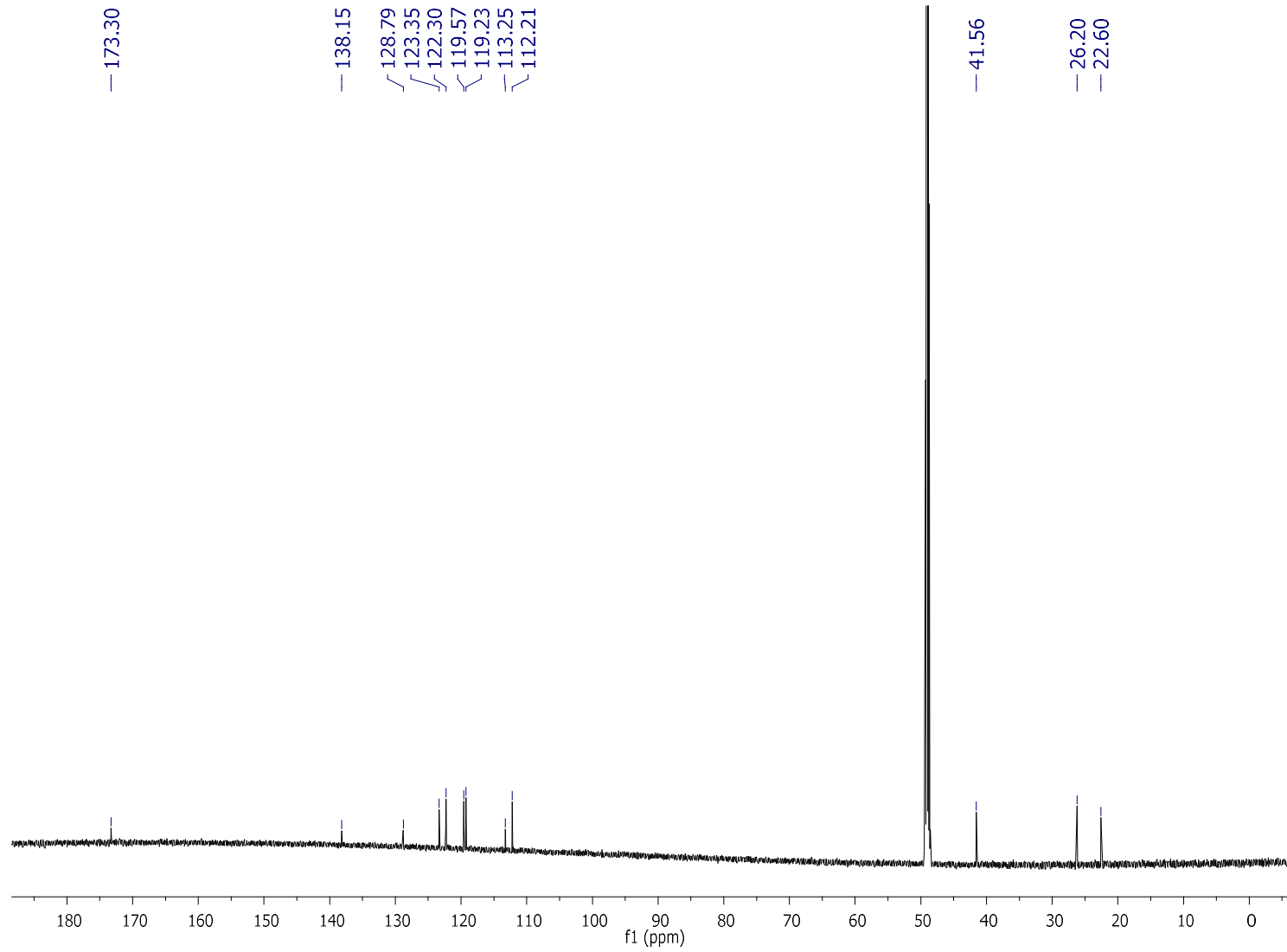


Figura 61. Mapa de contorno HSQC da substância **3** (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).

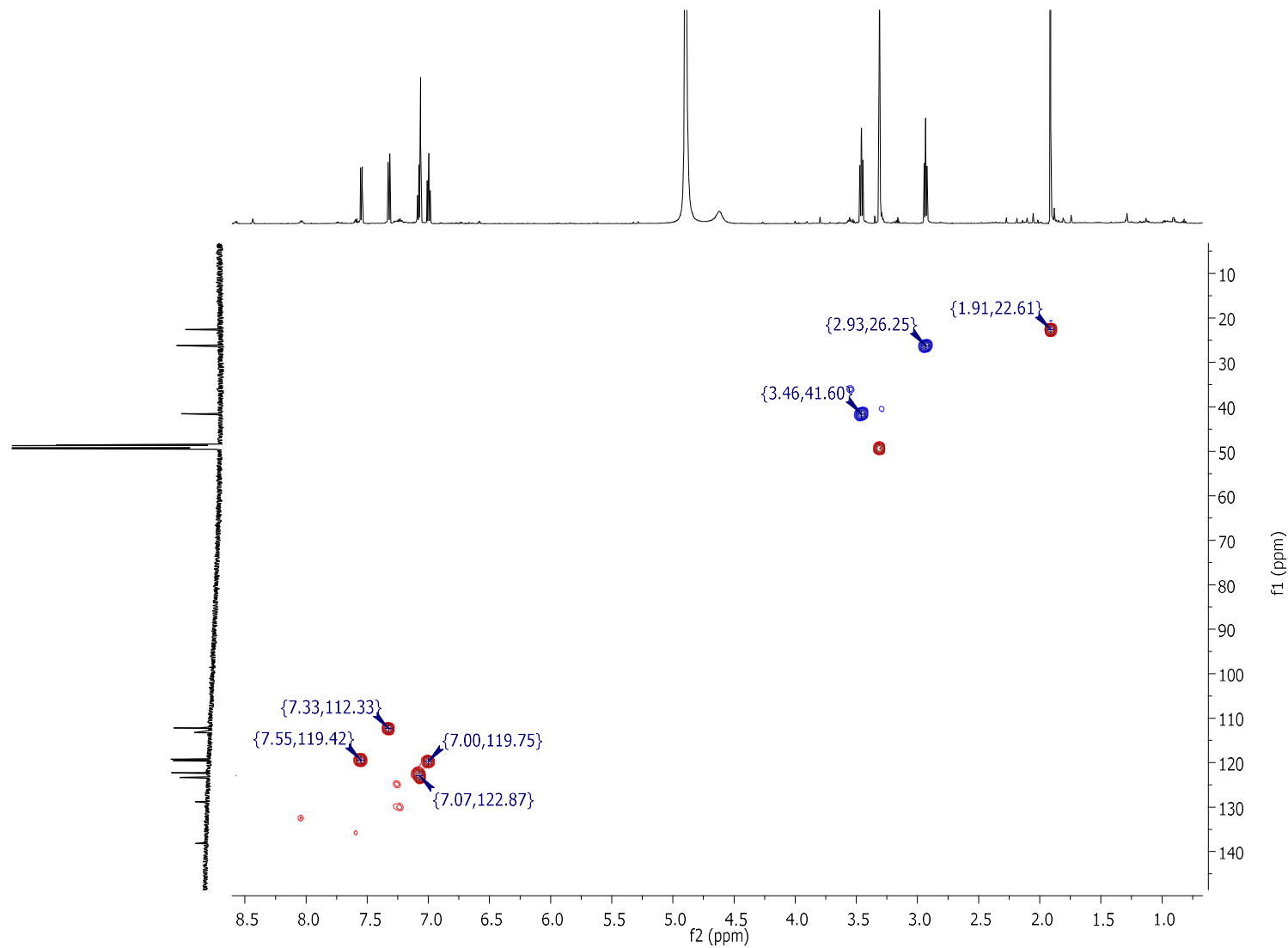


Figura 62. Mapa de contorno HMBC da substância **3** (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).

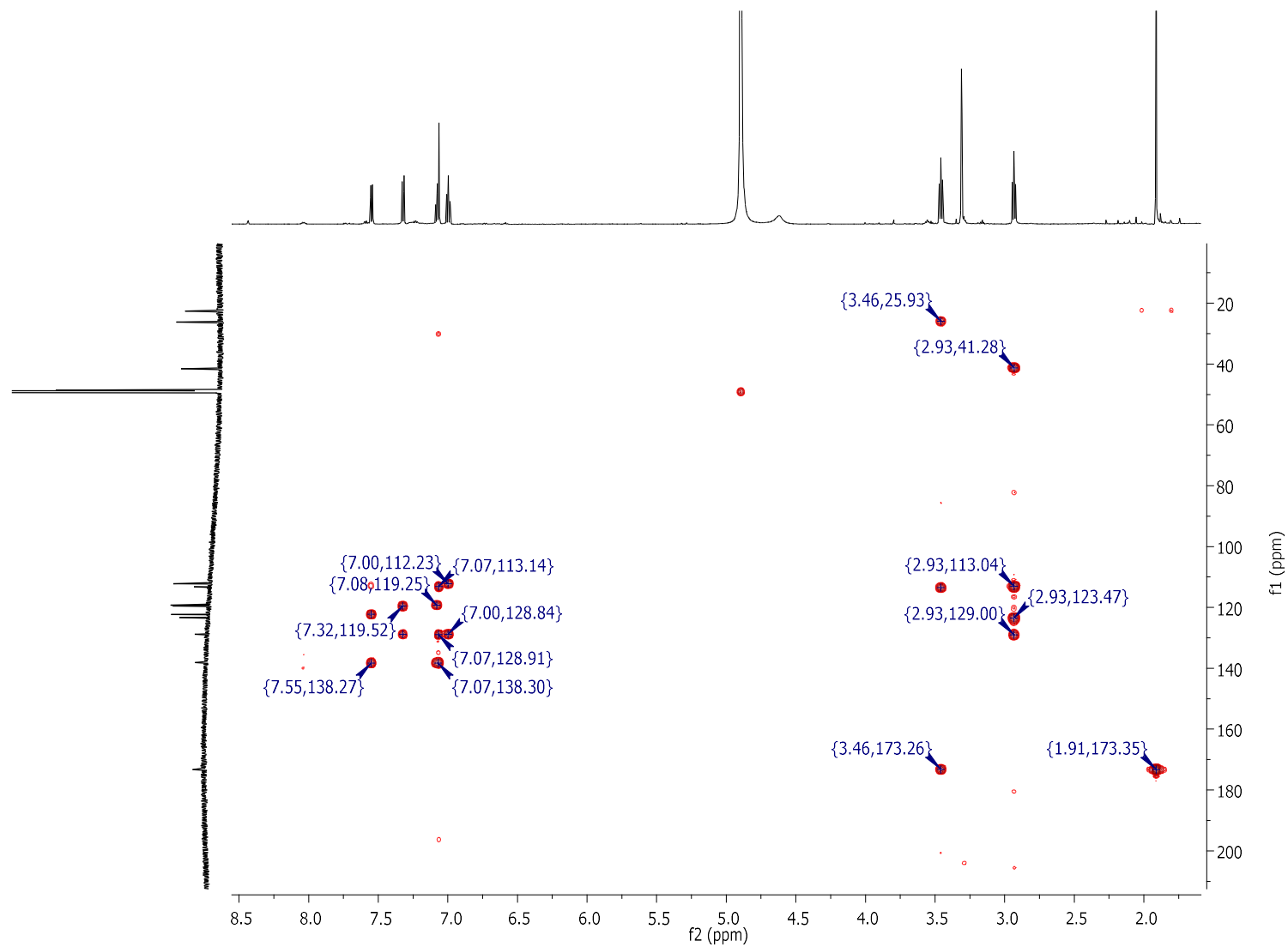
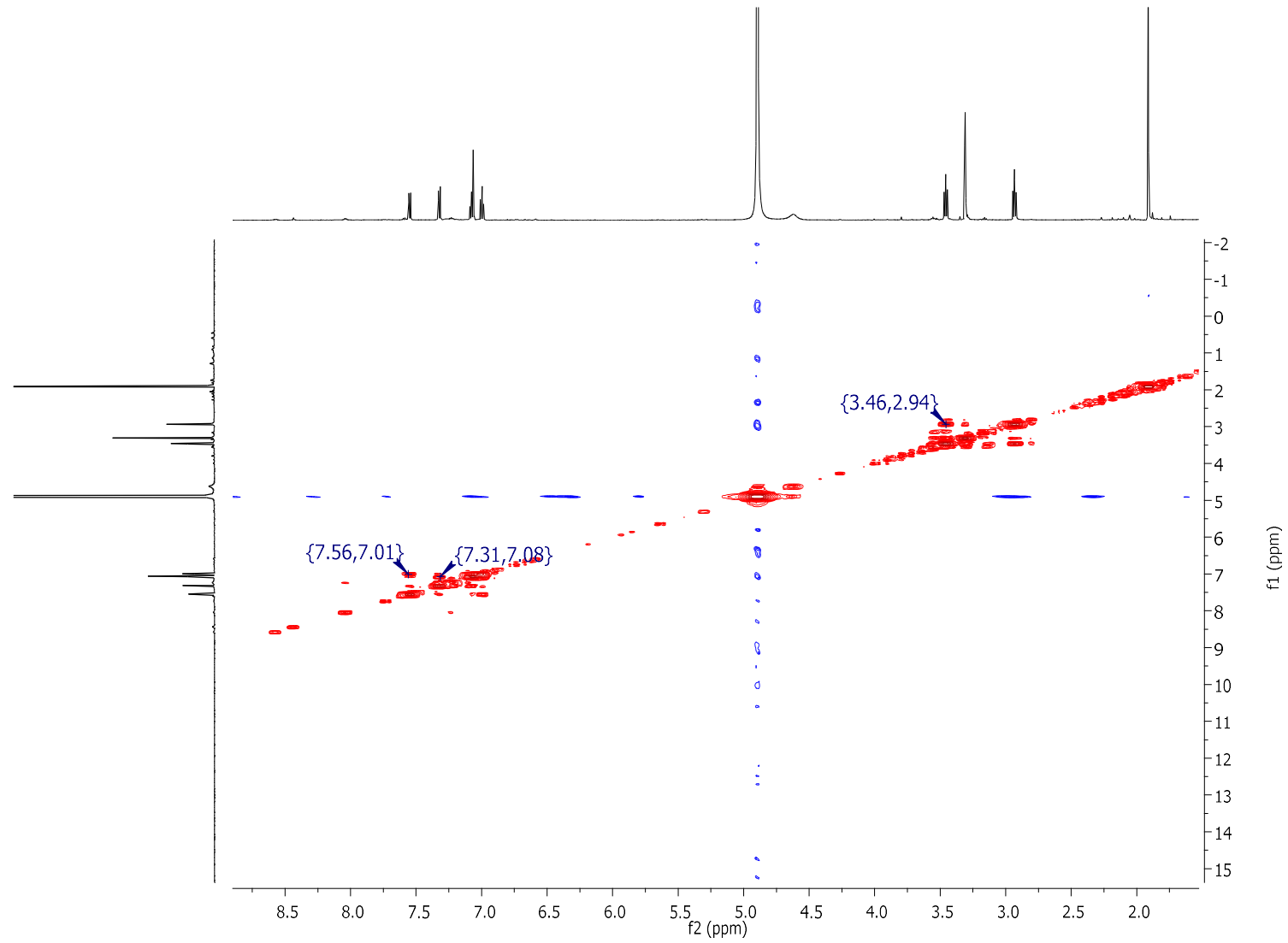
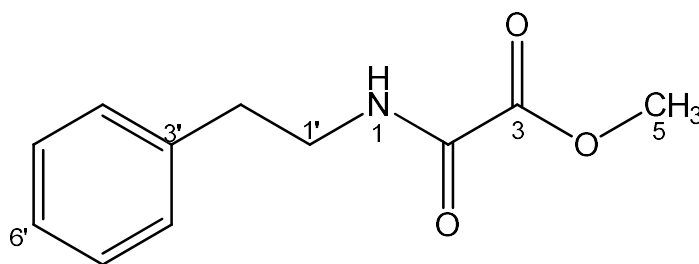


Figura 63. Mapa de contorno COSY da substância **3** (CD<sub>3</sub>OD; 600 MHz).





#### 5.2.4 Identificação estrutural da substância 4



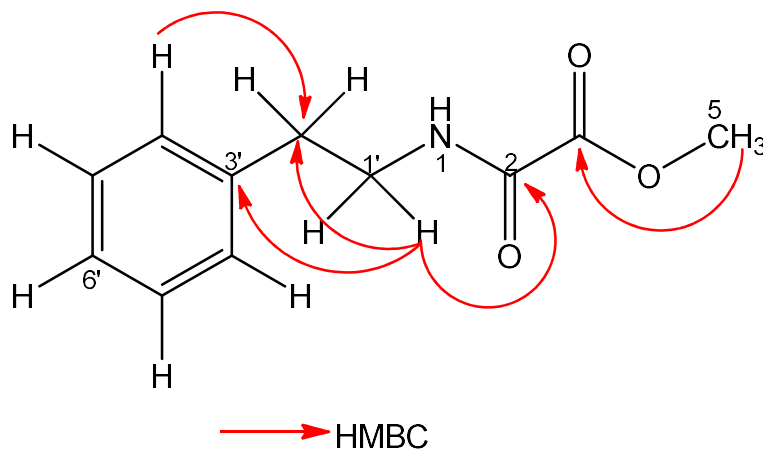
A análise dos dados de espectrometria de massas, ESI-EM (Figura 65), modo positivo, apresentou para a substância **4** o íon  $m/z$  246, 06  $[M+K]^+$ , que associado aos dados de RMN uni e bidimensionais permitiu propor a fórmula molecular  $C_{11}H_{13}NO_3$ .

A análise conjunta dos dados de RMN de  $^1H$ ,  $^{13}C$ , HSQC e HMBC (Figuras 66-69) da substância **4** permitiu observar uma grande semelhança dos deslocamentos químicos e das multiplicidades dos sinais quando comparado com os da substância **2**.

A presença de um simpleto em  $\delta_H$  3,70 (s; 3H;  $\delta_C$  52,7) (Tabela 12) atribuído a uma metila de um grupo acetóxi, aliada as correlações observadas em HMBC entre  $H-5 \leftrightarrow C-3$ ,  $H-1' \leftrightarrow C-2/C2'/C3'$  (Figuras 64 e 69) e associados aos dados relatados por Maskey et al. (2002) permitiram propor a substância **4** como 2-oxo-2-(feniletilamino)-Acetato de metila.

Uma busca realizada na base de dados SciFinder, mostrou que não há relatos de isolamento desse composto em plantas ou microrganismos, apenas obtido por síntese. Desta forma, este trabalho apresenta o primeiro estudo de isolamento a partir de uma fonte natural e atribuição dos dados de ressonância para esta substância

**Figura 64.** Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC da substância **4**.



**Tabela 12.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC e COSY ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) de **4** ( $\delta$  em ppm e  $J$  em Hz).

| Posição        | $\delta_{\text{H}}$           | $\delta_{\text{C}}$ | HMBC               | COSY |
|----------------|-------------------------------|---------------------|--------------------|------|
| <b>1</b>       | *                             | -                   | -                  |      |
| <b>2</b>       | -                             | 168,3               | -                  |      |
| <b>3</b>       | -                             | 170,4               | -                  |      |
| <b>5</b>       | 3,70 (s)                      | 52,7                | C3                 |      |
| <b>1'</b>      | 3,43 ( <i>t</i> , $J=7,5$ Hz) | 42,3                | C2'; C3'; C2       | H-2' |
| <b>2'</b>      | 2,80 ( <i>t</i> , $J=7,5$ Hz) | 36,3                | C1'; C4'; C8'; C3' | H-1' |
| <b>3'</b>      | -                             | 140,4               | -                  |      |
| <b>4' e 8'</b> | 7,24 ( <i>m</i> )             | 129,8               | C7; C4'            |      |
| <b>5' e 7'</b> | 7,28 ( <i>m</i> )             | 129,5               | C3'; C1'; C5'      |      |
| <b>6'</b>      | 7,20 ( <i>m</i> )             | 127,5               | C2'                |      |

\* Sinal não observado

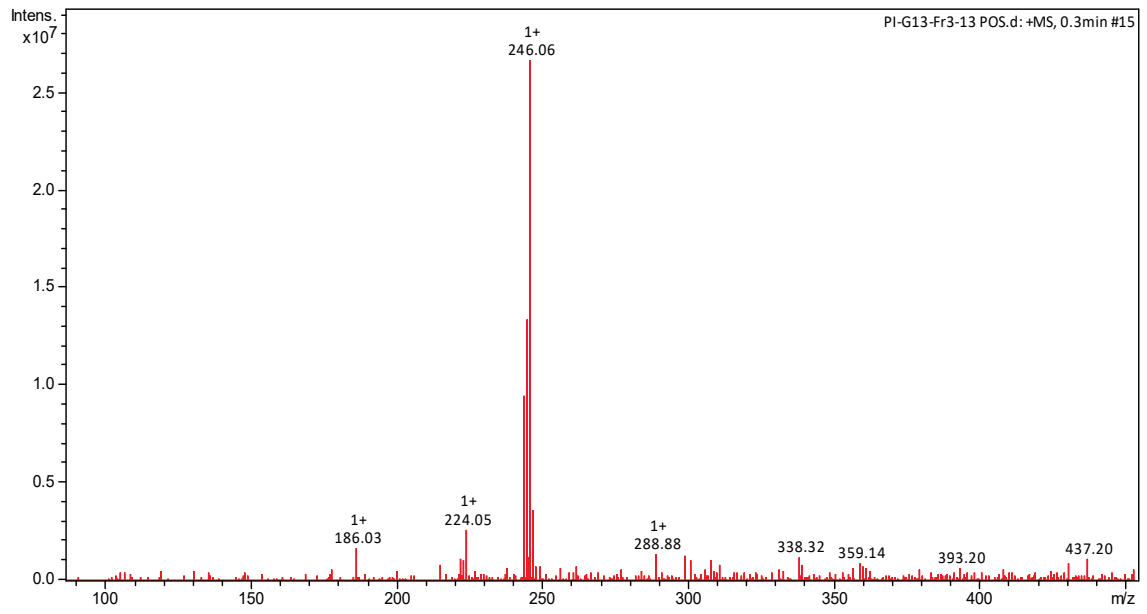
**Figura 65.** Espectro de massas (+)-ESI-MS da substância **4**.

Figura 66. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 4 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).

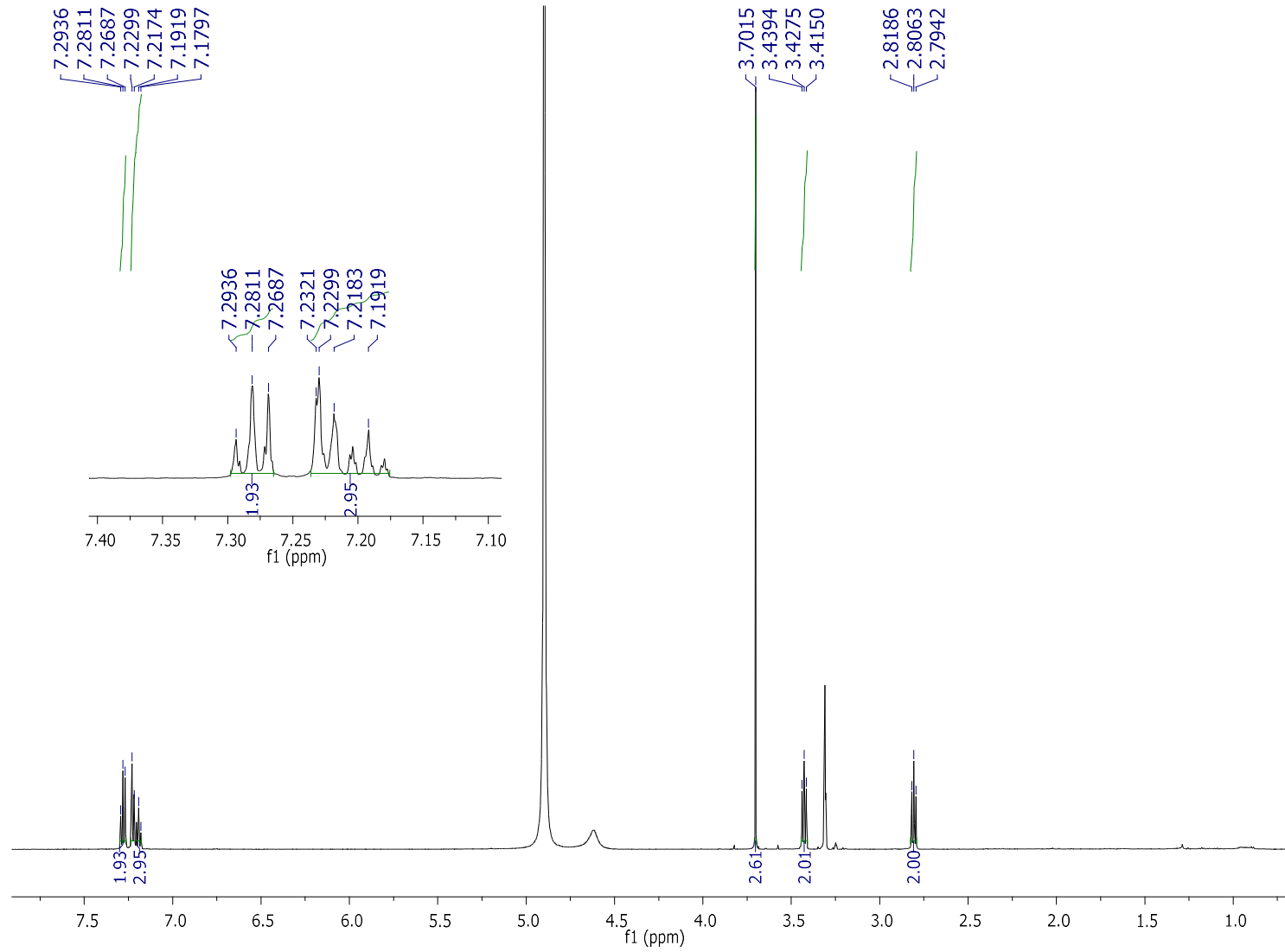


Figura 67. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **4** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).

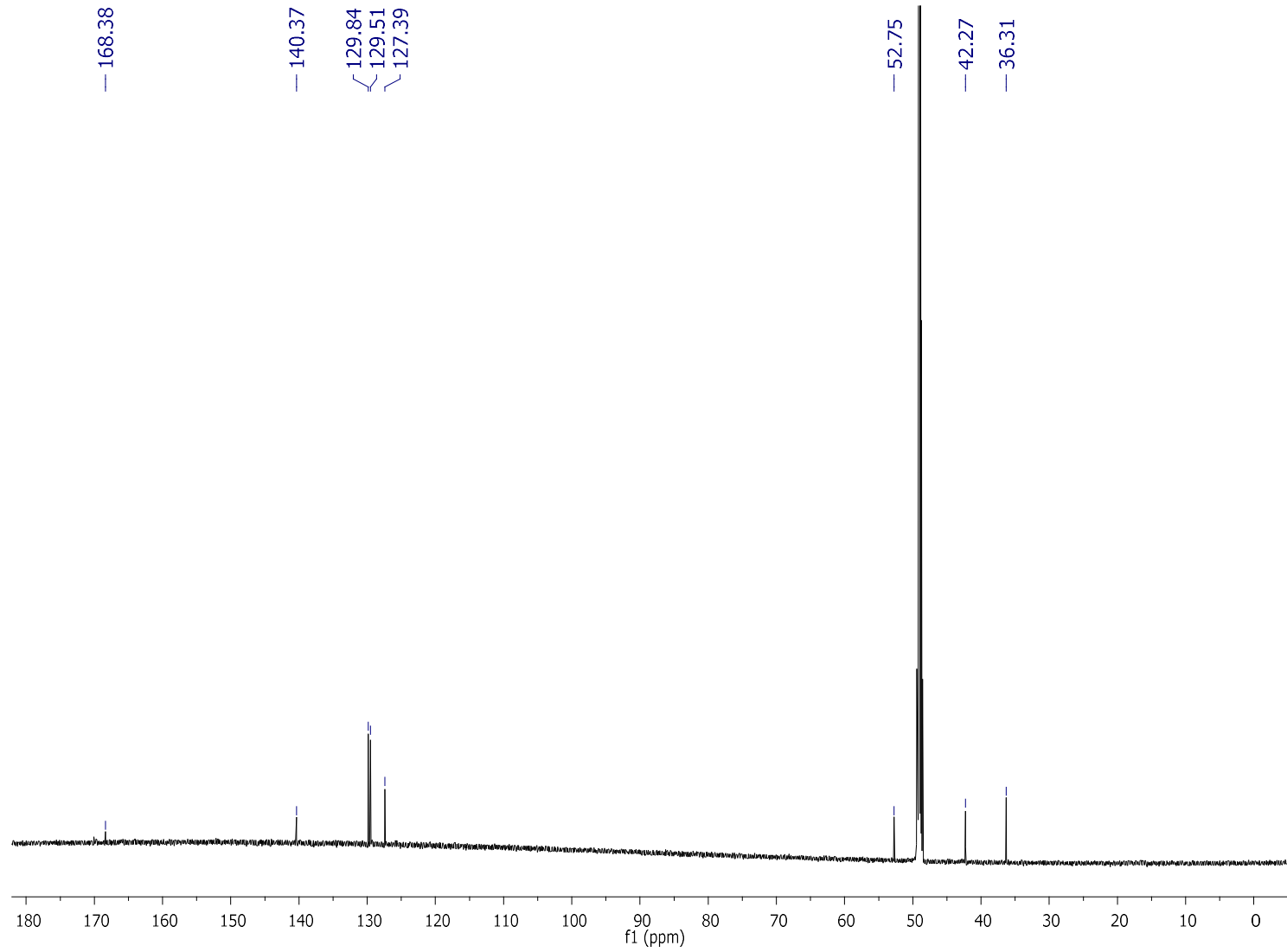


Figura 68. Mapa de contorno HSQC da substância 4 (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).

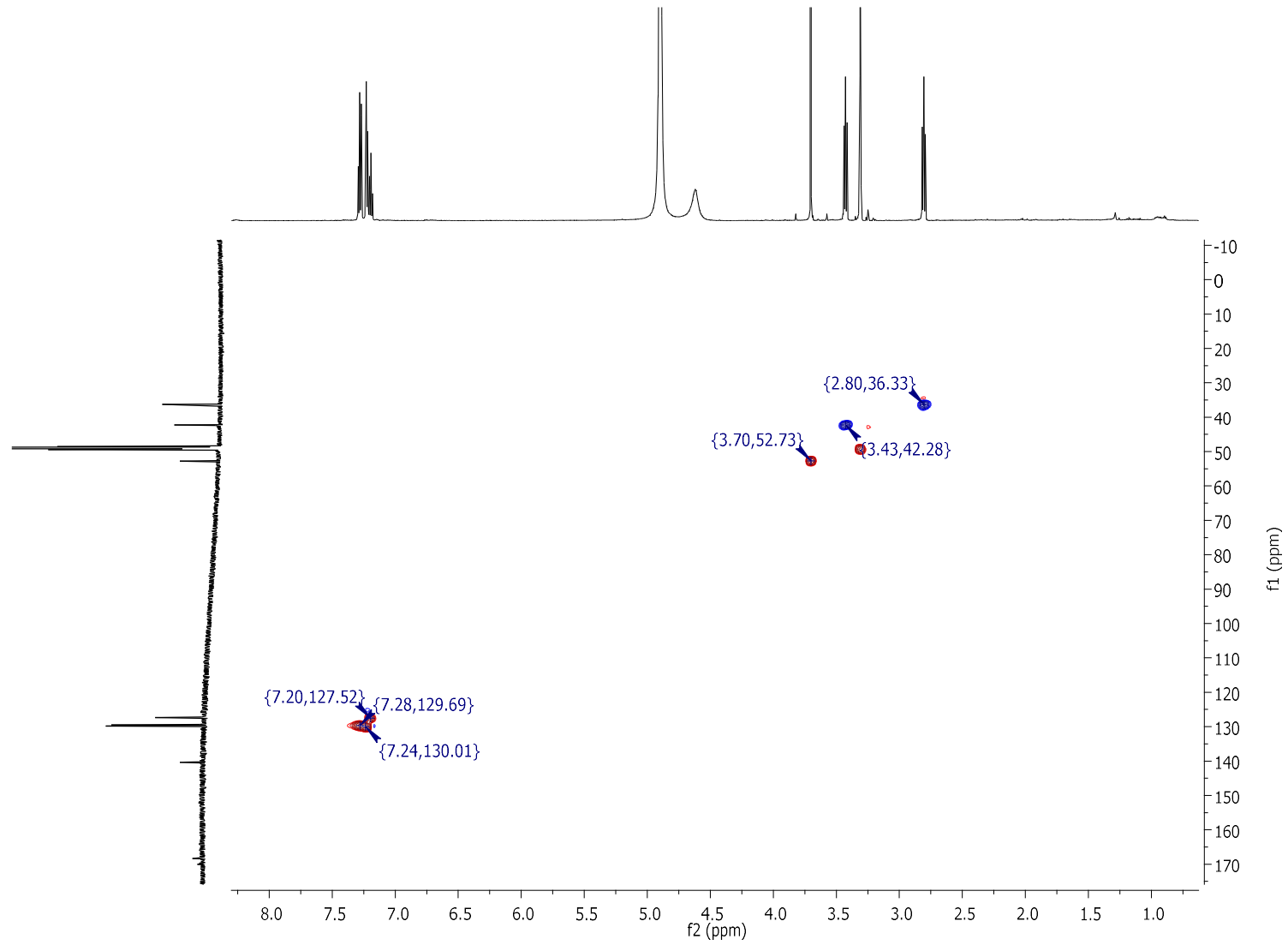
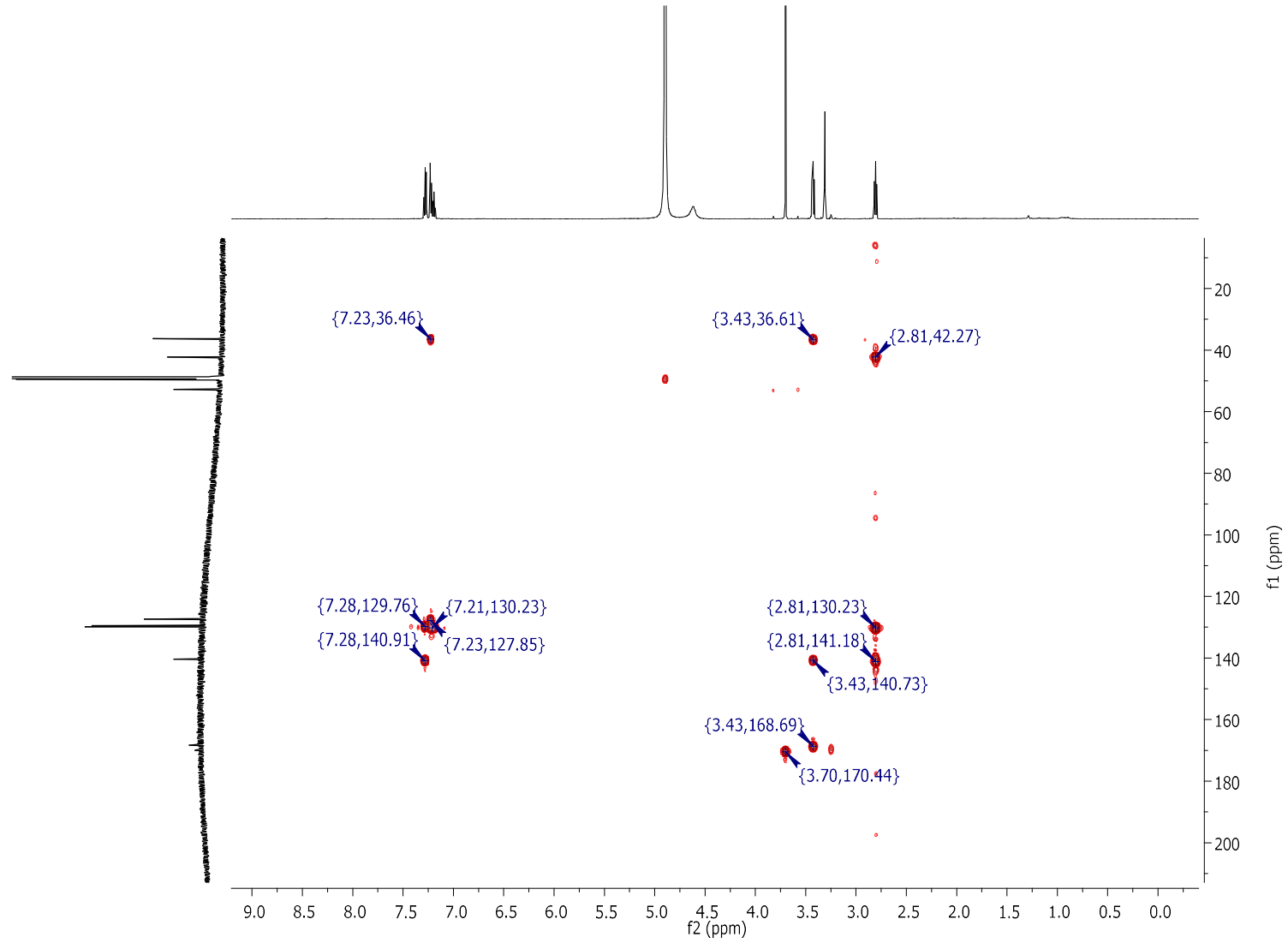
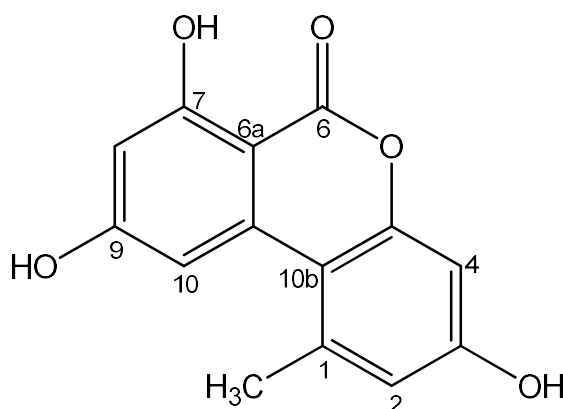


Figura 69. Mapa de contorno HMBC da substância 4 (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).



### 5.2.5 Identificação estrutural da substância **12**



O espectro de massas obtido por ESI-EM (Figura 71), modo positivo, evidenciou para **12** a molécula protonada de  $m/z$  259,01  $[M+H]^+$ , que associado aos dados de RMN uni e bidimensionais permitiu propor fórmula molecular  $C_{14}H_{10}O_5$ .

O espectro de RMN de  $H^1$  (Figura 72) apresentou sinais em  $\delta_H$  6,37 ( $d$ ,  $J = 2,0$  Hz;  $\delta_C$  100,5); 6,61 ( $d$ ,  $J = 2,6$  Hz;  $\delta_C$  101,3); 6,70 ( $d$ ,  $J = 2,6$  Hz;  $\delta_C$  117,1) e 7,26 ( $d$ ,  $J = 2,0$  Hz;  $\delta_C$  104,4), evidenciando acoplamentos *meta*, o que sugeriu a presença de dois anéis aromáticos tetrassubstituídos. Foi observado ainda um simpleto em  $\delta_H$  2,77 ( $s$ ,  $\delta_C$  24,3), sugerindo a presença de uma metila ligada a anel aromático.

A análise do espectro de DEPTQ (Figura 73) permitiu identificar 12 sinais na região de aromáticos, sugerindo dois anéis aromáticos, uma metila benzílica e um sinal em  $\delta_C$  164, 8, o qual foi atribuído a uma carbonila de éster conjugado.

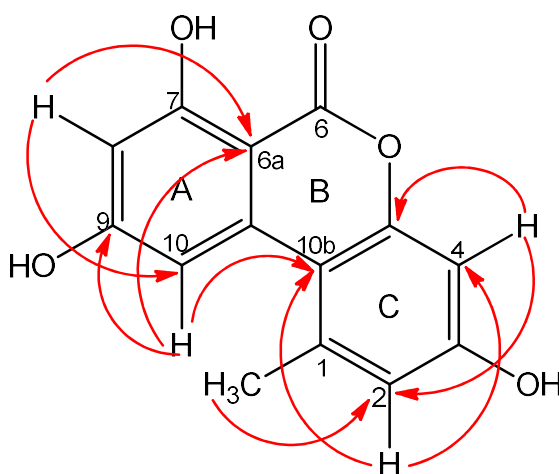
As correlações observadas em HMBC (Figuras 70 e 75) entre  $H-8 \leftrightarrow C-10/C-6a$  e  $H-10 \leftrightarrow C-6a/C-8/C-9/C-10b$  confirmou a conectividade entre os anéis A e B, e as correlações entre  $H-2 \leftrightarrow C-4/C-10b/C-11$ ,  $H-4 \leftrightarrow C-2/C-3/C-5$  e  $H-11 \leftrightarrow C-1/C-2/C-10b$  permitiram estabelecer a conectividade entre os anéis B e C. Os dados espectrais obtidos (Tabela 13) foram comparados com os descritos na literatura (GU, 2009; ALY, et al., 2008) e a substância **12** foi identificada como alternariol.

O alternariol é uma micotoxina, frequentemente encontrada em alimentos contaminados com algumas espécies do gênero *Alternaria*, especialmente a *Alternaria alternata* (WANG, et al., 2018; PFEIFFER, et al., 2007). Ainda não está definido o papel das micotoxinas com relação à sua fitotoxicidade, na competição microbiana em um ecossistema ou na planta hospedeira, uma vez que esta substância é produzida por fungos endofíticos (DAI et al., 2005).



Um estudo realizado por Muller et al., (2015) avaliou a influência de algumas micotoxinas, entre elas o alternariol, no crescimento e produção de micotoxinas de algumas espécies de *Fusarium*. Quando estas foram incubadas em grãos de trigo, suplementados com alternariol e outras micotoxinas produzidas por espécies de *Alternaria*, observou-se que as linhagens de *Fusarium* não foram capazes de degradar o alternariol. Além disso, quando as linhagens de *Alternaria* foram cultivadas em grãos de trigo, enriquecidos com micotoxinas de *Fusarium*, suas taxas de crescimento aumentaram, assim como a produção de alternariol e alternariol metil éter, que foram capazes de degradar as micotoxinas de *Fusarium*. Este estudo mostra que as micotoxinas podem desempenhar um papel importante no processo competitivo entre fungos e auxilia na compreensão das interações ecológicas entre microrganismos.

**Figura 70.** Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC da substância **12**.



**Tabela 13.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC e COSY ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 150 MHz) de **12** ( $\delta$  em ppm e  $J$  em Hz).

| Posição    | $\delta_{\text{H}}$           | $\delta_{\text{C}}$ | HMBC              |
|------------|-------------------------------|---------------------|-------------------|
| <b>1</b>   | -                             | 138,1               | -                 |
| <b>2</b>   | 6,70 ( <i>d</i> , $J=2,6$ Hz) | 117,1               | C4; C10b; C11     |
| <b>3</b>   | -                             | 158,5               | -                 |
| <b>4</b>   | 6,61 ( <i>d</i> , $J=2,6$ Hz) | 101,3               | C2; C3; C5; C10b  |
| <b>5</b>   | -                             | 153,0               | -                 |
| <b>6</b>   | -                             | 164,8               | -                 |
| <b>6a</b>  | -                             | 97,5                | -                 |
| <b>7</b>   | -                             | 165,5               | -                 |
| <b>8</b>   | 6,37 ( <i>d</i> , $J=2,0$ Hz) | 100,5               | C6a; C10          |
| <b>9</b>   | -                             | 165,9               | -                 |
| <b>10</b>  | 7,26 ( <i>d</i> , $J=2,0$ Hz) | 104,4               | C6a; C8; C9; C10b |
| <b>10a</b> | -                             | 138,4               | -                 |
| <b>10b</b> | -                             | 109,5               | -                 |
| <b>11</b>  | 2,75 ( <i>s</i> )             | 24,3                | C2; C10b          |

**Figura 71.** Espectro de massas (+)-ESI-MS da substância **12**.

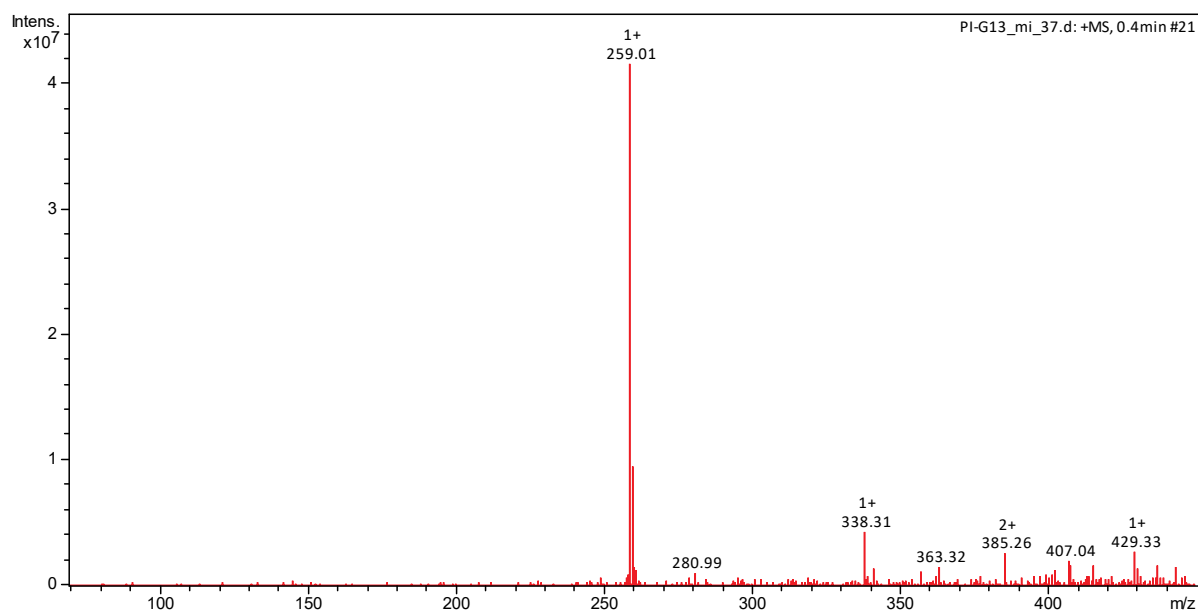


Figura 72. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **12** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).

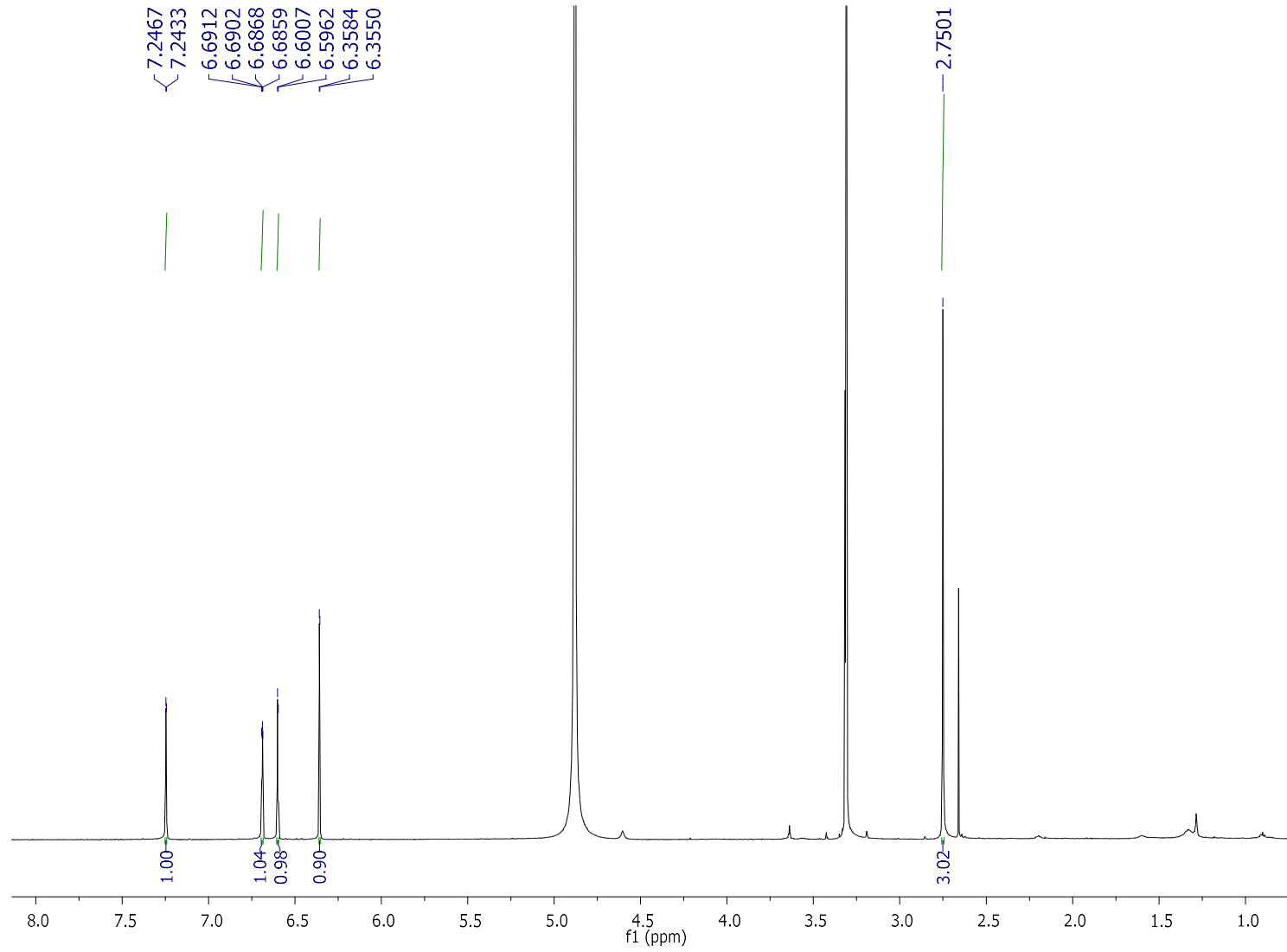


Figura 73. Espectro de DEPTQ da substância **12** (CD<sub>3</sub>OD; 150 MHz).

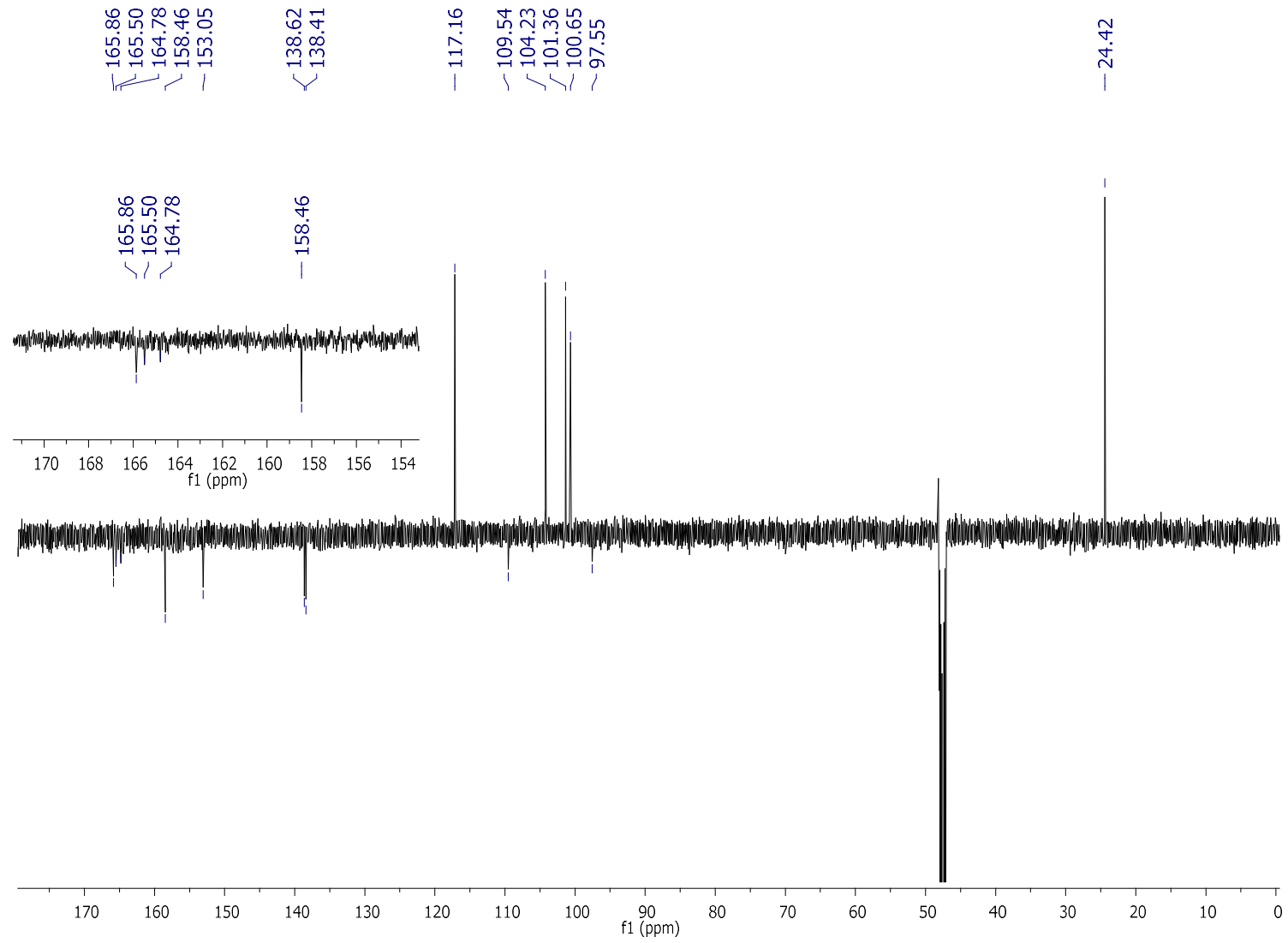


Figura 74. Mapa de contorno HSQC da substância **12** (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).

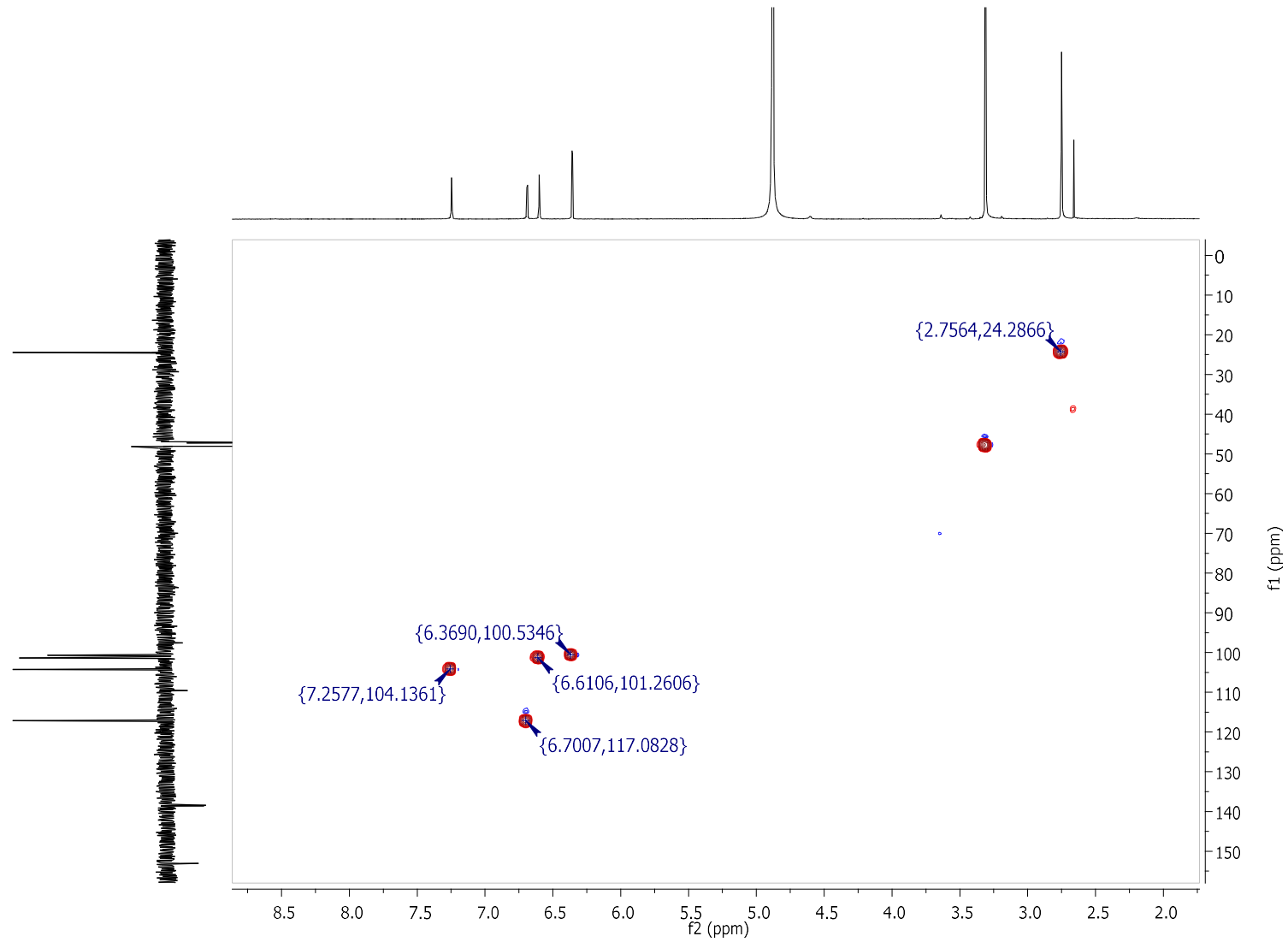
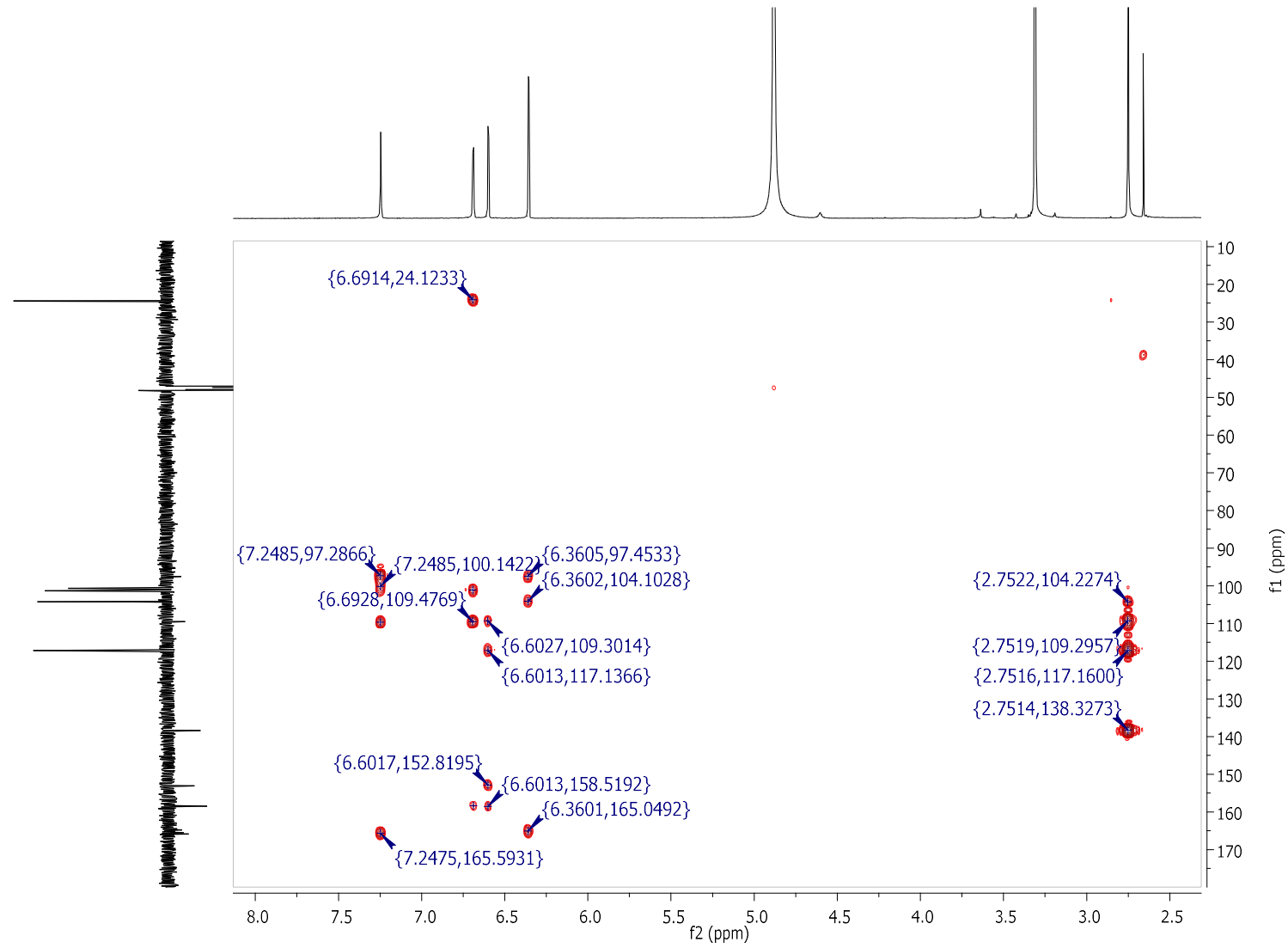
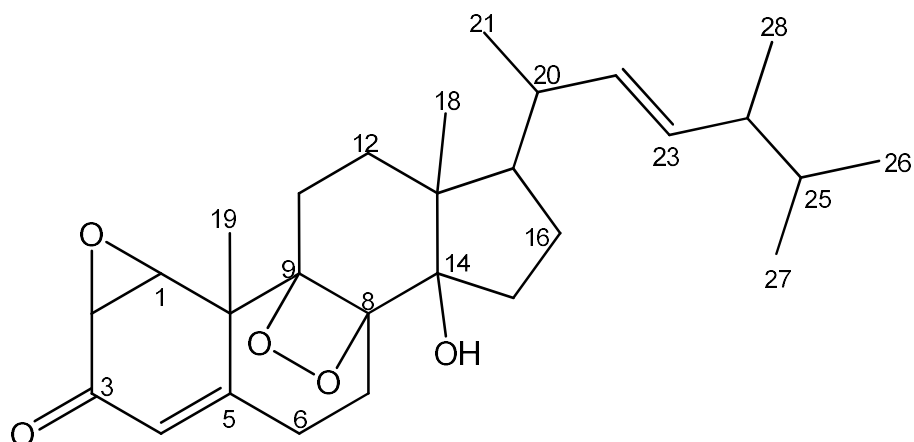


Figura 75. Mapa de contorno HMBC da substância **12** (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).



### 5.2.6 Proposta estrutural para substância **13**

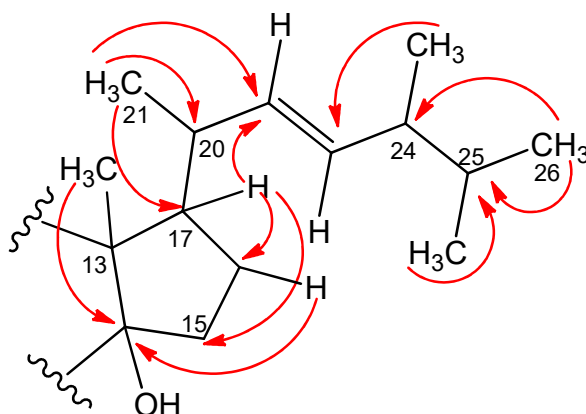


A análise dos dados de espectrometria de massas, ESI-EM (Figura 79), modo positivo, apresentou para a substância **13** a molécula protonada de  $m/z$  457,2828  $[M+H]^+$  e a formação da molécula sodiada de  $m/z$  479,2641  $[M+Na]^+$ , que associado aos dados de RMN uni e bidimensionais permitiram propor a fórmula molecular  $C_{28}H_{40}O_5$ .

Na análise conjunta dos dados de RMN de  $^1H$  e DEPTQ (Figuras 80 e 81) foram visualizadas seis metilas, sendo quatro dupletos em  $\delta_H$  0,85; 0,87, 0,96 e 1,03 e dois simpletos em  $\delta_H$  1,06 e 1,23, além de vários sinais, na região de hidrogênios metilênicos e metínicos, entre  $\delta_H$  1,44 e 2,83. Adicionalmente, foram observados dois duplos dupletos em  $\delta_H$  5,28 e 5,39 ( $J = 15,3$  e  $8,2$  Hz) referentes a hidrogênios olefínicos (Tabela 14).

A análise detalhada do mapa de contorno HMBC (Figura 83) mostrou correlações que permitiram propor a unidade A para a substância **13**, as quais estão apresentadas na Figura 76 e Tabela 14.

**Figura 76.** Principais correlações observadas em HMBC para a unidade A da estrutura de **13**.

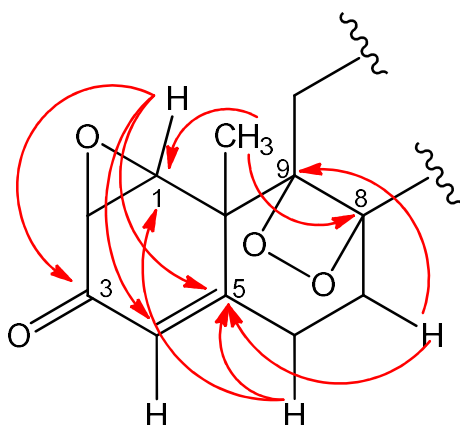


Em continuidade à determinação estrutural de **13**, foram observados no espectro de DEPTQ três carbonos em  $\delta_c$  197,9; 126,4 e 176,7, atribuídos a uma carbonila de cetona, um olefínico metínico e um  $sp^2$  quaternário, respectivamente, sugerindo uma cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada, que foi confirmada por HMBC (Figura 83).

Considerando que foram observados:

- presença de uma cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada, onde o carbono  $\beta$  é quaternário;
- carbonos em  $\delta_c$  83,1; 84,7 e 86,8, sendo estes quaternários, e pelo valor dos deslocamentos químicos sugerindo carbonos carbinólicos em um sistema com tensão angular;
- um duplete em  $\delta_H$  2,83 (1H;  $J = 1,1$  Hz;  $\delta_c$  66,1), atribuído a um epóxido, o qual apresentou correlação, em HMBC, com C-3 e C-5, permitiu atribuir a unidade B para a substância **13** (Figura 77).

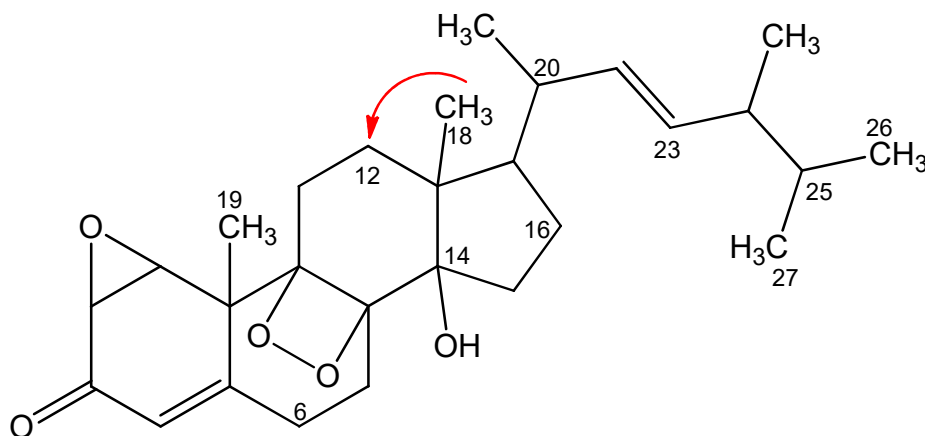
**Figura 77.** Principais correlações observadas em HMBC para a unidade B da estrutura de **13**.





A conexão das unidades A e B foi estabelecida pela correlação observada em HMBC entre H-18↔C-12 (Figura 78 e 83). A junção entre C-14 e C-18 não foi observada, no entanto, considerando os valores de deslocamento químico e as correlações em RMN 1D e 2D, associado aos dados de espectrometria de massas, permitiram propor a estrutura de **13** e sugeriu que a mesma pertence à classe dos esteroides.

**Figura 78.** Correlação observada em HMBC, correspondente à conexão das unidades A e B da substância **13**.



A partir da fração PI\_G13\_Mi\_52\_66 foram isoladas mais três substâncias (sub\* I; II e III) (Figura 19) que após análise dos dados de RMN (Apêndices 1-3), pode-se observar um perfil espectroscópico semelhante ao da substância **13**.

**Tabela 14.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HMBC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 150 MHz) de **13** ( $\delta$  em ppm e  $J$  em Hz).

| Posição | $\delta_{\text{H}}$                       | $\delta_{\text{C}}$ | HMBC                                |
|---------|---|---------------------|-------------------------------------|
| 1       | 2,83 ( <i>d</i> ; $J = 1,0$ Hz)           | 66,1                | C3; C4; C5; C6; C8; C9; C10;<br>C19 |
| 2       | *   | *                   | -                                   |
| 3       | -   | 197,9               | -                                   |
| 4       | 6,48 ( <i>d</i> ; $J = 1,0$ )             | 126,4               | C1                                  |
| 5       | -   | 176,7               | -                                   |
| 6       | 2,11 ( <i>m</i> )                         | 39,5                | C1; C5                              |
| 7       | 2,05 ( <i>m</i> )                         | 25,5                | C5; C9                              |
| 8       | -   | 86,8                | -                                   |
| 9       | -   | 83,1                | -                                   |
| 10      | -   | 51,0                | -                                   |
| 11      | 2,35 ( <i>m</i> )<br>1,29 ( <i>m</i> )    | 30,7                | C1; C10                             |
| 12      | 1,87 ( <i>m</i> )                         | 37,3                | C13; C14; C18                       |
| 13      | -   | 48,7                | -                                   |
| 14      | -   | 84,7                | -                                   |
| 15      | 1,46 ( <i>m</i> )                         | 36,5                | -                                   |
| 16      | 1,75 ( <i>m</i> )                         | 28,7                | C14                                 |
| 17      | 1,69 ( <i>m</i> )                         | 56,3                | C13; C15; C16; C22                  |
| 18      | 1,06 ( <i>s</i> )                         | 17,7                | C12; C13; C14                       |
| 19      | 1,23 ( <i>s</i> )                         | 22,4                | C1; C8; C10; C11                    |
| 20      | 2,31 ( <i>m</i> )                         | 40,2                | C17; C21; C22                       |
| 21      | 1,03 ( <i>d</i> ; $J = 6,8$ Hz)           | 22,8                | C13; C20; C22                       |
| 22      | 5,39 ( <i>dd</i> ; $J = 15,3$ e $8,2$ Hz) | 135,7               | C20; C21; C23; C24                  |
| 23      | 5,28 ( <i>dd</i> ; $J = 15,3$ e $8,2$ Hz) | 134,2               | C20; C22; C24; C28                  |
| 24      | 1,91 ( <i>m</i> )                         | 44,4                | C22; C25; C26; C27                  |
| 25      | 1,50 ( <i>m</i> )                         | 34,4                | C23; C24; C26; C27                  |
| 26      | 0,87 ( <i>d</i> ; $J = 6,8$ Hz)           | 20,2                | C24; C25; C27                       |
| 27      | 0,85 ( <i>d</i> ; $J = 6,8$ Hz)           | 20,2                | C24; C25; C26                       |
| 28      | 0,96 ( <i>d</i> ; $J = 6,8$ Hz)           | 18,1                | C23; C24; C25                       |

\*Sinal não observado

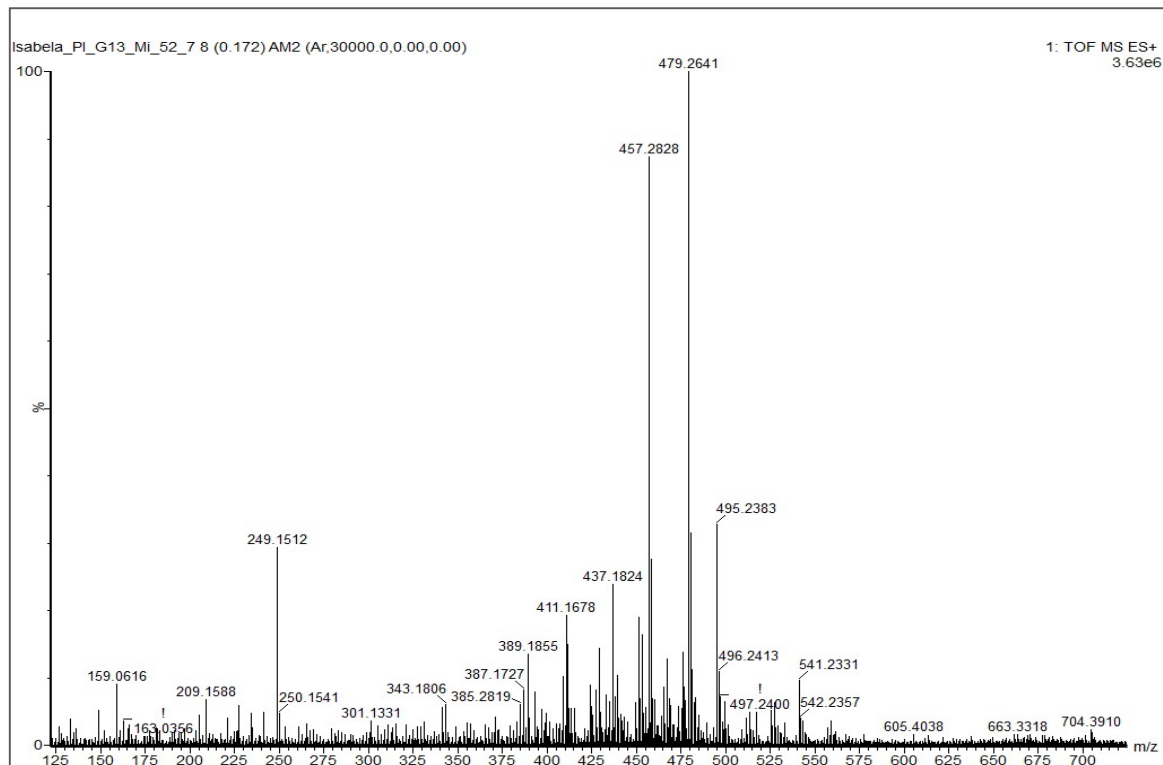
**Figura 79.** Espectro de massas de alta resolução da substância **13** (ESI-Qq-TOF).

Figura 80. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **13** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).

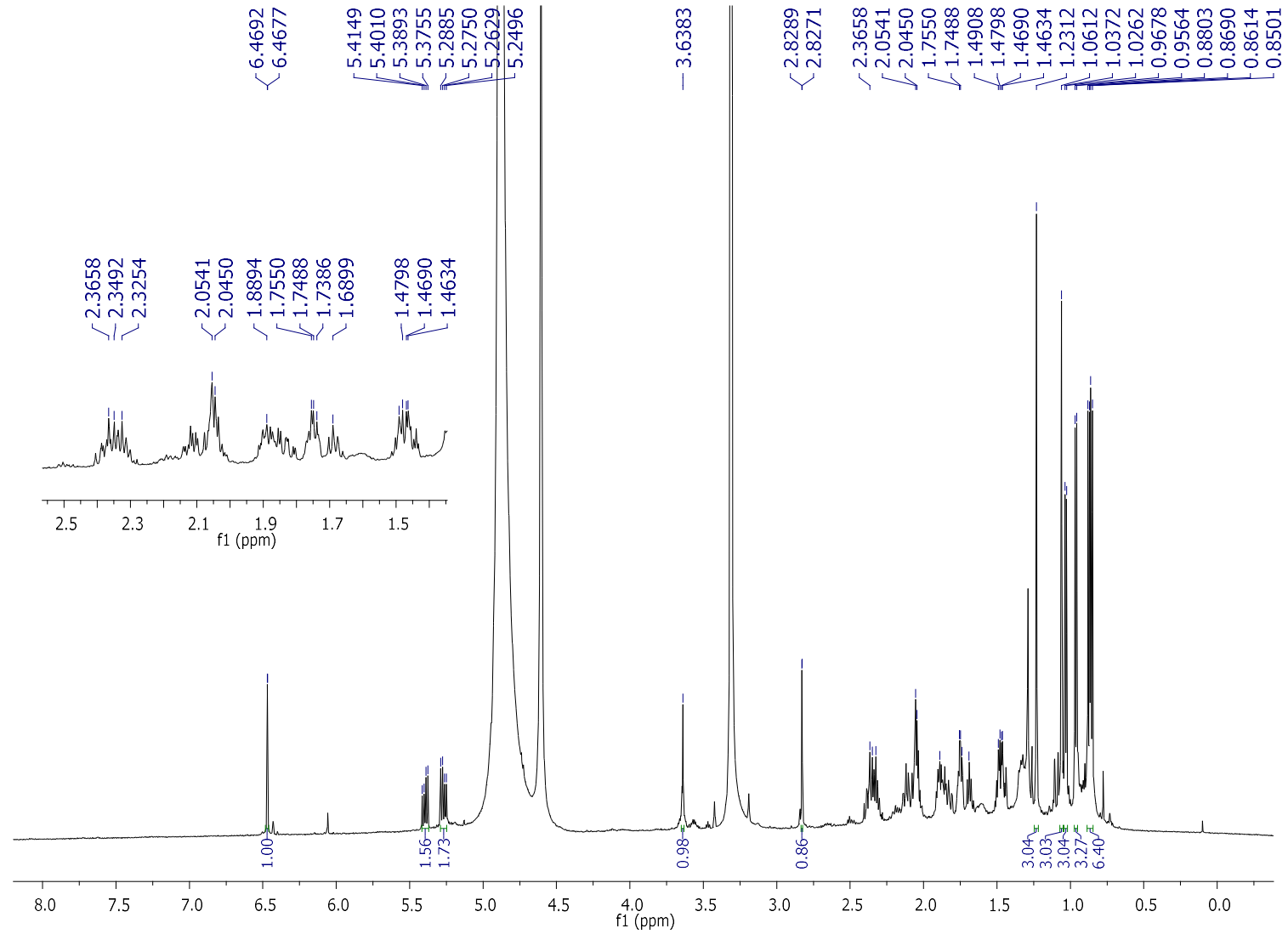


Figura 81. Espectro de DEPTQ da substância **13** (CD<sub>3</sub>OD; 150 MHz).

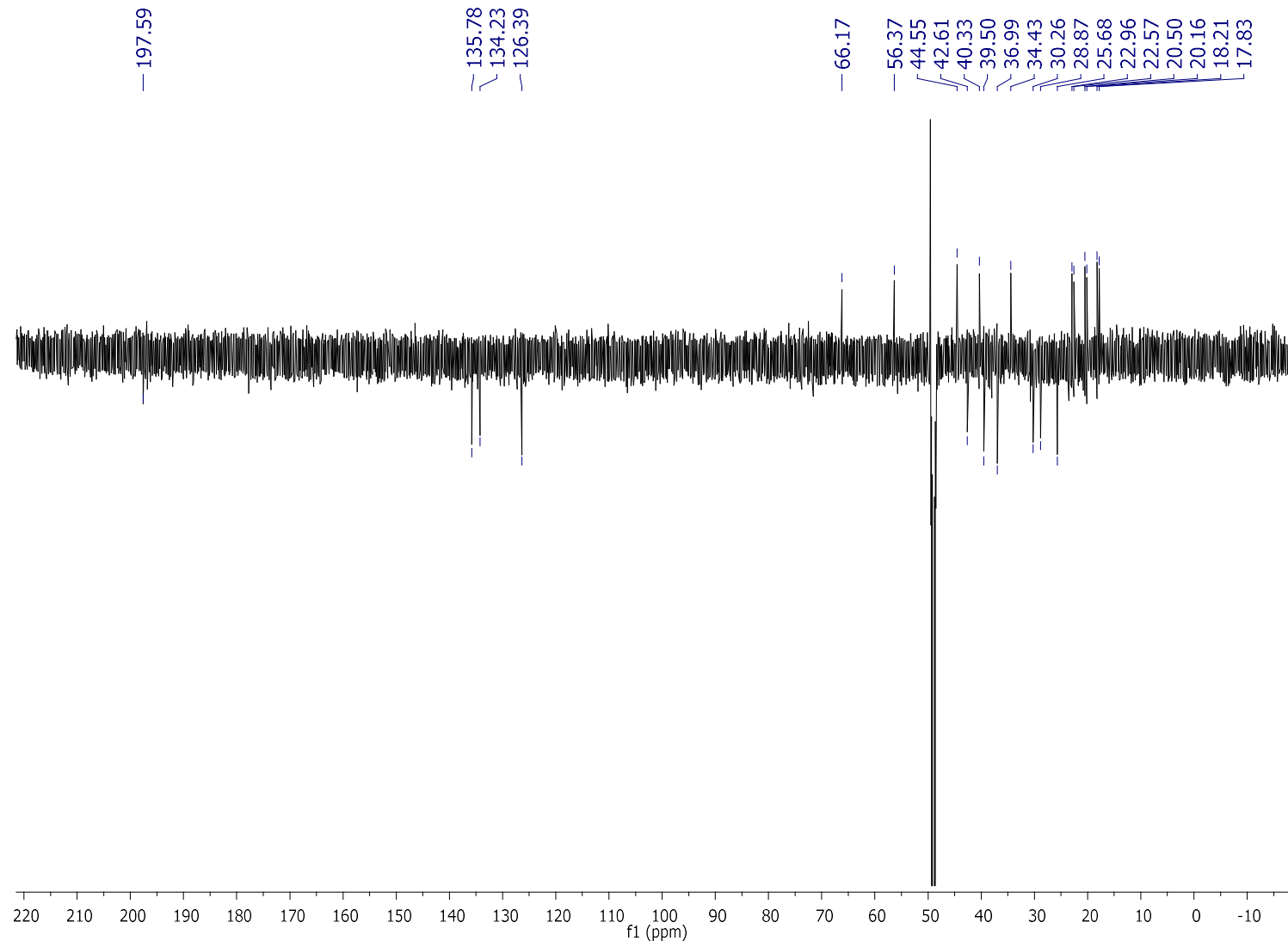


Figura 82. Mapa de contorno HSQC da substância **13** (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).

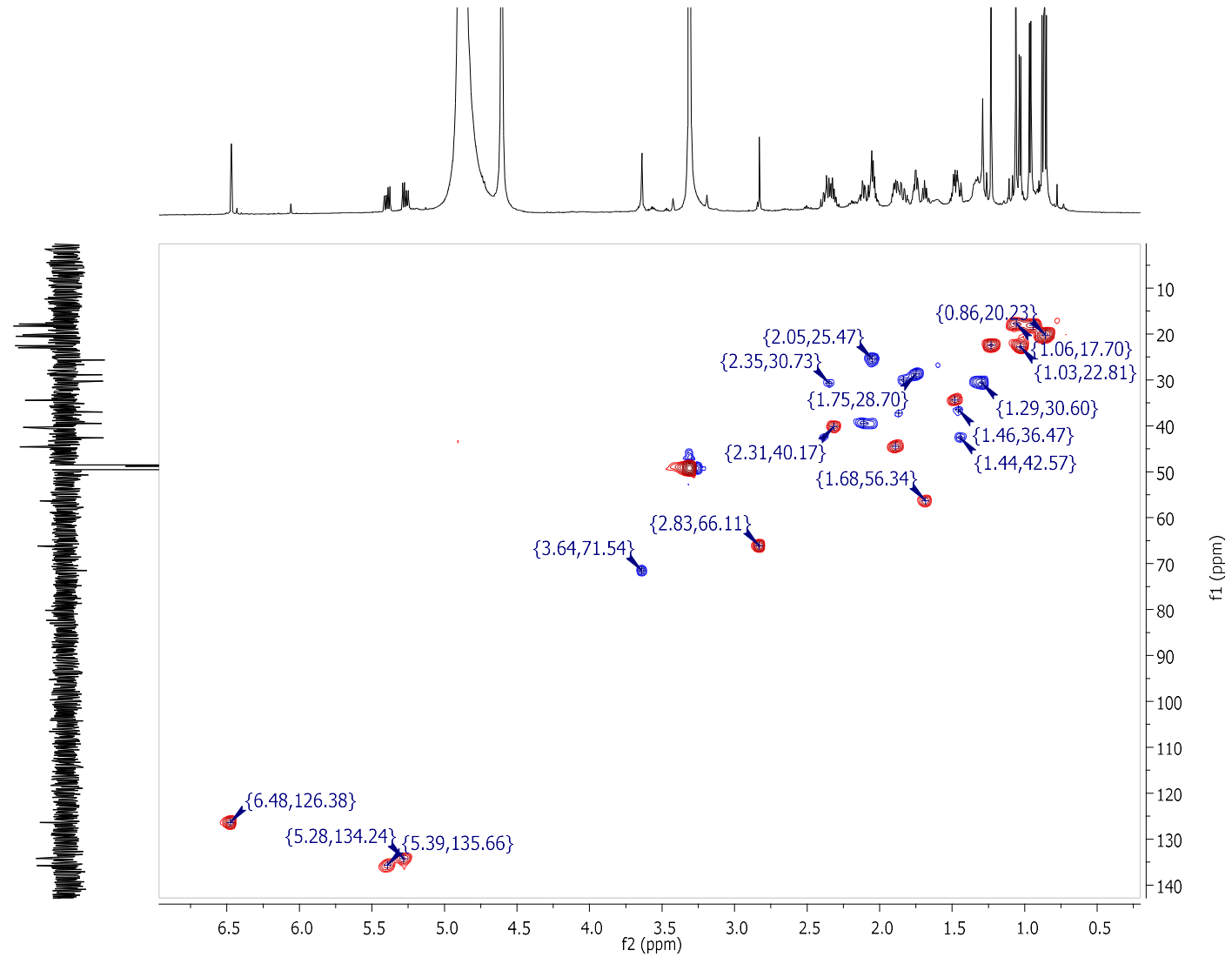


Figura 83. Mapa de contorno HMBC da substância **13** (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).

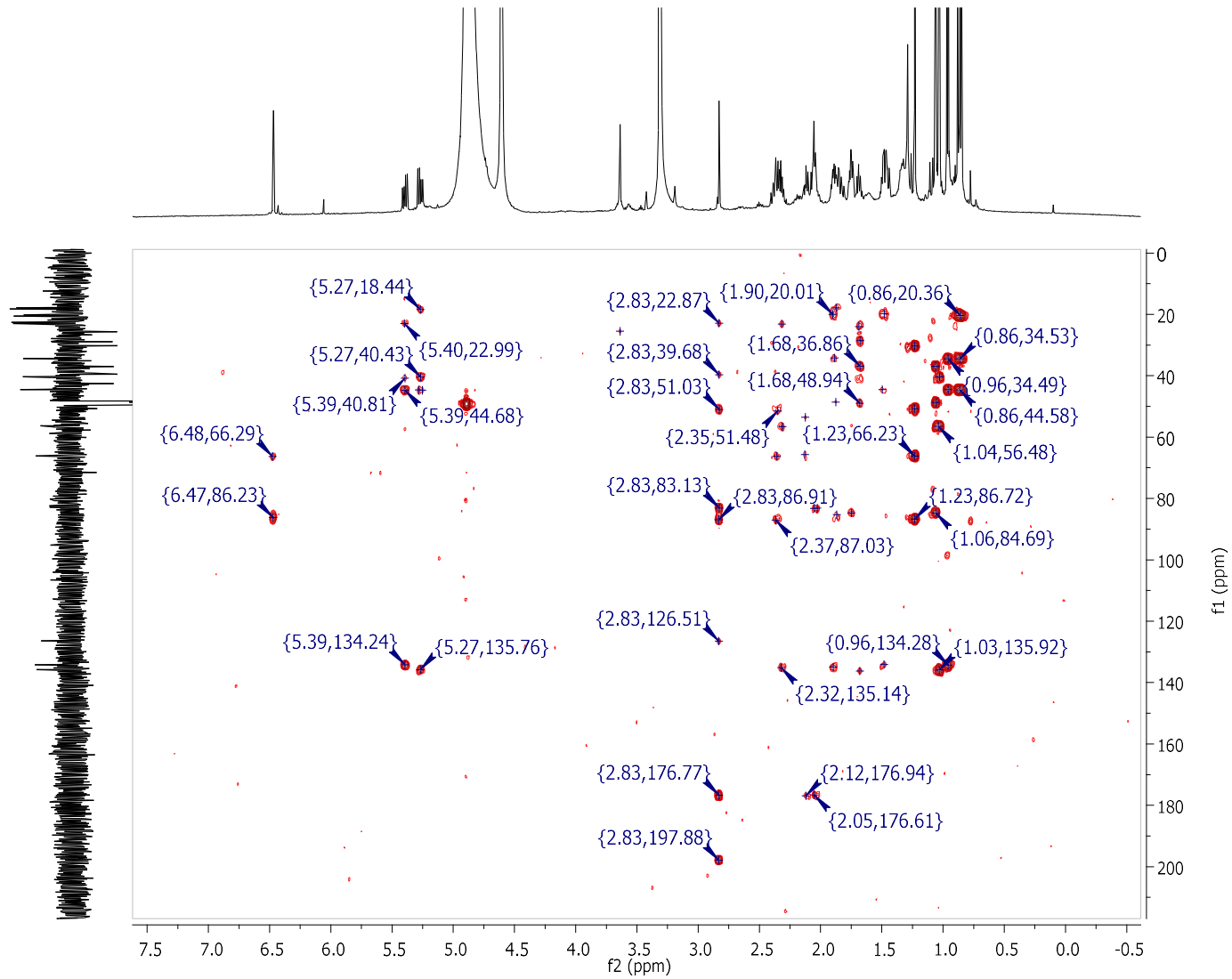
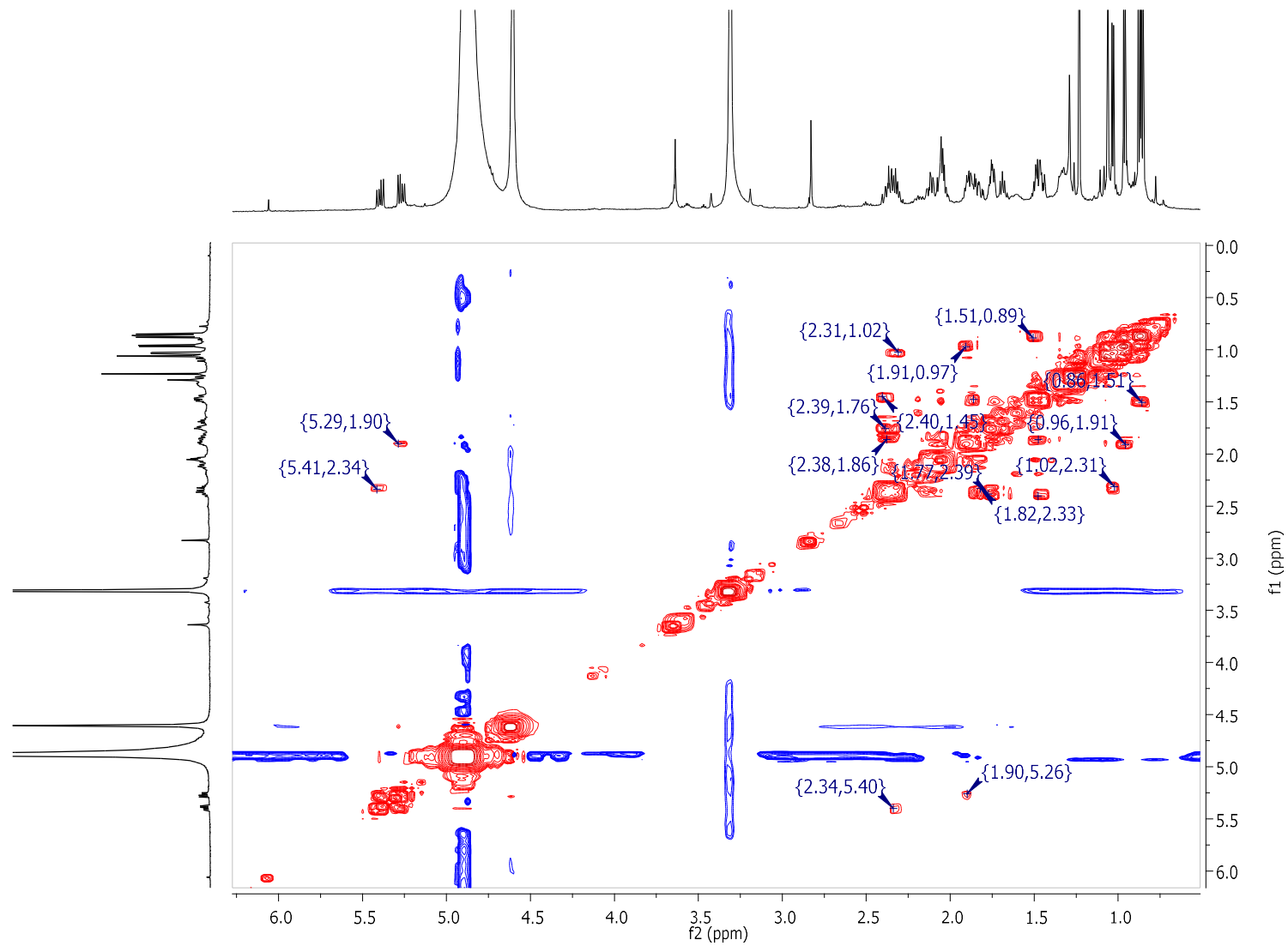
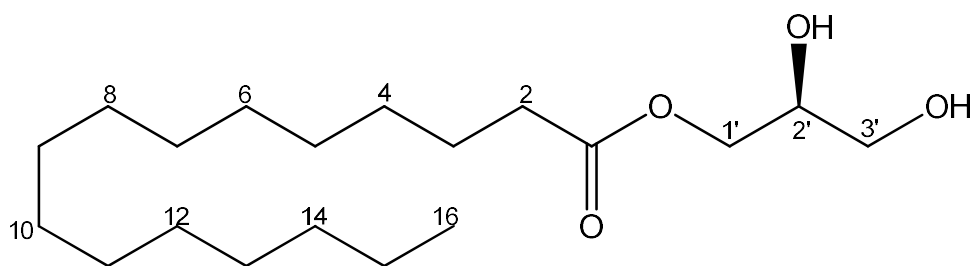


Figura 84. Mapa de contorno COSY da substância **13** (CD<sub>3</sub>OD; 600 MHz).





### 5.2.7 Identificação estrutural da substância **14**



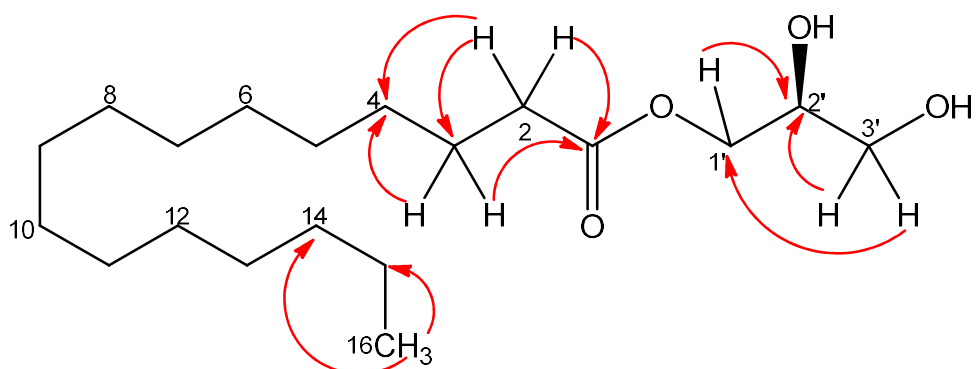
A análise dos dados de espectrometria de massas, ESI-Q-TOF (Figura 87), modo positivo, apresentou para a substância **14** a molécula sodiada  $m/z$  353,2682  $[M+Na]^+$ , que associado aos dados de RMN uni e bidimensionais permitiram propor a fórmula molecular  $C_{19}H_{38}O_4$ .

O espectro de RMN de  $^1H$  (Figura 88) apresentou na região de alifáticos, um sinal largo e intenso ( $\delta_H$  1,29 a 1,31;  $\delta_C$  30,7), integrando para 24 hidrogênios, um tripleto em  $\delta_H$  2,35 (2H;  $J = 7,5$  Hz;  $\delta_C$  35,1), além do sinal em  $\delta_H$  1,62 (2H;  $m$ ;  $\delta_C$  26,1), todos correspondentes a hidrogênios metilênicos, indicando a presença de uma cadeia alifática. A presença de um tripleto em  $\delta_H$  0,90 (3H,  $J = 7,0$ ,  $\delta_C$  14,4, atribuídos a hidrogênios metílicos, aliada as correlações observados em HMBC e COSY (Figuras 85, 86, 91 e 92) permitiram propor um grupo metílico terminal na cadeia.

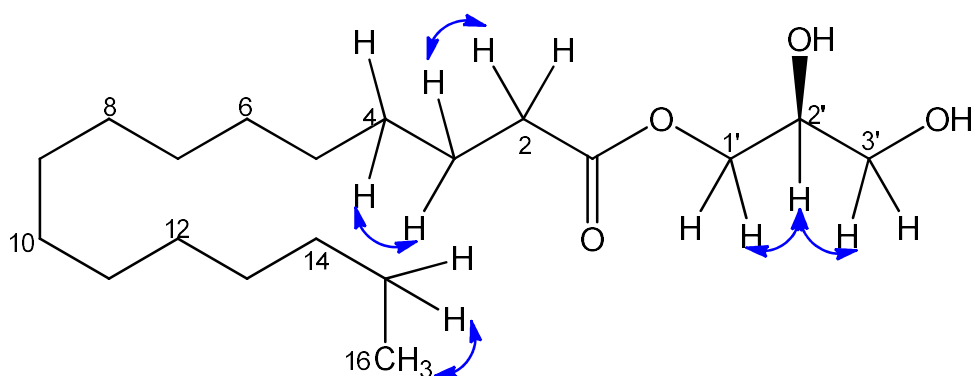
No espectro de DEPTQ (Figura 89), foram visualizados três carbonos  $sp^3$  em  $\delta_C$  64,1; 66,5; 71,2, característicos de hidrogênios carbinólicos, e uma carbonila em  $\delta_C$  175,6, atribuída a um grupo éster. Além de sinais em uma faixa de  $\delta_C$  23,7 a 35,1, correspondentes a carbonos metilênicos.

No espectro de RMN de  $^1H$  foram observados ainda duplos dupletos em  $\delta_H$  3,54 (1H;  $J = 11,3$  e 5,8 Hz; H-3'a;  $\delta_C$  64,1), 3,56 (1H;  $J = 11,3$  e 5,4 Hz; H-3'b;  $\delta_C$  64,1), 4,06 (1H;  $J = 11,3$  e 6,3 Hz; H-1'a;  $\delta_C$  66,5) e 4,15 (1H;  $J = 11,3$  e 4,3 Hz; H-1'b;  $\delta_C$  66,5), referentes a hidrogênios metilênicos, e um sinal em  $\delta_H$  3,82 (1H;  $m$ ;  $\delta_C$  71,2) correspondente a hidrogênio metínico. Estes dados aliados às informações obtidas pelas correlações observadas no mapa de contorno HMBC (Figura 85 e 91), permitiram sugerir a presença de uma porção de glicerol na molécula.

**Figura 85.** Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC da substância **14**.



**Figura 86.** Principais correlações observadas no mapa de contorno COSY da substância **14**.



A comparação dos dados espectrais obtidos (Tabela 15) com os descritos na literatura (RAHMAN et al., 2008), permitiu identificar a substância **14** como hexadecanoato de 2,3-dihidroxiopropila.

Esta substância já foi isolada das espécies vegetais *Rhazya stricta* e *Murraya tetramera* Huang e produzida pelos fungos endofíticos *Mycoleptodiscus* sp. e *Annulohyphoxylon elevatidiscus* (CHANG et al., 2018a; CHENG et al., 2015; YOU et al., 2017; RAHMAN et al., 2008). Um estudo realizado por You et al., 2017, mostrou que esta substância apresentou atividade repelente significativa contra *Tribolium castaneum*, principal praga de alimentos armazenados, como grãos, sendo considerada uma substância com potencial para o desenvolvimento de repelentes naturais.

**Tabela 15.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC e COSY ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 150 MHz) de **14** ( $\delta$  em ppm e  $J$  em Hz).

| Posição     | $\delta_{\text{H}}$                 | $\delta_{\text{C}}$ | HMBC         | COSY                       |
|-------------|-------------------------------------|---------------------|--------------|----------------------------|
| <b>1</b>    | -                                   | 175,6               | -            | -                          |
| <b>2</b>    | 2,35 ( <i>t</i> ; $J = 7,5$ )       | 35,1                | C1; C3; C4   | H-3                        |
| <b>3</b>    | 1,62 ( <i>m</i> )                   | 26,1                | C1; C2; C4   | H-2; H-4                   |
| <b>4-13</b> | 1,29-1,31 ( <i>m</i> )              | 30,2 -<br>30,8      | *            | *                          |
| <b>14</b>   | 1,29-1,31 ( <i>m</i> )              | 33,1                | *            | *                          |
| <b>15</b>   | 1,29-1,31 ( <i>m</i> )              | 23,7                | *            | H-16                       |
| <b>16</b>   | 0,90 ( <i>t</i> ; $J = 7,0$ Hz)     | 14,4                | C14; C15     | H-15                       |
| <b>1'a</b>  | 4,06 (dd; $J = 11,3$ e<br>6,3 Hz)   | 66,5                | C1; C2'; C3' | H-2'                       |
| <b>1'b</b>  | 4,15 (dd; ( $J = 11,3$<br>e 4,3 Hz) |                     | C1; C2'; C3' | H-2'                       |
| <b>2'</b>   | 3,82 ( <i>m</i> )                   | 71,2                | *            | H-1'a; H-1'b; H-3'a; H-3'b |
| <b>3'a</b>  | 3,54 (dd; $J = 11,3$ e<br>5,8 Hz)   | 64,1                | C1'          | H-2'                       |
| <b>3'b</b>  | 3,56 (dd; $J = 11,3$ e<br>5,4 Hz)   |                     | C2'          | H-2'                       |

\*Sinal não observado

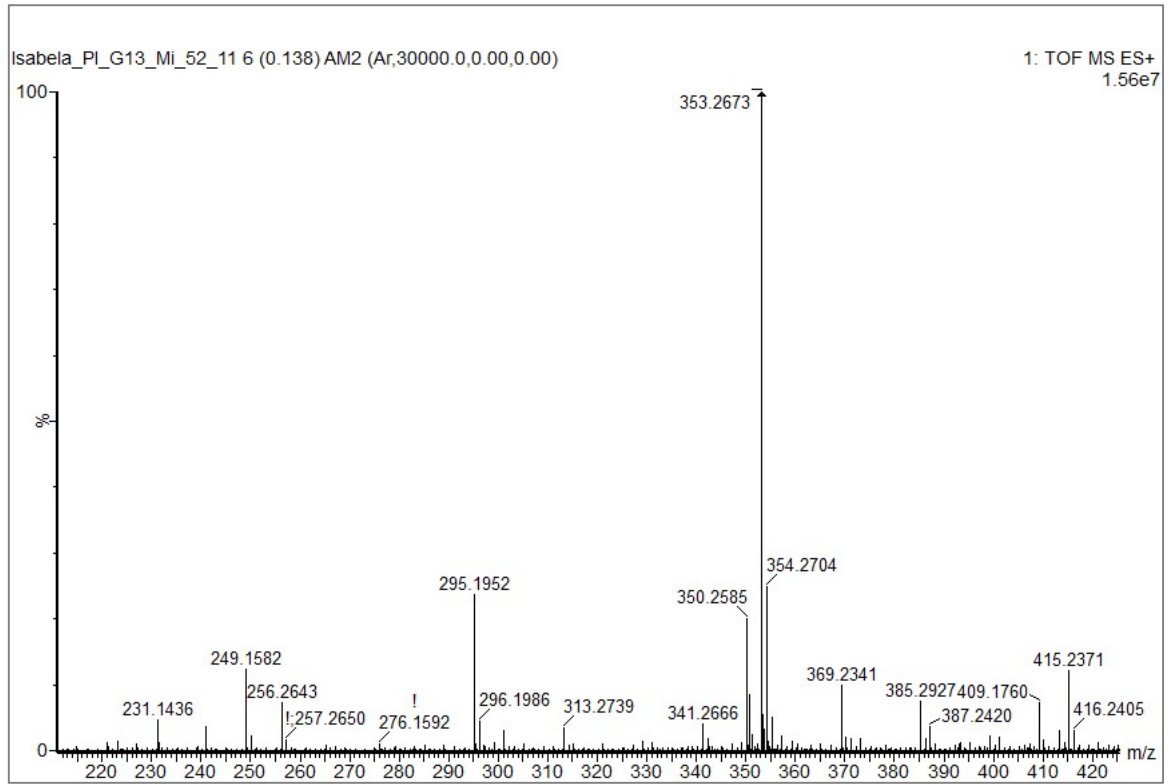
**Figura 87.** Espectro de massas de alta resolução da substância **14** (ESI-Qq-TOF).

Figura 88. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **14** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).

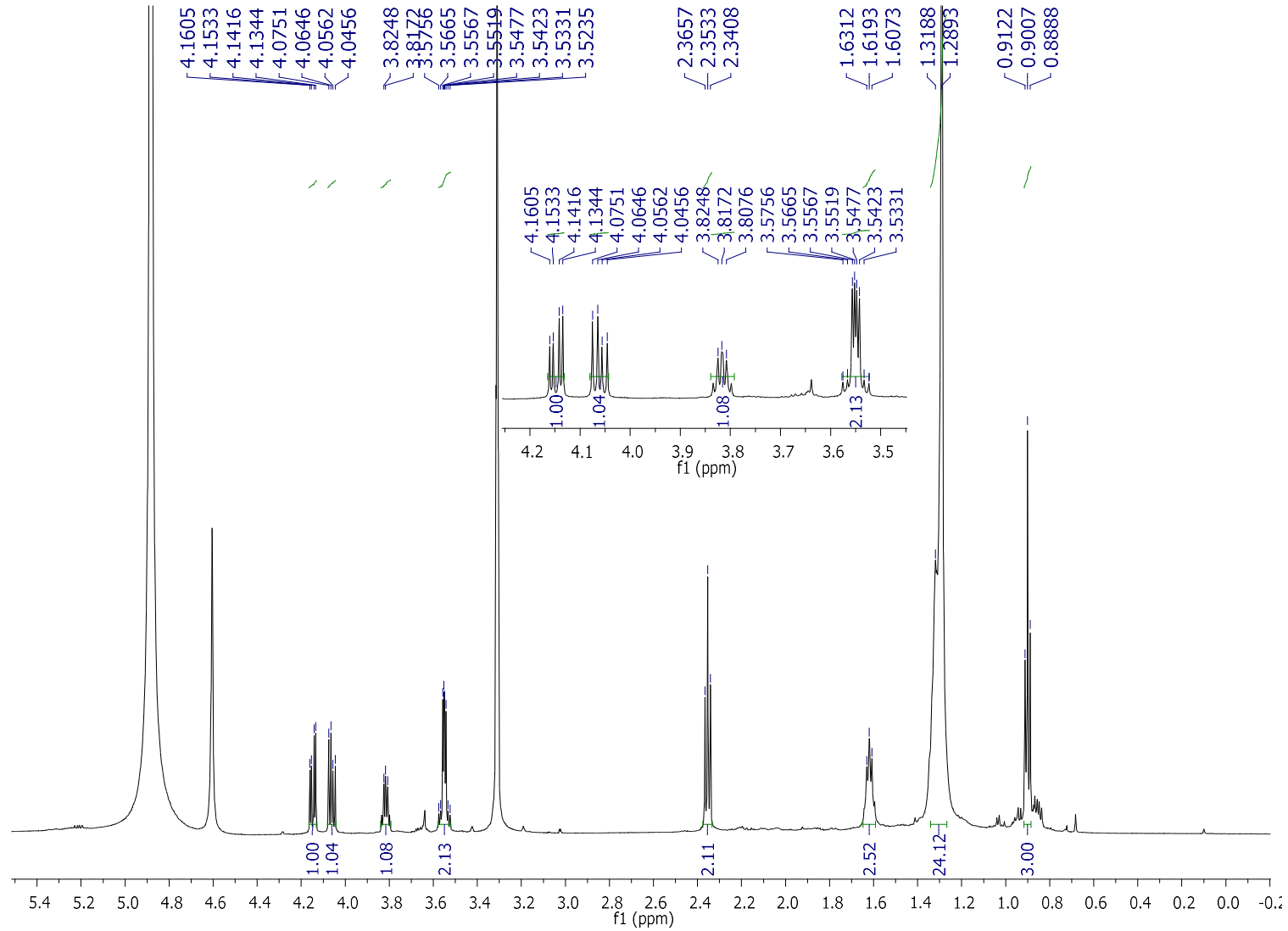


Figura 89. Espectro de DEPTQ da substância **14** (CD<sub>3</sub>OD; 150 MHz).

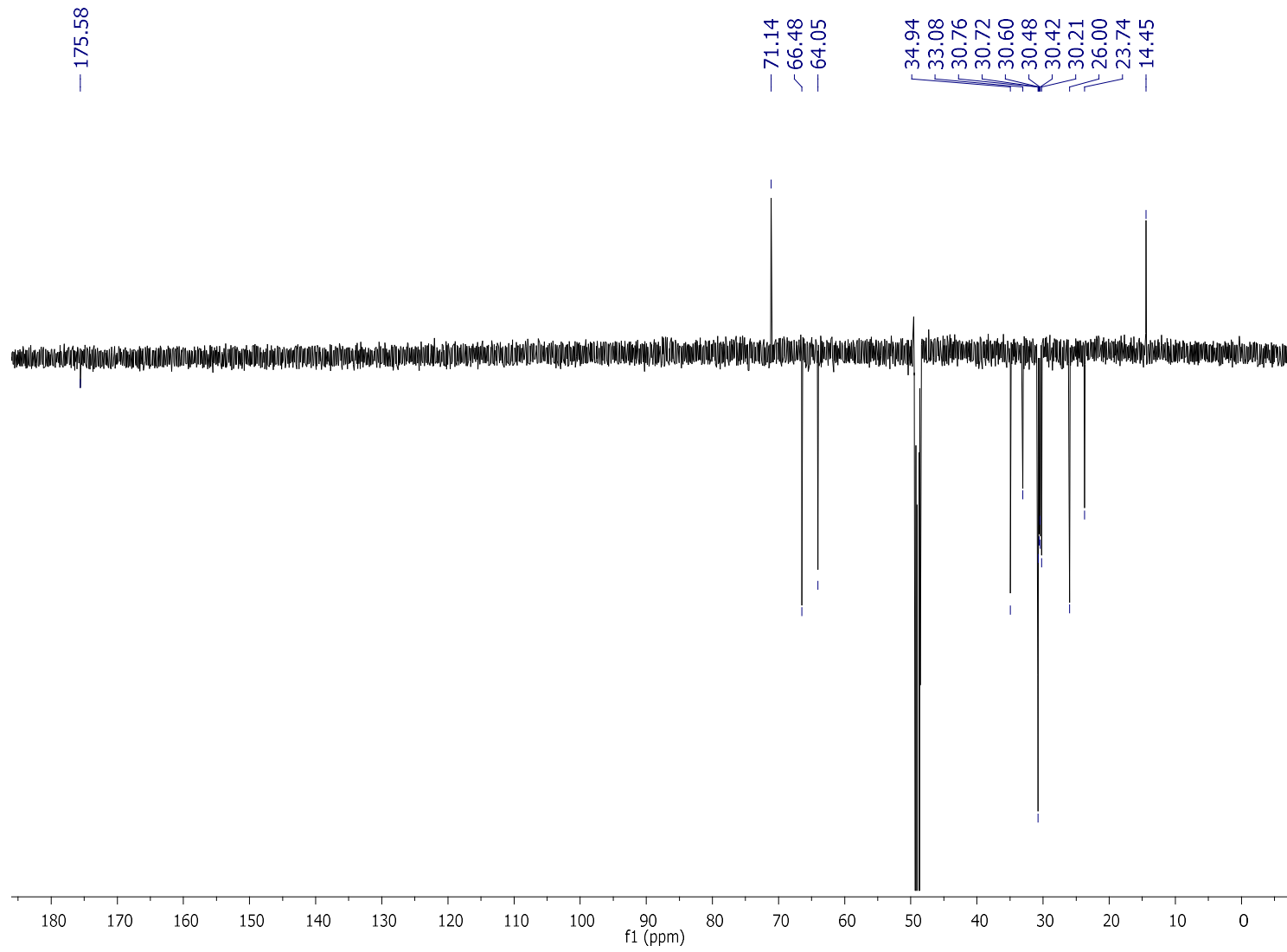


Figura 90. Mapa de contorno HSQC da substância **14** (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).

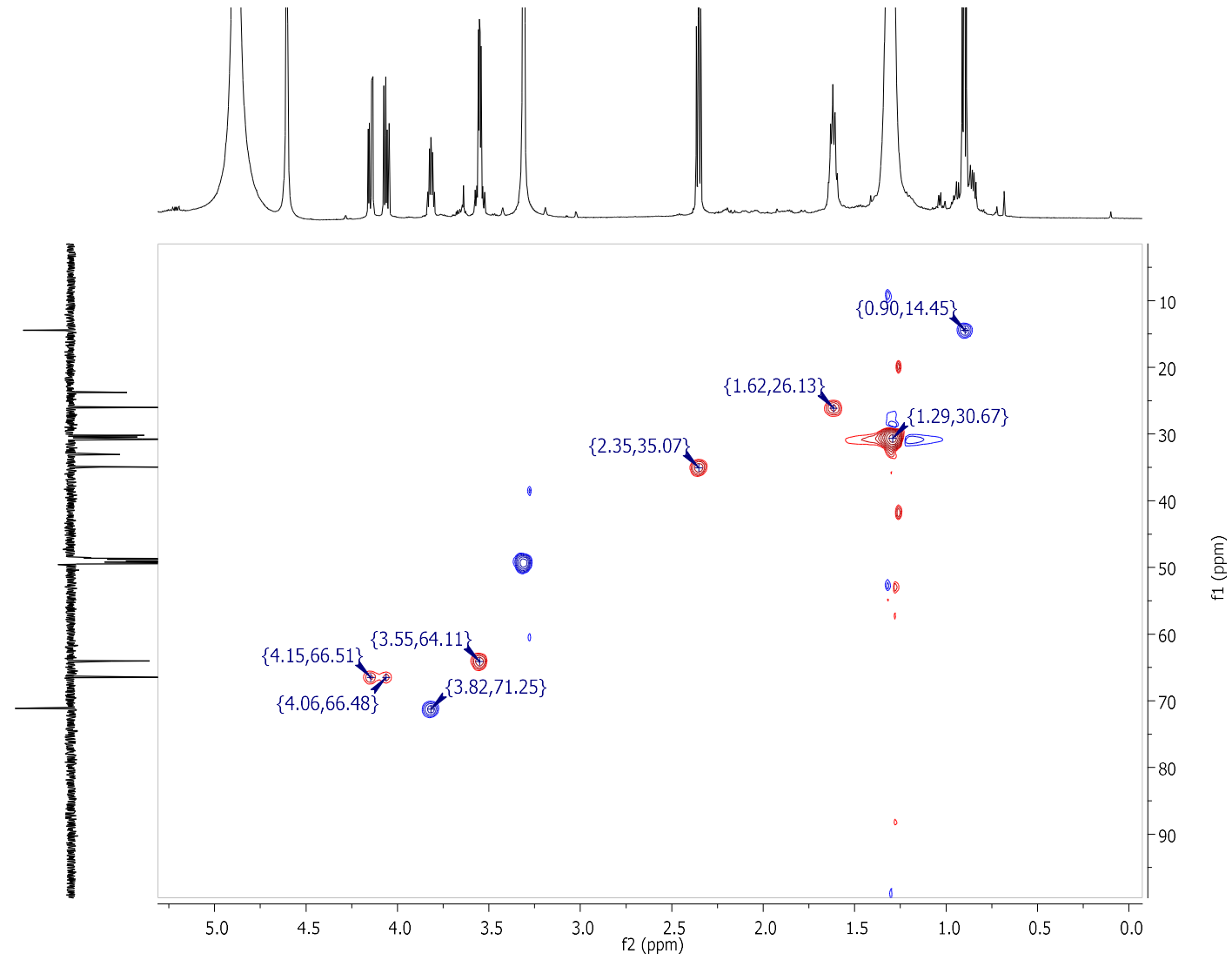


Figura 91. Mapa de contorno HMBC da substância **14** (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).

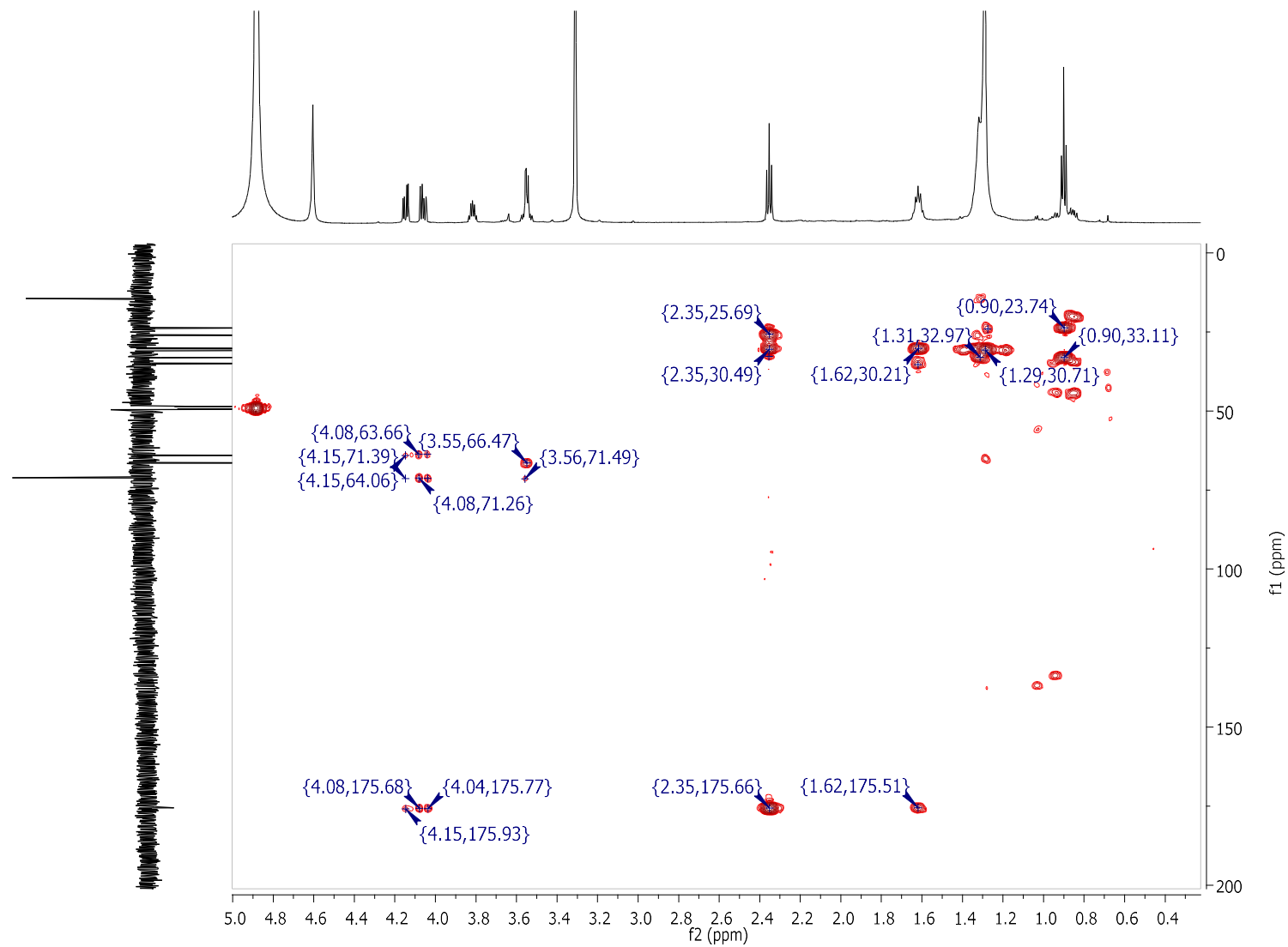
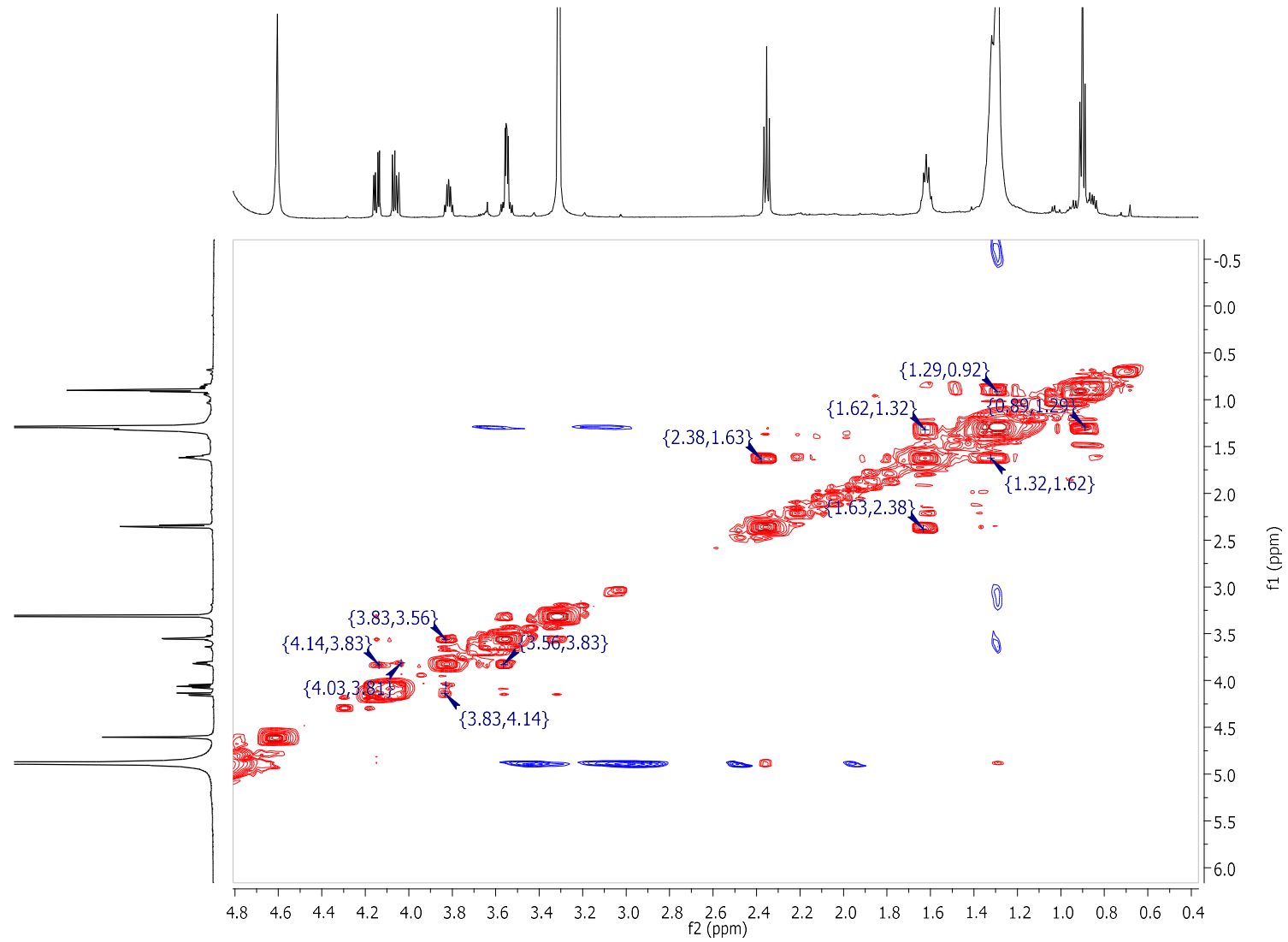


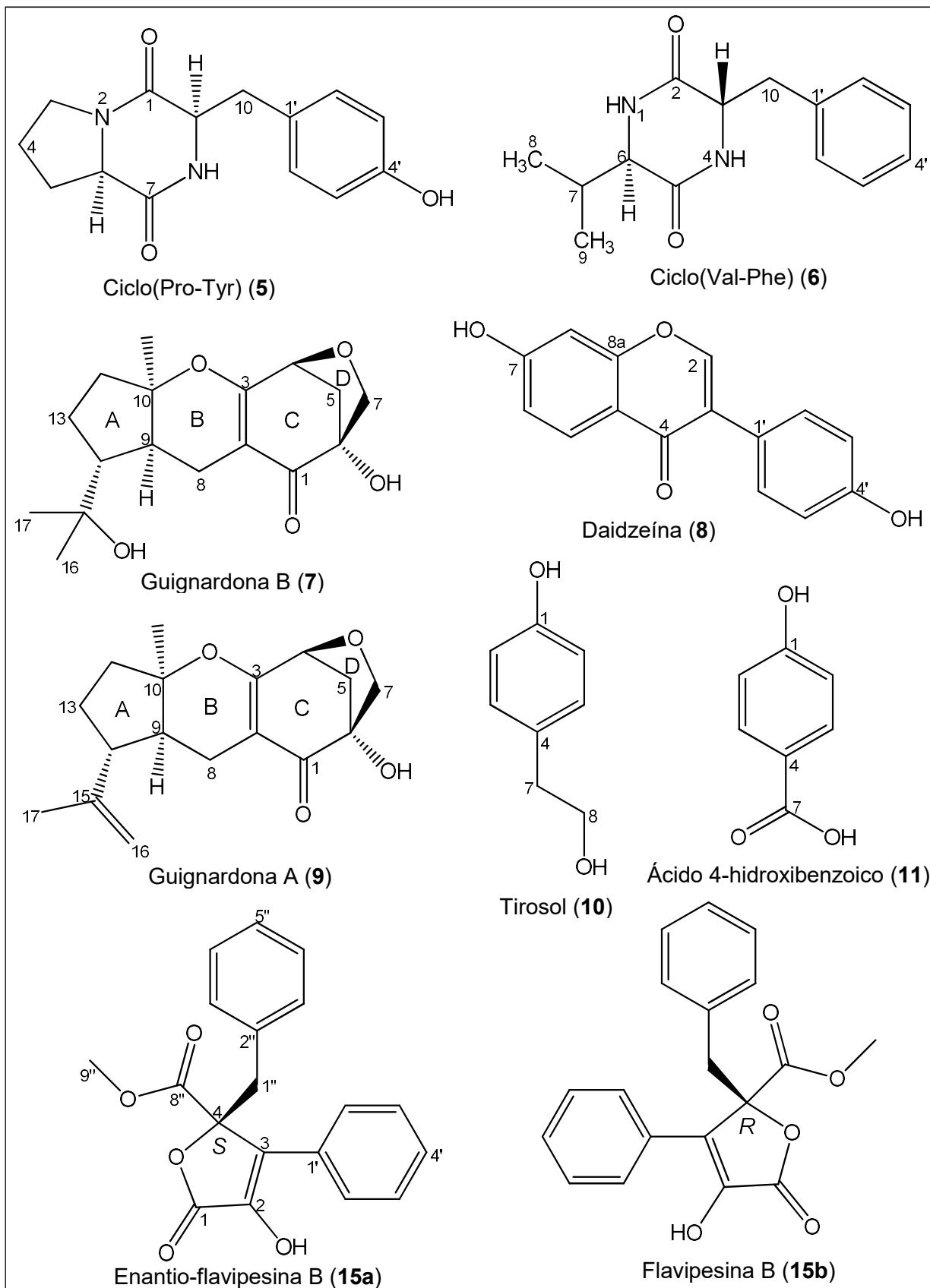


Figura 92. Mapa de contorno COSY da substância **14** (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).

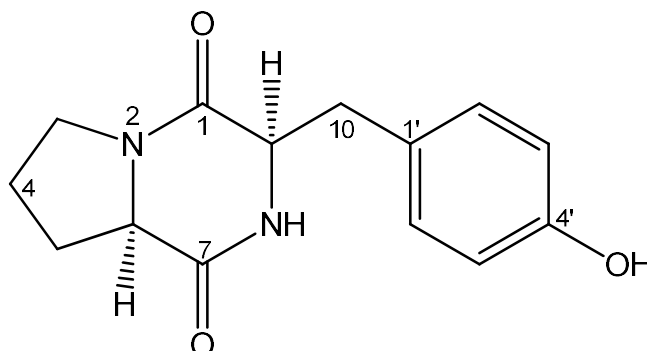


### 5.3 Identificação estrutural das substâncias produzidas por *P. elongata*

**Figura 93.** Substâncias produzidas por *P. elongata* cultivado em MDB e milho.



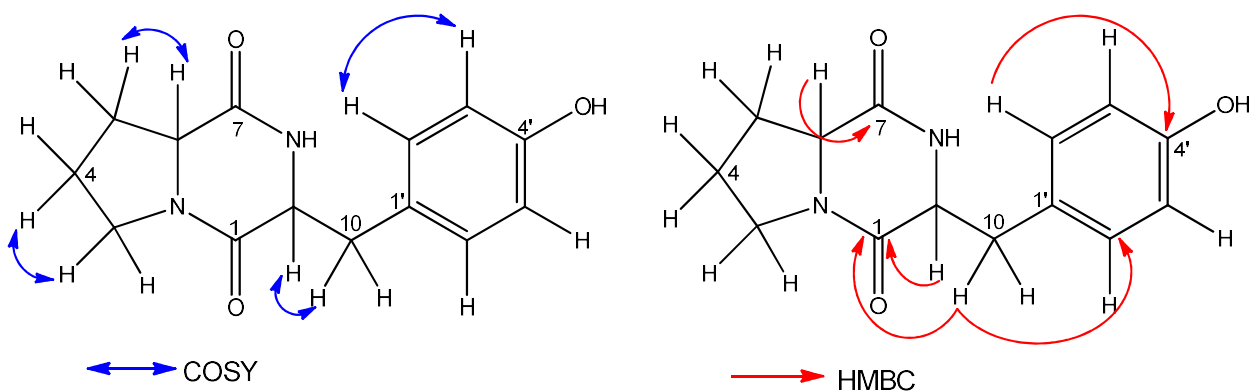
### 5.3.1 Identificação estrutural da substância 5



O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 95) da substância **5** apresentou perfil espectroscópico semelhante ao da substância **1**, sendo que a única diferença observada foi a substituição do anel aromático. Foram visualizados dois dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,03 ( $d$ ; 2H;  $J = 8,5$  Hz; H-2' e H-6') e 6,70 ( $d$ ; 2H;  $J = 8,5$  Hz; H-3' e H-5') evidenciando um sistema típico de anel aromático *para*-dissubstituído, que sugeriu a presença do aminoácido tirosina, ao invés do aminoácido fenilalanina como em **1**. A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e dos mapas de contorno HSQC (Figura 97) e HMBC (Figura 98) permitiu identificar os sinais de hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  4,04 ( $ddd$ ; 1H;  $J = 10,8; 6,3; 1,8$  Hz; H-6) e  $\delta_{\text{H}}$  4,36 ( $m$ , 1H; H-9) e duas carbonilas  $\delta_{\text{C}}$  166,9 e  $\delta_{\text{C}}$  170,8, característico de anel dicetopiperazínico. As principais correlações de COSY e HMBC, que confirmaram a estrutura proposta, estão apresentadas na Tabela 16 e Figura 94.

Os dados espectrais obtidos (Tabela 16) foram comparados com a literatura (WANG et al., 2010; CAFÊU, 2007) e permitiram identificar a substância **5** como ciclo(Pro-Tyr).

**Figura 94.** Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC da substância **5**.

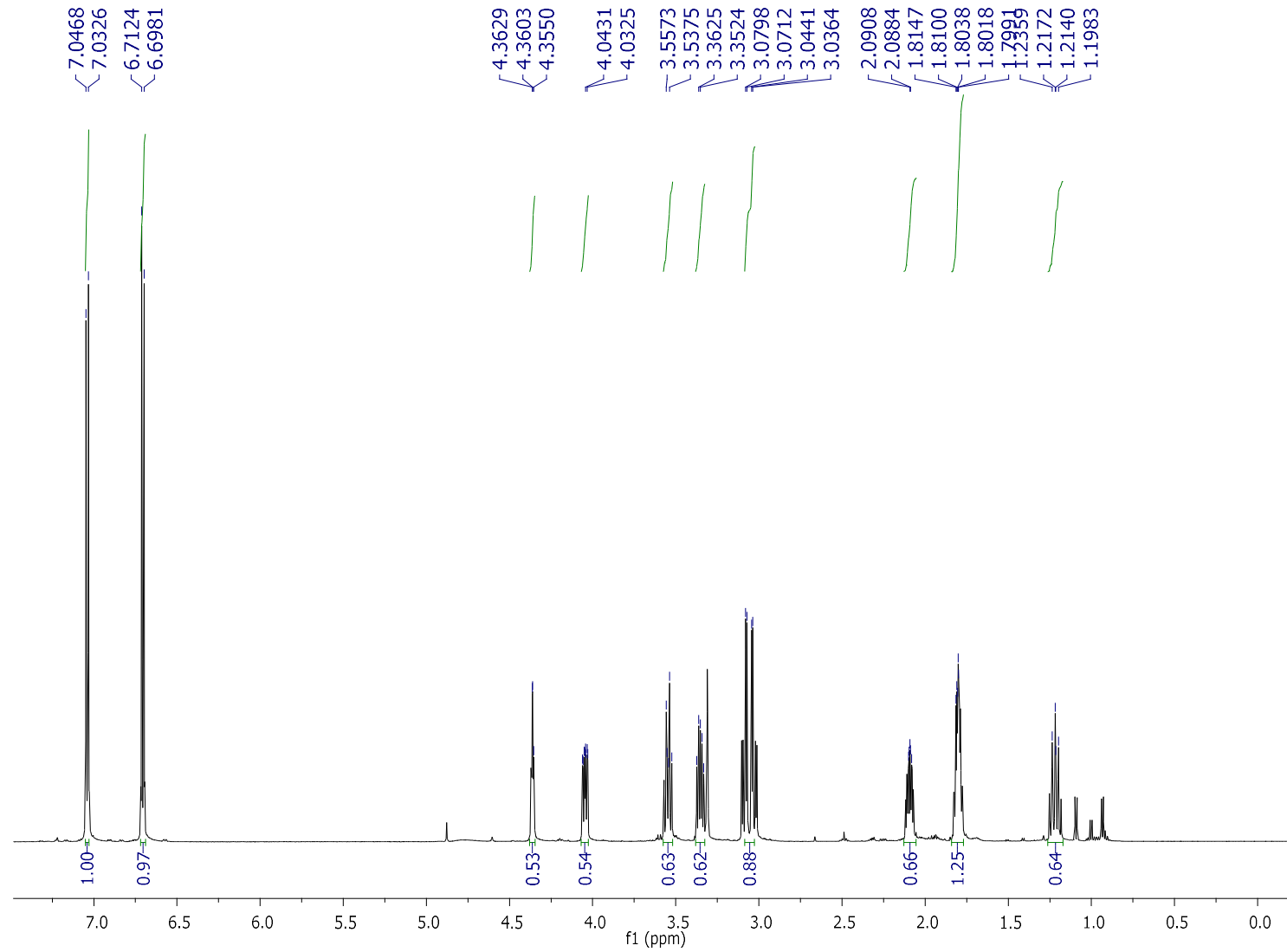


**Tabela 16.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC e COSY ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 150 MHz) de **5** ( $\delta$  em ppm e  $J$  em Hz).

| Posição        | $\delta_{\text{H}}$                               | $\delta_{\text{C}}$ | HMBC             | COSY     |
|----------------|---|---------------------|------------------|----------|
| <b>1</b>       | -   | 166,9               | -                | -        |
| <b>2</b>       | *   | -                   | *                | *        |
| <b>3</b>       | 3,35; 3,54 ( <i>m</i> )                           | 45,5                | C4; C5; C6       | H-4      |
| <b>4</b>       | 1,79 ( <i>m</i> )                                 | 22,7                | C3; C5           | H-3; H-5 |
| <b>5</b>       | 1,21 ( <i>m</i> )                                 | 29,3                | C4; C6; C7       | H-4      |
|                | 2,09 ( <i>m</i> )                                 |                     | C3               | H-6      |
| <b>6</b>       | 4,04 ( <i>ddd</i> ; $J = 10,8$ ;<br>6,3 e 1,8 Hz) | 59,8                | C5; C7           | H-5      |
| <b>7</b>       | -   | 170,8               | -                | -        |
| <b>8</b>       | *   | -                   | *                | *        |
| <b>9</b>       | 4,36 ( <i>m</i> )                                 | 57,8                | C1; C10; C1'     | H-10     |
| <b>10</b>      | 3,05 ( <i>m</i> )                                 | 37,7                | C1; C9; C1'; C2' | H-9      |
| <b>1'</b>      | -   | 127,6               | -                | -        |
| <b>2' e 6'</b> | 7,03 ( <i>d</i> ; $J = 8,5$ Hz)                   | 132,1               | C10; C4'         | H-3'     |
| <b>3' e 5'</b> | 6,70 ( <i>d</i> ; $J = 8,5$ Hz)                   | 116,2               | C1'; C4'         | H-2'     |
| <b>4'</b>      | -   | 157,6               | -                | -        |

\*Sinal não observado

Figura 95. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **5** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).



**Figura 96.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **5** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).

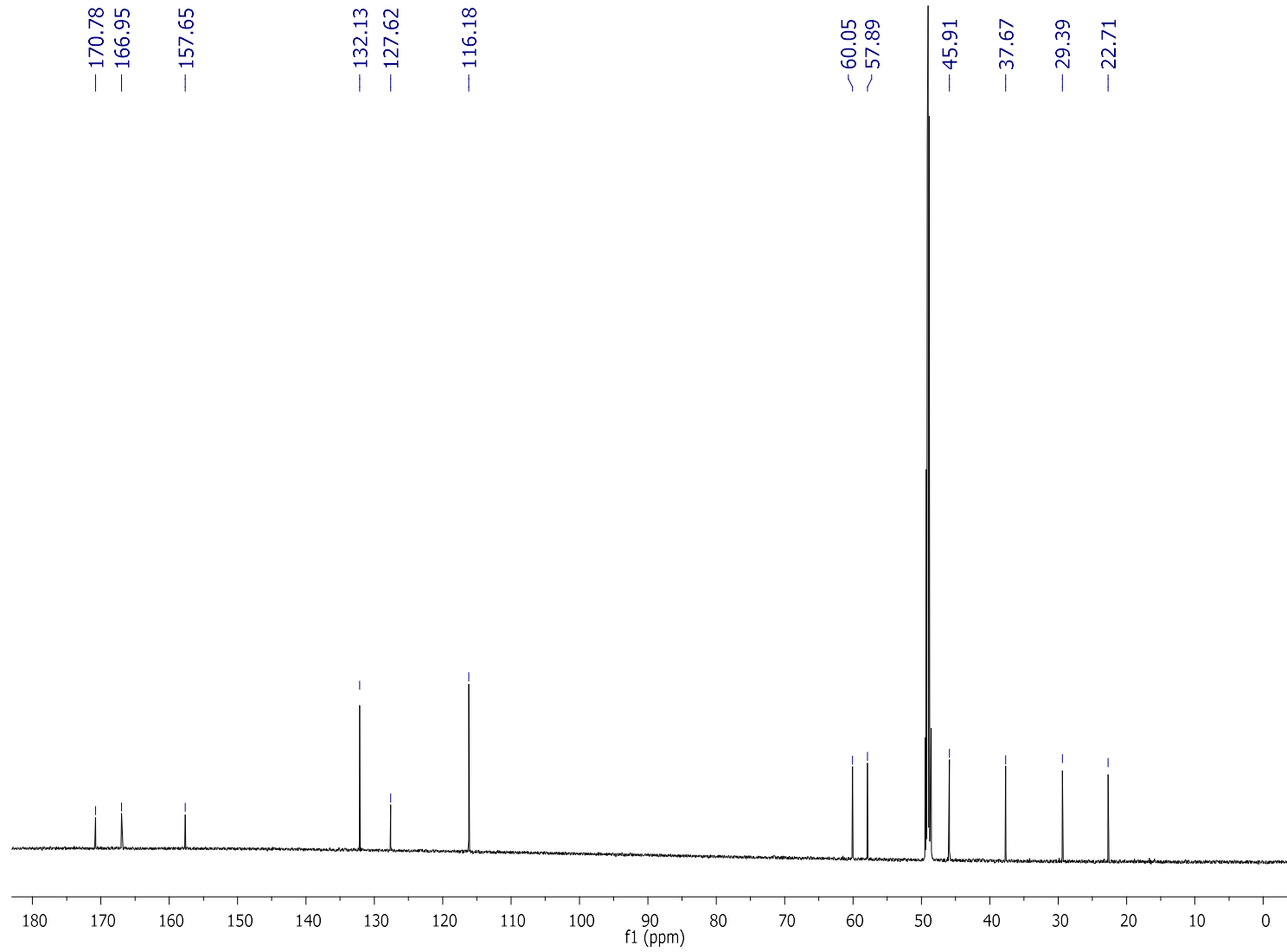
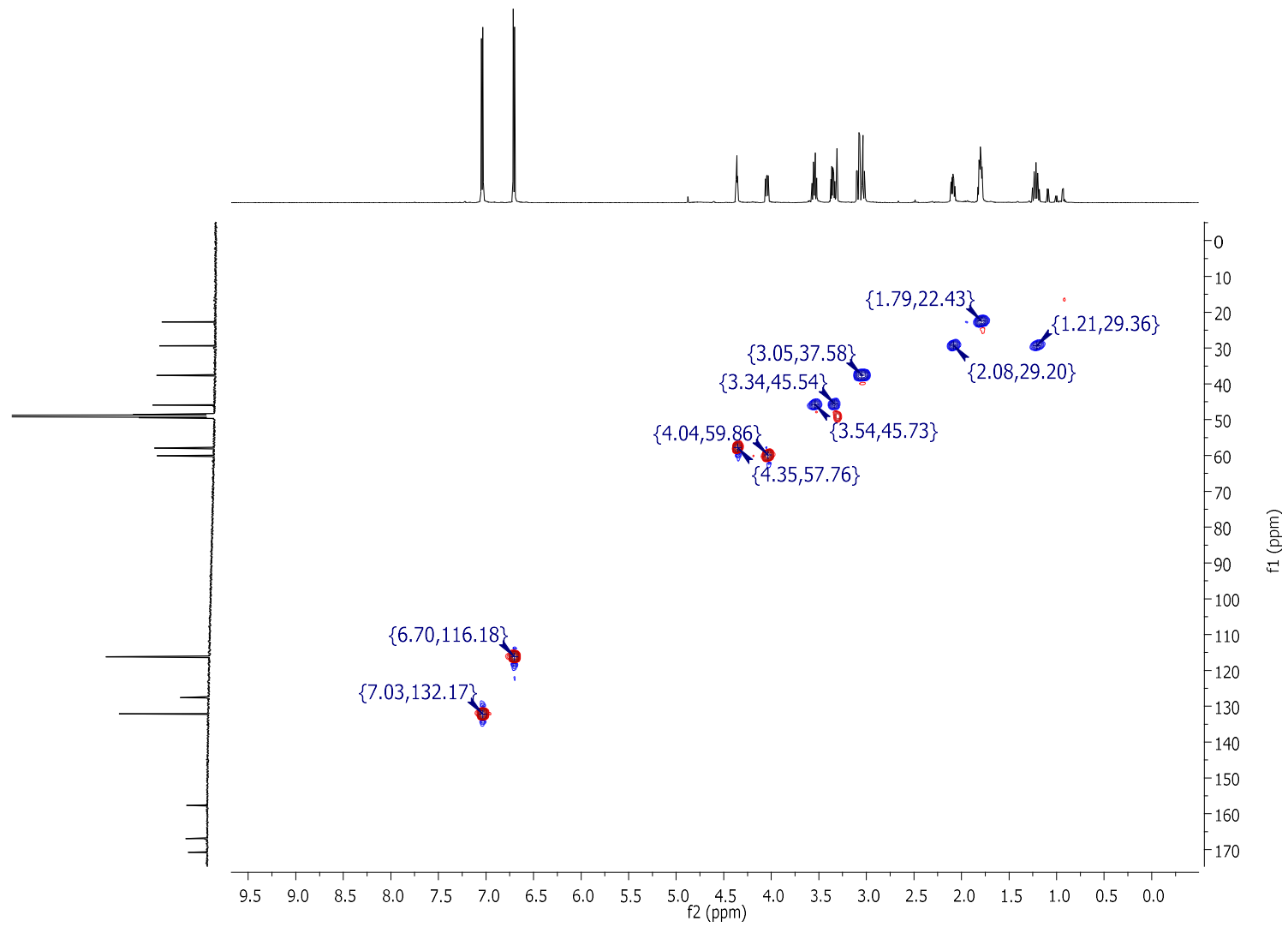


Figura 97. Mapa de contorno HSQC da substância **5** (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).



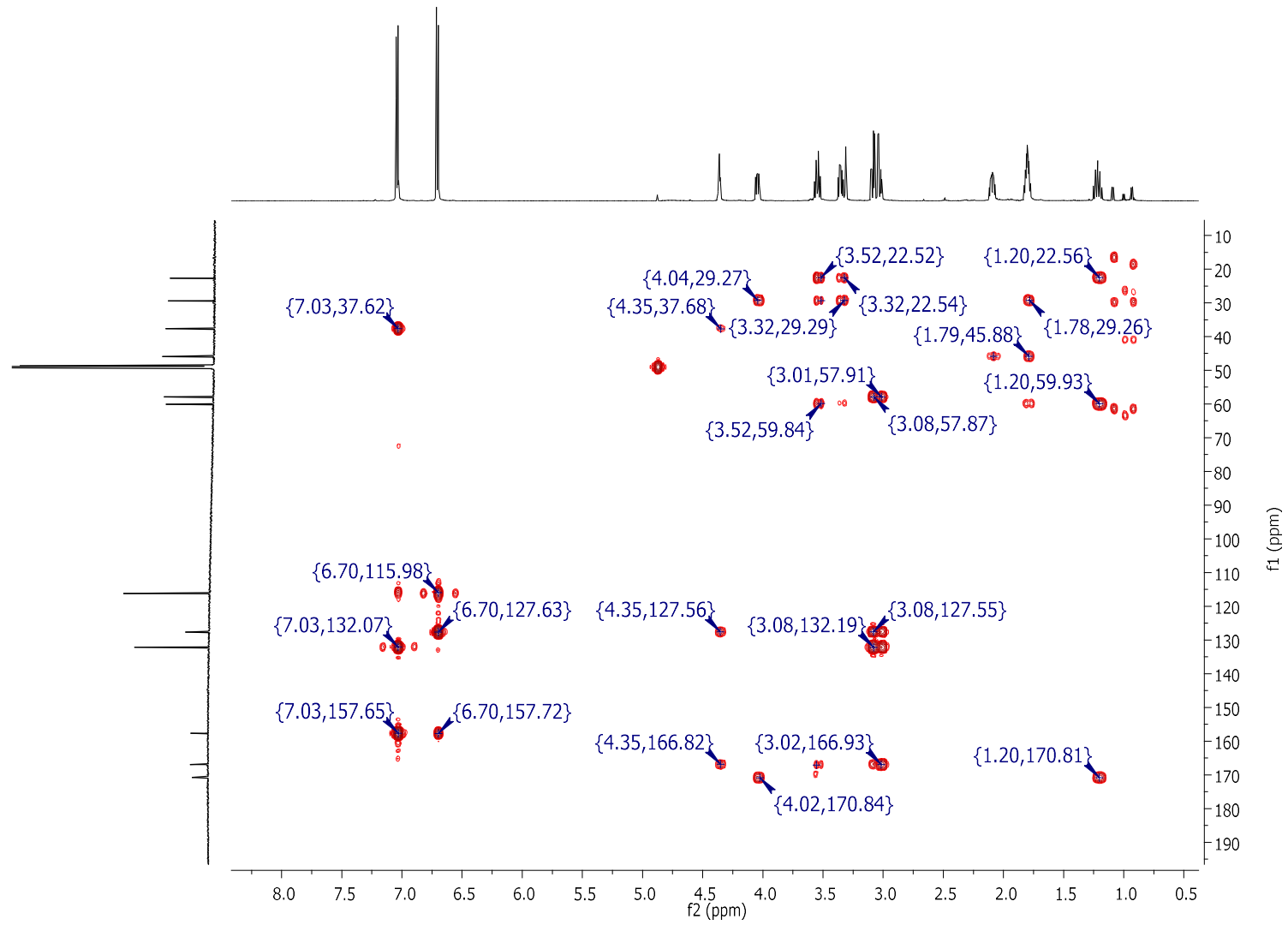
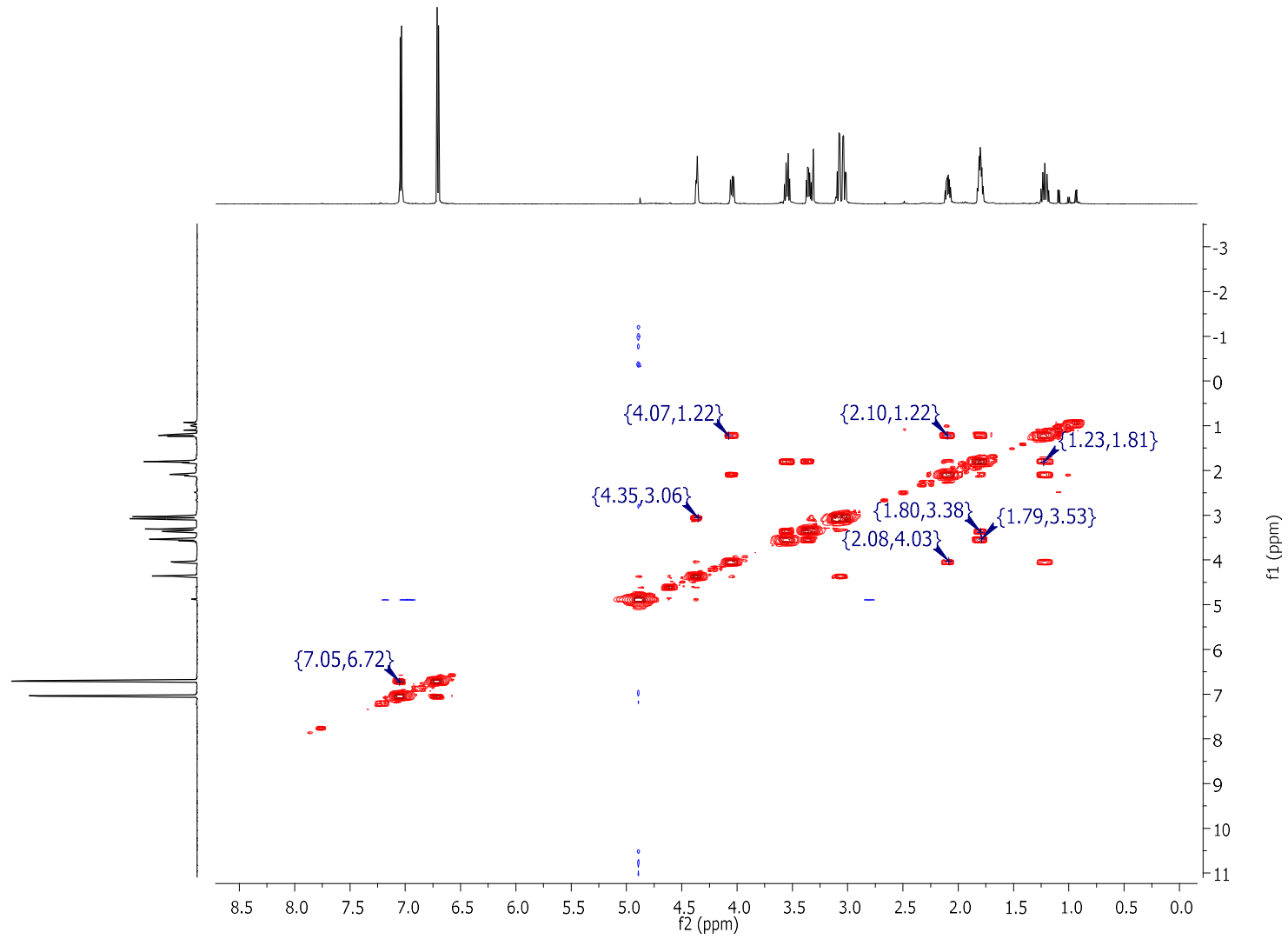
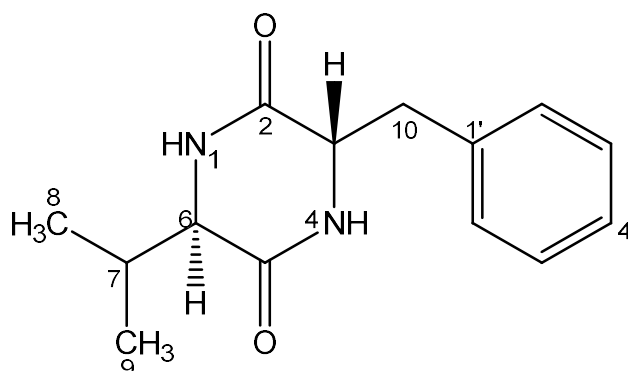
**Figura 98.** Mapa de contorno HMBC da substância **5** (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).



Figura 99. Mapa de contorno COSY da substância **5** (CD<sub>3</sub>OD; 600 MHz).



### 5.3.2 Identificação estrutural da substância 6



Os dados obtidos por ESI-EM (Figura 101), modo positivo, evidenciaram a molécula protonada  $m/z$  247,07  $[M+H]^+$  e a formação da molécula sodiada  $m/z$  269,09  $[M+Na]^+$ , o que associado aos dados de RMN permitiram propor a fórmula molecular  $C_{14}H_{18}N_2O_2$ .

A análise detalhada dos espectros de RMN de  $^1H$ , HSQC, HMBC COSY (Figuras 102, 104, 105 e 106) da substância **6** permitiu observar o perfil espectroscópico semelhante ao da substância **1**, sugerindo uma dicetopiperazina, diferindo apenas pela ausência do aminoácido prolina.

No espectro de RMN de  $^1H$  foram observados a presença de dois dupletos em  $\delta_H$  0,24 ( $d$ ; 3H;  $J = 6,8$  Hz; H-8) e 0,63 ( $d$ ; 3H;  $J = 6,8$  Hz; H-9), correspondentes a hidrogênios metílicos, e um multipletto em  $\delta_H$  1,68 ( $m$ ; 1H; H-7). As correlações observadas em COSY (Figuras 100 e 106) entre  $\delta_H$  H-8 $\leftrightarrow$ H-7 $\leftrightarrow$ H-9 $\leftrightarrow$ H-6 permitiram sugerir a presença de uma unidade do aminoácido valina em **6**. A presença dos sinais em  $\delta_H$  7,16-7,18 ( $m$ , 3H, H-2', H-4', H-6') e 7,23 ( $m$ , 2H, H-3', H-5'), além de dois duplos dupletos em  $\delta_H$  2,84 ( $dd$ ; 1H;  $J=13,5$  e 5,0 Hz; H-10a) e 3,12 ( $dd$ ; 1H;  $J=13,5$  e 4,3 Hz, H-10b), evidenciaram um sistema benzílico com anel aromático monossustituído, permitindo definir o segundo aminoácido como sendo a fenilalanina. A análise do espectro de DEPTQ (Figura 103), mostrou a presença de duas carbonilas com valores de deslocamentos químicos próximos, atribuídos a C-2 ( $\delta_C$  166,6) e C-5 ( $\delta_C$  166,4).

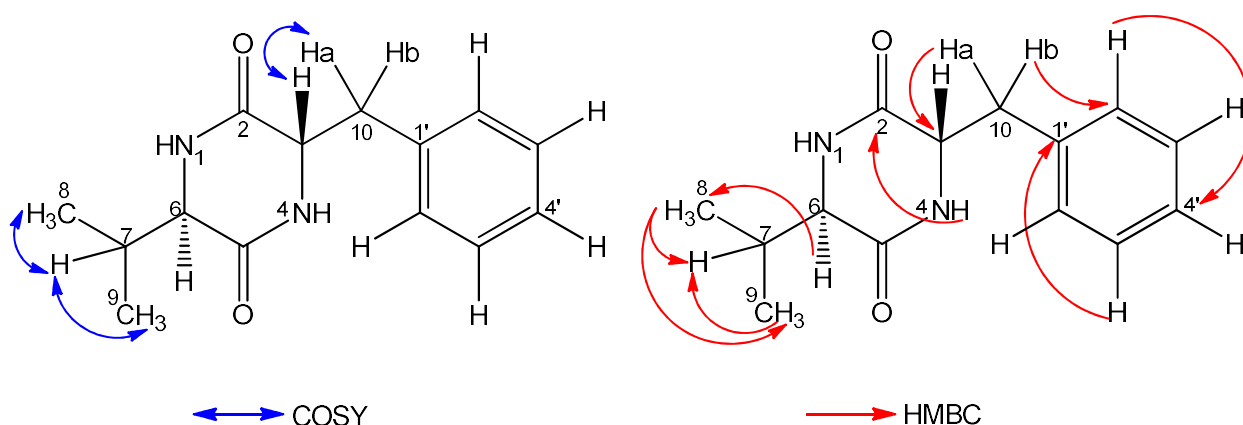
A configuração relativa de **6** foi definida com base no espectro de NOESY-1D (Figura 107), no qual não foram observadas interações espaciais entre H-3 ( $\delta_H$  4,20)

e H-6 ( $\delta_H$  3,52), indicando que estes hidrogênios se encontram em planos opostos da molécula.

Esta sugestão é corroborada pelo valor encontrado para o deslocamento químico de H-6 em  $\delta_H$  3,52 (uma região mais protegida), diferente dos valores esperados entre  $\delta_H$  4,0 e 4,40, e este fato pode ser explicado pelo efeito de proteção que o anel aromático causa neste hidrogênio.

Os dados espectrais (Tabela 17) quando comparados com a literatura (WANG et al., 2010; FURTADO et al., 2005) permitiram identificar a substância **6** como ciclo(Val-Phe).

**Figura 100.** Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC da substância **6**.



**Tabela 17.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC e COSY (DMSO- $d_6$ , 600 e 150 MHz) de **6** ( $\delta$  em ppm e  $J$  em Hz).

| Posição        | $\delta_{\text{H}}$              | $\delta_{\text{C}}$ | HMBC                     | COSY       |
|----------------|----------------------------------|---------------------|--------------------------|------------|
| <b>1</b>       | 7,90 (s)                         | -                   | C3; C5                   | *          |
| <b>2</b>       | -                                | 166,5               | -                        | -          |
| <b>3</b>       | 4,20 (m)                         | 55,4                | C1'; C2                  | H-10       |
| <b>4</b>       | 8,11 (s)                         | -                   | C2; C6                   | *          |
| <b>5</b>       | -                                | 166,4               | -                        | -          |
| <b>6</b>       | 3,52**                           | 59,6                | C5; C7; C8               | *          |
| <b>7</b>       | 1,68 (m)                         | 31,2                | *                        | H-8; H-9   |
| <b>8</b>       | 0,24 (d; $J = 6,8$ Hz)           | 16,5                | C6; C7; C9               | H-7        |
| <b>9</b>       | 0,63 (d; $J = 7,0$ Hz)           | 18,6                | C6; C7; C8               | H-7        |
| <b>10a</b>     | 2,84 (dd; $J = 13,5$ e $5,0$ Hz) | 38,1                | C3; C2'; C6';<br>C1'; C2 | H-3; H-10b |
| <b>10b</b>     | 3,12 (dd; $J = 13,5$ e $4,3$ Hz) |                     | C3; C2'; C6'; C1'        | H-10a      |
| <b>1'</b>      | -                                | 136,6               | -                        | -          |
| <b>2' e 6'</b> | 7,16 (m)                         | 130,8               | C10; C4'                 | *          |
| <b>3' e 5'</b> | 7,23 (m)                         | 128,4               | C1'                      | *          |
| <b>4'</b>      | 7,18 (m)                         | 127,1               | C2'; C6'                 | *          |

\* Sinal não observado; \*\*Multiplicidade não observada.

**Figura 101.** Espectro de massas (+)-ESI-MS da substância **6**.

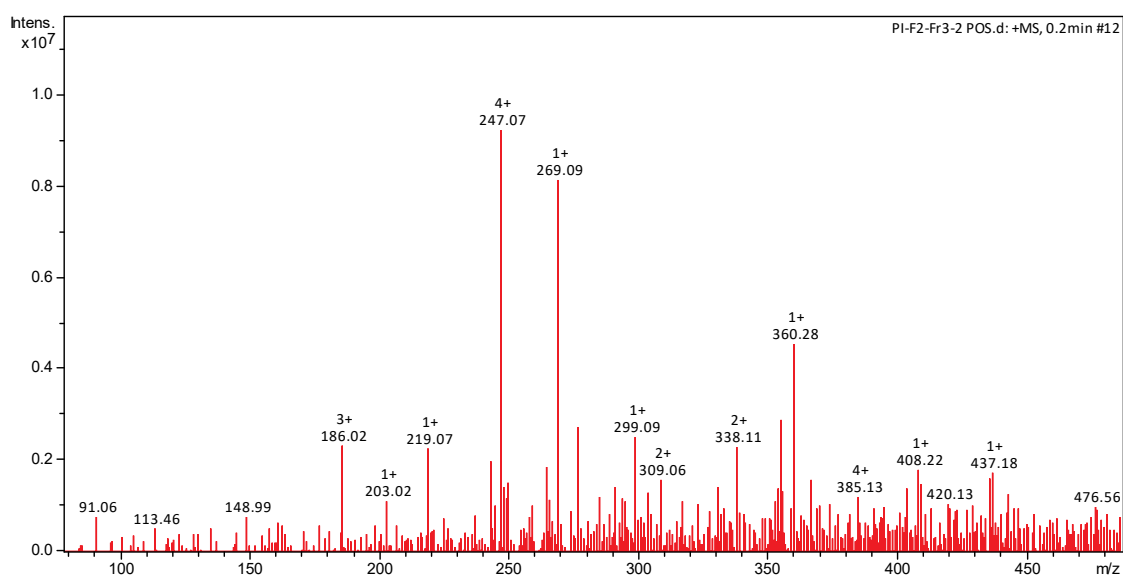


Figura 102. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **6** ( $\text{DMSO-}d_6$ ; 600 MHz).

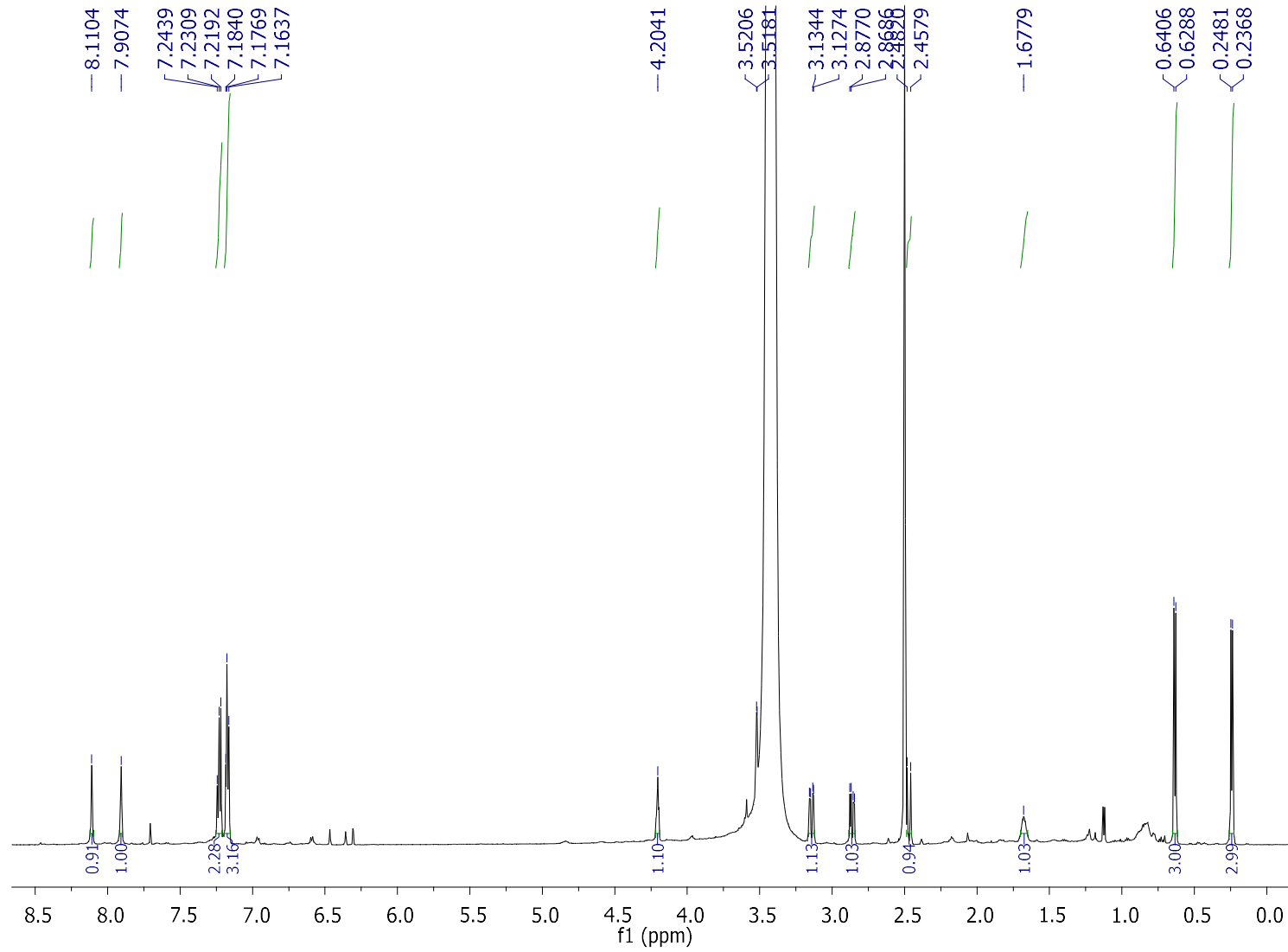


Figura 103. Espectro de DEPTQ da substância **6** (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 150 MHz).

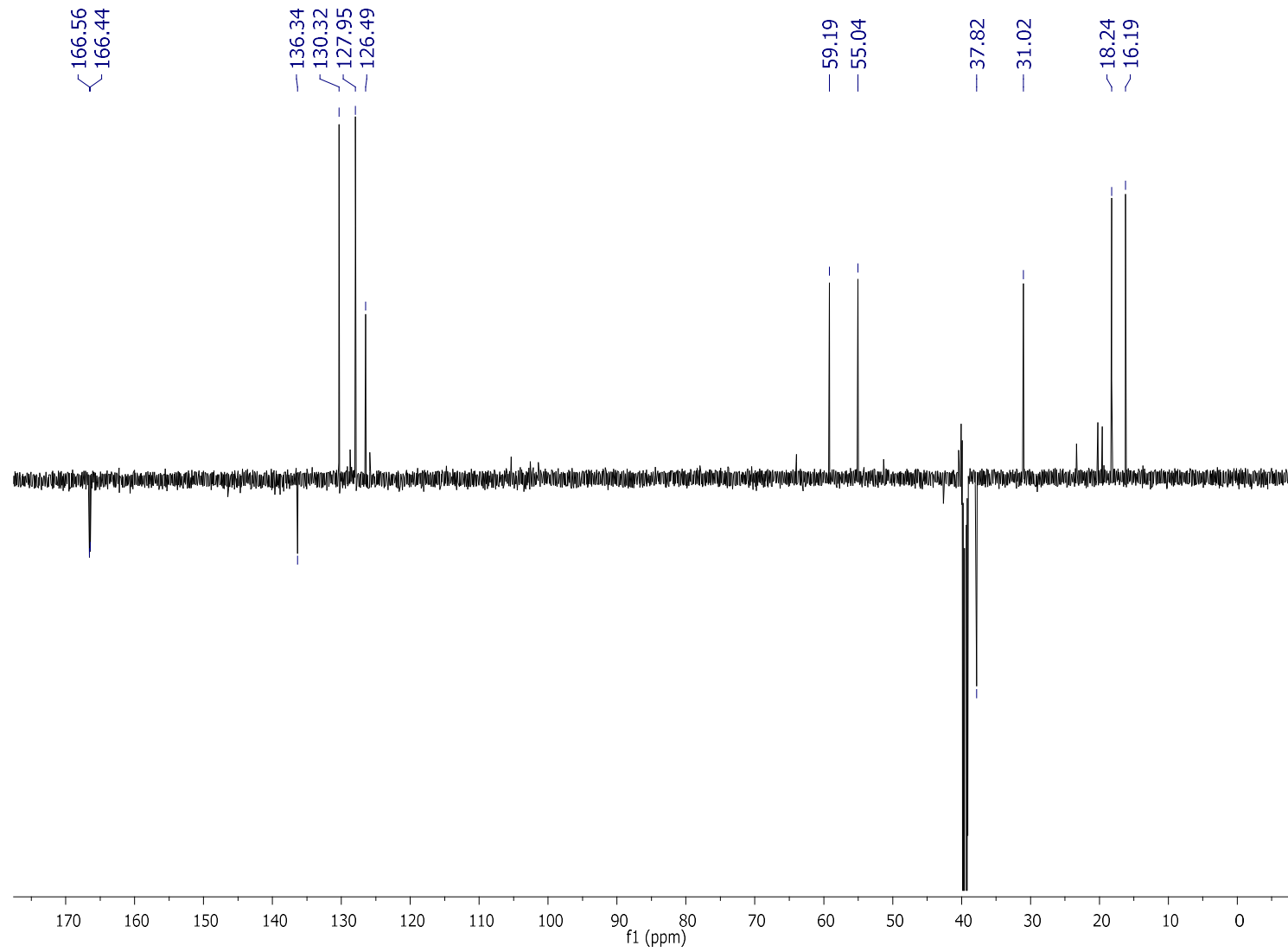


Figura 104. Mapa de contorno HSQC da substância **6** (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 600 e 150 MHz).

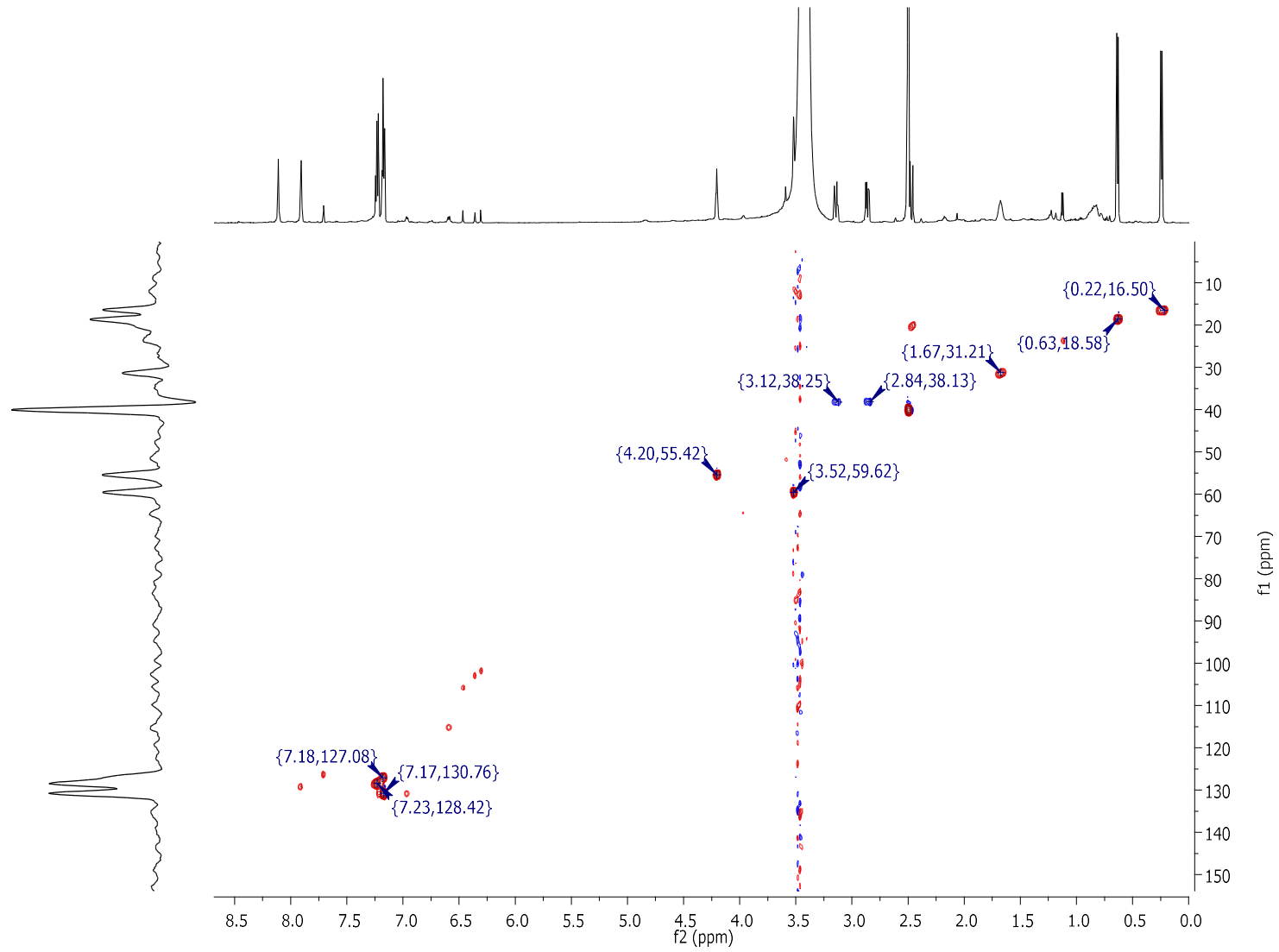


Figura 105. Mapa de contorno HMBC da substância **6** (DMSO- $d_6$ ; 600 e 150 MHz).

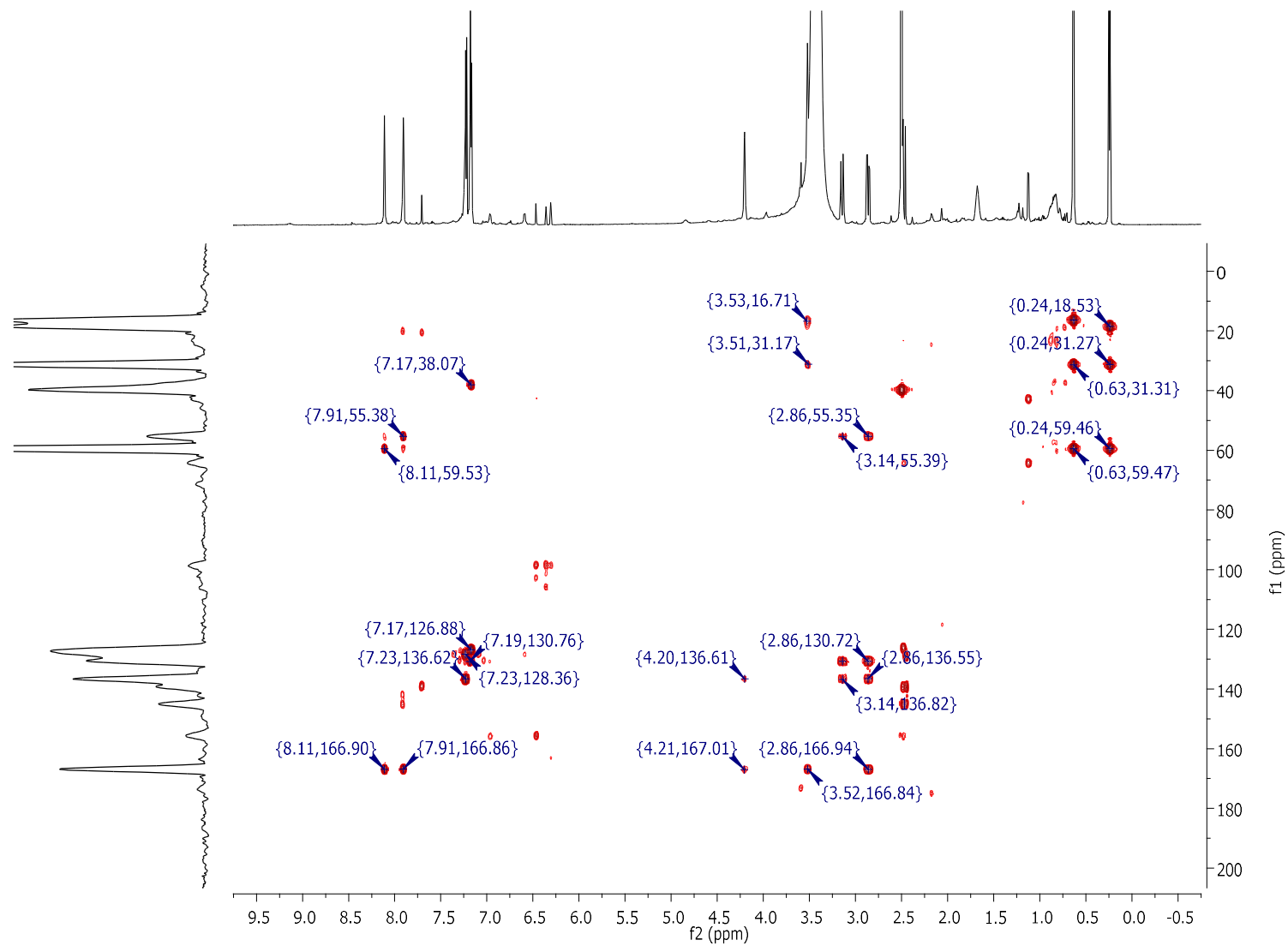




Figura 106. Mapa de contorno COSY da substância **6** (DMSO- $d_6$ ; 600 MHz).

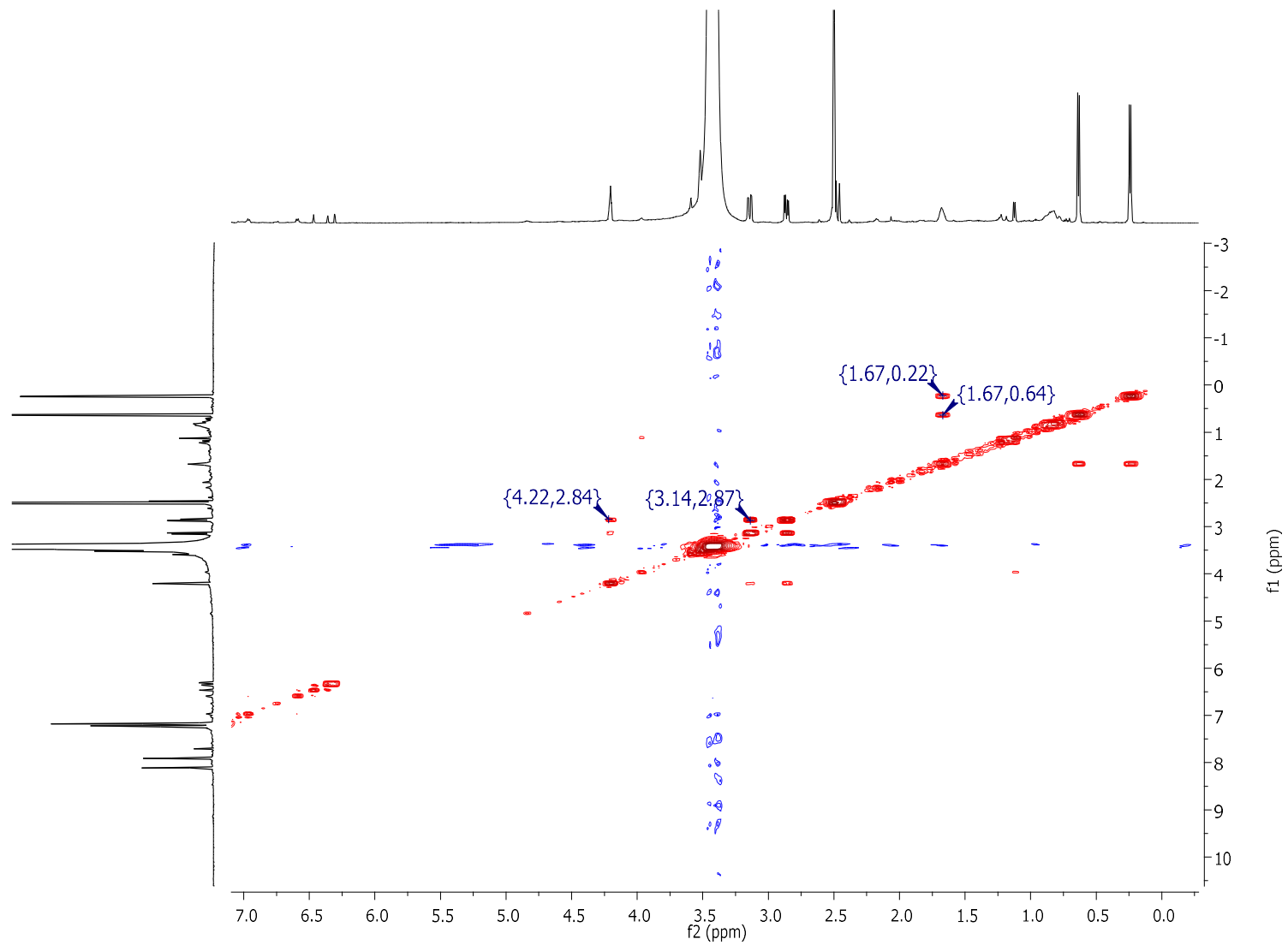
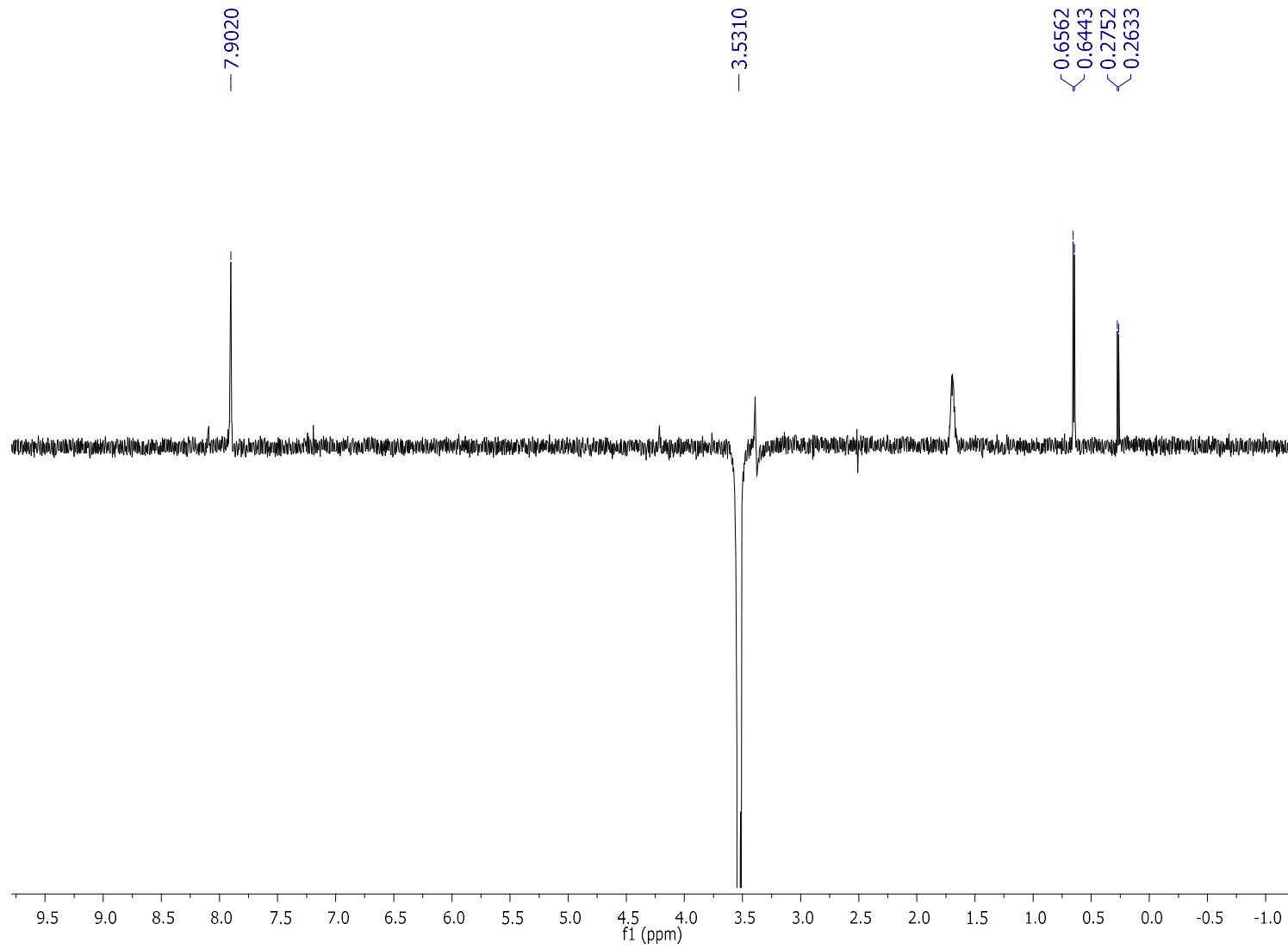
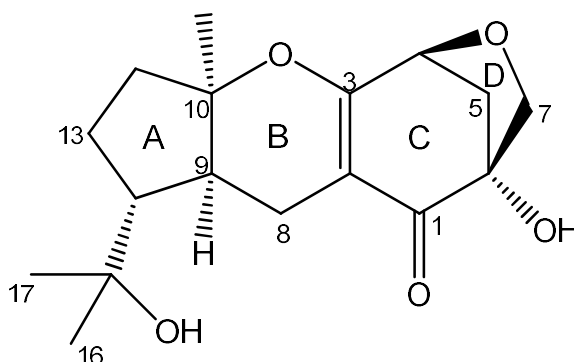


Figura 107. Experimento de NOESY-1D da substância **6** (DMSO- $d_6$ ; 600 MHz).



### 5.3.3 Identificação estrutural da substância 7



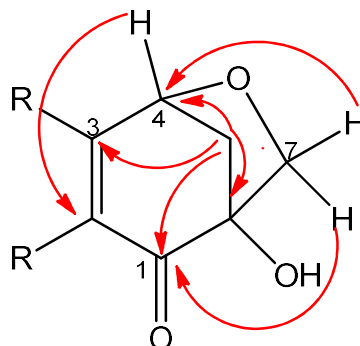
A análise dos dados de espectrometria de massas, ESI-Q-TOF (Figura 112), modo positivo, apresentou para **7** a molécula protonada de  $m/z$  309,1698  $[M+H]^+$  e a formação da molécula sodiada de  $m/z$  331,1519  $[M+Na]^+$ , o que associado aos experimentos de RMN uni e bidimensionais permitiram propor a fórmula molecular  $C_{17}H_{24}O_5$ .

Na análise dos dados de RMN de  $^1H$  e HSQC (Figuras 113 e 114) foram observados sinais em  $\delta_H$  3,73 (1H; *d*;  $J = 7,8$  Hz;  $\delta_C$  70,8), 3,53 (1H; *d*;  $J = 7,8$  Hz;  $\delta_C$  70,8) e 4,55 (1H; *d*;  $J = 5,5$  Hz;  $\delta_C$  78,5) correspondentes a hidrogênios carbinólicos metilênicos e metínicos, respectivamente. Adicionalmente, foram observados sinais em  $\delta_H$  2,31 (1H; *dd*;  $J = 10,7$  e  $5,5$  Hz;  $\delta_C$  43,8) e 2,10 (1H; *d*;  $J = 10,7$  Hz;  $\delta_C$  43,8), atribuídos a hidrogênios metilênicos.

Com base nos mapas de contorno HSQC e HMBC (Figuras 114 e 115), foi possível verificar uma carbonila em  $\delta_C$  199,0 e dois carbonos em  $\delta_C$  103,2 e 173,2, sendo um olefínico e o outro  $sp^2$  ligado a um oxigênio, respectivamente. Estas informações associadas as correlações observadas em HMBC (Figura 115) indicaram a presença de uma cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada.

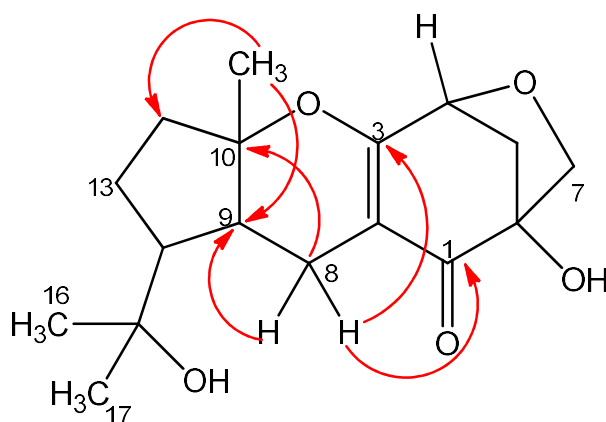
As correlações observadas em HMBC (Figuras 108 e 115) entre H-4 $\leftrightarrow$ C2; C6; C7, H-5a $\leftrightarrow$ C1; C3; C4; C6, H-5b $\leftrightarrow$ C6; C7 e H-7a/H-7b $\leftrightarrow$ C1; C4, permitiram estabelecer os anéis C e D para a substância **7**.

**Figura 108.** Principais correlações observadas em HMBC para os anéis C e D da substância **7**.



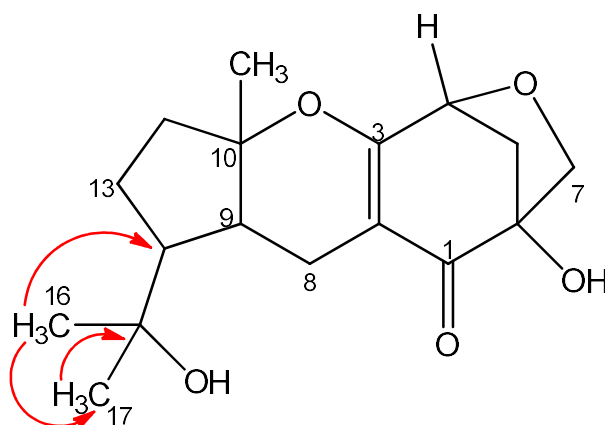
Na região de alifáticos foram visualizados sinais em  $\delta_H$  1,95 (1H; *m*;  $\delta_C$  37,8), 1,68 (1H; *m*;  $\delta_C$  37,8), 1,79 (1H; *m*;  $\delta_C$  24,0), 1,60 (1H; *m*;  $\delta_C$  24,0), 2,62 (1H; *d*;  $J = 17,0$  Hz;  $\delta_C$  17,5) e 2,23 (1H; *dd*;  $J = 17,0$  e 6,1 Hz;  $\delta_C$  17,5) atribuídos a hidrogênios metilênicos, dois multipletos em  $\delta_H$  2,10 (1H;  $\delta_C$  41,0) e  $\delta_H$  1,57 (1H;  $\delta_C$  51,0), correspondentes a hidrogênios metínicos e um grupo metílico em  $\delta_H$  1,33 (3H; *s*;  $\delta_C$  21,4). Estes dados, aliados às correlações observadas no mapa de contorno HMBC, permitiram definir os anéis A e B. Adicionalmente, as correlações visualizadas entre H-8a $\leftrightarrow$ C1; C3 e H-8b $\leftrightarrow$ C2; C3 permitiram estabelecer a conexão do anel B com o C (Figura 109).

**Figura 109.** Principais correlações observadas em HMBC para os anéis A, B e C da substância **7**.



Com base no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foram observados ainda, dois simpletos em  $\delta_{\text{H}}$  1,16 (3H;  $\delta_{\text{C}}$  27,1) e 1,15 (3H;  $\delta_{\text{C}}$  25,8), atribuídos a dois grupos metílicos. As correlações observadas em HMBC entre H-16 $\leftrightarrow$ C14; C17 e H-17 $\leftrightarrow$ C15 (Figura 110) sugeriram a presença de uma cadeia lateral ligada a C-14.

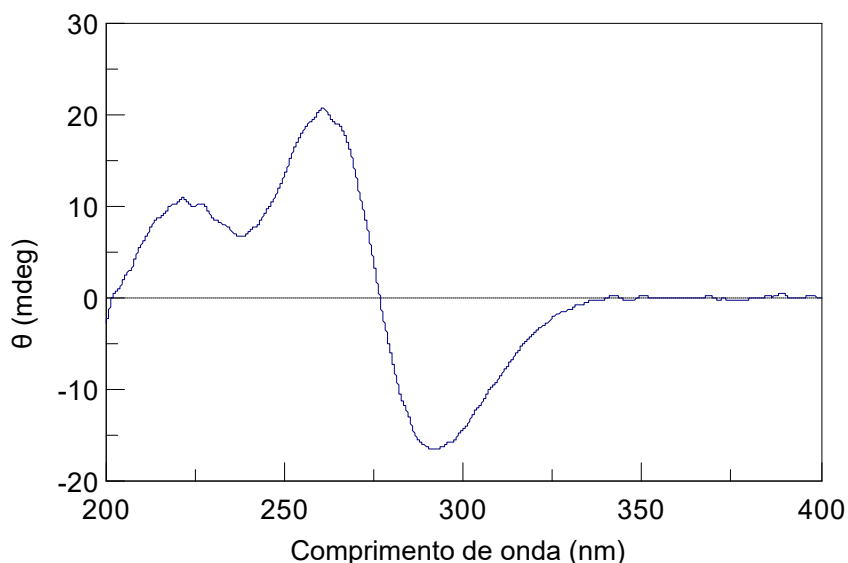
**Figura 110.** Correlações observadas em HMBC para a cadeia lateral ligada a C-14 da substância **7**.



A comparação dos dados obtidos (Tabela 18) com os descritos na literatura (YUAN et al., 2010) permitiram identificar a substância **7** como Guignardona B.

Para determinar a configuração dos centros quirais C4, C6, C9, C10 e C14, foram realizados experimentos de dicroísmo circular eletrônico. O espectro de dicroísmo circular apresentou dois efeitos Cotton positivo em 221 e 261 nm e um efeito Cotton negativo em 292 nm (Figura 111), indicando a configuração 4S, 6R, 9S, 10R e 14R. Sendo assim, a substância **7** foi nomeada como: (4S,6R,9S,10R,14R)-guignardona B, corroborando com os dados da literatura (YUAN et al., 2010)

**Figura 111.** Espectro de dicroísmo circular eletrônico da substância **7** (200-400 nm).



A substância **7** pertence à classe dos meroterpenoides do tipo guignardona. Este tipo raro de meroterpenos são biossinteticamente constituídos por unidades isoprênicas que dão origem a um esqueleto terpênico, que por sua vez se encontra conectado a uma unidade C7 de origem policetílica, resultando em uma estrutura com esqueleto tetracíclico. A principal fonte natural desse tipo de meroterpenos são os fungos endofíticos, especialmente de espécies do gênero *Guignardia* (forma sexuada do gênero *Phyllosticta*) (YANG et al., 2017; HAN et al., 2015).

A guignardona B já foi produzida pelos endófitos *Guignardia mangiferae* e *Guignardia* sp., e por algumas espécies do gênero *Phyllosticta*, como *Phyllosticta capitalensis* e *Phyllosticta* sp., sendo relatada pela primeira vez para *Phyllosticta elongata*. Além disso, tem se destacado por apresentar atividade antibacteriana e antifúngica relevante (MA et al., 2019; LI et al., 2015; YANG et al., 2017; YUAN et al., 2010).

A fim de explorar ainda mais o potencial biológico da guignardona B, neste trabalho, a mesma foi testada frente à cepa de *Trypanosoma cruzi* Tulahuen LacZ, agente etiológico da doença de Chagas. O resultado obtido mostrou que a substância apresenta moderada capacidade de inibição de crescimento do parasita (IC<sub>50</sub> 31,03 μM), quando comparado ao padrão benznidazol (IC<sub>50</sub> 6,54 μM).

**Tabela 18.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HMBC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 150 MHz) de **7** ( $\delta$  em ppm e  $J$  em Hz).

| Posição    | $\delta_{\text{H}}$                        | $\delta_{\text{C}}$ | HMBC                     |
|------------|--|---------------------|--------------------------|
| <b>1</b>   | -  | 199,0               | -                        |
| <b>2</b>   | -  | 103,2               | -                        |
| <b>3</b>   | -  | 173,2               | -                        |
| <b>4</b>   | 4,55 ( <i>d</i> ; $J = 5,5$ Hz)            | 78,5                | C2; C3; C6; C7           |
| <b>5a</b>  | 2,31 ( <i>dd</i> ; $J = 10, 7$ e $5,5$ Hz) | 43,8                | C1; C3; C4; C6           |
| <b>5b</b>  | 2,10 ( <i>d</i> ; $J = 10,7$ Hz)           |                     | C6; C7                   |
| <b>6</b>   | -  | 81,9                | -                        |
| <b>7a</b>  | 3,73 ( <i>d</i> ; $J = 7,8$ Hz)            |                     | C1; C4; C6               |
| <b>7b</b>  | 3,53 ( <i>d</i> ; $J = 7,8$ Hz)            | 70,8                | C1; C4; C5               |
| <b>8a</b>  | 2,62 ( <i>d</i> ; $J = 17,0$ Hz)           |                     | C1; C2; C3; C9; C10; C14 |
| <b>8b</b>  | 2,23 ( <i>dd</i> ; $J = 17,0$ e $6,1$ Hz)  | 17,5                | C2; C3; C9; C14          |
| <b>9</b>   | 2,10 ( <i>m</i> )                          | 41,0                | C2; C8; C14              |
| <b>10</b>  | -  | 90,3                | -                        |
| <b>11</b>  | 1,33 ( <i>s</i> )                          | 21,4                | C9; C10; 12              |
| <b>12a</b> | 1,95 ( <i>m</i> )                          |                     | C9; C10; C13; C14        |
| <b>12b</b> | 1,68 ( <i>m</i> )                          | 37,8                | *                        |
| <b>13a</b> | 1,79 ( <i>m</i> )                          |                     | *                        |
| <b>13b</b> | 1,60 ( <i>m</i> )                          | 24,0                | *                        |
| <b>14</b>  | 1,57 ( <i>m</i> )                          | 51,0                | *                        |
| <b>15</b>  | -  | 72,0                | -                        |
| <b>16</b>  | 1,16 ( <i>s</i> )                          | 27,1                | C14; C17                 |
| <b>17</b>  | 1,15 ( <i>s</i> )                          | 25,8                | C15                      |

\*Sinal não observado

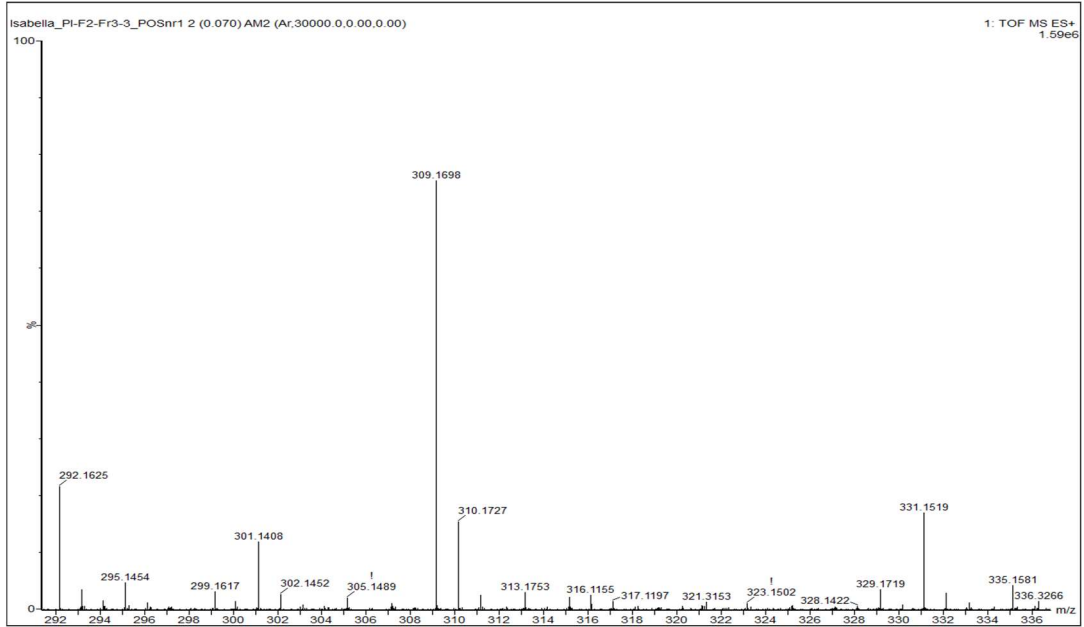
**Figura 112.** Espectro de massas de alta resolução da substância 7 (ESI-Qq-TOF).



Figura 113. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 7 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).

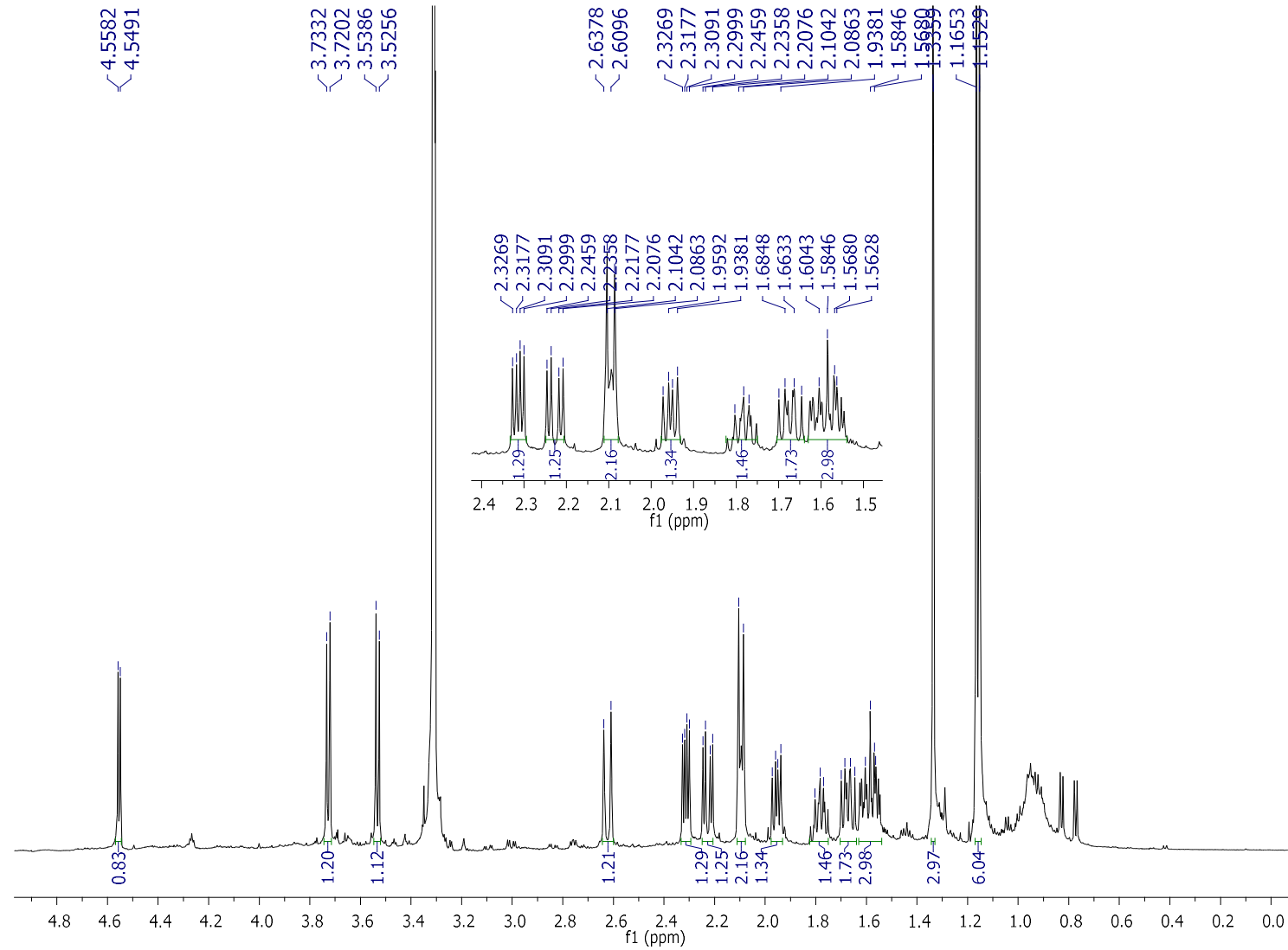


Figura 114. Mapa de contorno HSQC da substância 7 (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).

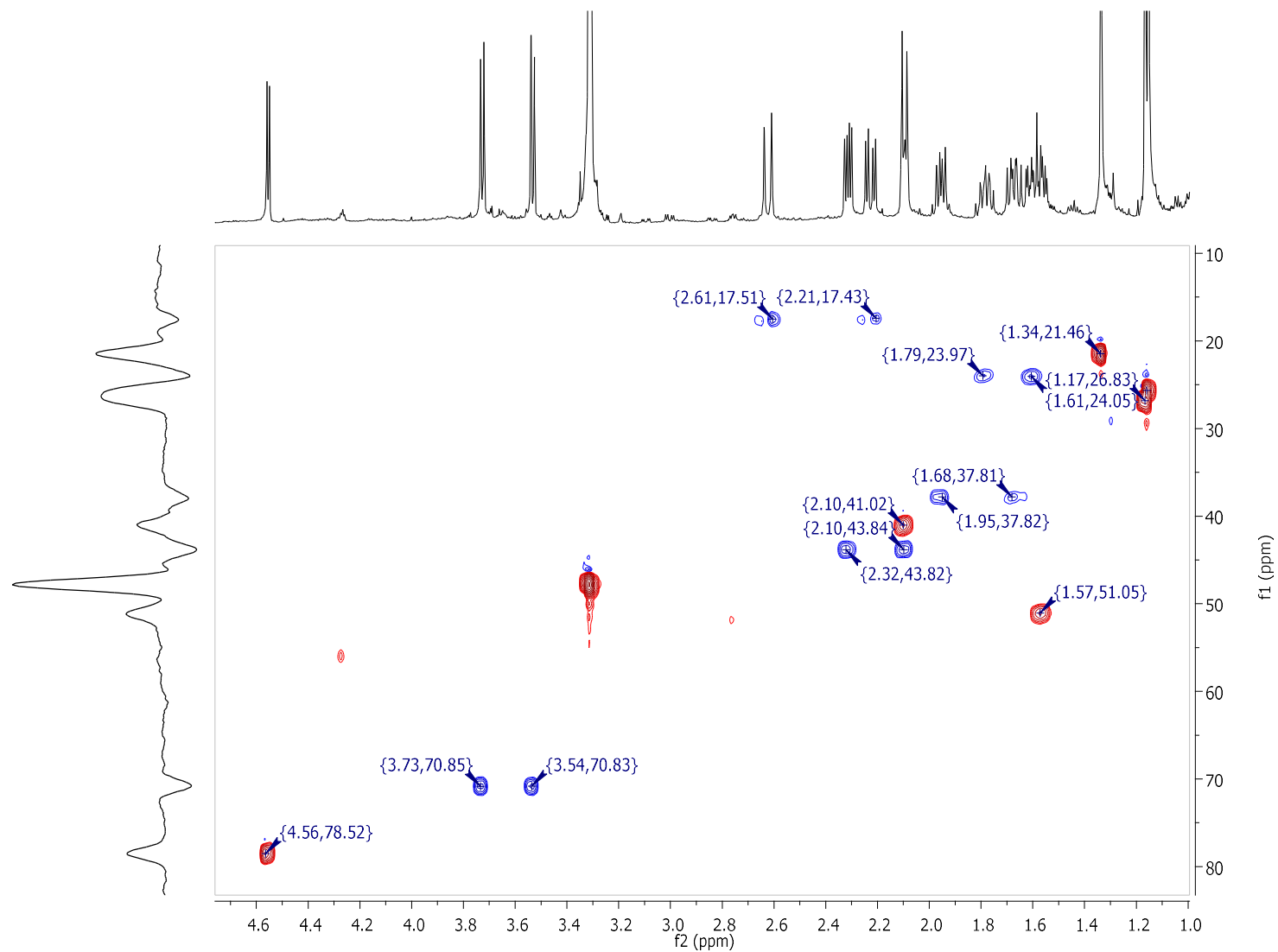


Figura 115. Mapa de contorno HMBC da substância 7 (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).

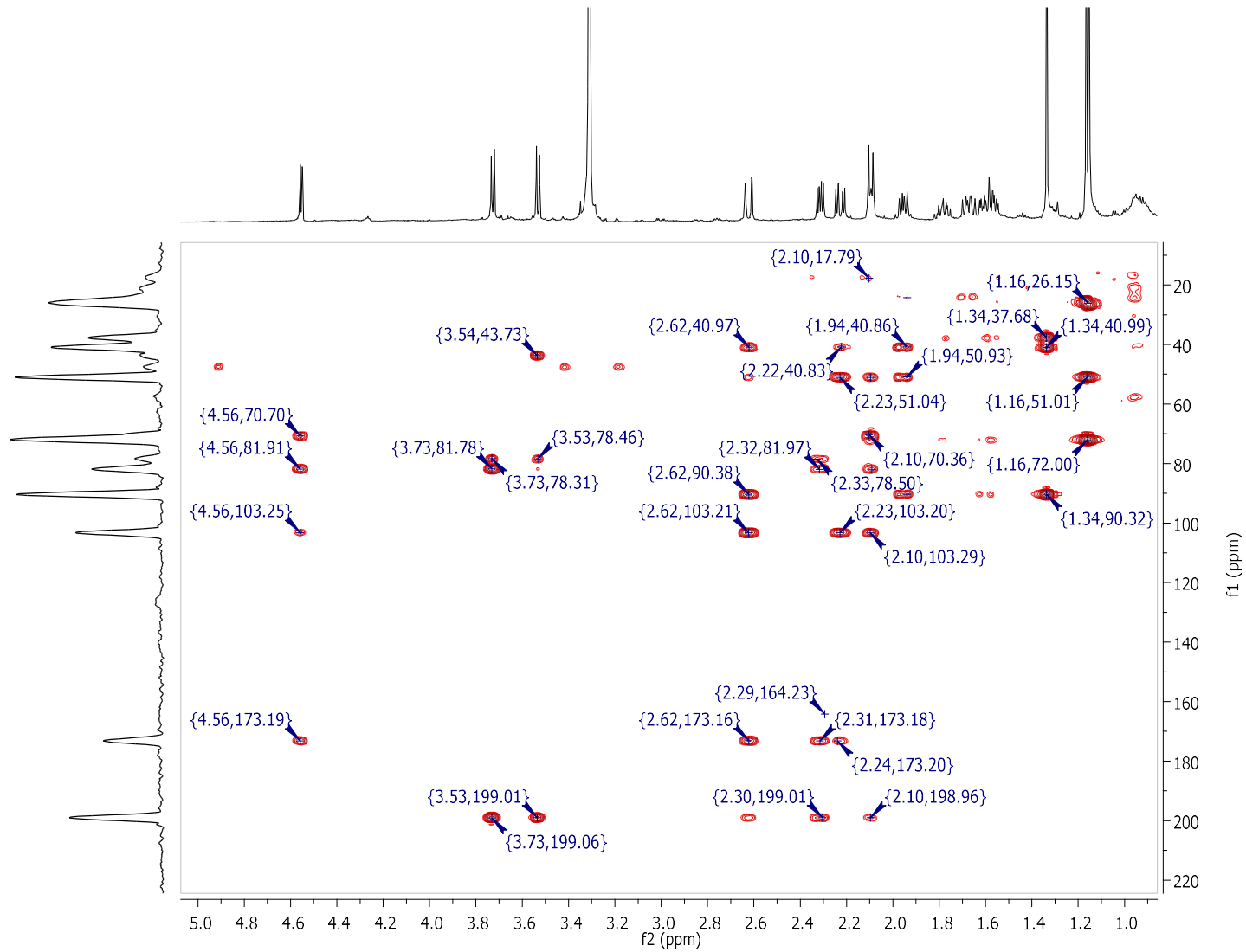
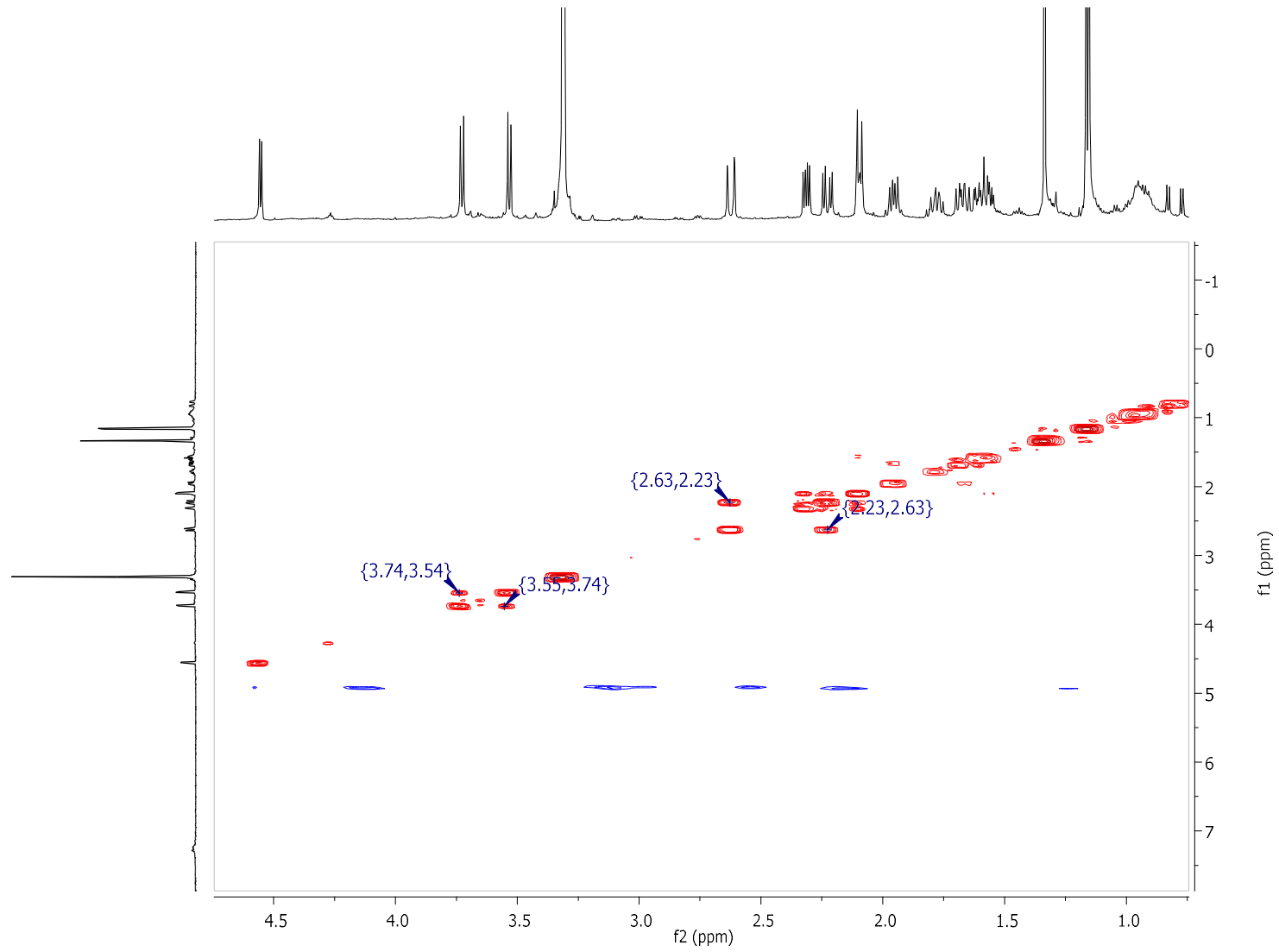
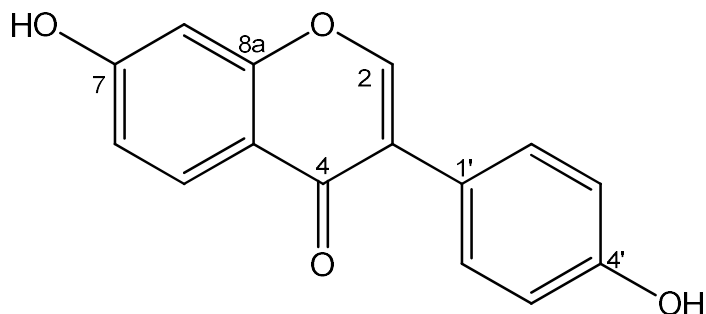


Figura 116. Mapa de contorno COSY da substância 7 (CD<sub>3</sub>OD; 600 MHz).



### 5.3.4 Identificação estrutural da substância **8**



O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 118) da substância **8** apresentou dois sistemas distintos de anéis aromáticos fenólicos, sendo um com dois dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  8,06 (1H,  $J = 8,8$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  6,87 (1H,  $J = 2,2$  Hz) e um duplo duplete em  $\delta_{\text{H}}$  6,95 (1H,  $J = 8,8$  e 2,2 Hz), evidenciando um sistema trissubstituído. O outro apresentou dois dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,37 (2H,  $J=8,6$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  6,85 (2H,  $J=8,6$  Hz) que, em consonância com as multiplicidades e integração, sugeriram um anel dissustituído. Adicionalmente, foi observado um sinal em 8,14 (s; 1H,  $\delta_{\text{C}}$  153,3), característico de isoflavonas (HARBORNE, 1996).

A análise dos mapas de contorno HSQC (Figura 119) e HMBC (Figura 120) permitiu identificar oito carbonos metínicos e sete carbonos quaternários, sendo três sinais característicos de carbono ligado a oxigênio ( $\delta_{\text{C}}$  163,1; 158,3; 157,2) e uma carbonila em  $\delta_{\text{C}}$  176,8. Esta informação, associada as correlações observadas em HMBC (Figura 120) entre  $\text{H-2} \leftrightarrow \text{C-3/C-4/C-8a}$ , indicou a presença de uma cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada.

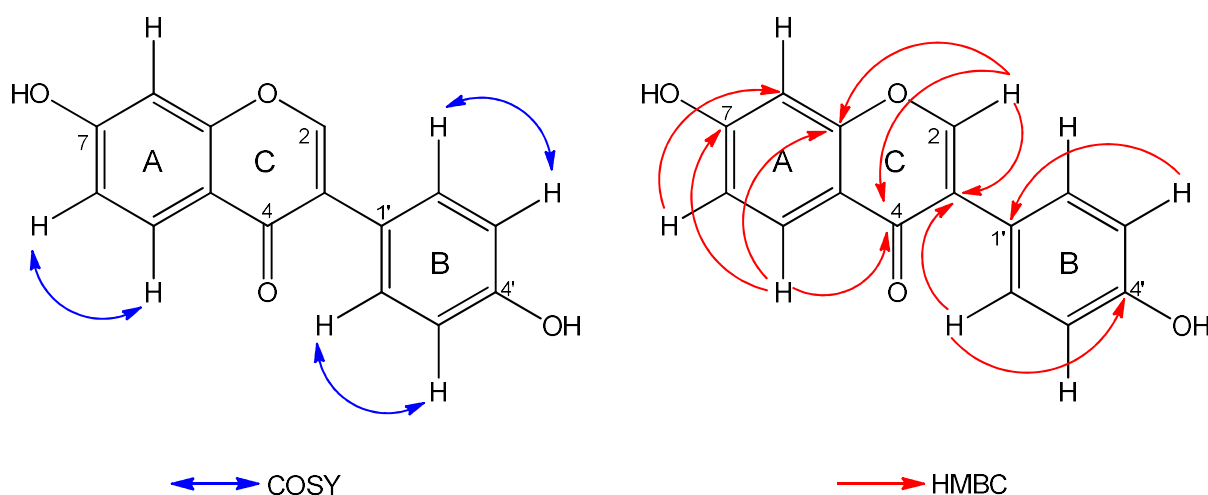
As correlações observadas em HMBC (Figuras 117 e 120) entre  $\text{H-2}' \leftrightarrow \text{C-3}$  permitiram estabelecer a conexão do anel C com o anel B. Foram observados também correlações entre  $\text{H-5} \leftrightarrow \text{C-4/C-7/C8a}$ ,  $\text{H-6} \leftrightarrow \text{C-8/C4a}$  e  $\text{H-8} \leftrightarrow \text{C6/C7}$  que associados às correlações visualizadas em COSY (Figura 117 e 121 e Tabela19) e comparação com dados da literatura (HUANG et al., 2013), permitiram identificar a substância **8** como 7-hidroxi-3-(4'-hidroxifenil)cromona, conhecida como daidzeína.

A daidzeína é uma isoflavona, normalmente encontrada em espécies da família Fabaceae, como a soja (*Glycine max*) (MURAKAMI et al., 2014). Apresenta ação antioxidante, anti-inflamatória, antialérgica e anti-aging e possui efeito inibitório contra

linhagens de células tumorais, incluindo células de câncer de mama (FUGITAKA et al., 2019; LEE; PARK, 2018; KAUSHIK et al., 2018).

Um estudo realizado por Huang et al., (2013) mostrou que espécies de bactérias do gênero *Streptomyces* produzem isoflavonas, como a daidzeína, a partir da biotransformação de componentes do meio de cultivo provenientes da soja. Outro estudo demonstrou que algumas espécies do gênero *Aspergillus*, usados no preparo de alimentos fermentados de soja, são capazes de metabolizar a daidzeína e produzir a 8-hidróxi-daidzeína (CHANG et al., 2007)

**Figura 117.** Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC da substância **8**.



**Tabela 19.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC e COSY ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 150 MHz) de **8** ( $\delta$  em ppm e  $J$  em Hz).

| Posição        | $\delta_{\text{H}}$                      | $\delta_{\text{C}}$ | HMBC        | COSY        |
|----------------|--|---------------------|-------------|-------------|
| <b>1</b>       | -  | -                   | -           | -           |
| <b>2</b>       | 8,14 (s)                                 | 153,3               | C3; C4; C8a | -           |
| <b>3</b>       | -  | 124,5               | -           | -           |
| <b>4</b>       | -  | 176,8               | -           | -           |
| <b>4a</b>      | -  | 116,7               | -           | -           |
| <b>5</b>       | 8,06 ( <i>d</i> ; $J = 8,8$ Hz)          | 127,1               | C8a; C7; C4 | H-6         |
| <b>6</b>       | 6,95 ( <i>dd</i> ; $J = 8,8$ e $2,2$ Hz) | 115,0               | C8; C10     | H-5         |
| <b>7</b>       | -  | 163,1               | -           | -           |
| <b>8</b>       | 6,87 ( <i>d</i> ; $J = 2,2$ Hz)          | 101,8               | C6; C7      | -           |
| <b>8a</b>      | -  | 158,3               | -           | -           |
| <b>1'</b>      | -  | 122,7               | -           | -           |
| <b>2' e 6'</b> | 7,37 ( <i>d</i> ; $J = 8,6$ Hz)          | 130,0               | C3; C4'     | H-3' e H-5' |
| <b>3' e 5'</b> | 6,85 ( <i>d</i> ; $J = 8,6$ Hz)          | 114,8               | C1'         | H-2' e H-6' |
| <b>4'</b>      | -  | 157,2               | -           | -           |

Figura 118. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **8** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).

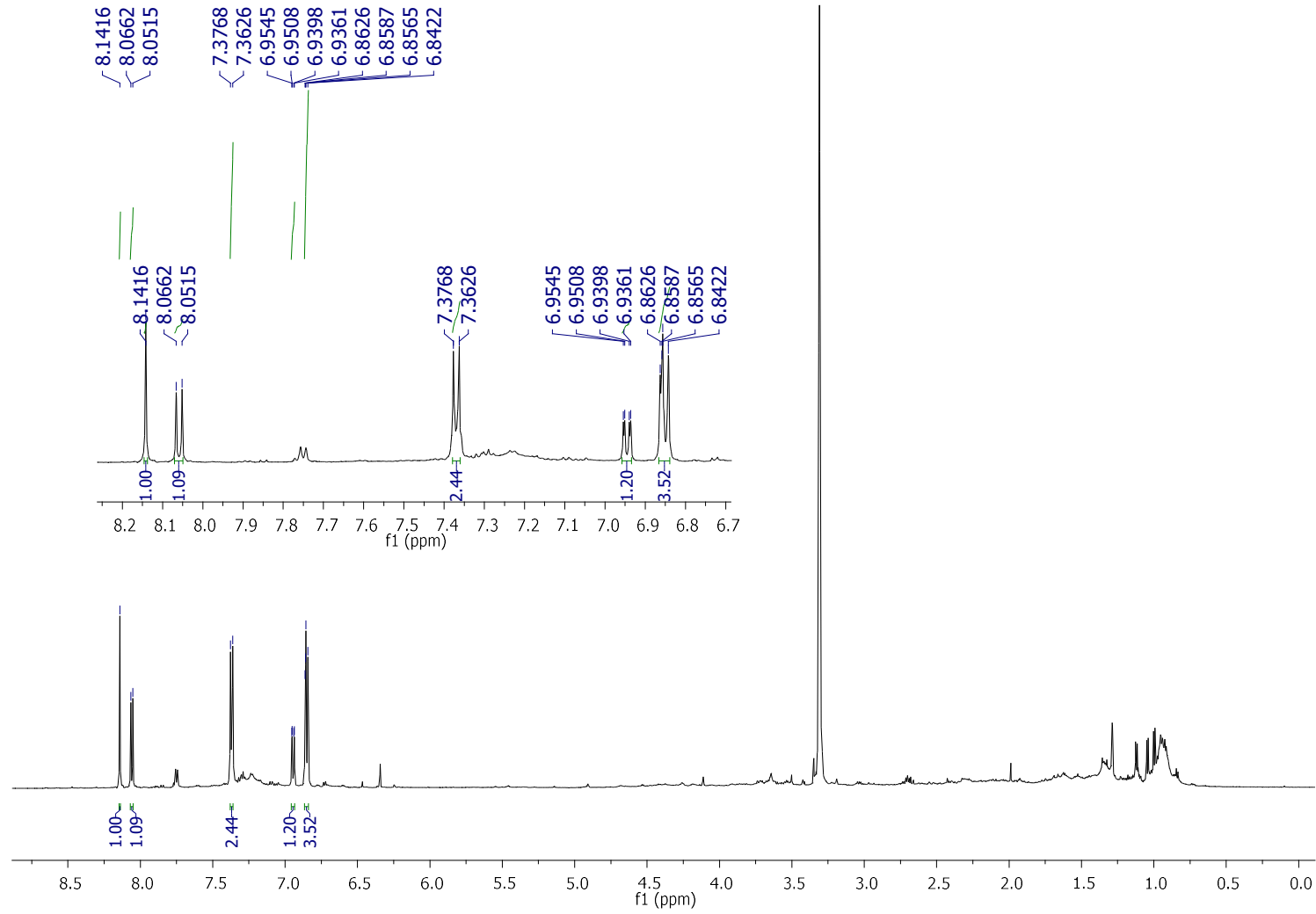




Figura 119. Mapa de contorno HSQC da substância **8** (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).

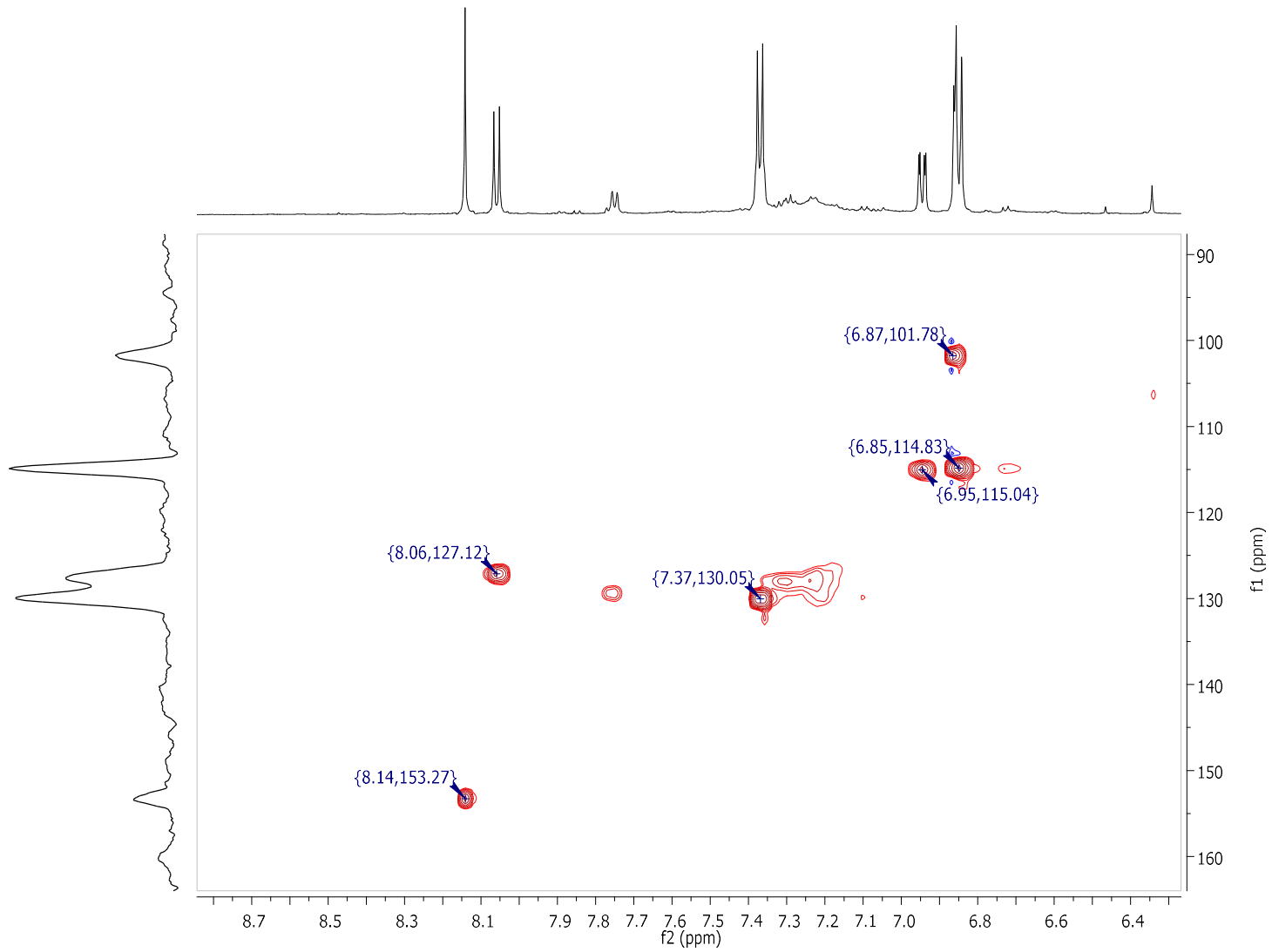


Figura 120. Mapa de contorno HMBC da substância **8** (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).

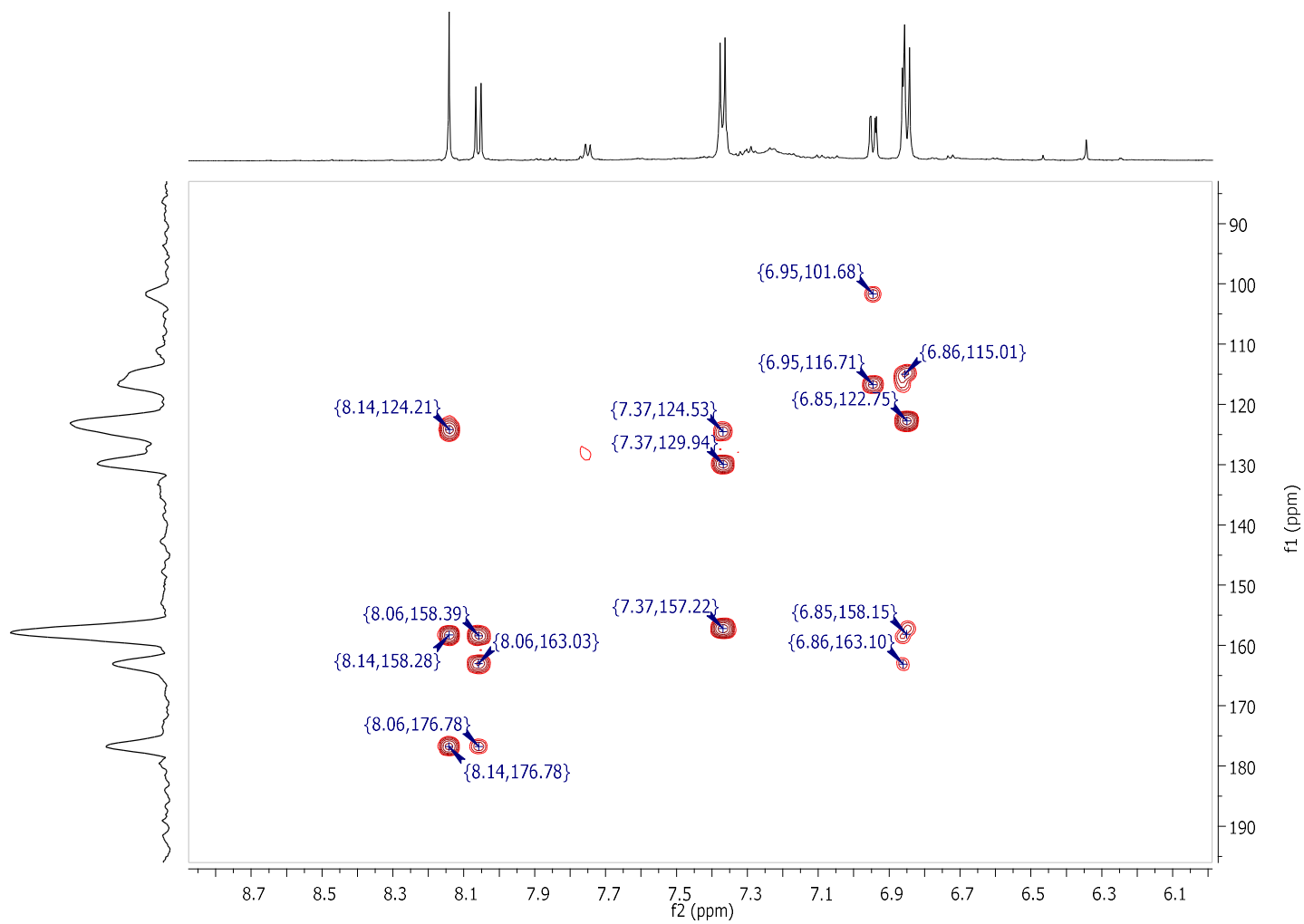
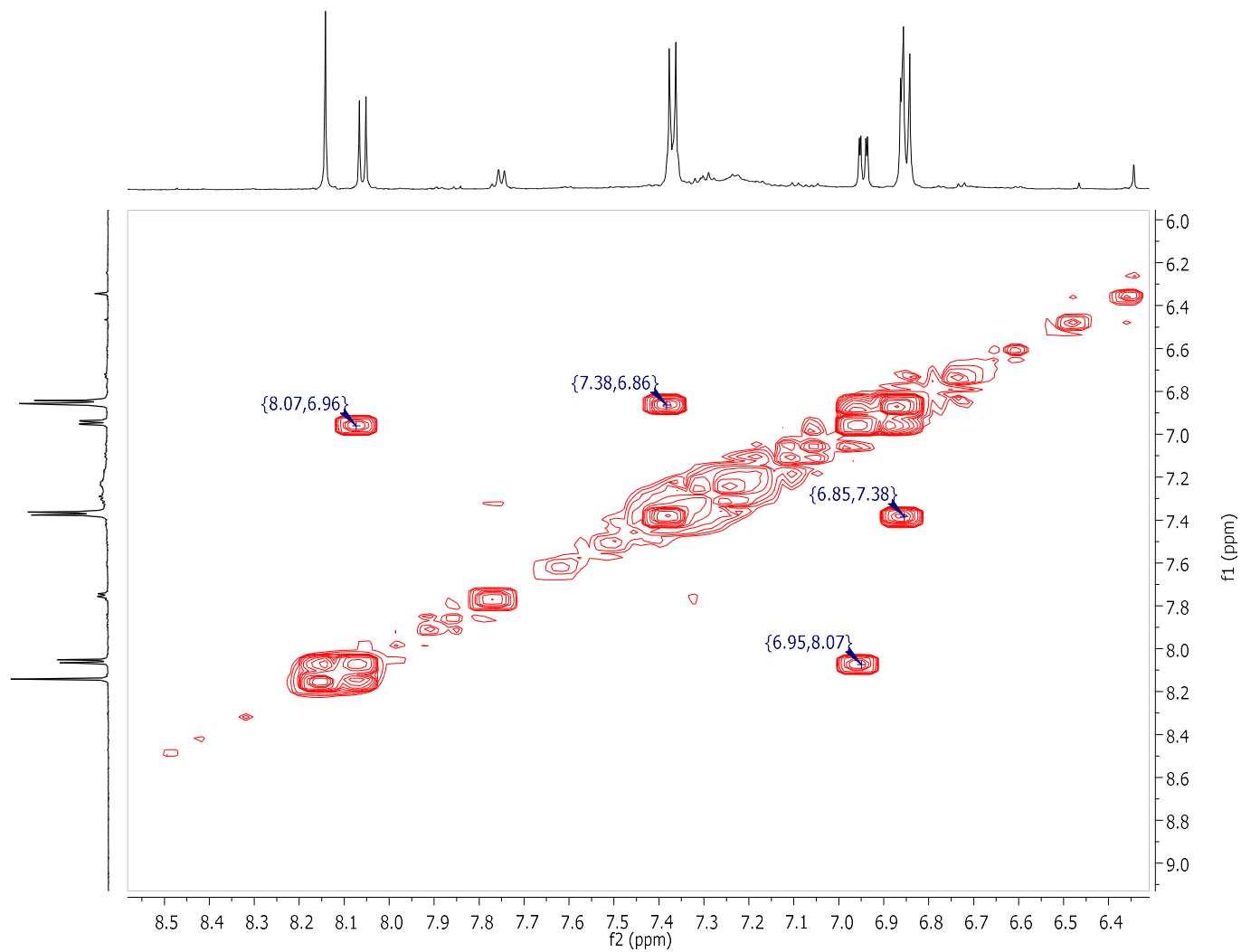
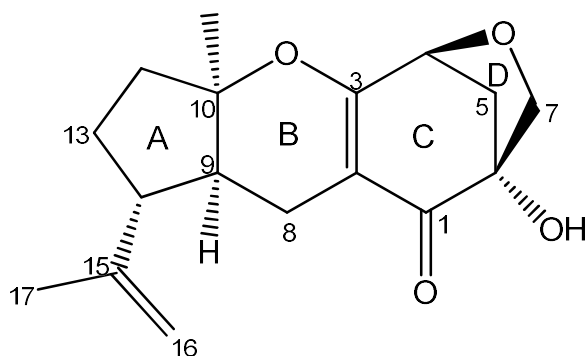


Figura 121. Mapa de contorno COSY da substância **8** (CD<sub>3</sub>OD; 600 MHz).



### 5.3.5 Identificação estrutural da substância **9**

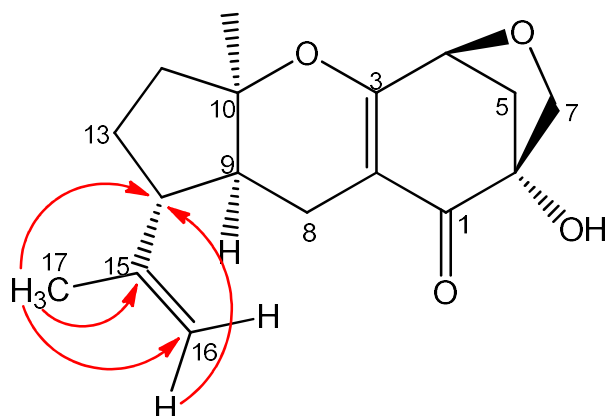


Os dados obtidos por espectrometria de massas, ESI-Q-TOF (Figura 124), modo positivo, evidenciou para a substância **9** a molécula protonada  $m/z$  291,1595  $[M+H]^+$  e a formação da molécula sodiada  $m/z$  313,1416  $[M+Na]^+$ , o que associado aos dados de RMN de uni e bidimensionais permitiu propor a fórmula molecular  $C_{17}H_{22}O_4$ .

A análise do espectro de RMN de  $^1H$  (Figura 125), aliado aos mapas de contorno HSQC e HMBC (Figuras 126 e 127), mostrou que a substância **9** apresenta perfil espectroscópico semelhante ao da substância **7**, em que a única diferença observada consiste na cadeia lateral ligada ao C-14.

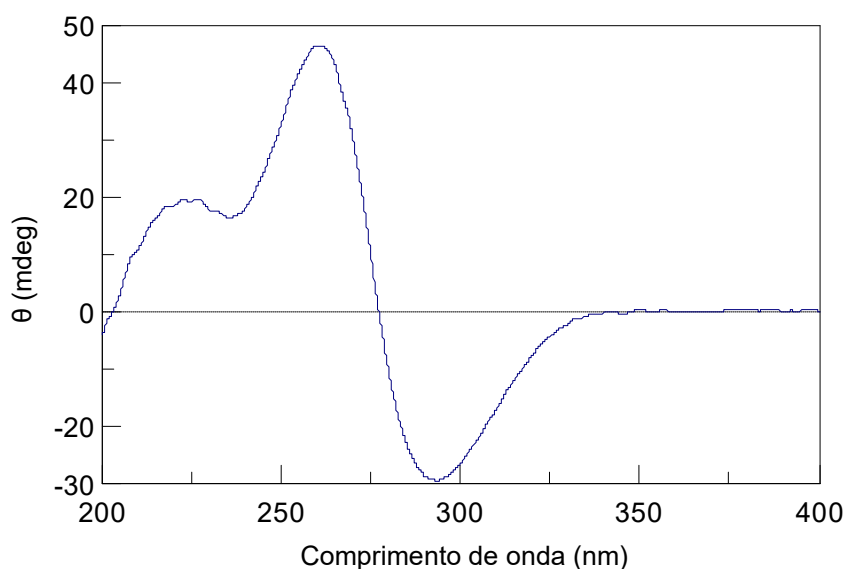
A ausência de uma metila e de um carbono carbinólico quando comparado com **7** associado à presença de um simpleto em  $\delta_H$  1,67 (3H;  $\delta_C$  17,3), atribuído a um grupo metílico, e dos sinais em  $\delta_H$  4,72 (1H; *s*;  $\delta_C$  110,6) e 4,60 (1H; *s*; 110,6) correspondentes a dois hidrogênios olefínicos, aliados as correlações observadas em HMBC (Figuras 122 e 127), evidenciaram a desidratação de C-15 com a formação de uma ligação dupla e desaparecimento de uma metila. Estes dados (Tabela 20) foram comparados com os descritos na literatura (YUAN et al., 2010; GUIMARÃES; LOPES; PUPO, 2012) e permitiram identificar a substância **9** como a Guignardona A.

**Figura 122.** Principais correlações observadas em HMBC para a cadeia lateral da substância **9**.



A configuração absoluta dos centros quirais C4, C6, C9, C10 e C14 foi determinada por experimentos de dicroísmo circular eletrônico. O espectro de dicroísmo circular apresentou dois efeitos Cotton positivo em 221 e 260 nm e um efeito Cotton negativo em 293 nm (Figura 123), indicando a configuração 4S, 6R, 9S, 10R e 14R. Desta forma, a substância **9** foi nomeada como: (4S, 6R, 9S, 10R, 14R)-guignardona A, em concordância com os dados da literatura (YUAN et al., 2010).

**Figura 123.** Espectro de dicroísmo circular eletrônico da substância **9** (200-400 nm).



Esta substância também pertence à classe dos meroterpenoides do tipo guignardona, e já foi produzida pelos fungos endofíticos *Guignardia mangiferae*,

Guignardia sp. e *Phyllosticta capitalensis*, sendo relatada pela primeira vez para *Phyllosticta elongata*. Além disso, tem se destacado por apresentar atividade antibacteriana e reguladora de receptores envolvidos no sistema imunológico, como o *Toll-like 3* (TLR3) (LI et al., 2015; XU; XIONG; XU, 2019; HAN et al., 2015 ).

Neste trabalho, a guignardona A também foi testada frente à cepa de *Trypanosoma cruzi* Tulahuen LacZ, agente etiológico da doença de Chagas. O resultado obtido mostrou que esta substância apresenta significativa capacidade de inibição de crescimento do parasita (IC<sub>50</sub> 7,58 µM), quando comparado ao padrão benznidazol (IC<sub>50</sub> 6,54 µM).

Tendo em vista que a doença de Chagas afeta milhões de pessoas no mundo, a busca por alternativas terapêuticas se torna relevante, uma vez que são poucas as opções atuais, sendo disponível apenas o nifurtimox e benznidazol. Portanto, este resultado estimula a prosseguir com estudos posteriores, com o objetivo de compreender o mecanismo de ação envolvido ou servir de modelo para a síntese de produtos mais específicos e menos tóxicos.

**Tabela 20.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HMBC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 150 MHz) de **9** ( $\delta$  em ppm e  $J$  em Hz).

| Posição    | $\delta_{\text{H}}$                                | $\delta_{\text{C}}$ | HMBC                |
|------------|--|---------------------|---------------------|
| <b>1</b>   | -  | 199,1               | -                   |
| <b>2</b>   | -  | 103,2               | -                   |
| <b>3</b>   | -  | 172,3               | -                   |
| <b>4</b>   | 4,53 ( <i>d</i> ; $J = 5,5$ Hz)                    | 78,6                | C2; C3; C6; C7      |
| <b>5a</b>  | 2,31 ( <i>dd</i> ; $J = 10,7$ e $5,5$ Hz)          | 43,7                | C1; C3; C4; C6      |
| <b>5b</b>  | 2,11 ( <i>d</i> ; $J = 10,7$ Hz)                   |                     | C1; C6; C7          |
| <b>6</b>   | -  | 82,0                | -                   |
| <b>7a</b>  | 3,72 ( <i>d</i> ; $J = 7,9$ Hz)                    | 70,9                | C1; C4; C6          |
| <b>7b</b>  | 3,46 ( <i>d</i> ; $J = 7,9$ Hz)                    |                     | C1; C4; C5; C6      |
| <b>8a</b>  | 2,25 ( <i>dd</i> ; $J = 17,1$ e $1,0$ Hz)          | 14,8                | C1; C2; C3; C9; C10 |
| <b>8b</b>  | 2,15**   |                     | C2; C3; C14         |
| <b>9</b>   | 2,02 ( <i>ddd</i> ; $J = 11,8$ ; $6,1$ e $1,2$ Hz) | 42,8                | C2; C8; C14; C15    |
| <b>10</b>  | -  | 88,9                | -                   |
| <b>11</b>  | 1,33 ( <i>s</i> )                                  | 22,2                | C9; C10; C12        |
| <b>12a</b> | 2,10 ( <i>m</i> )                                  | 36,8                | *                   |
| <b>12b</b> | 1,88 ( <i>m</i> )                                  |                     | C11; C13            |
| <b>13a</b> | 1,89 ( <i>m</i> )                                  | 26,1                | C9; C14             |
| <b>13b</b> | 1,61 ( <i>m</i> )                                  |                     | C10; C12; C14; C15  |
| <b>14</b>  | 2,18 ( <i>m</i> )                                  | 48,8                | C13; C16            |
| <b>15</b>  | -  | 145,6               | -                   |
| <b>16a</b> | 4,72 ( <i>sl</i> )                                 | 110,6               | C14; C17            |
| <b>16b</b> | 4,60 ( <i>sl</i> )                                 |                     | C14; C17            |
| <b>17</b>  | 1,67 ( <i>s</i> )                                  | 17,3                | C14; C15; C16       |

\*Sinal não observado; \*\*sinal sobreposto

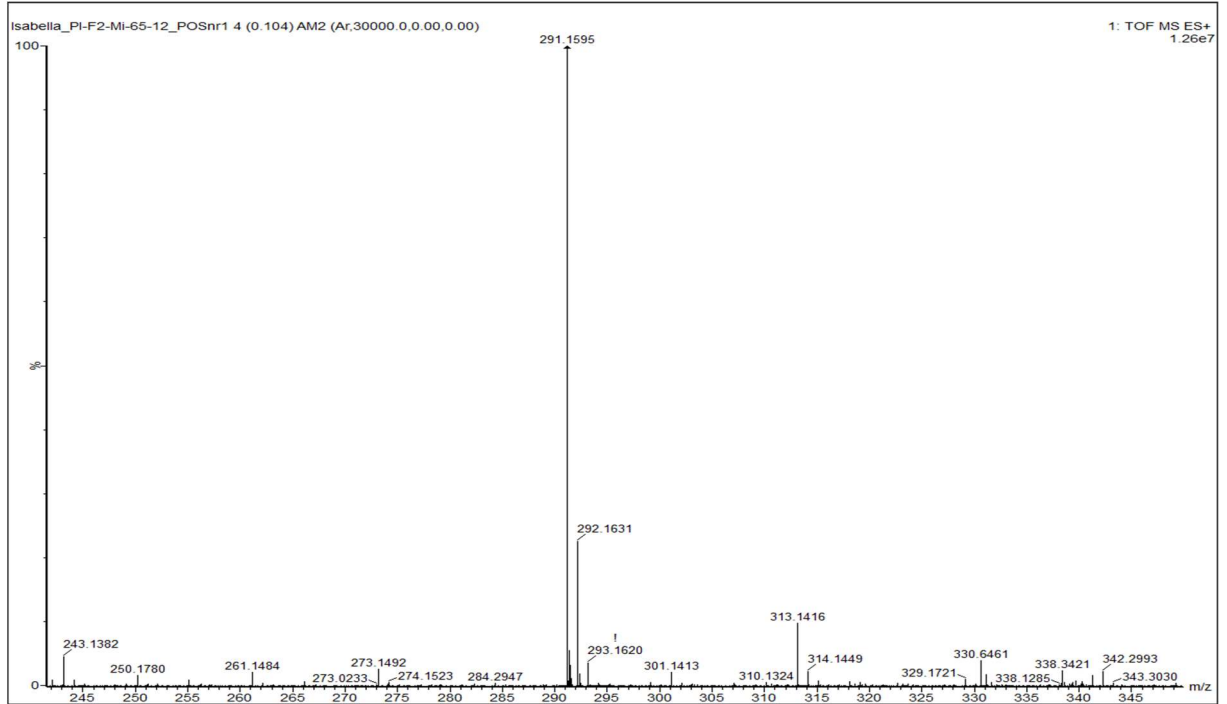
**Figura 124.** Espectro de massas de alta resolução da substância **9** (ESI-Qq-TOF).



Figura 125. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **9** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).

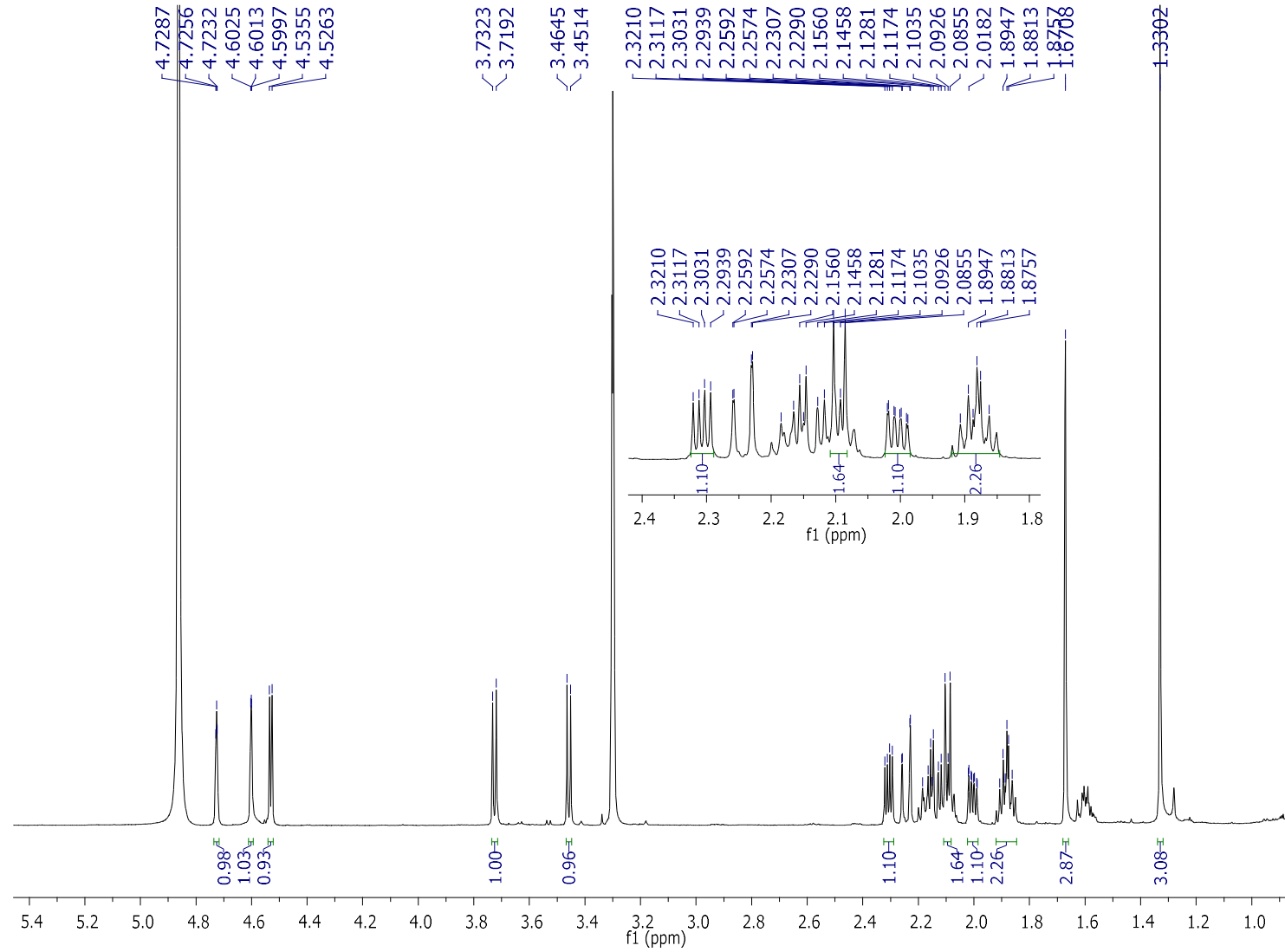


Figura 126. Mapa de contorno HSQC da substância **9** (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).

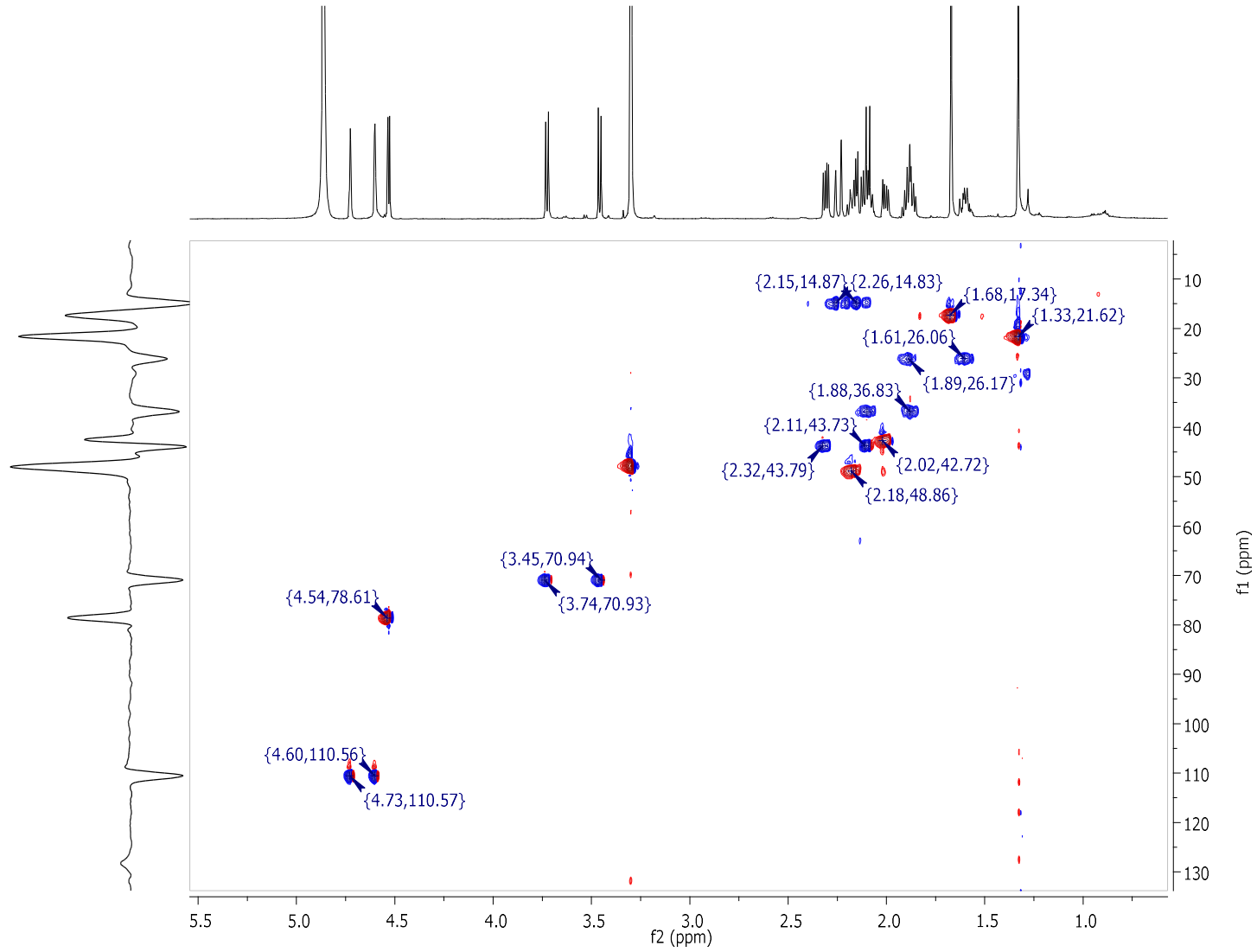
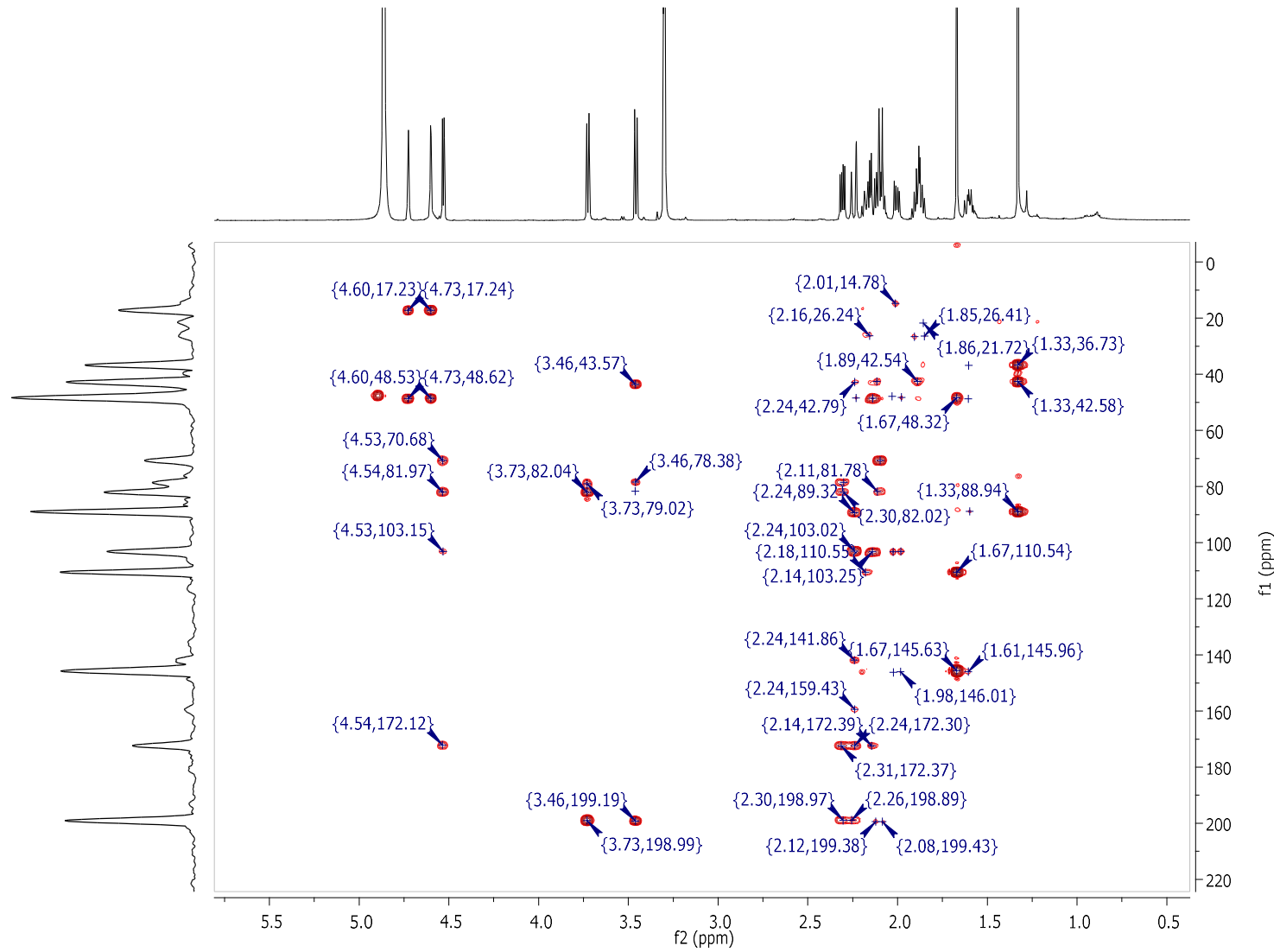
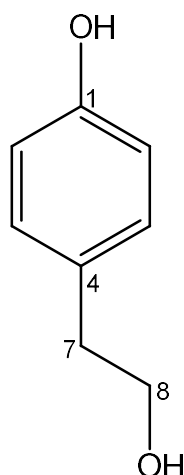


Figura 127. Mapa de contorno HMBC da substância **9** (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).



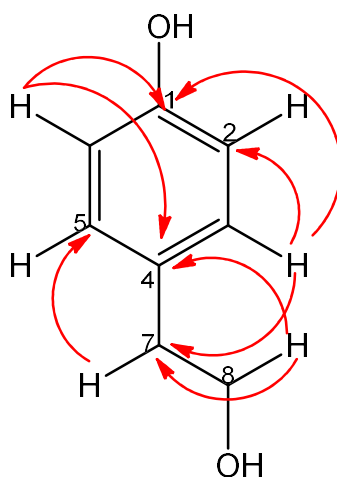
### 5.3.6 Identificação estrutural da substância **10**.



A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **10** (Figura 129) evidenciou a presença de dois dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,03 ( $J = 8,5$  Hz; 2H) e 6,70 ( $J = 8,5$  Hz; 2H) que, aliada às correlações observadas em HMBC (Figuras 128 e 131), foi possível sugerir um anel aromático *para*-substituído. Adicionalmente, observou-se dois sinais em 2,71 ( $t$ ;  $J = 7,2$  Hz; 2H) e 3,68 ( $t$ ;  $J = 7,2$ ; 2H), característicos de hidrogênios metilênicos benzílicos e carbinólicos, respectivamente.

A comparação dos dados espectrais obtidos (Tabela 21) com os descritos na literatura (GUZMÁN-LOPEZ et al., 2007), permitiu identificar a substância **10** como tirosol.

**Figura 128.** Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC da substância **10**.



Esta substância já foi relatada como metabólito secundário produzido por *Fusarium sp.*, *Phomopsis asparagi* e *Ceratocystis adiposa* (IBRAHIM et al., 2019; GUZMÁN-LOPEZ et al., 2007; CHANG et al., 2018b), apresenta atividade antifúngica, anti-inflamatória e antioxidante e desempenha um papel importante na preservação de doenças cardiovasculares. Também é relatado que este composto atua como molécula sinalizadora, no processo *quórum sensing*, o qual é definido como uma forma de comunicação química intra e interespecífica microbiana, mediado por sinais químicos extracelulares denominadas sinalizadoras ou autoindutoras (CHANG et al., 2019; BRILHANTE et al., 2016; CHANDRAMOHAN e PARI, 2016).

**Tabela 21.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HMBC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 150 MHz) de **10** ( $\delta$  em ppm e  $J$  em Hz).

| Posição      | $\delta_{\text{H}}$             | $\delta_{\text{C}}$ | HMBC           |
|--------------|---------------------------------|---------------------|----------------|
| <b>1</b>     | -                               | 156,7               | -              |
| <b>2 e 6</b> | 6,70 ( <i>d</i> , $J = 8,5$ Hz) | 116,1               | C1; C4         |
| <b>3 e 5</b> | 7,03 ( <i>d</i> ; $J = 8,5$ Hz) | 130,9               | C1; C2; C6; C7 |
| <b>4</b>     | -                               | 131,0               | -              |
| <b>7</b>     | 2,71 ( <i>t</i> ; $J = 7,2$ Hz) | 39,4                | C3; C8         |
| <b>8</b>     | 3,68 ( <i>t</i> ; $J = 7,2$ Hz) | 64,5                | C4; C7         |

Figura 129. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **10** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).

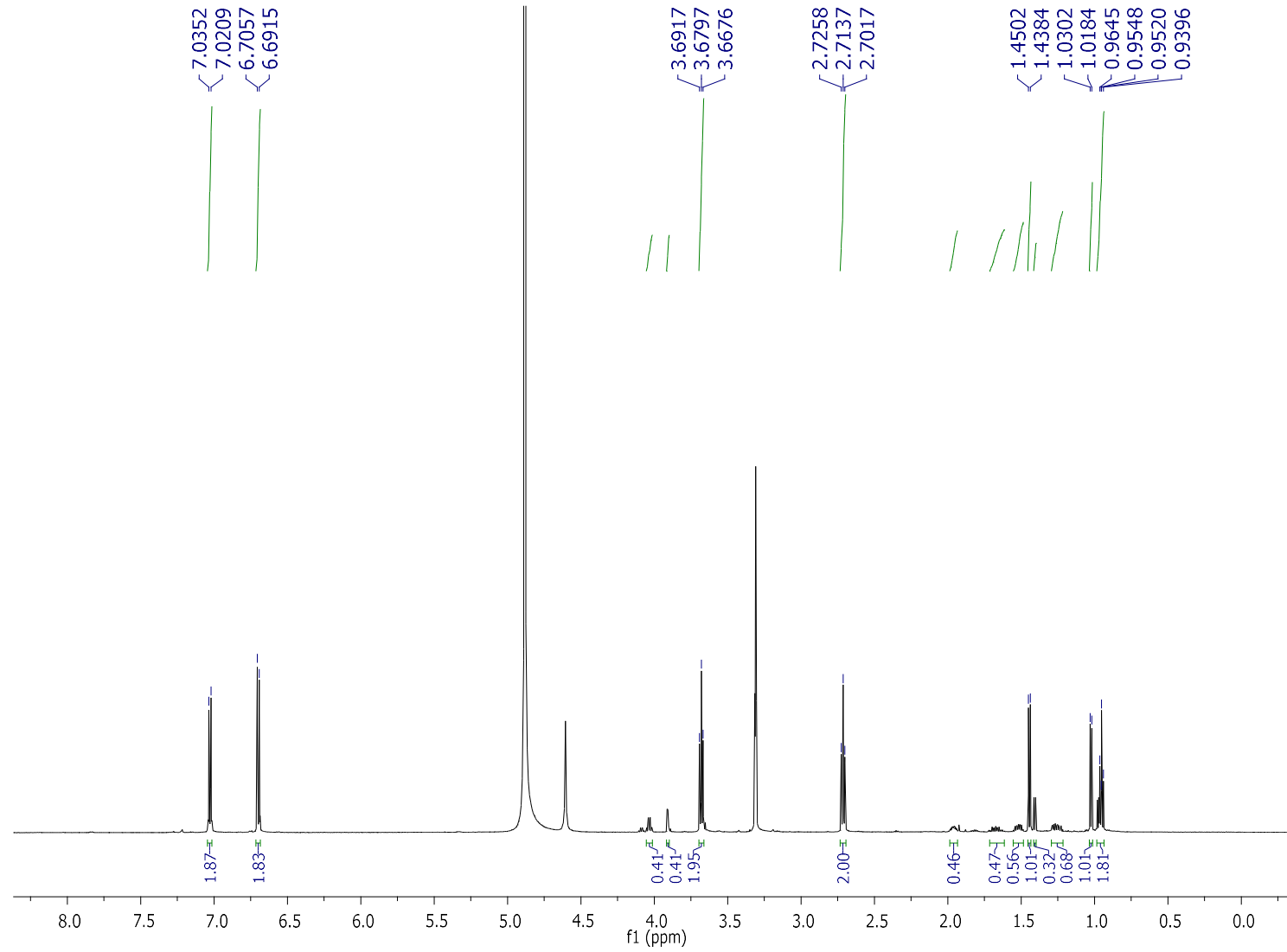


Figura 130. Mapa de contorno HSQC da substância **10** (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).

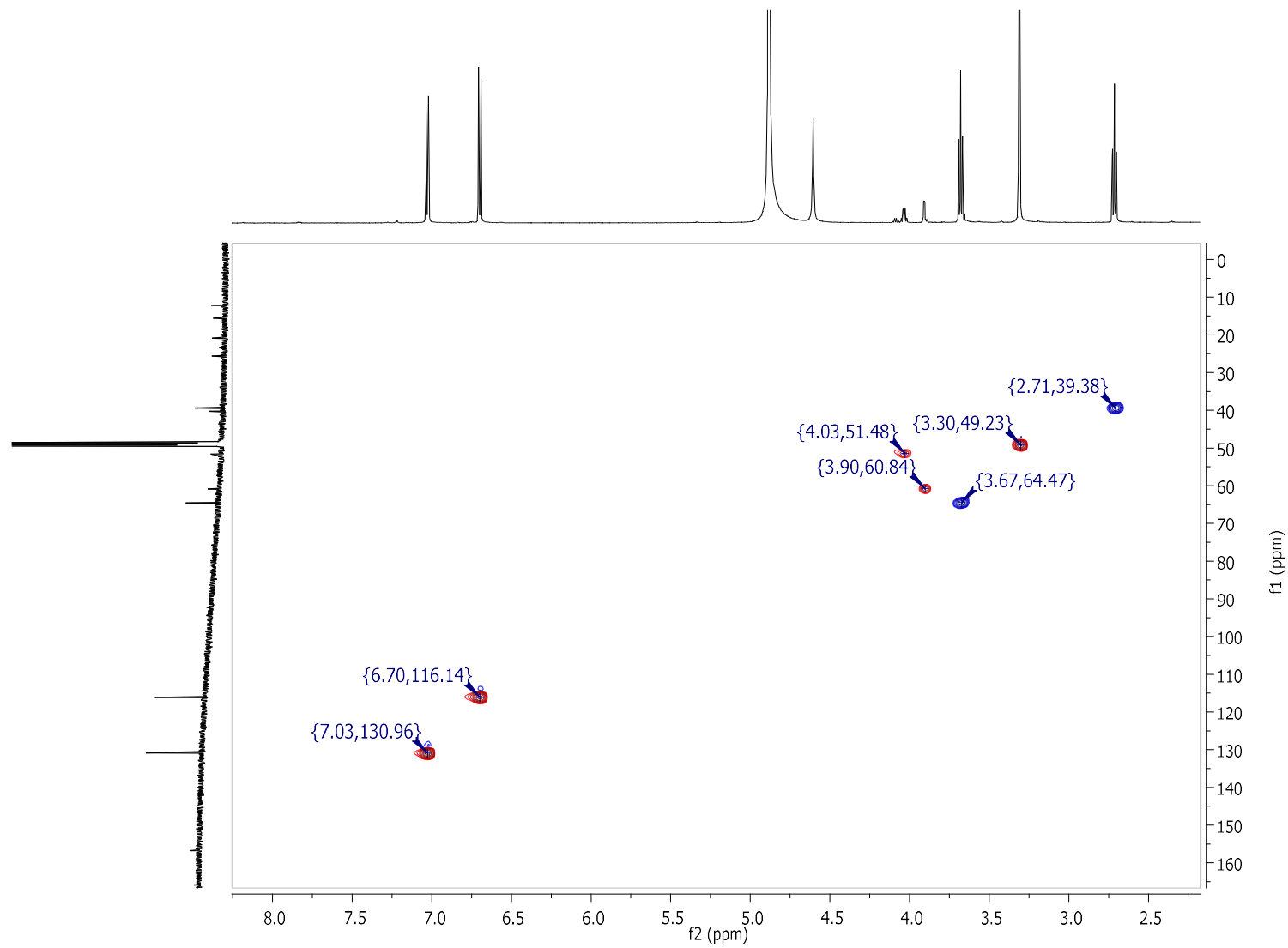
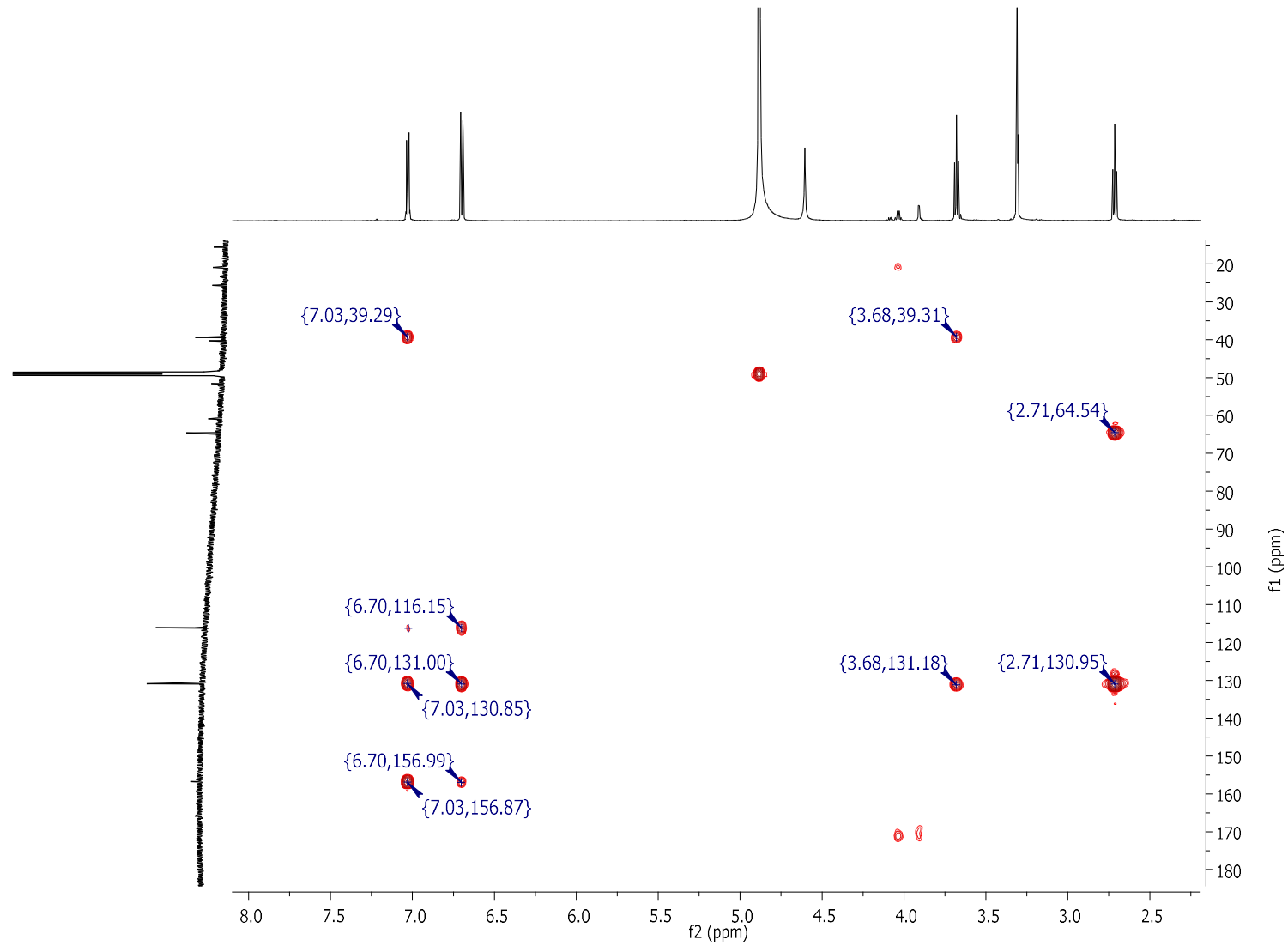
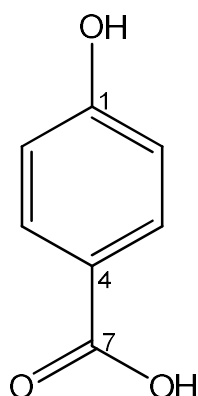


Figura 131. Mapa de contorno HMBC da substância **10** (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).





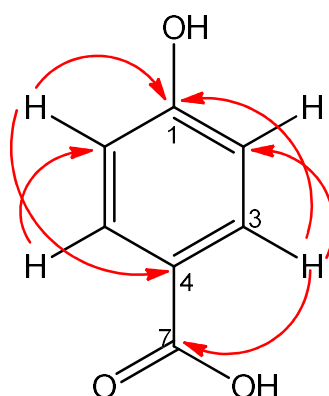
### 5.3.7 Identificação estrutural da substância **11**.



A análise em conjunto dos dados de RMN de  $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC (Figuras 133-135) da substância **11** permitiu identificar um anel aromático *para*-substituído em  $\delta_{\text{H}}$  7,87 (*d*;  $J = 8,7$  Hz; 2H) e  $\delta_{\text{H}}$  6,81 (*d*;  $J = 8,7$  Hz; 2H) e uma carbonila em  $\delta_{\text{C}}$  170,6.

No mapa de contorno HMBC visualizou-se correlações (Figuras 132 e 135) entre H-2/H-6 $\leftrightarrow$ C1/C4 e H-3/H-5 $\leftrightarrow$ C1/C2/C7. Estes dados (Tabela 22) aliados às informações da literatura (TEOH et al., 2016) permitiram identificar a substância **11** como ácido 4-hidroxibenzoico.

**Figura 132.** Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC da substância **11**.



Esta substância é relatada como metabólito secundário produzida por algumas espécies de fungos endofíticos, entre elas: *Alternaria alternata*, *Phomopsis asparagi* e *Fusarium oxysporum*. Apresenta atividade antimicrobiana e nematicida relevante, o que reforça o potencial dos fungos endofíticos como fonte de metabólitos que podem

atuar no controle de pragas, atuando como biopesticidas. Além disso, pode estar envolvido na comunicação química entre endófito-hospedeiro, possivelmente protegendo a planta hospedeira contra possíveis predadores, exercendo assim, um papel ecológico (XU et al., 2019; CHANG et al., 2018; HELENO et al., 2013; BOGNER et al., 2016).

**Tabela 22.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HMBC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 150 MHz) de **11** ( $\delta$  em ppm e  $J$  em Hz).

| Posição | $\delta_{\text{H}}$        | $\delta_{\text{C}}$ | HMBC           |
|---------|----------------------------|---------------------|----------------|
| 1       | -                          | 163,2               | -              |
| 2 e 6   | 6,81 ( $d$ ; $J = 8,7$ Hz) | 115,8               | C1; C4         |
| 3 e 5   | 7,87 ( $d$ ; $J = 8,7$ Hz) | 133,0               | C1; C2; C6; C7 |
| 4       | -                          | 123,0               | -              |
| 7       | -                          | 170,6               | -              |

Figura 133. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **11** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).

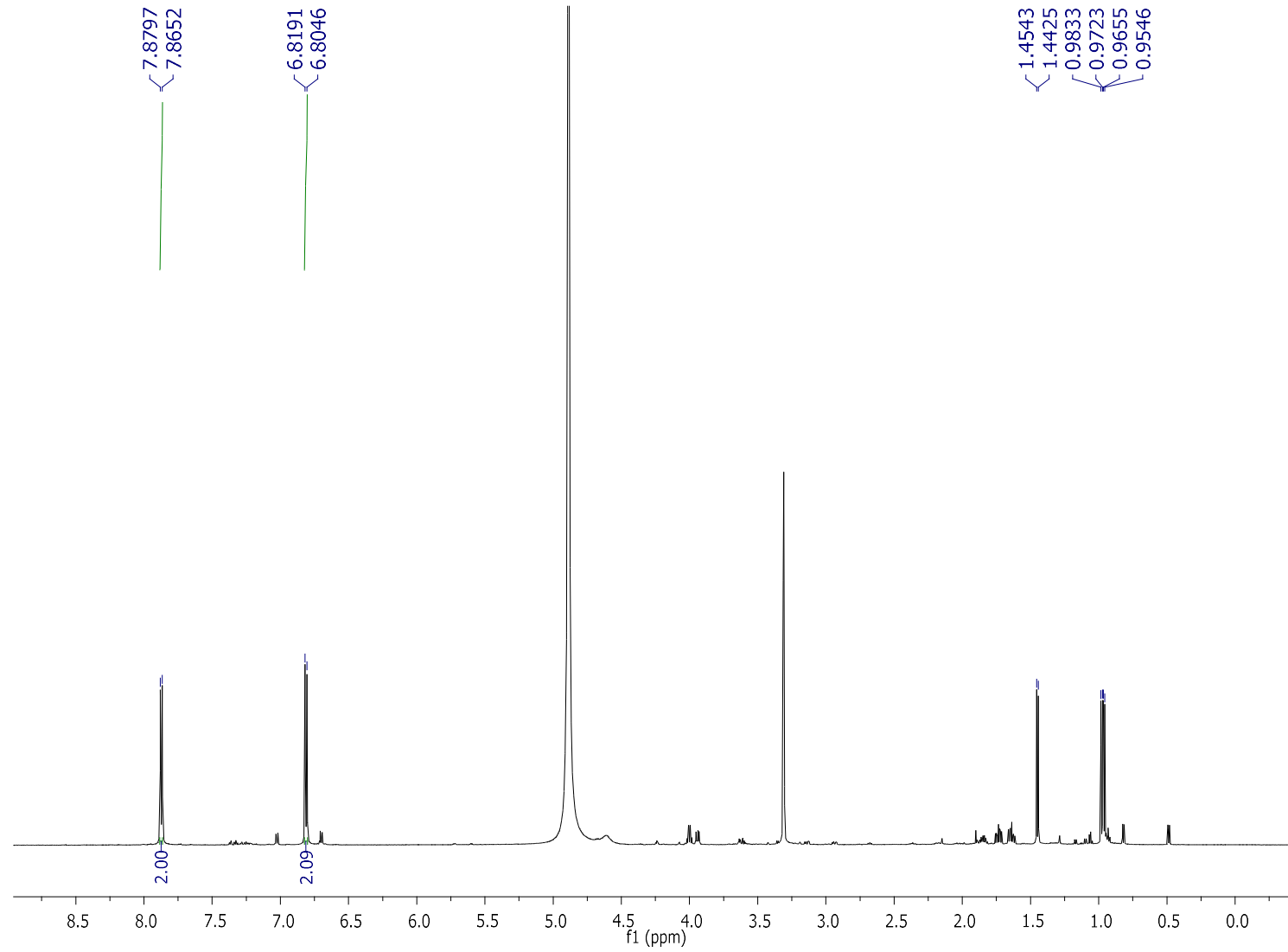


Figura 134. Mapa de contorno HSQC da substância 11 (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).

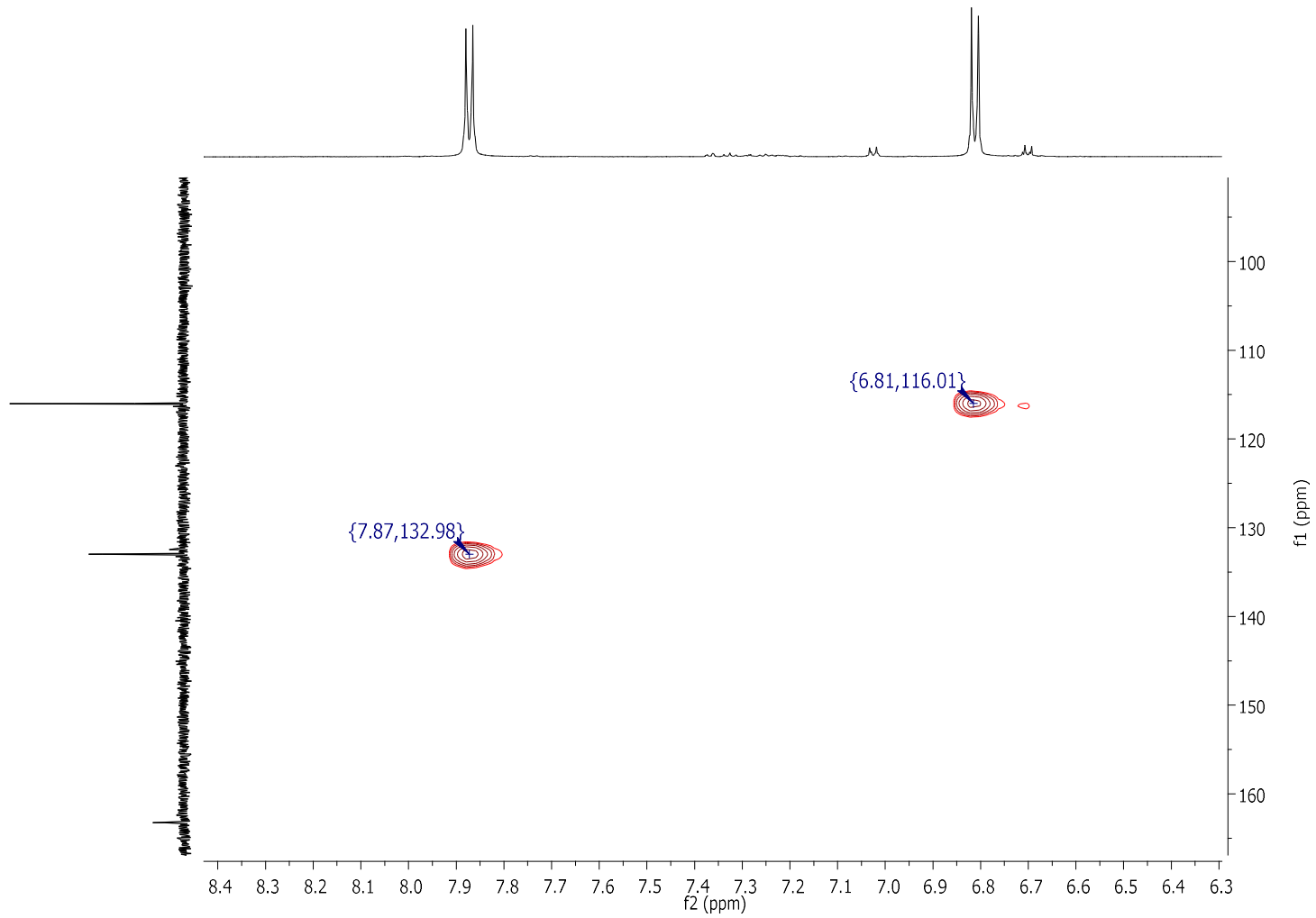
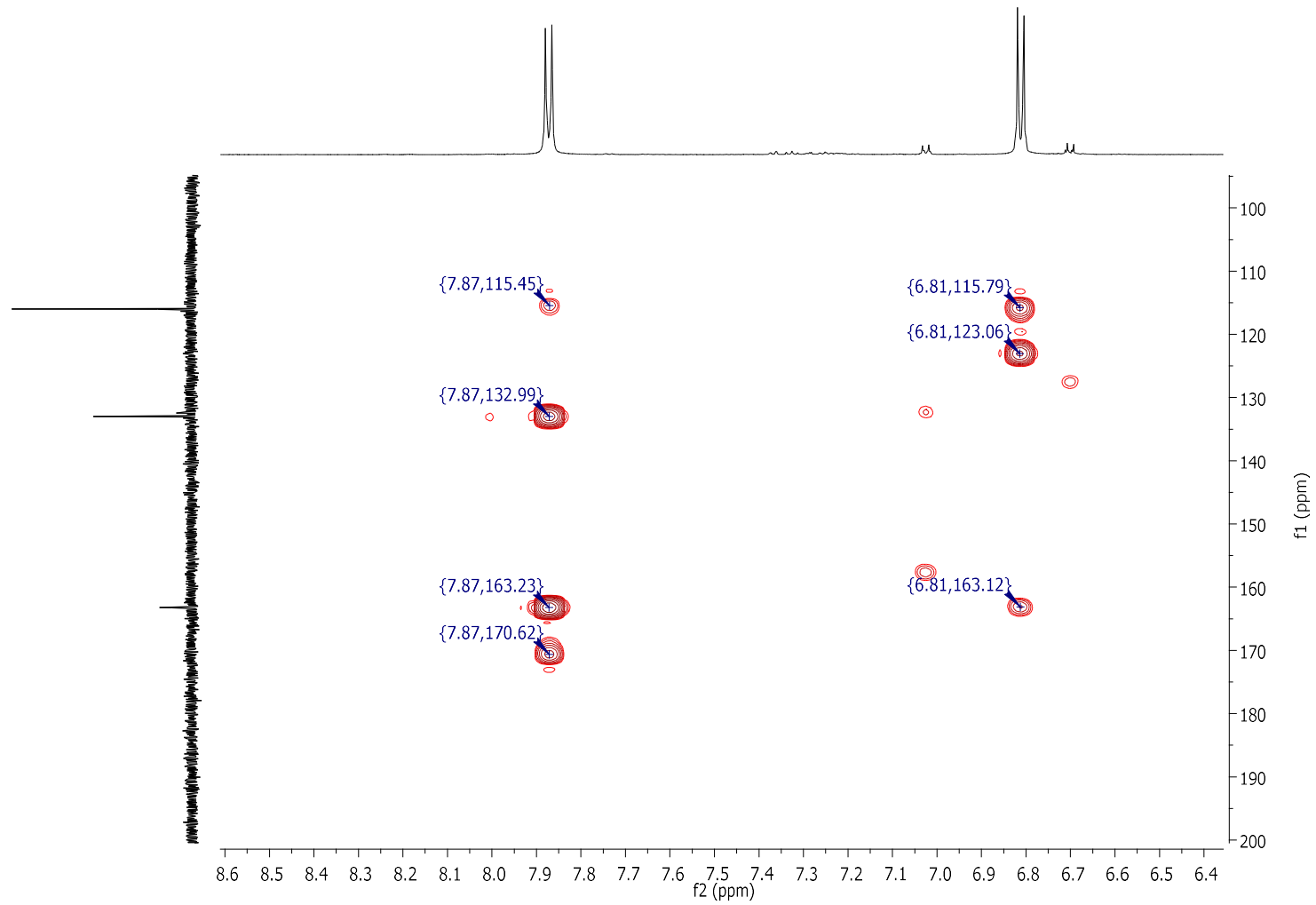
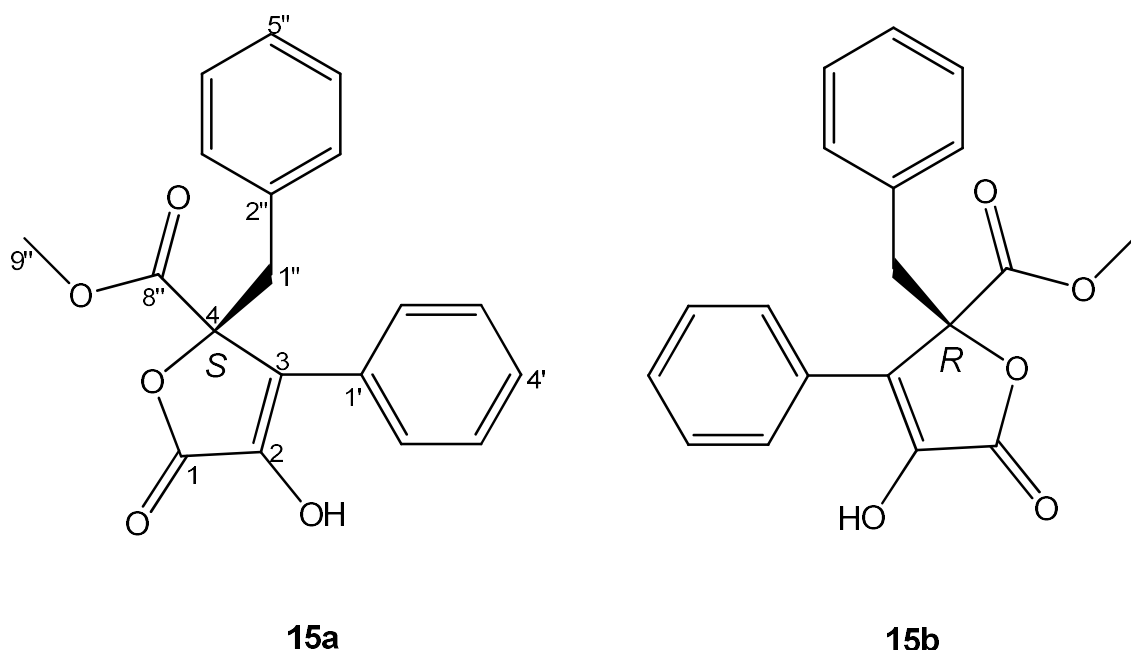


Figura 135. Mapa de contorno HMBC da substância **11** (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 MHz).



### 5.3.8 Identificação estrutural das substâncias **15a** e **15b**.



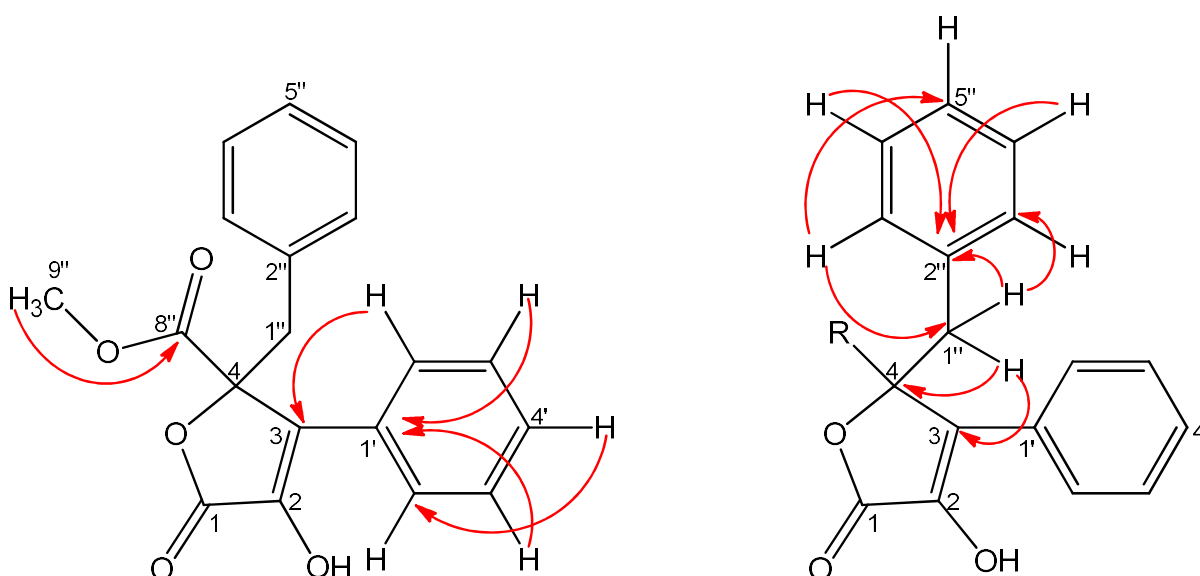
A análise dos dados de espectrometria de massas, ESI-Qq-TOF (Figura 138), modo positivo, apresentou para a substância **15**, a molécula sodiada de  $m/z$  347,0894  $[M+Na]^+$ , que associado aos experimentos de RMN uni e bidimensionais permitiram propor a fórmula molecular  $C_{19}H_{16}O_5$ .

Na análise conjunta dos dados de RMN de  $^1H$  e DEPTQ (Figuras 139 e 140), foram visualizados, dois sistemas aromáticos em  $\delta_H$  7,70 (2H; *dd*;  $J = 8,0$  e  $1,3$  Hz;  $\delta_C$  128,6), 7,47 (2H; *t*;  $J = 7,7$  Hz;  $\delta_C$  129,9), 7,41 (1H; *t*;  $J = 7,4$  Hz;  $\delta_C$  129,8), 7,15 (1H; *t*;  $J = 7,3$  Hz;  $\delta_C$  128,2), 7,11 (2H; *t*;  $J = 7,3$  Hz;  $\delta_C$  128,8) e 6,82 (2H; *dd*;  $J = 8,0$  e  $1,3$  Hz;  $\delta_C$  131,5), evidenciando dois anéis monossustituídos. Foram observados ainda um simpleto em  $\delta_H$  3,81 (3H;  $\delta_C$  54,0), atribuído a um grupo metoxílico e dois dupletos em  $\delta_H$  3,60 (1H;  $J = 14,6$  Hz;  $\delta_C$  40,1) e 3,56 (1H;  $J = 14,6$  Hz;  $\delta_C$  40,1), os quais mostraram correlação por HMBC com C-2" ( $\delta_C$  134,6), evidenciando a presença de um sistema benzílico na estrutura (Figura 142).

Adicionalmente, no espectro de DEPTQ, foram observados 16 carbonos  $sp^2$ , dos quais dez são carbonos metínicos e seis quaternários, incluindo duas carbonilas em  $\delta_C$  171,3 e 169,7, ambas atribuídas a grupo éster, confirmada por HMBC. Além de três carbonos  $sp^3$ : um quaternário, um metínico e um metilênico.

As correlações observadas em HMBC entre H-3'/H-5' ↔ C-1'/C4', H-4' ↔ C2'/C6', H-3''/H-7'' ↔ C5'', H-4''/H-6'' ↔ C2'' e H-5'' ↔ C3''/C7'', confirmaram a existência de dois anéis aromáticos monossustituídos. Foram observados também correlações entre H-1' ↔ C-3/C4/C2''/C3''/C7'', H-2'/H-6' ↔ C-3, H-3''/H-7'' ↔ C1'' e H-9'' ↔ C8'' (Figuras 136 e 142) evidenciando as conectividades essenciais para a confirmação da estrutura planar de **15**, cujos dados (Tabela 25) foram comparados com os descritos na literatura (YANG et al., 2018).

**Figura 136.** Principais correlações observadas em HMBC para **15**.

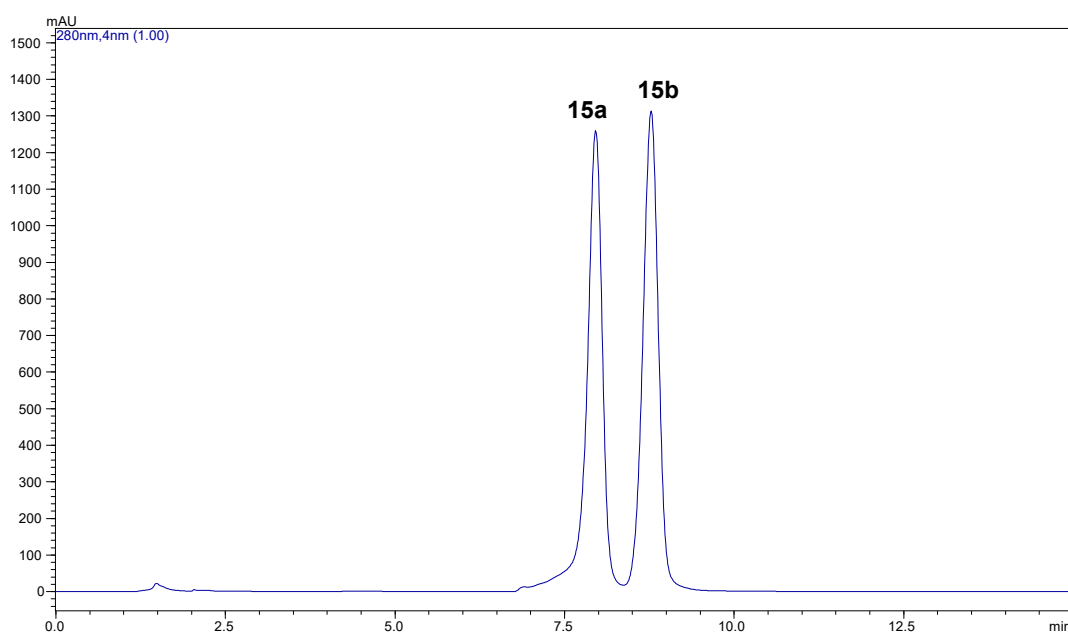


O valor obtido para a rotação óptica específica de **15** foi de  $[\alpha]_D^{25} -3,3$  (c 0,15, CH<sub>3</sub>OH), próximo a zero, sugerindo se tratar de uma mistura de enantiômeros. Para confirmar tal suposição, a substância **15** foi submetida a CLAE-DAD modo analítico, utilizando uma coluna de sílica fase reversa C18 quiral e eluição isocrática H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (53:47 v/v; 1 mL min<sup>-1</sup>) por 15 min. Após análise do perfil cromatográfico pode-se observar a presença de duas bandas com tempos de retenção distintos entre si (Figura 137). Estas por sua vez, foram separadas conforme metodologia descrita no item 3.2.4.2.3, sendo nomeadas **15a** e **15b**.

As configurações absolutas de **15a** e **15b** foram determinadas com base nos valores obtidos pelas análises de rotação óptica específica e comparação com os da

literatura. Assim, para **15a** o valor foi  $[\alpha]_D^{25} -16,7$  (c 0,15, CH<sub>3</sub>OH) e para **15b**  $[\alpha]_D^{25} +16,7$  (c 0,15, CH<sub>3</sub>OH), compatíveis com os valores descritos na literatura (YANG et al., 2018), sugerindo que a configuração absoluta de C-4 nas substâncias é S e R, respectivamente. Desta forma, com base em todas as informações obtidas, **15a** e **15b** foram caracterizadas como: (S)-2-benzil-4-hidroxi-5-oxo-3-fenil-2,5di-hidrofuran-2-carboxilato de metila (enantio-flavipesina B) e (R)-2-benzil-4-hidroxi-5-oxo-3-fenil-2,5-dihidrofuran-2-carboxilato de metila (flavipesina B).

**Figura 137.** Cromatograma das substâncias **15a** e **15b**, em coluna CHIRALCEL-OD-RH, eluição isocrática H<sub>2</sub>O/MeOH (53:47 v/v; 1 mL min<sup>-1</sup>) por 15 min, em 280 nm.



As substâncias **15a** e **15b** são conhecidas como ácidos fenilisotertrônicos naturais, derivados do ácido fenilpirúvico. A flavipesina B já foi isolada a partir dos fungos endofíticos *Aspergillus flavipes* AIL8 e *Phyllosticta* sp., enquanto que a enantio-flavipesina B foi produzida apenas por *Phyllosticta* sp., e para ambas já foi relatado atividade antimicrobiana relevante (BAI et al., 2014; YANG et al., 2018)

A atividade antibacteriana da enantio-flavipesina B e flavipesina B foi avaliada frente às bactérias Gram positivas (*S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 e *E. faecium* ATCC 700221) e Gram negativas (*A. baumannii* ATCC 1906, *K. pneumoniae* ATCC 700603 e *P. aeruginosa* ATCC 27853). A substância **15b** apresentou atividade significativa apenas frente à *S. aureus* ATCC 25923, com valor de 4 µg mL<sup>-1</sup> para concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida



mínima (CBM), sendo considerada bactericida, enquanto que a **15a** não foi ativo para nenhuma das cepas testadas (Tabelas 23 e 24). Estes resultados mostram que a mudança na estereoquímica conduz a alteração na resposta estrutura-atividade, e estimula a prosseguir com estudos posteriores, a fim de compreender o mecanismo de ação envolvido.

**Tabela 23.** Resultado da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) para a substância **15a**.

| <b>Linhagens bacterianas</b>     | <b>CIM<br/>(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> | <b>CBM<br/>(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> | <b>CBM/CIM</b> | <b>Atividade</b> |
|----------------------------------|--|--|----------------|------------------|
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923      | >128   | N.D.   | N.D.           | N.D.             |
| <i>E. faecalis</i> ATCC 29212    | >128   | N.D.   | N.D.           | N.D.             |
| <i>E. faecium</i> ATCC 700221    | >128   | N.D.   | N.D.           | N.D.             |
| <i>A. baumannii</i> ATCC 1906    | >128   | N.D.   | N.D.           | N.D.             |
| <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 | >128   | N.D.   | N.D.           | N.D.             |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853  | >128   | N.D.   | N.D.           | N.D.             |

CBM/CIM  $\leq$  4 atividade bactericida; CBM/CIM  $>$  4 atividade bacteriostática.

**Tabela 24.** Resultado da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) para a substância **15b**.

| <b>Linhagens bacterianas</b>     | <b>CIM<br/>(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> | <b>CBM<br/>(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> | <b>CBM/CIM</b> | <b>Atividade</b> |
|----------------------------------|--|--|----------------|------------------|
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923      | 4  | 4  | 1              | Bactericida      |
| <i>E. faecalis</i> ATCC 29212    | >128   | N.D.   | N.D.           | N.D.             |
| <i>E. faecium</i> ATCC 700221    | >128   | N.D.   | N.D.           | N.D.             |
| <i>A. baumannii</i> ATCC 1906    | >128   | N.D.   | N.D.           | N.D.             |
| <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 | >128   | N.D.   | N.D.           | N.D.             |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853  | >128   | N.D.   | N.D.           | N.D.             |

CBM/CIM  $\leq$  4 atividade bactericida; CBM/CIM  $>$  4 atividade bacteriostática.

**Tabela 25.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HMBC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 150 MHz) de **15a** e **15b** ( $\delta$  em ppm e  $J$  em Hz).

| Posição          | $\delta_{\text{H}}$                      | $\delta_{\text{C}}$ | HMBC                     |
|------------------|--|---------------------|--------------------------|
| <b>1</b>         | -  | 169,7               | -                        |
| <b>2</b>         | -  | 138,6               | -                        |
| <b>3</b>         | -  | 127,8               | -                        |
| <b>4</b>         | -  | 86,7                | -                        |
| <b>1'</b>        | -  | 131,8               | -                        |
| <b>2' e 6'</b>   | 7,70 ( <i>dd</i> ; $J = 7,9$ e $1,3$ Hz) | 128,6               | *                        |
| <b>3' e 5'</b>   | 7,47 ( <i>t**</i> ; $J = 7,9$ Hz)        | 129,9               | C1'; C4'                 |
| <b>4'</b>        | 7,41 ( <i>t**</i> ; $J = 7,9$ Hz)        | 129,8               | C2'; C6'                 |
| <b>1''</b>       | 3,60 ( <i>d</i> ; $J = 14,6$ Hz)         | 40,1                | C3; C4; C2''; C3''; C7'' |
|                  | 3,56 ( <i>d</i> ; $J = 14,6$ Hz)         |                     | C4; C2''; C3''; C7''     |
| <b>2''</b>       | -  | 134,6               | -                        |
| <b>3'' e 7''</b> | 6,82 ( <i>dd</i> ; $J = 7,5$ e $1,3$ Hz) | 131,5               | C1''; C5''               |
| <b>4'' e 6''</b> | 7,11 ( <i>t**</i> ; $J = 7,5$ Hz)        | 128,8               | C2''                     |
| <b>5''</b>       | 7,15 ( <i>t**</i> ; $J = 7,5$ Hz)        | 128,2               | C3''; C7''               |
| <b>8''</b>       | -  | 171,3               | -                        |
| <b>9''</b>       | 3,81 ( <i>s</i> )                        | 54,0                | C8''                     |

\*Sinal não observado; \*\*tripleto aparente

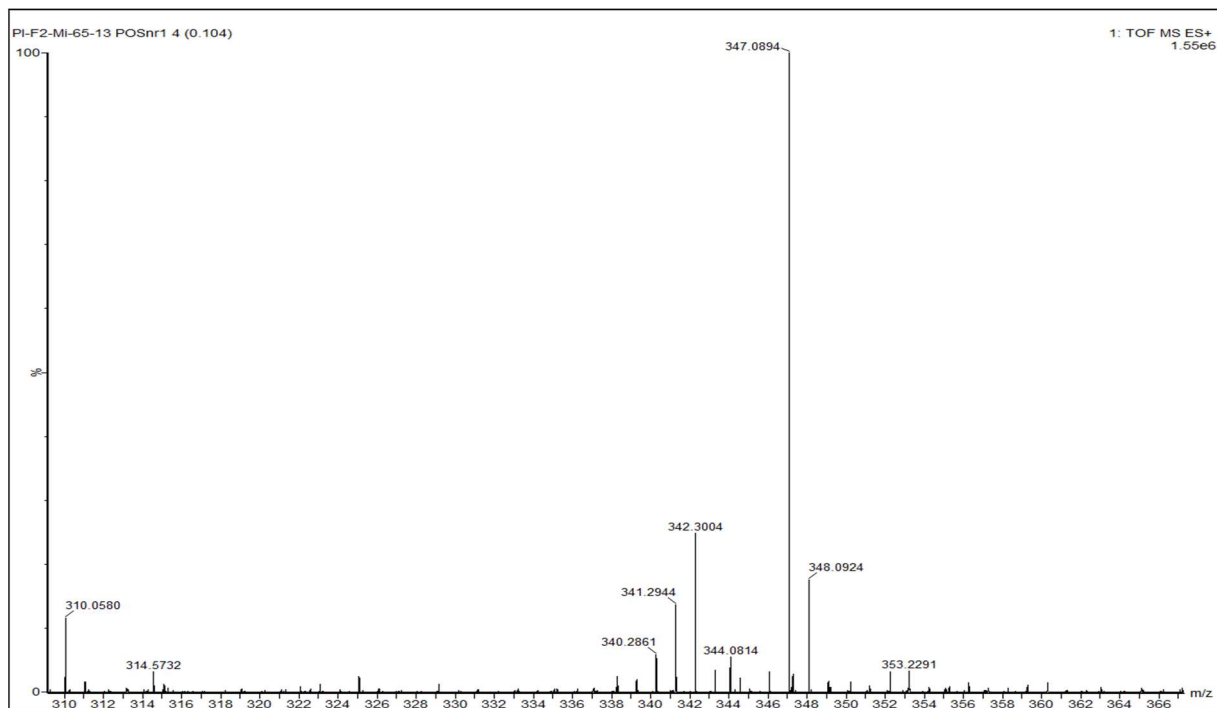
**Figura 138.** Espectro de massas de alta resolução da substância **15** (ESI-Qq-TOF).

Figura 139. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **15a** e **15b** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 Mz).

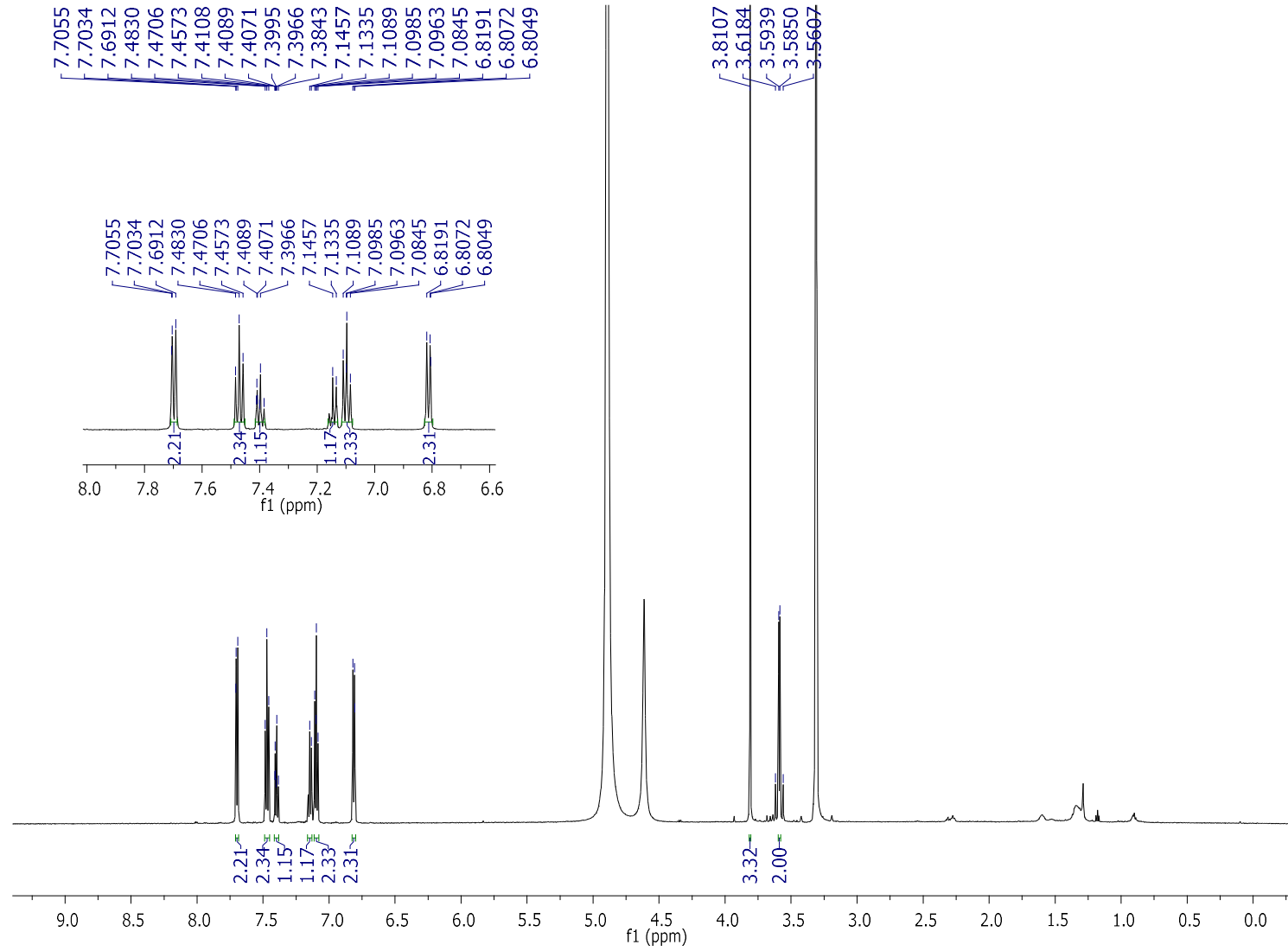


Figura 140. Espectro de DEPTQ das substâncias **15a** e **15b** (CD<sub>3</sub>OD; 150 Mz).

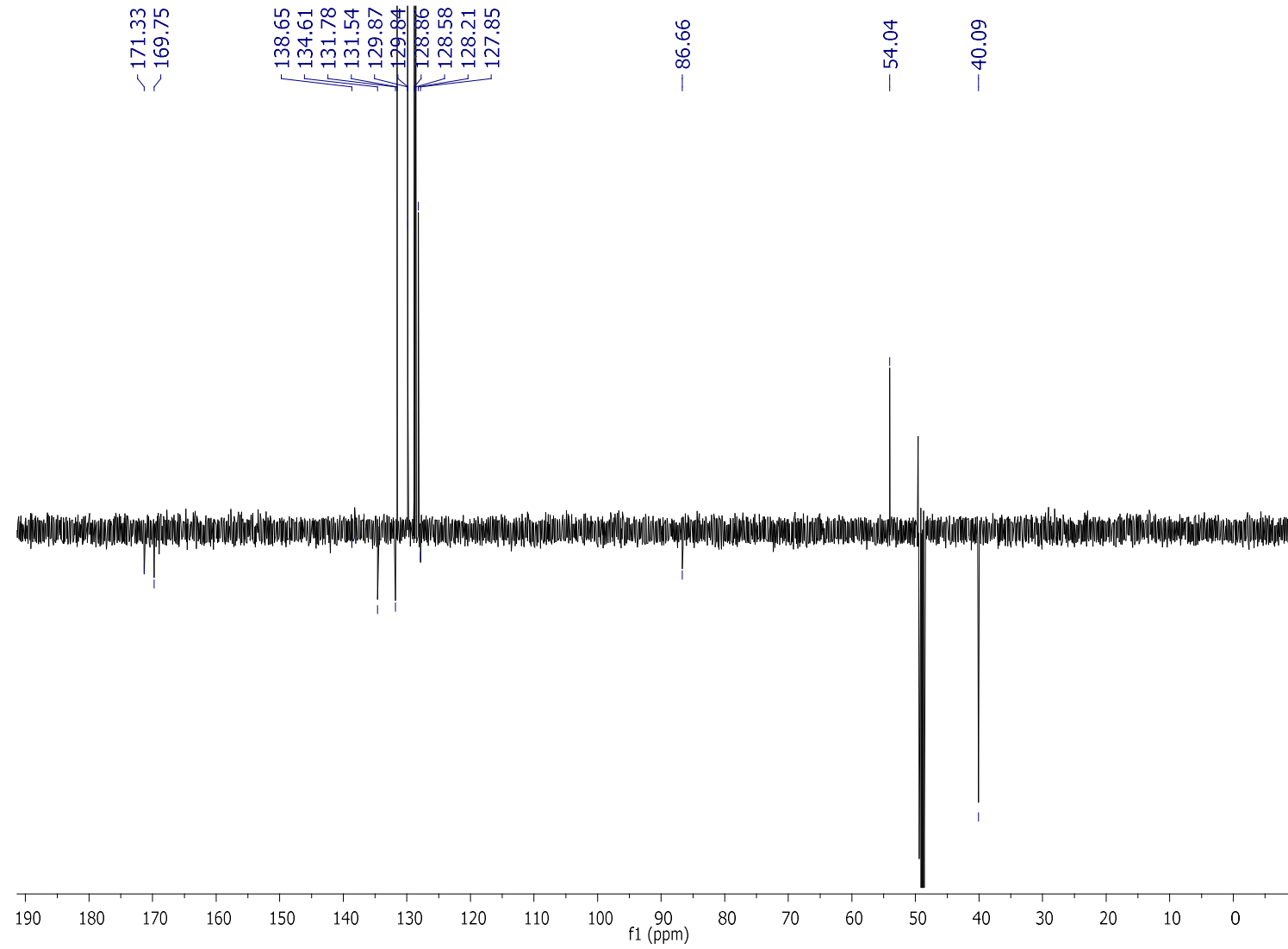


Figura 141. Mapa de contorno HSQC das substâncias **15a** e **15b** (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 Mz).

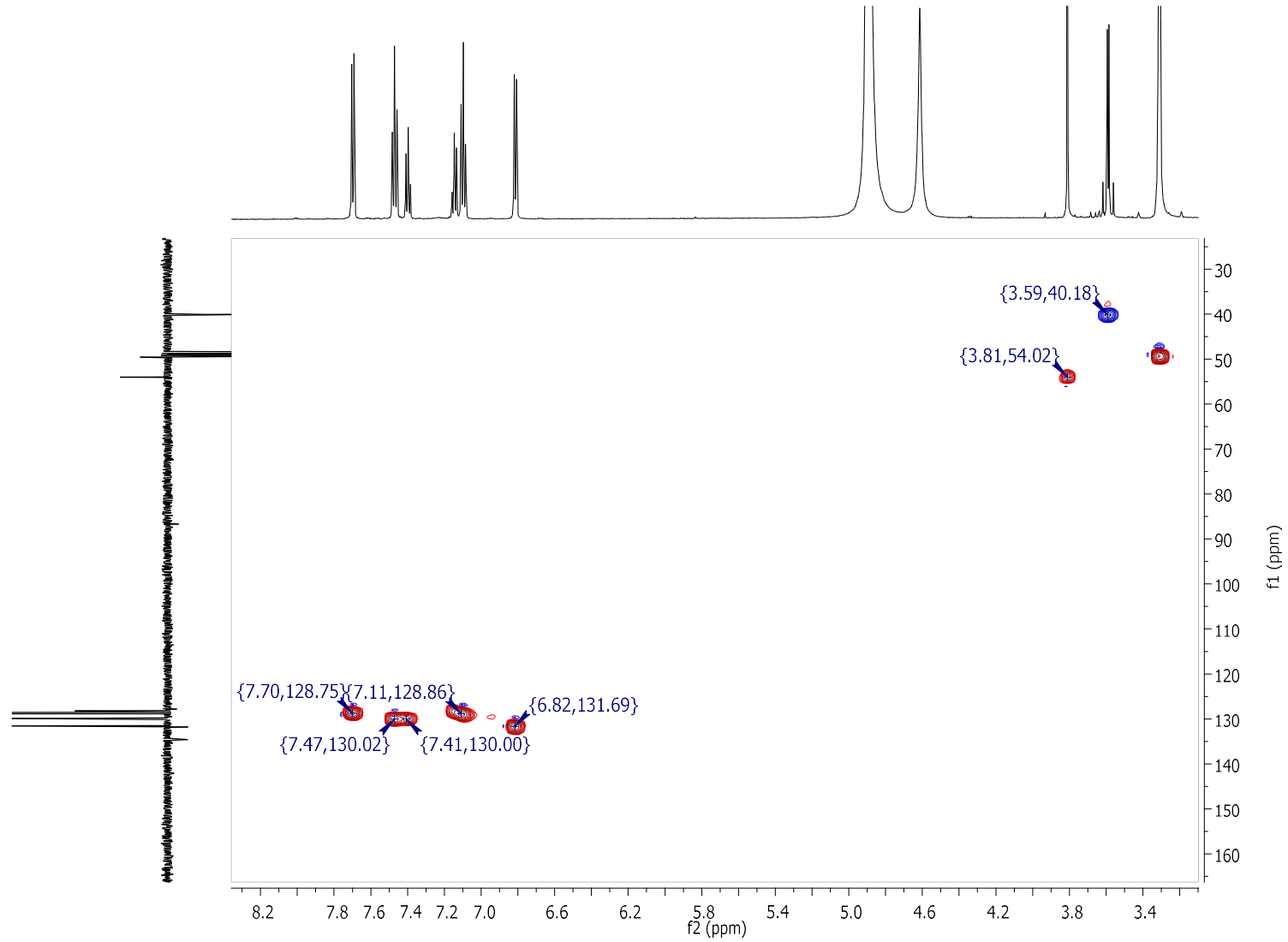


Figura 142. Mapa de contorno HMBC das substâncias **15a** e **15b** (CD<sub>3</sub>OD; 600 e 150 Mz).

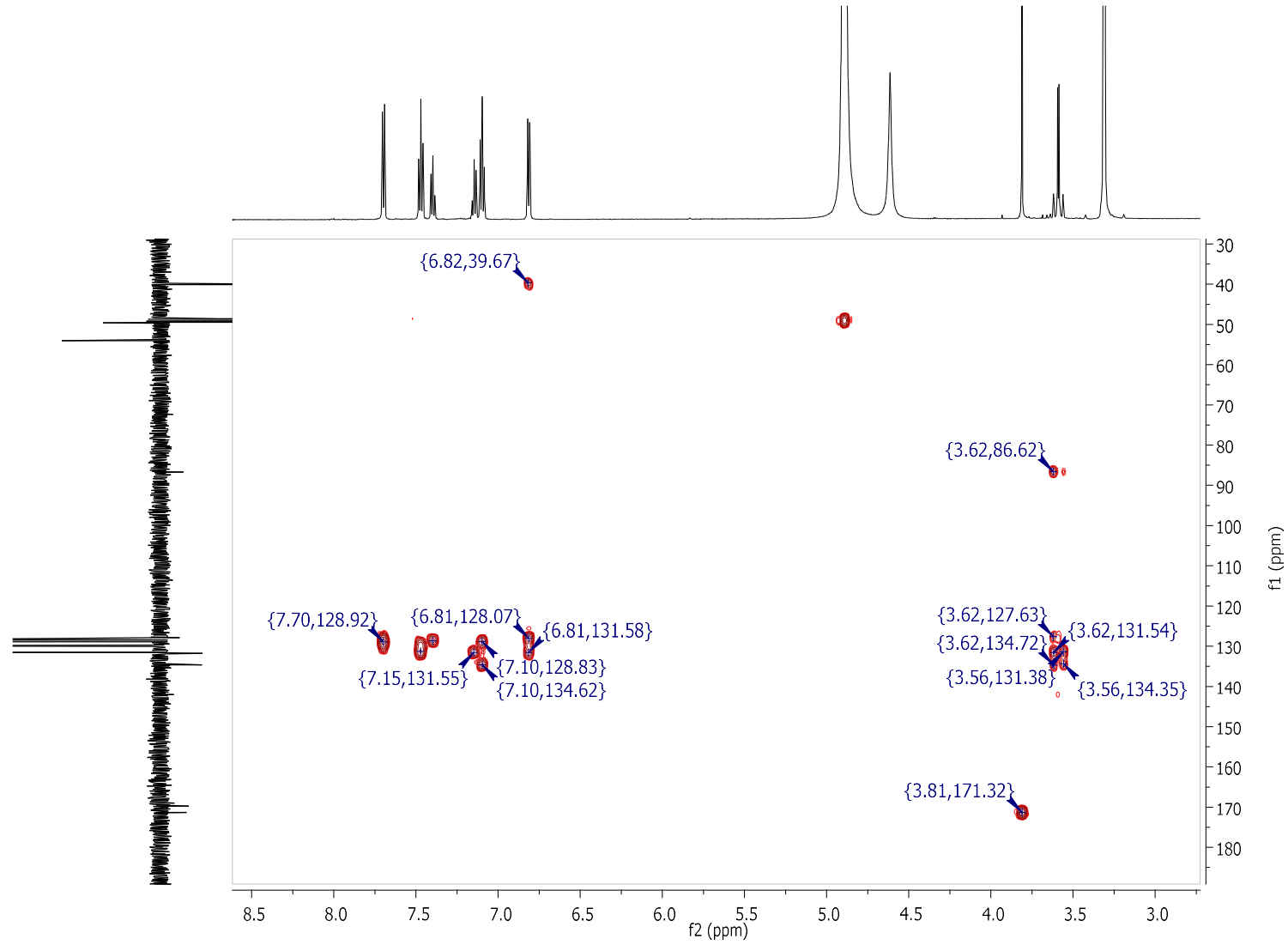
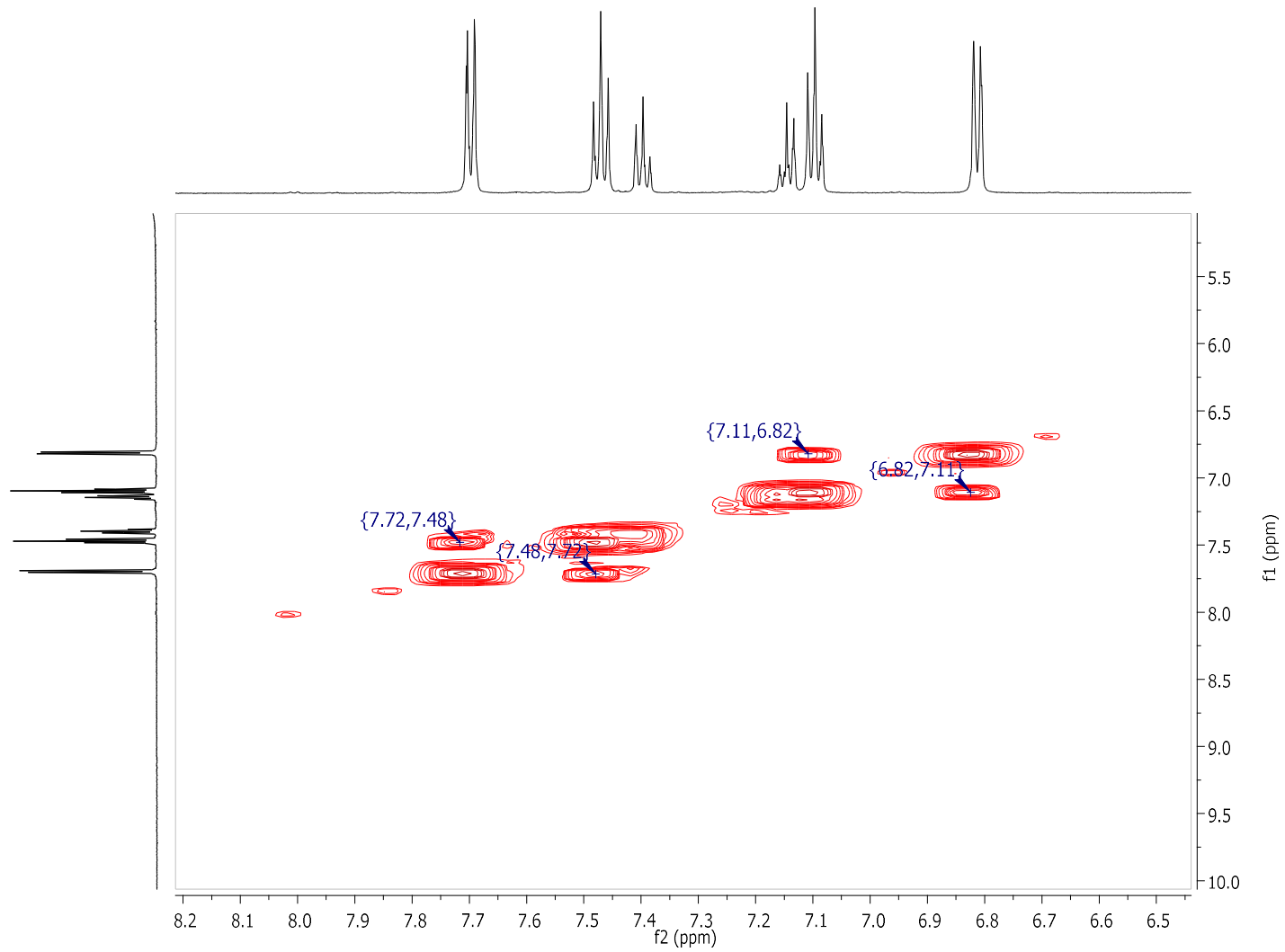


Figura 143. Mapa de contorno COSY das substâncias **15a** e **15b** (CD<sub>3</sub>OD; 600 Mz).





## **6. Identificação dos compostos orgânicos voláteis (COVs) de *D. hongkongensis* e *P. elongata***

É relatado que a produção de COVs por espécies fúngicas ocorre por mecanismos diversificados em função das diferentes fontes de nutrientes (BAGO et al., 1999). Desta forma, para investigar o perfil químico dos COVs produzidos pelos fungos endofíticos *D. hongkongensis* e *P. elongata*, estes foram submetidos a diferentes condições de cultivo. Foram realizados experimentos de cultivo simples e co-cultura destes endófitos, no qual utilizou-se dois meios de cultivo sólido, sendo o BDA e o milho, e dois períodos de incubação distintos (7 e 14 dias), com as extrações e análises dos COVs realizadas no final de cada período.

Para a identificação dos compostos voláteis, foi calculado índice de retenção (IR) de cada constituinte usando a equação de VAN DEN DOOL e KRATZ (pág. 45), utilizando como referência uma série homóloga de alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>40</sub>). O índice de retenção é um número obtido pela interpolação do tempo de retenção do componente de interesse com os tempos de retenção de dois padrões da série homóloga de alcanos eluídos imediatamente antes e após o composto de interesse.

A identificação de cada composto foi proposta comparando o valor do IR calculado com os dados da literatura (NIST), e confirmada quando a comparação do espectro de massas obtido com o da literatura apresentou similaridade acima de 85%.

### **6. 1 Análise dos COVs de *D. hongkongensis***

Após análise dos cromatogramas obtidos do cultivo simples de *D. hongkongensis*, em BDA, durante 7 e 14 dias de incubação (Figura 144), observou-se uma semelhança no perfil cromatográfico de ambos, o que também foi observado nos cromatogramas obtidos do cultivo em meio de milho (7 e 14 dias) (Figura 145).

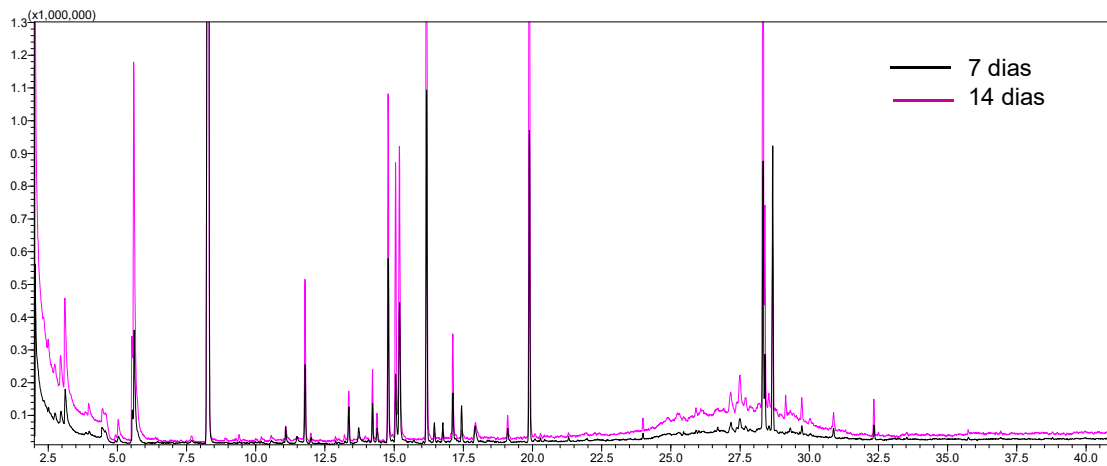
Entretanto, após comparação dos dados de índice de retenção e espectros de massas experimentais com os dados da literatura, pode-se observar diferenças na produção de COVs. O cultivo de *D. hongkongensis* em BDA com 7 dias de incubação apresentou uma maior produção de compostos voláteis, totalizando 13 COVs, quando comparado com o cultivo, neste mesmo meio, em 14 dias de incubação. No entanto, a condição que apresentou a maior produção de COVs foi o cultivo de *D.*

*hongkongensis* em milho durante 7 dias de incubação, sendo produzidos 28 compostos voláteis, enquanto que com 14 dias de incubação, observou-se uma diminuição desses compostos, sendo observados 26 COVs (Tabela 26).

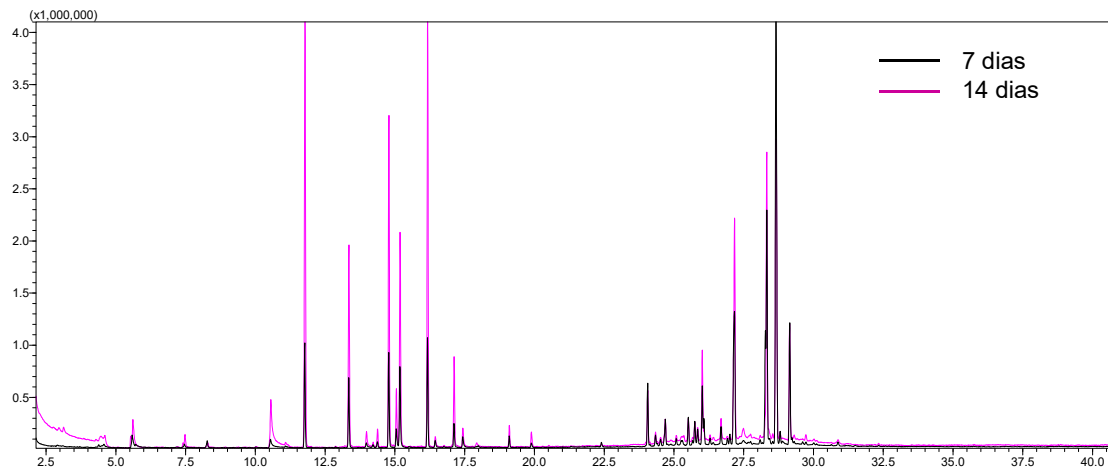
Um total de 29 COVs foram identificados, a partir do cultivo simples deste endófito, em diferentes condições de cultivo, os quais não foram observados nos cultivos controle. A maioria destes pertence às classes dos monoterpenos e sesquiterpenos, além disso, também foram identificados hidrocarbonetos, álcoois, ésteres de baixo peso molecular.

É importante destacar que alguns compostos voláteis foram produzidos por este endófito, nos dois meios de cultivo e nos dois períodos de incubação (Tabela 26), e esta prevalência em todas as condições credenciam este grupo de COVs como possíveis marcadores químicos para este fungo.

**Figura 144.** Comparação dos perfis cromatográficos dos COVs de *D. hongkongensis* cultivado em BDA e analisado após 7 e 14 dias.



**Figura 145.** Comparação dos perfis cromatográficos dos COVs de *D. hongkongensis* cultivado em milho e analisado após 7 e 14 dias.



**Tabela 26.** Compostos orgânicos voláteis identificados de *D. hongkongensis* em diferentes condições de cultivo.

| Composto                             | IR1  | IR2  | BDA7 | BDA14 | Milho7 | Milho14 |
|--------------------------------------|------|------|------|-------|--------|---------|
| Acetato de etila                     | -    | 615  | *    | *     | -      | -       |
| 3-Metilbutan-1-ol                    | -    | 736  | *    | *     | *      | *       |
| Estireno                             | 892  | 890  | -    | -     | *      | *       |
| $\alpha$ -Thujeno                    | 928  | 926  | *    | *     | *      | *       |
| Sabineno                             | 975  | 975  | *    | *     | *      | *       |
| $\alpha$ -Felandreno                 | 1006 | 1006 | -    | -     | *      | *       |
| $\alpha$ -Terpineno                  | 1018 | 1018 | *    | *     | *      | *       |
| <i>p</i> -Cimeno                     | 1027 | 1028 | *    | *     | *      | *       |
| D-Limoneno                           | 1031 | 1031 | -    | -     | *      | *       |
| $\gamma$ -Terpineno                  | 1062 | 1062 | *    | *     | *      | *       |
| <i>cis</i> -4-Thujanol               | 1070 | 1068 | *    | -     | *      | *       |
| Terpinoleno                          | 1091 | 1091 | *    | *     | *      | *       |
| <i>cis-p</i> -menth-2-en-1-ol        | 1101 | 1103 | *    | -     | *      | *       |
| Terpinen-4-ol                        | 1182 | 1182 | *    | *     | *      | *       |
| $\gamma$ -Selineno                   | 1330 | -    | -    | -     | *      | *       |
| (-)-Aristoleno                       | 1340 | -    | -    | -     | *      | *       |
| llangeno                             | 1353 | 1351 | -    | -     | *      | *       |
| Isolongifoleno                       | 1368 | 1367 | -    | -     | *      | *       |
| (+)-ciclosativeno                    | 1384 | 1383 | -    | -     | *      | *       |
| (-)-Isocomeno                        | 1397 | 1388 | -    | -     | *      | *       |
| Longifoleno                          | 1406 | 1406 | -    | -     | *      | *       |
| $\alpha$ -Guaieno                    | 1414 | 1413 | -    | -     | *      | *       |
| Cariofileno                          | 1430 | 1430 | -    | -     | *      | *       |
| $\beta$ -Copaeno                     | 1439 | -    | -    | -     | *      | -       |
| <i>trans</i> - $\alpha$ -Bergamoteno | 1443 | 1441 | -    | -     | *      | -       |
| $\beta$ -bisaboleno                  | 1493 | 1491 | -    | -     | *      | *       |
| Aristoluqueno                        | 1495 | 1494 | *    | *     | *      | *       |
| $\alpha$ -Muuroleno                  | 1510 | 1506 | *    | *     | *      | *       |
| <i>E</i> - $\beta$ -Fameseno         | 1515 | -    | -    | -     | *      | *       |

IR1: Índices de retenção calculados; IR2: Índices de retenção da literatura; \*composto identificado; BDA7: Meio de batata dextrose ágar (7 dias); BDA14: Meio de batata dextrose ágar (14dias); Meio de milho (7 e 14 dias).

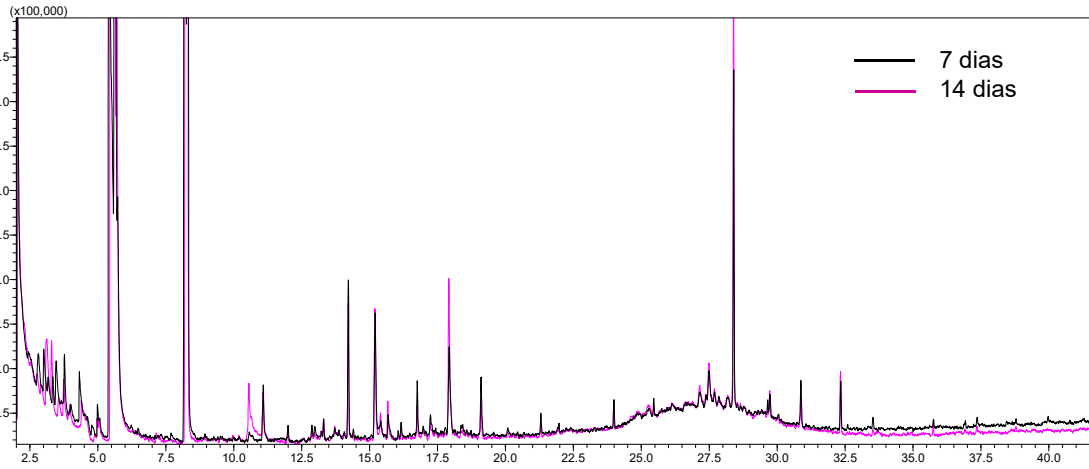
## 6. 2 Análise dos COVs de *P. elongata*

Os cromatogramas obtidos do cultivo de *P. elongata*, em BDA, durante 7 e 14 dias de incubação, exibiram perfil cromatográfico semelhante para ambos períodos. Além disso, foi observado semelhança nos cromatogramas obtidos do cultivo em meio de milho (7 e 14 dias). Entretanto, observou-se uma diferença significativa ao comparar os cromatogramas obtidos nos dois meios de cultivos (Figuras 146 e 147).

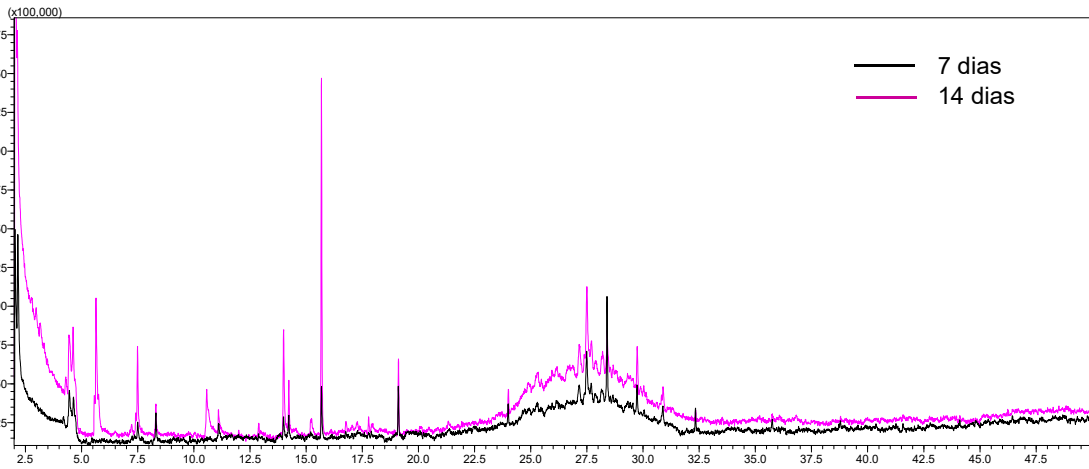
Estas observações preliminares foram confirmadas, após comparação dos dados de índice de retenção e espectros de massas experimentais com os descritos na literatura. A condição que apresentou a maior produção de COVs foi o cultivo de *P. elongata* em BDA durante 14 dias de incubação, sendo produzidos 8 compostos voláteis, enquanto que em 7 dias, foram observados 7 COVs. Contudo, observou-se que o cultivo deste endófito em milho apresentou uma menor produção de compostos, sendo identificados 1 e 4 COVs, nos períodos de 7 e 14 dias de incubação, respectivamente (Tabela 27).

Portanto, 8 compostos foram produzidos, a partir do cultivo simples deste endófito, em diferentes condições de cultivo, sendo identificados álcoois, ésteres, cetona e um hidrocarboneto aromático, os quais não foram observados nos cultivos controle. Outra observação é que apenas o composto identificado como 2-etil-hexanoato de metila foi produzido por este endófito, nos dois meios de cultivo e nos dois períodos de incubação. Esta observação caracteriza este composto como um possível marcador químico volátil para o fungo endofítico *P. elongata*.

**Figura 146.** Comparação dos perfis cromatográfico dos COVs de *P. elongata* cultivado em BDA e analisado após 7 e 14 dias.



**Figura 147.** Comparação dos perfis cromatográfico dos COVs de *P. elongata* cultivado em milho e analisado após 7 e 14 dias



**Tabela 27.** Compostos orgânicos voláteis identificados de *P. elongata* em diferentes condições de cultivo.

| Composto                   | IR1  | IR2  | BDA7 | BDA14 | Milho7 | Milho14 |
|----------------------------|------|------|------|-------|--------|---------|
| Acetoina                   | -    | 720  | *    | *     | -      | -       |
| 3-Metilbutan-1-ol          | -    | 736  | *    | *     | -      | *       |
| 2-Metilbutan-1-ol          | -    | 739  | *    | *     | -      | *       |
| Estireno                   | 892  | 890  | -    | *     | -      | *       |
| Propionato de geranila     | 1031 | -    | *    | *     | -      | -       |
| 2-etil-hexanoato de metila | 1046 | -    | *    | *     | *      | *       |
| 2-feniletanol              | 1117 | 1117 | *    | *     | -      | -       |
| Fenilmetanol               | 1038 | 1037 | *    | *     | -      | -       |

IR1: Índices de retenção calculados; IR2: Índices de retenção da literatura; \*composto identificado; BDA7: Meio de batata dextrose ágar (7 dias); BDA14: Meio de batata dextrose ágar (14dias); Meio de milho (7 e 14 dias).

### 6. 3 Análise dos COVs do co-cultivo

Após análise dos cromatogramas obtidos do co-cultivo de *D. hongkongensis* e *P. elongata*, em BDA, durante 7 e 14 dias de incubação, observou-se uma semelhança no perfil cromatográfico de ambos (Figura 148), o que também foi observado nos cromatogramas obtidos do co-cultivo em meio de milho (7 e 14 dias) (Figura 149).

Estas observações foram confirmadas, após comparação dos dados de índice de retenção e espectros de massas experimentais com os descritos na literatura, que possibilitou identificar, no cultivo em BDA, 18 compostos voláteis para ambos períodos de incubação (7 e 14 dias). O co-cultivo em milho, também apresentou igual número de COVs, para os dois períodos, sendo identificados 22 compostos (Tabela 28).

Assim, 25 COVs foram identificados a partir do co-cultivo destes endófitos, em diferentes condições de cultivo, os quais não foram observados nos cultivos controle. A maioria destes compostos pertence às classes dos monoterpenos e sesquiterpenos, além disso, também foram identificados hidrocarbonetos, ésteres e álcoois de baixa massa molecular.

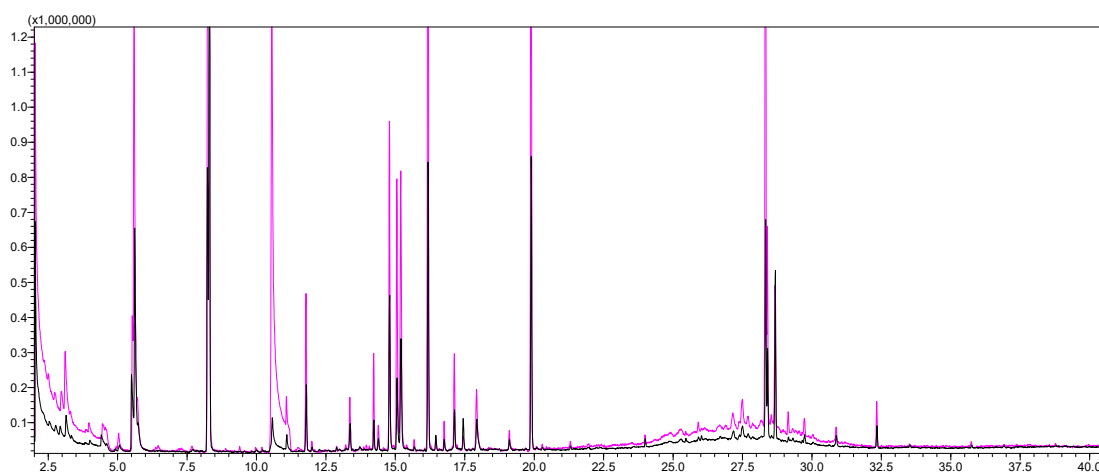
Os resultados obtidos do co-cultivo e dos experimentos de cultivo individual de cada endófito foram comparados, no qual pode-se observar uma predominância do COVs produzidos pelo fungo *D. hongkongensis*. Além disso, também não foram identificados novos compostos, isto é, exclusivos do co-cultivo, que poderiam estar

envolvidos na interação endófito-endófito. Entretanto, observou-se que alguns compostos produzidos por *P. elongata*, em cultura simples, não foram identificados nos experimentos de co-cultivo, sendo estes a acetoina, propionato de geranila e o fenilmetanol.

Estes resultados sugerem que os COVs produzidos pelo *D. hongkongensis* podem estar inibindo a produção de metabólitos do endófito *P. elongata*, pois durante os experimentos de co-cultivo, observou-se uma inibição no crescimento de *P. elongata*, o que não foi observado para *D. hongkongensis*, o qual se desenvolveu normalmente durante os experimentos.

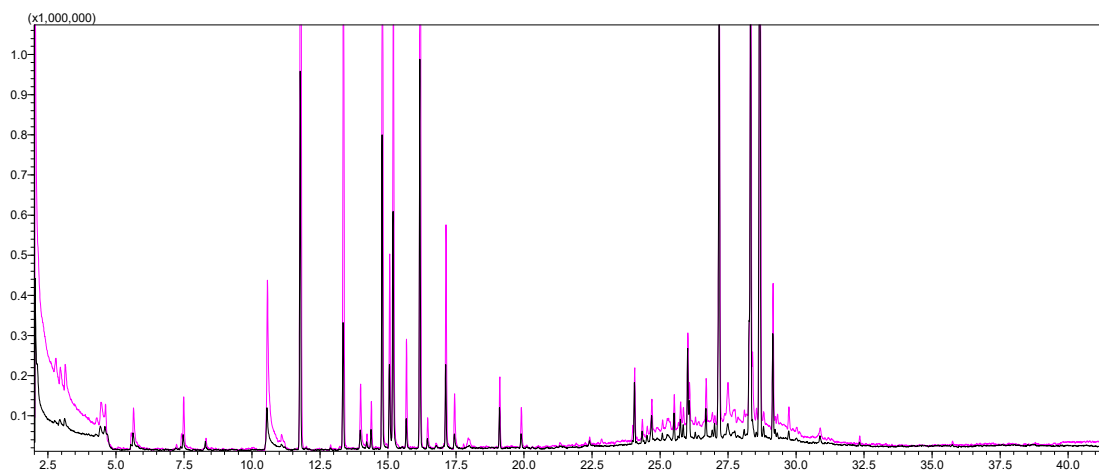
Os experimentos de co-cultivo foram realizados para estimular a produção de metabólitos voláteis em resposta à interação entre os microrganismos. Sendo assim, sugere-se a produção de compostos com potencial de inibição no crescimento fúngico.

**Figura 148.** Comparação dos perfis cromatográfico dos COVs obtidos do co-cultivo de *D. hongkongensis* e *P. elongata*, cultivados em BDA e analisado após 7 e 14 dias.





**Figura 149.** Comparação dos perfis cromatográfico dos COVs obtidos do co-cultivo de *D. hongkongensis* e *P. elongata*, cultivados em milho e analisado após 7 e 14 dias.



**Tabela 28.** Compostos orgânicos voláteis identificados no co-cultivo de *D.hongkongensis* e *P. elongata* em diferentes condições de cultivo.

| Composto                             | IR1  | IR2  | BDA7 | BDA14 | Milho7 | Milho14 |
|--------------------------------------|------|------|------|-------|--------|---------|
| Acetato de etila                     | -    | 615  | *    | *     | -      | -       |
| 3-Metilbutan-1-ol                    | -    | 736  | *    | *     | *      | *       |
| 2-Metilbutan-1-ol                    | -    | 739  | *    | *     | -      | -       |
| Estireno                             | 892  | 890  | *    | *     | *      | *       |
| $\alpha$ -Thujeno                    | 928  | 926  | *    | *     | *      | *       |
| Sabineno                             | 975  | 975  | *    | *     | *      | *       |
| $\alpha$ -Felandreno                 | 1006 | 1006 | *    | *     | *      | *       |
| $\alpha$ -Terpineno                  | 1018 | 1018 | *    | *     | *      | *       |
| <i>p</i> -cimeno                     | 1027 | 1028 | *    | *     | *      | *       |
| D-limoneno                           | 1031 | 1031 | *    | *     | *      | *       |
| 2-etil-hexanoato de metila           | 1046 | -    | -    | -     | *      | *       |
| $\gamma$ -Terpineno                  | 1062 | 1062 | *    | *     | *      | *       |
| <i>cis</i> -4-Thujanol               | 1070 | 1068 | *    | *     | *      | *       |
| Terpinoleno                          | 1091 | 1091 | *    | *     | *      | *       |
| <i>cis-p</i> -menth-2-en-1-ol        | 1101 | 1103 | *    | *     | *      | *       |
| 2-feniletanol                        | 1117 | 1117 | *    | *     | -      | -       |
| Terpinen-4-ol                        | 1182 | 1182 | *    | *     | *      | *       |
| $\gamma$ -Selineno                   | 1330 | -    | -    | -     | *      | *       |
| Ilangeno                             | 1353 | 1351 | -    | -     | *      | *       |
| (+)-ciclosativeno                    | 1384 | 1383 | -    | -     | *      | *       |
| Longifoleno                          | 1406 | 1406 | -    | -     | *      | *       |
| Cariofileno                          | 1430 | 1430 | -    | -     | *      | *       |
| <i>trans</i> - $\alpha$ -Bergamoteno | 1443 | 1441 | -    | -     | *      | *       |
| Aristoliqueno                        | 1495 | 1494 | *    | *     | *      | *       |
| $\alpha$ -Muuroleno                  | 1510 | 1506 | *    | *     | *      | *       |

IR1: Índices de retenção calculados; IR2: Índices de retenção da literatura; \*composto identificado; BDA7: Meio de batata dextrose ágar (7 dias); BDA14: Meio de batata dextrose ágar (14dias); Meio de milho (7 e 14 dias).

## ***Conclusões***

## 7. Conclusões

Os resultados descritos e discutidos neste trabalho permitem fundamentar a hipótese de que os fungos endofíticos compreendem um grupo de microrganismos que possui uma enorme capacidade de produzir metabólitos bioativos com potencial para serem utilizados na agricultura e indústria farmacêutica, além de contribuir com estudos de produtos naturais oriundos da biodiversidade brasileira.

A espécie *Platonia insignis* Mart., pertencente à família Clusiaceae, mostrou ser hospedeira de vários fungos endofíticos, uma vez que, neste trabalho, foram isoladas 18 linhagens que resultaram em extratos brutos. A avaliação preliminar do perfil químico por CLAE-DAD e RMN de  $^1\text{H}$  destes extratos forneceu resultados relevantes, sendo possível observar variação metabólica distinta para cada extrato, reforçando a potencialidade desses microrganismos como fonte de substâncias bioativas.

Além disso, os resultados obtidos para as cinco atividades biológicas realizadas para cada extrato, mostrou, de maneira geral, resultados distintos para os mesmos. Esses resultados aliados à ideia de que o ambiente em que esses microrganismos estão associados (planta hospedeira) seja competitivo e dinâmico, e que foram isolados de diferentes partes da planta, sugere que os mesmos produzam substâncias em resposta a algum tipo de interação ecológica e, conseqüentemente, apresentam algum tipo de atividade, em sua maioria antagônica, o que pode explicar os resultados obtidos para cada extrato.

As duas abordagens adotadas para o estudo do perfil químico de *D. hongkongensis* e *P. elongata* proporcionaram alterações na produção de metabólitos não voláteis e garantiu a obtenção de diferentes substâncias a partir de uma mesma linhagem fúngica, evidenciando que variações no meio de cultivos podem influenciar a ativação de vias biossintéticas silenciadas e, portanto, aumentar a diversidade de metabólitos produzidos pelos microrganismos.

A maior parte das substâncias isoladas neste estudo têm se destacado por apresentar atividades antibacteriana e antifúngica relevantes, o que sugere que estes metabólitos podem estar associados ao mecanismo de proteção destes endófitos como forma de garantir sua sobrevivência nos espaços inter e intracelular da planta hospedeira.

A flavipesina B, produzida pelo fungo endofítico *P. elongata*, apresentou atividade antibacteriana significativa frente à *S. aureus* ATCC 25923, com valor de 4

$\mu\text{g mL}^{-1}$  para concentração inibitória mínima (CIM). O meroterpenoide guignardona A, também produzido por este endófito, foi testado frente à cepa Tulahuen de *Trypanosoma cruzi*, e o resultado obtido mostrou que esta substância apresenta significativa capacidade de inibição de crescimento do parasita ( $\text{IC}_{50}$  7,58  $\mu\text{M}$ ), quando comparado ao padrão benznidazol ( $\text{IC}_{50}$  6,54  $\mu\text{M}$ ). Estes resultados reforçam a importância do estudo destes microrganismos como fonte de substâncias potencialmente ativas e estimula a prosseguir com estudos posteriores, a fim de compreender o mecanismo de ação envolvido.

A partir do cultivo do endófito *D. hongkongensis* em meio de milho, foi possível isolar quatro substâncias que, após análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , pode-se observar perfil espectroscópico característicos de esteroides. É importante ressaltar que o cultivo deste endófito, no meio MDB, não produziu essa mesma classe de substâncias.

Os dois fungos endofíticos selecionados também foram investigados quanto à produção de compostos orgânicos voláteis (COVs), em diferentes condições de cultivo. Os resultados obtidos mostraram que estes fungos representam uma fonte promissora de COVs, e que mudanças nas condições de cultivo, principalmente na variação de meio de cultivo, podem levar a produção de diferentes COVs. Os dados observados no co-cultivo e nos experimentos de cultivo individual de cada endófito foram comparados, no qual pode-se observar uma predominância do COVs produzidos pelo fungo *D. hongkongensis*. Tendo em vista que, nos experimentos de co-cultivo, observou-se inibição no crescimento de *P. elongata*, o que já não foi observado para o *D. hongkongensis*, sugere-se que os COVs produzidos pelo *D. hongkongensis* possam ser os responsáveis pela inibição do crescimento do endófito *P. elongata*, em resposta a esta interação ecológica.

Os resultados obtidos neste trabalho reforçam a potencialidade do estudo destes microrganismos, os quais poderão ser utilizados na fundamentação de trabalhos futuros acerca da escolha de matrizes para o cultivo de fungos endofíticos isolados de *P. insignis* para fins biotecnológicos, na condução de ensaios de atividades biológicas, no estudo de rotas biossintéticas, etc. Além disso, este é o primeiro relato de estudo químico para *D. hongkongensis* e *P. elongata*, contribuindo assim, para a compreensão da quimiodiversidade desses endófitos.

## ***Referências***

## REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Synopsis of the plants know as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.
- ALMEIDA, J. R. G. S.; ARAÚJO, C. S.; PESSOA, C. Ó; COSTA, M. P.; PACHECO, A. G. M. Atividade Antioxidante, Citotóxica e Antimicrobiana de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 258-264, 2014.
- ALVIN, A.; KALAITZIS, J. A.; SASIA, B.; NEILAN, B. A. Combined genetic and bioactivity-based prioritization leads to the isolation of an endophyte-derived antimycobacterial compound. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 5, p. 1229–1239, 2016.
- ALVIN, A.; MILLER, K. I.; NEILAN, B. A. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. **Microbiological Research**, v. 169, p. 483-495, 2014.
- ALY, A. H.; EDRADA-EBEL, R.; INDRIANI, I. D.; WRAY, V.; MULLER, W. E. G.; TOTZKE, F.; ZIRRGIEBEL, U.; SCHACHTELE, C.; KUBBUTAT, M. H. G.; LIN, W. H. PROKSCH, P.; EBEL, R. Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in Its host plant *Polygonum senegalense*. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 972-980, 2008.
- ANDRÉS, M. F.; DIAZ, C. E.; GIMÉNEZ, C.; CABRERA, R.; GONZÁLEZ-COLOMA, A. Endophytic fungi as novel sources of biopesticides: the Macaronesian Laurel forest, a case study. **Phytochemistry Reviews**, v. 16, p. 1009-1022, 2017.
- ARCANJO, D. D. R.; COSTA JÚNIOR, J. S.; MOURA, L. H. P.; FERRAZ, A. B. F.; ROSSATO, R. R.; DAVID, J. M.; QUINTANS JÚNIOR, L. J.; OLIVEIRA, R. C. M.; CITÓ, A. M. G. L.; OLIVEIRA, A. P. Garcinielliptone FC, a polyisoprenylated benzophenone from *Platonia insignis* Mart., promotes vasorelaxant effect on rat mesenteric artery. **Natural Product Research**, v. 28, n. 12, p. 923-927, 2014.
- AZEVEDO, J. L.; ESPOSITO, E. Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.. In: AZEVEDO, J. L.; ESPOSITO, E.(Orgs.). **EDUCS** (2ed). Caxias do Sul, 2010.
- AZMAN, A.; MAWANG, C.; KHAIRAT, J.; ABUBALAR, S. Actinobacteria-a promising natural source of anti-biofilm agentes. **International Microbiology**, v. 22, p. 403-409, 2019.

BAE, H.; SICHER, R. C.; KIM, M. S.; KIM, S.; STREM, M. D.; MELNICK, R. L.; BAILEY, B. A. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 11, p. 3279-3295, 2009.

BAGO, B.; PFEFFER, P. E.; DOUDS, D. D.; BROUILLETTE, J.; BÉCARD, G.; SHACHAR-HILL, Y. Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Plant Physiology**, v. 121, p. 263-271, 1999.

BAI, Z.; LIN, X.; WANG, Y.; WANG, J.; ZHOU, X.; YANG, B.; LIU, J.; YANG, X.; WANG, Y.; LIU, Y. New phenyl derivatives from endophytic fungus *Aspergillus flavipes* AIL8 derived of mangrove plant *Acanthus ilicifolius*. **Fitoterapia**, v. 95, p. 194-202, 2014.

BAILEY, B. A.; BAE, H.; STREM, M. D.; ROBERTS, D. P.; THOMAS, S. E.; CROZIER, J.; SAMUELS, G. J.; CHOI, IK YOUNG; HOLMES, K. A. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. **Planta**, v. 224, n. 6, p. 1449–1464, 2006.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A.S.; WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, n. 1, p. 14-19, 1996.

BERTRAND, S.; SCHUMPP, O.; BOHNI, N.; MONOD, M.; GINDRO, K.; WOLFENDER, J. L. De novo production of metabolites by fungal co-culture of *Trichophyton rubrum* and *Bionectria ochroleuca*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 6, p. 1157–1165, 2013.

BODE, H. B.; BETHE, B.; HÖFS, R.; ZEECK, A. Big effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity, **ChemBioChem**, v. 3, n. 7, p. 619–627, 2002.

BOGNER, C. W.; KAMDEM, R. S. T.; SICHTERMANN, G.; MATTHÄUS, C.; HÖLSCHER, D.; POPP, J.; PROKSCH, P.; GRUNDLER, F. M. W.; SCHOUTEN, A. Bioactive secondary metabolites with multiple activities from a fungal endophyte. **Microbial Biotechnology**, v. 10, p. 175-188, 2016.

BRAKHAGE, A. A.; SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites - Strategies to activate silent gene clusters. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 1, p. 15–22, 2011.



BRILHANTE, R. S. N.; CAETANO, É. P.; LIMA, R. A. C.; MARQUES, F. J. F.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; MELO, C. V. S.; GUEDES, G. M. M.; OLIVEIRA, J. S.; CAMARGO, Z. P.; MOREIRA, J. L. B.; MONTEIRO, A. J.; BANDEIRA, T. J. P. G.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C. Terpinen-4-ol, tyrosol, and  $\beta$ -lapachone as potential antifungals against dimorphic fungi, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 917-924, 2016.

BUCKEL, I.; MOLITOR, D.; LIERMANN, J. C.; SANDJO, L.P.; BERKELMANN-LOHNERTZ, B.; OPATZ, T.; THINES, E. Phytotoxic dioxolanone-type secondary metabolites from *Guignardia bidwellii*. **Phytochemistry**, v. 89, p. 96-103, 2013.

CAFÊU, M. C. **Estudo químico e avaliação biológica os fungos endofíticos *Xylaria* sp. e *Colletotrichum crassipes* isolados de *Casearia sylvestris***. 2007. 252 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

CARVALHO, M. P.; ABRAHAM, W. Antimicrobial and Biofilm Inhibiting Diketopiperazines. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 3564-3577, 2012.

CHANDRAMOHAN, R.; PARI, L. Anti-inflammatory effects of tyrosol in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 17-28, 2016.

CHANG, A.; SUN, S.; LI, L.; DAI, X.; LI, H.; HE, Q.; ZHU, H. Tyrosol from marine Fungi, a novel Quorum sensing inhibitor against *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Bioorganic Chemistry**, v. 91, p. 1-7, 2019.

CHANG, H.; CHEN, Y. S.; CHENG, M. J.; WU, H. C.; CHAN, H. Y.; HSIEH, S. Y.; YANG, S. S.; CHEN, I. S.; CHEN, J. J. Chemical Constituents of the fungus *Mycocleptodiscus* sp. 09F0149, **Chemistry of Natural Compounds**, v. 54, n. 2, p. 396-398, 2018a.

CHANG, H.; PENG, C.; CHENG, M.; WU, H.; CHAN, H.; HSIEH, S.; YUAN, G.; CHEN, I. Chemical Constituents of the Endophytic Fungus *Phomopsis asparagi* Isolated from the Plant *Peperomia* sui. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 54, n. 3, p. 504-508, 2018b.

CHANG, T.; DING, H.; TAI, S. S.; WU, C. Metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein by fungi used in the preparation of various fermented soybean foods. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, n.5, p. 1330-1333, 2007.

CHENG, M. J.; WU, M. D.; CHENG, Y. C.; CHEN, J. J.; HSIEH, S. Y.; YUAN, G. F.; SU, Y. S. Metabolites isolated from an endophytic fungus of *Annulohyphoxylon elevatidiscus*, **Chemistry of Natural Compounds**, v. 51, n. 1, p. 67-70, 2015.

CHIANG, Y. M.; KUO, Y. H.; OOTA, S.; FUKUYAMA, Y. Xanthonenes and benzophenones from the stems of *Garcinia multiflora*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1070-1073, 2003.

CICHEWICZ, R. H. Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 1, p. 11–22, 2010.

COSTA, I. C. G. **Constituintes químicos e potencial farmacológico das cascas do caule de *Platonia insignis* Mart. (Cluciaceae)**. 2015, 186f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2015.

COSTA JÚNIOR, J. S.; FERRAZ, A. B. F.; FEITOSA, C. M.; CITÓ, A. M. G. L.; FREITAS, R. M.; SAFFI, J. Evaluation of antioxidant effects in vitro of garcinielliptone FC (GFC) isolated from *Platonia insignis* Mart. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 2, p. 293-299, 2011.

COSTA JÚNIOR, J. S.; ALMEIDA, A. A. C.; FERRAZ, A. B. F.; ROSSATTO, R. R.; SILVA, T. G.; SILVA, P. B. N.; MILITÃO, G. C. G.; CITÓ, A. M. G. L.; SANTANA, L. C. L. R.; CARVALHO, F. A. A.; FREITAS, R. M. Cytotoxic and leishmanicidal properties of garcinielliptone FC, a prenylated benzophenone from *Platonia insignis*. **Natural Product Research**, v. 27, p. 470-474, 2013.

DAI, J.; KROHN, K.; FLÖRKE, U.; GEHLE, D.; AUST, H. J.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; RHEINHEIMER, J. Novel highly substituted biraryl ethers, phomosines D-G, isolated from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Adenocarpus foliolosus*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 4, p. 5100-5105, 2005.

DING, G.; QI, Y.; LIU, S.; GUO, L.; CHEN, X. . Photipyrones A and B, new pyrone derivatives from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis photiniae*. **Journal of Antibiotics**, v. 65, n. 5, p. 271–273, 2012.

EL-GENDY, B. E. M.; RATEB, M. E. Antibacterial activity of diketopiperazines isolated from a marine fungus using t-butoxycarbonyl group as a simple tool for purification. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, p. 3125-3128, 2015.

EVIDENTE, A.; CIMMINO, A.; ANDOLFI, A.; VURRO, M.; ZONNO, M.; MOTTA, A. Phyllostoxin and phyllostin, bioactive metabolites produced by *Phyllosticta cirsii*, a potential mycoherbicide for *Cirsium arvense* biocontrol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 884-888, 2008a.

EVIDENTE, A.; CIMMINO, A.; ANDOLFI, A.; VURRO, M.; ZONNO, M. C.; CANTRELL, C. L.; MOTTA, A. Phyllostictines A-D, oxazatricycloalkenones produced by *Phyllosticta cirsii*, a potential mycoherbicide for *Cirsium arvense* biocontrol. **Tetrahedron**, v. 64, p. 1612-1619, 2008b.

FAETH, S. H. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? **OIKOS**, v. 98, p. 25-36, 2002.

FDHILA, F.; VÁZQUEZ, V.; SÁNCHEZ, J. L.; RIGUERA, R. DD-Diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 10, p. 1299-1301, 2003.

FERREIRA, R. O.; CARVALHO, M. G.; SILVA, T. M. S. Ocorrência de biflavonoides em Clusiaceae: aspectos químicos e farmacológicos. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2271-2277, 2012.

FRAIGE, K.; DAMETTO, A. C.; ZERAIK, M. L.; FREITAS, L.; SARAIVA, A. C.; MEDEIROS, A. I.; GAMBOA, I. C.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; LOPES, N. P.; BOLZANI, V. S. Dereplication by HPLC-DAD-ESI-MS/MS and Screening for Biological Activities of *Byrsonima Species* (Malpighiaceae), **Phytochemical Analysis**, v. 29, p. 196-204, 2018.

FUJITAKA, Y.; HAMADA, H.; UESUGI, D.; KUBOKI, A.; SHIMODA, K.; IWAKI, T.; KIRIAKE, Y.; SAIKAWA, T. Synthesis of daidzein glycosides,  $\alpha$ -tocopherol glycosides, hesperetin glycosides by bioconversion and their potential for anti-allergic functional-foods and cosmetics. **Molecules**, v. 24, p. 1-11, 2019.

FURTADO, N. A. J. C.; PUPO, M. T.; CARVALHO, I.; CAMPO, V. L.; DUARTE, M. C. T.; BASTOS, J. K. Diketopiperazines Produced by an *Aspergillus fumigatus* Brazilian Strain. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1448-1453, 2005.

FURTADO, N. A. J. C.; VESSECCHI, R.; TOMAZ, J. C.; GALEMBECK, S. E.; JAIRO K. BASTOS, J. B.; LOPES, N. P.; CROTTI, A. E. M. Fragmentation of diketopiperazines from *Aspergillus fumigatus* by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, p. 1279-1286, 2007.

GASPARATO JÚNIOR, A.; FERREIRA, I. C. P.; NAKAMURA, C. V.; D FILHO, B. P.; JACOMASSI, E.; YOUNG, M. C. M.; CORTEZ, D. A. G. Estudo morfo-anatômico das folhas e caule da *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), uma contribuição ao estudo

farmacognóstico da droga vegetal. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, n. 3, p. 371-376, 2005.

GU, W. Bioactive metabolites from *Alternaria brassicicola* ML-P08, an endophytic fungus residing in *Malus halliana*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1677-1683, 2009.

GUIMARÃES, D. O.; LOPES, N. P.; PUPO, M. T. Meroterpenes isolated from the endophytic fungus *Guignardia mangiferae*. **Phytochemistry Letters**, v. 5, p. 519-523, 2012.

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008.

GUZMÁN-LÓPEZ, O.; TRIGOS, Á.; FERNÁNDEZ, F. J.; YAÑEZ-MORALES, M. J.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. Tyrosol and tryptophol produced by *Ceratocystis adiposa*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1473-1477, 2007.

HAN, W. B.; DOU, H.; YUAN, W. H.; GONG, W.; HOU, Y. Y.; NG, S. W.; TAN, R. X. Meroterpenes with toll-like receptor 3 regulating activity from the endophytic fungus *Guignardia mangiferae*. **Planta Medica**, v. 81, p. 145-151, 2015.

HARBORNE, J. B. **The flavonoids**: advances in research since 1986. New York: Chapman and Hall, 1996. 676 p.

HELENO, S. A.; FERREIRA, I. C.F.R.; ESTEVES, A. P.; ĆIRIĆ, A.; GLAMOČLIJA, J.; MARTINS, A.; SOKOVIĆ, M.; QUEIROZ, M. J. R. P. Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, p-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 95-100, 2013.

HUANG, R.; DING, Z. G.; LONG, Y. F.; ZHAO, J. Y.; LI, M. G.; CUI, X. L.; WEN, M. L. A new isoflavone derivative from *Streptomyces* sp. YIM GS3536. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 48, n. 6, p. 966-969, 2013.

HUERTA-REYES, M.; BASUALDO, M. C.; ABE, F.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; SOLER, C.; REYES-CHILPA, R. HIV-1 inhibitory compounds from *Calophyllum brasiliense* leaves. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 9, p. 1471-1475, 2004.

IBRAHIM, S. R. M.; MOHAMED, A. A.; HAIDARI, R. A. A.; EL-KHOLY, A. A. S.; ASFOUR, H. Z.; ZAYED, M. F. Fusaristerol A: A new cytotoxic and antifungal

- ergosterol fatty acid ester from the endophytic fungus *Fusarium* sp. associated with *Mentha longifolia* roots. **Pharmacognosy Magazine**, v. 14, n. 56, p. 308-313, 2018.
- IBRAHIM, S. M.; MOHAMED, G.; KHAYAT, M.; HAIDARI, R. A.; EL-KHOLY, A.; ZAYED, M. A new antifungal aminobenzamide derivative from the endophytic fungus *Fusarium* sp. **Pharmacognosy Magazine**, v. 51, p. 204-208, 2019.
- ITO, T.; YOKOTA, R.; WATARAI, T.; MORI, K.; OYAMA, M.; NAGASAWA, H.; MATSUDA, H.; IINUMAA, M. Isolation of six isoprenylated biflavonoids from the leaves of *Garcinia subelliptica*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 61, n. 5, p. 551-558, 2013.
- KANAAN, H.; EL-MESTRAH, M.; SWEIDAN, A.; AS-SADI, F.; BAZZAL, A.; CHOKR, A. Screening for antibacterial and antibiofilm activities in *Astragalus angulosus*. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 6, n.1, p. 50-57, 2017.
- KANCHISWAMY, C. N.; MALNOY, M.; MAFFEI, M. E. Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. **Frontiers in Plant Science**, v.6, p. 1-23, 2015.
- KAUSHIK, S.; SHYAM, H.; SHARMA, R.; BALAPURE, A. K. Dietary isoflavone daidzein synergizes centchroman action via induction of apoptosis and inhibition of PI3K/Akt pathway in MCF-7/MDA MB-231 human breast cancer cells. **Phytomedicine**, v. 40, p. 116-124, 2018.
- KLIMOVA, E. M.; PEÑA, K. R.; SÁNCHEZ, S. Endophytes as sources of antibiotics. **Biochemical Pharmacology**, v. 134, p. 1-17, 2017.
- KUMARAN, R. S.; MUTHUMARY, J.; HUR, B. Taxol from *Phyllosticta citricarpa*, a Leaf Spot Fungus of the Angiosperm *Citrus medica*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 106, n. 1, p. 103-106, 2008.
- KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. **Chemistry and Biology**, v. 19, n. 7, p. 792–798, 2012.
- KUSARI, S.; SINGH, S.; JAYABASKARAN, C. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: Hope versus hype. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 297–303, 2014.
- KUSARI, S.; SPITELLER, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? **Natural Products Reports**, v. 28, p.1203-1207, 2011.

KUSARI, S.; ZÜHLKE, S.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 1, p. 2-7, 2009.

LARRAN, S.; SIMÓN, M.R.; MORENO, M.V.; SIURANA, M.P. S.; PERELLÓ, A. Endophytes from wheat as biocontrol agents against tan spot disease. **Biological Control**, v. 92, p. 17-23, 2016.

LEE, J.; PARK, S. Daidzein Has Anti-Oxidant Activity in Normal Human Kidney Tubular HK-2 Cells via FOXO3/SOD2 Pathway. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 6, n.9, p. 557-560, 2018.

LI, G.; KUSARI, S.; KUSARI, P.; KAYSER, O., SPITELLER, M. Endophytic *Diaporthe* sp. LG23 produces a potent antibacterial tetracyclic triterpenoid. **Journal of Natural Products**, v. 78, p. 2128-2132, 2015.

LI, T. X.; YANG, M. H.; WANG, X. B.; WANG, Y.; KONG, L. Y. Synergistic Antifungal Meroterpenes and Dioxolanone Derivatives from the Endophytic Fungus *Guignardia* sp. **Journal of Natural Products**, v. 78, p. 2511-2520, 2015.

LIARZI, O.; BUCKI, P.; MIYARA, S. B.; EZRA, D. Bioactive volatiles from an endophytic *Daldinia* cf. *concentrica* isolate affect the viability of the plant parasitic nematode *Meloidogyne javanica*. **PLOS One**, v. 11, n. 12, p. 1–17, 2016.

LIMA, M. C. **Bacuri**: agrobiodiversidade, 1. ed. Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura: São Luis, 2007.

LIU, Y.; HU, Z.; LIN, X.; LU, C.; SHEN, Y. A new polyketide from *Diaporthe* sp. SXZ-19, an endophytic fungal strain of *Camptotheca acuminata*. **Natural Product Research**, v. 27, n. 22, p. 2100-2104, 2013.

LOKVAM, J.; BRADDOCK, J. F.; REICHARDT, P. B.; CLAUSEN, T. P. Two polyisoprenylated benzophenones from the trunk látex of *Clusia grandiflora* (Clusiaceae). **Phytochemistry**, v. 55, p. 29-34, 2000.

LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A. T.; HERDEIRO, M. T.; RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v.34, n. 1, p. 77-84, 2016.

LUNCEFORD, N.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v. 76, p. 419-427, 2005.

- MA, K.; WEI, W.; LI, H.; SONG, Q.; DONG, S.; GAO, K. Meroterpenoids with diverse ring systems and dioxolanone-type secondary metabolites from *Phyllosticta capitalensis* and their phytotoxic activity, **Tetrahedron**, v. 75, p. 4611-4619, 2019.
- MANDAVID, H.; RODRIGUES, A. M. S.; ESPINDOLA, L. S.; EPARVIER, V.; STIEN, D. Secondary metabolites isolated from the Amazonian endophytic fungus *Diaporthe* sp. SNB-GSS10. **Journal of Natural Products**, v. 78, p. 1735-1739, 2015.
- MANSUROVA, M.; EBERT, B. E.; BLANK, L. M.; IBÁÑEZ, A. J. A breath of information: the volatilome. **Current Genetics**, v. 64, n. 4, p. 959-964, 2018.
- MARQUES, T. H. C.; SANTOS, P. S.; FREITAS, R. M.; CARVALHO, R. B. F.; MELO, C. H. S.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; LIMA, L. S. Atividade anticolinesterásica e perfil químico de uma fração cromatográfica ativa do extrato etanólico das flores *Bellis perennis* L. (Asteraceae). **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 549-553, 2013
- MASKEY, R. P.; ASOLKAR, R.N.; KAPAUN, E.; WAGNER-DÖBLER, I.; LAATSCH, H. Phytotoxic arylethylamides from limnic bacteria using a screening with microalgae. **Journal of Antibiotics**, v. 55, n. 7, p. 643-649, 2002.
- MORENO, E.; VARUGHESE, T.; SPADAFORA, C.; ARNOLDD, A. E.; COLEYE, P. D.; KURSARE, T. A.; GERWICKF, W. H.; CUBILLA-RIOS, L. Chemical Constituents of the New Endophytic Fungus *Mycosphaerella* sp. nov. and Their Anti-Parasitic Activity, **Natural product communications**, v. 6, n. 6, p. 835-840, 2011
- MULLER, C. B.; KRAUSS, J. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 450-456, 2005.
- MÜLLER, M. E.H.; URBAN, K.; KÖPPEN, R.; SIEGEL, D.; KORN, U.; KOCH, M. Mycotoxins as antagonistic or supporting agents in the interaction between phytopathogenic *Fusarium* and *Alternaria* fungi, **World Mycotoxin Journal**, v. 8, n. 3, p. 311-321, 2015.
- MURAKAMI, S.; NAKATA, R.; ABOSHI, T.; YOSHINAGA, N.; TERAISHI, M.; OKUMOTO, Y.; ISHIHARA, A.; MORISAKA, H.; HUFFAKER, A.; SCHMELZ, E.; MORI, N. Insect-Induced Daidzein, Formononetin and Their Conjugates in Soybean Leaves, **Metabolites**, v. 4, p. 532-546, 2014.
- NAGIA, M. M.S.; SHAABAN, M.; ABDEL-AZIZ, M. S.; EL-ZALABANI, S. M.; HANNA, A. G. Secondary metabolites and bioactivity of two fungal strains. **Egyptian Pharmaceutical Journal**, v. 11, p. 16-21, 2012.

NAKASHIMA, K.; TOMIDA, J.; KAMIYA, T.; HIRAI, T.; MORITA, Y.; HARA, H.; KAWAMURA, Y.; ADACHI, T.; INOUE, M. Diaporthols A and B: Bioactive diphenyl ether derivatives from an endophytic fungus *Diaporthe* sp. **Tetrahedron Letters**, v. 59, p. 1212-1215, 2018.

NASCIMENTO, W. M. O.; CARVALHO, J. E. U.; MÜLLER, C. H. Ocorrência e distribuição geográfica do bacurizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 657-660, 2007.

NEIDELL, M. J.; COHEN, B.; FURUYA, Y.; HILL, J.; JEON, C. Y.; GLIED, S.; LARSON, E. L. Costs of healthcare- and community-associated infections with antimicrobial-resistant versus antimicrobial-susceptible organisms. **Clinical Infectious Disease**, v. 55, p. 807-815, 2012.

NGUYEN, L. T. T.; NGUYEN, H. T.; BARBIC, M.; BRUNNER, G.; HEILMANN, J. PHAM, H. D.; NGUYEN, D. M.; NGUYEN, L. H. D. Polyisoprenylated acylphloroglucinols and a polyisoprenylated tetracyclic xanthone from the bark of *Calophyllum thorelii*. **Tetrahedron Letters**, v. 53, p. 4487-4493, 2012.

NISA, H.; KAMILI, A. N.; NAWCHOO, I. A.; SHAFI, S.; SHAMEEM, N.; BANDH, S. A Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 82, p. 50-59, 2015.

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

PENG, X.; MA, J.; CHEN, F.; WANG, M. Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation end-products. **Food & Function**, v. 2, p. 289-301, 2011.

PFEIFFER, E.; SCHEBB, N. H.; PODLECH, J.; METZLER, M. Novel oxidative in vitro metabolites of the mycotoxins alternariol and alternariol methyl ether. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, p. 307-316, 2007.

PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity. **Science**, v. 311, p. 808-811, 2006.

RAHMANA, A. U.; SULTANAB, N.; SHAHWARA, D.; CHOUDHARYA, M. I. Two new fatty esters from *Rhazya stricta* roots (Apocynaceae), **Natural Product Research**, v. 22, n. 15, p. 1350–1354, 2008.



RAJAMANIKYAM, M.; VADLAPUDI, V.; AMANCHY, R.; UPADHYAYULA, S. M. Endophytic fungi as novel resources of natural therapeutics, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, p. 1–26, 2017.

RATNAWEERA, P. B.; SILVA, E. D.; WILLIAMS, D. E.; ANDERSEN, R. J. Antimicrobial activities of endophytic fungi obtained from the arid zone invasive plant *Opuntia dillenii* and the isolation of equisetin, from endophytic *Fusarium sp.* **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 220-226, 2015.

RAVINDRAN, C.; NAVEENAN, T.; VARATHARAJAN, G. R.; RAJASABAPATHY, R.; MEENA, R. M. Antioxidants in mangrove plants and endophytic fungal associations, **Botanica Marina**, v. 55, n. 3, p. 269–279, 2012.

REYES-CHILPA, R.; MUÑIZ, E. E.; APAN, T. R.; AMEKRAZ, B.; AUMELAS, A.; JANKOWSKI, C. K.; TORRES, M. V. Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. **Life Sciences**, v. 75, p. 1635-1647, 2004.

RHEE, K.; MEENT, M. V.; INGGANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, v. 915, p.217-223, 2001.

SÁNCHEZ-ORTIZ, B. L.; SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, R. E.; DUARTE, G.; LAPPE-OLIVERAS, P.; MACÍAS-RUBALCAVA, M. L. Antifungal, anti-oomycete and phytotoxic effects of volatile organic compounds from the endophytic fungus *Xylaria sp.* strain PB3f3 isolated from *Haematoxylon brasiletto*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, p. 1313-1325, 2016.

SANTOYO, G.; HAGELSIEB, G. M.; MOSQUEDA, M. C. O.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacterial endophytes, **Microbiological Research**, v. 183, p. 92-99, 2016.

SCHERLACH, K; HERTWECK, C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms, **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 7, p. 1753-1760, 2009.

SCHLOB, S.; HACKL, T.; HERZ, C.; LAMY, E.; KOCH, M.; ROHN, S., MAUL, R. Detection of a Toxic Methylated Derivative of Phomopsis A Produced by the Legume-Infesting Fungus *Diaporthe toxica*. **Journal of Natural Products**, v. 80, p. 1930-1934, 2017.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.

SETO, Y.; KOGAMI, Y.; SHIMANUKI, T.; TAKAHASHI, K.; MATSUURA, H.; YOSHIHARA, T. Production of *Cladosporium phlei* as stimulated by diketopiperazines of *Epichloe typhina*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 69, n. 8, p.1515-1519, 2005.

SHWETA, S.; ZUEHLKE, S.; RAMESHA, B.T.; PRITI, V.; MOHANA, K. P.; RAVIKANTH, G.; SPITELLER, M.; VASUDEVA, R.; SHAANKER, R. Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacinaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. **Phytochemistry**, v. 71, p. 117-122, 2010.

SILVA, G. H. **Substâncias bioativas isoladas dos fungos endofíticos *Xylaria* sp., *Phomopsis cassiae* e *Acremonium* sp. associados a espécies vegetais do Cerrado**. 2005. 306f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

SINGH, R.; BARDEN, A.; MORI, T, BEILIN, L.; Advanced glycation end-products: A review. **Diabetologia**, v. 44, p. 129-146, 2001.

SINGH, S. K.; STROBEL, G. A.; KNIGHTON, B.; GEARY, B.; SEARS, J.; EZRA, D. An Endophytic *Phomopsis* sp. Possessing Bioactivity and Fuel Potential with its Volatile Organic Compounds. **Microbial Ecology**, v. 61, p. 729–739, 2011.

SOBRAL, I. S.; SOUZA NETA, L. C.; COSTA, G. A. N.; GUEDES, M. L. S.; MARTINS, D.; CRUZ, F. G. Xantonas, triterpenos e atividade antibacteriana do extrato em diclorometano de *Kielmeyera cuspidata* saddi, Clusiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 686-689, 2009.

SOUSA, C. M. M. **Estudo químico e potencial farmacológico das cascas do fruto de *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae)**. 2012, 164f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2012.

SOUZA, A. C.; ALVES, M. M. M.; BRITO, L. M.; OLIVEIRA, L. G. C.; SOBRINHO-JÚNIOR, E. P. C.; COSTA, I. C. G.; FREITAS, S. D. L.; RODRIGUES, K. A. F.; CHAVES, M. H.; ARCANJO, D. D. R.; CARVALHO, F. A. A. *Platonia insignis* Mart., a Brazilian Amazonian Plant: The Stem Barks Extract and Its Main Constituent Lupeol Exert Antileishmanial Effects Involving Macrophages Activation. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1-12, 2017.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of *Pacific yew*. **Science**, v. 9; p. 214-216, 1993.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

SUWANNARACH, N.; KUMLA, J.; BUSSABAN, B.; NUANGMEK, W.; MATSUI, K.; LUMYONG, S. Biofumigation with the endophytic fungus *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 to control postharvest decay of citrus fruit. **Crop Protection**, v. 45, p. 63-70, 2013.

TAWFIKE, A. F.; TATE, R.; ABBOTT, G.; YOUNG, L.; VIEGELMANN, C.; SCHUMACHER, M.; DIEDERICH, M.; EDRADA-EBEL, R. Metabolomic Tools to Assess the Chemistry and Bioactivity of Endophytic *Aspergillus* Strain. **Chemistry and Biodiversity**, v. 14, p. 1-24, 2017.

TEIXEIRA, J. S. R.; MOREIRA, L. M.; GUEDES, M. L. S.; CRUZ, F. G. A new biphenyl from *Clusia melchiorii* and a new tocotrienol from *C. obdeltifolia*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 4, p. 812-815, 2006.

TEOH, W. Y.; TAN, H. P.; LING, S. K.; WAHAB, N. A.; SIM, K. S. Phytochemical investigation of *Gynura bicolor* leaves and cytotoxicity evaluation of the chemical constituents against HCT 116 cells. **Natural Product Research**, v. 30, n. 4, p. 448-451, 2016.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

VAN DEN DOOL.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963.

WANG, B.; ZHANG, Z.; GUO, L.; LIU, L. New cytotoxic meroterpenoids from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 99, p. 151-156, 2016.

WANG, G.; DAI, S.; CHEN, M.; WU, H.; XIE, L.; LUO, X.; LI, X. Two diketopiperazine cyclo(pro-phe) isomers from marine bacteria *Bacillus subtilis* sp. 13-2. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 46, p. 583-585, 2010.

WANG, J.; PENG, T.; ZHANG, X.; YAO, K.; KE, Y.; SHAO, B.; WANG, Z.; SHEN, J.; JIANG, H. A novel hapten and monoclonal antibody-based indirect competitive ELISA for simultaneous analysis of alternariol and alternariol monomethyl ether in wheat. **Food Control**, v. 94, p. 65-70, 2018.

WANG, L.; XU, B.; WANG, J.; SU, Z.; LIN, F.; ZHANG, C.; KUBICEK, C. Bioactive metabolites from *Phoma* species, an endophytic fungus from the Chinese medicinal plant *Arisaema erubescens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1231-1239, 2012.

WANG, W. X.; KUSARI, S.; LAATSCH, H.; GOLZ, C.; KUSARI, P.; STROHMANN, C.; KAYSER, O.; SPITELLER, M. Antibacterial Azaphilones from an Endophytic Fungus, *Colletotrichum* sp. BS4, **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 4, p. 704–710, 2016.

WENG, J. R.; LIN, C. N.; TSAO, L. T.; WANG, J. P. Terpenoids with a new skeleton and novel triterpenoids with anti-inflammatory effects from *Garcinia subelliptica*. **Chemistry A European Journal**, v. 9, p. 5520-5527, 2003.

WIJERATNE, E. M. K.; PARANAGAMA, P. A.; MARRON, M. T.; GUNATILAKA, M. K.; ARNOLD, A. E.; GUNATILAKA, A. A. L. Sesquiterpene Quinones and Related Metabolites from *Phyllosticta spinarum*, a Fungal Strain Endophytic in *Platyclusus orientalis* of the Sonoran Desert. **Journal of Natural Products**, n. 71, p. 218-222, 2008.

WIKKEE, S.; UDAYANGA, D.; CROUS, P. W.; CHUKEATIROTE, E.; MCKENZIE, E. H. C.; BAHKALI, A. H.; DAI, D.; HYDE, K. D. *Phyllosticta* - an overview of current status of specie recognition. **Fungal Diversity**, v. 51, p. 43-61, 2011.

WIKKEE, S.; LOMBARD, L.; CROUS, P. W.; NAKASHIMA, C.; MOTOHASHI, K.; CHUKEATIROTE, E.; ALIAS, S. A.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D. *Phyllosticta capitalensis*, a widespread endophyte of plants. **Fungal Diversity**, v. 60, n. 1, p. 91-105, 2013.

XIAO, J.; ZHANG, Q.; GAO, Y.Q.; TANG, J. J.; ZHANG, A. L.; GAO, J. M. Secondary metabolites from the endophytic *Botryosphaeria dothidea* of *Melia azedarach* and their antifungal, antibacterial, antioxidant, and cytotoxic activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 16, p. 3584-3590, 2014.

XIONG, Z. Q.; YANG, Y. Y.; ZHAO, N.; WANG, Y. Diversity of endophytic fungi and screening of fungal paclitaxel producer from Anglojap yew, *Taxus x media*. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 71, 2013.

XU, J.; HU, Y.; QU, W.; CHEN, M.; ZHOU, L.; BI, Q.; LUO, J.; LIU, W.; FENG, F.; ZHANG, J. Cytotoxic and neuroprotective activities of constituents from *Alternaria alternate*, a fungal endophyte of *Psidium littorale*. **Bioorganic Chemistry**, v. 90, p. 1-7, 2019.

XU, Z.; XIONG, B.; XU, J. Chemical Investigation Of Secondary Metabolites Produced By Mangrove Endophytic Fungus *Phyllosticta Capitalensis*. **Natural Product Research**, p. 1-5, 2019.

YAN, D. H.; SONG, X.; LI, H.; LUO, T.; DOU, G.; STROBEL, G. Antifungal activities of volatile secondary metabolites of four *Diaporthe* strains isolated from *Catharanthus roseus*. **Journal of Fungi**, v. 4, p.1-16, 2018.

YANG, H.; LI, J.; CHEN, S.; MOU, L.; ZOU, J.; WANG, C.; CHEN, G.; QIN, S.; YAO, X.; GAO, H. Phenylisotertronic acids from the TCM endophytic fungus *Phyllosticta* sp. **Fitoterapia**, v. 124, p. 86-91, 2018.

YANG, H.; ZHAO, H.; LI, J.; CHEN, S.; MOU, L.; ZOU, J.; CHEN, G.; QIN, S.; WANG, C.; HU, D.; YAO, X.; GAO, H. Phyllomeroterpenoids A-C, Multi-biosynthetic Pathway Derived Meroterpenoids from the TCM Endophytic Fungus *Phyllosticta* sp. and their Antimicrobial Activities. **Scientific Reports**, v.7, p. 1-8, 2017.

YOU, C. X.; GUO, S. S.; ZHANG, W. J.; GENG, Z. F.; LIANG, J. Y.; LEI, N.; DU, S. S.; DENG, Z. W. Chemical constituents of *Murraya tetramera* Huang and their repellent activity against *Tribolium castaneum*, **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1-11, 2017.

YUAN, W. H.; LIU, M.; JIANG, N.; GUO, Z. K.; MA, J.; ZHANG, J.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Guignardones A-C: Three meroterpenes from *Guignardia mangiferae*. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 6348-6353, 2010.

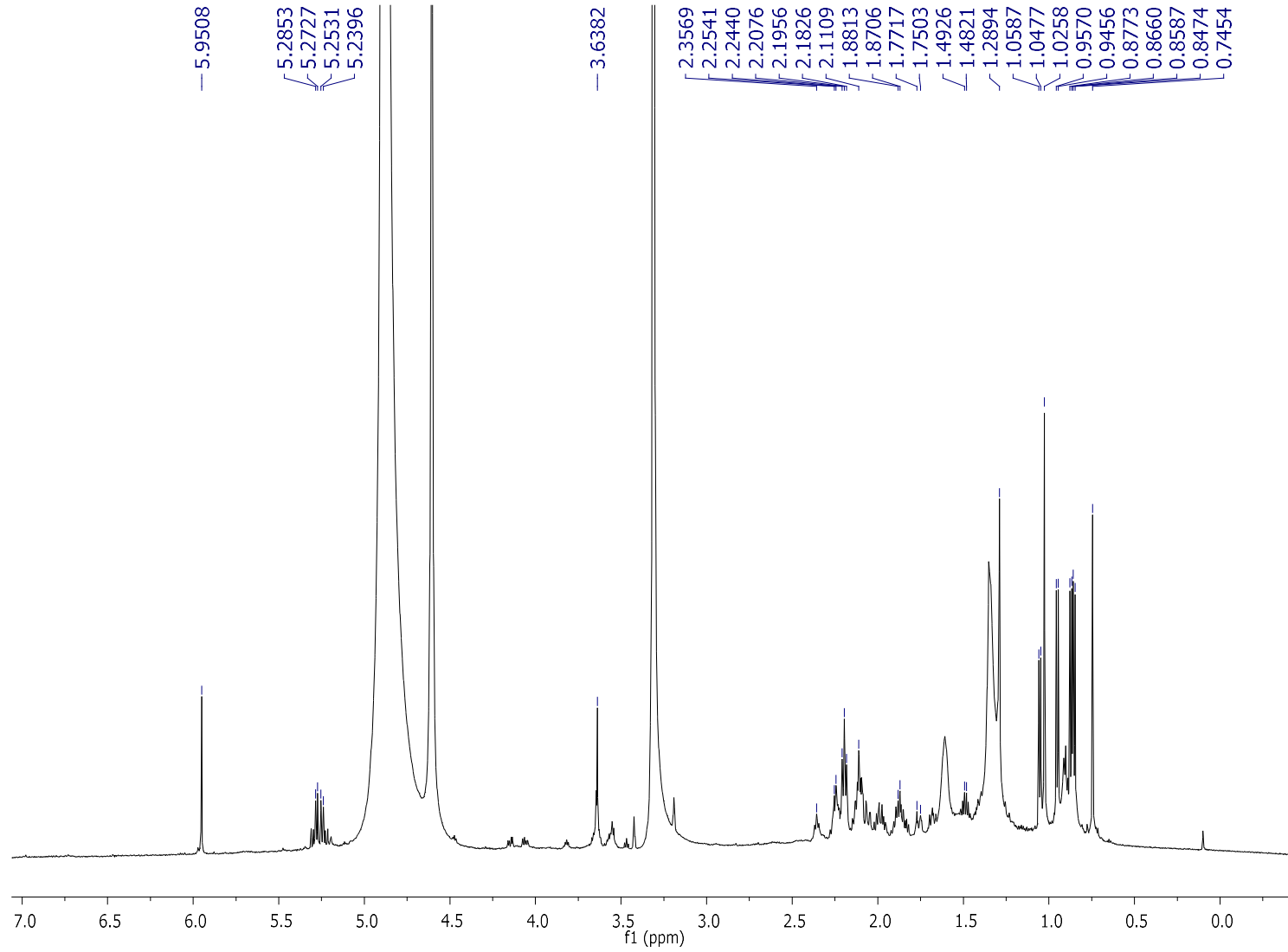
ZHANG, L. J.; CHIOU, C. T.; CHENG, J. J.; HUANG, H. C.; KUO, L. M. Y.; LIAO, C. C.; BASTOW, K. F.; LEE, K. H.; KUO, Y. H. Cytotoxic polyisoprenyl benzophenonoids from *Garcinia subelliptica*. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 557-562, 2010.

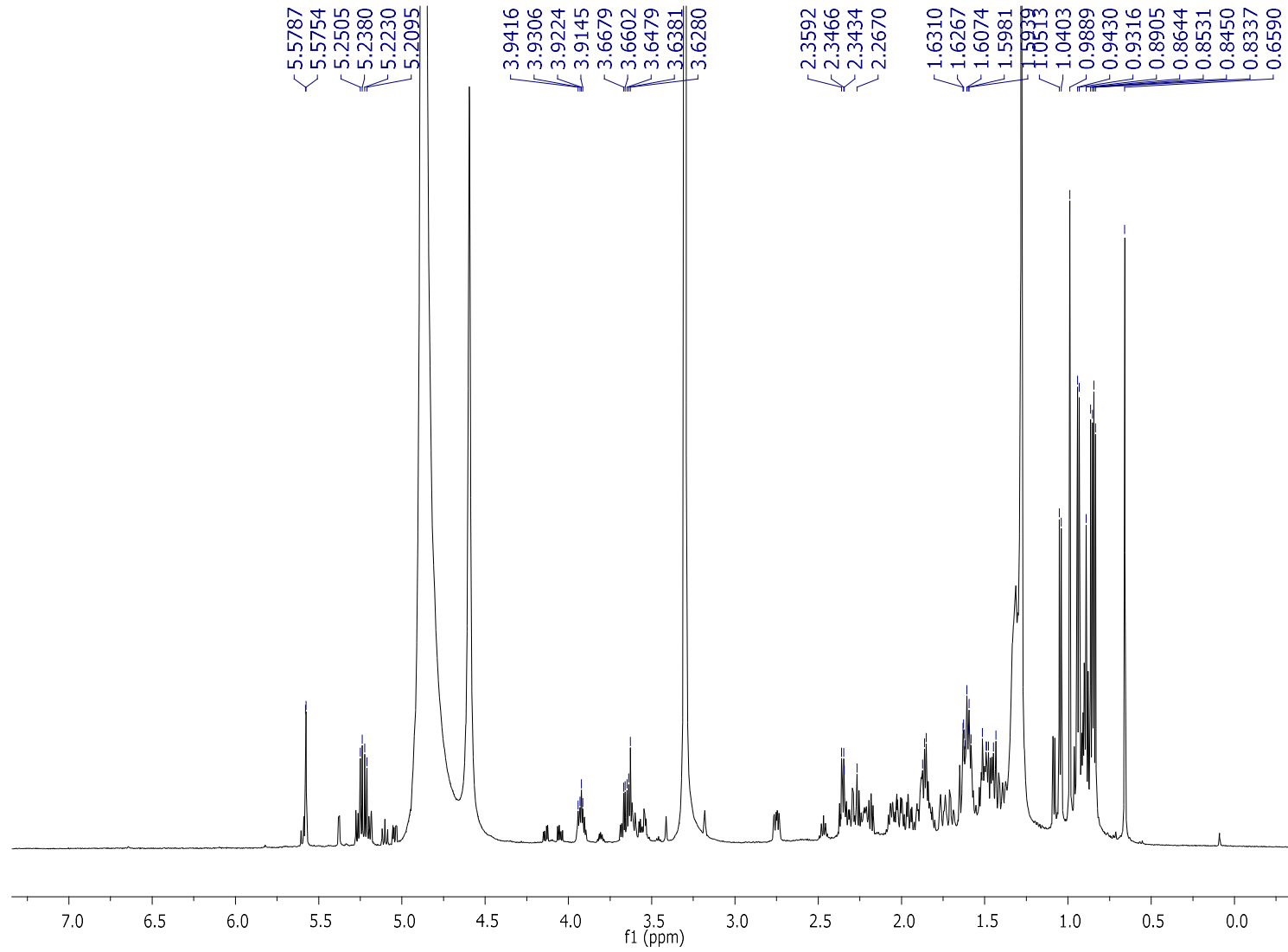
ZHAO, Q.; WANG, G. Q.; CHEN, G. D.; HU, D.; LI, X. X.; GUO, L. D.; LI, Y.; YAO, X. S.; GAO, H. Nodulisporisteroids C-L, new 4-methyl-progesteroid derivatives from *Nodulisporium* sp. **Steroids**, v. 102, p. 101–109, 2015.

ZHENG, Q.; CHEN, G.; KONG, M.; LI, G.; CUI, J.; LI, X.; WU, Z.; GUO, L.; CEN, Y.; ZHENG, Y.; GAO, H. Nodulisporisteroids A and B, the first 3,4-seco-4-methyl-progesteroids from *Nodulisporium* sp. **Steroids**, v. 78, n. 9, p. 896–901, 2013.

ZHENG, Y.; QIAO, X.; MIAO, C.; LIU, K.; CHEN, Y.; XU, L.; ZHAO, L. Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. **Annals of Microbiology**, v. 66, n.2, p. 529-542, 2016.

## ***Apêndice***

**Apêndice 1.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância I ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).

**Apêndice 2.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância II ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).



**Apêndice 3.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância III ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).