

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta **TESE** será disponibilizado somente a partir de 27/03/2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Estudo de modificadores químicos epigenéticos no cultivo de
fungos endofíticos associados à *Paepalanthus chiquitensis*
(Eriocaulaceae) e avaliação da atividade antimicrobiana**

Felipe Hilario

Orientadora: Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos

Coorientadora: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

Araraquara- SP

2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Estudo de modificadores químicos epigenéticos no cultivo
de fungos endofíticos associados à *Paepalanthus
chiquitensis* (Eriocaulaceae) e avaliação da atividade
antimicrobiana**

Felipe Hilario

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e
Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos,
para obtenção do título de Doutor em Ciências
Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos
Coorientadora: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

Araraquara- SP

2020

H641e Hilario, Felipe.
Estudo de modificadores químicos epigenéticos no cultivo de fungos endofíticos associados à *Paepalanthus chiquitensis* (Eriocaulaceae) e avaliação da atividade antimicrobiana / Felipe Hilario. – Araraquara: [S.n.], 2020.
255 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Lourdes Campaner dos Santos.
Coorientadora: Taís Maria Bauab.

1. Eriocaulaceae. 2. *Paepalanthus chiquitensis*. 3. *Fusarium fujikuroi*. 4. *Curvularia lunata*. 5. Fungo endofítico. 6. Epigenética. I. Santos, Lourdes Campaner dos, orient. II. Bauab, Taís Maria, coorient. III. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "ESTUDO DE MODIFICADORES QUÍMICOS EPIGENÉTICOS NO CULTIVO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À PAEPALANTHUS CHIQUITENSIS (ERIOCAULACEAE) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA"

AUTOR: FELIPE HILARIO

ORIENTADORA: LOURDES CAMPANER DOS SANTOS

COORDINADORA: TAIS MARIA BAUAB

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: Sem Área de Conhecimento pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LOURDES CAMPANER DOS SANTOS
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. MARCELO APARECIDO DA SILVA
Departamento de Alimentos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNIFAL

Prof. Dr. ROBERTO GOMES DE SOUZA BERLINCK
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química do Câmpus de São Carlos da USP

Prof. Dr. FERNANDO ROGERIO PAVAN
Departamento de Ciências Biológicas / FCFAR - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. MARGARETE TERESA GOTTARDO DE ALMEIDA
Departamento de Doenças Dermatológicas, Infeciosas e Parasitárias / FAMERP

Araraquara, 27 de março de 2020

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”
Marie Curie

*Dedico este trabalho aos meus pais Eduardo
& Maria Anália, meus irmãos Eduardo Filho
e Luis Fernando Hilário que sempre me
apoiam.*
Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por existir, por estar sempre presente na minha vida e por tudo que tem me concedido.

Aos meus pais, Eduardo e Maria Anália, que sempre me incentivaram e por terem acreditado em mim.

Ao meu irmão, Fernando, pela sincera amizade e por sempre poder contar com você.

Ao meu irmão, Eduardo Filho (Júnior), partiu em 2019, mas está marcado em nossos corações e em nossa família.

À minha querida prima Mari e aos meus amados sobrinhos Lê, Bia, Breno e Léo.

À professora Lourdes Campaner dos Santos, pela orientação e, principalmente, pelo aprendizado adquirido, os quais foram essenciais à minha formação e na realização desse trabalho, desde a IC em 2007.

À professora Taís Maria Bauab, minha estimada co-orientadora, por ter aberto as portas de seu laboratório e proporcionar-me a valiosa oportunidade de trabalhar com os ensaios de atividade antimicrobiana, além das enriquecedoras discussões.

Às professoras Rosemeire C. L. R. Pietro & Angela Regina do Araujo pela participação na banca de qualificação e pelas importantes sugestões para a finalização deste trabalho.

Aos professores Marcelo Aparecido da Silva, Roberto Berlinck, Fernando Pavan & Margarete Teresa Gottardo de Almeida, que gentilmente aceitaram o convite para compor a banca de defesa do mestrado.

Ao professor Marcelo Aparecido da Silva pela amizade, orientação e imenso aprendizado durante a iniciação científica.

À professora Angela Regina do Araujo por ter dado a oportunidade em trabalhar com fungos endofíticos, pela parceria, contribuição e pelos valiosos ensinamentos.

A todos os colegas do laboratório de fitoquímica: Aninha, Carlos, Claudinha, Michelle, Guilherme, Rodrigo, Leonardo, Ju Severi, Mayara, Júlia, Raissa, Fabiano, Viviane, Clenilson, Claudia, Maria do Socorro, Lima Neto, Samara, Sauna, Weslei, Daylin, Alexander, Talitinha, Taís, Carlos, Francisco, Fabiana, Mariana Pacífico e Fabiana pela amizade e pela convivência. Foi muito bom ter vocês comigo!

A todos os colegas do laboratório de Fisiologia de Micro-organismos: Patrícia Bento, Matheus Ramos, Larissa, Bruna, Gi, e Luciani Toledo pela amizade, receptividade e prestatividade em todos os momentos.

A todos os colegas do laboratório de Micro-organismos: Juzinha, Carol, Andressa (Blossom), Alana, Rebeca, Vanessa Chapla pela convivência dentro e fora do laboratório.

Aos grandes amigos, Lú (minha irmã), Mat, Gi Cintra, Roça, Jú Bosso, Alice Haddad, Ana Carolinda, Raquel Sabará, Marininha, França, Fuxs, Vardhan, Pei, Dú, Bel, Patrick, Revorta, Naira, Babs e Mari ruiva.

Aos estimados de Araraquara, Mau, Gui, Augustinho e Álvaro!

Aos técnicos João e Marília, do Laboratório de Espectrometria de Massas do Instituto de Química, pelas análises.

Ao Rafael (PT) e Albertinho pelos espectros de IV e DC.

Ao Dr. Nivaldo Boralle, pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Instituto de Química UNESP-Araraquara, pela acolhida e incentivo à vida acadêmica

Agradeço a The University of Oklahoma e aos membros do Natural Product Discovery Group (Norman, Oklahoma-EUA), em especial ao Dr. Jinwoo pela amizade e por tudo que aprendi com vocês. Muito obrigado!

Ao prof. Dr. Robert H. Cichewicz, pela orientação, pelos ensinamentos, compreensão e amizade.

A todos os funcionários da FCFAR e do IQ que contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

À FAPESP pelas bolsas concedidas no Brasil (Processo No. 2016/05480-9) e no exterior (Processo No. 2018/01620-6) e aos funcionários vinculados à FAPESP.

As agências de fomento Capes e CNPq.

RESUMO

Este trabalho apresenta o estudo dos efeitos de modificadores epigenéticos e eliciadores químicos na diversificação metabólica de *Curvularia lunata* e *Fusarium fujikuroi*, fungos isolados de *Paepalanthus chiquitensis* (Eriocaulaceae). Os fungos foram cultivados em PDB (caldo batata dextrose), e as seguintes condições foram investigadas: (PDB + SAHA) ácido hidroxâmico suberoilânilda, (PDB + AZA) 5-azacitidina, (PDB + AA) ácido anacárdico, PDB + Cu²⁺ e PDB + Mg²⁺. Essas condições foram comparadas com o controle PDB. O estudo químico de *C. lunata*, resultou no isolamento das novas γ -lactamas espirocíclicas **C3** e **C4**, e outros cinco compostos conhecidos: triticonas E (**C1**) e F (**C2**), ácido 5-O-metilcurvulínico (**C5**), ácido curvulínico (**C6**) e curvulina (**C7**). As estruturas foram elucidadas por análises espectroscópicas e pela comparação com dados da literatura. Além disso, um estudo computacional foi realizado para determinar a configuração absoluta do C-3' de **C3** e **C4**. As triticonas **C1** e **C2** apresentaram boa atividade antibacteriana para *Escherichia coli*, com CIM de 62,5 μ g/mL. Dos eliciadores químicos utilizados, a suplementação com Mg²⁺ foi a condição que apresentou as diferenças mais significativas no perfil metabólico de *F. fujikuroi*. O extrato PDB + Mg²⁺ preparado do cultivo em escala ampliada foi purificado por métodos cromatográficos e resultou no isolamento e identificação das substâncias: ácido indolacético (**F3**) e seus derivados **F4**, **F8** e **F17**, assim como a auxina ácido fenilacético (**F2**) e seus derivados **F6**, **F11**, **F12**, **F15** e **F18**. Os compostos **F2**, **F3** e **F4** apresentaram os melhores valores de CIM para todas as leveduras do gênero *Cândida* avaliadas. As análises quantitativas por CLAE-DAD dos metabólitos isolados ácido fusárico, AIA, ácido acético-2-(4-butilpicolinamida) e terpestacina foram quantificadas nos extratos obtidos dos cultivos, e o método desenvolvido foi validado. Paralelamente, em colaboração com a Universidade de Oklahoma, foram estudados os seguintes fungos de solo: *Aspergillus arcoverdensis* que resultou no isolamento da verruculogena, fumitremorgina e veriditoxina, apresentou potente atividade contra *Trichomonas vaginalis* (1,0 μ M). O estudo bioguiado de *Cylindrocarpon pauciseptatum* possibilitou o isolamento da fujikurina B, responsável pela atividade antituberculose, não apresentando citotoxicidade em células J774. Por fim, os estudos de *Talaromyces verruculosus*, resultou em frações e substâncias que exibiram atividades biológicas frente as cepas de *T. vaginalis*, *M. tuberculosis* e *C. albicans* na formação de biofilme, sendo não citotóxicas em células J774 e HepG2. O estudo bioguiado de *T. verruculosus* resultou no isolamento de metabolitos com potente atividade inibitória na formação do biofilme de *C. albicans*: duclauxina, bacillisporina F e 1-*epi*-bacillisporin F.

Palavras-chave: Eriocaulaceae, *Paepalanthus chiquitensis*, *Fusarium fujikuroi*, *Curvularia lunata*,
fungo endofítico, epigenética

ABSTRACT

This work presents the studies of the effects of epigenetic modifiers and chemical elicitors on the metabolic diversification of *Fusarium fujikuroi* and *Curvularia lunata*, isolated of *Paepalanthus chiquitensis* (Eriocaulaceae). The fungi were grown in PDB (potato dextrose broth) and the following conditions were investigated: (PDB +SAHA) suberoylanilide hydroxamic acid, (PDB +AZA) 5-azacitidine, (PDB +AA) anacardic acid, PDB +Cu²⁺ and PDB + Mg²⁺. These conditions were compared with the PDB control. The chemical study of *C. lunata*, resulted in the isolation of new spirocyclic- γ -lactams **C3** and **C4**, and five known compounds: triticones E (**C1**) and F (**C2**), 5-*O*-methylcurvulinic acid (**C5**), curvulinic acid (**C6**) and curvulin (**C7**). The structures were elucidated by spectroscopic analysis and by comparison with data from the literature. In addition, a computational study was carried out to determine the absolute configuration in the C-3' (**C3** and **C4**). The extract and compounds were tested against bacteria and yeasts. The **C1** and **C2** showed good antibacterial activity for *E. coli*, with a minimum inhibitory concentration of 62.5 μ g/mL. The supplementation with Mg²⁺ into PDB medium was the condition that showed the most significant differences in the metabolic profile of *F. fujikuroi*. The chemical study of extract PDB + Mg²⁺ resulted in the isolation and identification of the metabolites: indoleacetic acid (**F3**) and its derivatives **F4**, **F8** and **F17**, as well of the phenylacetic acid class (**F18**) the derivatives **F2**, **F6**, **F11**, **F12** and **F15** and **F18**. The compounds **F2**, **F3** e **F4** have showed interesting MIC values against all yeast strains tested. The quantitative analysis by HPLC-DAD of the metabolites fusaric acid, indole acetic acid, acetic acid-2-(4-butylicolinamide) and terpestacin were quantified in the extracts prepared of the cultured studied, besides the method was validated. In collaboration with Oklahoma University, others activities were studied the following soil fungi: *Aspergillus arcoverdensis*, resulted in isolation of verruculogen, fumitremorgin and veriditoxin that demonstrated potential activity against *Trichomonas vaginalis* (1.0 μ M). The bioguided study of *Cylindrocarpon pauciseptatum* made it possible to isolate fujikurin B, responsible for anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and non-cytotoxicity in the J774 cell line. Finally, the studies of *Talaromyces verruculosus*, result in fractions and substances that exhibit several biological activities against *T. vaginalis*, *M. tuberculosis* and *C. albicans* in the biofilm formation, besides showed non cytotoxic in J774 and HepG2 cells. The bioguided study of *T. verruculosus* resulted in the isolation of potent metabolites able to inhibit the formation of *C. albicans* biofilm, named: duclauxin, bacillisporin F and 1-*epi*-bacillisporin F.

Keywords: Eriocaulaceae, *Paepalanthus chiquitensis*, *Fusarium fujikuroi*, *Curvularia lunata*,
endophytic fungi, epigenetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Metabólitos secundários produzidos por <i>F. fujikuroi</i>	32
Figura 02a. Metabólitos secundários produzidos por <i>Curvularia</i> spp.	35
Figura 02b. Metabólitos secundários induzidos pela adição de modificadores epigenéticos e eliciadores químicos no cultivo de diversos fungos filamentosos.....	40
Figura 03. Microplaca para a determinação da CIM.....	53
Figura 04. Reação de redução da resazurina	54
Figura 05. Reação de redução do TTC.....	56
Figura 06. Cromatograma representando os perfis dos Ex. AcOEt produzidos em escala reduzida pelo fungo <i>C. lunata</i> isolado das folhas de <i>P. chiquitensis</i> : PDB (A), PDB + Cu ²⁺ (B) PDB + Mg ²⁺ (C) [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 mm; Solvente A: H ₂ O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min ⁻¹ ; λ= 280 nm]	64
Figura 07. Cromatograma representando os perfis dos Ex. AcOEt em escala reduzida produzido pelo fungo <i>C. lunata</i> isolado das folhas de <i>P. chiquitensis</i> : PDB (A), PDB + SAHA (B), PDB +AZA (C) e PDB +AA (D) [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 mm; Solvente A: H ₂ O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min ⁻¹ ; λ= 280 nm]	65
Figura 08. Análise por CCDC das frações obtidas do fracionamento por Sephadex LH-20; Sistema de solventes: CHCl ₃ /MeOH/ <i>n</i> -PrOH/H ₂ O (5:6:1:4,v/v/v/v); 1) Fr. 1-11, A-) Uv 254nm e B-) Anisaldeído/H ₂ SO ₄ 5.1.5 Análises por CLAE-DAD das frações 1-11	68
Figura 09. Cromatograma representando os perfis do fracionamento por CLAE-DAD Fr 01-04 (A-C) [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18 , 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μm; Solvente A: H ₂ O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min ⁻¹ ; λ= 280 nm]	69
Figura 10. Cromatograma representando os perfis do fracionamento por CLAE-DAD Fr 05-07 (D-F) [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 mm; Solvente A: H ₂ O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 30 min; vazão de 1,00 mL min ⁻¹ ; λ= 280	70
Figura 11. Cromatograma representando os perfis do fracionamento por CLAE-DAD Fr 09-11 (G-I) [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 mm; Solvente A: H ₂ O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 30 min; vazão de 1,00 mL min ⁻¹ ; λ= 280	71
Figura 12. Cromatograma do fracionamento e purificação do Ex. AcOEt preparado a partir do cultivo em escala ampliada de <i>C. lunata</i> (arrumado	72

Figura 13. Cromatogramas A, B, C das substâncias C1-C3 isoladas por CLAE-DAD semipreparativo. [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ [®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H ₂ O + 0,1% TFA; Solvente B. ACN + 0,1 % TFA. Gradiente exploratório de 5-100 % de B em 30 min; vazão de 1,00 mL min ⁻¹ ; λ= 280 nm].	73
Figura 14. Cromatogramas D, E, F das substâncias C4-C7 isoladas por CLAE-DAD semipreparativo. [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ [®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H ₂ O + 0,1% TFA; Solvente B. ACN + 0,1 % TFA. Gradiente exploratório de 5-100 % de B em 30 min; vazão de 1,00 mL min ⁻¹ ; λ= 280 nm].	74
Figura 15. Espectros representativos no UV dos picos 1-6 dos Ex. AcOEt produzido pelo fungo <i>C. lunata</i> . isolado das folhas de <i>P. chiquitensis</i> ; λ = 280 nm].	75
Figura 16A. Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) dos compostos C1-C2 (HILARIO, et al., 2020)	80
Figura 16B. Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) dos compostos C1-C2 (HILARIO, et al., 2020)	81
Figura 17. ESI-QTOF-HRMS dos compostos C1-C2 (HILARIO, et al., 2020).	83
Figura 18. Espectro de <i>g</i> COSY dos compostos C1-C2	84
Figura 19. Mapa de contorno <i>g</i> HSQC dos compostos	84
Figura 20. Mapa de contorno <i>g</i> HMBC dos compostos	85
Figura 21. Estruturas químicas das substâncias C1 e C2 (A) e das triticonas E-F (B)	85
Figura 22. Espectro de IV da substância C3 (HILARIO, et al., 2020)	86
Figura 23. Principais correlações observadas nos experimentos <i>g</i> COSY e <i>g</i> HMBC para os compostos C3 e C4 (HILARIO, et al., 2020)	88
Figura 24. Principais correlações observadas no experimento NOESY para o composto C3 Adaptado de : (HILARIO, et al., 2020)	88
Figura 24A. Estruturas avaliadas por análise computacional (HILARIO, et al., 2020)	89
Figura 25. Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) das substâncias C3 e C4	91
Figura 26. Espectro de RMN de ¹³ C (150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) das substâncias C3 e C4 . (HILARIO, et al., 2020)	92
Figura 27. Espectro de 1H-1H <i>g</i> COSY (DMSO- <i>d</i> ₆)	92
Figura 28. Mapa de contorno <i>g</i> HSQC (DMSO- <i>d</i> ₆) das substâncias C3 e C4	92
Figura 29. Mapa de contorno <i>g</i> HMBC (DMSO- <i>d</i> ₆) das substâncias C3 e C4	93
Figura 30. Estruturas químicas das substâncias C3 e C4	93

Figura 31. Espectro de massas ESI-QTOF-HRMS (modo positivo) das substâncias C3 e C4 . (HILARIO, et al., 2020)	94
Figura 32. Espectro de RMN de NOESY (sinal irradiado em δ 4,10 ppm) das substâncias C3 e C4 (600 MHz, DMSO- d_6). (HILARIO, et al., 2020).....	95
Figura 33. Espectro de RMN de NOESY (sinal irradiado em δ 5,67 ppm) das substâncias C3 e C4 (600 MHz, DMSO- d_6)	97
Figura 34. Espectro de RMN de NOESY (sinal irradiado em δ 4,48 ppm) das substâncias C3 e C4 (600 MHz, DMSO- d_6)	98
Figura 35. Proposta de fragmentação por ESI-MS de C5 (HILARIO et al., 2020)	100
Figura 36. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) da substância C5	103
Figura 37. Espectro de ^1H - ^1H $g\text{COSY}$ (600 MHz, DMSO- d_6) da substância C5	104
Figura 38. Mapa de contorno $g\text{HSQC}$ (600 MHz, DMSO- d_6) da substância C5	104
Figura 39. Mapa de contorno $g\text{HMBC}$ (600 MHz, DMSO- d_6) da substância C5	105
Figure 40. ESI-QTOF-HRMS (modo negativo) da substância C5	106
Figura 41. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) da substância C6	107
Figura 42. ESI-QTOF-HRMS (modo positivo) da substância C6	108
Figura 43. Espectro de ^1H - ^1H $g\text{COSY}$ (600 MHz, DMSO- d_6) da substância C6	109
Figura 44. Mapa de contorno $g\text{HSQC}$ (600 MHz, DMSO- d_6) da substância C6	109
Figura 45. Mapa de contorno $g\text{HMBC}$ (600 MHz, DMSO- d_6) da substância C6	110
Figura 46. Estrutura química das substâncias C5 e C6	110
Figura 48. Espectro de ^1H - ^1H $g\text{COSY}$ (300 MHz, CDCl_3) da substância C7	115
Figura 49. Mapa de contorno $g\text{HSQC}$ (300 MHz, CDCl_3) da substância C7	115
Figura 50. Mapa de contorno $g\text{HMBC}$ (300 MHz, CDCl_3) da substância C7	116
Figura 51. Estrutura química da substância C7	116
Figura 52. ESI-QTOF-HRMS da substância C7	117
Figura 53. Crescimento em PDA de <i>C. lunata</i> e metabólitos isolados	119
Figura 54. Cromatograma representando os perfis dos Ex. AcOEt em escala reduzida produzido pelo fungo <i>F. fujikuroi</i> isolado dos capítulos de <i>P. chiquitensis</i> : PDB, PDB + Mg^{2+} , PDB + Cu^{2+} [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ [®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 mm; Solvente A: H_2O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente exploratório de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min ⁻¹ ; λ = 270 nm]	124

- Figura 55.** Cromatograma representando os perfis dos Ex. AcOEt em escala reduzida produzido pelo fungo *F. fujikuroi* isolado dos capítulos de *P. chiquitensis*: PDB, PDB + SAHA, PDB +AZA e PDB +AA [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 mm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 270 nm] 125
- Figura 56.** Cromatograma representando os perfis do Ex. AcOEt PDB (controle) e sobreposição com os metabólitos isolados e quantificados por CLAE-DAD: A-) JBCS, 2017; B-) PDB; C-) PDB + ácido fusárico [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 mm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100% de B em 60 min; vazão de 1,0 mL min⁻¹; λ = 270 nm] 128
- Figura 57.** Cromatograma representando os perfis do Ex. AcOEt PDB (controle) e sobreposição com os metabólitos isolados e quantificados por CLAE-DAD: A-) PDB + AIA; B-) PDB + alcaloide; C-) PDB + terpestacina [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 mm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100% de B em 60 min; vazão de 1,0 mL min⁻¹; λ = 270 nm]..... 129
- Figura 58.** Curvas analíticas dos metabólitos A-B de *F. fujikuroi* 130
- Figura 59.** Curvas analíticas dos metabólitos C-D de *F. fujikuroi* 131
- Figura 60.** Análise por CCD das frações obtidas do fracionamento por Sephadex LH-20; Sistema de solventes: CHCl₃: AcOEt (7:3, v/v); A) iodo e B) Uv 254 nm..... 136
- Figura 61.** Cromatograma representando os perfis do fracionamento por Sephadex LH-20 frações A-C [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μ m; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 30 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 221 nm] 137
- Figura 62.** Cromatograma representando os perfis do fracionamento por Sephadex LH-20 Fr D-F [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μ m; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 30 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 221 nm] 139
- Figura 63.** Cromatograma representando os perfis do fracionamento por Sephadex LH-20 Frações G-I [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μ m; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 30 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 221 nm] 140
- Figura 64.** Cromatograma representando os perfis do fracionamento por Sephadex LH-20 Frações J-K [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μ m; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 30 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 221 nm] 141
- Figura 65.** Cromatograma do fracionamento e purificação do Ex. AcOEt preparado a partir do cultivo de *F. fujikuroi* **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 66.** Cromatogramas das substâncias **F1-F3** isoladas por CLAE-DAD semi-preparativo [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μ m; Solvente A. H₂O + 0,1% TFA; Solvente B. ACN + 0,1 % TFA]. 142

Figura 67. Cromatogramas das substâncias F4-F6 isoladas por CLAE-DAD semi-preparativo [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ [®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H ₂ O + 0,1% TFA; Solvente B. ACN + 0,1 % TFA].	144
Figura 68. Cromatogramas das substâncias F7-F9 isoladas por CLAE-DAD semi-preparativo [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ [®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H ₂ O + 0,1% TFA; Solvente B. ACN + 0,1 % TFA].	145
Figura 69. Cromatogramas das substâncias F10-F12 isoladas por CLAE-DAD semi-preparativo [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ [®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H ₂ O + 0,1% TFA; Solvente B. ACN + 0,1 % TFA].	146
Figura 70. Cromatogramas das substâncias F13-F15 isoladas por CLAE-DAD semi-preparativo [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ [®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H ₂ O + 0,1% TFA; Solvente B. ACN + 0,1 % TFA].	147
Figura 71. Cromatogramas das substâncias F16-F17 isoladas por CLAE-DAD semi-preparativo [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ [®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H ₂ O + 0,1% TFA; Solvente B. ACN + 0,1 % TFA].	148
Figura 72. Estrutura química dos compostos produzidos por <i>F. fujikuroi</i> (PDB + Mg ²⁺)	149
Figura 73A. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) da substância F3	152
Figura 73B. Espectro de RMN de <i>g</i> COSY (600 MHz, CD ₃ OD) da substância F3	153
Figura 73D. Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CD ₃ OD) da substância F3	154
Figura 73E. Estrutura química da substância F3	154
Figura 74A. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) da substância F4	156
Figura 74B. Espectro de RMN de COSY (600 MHz, CD ₃ OD) da substância F4	157
Figura 74C. Mapa de contorno <i>g</i> HMBC (600 MHz, CD ₃ OD) da substância F4	157
Figura 74D. Mapa de contorno <i>g</i> HMBC (600 MHz, CD ₃ OD) da substância F4	159
Figura 74E. Estrutura química da substância F4	159
Figura 75A. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) da substância F17	161
Figura 75B. Espectro de RMN de COSY (600 MHz, CD ₃ OD) da substância F17	162
Figura 75C. Mapa de contorno HSQC (600 MHz, CD ₃ OD) da substância F17	162
Figura 75D. Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CD ₃ OD) da substância S17	164
Figura 75E. Estrutura química da substância F17	164
Figura 76A. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) da substância F22	166
Figura 76B. Espectro de RMN de <i>g</i> COSY (600 MHz, CD ₃ OD) da substância F2	167

Figura 76C. Mapa de contorno <i>g</i> HSQC (CD ₃ OD) da substância <u>F2</u>	167
Figura 76D. Mapa de contorno <i>g</i> HMBC (CD ₃ OD) da substância <u>F2</u>	169
Figura 76E. Estrutura química da substância <u>F2</u>	169
Figura 77A. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) da substância <u>F6</u> ,	163
Figura 77B. Espectro de RMN de <i>g</i> COSY (600 MHz, CD ₃ OD) da substância <u>F6</u>	164
Figura 77C. Mapa de contorno <i>g</i> HSQC (600 MHz, CD ₃ OD) da substância <u>F6</u>	164
Figura 77D. Mapa de contorno <i>g</i> HMBC (600 MHz, CD ₃ OD) da substância <u>S6</u>	165
Figura 77E. Estrutura química da substância <u>F6</u>	165
Figura 78A. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) da substância <u>F11</u>	167
Figura 78B. Espectro de RMN de <i>g</i> COSY (600 MHz, CD ₃ OD) da substância <u>F11</u>	168
Figura 78C. Mapa de contorno <i>g</i> HSQC (CD ₃ OD) da substância <u>F11</u>	168
Figura 78D. Mapa de contorno <i>g</i> HMBC (CD ₃ OD) da substância <u>F11</u>	169
Figura 78E. Estrutura química da substância <u>F11</u>	169
Figura 79A. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) da substância <u>F12</u>	171
Figura 79B. Espectro de RMN de <i>g</i> COSY (600 MHz, CD ₃ OD) da substância <u>F12</u>	173
Figura 79C. Mapa de contorno <i>g</i> HSQC (CD ₃ OD) da substância <u>F12</u>	173
Figura 79D. Mapa de contorno <i>g</i> HMBC (CD ₃ OD) da substância <u>F12</u>	174
Figura 79E. Estrutura química da substância <u>F12</u>	174
Figura 80A. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) da substância <u>F15</u>	175
Figura 80B. Espectro de RMN de <i>g</i> COSY (600 MHz, CD ₃ OD) da substância <u>F15</u>	176
Figura 80C. Mapa de contorno <i>g</i> HSQC (CD ₃ OD) da substância <u>F15</u>	176
Figura 80D. Mapa de contorno <i>g</i> HMBC (CD ₃ OD) da substância <u>F15</u>	178
Figura 80E. Estrutura química da substância <u>F15</u>	178
Figura 81A. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) da substância <u>F18</u>	181
Figura 81B. Espectro de RMN de <i>g</i> COSY (600 MHz, CD ₃ OD) da substância <u>F18</u>	182
Figura 81C. Mapa de contorno <i>g</i> HSQC (CD ₃ OD) da substância <u>F18</u>	182
Figura 81D. Mapa de contorno <i>g</i> HMBC (CD ₃ OD) da substância <u>F18</u>	184

Figura 81E. Estrutura química da substância F18	184
Figura 82. Cromatograma do fracionamento e purificação da subfração 09I por métodos cromatográficos	189
Figura 83. Cromatograma por UCLAE-DAD representando os perfis do extrato AcOEt (05A) e Frações 05B-D obtidas do pré-fracionamento por CLV utilizando sílica como FE, [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 µm; Solvente A: H ₂ O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min ⁻¹ ; Max Plot λ 200-600 nm].....	190
Figura 84. Cromatograma por UCLAE-DAD representando os perfis químicos das Frações 05E-I obtidas do pré-fracionamento por CLV utilizando a resina HP20ss como FE [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 µm; Solvente A: H ₂ O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min ⁻¹ ; Max Plot λ 200-600 nm].....	191
Figura 85. Cromatograma por UCLAE-DAD das substâncias isoladas 48A-C obtidas por CLAE-DAD semi-preparativo [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 µm; Solvente A: H ₂ O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min ⁻¹ ; Max Plot λ 200-600 nm].....	192
Figura 86. Avaliação da atividade Anti- <i>Trichomonas vaginalis</i>	193
Figura 87. Isolamento de 49A por CLAE-DAD no modo semi-preparativo	194
Figura 88. Cromatograma por UCLAE-DAD das frações 21 A-D obtidas por CLAE-DAD semi-preparativo [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 µm; Solvente A: H ₂ O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min ⁻¹ ; Max Plot λ 200-600 nm]	195
Figura 89. Espectro de RMN de ¹ H (500MHz) em CD ₃ OD da verruculogena isolada de <i>Aspergillus Arcoverdensis</i>	198
Figura 90. Espectro de RMN de ¹ H (500MHz) em CD ₃ OD da fumitremorgina A isolada de <i>Aspergillus Arcoverdensis</i>	199
Figura 91. Estruturas químicas: verruculogena e fumitremorgina A	201
Figura 92. RMN de ¹ H (500MHz) CDCl ₃ da viriditoxina isolada de <i>A. Arcoverdensis</i> ...	202
Figura 93. Cromatograma e espectros de UV e EM por UCLAE-DAD-MS da viriditoxina	203
Figura 94. Estrutura química da viriditoxina (49A)	203
Figura 95. Avaliação da atividade anti- <i>Trichomonas vaginalis</i> de 48C e 49A.....	204
Figura 96. Cromatograma do fracionamento e isolamento de 42A.....	206

- Figura 97.** Cromatograma por UCLAE-DAD do extrato AcOEt (07A) e das frações 07B-D obtidas do pré-fracionamento por CLV utilizando sílica como FE, [Coluna Analítica Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 μ m; Solvente A: H₂O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min⁻¹; Max Plot λ 200-600 nm] 207
- Figura 98.** Cromatograma por UCLAE-DAD representando os perfis das Frações 07E-I obtidas do pré-fracionamento por CLV utilizando HP20ss como FE, [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 μ m; Solvente A: H₂O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min⁻¹; Max Plot λ 200-600 nm] 208
- Figura 99.** Espectro de RMN de ¹H (500MHz) in CD₃OD da fujikurina B isolada de *Cylindrocarpon pauciseptatum* 211
- Figura 100.** Espetro de RMN de ¹³C (125MHz) em CD₃OD da Fujikurina B isolada de *Cylindrocarpon pauciseptatum* 212
- Figura 101.** Perfil químico por UCLAE-DAD-ESI/MS: Fujikurina B 213
- Figura 102.** Estrutura química da fujikurina B 213
- Figura 103.** Cromatograma do fracionamento de 22A por métodos cromatográficos 214
- Figura 104.** Cromatograma por UCLAE-DAD representando os perfis químicos das frações 22A-D obtidas do pré-fracionamento por CLV utilizando sílica como FE, [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 μ m; Solvente A: H₂O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min⁻¹; Max Plot λ 200-600 nm] 215
- Figura 105.** Cromatograma por UCLAE-DAD representando os perfis químicos das Frações 22E-I do pré-fracionamento por CLV- HP20ss como FE, [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 μ m; Solvente A: H₂O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min⁻¹; Max Plot λ 200-600 nm] 216
- Figura 106.** Avaliação da atividade contra *Trichomonas vaginalis* de 22A-I 219
- Figura 108.** Cromatograma por UCLAE-DAD representando os perfis das Frações 73A-G obtidas por CLAE-DAD, [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 μ m; Solvente A: H₂O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min⁻¹; Max Plot λ 200-600 nm] 222
- Figura 109.** Avaliação da atividade anti- *Trichomonas vaginalis* de 73A-G 223
- Figura 110.** Cromatograma e espectro por UCLAE-DAD-ESI/MS da substância isolada 73D por CLAE-DAD semipreparativo [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 μ m; Solvente A: H₂O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min⁻¹; Max Plot λ 200-600 228
- Figura 111.** Cromatograma e espectro por UCLAE-DAD-ESI/MS da substância isolada 73E2 por CLAE-DAD semipreparativo [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm

d.i. x 2,6 μm ; Solvente A: H_2O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min^{-1} ; Max Plot λ 200-600 229

Figura 112. Cromatograma por UCLAE-DAD-ESI/MS da substância isolada 73F2 por CLAE-DAD semipreparativo [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 μm ; Solvente A: H_2O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min^{-1} ; Max Plot λ 200-600 230

Figura 113. Dado de RMN de ^1H (500MHz) em CDCl_3 da duclauxina isolada de *Talaromyces verruculosus*..... 231

Figura 114. Dado de RMN de ^1H (500MHz) em CDCl_3 da bacillisporina F isolada de *Talaromyces verruculosus*..... 232

Figura 115. Dado de RMN de ^1H NMR (500MHz) em CDCl_3 da 1-*epi*-bacillisporina F isolada de *T. verruculosi*..... 234

Figura 116. Espectro de DC de D-F 235

Figura 117. Estruturas químicas: Duclauxina, Bacillisporina F e 1-*epi*-Bacillisporina F..... 235

Figura 118. Efeito de diferentes concentrações de 73D em hifas de *C. albicans* SC5314 ... 236

Figura 119. Curvas Concentração-Resposta para determinação dos valores de IC_{50} dos compostos 73D, E2-F2 contra o biofilme de *C. albicans* SC5314..... 237

Figura 120. Atividade anti-*Trichomonas vaginalis* de 73D-F..... 238

Figura 122. Isolamento da 84D por métodos cromatográficos 240

Figura 123. Cromatogramas por UCLAE-DAD as frações 81A-H obtidas por CLAE-DAD semipreparativo, [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 μm ; Solvente A: H_2O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min^{-1} ; Max Plot λ 200-600 nm] 241

Figura 124. Cromatogramas por UCLAE-DAD das frações 84A-D obtidas por CLAE-DAD semipreparativo, [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 μm ; Solvente A: H_2O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min^{-1} ; Max Plot λ 200-600 nm] 237

Figura 125. Estrutura química da oxafenalenona (84D) 238

Figura 126. Cromatograma e espectros por UCLAE-DAD-ESI/MS da substância 84D isolada por CLAE-DAD semipreparativo [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 μm ; Solvente A: H_2O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min^{-1} ; Max Plot λ 200-600 239

Figura 127. Espectro de RMN de ^1H (500MHz) em CD_3OD da oxafenalenona SF 226 isolada de *Talaromyces verruculosus*..... 240

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Condições de cultivo em escala reduzida de <i>F. fujikuroi</i>	47
Tabela 02. Condições de cultivo em escala reduzida de <i>C. lunata</i>	47
Tabela 03. Cultivo em escala reduzida de <i>Curvularia lunata</i>	66
Tabela 04. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C das substâncias C1 e C2 e comparação com os respectivos valores publicados na literatura	79
Tabela 05. Dados RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) das substâncias C3-C4	87
Tabela 06. Erro absoluto calculado próton ($ \Delta\delta $) e Erro Médio Absoluto (MAE) para as estruturas candidatas C3 e C4 como calculadas com B3LYP/6-311+G (2d, p)//M06-2X/6-31+G(d, p) teoria de nível. (HILARIO, et al., 2020).....	89
Tabela 07. Erro absoluto calculado para carbono ($ \Delta\delta $) e Erro Médio Absoluto (MAE) para as estruturas candidatas C3 e C4 calculadas por B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p) teoria de nível. (HILARIO, et al., 2020).....	90
Tabela 08. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) em DMSO- d_6 -mono e bidimensionais das substâncias C5 e C6	102
Tabela 09. Dados de RMN de ^1H (300 MHz) e ^{13}C (150 MHz) da substância C7 (CDCl_3) e comparação com dados da literatura (CDCl_3).....	112
Tabela 10. Atividade antimicrobiana do extrato AcOEt e compostos isolados	118
Tabela 11. Cultivo em escala reduzida de <i>F. fujikuroi</i>	121
Tabela 12. Identificação de substâncias presentes nos cromatogramas (CLAE-DAD) nos Cultivos em escala reduzida do extrato de <i>F. fujikuroi</i>	126
Tabela 13. Dados de calibração dos metabólitos de <i>F. fujikuroi</i>	132
Tabela 14. Recuperação exatidão	133
Tabela 15. Quantidade de metabólitos nos Exs AcOEt de <i>F. fujikuroi</i> *.....	134
Tabela 16. Frações obtidas do fracionamento por Sephadex LH20 e rendimento em mg	136
Tabela 17. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, em CD_3OD) mono e bidimensionais da substância F3	150
Tabela 18. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD) mono e bidimensionais substância F4	155
Tabela 19. Dados de RMN de ^1H (600MHz) e ^{13}C (CD_3OD) mono e bidimensionais da substância F17	160
Tabela 20. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (CD_3OD) –mono e bidimensionais da substância F2	165

Tabela 21. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (CD_3OD) –mono e bidimensionais da substância F6	170
Tabela 22. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (CD_3OD) –mono e bidimensionais da substância F11	166
Tabela 23. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (CD_3OD) –mono e bidimensionais da substância F12	170
Tabela 24. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (CD_3OD) –mono e bidimensionais da substância F15	174
Tabela 25. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (CD_3OD) –mono e bidimensionais da substância F18	180
Tabela 26. Atividade antimicrobiana dos Extratos AcOEt das condições avaliadas e compostos isolados do cultivo com Mg^{2+}	187
Tabela 27. RMN de ^1H (500 MHz) de 48A e 48C: comparação com a literatura ^a	197
Tabela 28. Dados de RMN de ^1H da viriditoxina e comparação com os da literatura	200
Tabela 29. Avaliação da atividade anti-TB de 07A-I.....	209
Tabela 30. Dados de RMN de ^1H da fujikurina B e comparação com os da literatura	210
Tabela 31 Avaliação da atividade anti-TB (22A-I)	217
Tabela 32. Avaliação da citotoxicidade (22A-I).....	218
Tabela 33. Avaliação da atividade antifúngica e antibiofilme de 22 A-I.....	220
Tabela 34. Atividades antifúngica e antibiofilme de 73A-G.....	223
Tabela 35. Dados de RMN de ^1H dos compostos 73D-F isolados de <i>T. verruculosus</i> e comparação com os da literatura	227
Tabela 36. Valores de IC_{50} de 73E2-F2 contra o biofilme de <i>C. albicans</i> SC5314	236
Tabela 37. Atividade antifúngica e antibiofilme de 81A-H	236

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$[\alpha]_D^{20}$	Rotação específica a 20 °C
λ	Comprimento de onda
δ	Deslocamento químico
1J	Acoplamento a uma ligação
2J	Acoplamento a duas ligações
3J	Acoplamento a três ligações
AA	Ácido anacárdico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AZA	5-azacitidina
<u>C</u>	Substância isoladas de <i>Curvularia lunata</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCD	Cromatografia em camada delgada
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLV	Cromatografia líquida à vácuo
<i>D</i>	Dupleto
<i>Dd</i>	Duplo duplete
d.i.	Diâmetro interno
<i>Dt</i>	Duplo triplete
Ex AcOEt	Extrato acetato de etila
ESI-MS	<i>Electrospray Ionisation Mass Spectrometry</i>
FIA-ESI-IT-MS	<i>Flow Injection Analysis - Electrospray Ionization - Ion Trap - Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas acoplada a um ion-trap com interface de Ionização por Electrospray e inserção direta da amostra)
<i>g</i> HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
<i>g</i> HMQC	<i>Heteronuclear multiple-quantum coherence</i>
IR	<i>Infrared</i> (Infravermelho)
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>M</i>	Multiplete
$[M - H]^-$	Molécula desprotonada
$[M + H]^+$	Molécula protonada
<i>m/z</i>	Relação massa carga
AMH	Ágar Müeller-Hinton
MOPS	ácido 3-[N-morfino] propanossulfônico
CMH	caldo Müeller-Hinton
<i>Q</i>	Quadruplete
NOESY	<i>Nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
NPDG-OU	<i>Natural Products Discovery Group, The University of Oklahoma</i>
Nt	não testado

DAD	Photodiode array detector (detector de arranjo de diodos)
PDA	<i>Potato dextrose agar</i> (ágar batata dextrose)
PDB	<i>Potato dextrose broth</i> (meio de batata dextrose)
PBS	tampão fosfato de sódio
PTFE	Politetrafluoroetileno (Teflon)
R_f	Distância percorrida substância / distância percorrida solvente, CCD.
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
S	Singleto
<u>S</u>	Substância isoladas de <i>Fusarium fujokuroi</i>
SAHA	Ácido hidroxâmico suberoilânilda
sL	Singleto largo
TTC	cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
SPE	Extração em fase sólida (<i>Solid phase extraction</i>)
sp.	Espécies
T	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	<i>Total correlation spectroscopy</i>
R_T	Tempo de retenção
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultravioleta
V	Volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
2.1 <i>Fusarium fujikuroi</i>	31
2.2 Gênero <i>Curvularia</i>	33
2.3 Análises quantitativas e validação analítica por CLAE-DAD.....	36
2.4 Diversificação metabólica e epigenética	38
3. OBJETIVOS	42
3.1 Objetivos gerais:	42
3.2 Objetivos específicos:.....	42
4. MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 ETAPA QUÍMICA E CULTIVO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	44
4.1.1 Solventes.....	44
4.1.2 Meios para cultivo dos micro-organismos.....	44
4.1.3 Modificadores epigenéticos e íons metálicos	44
4.1.4 Esterilização dos materiais e meios de cultura	44
4.1.5 Manipulação dos micro-organismos.....	44
4.1.6 Isolamento dos fungos endofíticos	45
4.1.7 Identificação dos fungos endofíticos	45
4.1.8 Micro-organismos.....	45
4.1.9 Suspensão de hifas-esporos	46
4.1.10 Obtenção dos extratos AcOEt em escala reduzida	46
4.1.11 Obtenção do extrato AcOEt em escala ampliada:	47
4.1.12 Preparo das amostras para as análises por CLAE- DAD.....	47
4.1.13 Análises por CLAE- DAD no modo analítico.....	48
4.1.14 Fracionamento do extrato em coluna de permeação em gel.....	48
4.1.15 Isolamento dos metabólitos por CLAE-DAD no modo semi-preparativo ...	49
4.1.16 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	49
4.1.17 Análise dos metabólitos por ESI-QTOF-HRMS	50
4.1.18 Identificação das substâncias por Ressonância Magnética Nuclear	50
4.1.19 Outros equipamentos	51
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	52
4.2.1 Padronização da suspensão bacteriana	52
4.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima	53
4.2.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima	54

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	54
4.3.1 Padronização da suspensão fúngica.....	54
4.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima	55
4.3.3 Determinação da Concentração Fungicida Mínima	56
4.4 Avaliação da atividade tricomonicida	56
4.5 Avaliação da atividade antimicobacteriana	57
4.6 Determinação da citotoxicidade	57
4.7 Avaliação da atividade antibiofilme de <i>Cândida albicans</i>	58
5. RESULTADOS & DISCUSSÃO: <i>Curvularia lunata</i>	63
5.1 Cultivo em escala reduzida.....	63
5.2 Perfil cromatográfico por CLAE-DAD dos Exs AcOEt de <i>C. lunata</i>	67
5.3 Obtenção do extrato bruto em escala ampliada	67
5.4 Fracionamento por CLAE-DAD do Ex. AcOEt (PDB + Mg ²⁺).....	68
5.5 Isolamento das substâncias C1-C6 por CLAE-DAD	68
5.6 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	76
5.6.1 Substâncias C1 e C2	76
5.6.2 Substâncias C3 e C4	86
5.6.3 Substâncias C5 e C6	99
5.6.4 Substância C7	111
5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	118
6. RESULTADOS & DISCUSSÃO: <i>Fusarium fujikuroi</i>	120
6.1 Efeitos de moduladores epigenéticos e eliciadores químicos em <i>F. fujikuroi</i> : ...	120
6.2 Perfil cromatográfico por CLAE-DAD dos Exs AcOEt de <i>F. fujikuroi</i>	122
6.3 Análise quantitativa dos metabólitos de <i>F. fujikuroi</i> por CLAE-DAD.....	127
6.4 Obtenção do extrato bruto em escala ampliada (PDB + Mg ²⁺).....	135
6.5 Fracionamento do Ex. AcOEt por Sephadex LH-20	136
6.6 Análises por CLAE-DAD das frações A-K.....	136
6.7 Isolamento das substâncias F1-F18 por CLAE-DAD:.....	141
6.8 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL das substâncias isoladas de <i>F. fujikuroi</i>	149
6.8.1 Substância F3 :	149
6.8.2 Substância F4 :	155
6.8.3 Substância F17 :	160
6.8.4 Substância F2 :	165
6.8.5 Substância F6	170
6.8.6 Substância F11	166
6.8.7 Substância F12	170

6.8.8 Substância F15	174
6.8.9 Substância F18	180
6.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	185
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO: <i>Aspergillus arcuoverdensis</i>	188
7.1 Isolamento dos metabólitos ativos de <i>Aspergillus arcuoverdensis</i> :	188
7.2 Avaliação da atividade Anti- <i>Trichomonas vaginalis</i> :	193
7.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	196
7.3.1 151FH48A & 151FH48C:	196
7.3.2 151FH49A:	200
7.4 Avaliação da atividade Anti- <i>Trichomonas vaginalis</i> :	204
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO: <i>Cylindrocarpon pauciseptatum</i>	205
8.1 Isolamento dos compostos ativos de <i>Cylindrocarpon pauciseptatum</i> :	205
8.2 Avaliação da atividade antimicobacteriana:	209
8.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	210
8.3.1 151FH42A	210
9. RESULTADOS E DISCUSSÃO: <i>Talaromyces verruculosus</i>	214
9.1. Isolamento dos compostos ativos de <i>Talaromyces verruculosus</i> :.....	214
9.2 Avaliação da atividade antituberculose de 22A-I.....	217
9.3 Avaliação da citotoxicidade de 22A-I	218
9.4 Avaliação da atividade tricomonicida contra <i>T. vaginalis</i> de 22A-I	219
9.5 Avaliação da atividade antifúngica e antibiofilme de 22A-I.....	220
9.6 Isolamento dos metabólitos ativos da subfração 22I por CLAE-DAD	221
9.7 Atividades anti- <i>Trichomonas vaginalis</i> e antifúngica: 73A-G.....	223
9.8 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	224
9.8.1 151FH73D:	224
9.8.2 151FH73E2:.....	225
9.8.3 51FH73F2:.....	225
9.9 Configuração absoluta de 151FH73D-F2:.....	235
9.10 Avaliação da atividade antibiofilme de 73D, 73E2 3 73F2:.....	236
9.11 Avaliação da atividade anti- <i>Trichomonas vaginalis</i> dos compostos (73D-E2)	238
9.12 Isolamento dos metabólitos ativos da 81D por CLAE-DAD	240
9.13 Avaliação da atividade antifúngica das amostras 81A-H.....	236
9.15 Elucidação estrutural da 84D:.....	238
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS:	242
11. REFERÊNCIAS	245

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Estima-se a existência de 1,5 a 5,1 milhões de espécies de fungos no planeta, entretanto menos de 10 % desses micro-organismos foram descobertos e descritos na literatura (AMEND et al., 2019). Em vista disto, pesquisadores de diversas áreas envolvidos no estudo com fungos ficaram intrigados com o seguinte questionamento: onde poderiam existir os demais fungos do planeta? Tal questionamento instigou cientistas nas décadas passadas dando início às pesquisas com plantas, na tentativa de descobrir um reservatório de organismos conhecidos por endofíticos (STROBEL, 2018, 2003).

Dentre as várias descrições para endofíticos na literatura, o termo pode ser definido por bactérias e fungos que colonizam os tecidos vegetais intercelulares e/ou intracelulares, e também compartimentos que existem no exterior da membrana plasmática, o apoplasto (NEWMAN; CRAGG, 2020a, 2020b; STIERLE; STROBEL, 1993).

Esses micro-organismos são considerados uma importante fonte de novas substâncias bioativas (NEWMAN; CRAGG, 2016, 2020b; STROBEL, 2018), sendo também capazes de produzir muitas classes de metabólitos, com várias aplicabilidades na medicina (NEWMAN; CRAGG, 2020a; STROBEL, 2018). Além disso, trabalhos de relevância destacam que aproximadamente 47% das substâncias isoladas de fungos são biologicamente ativas (BILLS; GLOER, 2016).

Estudos recentes envolvendo o isolamento de importantes substâncias provenientes de fungos endofíticos com atividade anticarcinogênica, têm chamado atenção evidenciando a potencialidade destes micro-organismos como fonte de metabólitos secundários anticarcinogênicos. Entre os exemplos de sucesso que merecem destaque estão o paclitaxel (Taxol[®]) identificado de *Taxomices* e de muitas espécies de *Pestalotiopsis*, assim como a camptotecina, podofilotoxina, vimblastina e vincristina. Todos estes agentes anticarcinogênicos têm como característica em comum o fato de serem produzidos em pequena quantidade pelos fungos endofíticos. Tem sido demonstrado que esses compostos não são artefatos, e que a identificação e controle dos genes envolvidos na expressão das proteínas responsáveis pela biossíntese dos metabólitos secundários podem contribuir significativamente aumentando sua produção pelos micro-organismos (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Os endofíticos podem ser manipulados geneticamente e físico-quimicamente, tanto para aumentar a produtividade de metabólitos desejados quanto para produzir novos análogos de metabólitos bioativos (KHARWAR et al., 2011; SHARMA et al., 2017).

Infelizmente, os métodos de fermentação usuais tais como modo estático, agitação orbital e os meios de cultura artificialmente definidos são opções limitadas para mimetizar o habitat natural de um fungo endofítico. Consequentemente, apenas um subconjunto dos genes responsáveis pela produção de metabólitos secundários são sempre expressos no ambiente artificial de laboratório, limitando assim o potencial desses micro-organismos (SHARMA et al., 2017; WILLIAMS et al., 2008).

O termo epigenética é definido como alterações herdáveis na expressão gênica que ocorrem sem que haja mudanças na sequência de DNA (CHERBLANC et al., 2013). O epigenoma representa uma promissora oportunidade para a obtenção de novos metabólitos secundários de fungos endofíticos e outros micro-organismos.

O uso de modificadores epigenéticos pode ser explorado como uma ferramenta efetiva para promover a expressão das vias biossintéticas silenciosas responsáveis por produzir metabólitos secundários com características únicas (AKONE et al., 2019; LIU et al., 2014). Além disso, tem sido descrito na literatura que oligossacarídeos, íons metálicos e solventes orgânicos como etanol e dimetilsulfóxido são capazes de atuar como eliciadores químicos, isto é, são capazes de induzir a produção e diversificação de metabólitos pelos fungos (AUCKLOO et al., 2017; MAFEZOLI et al., 2018a; PETTIT, 2011). Diferente dos modificadores químicos epigenéticos, os eliciadores químicos induzem a produção de metabólitos secundários por meio de mecanismos inespecíficos ou ainda não determinados (CHAGAS, 2014).

Há diferentes mecanismos epigenéticos envolvidos nas alterações do epigenoma, controlando a acessibilidade transcricional dos genes que codificam as enzimas biossintéticas. Dos mecanismos epigenéticos, os mais estudados e conhecidos são a metilação do DNA e as modificações das histonas (CICHEWICZ, 2010; FISCH et al., 2009). Assim, a presença de inibidores químicos epigenéticos das enzimas HDAC e DNA-metiltransferase pode promover o aumento potencial na produção e diversificação dos metabólitos produzidos pelos micro-organismos (CHUNG et al., 2013).

As vantagens em usar inibidores de pequenas moléculas que têm como alvo o epigenoma reside no fato dessa técnica apresentar baixo custo, sendo de fácil implantação na maioria dos laboratórios de pesquisa, não requerendo o conhecimento prévio sobre sequências genômicas dos fungos (CICHEWICZ, 2010). Adicionalmente, verificou-se que a incorporação de metais pesados nos meios de cultura melhora também a produção de metabólitos fúngicos (MAFEZOLI et al., 2018a; PARANAGAMA; WIJERATNE; GUNATILAKA, 2007).

Em vista do exposto, é necessária a execução de projetos que caracterizem o potencial da associação planta-endofítico e que busquem novas abordagens que sejam mais efetivas na produção de compostos ativos produzidos por fungos endofíticos.

Para tanto, usamos como critério de seleção as espécies de plantas da Serra do Cipó de Minas Gerais. Essa região é privilegiada para o estudo de fungos endofíticos, visto que, as espécies vegetais são endêmicas e de habitat extremo (altitude elevada, solo arenoso com poucos nutrientes, alta incidência de raios ultravioleta e temperaturas elevadas durante o dia e baixas durante a noite). Dessa forma, o estudo de micro-organismos associados às espécies vegetais existentes nessas regiões pode proporcionar metabólitos ativos únicos.

A espécie hospedeira escolhida para o desenvolvimento desse trabalho é *Paepalanthus chiquitensis* Herzog tem como sinonímia *Paepalanthus giganteus* Sano (TROVÓ; SANO, 2010), e representa uma das 1200 espécies pertencentes à Eriocaulaceae. *Paepalanthus* é o maior gênero dessa família, contendo cerca de 400 espécies, das quais mais de 300 existem apenas no Brasil (ANDRINO; COSTA; SANO, 2015); TROVÓ; SANO, 2016).

Portanto, considerando que a espécie é endêmica na região possuindo uma grande diversidade química e biológica, e que existem poucos estudos na literatura de micro-organismos associados com espécies da família, neste trabalho foram estudados os extratos acetato de etila dos fungos endofíticos isolados de *Paepalanthus chiquitensis* que previamente mostraram-se mais promissores, visando a produção de novos metabólitos secundários com atividade antimicrobiana.

Paralelamente, durante o estágio BEPE-FAPESP, Processo nº. 2018/01620-6, uma triagem química dos extratos acetato de etila de três cepas pertencentes ao Banco de Fungos da Universidade de Oklahoma (OU) denominadas *Aspergillus arcovendensis*, *Cylindrocarpon pauciseptatum* e *Talaromyces verruculosus*, foram estudadas neste trabalho.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

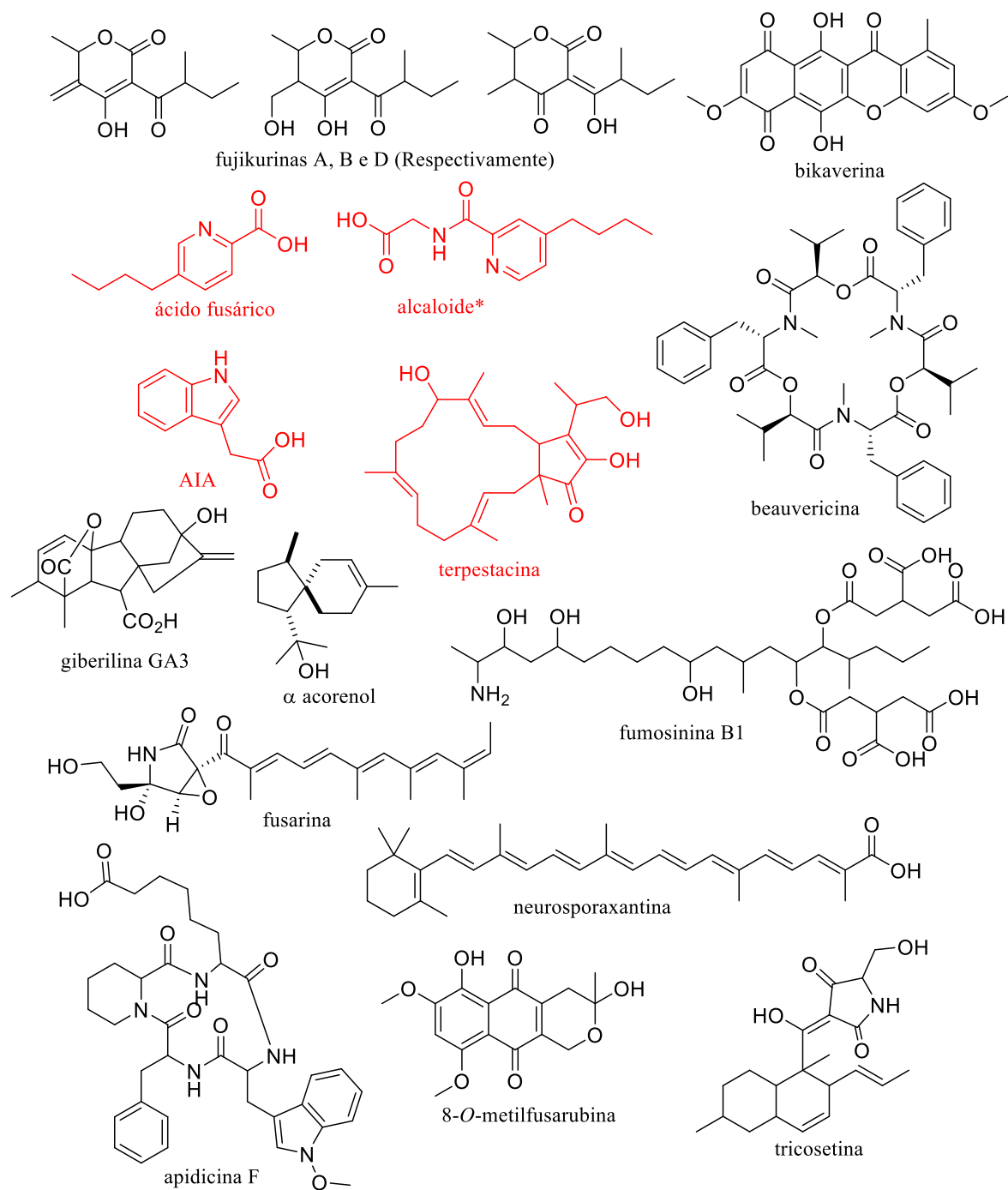
2.1 *Fusarium fujikuroi*

O *Fusarium fujikuroi* é um membro do complexo de espécies *Gibberella fujikuroi* (VON BARGEN et al., 2015a), sendo este fungo ascomiceto patogênico do arroz *F. fujikuroi* é um conhecido produtor de metabólitos secundários de várias classes de compostos (BROCK et al., 2013). O *F. fujikuroi* é causador de uma doença conhecida como bakanae devido à sua capacidade de produzir os hormônios das plantas, as giberelinas. O fungo é também conhecido por produzir micotoxinas nocivas (por exemplo, ácido fusárico e fusarinas) e pigmentos (por exemplo, bikaverina e fusarubinas) (ARNDT et al., 2015).

Outros metabólitos produzidos pelo *F. fujikuroi* estão emonisininas, ácido fusárico e moliniformina. Terpenóides incluem o fito-hormônio giberelina (GBA3) e vários dos seus derivados (BROCK et al., 2013).

Um estudo realizado por VON BARGEN et al., (2015) na qual são discutidos sequenciamento do genoma, revelou que o fungo tem o potencial genético de produzir muito mais metabólitos secundários do que os relatados. Por exemplo, os produtos do *cluster* do gene PKS19 críptico e silencioso que foram recentemente identificados, forneceram os compostos denominados de fujikurinas A – D (Figura 01).

No trabalho de Hilario e colaboradores (2017), foi realizada a triagem da atividade antimicrobiana de vinte e cinco fungos endofíticos isolados das partes aéreas de *Paepalanthus chiquitensis* (Eriocaulaceae) que também foram testadas contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Salmonella* sp., e a levedura *Cândida albicans* resistente ao fluconazol. O extrato acetato de etila produzido por *Fusarium fujikuroi* foi o mais bioativo, sendo escolhido para o estudo químico, proporcionando o isolamento do alcaloide inédito ácido acético-2-(4-butilpicolinamida), além do já mencionado ácido fusárico, do ácido indolacético e da terpestacina (HILARIO et al., 2017). Esta mesma cepa está sendo estudada no presente trabalho. Na Figura 01 está sendo apresentado os principais metabólitos isolados do meio de cultivo de *F. fujikuroi*.

Figura 01. Metabólitos secundários produzidos por *F. fujikuroi*

*ácido acético-2-(4-butilpicolinamida)

Substâncias isoladas por (Hilario et al., 2017)

2.2 GÊNERO *Curvularia*

O gênero *Curvularia* é composto por fungos filamentosos ascomicetos (Filo Ascomycota), Subfilo Ascomycotina, Classe Pezizocomycotina, Ordem Pleosporales e Família Pleosporaceae (KRIZSÁN et al., 2015). Este gênero apresenta mais de 80 espécies, sendo em sua maioria principalmente patógenas do solo ou planta. Recentemente, têm sido relatado por vários estudos que a dificuldade encontrada para a distinção entre as espécies pertencentes às espécies de *Curvularia* são decorrentes também da não correlação da identificação morfológica com a identificação molecular (MANAMGODA et al., 2014).

As espécies pertencentes do gênero *Curvularia* incluem espécies anteriormente classificadas como *Bipolaris* spp. (KRIZSÁN et al., 2015). O gênero inclui várias espécies patógenas de plantas e algumas outras patógenas emergentes oportunistas de humanos (MADRID et al., 2014).

Os conídios das espécies de *Curvularia* tendem a ser curtos (na maioria das espécies são menores de 100 µm) e geralmente retos ou curvos. Quando curvados, os conídios têm células intermédias excessivamente aumentadas, contribuindo para a sua curvatura. Diferentemente, os conídios das espécies de *Bipolaris* são geralmente maiores e mais septados que os de *Curvularia* (geralmente mais de 100 µm) e podem ser retos ou suavemente curvos (MANAMGODA; CAI; MCKENZIE, 2012).

Curvularia faz parte do grupo de fungos dematiáceos, também chamados de fungos negros. Formam um grupo de micro-organismos que possuem coloração escura, devido à presença do pigmento melanina na sua parede celular (DE HOFFMANN, 2011).

A melanina presente nos fungos dematiáceos é formada a partir do polímero diidroxinaftaleno (DNH), produzido no citoplasma e excretado na parede celular. A interação do polímero DNH com macromoléculas como lipídeos, proteínas e carboidratos resultam na formação do complexo melanínico, considerado um fator de virulência associado aos fungos do gênero *Bipolaris* (CALIGIORNE et al., 1999).

As espécies *C. australiensis*, *C. geniculata*, *C. hawaiiensis*, *C. lunata* e *C. spicifera* são as espécies mais frequentemente isoladas em amostras clínicas, causadoras de infecções locais, afetando principalmente o sistema respiratório, a córnea e a pele (KRIZSÁN et al., 2015).

Os fungos dematiáceos têm importância médica por serem causadores de feohifomicoses em humanos e animais (ANTONIASSI et al., 2010). A infecção pode ser cutânea, subcutânea e também sistêmica (REVANKAR et al., 2002). As apresentações

clínicas mais comuns são a sinusite alérgica, ceratite, endoftalmite, onicomicose, peritonite peritoneal associada à diálise, infecções de pulmão e pele, e, menos frequente, as infecções do sistema nervoso central (DA CUNHA et al., 2012).

Muito embora sejam responsáveis por infecções, fungos dematiáceos dentre os quais incluem as diversas espécies de *Curvularia*, são capazes também por produzir vasta gama de metabólitos secundários bioativos.

Entre outros compostos de relevância estão os macrolídeos curvulona A (I) e B (II) produzido por *Curvularia* sp., endofítico isolado da alga marinha *Gracilaria folifera* que apresentou atividade antimicrobiana contra *Microbotryum violaceum* e *Septoria tritici* (DAI et al., 2010). Outro trabalho bastante relevante na área de química de produtos naturais, publicado em 1967, apresentou um estudo comparativo com 13 espécies pertencentes ao gênero *Curvularia*, onde foram descritos o isolamento da curvulina (IV) e do ácido curvulínico (III) (COOMBE; JACOBS; WATSOW, 1968), metabólitos estes que desde então vêm sendo citados em uma série de outros manuscritos recentes.

Dentre os representantes da classe dos alcaloides isolados das espécies pertencentes ao gênero *Curvularia* estão o antimicrobiano curvulamina (V) e o seu derivado (VI) curindolizina que têm atividade antibacteriana e anti-inflamatória (HAN et al., 2016).

A descoberta de curvularida B (IX) a partir do cultivo de *Curvularia geniculata*, isolado de *Catunaregam tomentosa*, mostrou atividade contra a levedura *Cândida albicans* ATCC 90028, além disso não apresentou citotoxicidade (MARTINEZ-KLIMOVA; RODRÍGUEZ-PEÑA; SÁNCHEZ, 2017).

O glicosídeo curcubitacina E é um triterpeno tetracíclico isolado de espécies da família *Cucurbitaceae*, esse metabólito foi biotransformado por *Curvularia lunata* fornecendo os derivados (VIII e IX) que apresentam as atividades anti-inflamatória e antipirética, comparadas com a dos fármacos acetaminofeno/paracetamol e da indometacina (ABDELKHALEK et al., 2017).

Outros metabólitos de relevância isolados do fungo endofítico *Curvularia* sp., isolado das folhas de *Murraya koenigii*, cultivado em meio sólido (arroz) estão os seguintes compostos: murrano furano A (X), murranolida A (XI), pirenolida A (XVI), modiolida A (XV) e 8-hidroxi-6-metoxi-3-metilisocumarina (XVII). (MONDOL et al., 2017).

As estruturas químicas dos metabólitos secundários supramencionados estão sendo apresentados na Figura 02a.

2.3 ANÁLISES QUANTITATIVAS E VALIDAÇÃO ANALÍTICA POR CLAE-DAD

Podemos definir validação analítica como sendo a coleta e avaliação de dados gerados a partir de um determinado processo/método podendo ter aplicabilidade tanto comercial quanto científica. Desta forma, a validação analítica estabelece evidências experimentais de que processo/método/estudo forneça consistentemente resultados reprodutíveis, precisos e exatos e em conformidade com metodologias aceitas e estabelecidas (MCMILLAN, 2016).

Os conceitos e definições para validação analítica podem ser acessados em diferentes guias técnicos regulatórios e compêndios oficiais, dentre os quais podemos listar, por exemplo: as Farmacopéias Brasileira, Americana e Europeia; guias do FDA (Food and Drug Administration), da IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), e não menos importante os guias e diretrizes de agências regulatórias como por exemplo o ICH (International Conference on Harmonization) (PALLASTRELLI, 2013)

Mais especificamente no Brasil, a legislação vigente para a validação de métodos analíticos é a resolução da ANVISA RE nº 899, datada em 29 de maio de 2003 e a ANVISA RDC 27 de 17 de maio de 2012 responsáveis por estabelecer um conjunto de parâmetros de desempenho analítico. No caso de metodologia analítica não descrita em farmacopeias e formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados os parâmetros específicos: especificidade/seletividade, linearidade, exatidão, precisão, robustez, limites de quantificação (AGÊNCIA...2003; AGÊNCIA....2012).

O primeiro parâmetro de validação do método analítico é denominado de especificidade e pode ser definido como sendo a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes da amostra, dentre os quais estão inclusos os interferentes: adjuvantes, impurezas, produtos de degradação e até mesmo outra substância (AGÊNCIA...2012). Porém, o termo mais apropriado segundo a IUPAC no lugar de especificidade é seletividade, ou seja, métodos que respondem a vários compostos químicos que apresentam característica em comum e não a um único (seletivo) (RIBANI et al., 2004).

Segundo a ANVISA, a linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (AGÊNCIA..., 2003). A curva de calibração define a relação existente entre a resposta do detector com a concentração do analito presente na matriz da amostra (MCMILLAN, 2016). Recomenda-se que a linearidade seja determinada

pela análise de, no mínimo 5 concentrações diferentes (AGÊNCIA..., 2003; AGENCIA...2012).

A precisão pode ser dita como sendo a avaliação da proximidade dos resultados obtidos para uma mesma amostra analisada em uma série de repetições. Podemos dividir a precisão em três diferentes categorias: repetibilidade (precisão intra-corrida); precisão intermediária (precisão inter-corrida) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial). (AGÊNCIA., 2003). A repetibilidade é realizada a partir de análises seguidas, sob mesmas condições em um intervalo de tempo restrito. Enquanto que na precisão intermediária tem como objetivo o efeito de determinadas variações, como análises feitas em diferentes dias, analistas ou equipamentos. Por fim, a reprodutibilidade é referida quanto ao uso do procedimento analítico em laboratórios diferentes. Usualmente, expressa-se a precisão através do Desvio Padrão Relativo Percentual (DPR%), também chamada de Coeficiente de Variação (CV). Mais especificamente para métodos cromatográficos, a avaliação da precisão é feita por meio da injeção de padrões (LANÇAS, 2004). O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (AGÊNCIA., 2003).

O Limite de Detecção (LD) corresponde a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, em um dado procedimento experimental. Já o Limite de Quantificação (LQ) corresponde a menor concentração de uma substância que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis (RIBANI et al., 2004).

A robustez do método é definida como sendo a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e proposital variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante o uso normal. Por meio deste parâmetro analítico é possível constatar a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, por exemplo: porcentagem e pH da fase móvel, temperatura, comprimento de onda, entre outros (AGÊNCIA..., 2003).

Em suma, os parâmetros analíticos supramencionados tem grande importância uma vez que demonstra a adequabilidade do método para a finalidade pretendida, além do mais assegura a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (AGÊNCIA., 2003, AGÊNCIA., 2012; IUPAC, 2002; CHAN, 2011; MCMILLAN, 2016).

Estes parâmetros analíticos foram utilizados neste trabalho, com a finalidade de verificar a variação dos metabólitos secundários produzidos nos extratos estudados com a adição de eliciadores/modificadores epigenéticos.

2.4 DIVERSIFICAÇÃO METABÓLICA E EPIGENÉTICA

Para verificação da eficácia na produção de metabólitos secundários produzidos por endofíticos, infelizmente, os métodos de fermentação usuais tais como modo estático, agitação em “*shaker*” (agitação orbital) e os meios de cultura artificialmente definidos não são opções satisfatórias para mimetizar o habitat natural de um fungo endofítico. Consequentemente, apenas um subconjunto dos genes responsáveis pela produção de metabólitos secundários será sempre expresso no ambiente artificial de laboratório, limitando assim o potencial desses organismos (WILLIAMS et al., 2008).

No entanto, o uso de modificadores epigenéticos pode ser explorado como uma ferramenta efetiva para promover a expressão das vias biossintéticas silenciosas responsáveis por produzir metabólitos secundários com características únicas (LIU et al., 2014). Além disso, tem sido descrito na literatura que oligossacarídeos, metais pesados e solventes orgânicos como etanol e dimetilsulfóxido atuam como eliciadores químicos, ou seja, são capazes de induzir a produção de metabólitos pelos fungos (PETTIT, 2011). Diferente dos modificadores químicos e epigenéticos, os eliciadores químicos induzem a produção de metabólitos secundários por meio de mecanismos inespecíficos ou ainda não determinados (CHAGAS, 2014).

Assim, considerando que existem mecanismos epigenéticos envolvidos na alteração do epigenoma, que controla a acessibilidade transcricional dos genes que codificam as enzimas biossintéticas (CICHEWICZ, 2010; FISCH et al., 2009), o tratamento dos fungos com inibidores químicos das enzimas HDAC e DNA metiltransferase pode promover potencialmente o aumento na produção e diversificação dos metabólitos produzidos por eles (CHUNG, 2013).

As vantagens em usar inibidores de pequenas moléculas que têm como alvo o epigenoma reside no fato dessa técnica ser de baixo custo, sendo de fácil implantação na maioria dos laboratórios de pesquisa não requerendo o conhecimento prévio sobre sequências genômicas dos fungos (CICHEWICZ, 2010). Verificou-se recentemente que a incorporação de metais pesados nos meios de cultura melhora a produção de metabólitos fúngicos (PARANAGAMA et al., 2007).

A incorporação de Cu^{2+} no meio PDB aumentou tanto a produção de metabólitos produzidos por *Anteaglonium* sp. FL0768 quanto afetou drasticamente sua via biossintética, resultando na produção de dímeros de pentacetídeos: palmarumicina CP₄ (**I**), palmarumicina CP₁ (**II**), além do novo metabólito palmarumicina CE₄ (**III**) (MAFEZOLI et al., 2018).

O fungo de solo *Doratomyces microsporus* teve a produção de compostos antimicrobianos induzidos pela incorporação de ácido valpróico durante o seu cultivo em meio líquido, dentre os metabólitos estão o ácido indol-3-acético (AIA) (IV), ácido indol-3-carboxílico (V) e o ácido fenilacético (VI) (ZUTZ et al., 2016).

Quatro novos ácidos tetrâmeros denominados de cladosinas H e I (VII), e J e K (VIII) foram isolados do fungo *Cladosporium sphaerospermum* L3P3 do cultivo com o inibidor de histona desacetilase SAHA (ZHANG et al., 2018).

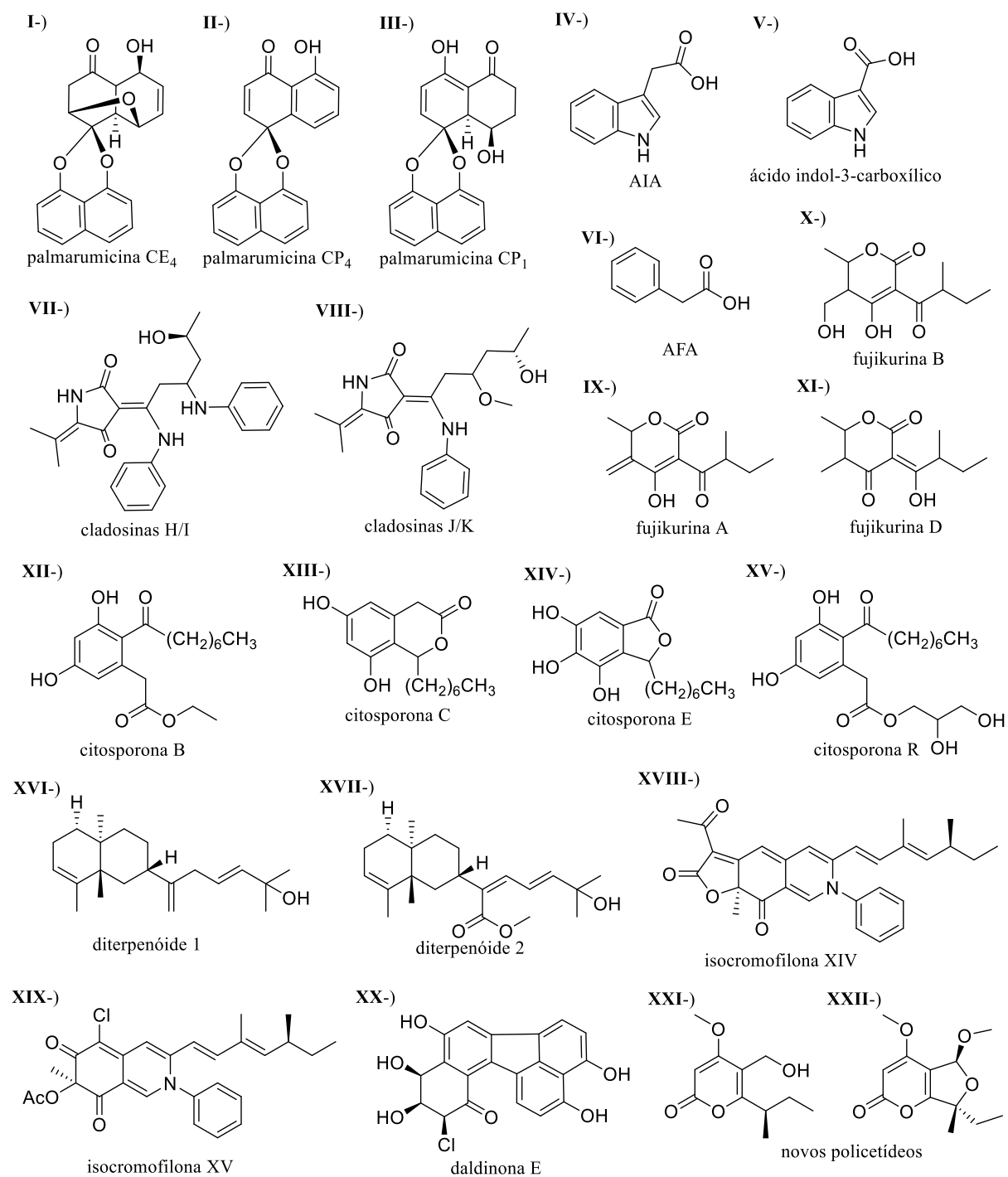
Um estudo com o *Fusarium fujikuroi* envolvendo a ativação do *cluster* de genes que codificam as enzimas conhecidas como policetídeo sintases (PKS19) possibilitou induzir a produção das fujikurinas B-D (IX-XI), novos metabólitos de origem natural (VON BARGEN et al., 2015).

O cultivo do fungo marinho *Leucostoma persoonii* com modificadores epigenéticos resultou em maior produção das conhecidas citosporonas B (XII), C (XIII) e (XIV), bem como a indução resultou na produção da citosporona R (XV), que exibiu promissora atividade contra o *Plasmodium falciparum*, baixa citotoxicidade na linhagem celular A549, e um índice terapêutico de inibição de 90% (BEAU et al., 2012)

A suplementação de um inibidor da DNA metiltransferase, 5-azacitidina (5-AZA), ao meio de cultura de *Penicillium funiculosum*, alterou dramaticamente os perfis metabólicos, fornecendo o isolamento de dois novos diterpenóides prenileudesmano 1 (XVI) e 2 (XVII) (LIU et al., 2014).

O modificador químico epigenético ácido hidroxâmico suberoylanilida (SAHA) induziu a produção de metabólitos por *Penicillium mallochii* CCH01, um fungo isolado do intestino de *Ectropis oblique*, fornecendo o isolamento de dois novos derivados da esclerotioramina: isocromofilona XIV (XVIII) e isocromofilona XV (XIX) (ZHANG et al., 2019). Além disso, a presença de SAHA no cultivo do fungo *Daldinia* sp. induziu a produção de um novo policetídeo pentacíclico clorado, daldinona E (XX) com potente atividade antioxidante (DU; KING; CICHEWICZ, 2014). Dois novos derivados policetídeos α -pirona (XXI e XXII) foram produzidos por *Penicillium herquei* pela adição de 5-AZA na cultura fúngica (GUO et al., 2018), Figura 02b.

Figura 02b. Metabólitos secundários induzidos pela adição de modificadores epigenéticos e eliciadores químicos no cultivo de diversos fungos filamentosos.



OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais:

Realizar estudos químicos e antimicrobianos de metabólitos secundários produzidos por *Fusarium fujikuroi* e *Curvularia lunata*, isolados de *Paepalanthus chiquitensis* (Eriocaulaceae).

Realizar estudos químicos e bioguiados para obter metabólitos secundários biologicamente ativos contra agentes infecciosos e resistentes produzidos por *Aspergillus arcoverdensis*, *Cylindrocarpon pauciseptatum* e *Talaromyces verruculosus* (BEPE/FAPESP).

3.2 Objetivos específicos:

- Realizar os cultivos dos fungos endofíticos em escala reduzida em diferentes condições para investigar os efeitos de modificadores epigenéticos e eliciadores químicos;
- Registrar os perfis cromatográficos dos extratos preparados a partir do cultivo dos fungos endofíticos por CLAE-DAD e CCD;
- Selecionar as condições promissoras para cultivo dos endofíticos em escala ampliada;
- Fracionar os extratos dos fungos endofíticos selecionados até a purificação dos metabólitos secundários por diferentes técnicas cromatográficas;
- Elucidar estruturas químicas por técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C , UV, IV e EM.
- Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica;
- Desenvolver estudos analíticos de quantificação e validação por CLAE-DAD de metabólitos isolados do extrato produzido por *F. fujikuroi*;
- Desenvolver estudos químicos bioguiados para obter bioativos de extratos de fungos de solos (NPDG-OU);
- Preparar e submeter amostras para a biblioteca de PNs de fungos de solo (NPDG-OU);
- Avaliação da atividade antimicobacteriana frente ao *M. tuberculosis* de amostras de fungos de solos (NPDG-OU);
- Determinar citotoxicidade em células HepG2 e J774A de amostras de fungos de solos (NPDG-OU);
- Avaliar a atividade tricomonicida contra *T. vaginalis* de amostras de fungos de solos (NPDG-OU);

- Avaliar a atividade antibiofilme de *C. albicans* de amostras de fungos de solos (NPDG-OU);

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ETAPA QUÍMICA E CULTIVO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

4.1.1 Solventes

- ✓ Solventes PA: Acetona, AcOEt, CHCl₃, DCM, MeOH, *n*-BuOH e *n*-PrOH e (Synthlab®); DMSO (Sigma-Aldrich®) e EtOH.
- ✓ Solventes CLAE: ACN (Tedia®), MeOH (Baker®), água purificada em sistema Milli Q (Millipore®) e TFA (Mallinckrodt®);
- ✓ Solventes deuterados. CDCl₃ (Sigma-Aldrich®) e DMSO-*d*₆ (CIL®).

4.1.2 Meios para cultivo dos micro-organismos

- ✓ PDA (meio de cultivo sólido) - Potato dextrose agar (Acumedia®). 39 g/L de água. [fécula de batata (4 g); dextrose (20 g), ágar (15 g)];
- ✓ PDB (meio de cultivo líquido) - Potato dextrose broth (Acumedia®). 24 g/L de água. [fécula de batata (4 g); dextrose (20 g)].
- ✓ Cereal Cherrios®

4.1.3 Modificadores epigenéticos e íons metálicos

Os efeitos na produção e diversificação dos metabólitos foram realizados na presença e ausência de modificados químicos epigenéticos. ácido hidroxâmico suberoilânida (SAHA) e 5- azacitidina (AZA) (Sigma-Aldrich®); de íons metálicos Cu²⁺ e Mg²⁺ e do composto fenólico conhecido como ácido anacárdico (AA) (Sigma-Aldrich®).

4.1.4 Esterilização dos materiais e meios de cultura

A esterilização de todo material utilizado na manipulação dos micro-organismos, e também dos meios de culturas preparados, foi realizada em autoclave do fabricante Quimis®, sendo mantidos a temperatura de 121 °C por 15 minutos, Pressão 1 atm.

4.1.5 Manipulação dos micro-organismos

O procedimento de esterilização do material vegetal e manipulação dos micro-organismos foram realizados em capela de vazão laminar (Pachame®) PA 310-Serie 172-99.

4.1.6 Isolamento dos fungos endofíticos

Esta etapa do trabalho foi realizada em colaboração com Dra. Vanessa Mara Chapla, orientada da Profa. Dra. Angela Regina de Araújo do Instituto de Química da Unesp (2013-2014). As cepas foram depositadas no Nucleo de Bioensaio, Biossíntesis e ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) em Araraquara.

As cepas foram isoladas das partes aéreas da espécie vegetal *Paepalanthus chiquitensis* (Eriocaulaceae). A espécie foi coletada na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil (19°14'58.92"S, 43°31'04.40"W), em fevereiro de 2012 e identificada pelo Prof. Dr. Paulo Takeo Sano. O *voucher* (Sano 3402 F) foi depositado no Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo-SP, Brasil. O cadastro desta espécie no SISGEN é A95E3A3.

Metodologia para cultivo e isolamento dos endofíticos de *P. chiquitensis* estão descritos em HILARIO et al., (2017).

4.1.7 Identificação dos fungos endofíticos

Os fungos endofíticos estudados neste trabalho, foram enviados para a Genotyping incubadora, localizada em Botucatu. A identificação foi realizada através do sequenciamento automático por eletroforese capilar no equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®) e alinhamento das sequências de nucleotídeos produzidas com as sequências de referência depositadas no GenBankSanger (MicroID™).

Os dados obtidos das sequências ITS de cada uma das cepas foram comparadas com a pesquisa BLAST permitindo a identificação das respectivas espécies e os dados obtidos depositados no GenBank. O resultado da pesquisa apresentou 99,0 % de similaridade com o *Fusarium fujikuroi* (número de acesso KJ000432.1 (HILARIO, et al., 2017) e Cadastro no SISGEN nº AA2B67C), enquanto que para a outra cepa estudada neste trabalho apresentou alta porcentagem de similaridade com a espécie *Curvularia lunata* (número de acesso HQ631009.1, e Cadastro no SISGEN nº AFE19D8)

4.1.8 Micro-organismos

Foi realizado o cultivo com modificadores químicos epigenéticos de *Fusarium fujikuroi*, isolado dos capítulos, e *Curvularia lunata*, isolado das folhas de *P. chiquitensis* (Eriocaulaceae).

Durante o estágio BEPE (realizado na University of Oklahoma, Norman-Oklahoma, Estados Unidos) foram estudados os fungos *Aspergillus arcovirdensis* (190D5) UT6927 RBM-2, *Cylindrocarpon pauciseptatum* (171G12) MO6345 TV8-3 e *Talaromyces verruculosus* (163A4) FL00859 RBM-3.

4.1.9 Suspensão de hifas-esporos

Os fungos *F. Fujikuroi* e *C. lunata* foram repicados em placa de Petri contendo PDA e incubados a 28 °C, por um período de 7-14 dias. Os micélios foram raspados e colocados em tubo tipo Falcon contendo água estéril. As suspensões foram agitadas em vortex e filtradas em separador celular (100 µm). Em seguida, as suspensões foram padronizadas em espectrofotômetro ($OD_{600} = 0.40-0.60$). A suspensão de hifas e esporos foi utilizada no cultivo em meio líquido PDB (itens 4.1.10 e 4.1.11).

4.1.10 Obtenção dos extratos AcOEt em escala reduzida

A suspensão de hifas e esporos preparada como descrita no item 4.1.9 foi utilizada para inocular os fungos *F. Fujikuroi* e *C. lunata* em meio de cultivo líquido PDB. Ambos esses fungos foram cultivados em escala reduzida e avaliados em sete diferentes condições de cultivo, em triplicata. O volume de 750 µL da suspensão de hifas-esporos ($OD_{600} = 0,3$) foi adicionado em cada um dos 21 frascos Erlenmeyer (500 mL) preparados com volumes de PDB apresentados nas Tabelas 01 e 02. As seguintes condições foram avaliadas: PDB (controle), PDB +SAHA; PDB +AZA PDB + Cu^{2+} ; PDB + Mg^{2+} , PDB +AA (Tabela 01 e 02). Os frascos foram mantidos em modo estático a 25 °C.

No 32º dia foi verificado a ausência de glicose (negativo) para o ensaio contendo Mg^{2+} no cultivo de *F. Fujikuroi*, e no 34º dia para o ensaio contendo Cu^{2+} no cultivo de *C. lunata*. Então, para ambos esses dois fungos, o meio líquido aquoso foi separado dos micélios por filtração a vácuo e submetido à partição líquido/líquido com AcOEt (3x 1/3 volume filtrado). As fases orgânicas foram reunidas e lavadas com água destilada (3x 1/5 volume filtrado), sendo posteriormente secas com Na_2SO_4 anidro, o qual foi removido por filtração simples. O solvente orgânico foi removido em evaporador rotativo para obtenção dos extratos brutos. Os perfis cromatográficos dos extratos foram registrados.

Tabela 01. Condições de cultivo em escala reduzida de *F. fujikuroi*

Código	Ensaio	[] final PDB (μm)	Vol. PDB (mL)	[] Sol. estoque (mM)	Vol. Sol. estoque (μL)
FH-51_1	PDB	-	200	-	-
FH-51_2	CuSO ₄	250	200	100	750
FH-51_3	MgSO ₄	250	200	100	750
FH-51_4	SAHA	100	200	5	1000
FH-51_5	AZA	100	200	50	600
FH-51_6	AA	100	200	2	2000

* Soluções estoque de SAHA e AA em 100 % DMSO

Tabela 02. Condições de cultivo em escala reduzida de *C. lunata*.

Código	Ensaio	[] final PDB (μm)	Vol. PDB (mL)	[] Sol. estoque (mM)	Vol. Sol. estoque (μL)
FH-80_1	PDB	-	300	-	-
FH-80_2	CuSO ₄	250	300	100	750
FH-80_3	MgSO ₄	250	300	100	750
FH-80_4	SAHA	2.5	300	5	150
FH-80_5	AZA	100	300	50	600
FH-80_6	AA	4	300	2	600

* Soluções estoque de SAHA e AA em 100 % DMSO

4.1.11 Obtenção do extrato AcOEt em escala ampliada:

Para a obtenção do Ex. AcOEt em escala ampliada, a suspensão de hifas e esporos preparada como descrita no item 4.1.9 foi utilizada para inocular os fungos *F. Fujikuroi* e *C. lunata* em meio de cultivo líquido PDB + Mg²⁺. O volume total de 6,3 L de meio de cultivo líquido PDB (21 frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 300 mL de PDB + Mg²⁺). Os frascos foram mantidos em modo estático, sob temperatura controlada (25 °C) por 35 dias. Ao final do período de fermentação o meio de cultivo foi filtrado. O filtrado aquoso foi submetido a partição líquido/líquido com AcOEt (3x volume total do filtrado), que após a evaporação do solvente resultou nos extratos AcOEt.

4.1.12 Preparo das amostras para as análises por CLAE- DAD

Todos os extratos injetados no cromatógrafo foram previamente submetidos ao *clean-up* em cartucho de SPE de 1000 mg/6 mL (55 μm , Strata-X, Phenomenex®) preenchidos com sílica de fase reversa C18, (1 mg da amostra para 10 mg de fase estacionária sílica C18). Os

cartuchos foram primeiramente ativados com MeOH (100%, 2,0 mL, 3 vezes), 20 mg de cada um dos extratos foi solubilizado em 2,0 mL de MeOH a 100 %. Após isso, o extrato foi aplicado no cartucho de SPE e eluído com a mesma fase móvel utilizadas nas etapas de ativação do cartucho e solubilização da amostra. O eluato foi levado a capela até a secura, solubilizado na concentração de 5 mg/mL (MeOH:H₂O, 8:2, v/v) e, por fim, filtrados em membrana de PTFE de 0,22 µm (Millex[®], Merck Millipore), coletados em vials de 1,5 mL e analisados por CLAE- DAD.

4.1.13 Análises por CLAE- DAD no modo analítico

Para registrar os cromatogramas dos extratos e das substâncias isoladas dos fungos de *P. chiquitensis*, utilizou-se cromatógrafo líquido de alta eficiência (analítico, gradiente quaternário) modelo PU-2089 (Jasco[®]), acoplado a detector de arranjo de fotodiodos com faixa de varredura de 195-650 nm e intervalo mínimo de 1 nm, modelo MD-2010 (Jasco[®]). Para a aquisição e processamento dos dados cromatográficos foi utilizado o software EZChrom Elite Client/Server versão 3.1.7 (Chromatec[®]). As análises foram realizadas utilizando uma coluna de fase reversa RP18, modelo Luna 2 (Phenomenex[®]) de 250 x 4,6 mm d.i., apresentando partículas com tamanho médio de 5 µm protegida com uma coluna de guarda (Phenomenex[®]) de 4 x 3 mm d.i. As substâncias foram injetadas por de um injetor Rheodyne[®] 7125 com um loop de 100 µL, volume de injeção de 20 µl, vazão de 1,0 mL/min.

4.1.14 Fracionamento do extrato em coluna de permeação em gel

O extrato AcOEt produzido a partir do cultivo do fungo endofítico de *F. fujikuroi* foi fracionado em coluna de vidro com 85 cm de altura por 2,5 cm de diâmetro interno, empacotada com Sephadex[®] LH-20 (Pharmacia), acoplada à bomba peristáltica P1 18-1110-91 e a um coletor automático de frações RedFrac (Pharmacia[®]), com capacidade para 95 frações. Para o fracionamento, o extrato (1,5 g) foi solubilizado em MeOH (7,0 mL), e em seguida centrifugado por 10 minutos a 3500 rpm (centrífuga CELM[®], COMBATE), separando-se o precipitado do sobrenadante. O sobrenadante foi filtrado com algodão e aplicado na coluna de sephadex LH-20, eluída com MeOH a 100%. Foram obtidas 49 frações de aproximadamente 10 mL cada, as quais foram submetidas a triagem química por CCD.

O extrato AcOEt preparado a partir do cultivo de *Fusarium fujikuroi* foi fracionado em coluna de vidro com 60 cm de altura por 1,0 cm de diâmetro interno, empacotada com Sephadex[®] LH-20 (Pharmacia), eluída com os sistemas de solventes Hex-DCM (1:4, v/v),

DCM-Acetona (3:4, v/v), DCM-Acetona (1:4, v/v), DCM-MeOH (1:1, v/v), e finalmente MeOH, sendo utilizado 50,0 mL de cada um destes sistemas de solventes. Foram coletadas 59 frações (10 mL) cada, analisadas por CCD e foram reunidas em conformidade com os seus perfis químicos sendo reunidas em 11 outras frações.

4.1.15 Isolamento dos metabólitos secundários por CLAE- DAD no modo semi-preparativo

As análises preparativas para purificação das substâncias isoladas dos fungos endofíticos isolados de *P. chuquitensis* por CLAE- DAD foram executadas usando cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo PU-2086 (Jasco®), acoplado a detector de arranjo de fotodiodos, monitorado nos comprimentos de onda $\lambda=270$ nm, $\lambda=280$ nm, $\lambda=305$ nm e $\lambda=366$ nm, modelo MD-2010 (Jasco®). Para a aquisição e processamento dos dados cromatográficos foi utilizado o software Chromnav (Jasco®). As análises foram realizadas utilizando uma coluna de fase reversa RP18, modelo Luna 2 (Phenomenex®) de 250 x 10,0 mm d.i., apresentando partículas com tamanho médio de 10 μ m protegida com uma coluna de guarda (Phenomenex®) de 4,0 x 3,0 mm d.i. A fração estudada foi injetada através de um injetor Rheodyne® 7125, com um loop de 500 μ L, volume de injeção de 100-500 μ L.

Para análises preparativas para purificação das substâncias isoladas dos fungos de solos estudadas em Oklohama foram realizadas por CLAE-DAD modelo Waters 1525 (Waters®), sistema binário de solventes, acoplado a DAD. As análises foram realizadas utilizando uma coluna de fase reversa RP18, modelo Kinetex ou Biphenyl (Phenomenex®) de 250 x 10,0 mm d.i., apresentando partículas com tamanho médio de 10 μ m protegida com uma coluna de guarda (Phenomenex®) de 4,0 x 3,0 mm d.i. A fração estudada foi injetada através de um injetor Rheodyne® com um loop de 500 μ L, volume de injeção de 75-400 μ L, vazão 4,0 mL/min.

4.1.16 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para a análise dos extratos, das frações obtidas do fracionamento por sephadex LH-20 e da purificação por coluna cromatográfica de sílica e CLAE-DAD preparativo, foram utilizadas placas de sílica gel, UV 254, marca Sorbent Technologies®, base de alumínio 200 μ m. Cada fração obtida das etapas de fracionamento e purificação foi aplicada em uma placa de sílica de 20x5cm. As placas foram eluídas com sistema de solvente quaternário (CHCl₃: MeOH: *n*-PrOH. H₂O, 5:6:1:4 v/v/v/v) e com sistema de solvente binário (CHCl₃.AcOEt 1/1

v/v). Após a eluição, reveladas primeiro com a luz UV, e em seguida foi borrifada uma solução de anisaldeído/H₂SO₄. As placas foram posteriormente levadas a uma estufa a 130 °C. Após revelação das cromatoplas, as frações que apresentaram mesmos R_fs (fatores de retenção) e coloração foram reunidas e transferidas para o mesmo frasco. As reuniões foram concentradas até a secura em evaporador rotativo, as massas medidas em balança analítica e armazenadas ao abrigo da luz e umidade.

4.1.17 Análise dos metabólitos por ESI-QTOF-HRMS e UCLAE-DAD/ESI-MS

Para espectrometria em alta resolução, os espectros das substâncias purificadas foram obtidos em um espectrômetro de massas Q-TOF MaXis Impact™, equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em vazão contínuo a 3 µL/min. As amostras foram solubilizadas em MeOH:H₂O (1:1, v/v) e foram ionizadas por electrospray (ESI).

Análise das substâncias isoladas dos extratos produzidos por fungos de solos estudadas em Oklohama foram realizadas em um equipamento de UPCLAE-DAD-ESI/MS Shimadzu 2020. As amostras foram solubilizadas em MeOH 100% e foram ionizadas por electrospray (ESI). Foi utilizada uma coluna Kinetex (Phenomenex®) C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 µm; Solvente A: H₂O + 0,05% ácido fórmico; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min⁻¹; Max Plot λ 200-600 nm.

4.1.18 Identificação das substâncias por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN unidimensional: ¹H, ¹³C e NOESY-1D, e bidimensional: ¹H-¹H-COSY, HSQC, HMBC, foram realizadas em espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker® Avance III HD 600 (14,1 Tesla) com sonda criogênica de 5 mm, com detecção inversa de três canais (¹H, ¹³C).

Para as análises de RMN das substâncias isoladas dos extratos preparados a partir dos cultivos de fungos de solos estudadas em Oklahoma foi utilizado o espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Varian VNMR (400 e 500 MHz para ¹H; 100 e 125 MHz para ¹³C)

Os solventes utilizados na dissolução das amostras para obtenção dos espectros foram CDCl₃, CD₃OD, ou DMSO-*d*₆ (CIL®) com pureza ≥ 99,9%, usando como referência o sinal do resíduo do solvente não-deuterado. O software Mestre Nova foi utilizado na aquisição dos deslocamentos químicos e interpretação de cada espectro.

4.1.19 POP-NPDG: pré-fracionamento de Exs. AcOEt da escala ampliada em Cheerios:

A metodologia empregada para preparar os extratos brutos AcOEt dos cultivos em escala ampliada assim como as etapas cromatográficas para realização dos pré-fracionamentos foram realizados em conformidade com o procedimento operacional padrão (POP) do Natural Products Discovery Group (NPDG) da University of Oklahoma: Pré-fracionamento de extratos AcOEt preparados em escala ampliada em Cheerios. A metodologia para preparo e envio de amostras para os diferentes bioensaios e encaminhamento para acerto na biblioteca de produtos naturais foram realizadas conforme descrito nesse mesmo POP do NPDG.

Para a obtenção do Ex. AcOEt em escala ampliada, foram utilizados três sacos de cultivo de fungos em meio sólido Cherrios. Os sacos foram mantidos em modo estático, sob temperatura controlada (25 °C) por 3 semanas. Ao final do período de fermentação o meio sólido contendo a massa micelar foi transferido para béquer de 2L, seguido da adição de AcOEt até a completa imersão do conteúdo transferido ao frasco.

A extração dos metabolitos foi realizada mecanicamente com um batedor adaptado, após homogeneizado foi mantido em repouso por 2 horas. Após esse período, foi realizada a filtração à vácuo através de um tecido de algodão. O solvente removido em evaporador rotativo.

Os extratos AcOEt preparados após a remoção do solvente em evaporador rotativo, foram submetidos à cromatografia líquida à vácuo (CLV), em coluna de sílica gel, eluída com hexano/DCM (1:1, v/v), DCM (100%), DCM/MeOH (10:1, v/v) e MeOH (100%), fornecendo quatro subfrações de 1,0 L cada. A subfração DCM/MeOH; 10:1, v/v resultante do pré-fracionamento por CLV em sílica gel foi novamente submetida à CLV, utilizando como FE a resina Diaion HP20ss, eluída com MeOH:H₂O: 30%, 50%, 70%, 90%, 100% MeOH e DCM:MeOH (1:1, v/v), resultando em seis subfrações, 1L cada. Os solventes foram removidos em evaporador rotativo.

As amostras submetidas para bioensaio e biblioteca de PNs do NPDG foram preparadas em DMSO (100%) na concentração de 5,0 mg/ml para Ex. AcOEt e 2,0 mg/ml para as frações obtidas em ambas etapas cromatográficas.

4.1.20 Outros equipamentos

- ✓ Balanças analíticas (Marte®, AL 200; Shimatzu, AY220) com capacidade para 200g e precisão de 0,001g.
- ✓ Evaporador rotativo (Heidolph®, Laborota 4001. efficient) equipado com bomba à vácuo (Heidolph®, Rotavac valve control).

4.1.21 Análise de dicroísmo circular

As análises de dicroísmo circular eletrônico foram realizadas em dois espectropolarímetros, Jasco® J-815 e Jasco® J-810, usando uma cela de quartzo com comprimento do caminho óptico de 1,0 mm.

4.1.22 Análises infravermelho (IV)

Os espectros por espectroscopia de absorção vibracional na região do infravermelho (IV) foram obtidos no espectrômetro Thermo Scientific Nicolet iS5 FT-IR 17.

4.1.23 Análises de rotação óptica

Os espectros de dispersão de rotação óptica foram realizados em um Polarímetro digital a JASCO Dip-370 (Jasco®) usando MeOH como solvente.

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada no Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos da FCFAr. Unesp Araraquara sob a co-orientação da Profa. Dra. Taís Maria Bauab.

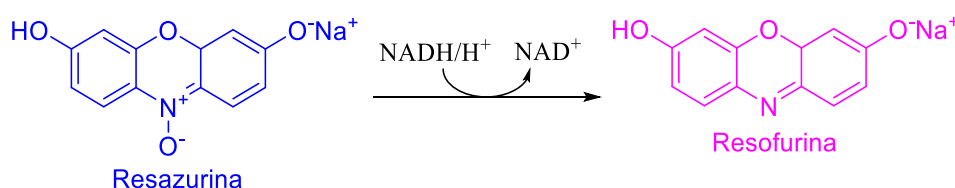
4.2.1 Padronização da suspensão bacteriana

Foram preparados cultivos das bactérias *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella* sp (ATCC 19196) em caldo MH, e incubados a 37 °C por 24 horas. Após o tempo de incubação, foi feita a padronização das cepas bacterianas. Cada um dos cultivos foi transferido para solução tampão fosfato pH 7,2 e ajustada a turbidez até a escala

Fonte: Adaptado de (BONIFÁCIO, 2014).

As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C durante 24 horas. Foi observado a turbidez por meio da leitura visual sem uso de revelador, e posterior avaliação colorimétrica utilizando 30 µL resazurina (100 µg/mL) como indicador (Figura 04). Após 2 horas de incubação a 37 °C, os poços que apresentam atividade antibacteriana permanecem corados de azul, enquanto os poços onde houve crescimento microbiano se coram em rosa. Assim, a CIM foi determinada como a menor concentração do extrato bruto onde não foi observado visualmente crescimento microbiano. Os testes foram realizados em triplicata.

Figura 04. Reação de redução da resazurina



Fonte: Adaptada de FUKUSHIMA et al., 2003

4.2.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Antes da adição de resazurina, uma alíquota de cada poço foi semeada em placas de Petri contendo agar Müeller-Hinton (MHA), e incubadas durante 24 h em estufa a 37°C.

Após esse período foram observados os pontos onde ocorreu crescimento microbiano, determinando assim a concentração bactericida mínima (CBM) que é definida como a menor concentração testada onde não ocorreu crescimento microbiano após a realização da subcultura. Os testes foram realizados em triplicata.

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

4.3.1 Padronização da suspensão fúngica

Foi preparado cultivo de levedura *C. albicans* (ATCC 10231) em caldo sabouraud dextrose (caldo SD), e incubados a 37 °C por 48 horas. Após o tempo de incubação, foi feita a padronização da levedura. O cultivo foi transferido para tampão fosfato (PBS) pH 7,2 e ajustada a turbidez até a escala 0,5 de McFarland (5×10^6 UFC/mL). Em seguida realizou-se a leitura espectrofotométrica a 530 nm até obtenção de absorbância de 0,12 a 0,15. Após isso, a

suspensão foi diluída na proporção 1.100, em tampão fosfato (PBS) seguido de diluição 1.20 em meio RPMI (Meio Roswell Park Memorial Institute) para atingir a concentração de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, mantida em banho de gelo até o momento de ser utilizada nos ensaios.

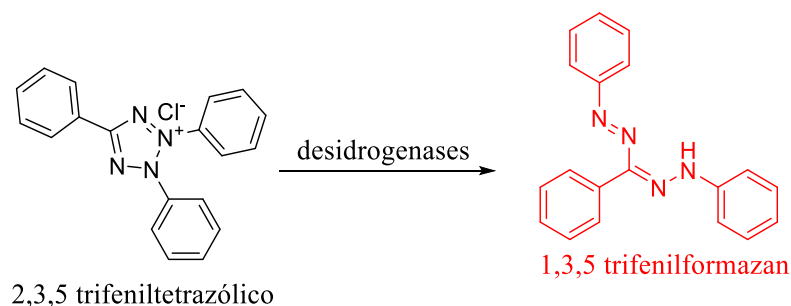
4.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A avaliação da atividade antifúngica e a determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos extratos produzidos por fungos endofíticos isolados de *P. chiquitensis* (Eriocaulaceae) foi realizada segundo a técnica de microdiluição em caldo em conformidade com a norma M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) e Duarte et al., 2005, com modificações.

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (colunas A-H, linhas 1-12) e cada orifício foi preenchido com 100 μ L de RPMI 1640, ajustado a pH 7,0 com tampão MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanossulfônico) e esterilizado por membrana filtrante. Seguido de 100 μ L de cada um dos extratos, diluídos em DMSO 20% (dimetilsulfóxido) na concentração inicial de 2000 μ g/mL. Após a homogeneização, uma alíquota de 100 μ L da mistura foi retirada e transferida para o próximo poço, realizando diluições seriadas na razão 1.1 sucessivamente da coluna A até H (Figura 03). Um volume de 100 μ L da suspensão de levedura padronizada foi adicionada em cada poço completando um volume final de 200 μ L, a concentração final no poço A foi de 1000 μ g/mL e no poço H foi de 7,8 μ g/mL.

Como controle positivo foi utilizado solução de anfotericina B na concentração de 16 μ g/mL e fluconazol a 128 μ g/mL. Também foram realizados o controle de esterilidade do meio, controle do crescimento do inóculo, controles de turbidez das substâncias-testes e controle negativo (DMSO 20 %).

As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C durante 48 horas. Foi observado a turbidez por meio de leitura visual sem uso de revelador, e posterior avaliação colorimétrica utilizando 20 μ L cloreto de 2,3,5- trifeniltetrazólio (TTC) (0,02 g/mL) como indicador (Figura 05). Após 2 horas de incubação a 37 °C, os poços que apresentam atividade antifúngica permanecem incolores, enquanto os poços onde houve crescimento microbiano se coram em rosa. Os poços que apresentaram atividade permanecem incolores, enquanto os poços nos quais houve crescimento microbiano se coram de vermelho (Duarte et al., 2005). Os testes foram realizados em triplicata.

Figura 05. Reação de redução do TTC

Fonte: Adaptada de DUARTE et al, 2005.

4.3.3 Determinação da Concentração Fungicida Mínima

Antes da adição do indicador TTC nas microplacas, uma alíquota de cada poço foi semeada em placas de Petri contendo agar Sabouraud dextrose (SDA), e incubadas durante 48 horas em estufa a 37 °C. Após esse período foi observado os pontos onde ocorreram crescimento microbiano, determinando assim a concentração fungicida mínima (CFM) que é definida como a menor concentração testada na qual não ocorreu crescimento microbiano após a realização da subcultura. Os testes foram realizados em triplicata.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRICOMONICIDA

A avaliação da atividade tricomonicida frente a cepa do parasita *T. vaginalis* foi realizado pelo Dr. Jarrod King, pesquisador associado, University of Oklahoma do NPDG (Norman, Oklahoma-Estados Unidos), a metodologia utilizada para avaliação da atividade contra o parasita foi publicada recentemente, sendo o responsável pelo desenvolvimento e padronização do método descrito a seguir (KING et al., 2019).

Foi utilizada a cepa de *T. vaginalis* Donne (ATCC PRA-98) em meio de cultivo TYI-S33 a 37 °C em tubos fechados com tampa de rosca. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços em condições empregando níveis reduzidos de oxigênio e níveis aumentados de dióxido de carbono (microaerófilo). As amostras foram solubilizadas em DMSO. Os controles utilizados nos testes foram DMSO 1% (solvente) e o metronidazol 25 µM (positivo).

Para a padronização do inóculo foi utilizado o volume de 250 µL de *T. vaginalis* da criopreservação (N₂ líquido com 5% DMSO), após o descongelamento a 37 °C, foi transferido para um tubo com tampa de rosca contendo 12 mL de meio TYI-S-33. Após 24 h de incubação a 37 °C foi realizada a contagem dos parasitas vivos (>3,0 x 10⁷ células por tubo).

A cultura padronizada foi então diluída em TYI-S33 para obtenção de 40,000 células do parasita em 100 µL de meio por poço.

As microplacas foram incubadas por 17 h a 37 °C, após isso foi pipetado o volume de 100 µL de uma solução de fixação (PBS, 1% de glutaraldeído, 5 µM de iodeto de propídio, e 5 µM de laranja de acridina), em todos os poços. Foram então agitadas em agitador orbital por 30 s para viabilizar o desprendimento celular, e incubadas por 3 h a 37 °C para viabilização da fixação e coloração feitos no teste.

Por fim, foram quantitativamente fotografadas usando a Perkin Elmer Operetta e analisados usando o pacote de software Harmony 3.5.1.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA

A avaliação da atividade antimicobacteriana e a determinação da citotoxicidade (tópico 4.7) foram realizados pelo Prof. Dr. Kyle Rohde, da University of Central Florida (FELIX et al., 2017).

Foi utilizada cepa de *Mycobacterium tuberculosis* (CDC 1551), incluindo outra derivada de CDC 1551 com plasmídeos repórter. As amostras foram testadas em microplacas de 384 poços, foi usado um dispensador automático para a preparação das microplacas, (Precision robotic liquid handler-BioTeK). Foram investigados os controles: DMSO a 0,5%, rifampicina 160 µM e isoniazida 10 µM. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Os inóculos foram diluídos em caldo Middlebrook 7H9 OADC, e a densidade óptica ajustada em 0,05 a 600 nm. A leitura foi realizada por fluorescência GFP (proteína verde fluorescente) após incubação de 6 dias a 37 °C em leitor microplacas Synergy H4 (BioTek).

Para a avaliação da atividade antimicobacteriana frente ao *M. tuberculosis* latente / dormiente foi usado o modelo MSD (*Multi-Stress Dormancy*). A leitura por fluorescência foi realizada após 7 dias em leitor de microplacas Synergy™ H4 (BioTeK). Nos ensaios luminescentes com Mtb-Lux a DO₆₀₀ foi ajustada em 0,01, e foram utilizadas microplacas de cultivo na cor branca, demais ensaios microplacas pretas

4.6 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Foram utilizadas as linhagens celulares de macrófagos J774A e HepG2 (células de carcinoma hepatocelular humano). O meio de cultivo utilizado foi o DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecc, Gibco), o meio foi suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Atlanta Biologicals). Foram utilizadas microplacas de cultivo celular na cor preta.

No dia anterior à realização do ensaio, foram semeadas na concentração de $2,5 \times 10^4$ células/poço, foi utilizado o volume 30 μL . Após 6 h de incubação, as amostras (20 $\mu\text{g/mL}$) e os controles (0,5% DMSO e 2% Triton X) foram adicionados nos poços das microplacas.

A avaliação da viabilidade celular foi determinada após 24h, pela redução da resazurina. A cor azul é indicativa de ausência de multiplicação/inviabilidade celular, enquanto que a cor rosa evidencia viabilidade celular.

A fluorescência foi medida após incubação de 4 h a 37 °C por excitação a 560 nm e emissão a 590 nm usando um leitor de microplacas SynergyTM H4 (BioTeK). As amostras que tiveram 20% de inibição nas células J774 foram consideradas citotóxicas e eliminadas do estudo.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE *Cândida albicans*

A avaliação da atividade antibiofilme de *C. albicans* foi realizada pela Profa. Dra. Jianlan Yoi, University of Oklahoma- NPDG (Norman, Oklahoma-Estados Unidos).

Foi utilizada a cepa de *Cândida albicans* SC5314, cedida por A. Dongari-Bagtzoglou (University of Connecticut Health Center). Os meios de cultivos utilizados para realização dos testes foram o caldo de infusão cérebro-coração (meio BHI, Becton Dickinson) e o RPMI-1640 [RPMI-1640 (Sigma), MOPS 0,17 M (0,17 M Sigma)].

A metodologia utilizada no teste foi realizada em conformidade com as diretrizes do CLSI, norma M27-A3 (2008), com as seguintes modificações: a levedura *C. albicans* SC5314 foi cultivada em meio BHI (Becton Dickinson) a 35 °C durante 12 h. As células foram sedimentadas por centrifugação, lavadas com PBS (solução salina tamponada com fosfato, pH 7,4), e ressuspensas em meio RPMI-1640.

As amostras foram preparadas em DMSO na concentração de 2,0 μM , o meio RPMI-1640 foi utilizado nos ensaios. Alíquotas de 100 μL da suspensão padronizada do inóculo de levedura ($2,5 \times 10^3$ células por mL^{-1}) foram adicionadas ao meio de cultivo contendo as amostras diluídas ou DMSO (até 2%, v/v) antes de serem transferidas para placas de 96 poços. Após 48 h de incubação a 37 °C, a viabilidade celular foi medida pela leitura da DO (densidade óptica) em espectrofotômetro a 600 nm. As microplacas foram lavadas com PBS, sendo então realizada novamente a leitura da DO_{600} para avaliar a inibição do biofilme.

Os valores de IC_{50} foram calculadas utilizando a ferramenta de cálculo desenvolvida pela AAT Bioquest (<<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>>). O corante

colorimétrico utilizado foi o reagente branco de calco-flúor e as imagens foram obtidas no Operetta High-Content Imaging System. A e a leitura foi realizada por fluorescência.

4.8. METODOLOGIA COMPUTACIONAL: configuração absoluta em C-3' de **C3** e **C4**

Para elucidar a configuração absoluta no estereocentro C-3' das substâncias **C3** e **C4** um estudo computacional foi realizado em colaboração com grupo de pesquisa do Prof. Nailton Monteiro do Nascimento Junior (IQ- UNESP, Araraquara) e seu orientado de mestrado Victor de Souza Batista.

Para elucidar a estereoquímica absoluta do núcleo de carbono C-3', foi realizado um estudo computacional seguindo as diretrizes propostas por Willoughby, Jansma e Hoyer, com pequenas modificações (WILLOUGHBY et al., 2004). Inicialmente, todas as estruturas candidatas, **3A**, **3B**, **4A** e **4B** (Figura 24a), foram construídas no software Discovery Studio Visualizer (v.17.0.2.1076) com todos os átomos de hidrogênio explicitados (DASSAULT SYSTÈMES, 2017). Os confôrmeros para todas essas estruturas foram gerados usando o módulo gerador de confôrmeros do software CSD Mercury (MACRAE, et al., 2008). Nesta etapa, o software foi solicitado a minimizar a geometria de entrada antes de iniciar a busca conformacional.

O número máximo de conformações foi definido como 200, com no máximo duas torções incomuns, amostrando um máximo de 1.000.000 de conformações por molécula e com uma probabilidade mínima de rotâmero de 0,05%. Os confôrmeros gerados foram inspecionados para garantir que todos os rotâmeros e invertâmeros lógicos previstos fossem encontrados, bem como para remover estruturas redundantes. Esta etapa resultou em 16 confôrmeros para as estruturas **3A** e **4A** e 20 confôrmeros para as estruturas **3B** e **4B**.

Todos os confôrmeros foram então submetidos à otimização geométrica e cálculo de frequências vibracionais no Gaussian 09, utilizando o funcional M06-2X com o conjunto de bases 6-31+G (d,p) (GAUSSIAN 09, 2013; ZHAO, et al., 2008; PETERSSON et al., 1988; PETERSSON et al., 1991). Uma grade de integração refinada foi solicitada durante os cálculos. Os efeitos da solvatação do DMSO foram considerados através do formalismo do modelo contínuo polarizado de equações integrais (IEFPCM) e as cavidades do soluto foram construídas usando raios padrão de átomos unidos (UA0) (MENNUCCI, et al., 1997a; 1997b; TOMASI et al., 1999; BARONE, et al., 1997). As geometrias de saída das estruturas avaliadas foram inspecionadas para remover conformações redundantes. A etapa resultou em 12 conformações para a estrutura **3A**, 8 para as estruturas **3B**, **4A** e **4B**.

Após a remoção das geometrias redundantes, os tensores atômicos de blindagem química (σ) ^1H e ^{13}C dos confôrmeros otimizados foram computados no nível do funcional da densidade usando o formalismo do orbital atômico *gauge-independent* (GIAO) (LONDON, 1937; DITCHFIELD, 1974; WOLINSKI, 1990). Para tal, se utilizaram o funcional B3LYP BECKE, 1993; LEE, et al., 1988; VOSKO, et al., 1980; STEPHENS, et al., 1994) e o conjunto de bases 6-311+G (2d,p) e uma grade de integração refinada foi solicitada novamente. A solvatação do DMSO foi abordada através do IEFPCM novamente, mas nesta etapa as cavidades do solvente do substrato foram modeladas por raios atômicos individuais (BONDI, 1964). Os tensores de blindagem de RMN computados foram convertidos em desvios químicos de referenciados, conforme definido na Equação 1, onde σ é o tensor de blindagem de RMN computado e δ é o deslocamento químico referenciado (LODEWYK, et al., 2011).

$$\delta = \frac{\sigma - \text{intercepto}}{\text{inclinação}}$$

O *intercept* e o *slope* são fatores de escalonamento empiricamente derivados que são aplicáveis ao nível de teoria usado neste trabalho e são independentes da estrutura em estudo. Os valores desses parâmetros, resumidos na Tabela abaixo, foram obtidos a partir da referência para o método e criados pela abordagem proposta por Lodewyk, Siebert e Tantillo (2011).

Fatores de escalonamento para o nível de teoria B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p).

	Fatores de escalonamento	
	<i>Slop</i>	<i>Intercept</i>
^1H	-1,0767	31,9477
^{13}C	-1,0522	181,2412

Em seguida, os fatores de ponderação de Boltzmann para cada confôrmero são determinados a 25 ° C usando as energias livres obtidas nos cálculos de frequência vibracional, resultando em uma contribuição da fração molar para cada confôrmero, χ_i . Essas contribuições são então aplicadas aos tensores de blindagem de RMN computados para cada

núcleo de cada confômero individualmente para fornecer os tensores de blindagem de RMN médios ponderados por Boltzmann para cada um. As contribuições da fração molar são calculadas conforme definido pela Equação 2, onde $-E^*i$ é a diferença de energia livre do i -ésimo indicador menos do que o mais estável, R é a constante universal dos gases e T é a temperatura em Kelvin.

$$x_i = \frac{e^{\left(\frac{-E^*i}{RT}\right)}}{\sum_{i=1}^n e^{\left(\frac{-E^*i}{RT}\right)}}$$

Os desvios químicos experimentais (δ_i^{exp}) e computados (δ_i^{comp}) são então comparados entre si através do erro absoluto ($|\Delta\delta|$) e do erro absoluto médio (MAE) entre eles, conforme descrito nas Equações 3 e 4, nas quais N é o número de desvios químicos únicos usados na comparação. Os tensores de blindagem para núcleos quimicamente equivalentes são ponderados antes da análise do MAE, neste caso, isso era necessário para os hidrogênios metílicos de C-9 e C-10. Os desvios químicos calculados para as estruturas denominadas **A** e **B** também foram ponderadas pela média delas, dado que as moléculas **C3** e **C4** existem em uma mistura diastereoisomérica.

$$|\Delta\delta| = \sum_{i=1}^N |\delta_i^{comp} - \delta_i^{exp}|$$

$$MAE = |\Delta\delta_{avg}| = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |\delta_i^{comp} - \delta_i^{exp}|$$

CONSIDERAÇÕES FINAIS

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Neste trabalho foi realizado a investigação dos efeitos da adição de modificadores epigenéticos e eliciadores metálicos nos cultivos dos fungos *C. lunata* e *F. fujikuroi*. Essa abordagem de manipulação química possibilita o acesso de vias metabólicas não expressas em condições de cultivos usuais.

O estudo epigenético empregado em culturas de *C. lunata* não teve resultados expressivos quanto a diversificação química, entretanto, o cultivo em escala ampliada em PDB com a suplementação de Mg^{2+} forneceu o isolamento de duas novas γ -lactamas espirocíclicas (**C3** e **C4**), e de outros cinco compostos conhecidos, dentre os quais destacam as triticonas E (**C1**) e F (**C2**) que apresentaram atividade antibacteriana para *E. coli*, com CIM de 62,5 μ g/mL.

A presença de íons magnésio no cultivo de *F. fujikuroi* não apenas promoveu maior rendimento em massa como também induziu a produção de metabólitos ausentes nos demais cultivos. Fornecendo a produção das auxinas nitrogenadas **F4**, **F8** e **F17**, derivadas do ácido indolacético (**F3**), e de outras derivadas do ácido fenilacético, **F2**, **F6**, **F11**, **F12**, **F15** e **F18**. Os compostos **F2**, **F3** e **F4** apresentaram atividade antifúngica para diversas leveduras do gênero *Cândida*.

A avaliação quantitativa por CLAE-DAD indicou que o teor de ácido fusárico não teve alterações significativas, estando presente em todas as amostras em quantidades próximas. Diferentemente, a presença de SAHA e íons de cobre no meio de cultivo PDB levaram a um aumento na produção de AIA de quase 50%.

O alcaloide ácido acético-2-(4-butilpicolinamida) foi possível ser quantificado apenas em PDB + Mg^{2+} , e que portando a presença íons de magnésio no meio de cultivo favorece por algum mecanismo não conhecido a sua produção.

O serterterpeno terpestacina é o metabólito majoritário presente em todos os extratos AcOEt estudados, obedecendo faixa de concentração entre $257,83 \pm 2,07$ (PDB + Cu^{2+}) e $885,84 \pm 9,53$ (PDB + SAHA).

O estudo bioguiado de *Aspergillus arcuoverdensis* possibilitou o isolamento dos metabólitos verruculogena, fumitremogina A, e viriditoxina que apresentou potente atividade contra *T. vaginalis*.

Os estudos químicos e antimicrobianos de *Cylindrocarpon pauciseptatum* resultaram no isolamento e identificação da fujikurina B, sendo o principal metabólito produzido e responsável pelas atividades antituberculose e tricomonicida.

O cultivo em escala ampliada de *Talaromyces verruculosus* forneceu o extrato acetato de etila e diversas frações que exibiram atividades contra *T. vaginalis*, *M. tuberculosis* latente e formação de biofilme de *C. albicans*. O estudo bioguiado forneceu o isolamento da duclauxina, bacilisorina F e 1-*epi*-bacilisorina F que exibiram promissora inibição na formação de biofilme de *C. albicans* SC5314.

Frente aos resultados apresentados, podemos concluir que todas as cepas fúngicas estudadas são interessantes para o estudo químico e biológico. Além disso, a abordagem epigenética, a eliciação química, e os estudos bioguiados são ferramentas importantes para explorar e obter metabólitos bioativos com características únicas.

REFERÊNCIAS

11. REFERÊNCIAS

- ABDELKHALEK, A. A. et al. Derivatives of Cucurbitacin-E-glucoside produced by *Curvularia lunata* NRRL 2178: Anti-inflammatory, antipyretic, antitumor activities, and effect on biochemical parameters. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 124–130, 2017.
- AFIYATULLOV, SH. SH. et al. Fumitremorgins from the marine isolate of the fungus *Aspergillus fumigatus*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 40, n. 6, p. 615–617, 2004.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012**: Dispõe sobre os pré-requisitos para avaliação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2012. 10 p. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0027_17_05_2012.pdf/c6edeb56-200d-4482-8a19-99fa11c33fd3>. Acesso em: 08 abr. 2020.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC RE nº 899, de 29 de maio de 2003**: guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003. 15 p. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/349509/Consolidado%2Bde%2Bnormas%2BCOBIO.pdf/3122249b-48cb-47aa-be78-76f3129a62ba>>. Acesso em: 3 abr. 2018.
- AKONE, S. H. et al. Epigenetic modification, co-culture and genomic methods for natural product discovery. **Physical Sciences Reviews**, v. 4, n. 4, p. 1–13, 2019.
- ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168–4170, 2001.
- ALLEN, C. L.; BUREL, C.; WILLIAMS, J. M. J. Cost efficient synthesis of amides from oximes with indium or zinc catalysts. **Tetrahedron Letters**, v. 51, n. 20, p. 2724–2726, 2010.
- ALMEIDA, T. T. et al. Curvulin and spirostaphylotrichins R and U from extracts produced by two endophytic *Bipolaris* sp. associated to aquatic *macrophytes* with antileishmanial activity. **Natural Product Research**, v. 32, n. 23, p. 2783–2790, 2018.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes - Secret producers of bioactive plant metabolites. **Pharmazie**, v. 68, n. 7, p. 499–505, 2013. não está no texto
- AMEND, A. et al. Fungi in the marine environment: Open questions and unsolved problems. **mBio**, v. 10, n. 2, p. 1–15, 2019.
- ANDERSON, D. E. et al. Comparison of small molecule inhibitors of the bacterial cell division protein FtsZ and identification of a reliable cross-species inhibitor NIH Public Access. v. 7, n. 11, p. 1918–1928, 2013.
- ANDRINO, C. O.; COSTA, F. N.; SANO, P. T. O gênero *Paepalanthus* Mart. (Eriocaulaceae) no Parque Estadual do Biribiri, Diamantina, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 2, p. 393–419, jun. 2015.

ANTONIASSI, N. A. B. et al. Feohifomicose cutânea causada por *Curvularia* sp. em um equino. **Pathology**, v. 38, p. 73–76, 2010. não esta no texto

ARNDT, B. et al. Genetic engineering, high resolution mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy elucidate the bikaverin biosynthetic pathway in *Fusarium fujikuroi*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 84, p. 26–36, 2015.

AUCKLOO, B. N. et al. Stress-driven discovery of novel cryptic antibiotics from a marine fungus *Penicillium* sp. BB1122. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. AUG, p. 1–17, 2017.

BARONE, V and COSSI, M. A new definition of cavities for the computation of solvation free energies by the polarizable continuum model. **The Journal of Chemical Physics**, v. 107, p. 3210-3221, 1997.

BEAU, J. et al. Epigenetic tailoring for the production of anti-infective cytosporones from the marine fungus *Leucostoma persoonii*. **Marine Drugs**, v. 10, n. 4, p. 762–774, 2012.

BECKE, A. D. A new mixing of Hartree–Fock and local density-functional theories. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, p. 1372-1377, 1993.

BILLS, G. F.; GLOER, J. B. Biologically Active secondary metabolites from the fungi. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 6, 2016.

BOLLER, A. et al. Welkstoffe und antibiotika mitteilung diaporthin, ein welketoxin aus kulturen von *Endothia parasitica* (Murr.) And. **Helvetica Chimica Acta**, v. 40, n. 3, p. 875–880, 1957.

BONDI, A. van der Waals Volumes and radii of metals in covalent compounds. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 68, p. 441-451, 1964.

BONIFÁCIO, B. V. **Atividade antimicrobiana in vitro de extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados**. 2014. 140 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2014.

BRADY, S. F.; CLARDY, J. CR377, a new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 10, p. 1447–1448, 2000.

BROCK, N. L. et al. Genetic dissection of sesquiterpene biosynthesis by *Fusarium fujikuroi*. **ChemBioChem**, v. 14, n. 3, p. 311–315, 2013.

BRYANT, F. O.; CUTLER, H. G.; JACYNO, J. M. Properties and cost effective method for production of the antitumor agent duclauxin from sporulating *Penicillium herquei*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, n. 12, p. 1214–1217, 1993.

CALIGIORNE, R. B. et al. Fungos dematiáceos: fungos negros que afetam animais, plantas e o homem. **Biotecnologia e Ciência e Desenvolvimento**, v. 2, n. 11, p. 22-25, 1999.

CAO, P. et al. New duclauxamide from *Penicillium manginii* YIM PH30375 and structure revision of the duclauxin family. **Organic Letters**, v. 17, n. 5, p. 1146–1149, 2015.

CHAGAS, F. O. **Cultura mista, manipulação química e genética de micro-organismos: estratégias para a diversificação do metabolismo secundário**. 2014. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

CHAN, C. C. Principles and Practices of Analytical Method Validation: Validation of Analytical Methods is Time-consuming but Essential. **The Quality Assurance Journal**, v. 14, n. 3–4, p. 61–64, 2011.

CHERBLANC, F. L. et al. in chemical biology and medicine. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 5, p. 595–754, 2013.

CHIMATADAR, S. A.; BASAVARAJ, T.; NANDIBEWOOR, S. T. A study of the kinetics and mechanism of oxidation of *L*-tryptophan by diperiodatonickelate(IV) in aqueous alkaline medium. **Russian Journal of Physical Chemistry A**, v. 81, n. 7, p. 1046–1053, 2007.

CHUNG, Y. et al. Suberoylanilide Hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, induces the production of anti-inflammatory cyclodepsipeptides from *Beauveria felina*. **Journal of Natural Products**, v.76, n. 7, p. 1260–1266, 2013.

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.

CLAYDON, N.; ELGERSMA, D. M.; GROVE, J. F. The phytotoxicity of some phenolic metabolic products of *Ophiostoma ulmi* to *Ulmus* sp. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 86, p. 0–6, 1980.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute document M7-A6. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard**, 6th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA., 2006.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A3. **Methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts; approved standard**. 3rd ed. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA., 2008.

COLE, R. J. et al. Structure of the tremor-producing indole, TR-2. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 1015–1018, 1975.

COOMBE, B. R. G.; JACOBS, J. J.; WATSOW, T. R. *Curvularia*. **Austrian Journal Chemistry**, p. 783–788, 1968.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

DA CUNHA, K. C. et al. Diversity of *Bipolaris* species in clinical samples in the United States and their antifungal susceptibility profiles. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 12, p. 4061–6, 2012.

DAI, J. et al. Curvularin-type metabolites from the fungus *Curvularia* sp. isolated from a marine alga. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 36, p. 6928–6937, 2010.

Dassault Systemes BIOVIA, **Discovery Studio Visualizer**, V.17.0.2.1076, (2017).

DE HOFFMANN, C. C. et al. Infecções causadas por fungos demácios e suas correlações anátomo-clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 1, p. 138–141, 2011.

DEMARQUE, D. P.; CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Products Report**, v. 33, p. 432–455, 2016.

DITCHFIELD, R. Self-consistent perturbation theory of diamagnetism. **Molecular Physics**, v. 27, p. 789–807, 1974

DUARTE, M. C. T. et al. anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305–311, 2005.

DU, L.; KING, J. B.; CICHEWICZ, R. H. Chlorinated polyketide obtained from a *Daldinia* sp. treated with the epigenetic modifier suberoylanilide hydroxamic acid. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 11, p. 2454–2458, 2014.

EVIDENTE, A.; SURICO, G. Isolation of indole-3-aldehyde from *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 5, p. 938–939, 1986.

FAYOS, J. et al. Structure of Verruculogen, a tremor producing peroxide from *Penicillium verruculosum*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 96, n. 21, p. 6785–6787, 1974.

FELIX, C. R. et al. Selective killing of dormant *Mycobacterium tuberculosis* by marine natural products. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 8. 2017.

FENG, Y. et al. Total synthesis of verruculogen and fumitremorgin a enabled by ligand-controlled C-H borylation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 32, p. 10160–10163, 2015.

FISCH, K. M. et al. Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 9, p. 1199–1213, 2009.

FUKUSHIMA, T. et al. Transcriptional, functional and cytochemical analyses of the veg gene in *Bacillus subtilis*. **Journal of Biochemistry**, v. 133, n. 4, p. 475–83, 2003.

GAO, S. S. et al. Biosynthesis of Heptacyclic Duclauxins Requires Extensive Redox Modifications of the Phenalenone Aromatic Polyketide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 140, n. 22, p. 6991–6997, 2018.

Gaussian 09, Revision D.01, FRISCH, M. J. et al., Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2013.

GOMEZ, I. J. et al. Nitrogen-doped Carbon Nanodots for bioimaging and delivery of paclitaxel. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 6, n. 35, 2018.

- GREEN, P. et al. Identification and preliminary evaluation of viriditoxin, a metabolite of *Paecilomyces varioti*, as an insecticide for sheep blowfly, *Lucilia cuprina* (Wied.). **General and applied entomology**, v. 21, p. 33–37, 1989.
- GROVE, J. F.; POPLER, M. The Synthesis and Reactions of Some Derivatives of C-Acetylorsellinic Acid. **Journal of the Chemical Society**, n. 2, p. 1972–1999, 1979.
- GUARATINI, T. et al. Mechanism for the elimination of aromatic molecules from polyenes in tandem mass spectrometry. **Chemical Communication**, v. 36, p. 4110–4112, 2006
- GUO, D. LE et al. Three new α -pyrone derivatives induced by chemical epigenetic manipulation of *Penicillium herquei*, an endophytic fungus isolated from *Cordyceps sinensis*. **Natural Product Research**, v. 34, n. 7, p. 958–964, 2018.
- HALLOCK, Y. F.; LU, H. S. M.; CLARDY, J. *Drechslera tritici-repentis*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 5, p. 747–754, 1993.
- HAN, W. B. et al. Curindolizine, an Anti-Inflammatory Agent Assembled via Michael Addition of Pyrrole Alkaloids Inside Fungal Cells. **Organic Letters**, v. 18, n. 8, p. 1816–1819, 2016.
- HARDEGGER, E. et al. Wilting agents and antibiotics. XXXV. Structure of diaporthin and the synthesis of diaporthinic acid. **Helvetica Chimica Acta**, v. 49, p. 1283–90, 1966.
- HILARIO, F. et al. Antimicrobial Screening of Endophytic Fungi Isolated from the Aerial Parts of *Paepalanthus chiquitensis* **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 8, p. 1389–1395, 2017.
- HILARIO, F. et al. Spirocyclic lactams and curvulinic acid derivatives from the endophytic fungus *Curvularia lunata* and their antibacterial and antifungal activities. **Fitoterapia**, v. 141, p. 104466, 2020.
- INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. IUPAC Technical Report: harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.
- KHARWAR, R. N. et al. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: Their importance and future challenges. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 7, p. 1208–1228, 2011.
- KING, J. B. et al. Design and Application of a High-Throughput, High-Content Screening System for Natural Product Inhibitors of the Human Parasite *Trichomonas vaginalis*. **ACS Infectious Diseases**, v. 5, n. 8, p. 1456–1470, 2019.
- KRIZSÁN, K. et al. Clinical Importance of the Genus *Curvularia*. **Medical Mycology**, n. March 2016, p. 147–204, 2015.
- LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical Review B**, v. 37, p. 785–789, 1988.
- LI, C. W. et al. A novel oxaphenalenone, penicimutalidine: Activated production of oxaphenalenones by the diethyl sulphate mutagenesis of marine-derived fungus *Penicillium purpurogenum* G59. **RSC Advances**, v. 6, n. 85, p. 82277–82281, 2016.

LIU, D.-Z. et al. Induced production of new diterpenoids in the fungus *Penicillium funiculosum*. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 5, p. 12–13, 2014.

LIU, Y.; JUNG, J. H.; ZHANG, S. Indole alkaloids from a sponge *Sarcotragus* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, n. 5, p. 453–456, 2006.

LODEWYK, M. W.; SIEBERT, M. R.; TANTILLO, D. J. Computational prediction of ^1H and ^{13}C chemical shifts: a useful tool for natural product, mechanistic and synthetic organic chemistry. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 1839–1862, 2011.

LONDON, F. Théorie quantique des courants interatomiques dans les combinaisons aromatiques. **Journal de Physique et Le Radium**, v. 8, p. 397–409, 1937.

MA, Y. M. et al. Structural diversity and biological activities of indole diketopiperazine alkaloids from fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 35, p. 6659–6671, 2016.

MACRAE, C. F. et al. Mercury CSD 2.0 - New features for the visualization and investigation of crystal structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 41, p. 466–470, 2008.

MCMILLAN, J. Principles of Analytical Validation. In: CIBOROWSKI, P.; SILBERRING, J. (Editor). **Proteomic Profiling and Analytical Chemistry: The Crossroads**. 2nd. ed. Omaha, NE: Elsevier, 2016. Charpt 13, p. 239–251.

MADRID, H. et al. Novel *Curvularia* species from clinical specimens. **Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 33, p. 48–60, 2014.

MAFEZOLI, J. et al. Modulation of polyketide biosynthetic pathway of the endophytic fungus, *Anteaglonium* sp. FL0768, by copper (II) and anacardic acid. **Phytochemistry Letters**, v. 28, p. 157–163, 2018.

MANAMGODA, D.; CAI, L.; MCKENZIE, E. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris-Cochliobolus-Curvularia* complex. **Fungal Diversity**, v. 56, p. 131–144, 2012.

MANAMGODA, D. S. et al. The genus *Bipolaris*. **Studies in Mycology**, v. 79, n. 1, p. 221–288, 2014.

MARTINEZ-KLIMOVA, E.; RODRÍGUEZ-PEÑA, K.; SÁNCHEZ, S. Endophytes as sources of antibiotics. **Biochemical Pharmacology**, v. 134, p. 1–17, 2017.

MASI, M. et al. Spirostaphylotrichin W, a spirocyclic γ -lactam isolated from liquid culture of *Pyrenophora semeniperda*, a potential mycoherbicide for cheatgrass (*Bromus tectorum*) biocontrol. **Tetrahedron**, v. 70, n. 7, p. 1497–1501, 2014.

MENNUCCI, B. and TOMASI, J. Continuum solvation models: A new approach to the problem of solute's charge distribution and cavity boundaries. **The Journal of Chemical Physics**, v. 106, p. 5151–5158, 1997a.

MENNUCCI, B.; CANCÈS, E.; TOMASI, J. Evaluation of Solvent effects in isotropic and anisotropic dielectrics and in ionic solutions with a unified integral equation method: theoretical bases, computational implementation, and numerical applications. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 101, p. 10506-10517, 1997b

MILNE, J. E. et al. Iodide-catalyzed reductions: Development of a synthesis of phenylacetic acids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 76, n. 22, p. 9519–9524, 2011.

MONDOL, M. A. M. et al. Metabolites from the endophytic fungus *Curvularia* sp. M12 Act as motility inhibitors against *Phytophthora capsici* Zoospores. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 2, p. 347–355, 2017.

MUNDT, K. et al. Identification of the Verruculogen prenyltransferase FtmPT3 by a combination of chemical, bioinformatic and biochemical approaches. **ChemBioChem**, v. 13, n. 17, p. 2583–2592, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Plant endophytes and epiphytes: burgeoning sources of known and “unknown” cytotoxic and antibiotic agents? **Planta Medica**, 2020a.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, 2020b.

CONNOR, C. et al. Substituent Effects on the N.M.R. Spectra of Carboxylic Acid Derivatives. IV. ¹³C N.M.R. Spectra of para-Substituted Phenols, Phenylureas and Phenyl Propionates. **Australian Journal of Chemistry**, v. 40, n. 4, p. 677, 1987.

PALLASTRELLI, M. B. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos enantiosseletivos para separação e determinação do esmolol e sotalol**. 2013. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

PARANAGAMA, P. A.; WIJERATNE, E. M. K.; GUNATILAKA, A. A. L. Uncovering biosynthetic potential of plant-associated fungi : effect of culture conditions on metabolite production by *Paraphaeosphaeria quadrisepata* and *Chaetomium chiwersii*. **Journal of Natural Products**, v. 21, n. Table 1, p. 1939–1945, 2007.

PETERSSON, G. A.; BENNETT, A.; TENSFELDT, T. G.; AL-LAHAM, M. A.; SHIRLEY, W. A. A complete basis set model chemistry. I. The total energies of closed-shell atoms and hydrides of the first-row elements. **The Journal of Chemical Physics**, v. 89, p. 2193-2218, 1988.

PETERSSON, G. A. and AL-LAHAM, M. A. A complete basis set model chemistry II. Open-shell systems and the total energies of the first-row atoms. **The Journal of Chemical Physics**, v. 94, p. 6081-6090, 1991.

PETTIT, R. K. Minireview Small-molecule elicitation of microbial secondary metabolites. **Microbial Biotechnology**, v. 4, p. 471–478, 2011.

- RAWLINSON, C. et al. The identification and deletion of the polyketide synthase-nonribosomal peptide synthase gene responsible for the production of the phytotoxic triticone A/B in the wheat fungal pathogen *Pyrenophora tritici-repentis*. **Environmental Microbiology**, v. 21, n. 12, p. 4875-4886, 2019.
- REVANKAR, S. G. et al. Disseminated phaeohyphomycosis. **Review of an Emerging Mycosis**, v. 34, p. 467-476, 2002.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- SCOTT, K. N. NMR parameters of biologically important aromatic acids. 2. Phenylacetic acid and derivatives. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 6, n. 1, p. 55-73, 1972.
- SHARMA, V. K. et al. Induction of Cryptic metabolite production through epigenetic tailoring in colletotrichum gloeosporioides isolated from *Syzygium cumini*. In: **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 169-184.
- SHIBATA, S. et al. Duclauxin, a metabolite of *Penicillium duclauxi* (delacroix). **Tetrahedron Letters**, v. 6, n. 18, p. 1287-1288, 1965.
- STEPHENS, P. J.; DEVLIN, F. J.; CHABALOWSKI, C. F.; FRISCH, M. J. Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields. **Journal of Physical Chemistry**, v. 98, p. 11623-11627, 1994
- STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific Yew. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214-216, 1993.
- STROBEL, G. The emergence of endophytic microbes and their biological promise. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 2, 2018.
- STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 535-544, 2003.
- SUGAWARA, F.; TAKAHASHI, N.; STROBEL, G. A.; SCOTT A.; STROBEL, S. A.; LU, H. S. M.; CLARDY, J. Triticones A and B, Novel Phytotoxins from the Plant; Pathogenic Fungus *Drechslera tritici-repentis*. **Journal American Chemical Society**, v. 110, p. 4086-4087, 1988.
- SUN, D. D. et al. Indole alkaloids from the roots of *Isatis ingigotica* and their antiherpes simplex virus type 2 (HSV-2) activity *in vitro*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 46, n. 5, p. 763-766, 2010.
- SUZUKI, K. et al. Structure revision of mycotoxin, viriditoxin, and its derivatives. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 38, n. 11, p. 3180-3181, 1990.
- TOMASI, J.; MENNUCCI, B.; CANCÈS, E. The IEF version of the PCM solvation method: an overview of a new method addressed to study molecular solutes at the QM ab initio level. **The Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 464, p. 211-226, 1999.

TROVÓ, M.; SANO, P. T. Taxonomic survey of *Paepalanthus* section *Diphyomene* (Eriocaulaceae). **Phytotaxa**, v. 14, p. 49–55, 2010.

TROVÓ, M.; SANO, P. T. Atualização das espécies de *Paepalanthus* (Eriocaulaceae) na flora fanerogâmica do estado de São Paulo, Brasil. **Rodriguesia**, v. 67, n. 3, p. 849–853, 2016.

VARMA, G. B. et al. Production of phenylacetic acid derivatives and 4-epiradicinol in culture by *Curvularia lunata*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 17, p. 1925–1930, 2006.

VON BARGEN, K. W. et al. Isolation and structure elucidation of fujikurins a-d: products of the PKS19 gene cluster in *Fusarium fujikuroi*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 8, p. 1809–1815, 2015.

VOSKO, S. H.; WILK, L.; NUSAIR, M. Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis. **Canadian Journal of Physics**, v. 58, p. 1200–1211, 1980.

WALSER-VOLKEN, P.; TAMM, C. **The spirostaphylotrichins and related microbial metabolites**. In: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Springer, Vienna, 1996. p. 125–165.

WANG, C.; PAN, Y.; WU, A. InCl₃/Al mediated pinacol coupling reactions of aldehydes and ketones in aqueous media. **Tetrahedron**, v. 63, n. 2, p. 429–434, 2007.

WANG, J. et al. Discovery of a small molecule that inhibits cell division by blocking FtsZ, a novel therapeutic target of antibiotics. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 45, p. 44424–44428, 2003.

WEBSTER, D. et al. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 140–146, 2008.

WEISLEDER, D.; LILLEHOJ, E. B. Structure of viriditoxin, a toxic metabolite of *Aspergillus viridi-nutans*. **Tetrahedron Letters**, v. 12, n. 48, p. 4705–4706, 1971.

WIITALA, K. W.; CRAMER, C. J.; HOYE, T. R. Comparison of various density functional methods for distinguishing stereoisomers based on computed ¹H or ¹³C NMR chemical shifts using diastereomeric penam β -lactams as a test set. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 45, n. 10, p. 819–829, 2007.

WIJERATNE, E. M. K. et al. Thievialides A–E, nor-spiro-azaphilones, and a bis-spiro-azaphilone from *Thielavia* sp. PA0001, an endophytic fungus isolated from aeroponically grown *Physalis alkekengi*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 6, p. 1467–1472, 2014.

WILLIAMS, R. B. et al. Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 6, n. 11, p. 1857–2020, 2008.

WILLOUGHBY, P. H.; JANSMA, M. J.; HOYE, T. R. A guide to small-molecule structure assignment through computation of (¹H and ¹³C) NMR chemical shifts. **Nature Protocols**, v. 9, n. 3, p. 643–660, 2014.

WOLINSKI, K.; HINTON, J. F.; PULAY, P. Efficient Implementation of the Gauge-Independent Atomic Orbital Method for NMR Chemical Shift Calculations. **The Journal of the American Chemical Society**, v. 112, p. 8251-8260, 1990.

YAMAZAKI, M.; FUJIMOTO, H.; KAWAZAKI, H. Chemistry of tremorogenic metabolites. I. fumitremorgin A from *Aspergillus fumigatus*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 1, p. 245–254, 1980.

YANG, S. W.; CORDELL, G. A. Metabolism studies of indole derivatives using a staurosporine producer, *Streptomyces staurosporeus*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 1, p. 44–48, 1997.

YILMAZ, N. et al. Four novel *Talaromyces* species isolated from leaf litter from Colombian Amazon rain forests. **Mycological Progress**, v. 15, n. 10–11, p. 1041–1056, 22 out. 2016.

ZANG, Y. et al. Antimicrobial oligophenalenone dimers from the soil fungus *Talaromyces stipitatus*. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 12, p. 2991–2996, 2016.

ZHANG, S. et al. Antimicrobial metabolites produced by *Penicillium mallochii* CCH01 isolated from the gut of *Ectropis oblique*, cultivated in the presence of a histone deacetylase inhibitor. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–8, 2019.

ZHANG, Z. et al. Aniline-tetramic acids from the deep-sea-derived fungus *Cladosporium sphaerospermum* L3P3 cultured with the HDAC inhibitor SAHA. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 7, p. 1651–1657, 2018.

ZHAO, Y. and TRUHLAR, D. G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 120, p. 215-241, 2008.

ZHOU, G. BIN; ZHANG, P. F.; PAN, Y. J. A novel method for synthesis of arylacetic acids from aldehydes, N-(2,3,4,6-tetra-*O*-pivaloylated-*D*-glucopyranosyl)amine and trimethylsilylcyanide. **Tetrahedron**, v. 61, n. 23, p. 5671–5677, 2005.

ZUTZ, C. et al. Valproic acid induces antimicrobial compound production in *Doratomyces microspores*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–12, 2016.