

FERNANDO MONTEIRO BORGES

**Potencial Químico e Biotecnológico de Fungos Endofíticos de
*Spartina alterniflora***

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

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Angela Regina Araujo

Araraquara

2023

B732p

Borges, Fernando Monteiro

Potencial químico e biotecnológico de fungos endofíticos de *Spartina alterniflora* / Fernando Monteiro Borges. -- Araraquara, 2023

136 f.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara

Orientadora: Angela Regina Araujo

1. Produtos naturais. 2. Compostos orgânicos voláteis. 3. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 4. Metabólitos. 5. Análise cromatográfica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Impacto potencial desta pesquisa

Esta tese apresenta apreciável resultado com 56 compostos orgânicos voláteis identificados de *Annulohypoxylon stygium* isolado de *Spartina alterniflora*, além do isolamento de 4 substâncias, que apresentam diversas atividades biológicas entre elas fitotóxica, antifúngica, antibiótica, antialérgica. Este é o primeiro passo para a compreensão da associação mutualística entre *A. stygium*-*S. alterniflora*.

Potential impact of this research

This thesis presents appreciable results with 56 volatile organic compounds identified from *Annulohypoxylon stygium* isolated from *Spartina alterniflora*, in addition to the isolation of 4 substances that exhibit various biological activities, including phytotoxic, antifungal, antibiotic, and antiallergic properties. This is the first step towards understanding the mutualistic association between *A. stygium*-*S. alterniflora*.

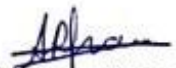
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Potencial químico e biotecnológico dos fungos endofíticos de *Spartina alterniflora*"

AUTOR: FERNANDO MONTEIRO BORGES

ORIENTADORA: ANGELA REGINA ARAUJO

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

Prof.^a Dr.^a ANGELA REGINA ARAUJO (Participação Virtual) 
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. ALAN CESAR PILON (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof.^a Dr.^a ISABELE RODRIGUES NASCIMENTO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. CLAUDIA QUINTINO DA ROCHA (Participação Virtual)
Departamento de Química / Universidade Federal do Maranhão - UFMA - São Luís

Profa. Dra. DEBORA CRISTINA BALDOQUI (Participação Virtual)
Departamento de Química / Universidade Estadual de Maringá - UEM - Maringá

Araraquara, 10 de julho de 2023

DADOS CURRICULARES

FERNANDO MONTEIRO BORGES

1. Dados Pessoais

Nascimento: 04 de janeiro de 1985
Nacionalidade: Brasileira
Naturalidade: São Paulo-SP
Filiação: João Batista Borges
Mércia Monteiro Borges

Endereço:

Rua João Gurguel, 895.
Bairro São José
Araraquara-SP
CEP: 14800-180

Endereço profissional

Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Departamento de Química Orgânica
Rua Professor Francisco Degni, 55
Bairro Jardim Quitandinha
Araraquara/SP
CEP:14800-060

E-mail: fernandomborges@yahoo.com.br

2. Formação acadêmica

2004-2011 Graduação: Licenciatura em Química
Área: Química
Instituição: Instituto de Química - Unesp – Araraquara

2011-2014 Mestrado em Química
Área: Química Orgânica
Instituição: Instituto de Química - Unesp - Araraquara
Orientação: Angela Regina Araujo

Título: Perfil metabólico por RMN de ^1H e avaliação citotóxica do fungo endofítico *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de *Eugenia jambolana*, em diferentes meios de cultivo.

2019-2023 Doutorado em Química
Área: Química Orgânica
Instituição: Instituto de Química - Unesp - Araraquara
Orientação: Angela Regina Araujo

Título: Potencial Químico e Biotecnológico de Fungos Endofíticos de *Spartina alterniflora*.

3. Experiência profissional e didática

Estágio Docência
Disciplina: Química Orgânica Experimental
Curso: Engenharia Química
Período: 2º Semestre/ 2015
Instituição: Instituto de Química - UNESP
Supervisor: Vivian E. Cornélio

Cursos

Atuou como docente em minicurso de cromatografia na 45ª Semana de Química
Carga Horária: 4 horas
Período: 2º semestre/ 2015

Analista em Projeto de Prestação de Serviço

Atuação como analista no projeto de prestação de serviços “análise diária do teor de mercaptanas em gás natural”, com interveniência da FACTE (Fundação de Apoio a Ciência, Tecnologia e Educação).
Período: 1º semestre de 2013 até 1º semestre de 2014
Período: 2º semestre de 2018 até 2º semestre de 2021

Técnico Químico em Delmar Analytical do Brasil LTDA
Período: 01/09/2021 até 24/01/2022
Analisando concentração de mercaptanas em gás natural para GasBrasilião

Analista Químico em Chrominsight Análise e consultoria LTDA
Período: 17/02/2022 até 31/01/2023
Analisando concentração de mercaptanas em gás natural para GasBrasilião

4. Produção Bibliográfica

Resumos apresentados em congressos

BORGES, F.M.; ZANARDI, L. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. ATIVIDADES ANTIFÚNGICAS, ANTIOXIDANTE E ANTICOLINESTERÁSICA DO FUNGO ENDOFÍTICO DE MICHELIA CHAMPACA. 2009. XXI Congresso de Iniciação Científica da UNESP São José do Rio Preto–SP.

BORGES, F.M.; ZANARDI, L. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. ESTUDO QUÍMICO DO FUNGO ENDOFÍTICO Mc-8R ISOLADO DE MICHELIA CHAMPACA L.(MAGNOLIACEAE). XVII - ENCONTRO DA SBQ - REGIONAL 2009. Araraquara-SP.

BORGES, F. M.; BIZELLI, M. H. S. S.; CAPELA, M. V.; CAPELA, J. M. V.; TANAKA, J. S.; BARROZO, S. Informática Para a Terceira Idade. 3º Congresso de Extensão Universitária, Extensão Universitária: um fator de inclusão social? 2005. Águas de Lindóia-SP

Participação em eventos e cursos

III Simpósio de Ecotoxicologia
Período: 18 a 20 de abril de 2016
Local: UNESP Rio Claro – SP
Carga horária: 3 horas

9ª Reunião de Avaliação do PROGRAMA BIOTA-FAPESP
Período: 03 a 06 de dezembro de 2017
Participação no curso: “Aplicação da Espectrometria de Massas em Interações Ecológicas”
Local: São Pedro, SP
Carga horária: 8 horas

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao Instituto de Química (IQ - UNESP - Araraquara) e as agências de fomento, pois o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

À minha Família e amigos pela força, apoio e suporte em todos os momentos, felizes ou tristes. Vencer essa etapa não seria possível sem o apoio de vocês.

A todos os funcionários do Instituto de Química sempre muito prestativos, e em muitos casos, auxiliando muito além da obrigação.

Ao grupo de trabalho por todas as discussões, ideias e, principalmente confraternizações.

Em especial a Professora Angela, pelo tempo, conversas, amizade e principalmente pela paciência, tive uma cota muito superior ao que me cabia. Uma das únicas certezas que tenho é que a realização deste trabalho não teria sido possível se não fosse por ela.

“The best index to a person's character is how he treats people who can't do him any good, and how he treats people who can't fight back.”

Abigail Van Buren

RESUMO

Estima-se que cerca de 20% de todo CO₂ capturado pelas plantas são convertidos em compostos orgânicos voláteis (COVs). Estes compostos são de suma importância pois são responsáveis pela interação da planta com o ambiente ao seu redor, servindo para sinalizar a um simbiote parceiro, da atração de polinizadores para a reprodução até de carnívoros para a diminuição da herbivoria. Fungos endofíticos vivem assintomaticamente dentro das plantas e podem ser transmitidos para futuras gerações pelas sementes. Durante o longo tempo de evolução eles se especializaram em produzir COVs para interagir com a planta hospedeira e o ambiente ao seu redor, manipulando, paralisando ou até estimulando a produção metabólica de seu hospedeiro. Compreender este fato é o primeiro passo para entender e atuar nos processos biológicos e ecológicos que impactam na produção de alimentos, medicamentos, controle de doenças e pragas na agricultura. Neste trabalho foi realizada a identificação de 56 COVs que são produzidos por *Annulohypoxyton stygium* pertencente a família Xylariaceae entre os quais, podemos observar compostos com atividade bactericida, estimulante de crescimento, entre outros. *A. stygium* foi isolado de *S. alterniflora* pertencente a família Poaceae popularmente conhecida como capim marinho, e conhecida por biodegradar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), substâncias tóxicas, mutagênicas e teratogênicas. Um dos objetivos deste trabalho foi avaliar se os microrganismos isolados de *S. alterniflora* eram resistentes a presença destes contaminantes e se seriam os responsáveis pela degradação de HPAs. Foi possível averiguar a resistência deles mas não a degradação. Dez fungos isolados de *S. alterniflora* foram cultivados em dois meios líquidos (Malte e Czapek), e avaliados por RMN de ¹H, CLAE-DAD, atividade antifúngica (cerca de metade dos extratos foram muito ativos), anticolinesterásica (somente o extrato de Malte de *A. stygium* apresentou forte atividade) e citotóxica (nenhum extrato foi considerado promissor). A partir destes resultados selecionou-se *A. stygium* para cultivo em escala ampliada levando ao isolamento de quatro substâncias (3,4-dihidro-3,4,6,8-tetrahidroxi-1(2H)-naftalenona, 3,4-dihidro-3,4,8-trihidroxi-1(2H)-naftalenona, 3,4-dihidro-4,8-dihidroxi-1(2H)-naftalenona e 6,8-dihidroxi-3-(2-hidroxipropil)-

isocoumarina). Diversas substâncias isoladas e identificadas apresentam atividades biológicas, como antifúngica, antibiótica e estimulante de crescimento entre outras, corroborando com a hipótese de simbiose entre o microrganismo e a planta hospedeira. A identificação destas substâncias é o primeiro passo para a compreensão das correlações ecológicas que podem sedimentar essa hipótese. Adicionalmente, fornece informações para a atuação biológica e ecológica cruciais na saúde da planta, levando a novas estratégias para melhorar o controle de doenças e a remediação em problemas ambientais.

Palavras chaves: *Annulohypoxylon stygium*, compostos orgânicos voláteis, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, naftalenona, isocoumarina.

ABSTRACT

It is estimated that around 20% of all CO₂ captured by plants is converted into volatile organic compounds (VOCs). These compounds are of utmost importance as they are responsible for the plant's interaction with the environment around it, serving to signal a partner symbiont, from attracting pollinators for reproduction to carnivores to reduce herbivory. Endophytic fungi live asymptotically inside plants and can be transmitted to future generations by seeds. During the long time of evolution they have specialized in producing VOCs to interact with the host plant and the surrounding environment, manipulating, paralyzing or even stimulating the host's metabolic production. Understanding this fact is the first step towards understanding and acting on the biological and ecological processes that impact the production of food, medicines, disease and pest control in agriculture. In this study, the identification of 56 VOCs that are produced by *Annulohypoxydon stygium* belonging to the Xylariaceae family was carried out, among which we can observe compounds with bactericidal activity, growth stimulant, among others. *A. stygium* was isolated from *S. alterniflora* belonging to the Poaceae family popularly known as saltmarsh cordgrass, and known to biodegrade polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), toxic, mutagenic and teratogenic substances. One of the objectives of this work was to evaluate whether the microorganisms isolated from *S. alterniflora* were resistant to the presence of these contaminants and whether they would be responsible for the degradation of PAHs. It was possible to verify their resistance but not their degradation. Ten fungi isolated from *S. alterniflora* were cultured in two liquid media (Malt and Czapek), and evaluated by ¹H NMR, HPLC-DAD, antifungal activity (about half of the extracts were very active), anticholinesterase activity (only Malt extract from *A. stygium* showed strong activity) and cytotoxic (no extract was considered promising). Based on these results, *A. stygium* was selected for cultivation on an enlarged scale, leading to the isolation of four substances (3,4-dihydro-3,4,6,8-tetrahydroxy-1(2H)-naphthalenone, 3,4-dihydro-3,4,8-trihydroxy-1(2H)-naphthalenone, 3,4-dihydro-4,8-dihydroxy-1(2H)-naphthalenone and 6,8-dihydroxy-3-(2-hydroxypropyl)-isocoumarin). Various isolated and identified substances exhibit biological activities, such as antifungal, antibiotic, and

growth-stimulating properties, among others, supporting the hypothesis of symbiosis between the microorganism and the host plant. The identification of these substances is the first step towards understanding the ecological correlations that may support this hypothesis. Additionally, it provides crucial biological and ecological insights into the plant's health, leading to new strategies for enhancing disease control and remediating environmental issues.

Keywords: *Annulohypoxylon stygium*, volatile organic compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons, naphthalenone, isocoumarin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos 16 HPAs considerados prioritários pela EPA.....	28
Figura 2. Movimento crescente de produtos transportados em milhões de toneladas por ano segundo a Autoridade Portuária de Santos.....	29
Figura 3. Registro fotográfico do efeito mutagênico na garra do caranguejo ‘mãozinha’ relatado em 2007. A esquerda normal sem mutações única ponta na parte fixa da pinça e a direita com cinco pontas.....	30
Figura 4. Floração de <i>Spartina alterniflora</i> (a) e predominância da espécie em região alagada de mangue (b) e ocorrência mundial (c).....	31
Figura 5. Metabólitos secundários produzidos por <i>A. stygium</i>	36
Figura 6. Imagem via satélite do ponto de coleta	39
Figura 7. <i>Spartina alterniflora</i> depois da lavagem. A Secções de <i>Spartina alterniflora</i> , folhas, caules e raízes. B <i>Spartina alterniflora</i> depois da lavagem.....	40
Figura 8. Órgãos inoculados em meio de Batata Dextrose Agar (BDA)	40
Figura 9. Esquema da obtenção do extrato bruto.	43
Figura 10. Esquema da disposição das placas	46
Figura 11. Ensaio antifúngico.....	55
Figura 12. Limite de inibição do crescimento dos microrganismos por HPA's..	58
Figura 13. A árvore filogenética de consenso de regra de maioria de 50% da análise bayesiana de sequências de α -actina <i>Annulohypoxylon</i> spp	61
Figura 14. Cromatograma da série homologa de alcanos C ₈ -C ₄₀	62
Figura 15. Determinação do índice de retenção de Eucaliptol.	63
Figura 16. Comparação do espectro de massas de <i>A. Stygium</i> com a biblioteca.	63
Figura 17. Cromatograma dos COVs de <i>A. stygium</i> com 6 dias de cultivo.....	64
Figura 18. Cromatograma dos COVS de <i>A. stygium</i> com 5 dias de cultivo.....	65
Figura 19. Cromatograma CLAE-DAD do fracionamento de SA-F02-Czapek..	68

Figura 20. Fluxograma do fracionamento de SA-F02-Czapek obtido em escala reduzida.....	68
Figura 21. Cromatograma do fracionamento de SA-F02-Czapek em escala ampliada.....	69
Figura 22. Fluxograma do fracionamento de SA-F02-Czapek obtido em escala ampliada.....	70
Figura 23. Frações de SA-R03-Malte-Escala ampliada	71
Figura 24. Cromatograma do fracionamento de SA-R03-Malte-40%.....	71
Figura 25. Frações de SA-R03-Malte-40%.....	72
Figura 26. Estrutura da substância 01	72
Figura 27. Espectro de RMN de ^1H da substância 01 (CD_3OD , 600 MHz).	73
Figura 28. Mapa de contorno de HMQC da substância 01 (CD_3OD , 600 e 125MHz).....	74
Figura 29. Mapa de contorno de COSY da substância 01 (CD_3OD , 600 MHz).75	
Figura 30. Estrutura parcial da substância 01 e correlações observadas em COSY.	75
Figura 31. Mapa de contorno de HMBC da substância 01 (CD_3OD , 600 e 125MHz).....	76
Figura 32. Representação esquemática das correlações observados no HMBC	77
Figura 33. Estrutura da substância 02	78
Figura 34. Espectro de RMN de ^1H da substância 02 (DMSO-d_6 , 600 MHz).....	79
Figura 35. Mapa de contorno de HMQC da substância 02 (DMSO-d_6 , 600 e 125MHz).....	80
Figura 36. Mapa de contorno de COSY da substância 02 (DMSO-d_6 , 600 MHz).	81
Figura 37. Estruturas parciais da substância 02.....	81
Figura 38. Mapa de contorno de HMBC da substância 02 (DMSO-d_6 , 600 e 125MHz).....	82

Figura 39. Representação esquemática das correlações observados no HMBC	83
Figura 40. Estrutura da substância 03	84
Figura 41. Espectro de RMN de ^1H da substância 03 (CD_3OD , 600 MHz).	85
Figura 42. Mapa de contorno de gHMQC da substância 03 (CD_3OD , 600 e 125MHz)	86
Figura 43. Mapa de contorno de COSY da substância 03 (CD_3OD , 600 MHz).	87
Figura 44. Estruturas parciais da substância 03.	87
Figura 45. Mapa de contorno de HMBC da substância 03 (CD_3OD , 600 e 125MHz)	88
Figura 46. Representação esquemática das correlações observados no HMBC	89
Figura 47. Estrutura da substância 04	90
Figura 48. Espectro de RMN de ^1H da substância 04 (CD_3OD , 600 MHz).	91
Figura 49. Mapa de contorno de COSY da substância 04 (CD_3OD , 600 MHz).	92
Figura 50. Estruturas parciais da substância 04 e correlações observadas em COSY.	92
Figura 51. Mapa de contorno de gHMQC da substância 04 (CD_3OD , 600 e 125MHz)	93
Figura 52. Mapa de contorno de HMBC da substância 04 (CD_3OD , 600 e 125MHz)	94
Figura 53. Representação esquemática das correlações observados no HMBC	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Metabólitos e atividades biológicas de <i>A. stygium</i>	34
Tabela 2. Tempo de esterilização das folhas, frutos e ramos	40
Tabela 3. Fungos isolados do caule, folhas e raízes de <i>Spartina alterniflora</i>	52
Tabela 4. Massa dos extratos brutos obtida do cultivo dos endófitos em Malte e Czapek.	53
Tabela 5. Resultados dos ensaios para avaliação da atividade anticolinesterásica.....	56
Tabela 6. Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras na concentração de 50 µg/mL. Valores são a média ± DPM (Desvio Padrão da Média).....	57
Tabela 7. Valores de recuperação (%) e coeficientes de variação (%) do método aplicado.	59
Tabela 8. COVs de <i>A. stygium</i> identificados com 6 dias de cultivo.....	64
Tabela 9. COVs de <i>A. stygium</i> identificados com 5 dias de cultivo.....	65
Tabela 10. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (CD ₃ OD, 600 e 125 MHz) de 01 (δ em ppm e J em Hz).	77
Tabela 11. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (DMSO-d ₆ , 600 e 125 MHz) de 02 (δ em ppm e J em Hz)	83
Tabela 12. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (CD ₃ OD, 600 e 125 MHz) da substância 03 (δ em ppm e J em Hz).....	89
Tabela 13. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (CD ₃ OD, 600 e 125 MHz) de 04 (δ em ppm e J em Hz)	95

LISTA DE SIMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
Φ	Diâmetro
Å	Angstrom
λ	Lambda (comprimento de onda)
µg	Micrograma
AChE	Enzima acetilcolinesterase
BDA	Batata Dextrose Ágar
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COL	Catalogue of Life
COSY	Correlation spectroscopy
COVs	Compostos Orgânicos Voláteis
CV	Coeficiente de variância
<i>d</i>	Dubleto
DAD	Detector de Arranjo de Diodo
DVB/CAR/PDMS	divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano
g	Grama
GC-MS	Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas
HCT-116	Linhagem teste para câncer de cólon humano
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPAs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
ICER	Immobilized capillary enzyme reactor

kg	Quilograma
L	Litro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
NCI	National Cancer Institute
NIST	National Institute of Standards and Technology
NQ	Não quantificável
OSMAC	One Strain Many Compounds
PCR	Polymerase chain reaction
PC3	Linhagem teste para câncer de próstata
PDA	Potato Dextrose Agar
<i>q</i>	Quarteto
REC	Recuperação
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN DE ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN DE ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono
SA-C01	Primeiro Microrganismo isolado do caule de <i>Spartina alterniflora</i>
SA-F01	Primeiro Microrganismo isolado da folha de <i>Spartina alterniflora</i>
SA-F02	Segundo Microrganismo isolado da folha de <i>Spartina alterniflora</i>
SA-F03	Terceiro Microrganismo isolado da folha de <i>Spartina alterniflora</i>
SA-F04	Quarto Microrganismo isolado da folha de <i>Spartina alterniflora</i>
SA-R01	Primeiro Microrganismo isolado da raiz de <i>Spartina alterniflora</i>

SA-R02	Segundo Microrganismo isolado da raiz de <i>Spartina alterniflora</i>
SA-R03	Terceiro Microrganismo isolado da raiz de <i>Spartina alterniflora</i>
SA-R04	Quarto Microrganismo isolado da raiz de <i>Spartina alterniflora</i>
SA-R05	Quinto Microrganismo isolado da raiz de <i>Spartina alterniflora</i>
SF-295	Linhagem teste para câncer no sistema nervoso central
<i>t</i>	Tripleto
WHO	world health organization

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1. Interação entre espécies.	25
1.2. Fungos como fonte de substâncias bioativas	26
1.3. Presença de HPAs no ambiente e fitorremediação	27
1.4. <i>Annulohypoxylon stygium</i> um endófito de <i>S. alterniflora</i>	32
2. OBJETIVO GERAL	38
3. PARTE EXPERIMENTAL	39
3.1. Obtenção da cepa fúngica	39
3.2. Identificação de <i>Annulohypoxylon stygium</i>	41
3.3. Obtenção dos extratos brutos dos fungos endofíticos em Malte e Czapek	42
3.4. Avaliação da atividade antifúngica.....	43
3.5. Avaliação da atividade Anticolinesterásica	44
3.6. Avaliação da atividade citotóxica	44
3.7. Avaliação da toxicidade dos HPA's.....	45
3.8. Avaliação da recuperação do método de extração de HPAs em BDA.	46
3.9. Avaliação dos compostos orgânicos voláteis (COV's).....	47
3.10. Perfil químico por CLAE-DAD	49
3.11. Fracionamento do Extrato SA-F02 Czapek	49
3.12. Obtenção dos extratos brutos dos endófitos em escala ampliada	49
3.13. Fracionamento do Extrato SA-F02 Czapek obtido em escala ampliada, por CLAE _{prep}	50
3.14. Fracionamento do Extrato SA-R03 Malte, obtido em escala ampliada, por Cromatografia Líquida de Baixa Eficiência.	50

3.15.	Fracionamento de SA-R03-Malte-40%.	50
3.16.	RMN de ^1H , ^{13}C e bidimensionais	51
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1.	Extratos Brutos	53
4.2.	Perfil cromatográfico dos extratos brutos obtidos em meios de Malte e Czapek	53
4.3.	Avaliação antifúngica	54
4.4.	Avaliação anticolinesterásica	55
4.5.	Avaliação citotóxica	56
4.6.	Avaliação da toxicidade dos HPAs	58
4.7.	Avaliação da recuperação do método de extração	58
4.8.	Análise filogenética	60
4.9.	Avaliação dos compostos orgânicos voláteis (COVs) de <i>Annulohypoxylon stygium</i>	62
4.9.1.	Identificação dos compostos adsorvidos pela fibra (HS-SPME)	62
4.10.	Fracionamento do extrato SA-F02-Czapek	67
4.11.	Fracionamento do extrato SA-F02 Czapek obtido em Escala ampliada	69
4.12.	Fracionamento do extrato SA-R03 Malte obtido em Escala ampliada	70
4.13.	Fracionamento do extrato SA-R03-Malte-40%	71
4.14.	Identificação estrutural da substância 01	72
4.15.	Identificação estrutural da substância 02	78
4.16.	Identificação estrutural da substância 03	84
4.17.	Identificação estrutural da substância 04	90
5.	CONCLUSÕES	96
	REFERÊNCIAS	98

APÊNDICE	107
APÊNDICE 1. Cromatograma de SA-C01 em Czapek.	107
APÊNDICE 2. Cromatograma de SA-C01 em Malte.	107
APÊNDICE 3. Cromatograma de SA-F01 em Czapek.	108
APÊNDICE 4. Cromatograma de SA-F01 em Malte.	108
APÊNDICE 5. Cromatograma de SA-F02 em Czapek.	109
APÊNDICE 6. Cromatograma de SA-F02 em Malte.	109
APÊNDICE 7. Cromatograma de SA-F03 em Czapek.	110
APÊNDICE 8. Cromatograma de SA-F03 em Malte.	110
APÊNDICE 9. Cromatograma de SA-F04 em Czapek.	111
APÊNDICE 10. Cromatograma de SA-F04 em Malte.	111
APÊNDICE 11. Cromatograma de SA-R01 em Czapek.	112
APÊNDICE 12. Cromatograma de SA-R01 em Malte.	112
APÊNDICE 13. Cromatograma de SA-R02 em Czapek.	113
APÊNDICE 14. Cromatograma de SA-R02 em Malte.	113
APÊNDICE 15. Cromatograma de SA-R03 em Czapek.	114
APÊNDICE 16. Cromatograma de SA-R03 em Malte.	114
APÊNDICE 17. Cromatograma de SA-R04 em Czapek.	115
APÊNDICE 18. Cromatograma de SA-R04 em Malte.	115
APÊNDICE 19. Cromatograma de SA-R05 em Czapek.	116
APÊNDICE 20. Cromatograma de SA-R05 em Malte.	116
APÊNDICE 21. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-C01 em Czapek.	117
APÊNDICE 22. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-C01 em Malte.	118

APÊNDICE 23. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-F01 em Czapek.....	119
APÊNDICE 24. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-F01 em Malte.	120
APÊNDICE 25. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-F02 em Czapek.....	121
APÊNDICE 26. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-F02 em Malte.	122
APÊNDICE 27. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-F03 em Czapek.....	123
APÊNDICE 28. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-F03 em Malte.	124
APÊNDICE 29. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-F04 em Czapek.....	125
APÊNDICE 30. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-F04 em Malte.	126
APÊNDICE 31. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-R01 em Czapek.....	127
APÊNDICE 32. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-R01 em Malte.	128
APÊNDICE 33. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-R02 em Czapek.....	129
APÊNDICE 34. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-R02 em Malte.	130
APÊNDICE 35. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-R03 em Czapek.....	131
APÊNDICE 36. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-R03 em Malte.	132

APÊNDICE 37. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-R04 em Czapek.....	133
APÊNDICE 38. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-R04 em Malte.	134
APÊNDICE 39. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-R05 em Czapek.....	135
APÊNDICE 40. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-R05 em Malte.	136

1. INTRODUÇÃO

1.1. Interação entre espécies.

As folhas das plantas metabolizam um amplo espectro de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) tais como, isoprenos, terpenos, alcanos, alcenos, alcoóis, ésteres, ácidos, etc. Estes COVs servem para comunicação inter e intra espécies, sendo de suma importância, pois fornecem soluções para os problemas enfrentados pelas plantas devido a sua imobilidade ocasionada pelo enraizamento no solo. A quantidade de voláteis não é trivial, sendo que cerca de 20% de todo CO₂ capturado pelas plantas são convertidos em COVs (BALDWIN, 2010).

A importância dos COVs não se resume somente para comunicação inter e intra espécie e tem sido, significativamente, subestimada para este fim. As interações também servem como sinais para a manipulação do ambiente, podendo por exemplo, reprogramar a arquitetura das raízes de uma planta simbiote parceira, ou induzir o crescimento da planta conduzindo o aumento da colonização na superfície. Estes voláteis podem aumentar a resistência de uma planta contra patógenos ativando vias de sinalização dependente dos fitormônios (WERNER; POLLE; BRINKMANN, 2016), atrair polinizadores para o auxílio na reprodução e carnívoros para diminuir a herbivoria.

Devido aos efeitos antimicrobianos, a emissão dos COVs presentes nas plantas desempenha um papel determinante nos tipos de comunidades microbianas que podem se estabelecer ao seu redor. Os microrganismos através da evolução desenvolveram algumas estratégias para interferir na produção de COVs das plantas, por exemplo, emitindo seus próprios COVs e misturando-os aos da planta. Deste modo afeta a planta fisiologicamente e faz com que ela altere sua produção metabólica biotransformando os COVs das plantas ou até desenvolvendo substâncias para confundir, paralisar ou até manipulá-los (LI, *et al.*, 2016) .

Um grande desafio desta área consiste em desvendar as funções biológicas e ecológicas destes compostos começando com o desenvolvimento de estudos relacionados à detecção e caracterização dos mesmos. Existem poucos estudos nessa área, onde são relatados apenas cerca de 2000 voláteis

conhecidos provenientes de 1000 espécies (LEMFACK *et al.*, 2018). O avanço nas pesquisas e conhecimento da produção, atuação biológica e papéis ecológicos destes COVs pode nos auxiliar na descoberta de novos mecanismos de controles de processos biológicos, cruciais na saúde da planta, levando a novas estratégias para melhorar a produção agrícola aumentando a produtividade, controle de doenças e até a resolução de problemas ambientais (BITAS *et al.*, 2013; KANCHISWAMY; MALNOY; MAFFEI, 2015).

1.2. Fungos como fonte de substâncias bioativas

Historicamente, todas as civilizações tem usado plantas como fonte de terapia medicinal, ainda hoje elas são utilizadas como alternativas aos fármacos. Cerca de 80% da população em países em desenvolvimento utilizam plantas medicinais para cuidados com a saúde. Estudos revelaram que dos medicamentos sintetizados e desenvolvidos entre 1981 e 2014, 51% são baseados em plantas (ADELEKE; BABALOLA, 2021). A grande desvantagem na utilização de plantas como fonte de princípios ativos é o tempo até atingir a fase produtiva que, em alguns casos podem levar décadas, elevando o preço do medicamento ou promover o extrativismo das plantas nativas podendo levar a sua extinção.

Uma solução pra este problema é a utilização de fungos endofíticos, que são microrganismos que habitam o interior da planta sem causar efeito patológico à espécie hospedeira. Normalmente, apresentando interação mutualística onde a planta fornece o habitat e nutriente enquanto o endófito produz substâncias para defesa, crescimento ou até metabolitos de grande importância que a planta não produz por alguma deficiência no ambiente (HIRUMA *et al.*, 2016). Eles se especializaram em invadir as plantas através de estômatos ou feridas causados por choques mecânicos, insetos ou patógenos. Após a instalação ele pode viver dentro da planta por toda sua vida, podendo ser transmitido a futuras gerações pelas sementes (ESPÓSITO; AZEVEDO, 2010). Isso permitiu uma coevolução dos mesmos com as plantas hospedeiras e a capacidade de produzir algumas das substâncias inclusive, similares às produzidas por elas e até auxiliando nas suas próprias produções.

Existem algumas vantagens em utilizar microrganismos frente a outras fontes naturais. Após o isolamento de uma cepa, é possível a sua replicação indefinidamente para a produção do metabólito ativo de interesse. O cultivo é feito de forma simples utilizando tecnologias existentes. A produção destes metabólitos secundários são dependentes dos fatores de cultivo, sendo que uma pequena alteração no meio de cultivo como, temperatura, luminosidade, adição de cofatores, entre outros são parâmetros que influenciam nessa produção. Com a modificação sistêmica desses parâmetros se criou uma metodologia conhecida como OSMAC (*One Strain Many Compounds*) (BODE et al., 2002).

Os fungos constituem o segundo maior grupo sobre a terra, estima-se que existem entre 11,7 e 13,2 milhões de espécies diferentes (WU, Bing *et al.*, 2019), das quais somente 154.538 (~1%) foram classificados segundo o COL Checklist, (2023) demonstrando um amplo campo a ser explorado. A partir da sua descoberta em 1866, produtos naturais proveniente de microrganismos apresentam-se praticamente inexplorados (KUSARI; SPITELLER, 2011).

A produção de metabólitos bioativos a partir de fungos começou a ser explorada extensivamente nos anos 40, com o amplo uso terapêutico da penicilina durante a segunda guerra mundial. A seguir seu potencial foi expandido na produção de fármacos, toxinas, fatores de crescimento e muitos outros produtos de interesse biotecnológico como a produção de enzimas. Sendo que 60% das enzimas utilizadas nas indústrias são provenientes de fungos (BEZERRA *et al.*, 2021) e com potencial de biodegradação.

1.3. Presença de HPAs no ambiente e fitorremediação

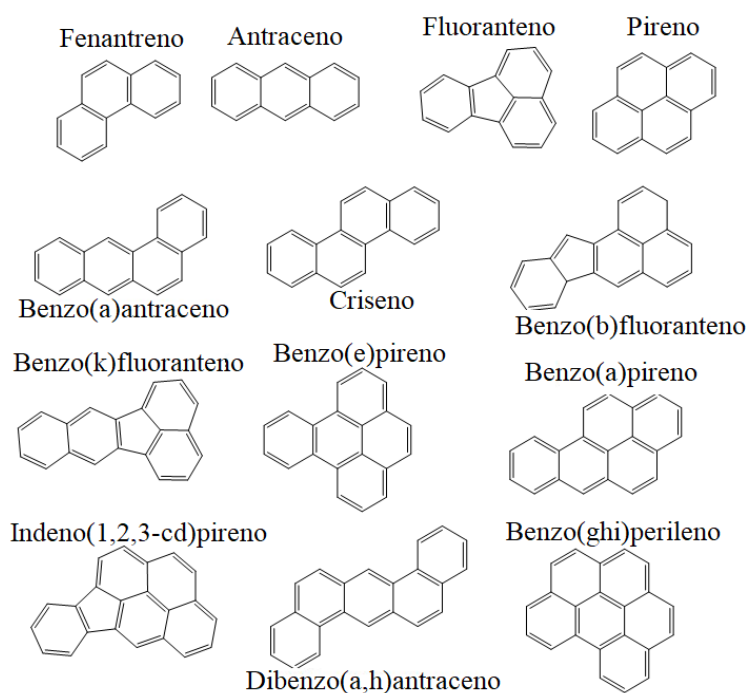
O petróleo é uma mistura complexa de compostos orgânicos gasosos, líquidos e sólidos, onde os hidrocarbonetos de 4 a 26 átomos de carbono constituem em 75% do peso do óleo. Entre as substâncias que compõem o petróleo, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) apresentam importância ambiental devido aos seus efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos. São considerados como os hidrocarbonetos de maior toxicidade (SISINNO *et al.*, 2003) e comumente encontrados como misturas complexas

em diferentes matrizes ambientais (água superficial, subterrâneas, mar, lagoas, solos, etc) (READMAN *et al.*, 2002).

Os HPAs e seus derivados são frequentemente encontrados em regiões onde é desenvolvida a atividade petrolífera. No Brasil, no estado de São Paulo, em regiões como São Vicente, Cubatão e o porto de Santos (maior porto da Latino América) considerados centros econômicos e pólos petroquímicos, químicos e metalúrgicos do país, são locais onde sua constante exploração, extração, manufatura, transporte e inclusive vazamentos, promovem ações antrópicas que impactam diretamente no meio ambiente e ocasionam continua poluição.

A literatura relata centenas de HPAs, porém segundo a Agência de Proteção Ambiental Americana (Environmental Protection Agency EPA), apenas 16 possuem interesse em estudos ambientais (WHO, 2011) e que serão abordados nesta tese, são os seguintes: naftaleno, antraceno, acenafteno, acenaftileno, fenantreno, fluoreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno, dibenzo(a,h)antraceno e indeno(1,2,3-cd)pireno (Figura 1).

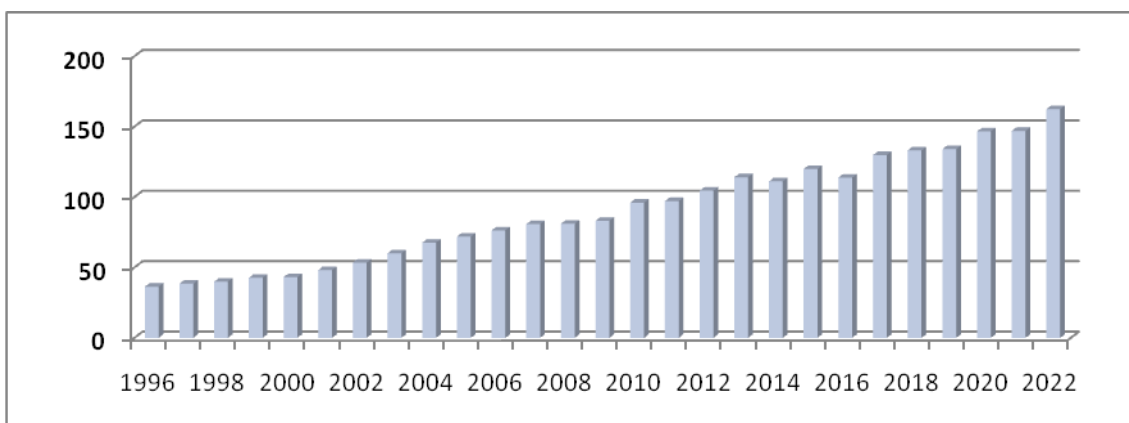
Figura 1. Estrutura dos 16 HPAs considerados prioritários pela EPA.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

As instalações do porto de Santos ocupam 13 km de extensão de cais, contando com 53 terminais entre públicos e privados. Podemos observar na Figura 2 que o movimento no porto de Santos, em toneladas, aumenta ano após ano configurando assim grande contribuição como fonte poluidora de regiões próximas.

Figura 2. Movimento crescente de produtos transportados em milhões de toneladas por ano segundo a Autoridade Portuária de Santos.



Fonte: Autoridade Portuaria de Santos, (2023)

Manguezais são as regiões mais impactadas pela poluição gerada nesse tráfego pois são ecossistemas de transição entre os ambientes terrestres e marinho. Possuem importância fundamental ao bioma, pois formam um importante habitat para inúmeras espécies de peixes, crustáceos, mamíferos, aves e insetos (CUNHA-LIGNON *et al.*, 2009). O Estado de São Paulo conta com uma área de 231 km² de manguezais no entanto, 28 km² dessa área encontram-se alterada ou degradada. Na Figura 3 podemos observar o efeito mutagênico na garra do caranguejo ‘mãozinha’ apresentando maior número de pinças.

Figura 3. Registro fotográfico do efeito mutagênico na garra do caranguejo ‘mãozinha’ relatado em 2007. A esquerda normal sem mutações única ponta na parte fixa da pinça e a direita com cinco pontas.

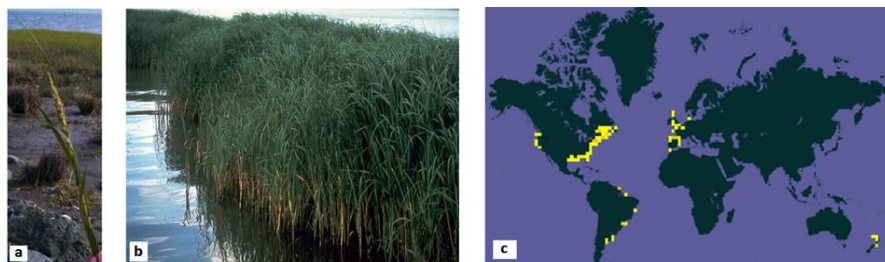


Fonte: GIRARDI, (2010).

A contínua presença de contaminantes orgânicos nesse tipo de ecossistemas têm sido uma preocupação constante. Foi relatada a ocorrência de HPA₁₆, somatória dos 16 HPAs considerados prioritários pela EPA (WHO, 2020), em sedimentos em países como Índia e Brasil, onde foram detectadas concentrações entre 132 ~ 2938 ng/g (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2010) e 1350 ng/g (VELHO *et al.*, 2012), respectivamente.

A espécie *S. alterniflora* é uma planta herbácea, perene halófito, largamente encontrada principalmente no continente Americano e Europeu (Figura 4) pertence ao gênero *Spartina* que é formado por 16 espécies de gramíneas perenes, nativa de toda a costa do Oceano Atlântico, ocorrendo principalmente nas Américas do Norte e Sul. *S. alterniflora* é a espécie que apresenta mais característica de manguezais, não se restringindo à região de marisma (AMÉRICO, 2010). Já foi estudada quanto a sua sobrevivência em situações de derramamento de óleo, a recolonização do ambiente pós contaminação e quanto a fitorremediação de contaminantes orgânicos (PEZESHKI *et al.*, 2000; XIE *et al.*, 2020).

Figura 4. Floração de *Spartina alterniflora* (a) e predominância da espécie em região alagada de mangue (b) e ocorrência mundial (c)



Fonte: Global Biodiversity Information Facility (GBIF, 2023).

A fitorremediação é o uso de certas plantas para recuperar o solo, sedimentos, ar e a água contaminada por compostos orgânicos e inorgânicos (PIRES *et al.*, 2005). Diversos estudos demonstram sua aplicabilidade na remoção de vários tipos de compostos, como metais (RAMIREZ; DUSSAN, 2014; SALLA; HARDAWAY; SNEDDON, 2011) hidrocarbonetos derivados de petróleo (MOREIRA *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2014) e pesticida organoclorado (BUOSI; FELFILI, 2004).

As plantas podem atuar diretamente, absorvendo, acumulando ou metabolizando os compostos nos tecidos, ou indiretamente, alterando as condições físico-químicas do sedimento, propiciando a imobilização ou alteração química de compostos tóxicos. Os mecanismos diretos são a fitoextração (a planta extrai os contaminantes e acumula em seus tecidos), fitodegradação (a planta extrai e degrada os contaminantes) e fitovolatilização (a planta extrai e libera para a atmosfera o contaminante em forma de compostos voláteis) e os indiretos são a fitoestabilização (a planta promove a estabilização no solo fazendo com que não haja difusão do contaminante) e fitoestimulação/rizodegradação (a planta cria um ambiente propício para a vida de microrganismos que degradam o contaminante) (DINARDI *et al.*, 2003; ITRC, 2001; ZYNDA, 2005). A descontaminação por fitorremediação tem o custo relativamente baixo quando comparados aos métodos convencionais de incineração ou aterros, sendo relatados entre U\$75 e U\$200 por jardas³, comparada com os custos de métodos tradicionais variando de U\$200 a U\$800 (GABRIEL, 1991).

Levando-se em conta a alta toxicidade dos HPAs podendo apresentar carcinogenicidade e mutagenicidade, o aumento da exposição com o passar dos anos, pois são contaminantes persistentes e que são remediados por *S. alterniflora* (PEZESHKI *et al.*, 2000; XIE *et al.*, 2020), este trabalho teve como objetivo, avaliar se os fungos endofíticos associados a *S. alterniflora*, também podem trazer essa biorremediação, assim como a espécie vegetal.

1.4. *Annulohypoxylon stygium* um endófito de *S. alterniflora*

Annulohypoxylon stygium é um fungo pertencente a família Xylariaceae encontrado principalmente em zonas tropicais e equatoriais. A maior parte dos relatos descrevem associação com organismos marinhos, principalmente algas, indicando diversas atividades biológicas.

Ensaio relatados por MACIEL *et al.*, (2018) com o extrato do fungo *A. stygium* apresentaram atividade antioxidante e intensa absorção de radiação UV-B, não apresentando atividade citotóxica e sendo foto estável. Deste modo pode ser, considerado promissor como produtor de metabólitos secundários com atividade foto protetora, podendo ser aplicado a protetores solares.

ROBL *et al.*, (2015, 2016) demonstram estudos, onde a utilização de *A. stygium* na fermentação de bagaço de cana de açúcar evidenciou aumento da hidrólise pela produção enzimática de pectinase, hemicelulase e β -glicosidase. Esta observação demonstrou um arsenal enzimático muito rico, sendo consideradas de elevado interesse comercial.

Alguns fatores indicam o potencial antifúngico gerado pelo metabolismo secundário de *A. stygium*. A fungicultura por insetos é uma prática conhecida e realizadas por formigas, besouros e cupins. Os ancestrais das formigas *attine* (formigas cortadeiras) desenvolveram esse método de cultivo de alimentos há cerca de 50 milhões de anos. Elas levam até seu habitat as folhas para o crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*. Estudos realizados por SEIPKE *et al.*, (2012) revelaram que a interação das formigas com as actinobactérias das linhagens *Streptomyces* e *Amycolatopsis* produzem substâncias antifúngicas capazes de inibir o crescimento de *A. stygium*. Essa inibição é necessária já que este microrganismo poderia destruir o fungo usado como alimento levando ao colapso da colônia.

Um estudo realizado por MEDINA *et al.*, (2019) com *A. stygium* levou ao isolamento de pirogalol que foi ativo frente a *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA) e linhagens de *Escherichia coli* (Φ 4 e 3 mm em 40 μ g/disk frente ao padrão positivo rifamicina (10 μ g/disk para MRSA) e Polimixina B (30 μ g/disk para *E. coli*) que apresentaram Φ 3 e 15 mm, respectivamente.

Na literatura especializada são poucos os relatos que mencionem o estudos do perfil químico e metabólico produzidos por *A. stygium* (Tabela 1, Figura 5), sendo sua maior parte nos últimos anos. Existem porém diversas atividades biológicas ligadas a estes metabólitos, mostrando-se um estudo promissor tanto pelo potencial bioativo quanto na diversidade de classe dos compostos produzidos, incentivando-nos ainda mais ao estudo deste microrganismo.

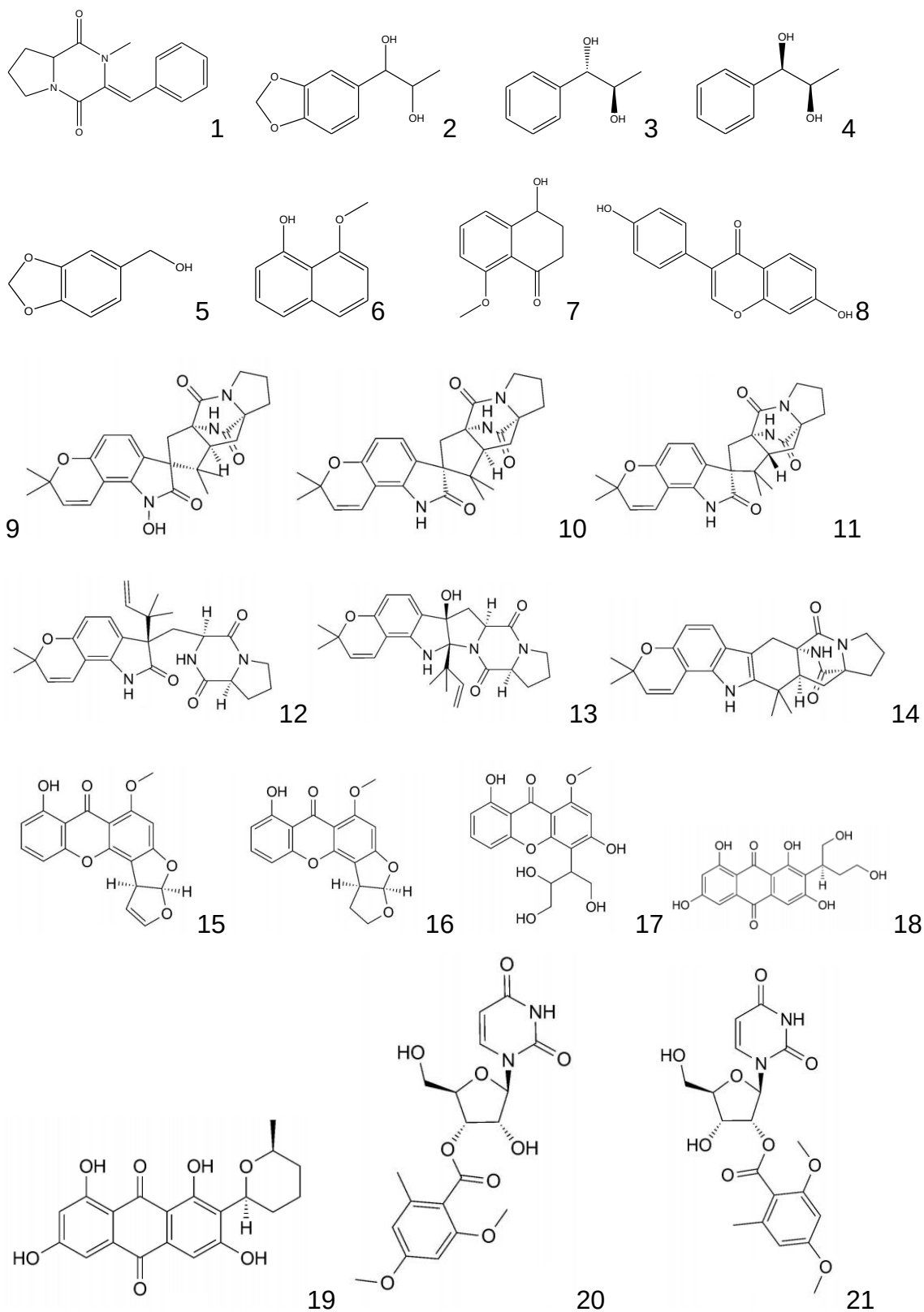
Tabela 1. Metabólitos e atividades biológicas de *A. stygium*.

Estrutura	Nome	Atividade biológica	referência
1	3-benzilideno-2-metilhexahidropirrolol [1,2-α] pirazina-1,4-diona	Não fototóxico; absorve radiação UV-B	MACIEL <i>et al.</i> , (2018)
2	1,2-propanodiol-1-(1,3-benzodioxol-5-il)	Não fototóxico; Fotoestável; absorve radiação UVB	
3	(1S,2R)-1-fenil-1,2-propanodiol	Fototóxico	
4	(1R,2R)-1-fenil-1,2-propanodiol		
5	Álcool piperonílico ou 5-metanol-1,3-benzodioxolano		
6	8-metoxinaftol	Sem atividade relatada	RONDILLA <i>et al.</i> , (2022)
7	Nodulisporona		SEGUNDO <i>et al.</i> , (2023)
8	Daidzeína	Anticarcinogênese, antifibrótica, antidiabética, redução de colesterol e atividade cardiovascular	RAWAT <i>et al.</i> , (2019)
9	Notoamida A	Sem atividade relatada	GAO <i>et al.</i> , (2020)
10	Notoamida B		
11	Versicolamida B		
12	Notoamida C		
13	Notoamida D		
14	Estefacidina A		
15	Esterigmatocistina	Citotóxico frente a linhagens cancerígenas de fígado, cervical, mama e cólon	
16	Diidrosterigmatocistina	Sem atividade relatada	
17	Secosterigmatocistina		
18	Versiconol		
19	Averufanina		

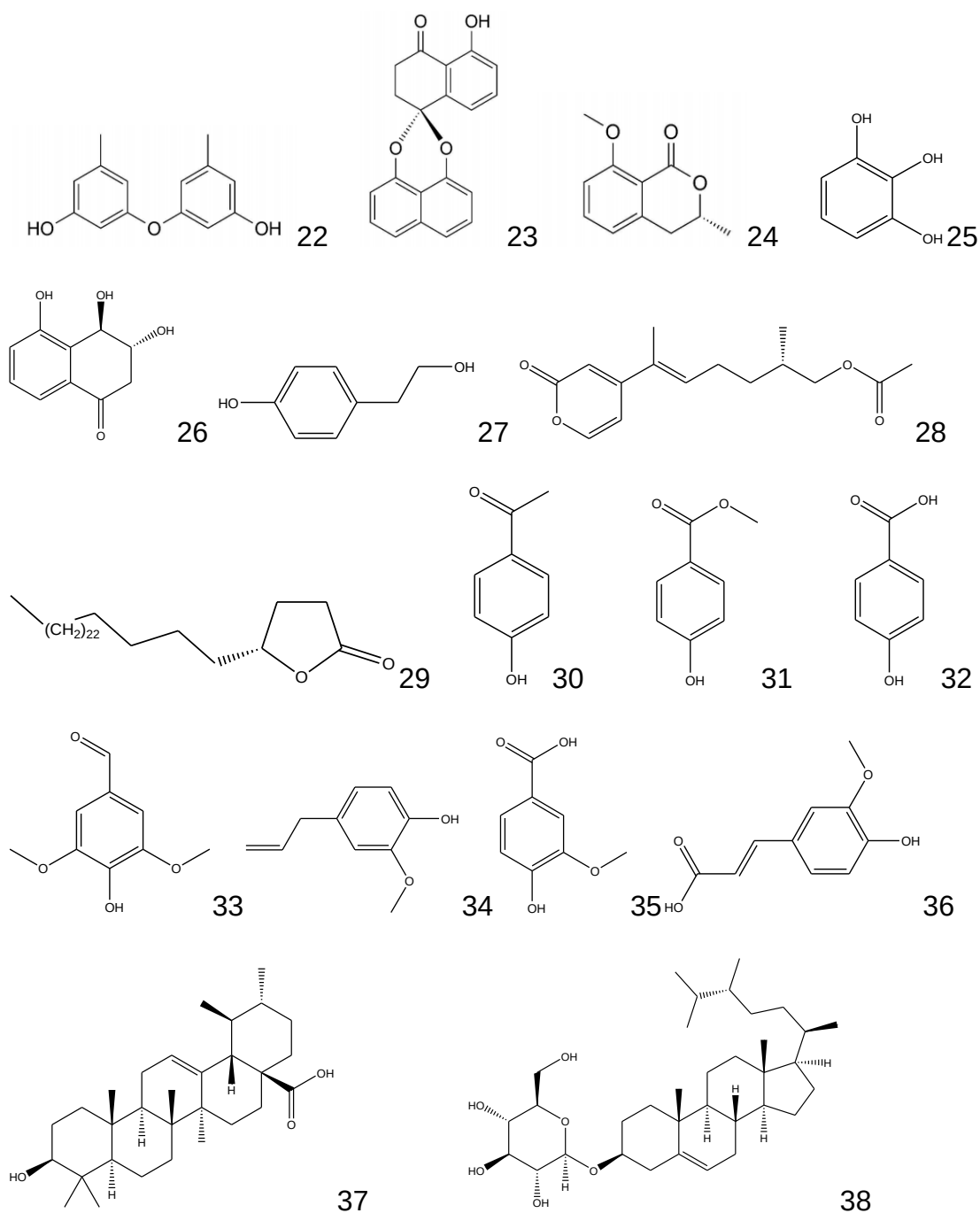
Continuação Tabela 1			
20	Kipucasina D	Sem atividade relatada	GAO <i>et al.</i> , (2020)
21	Kipucasina E		
22	Diorcinal		
23	Palmarumicina CP2	Citotóxico frente a linhagens cancerígenas de fígado, cervical, mama e cólon	
24	(3R)-meleína metil éter	Sem atividade relatada	
25	Pirogalol	Antimicrobial contra MRSA e. coli	MEDINA <i>et al.</i> , (2019)
26	3,4,5-trihidroxi-1-tetralona	Sem atividade relatada	
27	Tirosol		
28	Annulopironato	Inibição da produção de NO	PIMJUK <i>et al.</i> , (2021)
29	Annulostygilactona	Sem atividade relatada	CHENG <i>et al.</i> , (2014)
30	4-hidroxibenzaldeído		
31	Metilparabeno		
32	Ácido p-hidroxibenzóico		
33	Siringaldeído	Anti-diabética, potencializador de contratilidade intestinal	WU <i>et al.</i> , (2022)
34	Eugenol	Antifúngico, antimicrobiano, anti-inflamatório, antioxidante, analgésico, anticâncer e antiparasitário	ABDOU <i>et al.</i> , (2021)
35	Ácido vanílico	Sem atividade relatada	CHENG <i>et al.</i> , (2014)
36	Ácido ferúlico		
37	Ácido ursólico	Anti-inflamatório, anticâncer, antidiabetico, antioxidante e antibacteriano	MLALA <i>et al.</i> , (2019)
38	β-daucosterol	Sem atividade relatada	CHENG <i>et al.</i> , (2014)

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Figura 5. Metabólitos secundários produzidos por *A. stygium*.



continuação **Figura 5.** Metabólitos secundários produzidos por *A. stygium*.



Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

2. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial químico e biotecnológico dos fungos endofíticos de *Spartina alterniflora* e estudar o perfil metabólito de *Annulohypoxylon stygium*.

2.1 Objetivos específicos

- Isolamento, purificação e preservação dos fungos endofíticos associados à *Spartina alterniflora*;
- Avaliar a resistência dos endófitos isolados a diferentes concentrações de HPAs;
- Validar método de extração de HPAs em BDA;
- Cultivo dos endófitos isolados de *S. alterniflora* em extrato de Malte e de Czapek (escala reduzida) e obtenção dos respectivos extratos brutos;
- Triagem química dos extratos brutos obtidos, por RMN de ^1H e CLAE-DAD;
- Cultivo de *Annulohypoxylon stygium* em escala ampliada para o isolamento, elucidação ou determinação estrutural dos metabólitos secundários, utilizando técnicas cromatográficas e espectroscópicas;
- Análise dos COVs produzidos por *Annulohypoxylon stygium*.
- Triagem biológica dos extratos brutos obtidos, pela avaliação das atividades anticolinesterásica, citotóxica e contra os fungos fitopatógenos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*;

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Obtenção da cepa fúngica

A coleta de *Spartina alterniflora* foi realizada no dia 09 de abril de 2015 na cidade de São Vicente – SP, na Rua Paulo Sérgio Garcia, num local denominado Portinho pelos locais, latitude -23.986731 e longitude -46.403370), Figura 6 mostrado pela flecha verde clara.

Figura 6. Imagem via satélite do ponto de coleta



Fonte: Googlemap (2015)

O isolamento dos endófitos iniciou-se com a lavagem da superfície do material vegetal em água corrente e separação de caules, folhas e raízes (Figura 7), seguido de esterilização por imersão em NaClO 1% e em etanol 70%, e dupla lavagem em água estéril em três condições diferentes (Tabela 2) (SILVA, 2005). Para garantir a obtenção de somente fungos endofíticos foi feita a inoculação da água de lavagem como controle negativo para microrganismos não endofíticos. Após o processo de esterilização, as folhas/caules/raízes foram seccionados assepticamente e incubados em placas de Petri contendo BDA (Batata Dextrose e Agar) estéril comercial (Figura 8). O meio de cultivo foi previamente esterilizado em autoclave, adicionou-se o antibiótico amoxicilina tri-hidratada (2 g L^{-1}) ao meio para inibir o crescimento bacteriano. O crescimento dos fungos foi monitorado

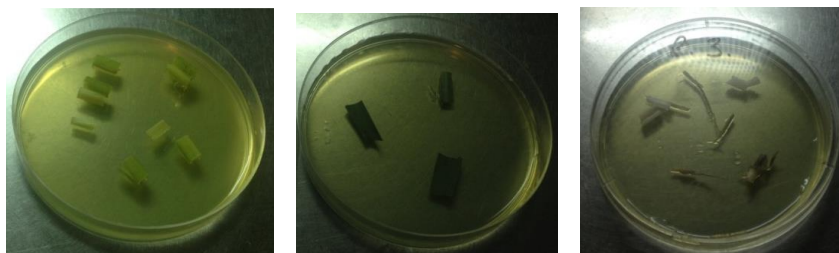
diariamente e repiques sucessivos foram realizados até a obtenção das linhagens puras, as quais foram avaliadas quanto à pureza, através da aparência uniforme nas placas com os meios próprios, sendo posteriormente preservadas em água estéril (*slants*).

Figura 7. *Spartina alterniflora* depois da lavagem. **A** Secções de *Spartina alterniflora*, folhas, caules e raízes. **B** *Spartina alterniflora* depois da lavagem



Fonte: Elaborado pelo autor (2015).

Figura 8. Órgãos inoculados em meio de Batata Dextrose Agar (BDA)



Fonte: Elaborado pelo autor (2015).

Tabela 2. Tempo de esterilização das folhas, frutos e ramos

	NaClO 1%	Etanol 70%	Águas de lavagem
Método 1	0,5 min	1 min	10 min total
Método 2	3 min	1 min	
Método 3	5 min	3 min	

Fonte: Elaborado pelo autor (2015).

3.2. Identificação de *Annulohypoxylon stigium*

Annulohypoxylon stigium foi cultivado por 7 dias em PDA e usado como fonte de DNA. Aproximadamente 0,1 g do micélio foi triturado utilizando nitrogênio líquido e homogeneizado com 1 mL do tampão extrator (100 mmol/L Tris-HCl, pH 8,0; 50 mmol L⁻¹ EDTA pH 8,0; 500 mmol L⁻¹ NaCl; 0,07% 2-mercaptoetanol). Após a adição de 130 µL de 10% SDS, o homogenato foi incubado por 15 min a 65 °C. Para a precipitação das proteínas, foi adicionado 300 µL de acetato de potássio 5 mol/ L e incubado por 30 min a 4 °C. Após centrifugação a 7000 G, 750 µL da solução foi transferida a um novo *vial*, misturada (v:v) com a solução caotrópica (0,5 mol/L de acetato de potássio, pH 5,0; 4,5 mol/L de guanidiniumisotiocianato) e aplicado por uma coluna para purificação de DNA Miniprep contendo sílica (Promega, USA), A coluna foi eluída duas vezes com uma solução contendo 10 mmol/L de acetato de potássio, pH 5,0; 80% Etanol; 16,7 µmol/L de EDTA, pH 8,0. O DNA foi eluído com 50 µL de água estéril duplamente destilada.

A técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) para amplificação dos fragmentos de gens do rDNA assim como o α -actin e β -tubulin foram desenvolvidos usando os ITS1/ITS4 (WHITE *et al.*, 1990), T1/T22 (O'DONELL; CIGELNIK, 1997) e ACT-512F/ACT-783R (CARBONE; KOHN, 1999), respectivamente. O seqüenciamento da amplificação do DNA foi executada no Instituto de botânica de São Paulo com os mesmos primers utilizados na amplificação. O seqüenciamento de reação foi feito no ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA), seguindo o protocolo do fabricante (BLASTN, 2017) foi utilizado para buscar um sequência de nucleotídeos similar na base de dados (GENBANK, 2018).

O ensaio foi realizado pelo doutor Alexander Banguela Castillo do Instituto de Botânica de São Paulo.

3.3. Obtenção dos extratos brutos dos fungos endofíticos em Malte e Czapek

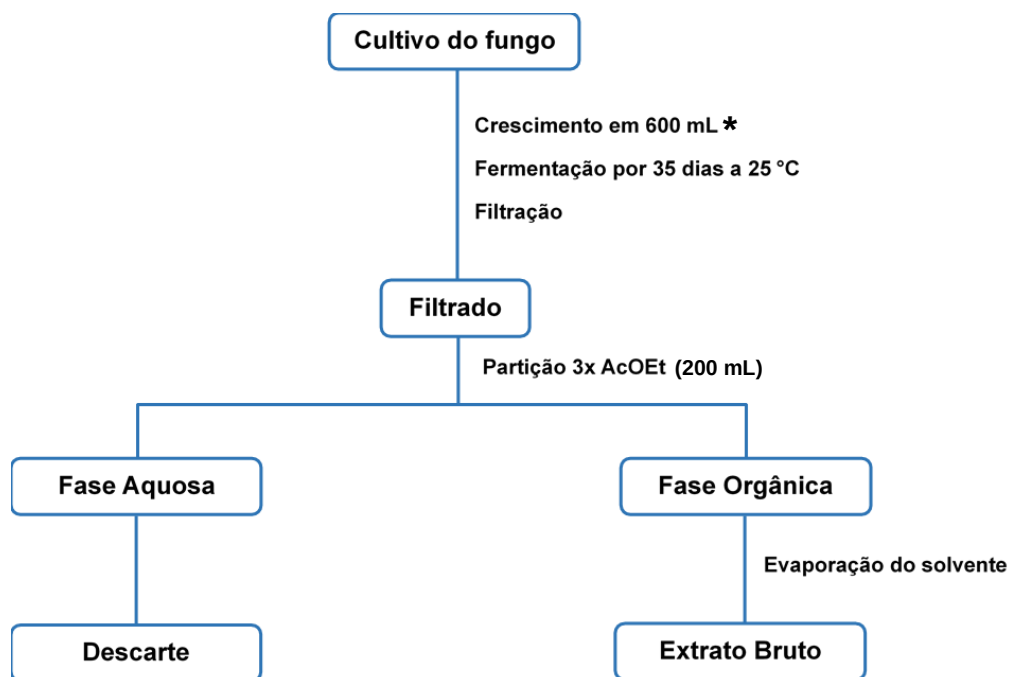
Os fungos endofíticos foram codificados da seguinte maneira:

SA-R01 (**SA**= *Spartina alterniflora*) **R** (raízes), e **01**(significa o ordem de isolamento dos endófitos). Paralelamente foi realizado o branco dos extratos de Malte e de Czapek seguindo a mesma metodologia sem a inoculação dos fungos endofíticos.

Os fungos endofíticos preservados em “slants” foram repicados em placas de Petri contendo BDA e incubados por 10 dias a 25 °C. A seguir, aproximadamente um terço de micélio de cada placa de Petri foi inoculado nos meios líquidos: Extrato de Malte e Czapek, e mantidos no modo estático por 35 dias a 25 °C. O cultivo em pequena escala foi realizado adicionando em frascos de Erlenmeyer (500 mL), 200 mL de cada meio líquido sendo estes autoclavados a 120 °C por 20 minutos. Preparou-se 62 frascos, sendo 3 de cada fungo e 1 de controle em cada meio.

Ao final do cultivo em escala reduzida (Figura 9) o caldo fermentado foi separado do micélio por filtração a pressão reduzida e submetido à partição líquido/líquido com AcOEt. A fração aquosa foi descartada e a orgânica foi evaporada fornecendo os extratos brutos

Figura 9. Esquema da obtenção do extrato bruto.



* Malte e Czapek

Fonte. Elaborado pelo autor (2017).

Os solventes recolhidos do rotaevaporador foram reutilizados na extração e após o término desta foram adequadamente descartados em frascos previamente rotulados e encaminhados ao descarte conforme as Normas Gerais de Gerenciamento de Resíduos Químicos no IQ/UNESP presente no site: www.iq.unesp.br/APOIO-TECNICO/normas-residuos.pdf.

3.4. Avaliação da atividade antifúngica

A atividade antifúngica foi determinada pela técnica da autobiografia para a detecção da atividade fungitóxica, pela nebulização dos fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (concentração de 5×10^7 esporos/mL, em solução de glicose e sais) em placas de CCDC em sílica gel de fase reversa (C-18) contendo 400µg dos extratos brutos, previamente eluídas com CHCl_3 :MeOH (87:13). As placas foram incubadas a 25° C por 48 horas, na

ausência de luz. A presença de halos de inibição de crescimento dos fungos, em comparação com o padrão positivo nistatina (5 µg).

O ensaio foi realizado pela Doutora Cynthia Murakami do Instituto de Botânica - Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica.

3.5. Avaliação da atividade Anticolinesterásica

As amostras foram submetidas ao ensaio para avaliação da atividade anticolinesterásica *on-flow* com as enzimas acetilcolinesterase humana (AChE-hu) e de enguia elétrica (AChE-ee) imobilizadas em capilar de sílica fundida, resultando em biorreatores denominados ICER (*Immobilized Capillary Enzyme Reactor*) e acopladas a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência. Este ensaio baseia-se no método modificado de Ellmann, avaliando a medida da produção da tiocolina formada através da hidrólise do análogo do substrato da AChE, a acetiltiocolina. A tiocolina formada reage com o chamado reagente de Ellman (ácido 5,5-ditiobis[2-nitrobenzólico]) formando uma mistura de dissulfetos e um ânion amarelo com intensa absorção em 412 nm (ELLMAN *et al.*, 1961).

Os resultados são comparados a partir da proporção de área entre a atividade enzimática na presença (A_i) e ausência do inibidor (A_0) de acordo com a equação:

$$\% \text{ inibição} = \left(1 - \frac{A_i}{A_0} \right) \times 100$$

Ensaio realizado por Adriana Ferreira Lopes Vilela da FFCL de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

3.6. Avaliação da atividade citotóxica

As células foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ cél mL⁻¹ para as linhagens PC3 (próstata - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano) e $0,7 \times 10^5$ cél mL⁻¹ para a linhagem HCT-116 (cólon - humano). As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e os sobrenadantes, removidos. Em seguida, foram adicionados 150

μL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3 h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 μL de DMSO puro (contendo as amostras na concentração de 20 mg mL^{-1}) em espectrofotômetro de placa a 595nm.

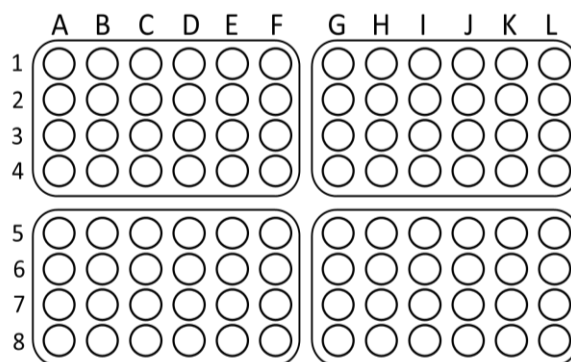
A avaliação citotóxica foi realizada em parceria pelo Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira UFC, LOE.

3.7. Avaliação da toxicidade dos HPA's

Para verificar a toxicidade dos HPAs nos fungos endofíticos, foram repicados em placas de Petri contendo BDA (Batata dextrose e Agar) e incubados por 10 dias a 25 °C. A seguir, aproximadamente 1 cm^2 do micélio foi raspado e colocado em frascos de Eppendorf contendo 2 mL de água ultra pura, e submetidos a agitação em vortex por 3 minutos.

Quatro placas de cultivo de célula com 24 poços de fundo chato foram ordenadas de forma a obter um conjunto com 8 linhas de poços e 12 colunas (Figura 10), em cada linha de poços foi adicionado 1 mL de BDA contendo solução padrão mista dos HPA's prioritários (Sigma Aldrich TCL HPAs MIX 49156), nas concentrações, controle negativo, 0,0005 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 0,0038 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 0,0074 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 0,0138 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 0,0498 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 0,7407 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 1,1393 $\mu\text{g mL}^{-1}$, referentes as linhas de 1 a 8, respectivamente. Em cada coluna foi adicionado 100 μL da dispersão de um microrganismo obtida anteriormente. Na coluna A foi adicionado SA-C01, na B SA-F01, na C SA-F02, na D SA-F03, na E SA-F04, na F SA-R01, na G SA-R02, na H SA-R03, na I SA-R04 e na J SA-R05, para após 7 dias ser feita a análise visual de inibição do crescimento do microrganismo.

Figura 10. Esquema da disposição das placas



Fonte. Elaborado pelo autor (2017).

3.8. Avaliação da recuperação do método de extração de HPAs em BDA.

Efetuuou-se os experimentos para verificar a viabilidade da extração por ultrassom utilizando como solventes extratores *n*-hexano, diclorometano e acetona. Este método foi escolhido por ser simples e rápido necessitando apenas de um banho de ultrassom e por ser amplamente relatado para extração de HPAs em diferentes tipos de matrizes como sedimento na Tanzânia (MAHUGIJA; AHMED; MAKAME, 2017) e solo-plantas na Itália (ALBANESE *et al.*, 2015).

Foram preparados vials âmbar de 40 mL, onde pesou-se 20 gramas de BDA e a cada vial foi adicionado 15 µL de solução padrão de HPA de concentração 20 ppm (µg/mL). Após 24 h a matriz fortificada de PDA foi liofilizada (Liofilizadores Christ Alpha 1-2 LD plus Bomba Vaccubrand modelo RZ25 e Christ Alpha 2-4 LD plus e Bomba Vaccubrand modelo RC 6) até a total retirada de umidade e em seguida os experimentos de extração foram executados. A recuperação é calculada pela divisão da área do extrato obtido ao final da extração pela area do padrão utilizado na fortificação, onde o resultado é multiplicado por 100.

A extração foi efetuada com 20 mL de solvente, em cada sequência de extração, banho de ultrassom por 20 min a 35 °C, seguido 2 min de centrifuga e separação do sobrenadante. Foram efetuadas duas sequências para cada

amostra. Os solventes de extração utilizados foram 3 puros (diclorometano, acetona e *n*-hexano) e 3 misturas (diclorometano:*n*-hexano (1:1), acetona:*n*-hexano (1:1), acetona:diclorometano:*n*-hexano (1:1:1)). Em seguida o solvente extrator foi retirado em fluxo moderado de N₂(g), ressuspenso em 1 mL *n*-hexano o qual foi analisado no GC-MS-QP2020 SHIMADZU, com fonte de ionização por elétrons e analisador quadrupolo. A coluna utilizada foi uma Restek Rtx-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm,), GCMS solutions ver. 4.41. A temperatura do forno foi programada: 80 °C (6 min), 20 °C/min 140 °C (2 min), 20 °C/min 180 °C (0 min), 1 °C/min 186 °C (0 min), 20 °C/min 245 °C (2 min), 7 °C/min 300 °C (6 min). A temperatura do injetor foi 300 °C split 1:5, 1 µL de injeção. A faixa da massas de aquisição entre 5,00-7,00 min 148-154 Daltons, 7,00-11,00 min 126-138 Daltons, 11,00-12,50 min 170-172 Daltons, 12,50-14,00 min 151-162 Daltons, 14,00-16,00 min 164-167 Daltons, 16,00-20,00 min 176-189 Daltons, 20,00-25,00 min 200-203 Daltons, 25,00-28,00 min 225-240 Daltons, 28,00-29,82 min 250-255 Daltons, 29,82-32,00 min 250-264 Daltons, 32,00-38,00 min 275-279 Daltons. Modo de injeção automático, modo de ionização por elétrons a 70 eV, gás de arraste hélio (99,999%) a vazão constante de 1,0 mL/min, pressão: 45.8 kPa, velocidade linear: 35.9 cm seg⁻¹, vazão total: 9.0 mL min⁻¹ com análises em triplicata.

3.9. Avaliação dos compostos orgânicos voláteis (COV's)

O fungo endofítico *A. stygium* foi inoculado em três *vials* de 40 mL, contendo 15 g de PDA, utilizando para extração dos COVs por HS-SPME (Headspace Solid Phase Microextraction) uma microfibra trifásica de DVB/CAR/PDMS (divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano 50/30 µm, Supelco) durante 50 min cerca de 1 cm acima da cepa fúngica.

Para as análises por GC-MS utilizou-se cromatógrafo a gás Shimadzu QP2020 equipado e interface com um espectrômetro de massas. A coluna utilizada foi uma Restek Rtx-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm,), GCMS solutions ver. 4.41. A temperatura do forno foi programada: 30 °C (3 min), 5 °C/min 250 °C (3 min). A temperatura do injetor foi 220 °C. Modo de injeção manual por dessorção térmica da fibra por 3 min, *split* (1:5), gás de arraste hélio (99,999%) a

vazão constante de 1,0 mL/min, pressão: 45.8 kPa, velocidade linear: 35.9 cm seg⁻¹, vazão total: 9.0 mL/min. Condições MS: temperatura da fonte de íons e interface de 250 °C, modo de ionização por elétrons a 70 eV, faixa da massas de aquisição de m/z 35 - 450 Daltons. Foram efetuadas análises inter-dias e em triplicata para garantir a adsorção para a maior quantidade de analitos.

Os cromatogramas das análises por GC-MS foram integrados e os tR (tempo de retenção) tabulados. O cálculo do índice de retenção foi calculado utilizando série homóloga de *n*-alcanos C₈-C₄₀ (Sigma-Aldrich). O índice de retenção de um analito é um número, obtido pela interpolação, relacionando o tempo de retenção do analito de interesse com o tempo de retenção de dois padrões eluídos anterior e posterior ao pico do composto de interesse (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963). Para o cálculo do índice de retenção linear foi utilizada a equação de Van Den Dool e Kratz:

$$IR = 100.n + 100.\left(\frac{tR_x - tR_n}{tR_{n+1} - tR_n}\right)$$

onde:

n é número de carbonos do *n*-alcano anterior ao analito

tR_x é o tempo de retenção do analito de interesse

tR_n é o tempo de retenção do *n*-alcano eluído antes do analito

tR_{n+1} é o tempo de retenção do *n*-alcano eluído após o analito.

Os índices de retenção do GC-MS, foram comparados com o banco de dados NIST (National Institute of Standards and Technology)

A identificação dos constituintes analisados por cromatografia gasosa foi realizada por meio de análise e comparação dos espectros de massas com dados das bibliotecas NIST e WILEY 7 através do software GCMS solutions Ver. 4.41. Para tal comparação estabeleceu-se um limite de 80% de similaridade entre o espectro da amostra e o espectro da biblioteca. Para confirmação da identificação, também foi utilizada a comparação do índice de retenção calculado (usando séries

homólogas de hidrocarbonetos) com os valores de retenção da literatura (NIST). Utilizando um limite ± 10 unidade para comparação dos índices de retenção.

3.10. Perfil químico por CLAE-DAD

Os extratos brutos obtidos foram submetidos à análise em CLAE-DAD em gradiente exploratório. Antes das análises as amostras foram solubilizadas em MeOH:H₂O (95:05) e submetidas a um “clean up” utilizando cartuchos de sílica C-18 acoplado em membrana Millipore® (0,2 μ m) na concentração de 1,5 mg/mL. Após este procedimento, as amostras foram armazenadas em frascos para injeção. O sistema utilizado para análise em CLAE-DAD foi coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadesil silano (250 x 4,6 mm; 5 μ m C-18), com injeção de 20,0 μ L e eluição em gradiente exploratório H₂O:MeOH (95:05 v/v) à (0:100 v/v) por 50 min., permanecendo nesta condição por mais 10 min., vazão de 1,0 mL min⁻¹ e λ inicial de 200 nm até 400 nm. Todos os cromatogramas são mostrados no APÊNDICE 1-20.

3.11. Fracionamento do Extrato SA-F02 Czapek

O extrato SA-F02 Czapek (113,7 mg) foi submetido a separação cromatográfica no equipamento Shimadzu com detector por arranjo de diodos (Shimadzu SPD-M20A), com desgaseificador DGU-20A3 e injetor automático Shimadzu SIL-20^a, no modo preparativo em condição gradiente, com variação de 40% a 55% de MeOH/H₂O (com adição de 0,01% de Ácido Fórmico), durante 20 minutos, utilizando uma coluna Phenomenex Luna C18, 5 μ m de dimensões 250mm x 10,0mm, vazão de 3,5 mL/min.

3.12. Obtenção dos extratos brutos dos endófitos em escala ampliada

Os endófitos selecionados, SA-F02 e SA-R03 foram cultivados em 8L de Czapek e 24L de Extrato de Malte, respectivamente, do mesmo modo efetuado em escala reduzida (Figura 9, pag.43).

3.13. Fracionamento do Extrato SA-F02 Czapek obtido em escala ampliada, por CLAE_{prep}.

O extrato SA-F02 Czapek obtido em escala ampliada (710,6 mg) foi submetido a separação cromatográfica no equipamento Shimadzu com detector por arranjo de diodos (DAD) (Shimadzu SPD-M20A), com desgaseificador DGU-20A3 e injetor automático Shimadzu SIL-20A, no modo preparativo em condição gradiente, com variação de 40% a 55% de MeOH/H₂O (com adição de 0,01% de Ácido fórmico), durante 20 min, de 55% a 100% em 5 min, condição que permaneceu por mais 10 min para limpeza, voltando a condição inicial em 5 min e permanecendo assim por mais 5 min para condicionamento da coluna, utilizando uma coluna Phenomenex Luna C18, 5µm de dimensões 250 mm x 10,0 mm, vazão de 3,5 mL/min.

3.14. Fracionamento do Extrato SA-R03 Malte, obtido em escala ampliada, por Cromatografia Líquida de Baixa Eficiência.

O extrato SA-R03 Malte (2,62 g) foi submetido a separação cromatográfica coluna aberta com 3,5 cm de diâmetro, 20 cm de altura e 120 g de fase estacionária reversa do tipo octadesil silano (C18), da marca Sorbent Technologies, porosidade 60 Å, tamanho das partículas 40 - 75 µm (200-400 mesh); utilizando-se como fase móvel misturas dos solventes, H₂O, MeOH, ACN e AcOEt, originando 10 frações (SA-R03-Malte-30%, SA-R03-Malte-40%, SA-R03-Malte-45%, SA-R03-Malte-50%, SA-R03-Malte-55%, SA-R03-Malte-70%, SA-R03-Malte-85%, SA-R03-Malte-MeOH, SA-R03-Malte-ACN, SA-R03-Malte-AcOEt onde a % indica o quanto de MeOH havia em água naquela fração).

3.15. Fracionamento de SA-R03-Malte-40%.

O extrato SA-R03-Malte-40% (380,5 mg) foi submetido a separação cromatográfica no modo preparativo em condição isocrática de 18% de MeOH/H₂O (com adição de 0,01% de ácido fórmico), durante 30 min, seguido por um gradiente de limpeza e recondicionamento, utilizando uma coluna

Phenomenex Luna C18, 5 µm de dimensões 250 mm x 10,0 mm, vazão de 3,5 mL min⁻¹.

3.16. RMN de ¹H, ¹³C e bidimensionais

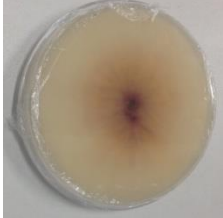
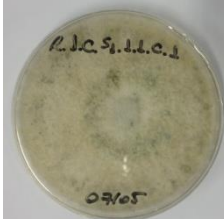
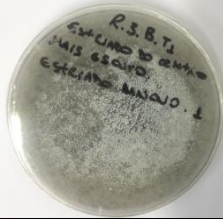
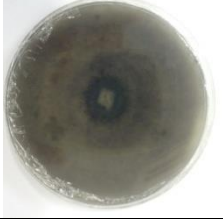
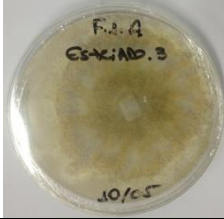
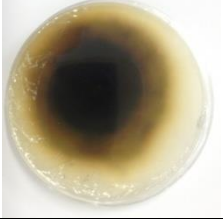
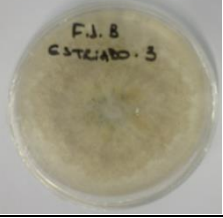
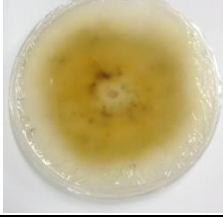
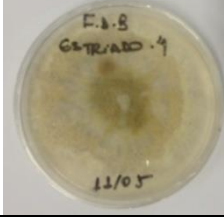
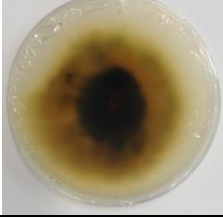
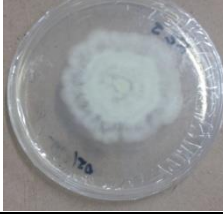
Os espectros de RMN de ¹H, ¹³C e bidimensionais das substâncias puras foram realizados em espectrômetros Varian INOVA-600 operando em 600 MHz para o núcleo de ¹H e em 150 MHz para o núcleo de ¹³C. Os extratos brutos foram obtidos em Bruker INOVA-300 operando em 300 MHz para o núcleo de ¹H. Os espectros dos extratos podem ser observados no Apêndice 21-40.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

S. alterniflora foi escolhida devido ao seu conhecido potencial de biodegradação, inspirando-nos a verificar se alguns dos microrganismos associados a ela poderiam ser os responsáveis por essa degradação.

Os três métodos de esterilização foram eficientes, pois em nenhum deles foi observado crescimento de microrganismos no controle negativo, o processo de isolamento levou à 10 linhagens puras (Tabela 3), codificadas como SA-R01, SA-R02, SA-R03, SA-R04, SA-R05, SA-F01, SA-F02, SA-F03, SA-F04 e SA-C01, (SA = *Spartina alterniflora*, R = raízes, C = caules, F = folhas) sendo posteriormente preservados em “*slants*” (método Castelani) e depositados na micoteca do Departamento de Bioquímica e Química Orgânica, IQ-UNESP. A avaliação da pureza das linhagens foi realizada pela aparência uniforme das placas de cultivo.

Tabela 3. Fungos isolados do caule, folhas e raízes de *Spartina alterniflora*

Fungos endofíticos isolados de <i>Spartina alterniflora</i>			
Frente	Verso	Frente	Verso
SA-R01		SA-R02	
			
SA-R03		SA-R04	
			
SA-R05		SA-F01	
			
SA-F02		SA-F03	
			
SA-F04		SA-C01	
			

Fonte: Elaborada pelo autor (2016).

4.1. Extratos Brutos

Ao final do cultivo em escala reduzida o caldo fermentado foi separado do micélio por filtração a pressão reduzida e submetido à partição líquido/líquido com AcOEt. A fração aquosa foi descartada e a orgânica foi evaporada fornecendo os extratos brutos (Tabela 4).

Tabela 4. Massa dos extratos brutos obtida do cultivo dos endófitos em Malte e Czapek.

Fungos endofíticos	Massas dos extratos (mg)	
	Malte	Czapek
SA-R01	33,2	13,9
SA-R02	92,0	22,4
SA-R03	35,2	17,6
SA-R04	138,4	33,9
SA-R05	24,0	13,6
SA-F01	92,2	34,0
SA-F02	118,7	113,7
SA-F03	134,9	24,9
SA-F04	31,1	40,2*
SA-C01	37,7	6,9

*Houve contaminação em um dos três meios de cultivo que foi descartado.

Fonte. Elaborado pelo autor (2017).

4.2. Perfil cromatográfico dos extratos brutos obtidos em meios de Malte e Czapek

Os cromatogramas dos extratos brutos obtidos em Malte e Czapek (ÂPENDICE 1-20, pag. 107-116), utilizando gradiente exploratório (CLAE-DAD) apresentaram além de picos com diferentes absorbâncias, vários picos com polaridades variando de média a alta, e boa resolução cromatográfica. Comparando os cromatogramas dos extratos brutos com os brancos, é possível

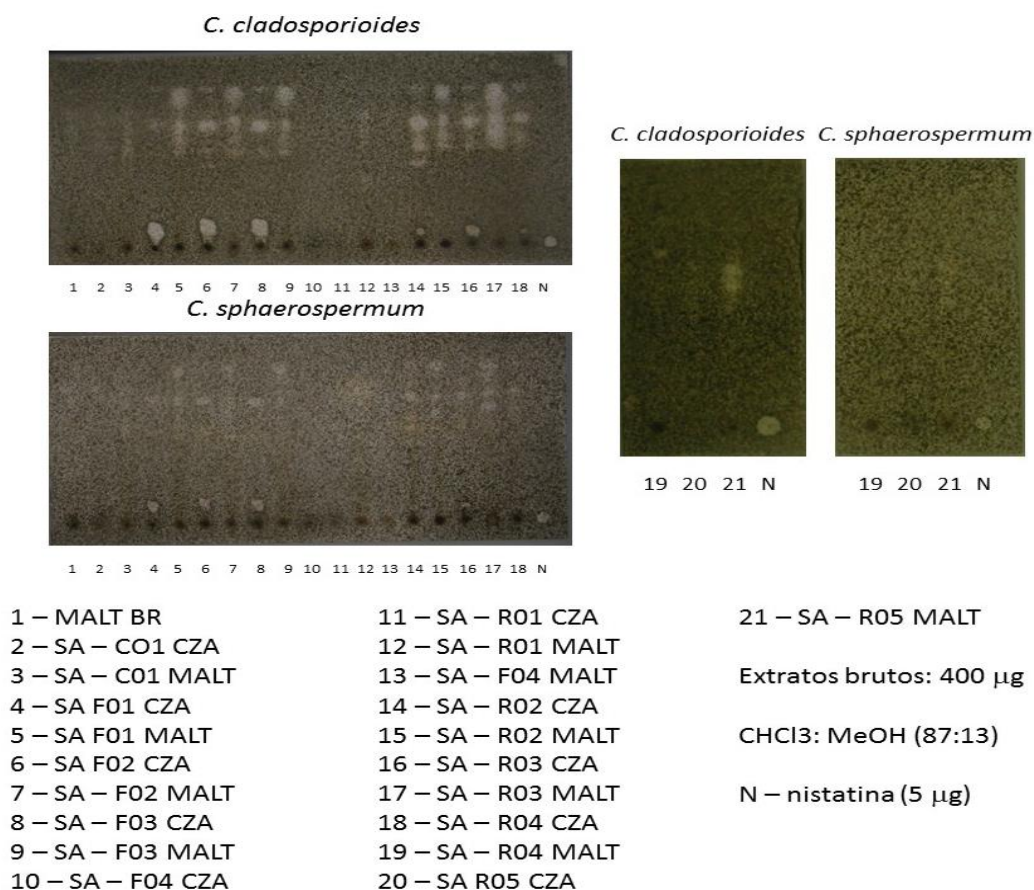
observar diversificada produção de metabólitos secundários aromáticos ($\lambda = 254$ nm) (exceção feita ao extrato bruto produzido por SA-F04 em Czapek que quase não apresentou substâncias neste comprimento de onda). Comparando-se os extratos cultivados em Malte e Czapek, os extratos em Malte evidenciaram maior variedade metabólica o que pode ser justificado por Malte ser um meio de cultivo mais rico em nutrientes.

4.3. Avaliação antifúngica

Este é um ensaio qualitativo que se baseia na inibição do crescimento do microrganismo, quanto maior o halo maior é a inibição do microrganismo pelo metabolito específico. Como podemos observar na Figura 11, os extratos que não apresentaram inibição contra os fungos patogênicos *C. cladosporioides*, foram os extratos 1, 2, 10, 11, 13 e 20. Os extratos que apresentaram substâncias com forte atividade foram 4, 5, 6, 8, 9, 14, 15, 16, 17, 18 e 21. Os demais extratos apresentaram inibição dos patógenos variando de baixa a media intensidade.

Ainda na Figura 11, os extratos 1, 2, 3, 10, 11, 12, 13, 19 e 20 não apresentaram inibição contra os fungos patogênicos *C. sphaerospermum*. Os extratos que apresentaram forte atividade foram 4, 6, 8 e 17, os demais extratos apresentaram inibição do patógenos variando de baixa a media intensidade. Estes resultados sugerem que estes microrganismos estejam desempenhando um papel ecológico, na proteção da planta hospedeira contra possíveis fitopatógenos.

Figura 11. Ensaio antifúngico



Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

4.4. Avaliação anticolinesterásica

Quando comparamos os resultados obtidos para a tacrina (Tabela 5) que é uma substância pura (controle positivo) e os resultados evidenciados na inibição da enzima acetilcolinesterase para os extratos brutos produzidos pelos fungos endofíticos associados a *S. alterniflora*, identificamos principalmente SA-R03 como endófito com potencial na produção de substâncias potencialmente inibidoras da enzima acetil colinesterase.

Devemos, também, estar atentos as análises de RMN de ¹H e CLAE-DAD que evidenciam a mistura complexa destes extratos. Esta observação aponta os fungos endofíticos como fontes promissoras na busca de substâncias com potencial de inibir a enzima acetil colinesterase.

Tabela 5. Resultados dos ensaios para avaliação da atividade anticolinesterásica.

Código das Amostras	Identificação Amostras	% inibição ICER-AChE ee	% inibição ICER-AChE hu
Tacrina*	Tacrina*	95,0	89,7
1	Malte Br	13,159	4,57
2	SA-C01 Czapek	25,75	8,55
3	SA-C01 Malte	19,95	14,87
4	SA-F01 Czapek	24,35	16,27
5	SA-F01 Malte	24,55	27,45
6	SA-F02 Czapek	30,30	34,85
7	SA-F02 Malte	41,62	40,10
8	SA-F03 Czapek	15,61	29,07
9	SA-F03 Malte	32,80	42,49
10	SA-F04 Czapek	19,81	3,452
11	SA-F04 Malte	15,50	18,29
12	SA-R01 Czapek	15,40	10,51
13	SA-R01 Malte	19,53	50,59
14	SA-R02 Czapek	44,60	59,11
15	SA-R02 Malte	50,42	59,13
16	SA-R03 Czapek	45,31	58,95
17	SA-R03 Malte	74,59	67,46
18	SA-R04 Czapek	56,39	64,36
19	SA-R04 Malte	60,53	55,35
20	SA-R05 Czapek	57,08	56,69
21	SA-R05 Malte	43,72	63,22

* inibidor padrão acetilcolinesterase.

Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

4.5. Avaliação citotóxica

O método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN *et al.*, 1990). É um método rápido, sensível, barato e descrita inicialmente por MOSMANN, (1983), com capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996).

Um extrato quando atinge, para duas linhagens diferentes entre 0-50% é considerado com pouca atividade, entre 50-75% atividade moderada e promissor quando superior a 75% (ALMEIDA et al., 2014). Este índice não foi alcançado por nenhum dos extratos (Tabela 6), indicando que nenhum deles apresentou potencial citotóxico frente às linhagens tumorais testadas.

Tabela 6. Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras na concentração de 50 µg/mL. Valores são a média ± DPM (Desvio Padrão da Média)

Amostra		HCT-116		PC3		SF-295	
Nº	Identificação	IC% (média)	DPM	IC% (média)	DPM	IC% (média)	DPM
1	MALTE BRANCO	1,88%	6,39%	36,12%	16,35%	8,41%	3,63%
2	SA-C01 CZAPEK	18,16%	9,40%	21,82%	0,84%	5,96%	6,83%
3	SA-C01 MALTE	16,96%	2,13%	21,64%	6,66%	4,92%	0,78%
4	SA-F01 CZAPEK	20,35%	0,32%	26,77%	4,47%	11,22%	1,90%
5	SA-F01 MALTE	9,87%	8,95%	24,39%	2,28%	13,97%	1,73%
6	SA-F02 CZAPEK	21,18%	0,21%	30,34%	6,15%	6,63%	0,95%
7	SA-F02 MALTE	25,40%	2,34%	28,56%	6,15%	2,35%	7,96%
8	SA-F03 CZAPEK	22,08%	8,10%	41,13%	10,28%	9,32%	0,43%
9	SA-F03 MALTE	68,20%	8,74%	46,13%	7,08%	44,48%	4,32%
10	SA-F04 MALTE	31,27%	2,98%	12,47%	6,49%	5,17%	10,03%
11	SA-R01 CZAPEK	9,12%	4,05%	33,86%	2,19%	10,30%	15,82%
12	SA-R01 MALTE	11,08%	5,97%	44,17%	8,17%	15,13%	0,86%
13	SA-R02 CZAPEK	27,96%	7,25%	19,38%	8,17%	4,37%	1,30%
14	SA-R02 MALTE	1,06%	9,54%	39,16%	10,53%	22,47%	43,06%
15	SA-R03 CZAPEK	18,54%	0,53%	18,55%	4,13%	5,23%	22,57%
16	SA-R03 MALTE	16,35%	1,92%	76,23%	9,52%	6,33%	1,82%
17	SA-R04 CZAPEK	20,57%	6,82%	14,85%	21,49%	0,15%	8,91%
18	SA-R04 MALTE	31,65%	11,40%	24,21%	2,53%	5,96%	4,76%
19	SA-R05 CZAPEK	1,28%	10,87%	20,57%	9,86%	1,01%	3,98%
20	SA-R05 MALTE	17,86%	16,84%	20,27%	10,62%	2,48%	15,31%

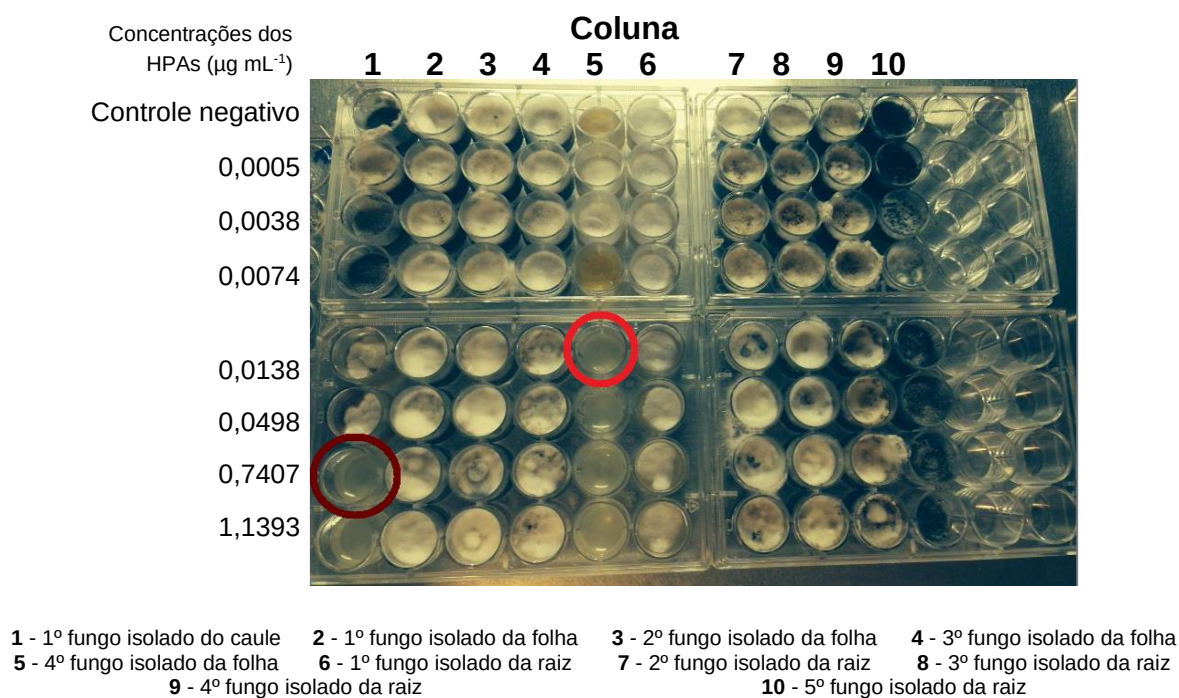
Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

4.6. Avaliação da toxicidade dos HPAs

Podemos observar na Figura 12 que, quase todos os microrganismos toleraram a presença dos 16 HPAs prioritários até nas concentrações mais elevadas. No entanto, observamos que para os fungos endofíticos **SA-C01** (coluna 1) na concentração de 0,7407 $\mu\text{g/mL}$ (círculo marrom) e para **SA-F04** (coluna 5) a concentração de 0,0138 $\mu\text{g/mL}$ (círculo vermelho) houve inibição do crescimento.

Estes dados são preliminares e indicam que nestas concentrações os HPAs poderão ser utilizadas para os testes de degradação.

Figura 12. Limite de inibição do crescimento dos microrganismos por HPA's.



Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

4.7. Avaliação da recuperação do método de extração

Os resultados de recuperação estão sumarizados a seguir, na Tabela 7, onde os valores que não atendem as especificações da ANVISA de intervalo de recuperação de 70 - 120% e CV abaixo de 20% estão destacados em vermelho. O CV foi calculado com o desvio padrão dividido pela media aritmética e o resultado multiplicado por 100.

Tabela 7. Valores de recuperação (%) e coeficientes de variação (%) do método aplicado.

	n-HEXANO*		DICLOROMETANO		ACETONA		n-HEXANO DICLOROMETANO (1:1)		n-HEXANO ACETONA (1:1)		TERNARIO (1:1:1)	
	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV
Naftaleno	NQ	-	NQ	-	NQ	-	NQ	-	NQ	-	NQ	-
Acenaftileno	NQ	-	NQ	-	NQ	-	NQ	-	NQ	-	NQ	-
Acenafteno	NQ	-	NQ	-	NQ	-	NQ	-	NQ	-	NQ	-
Fluoreno	NQ	-	NQ	-	NQ	-	NQ	-	NQ	-	NQ	-
Fenantreno	NQ	-	NQ	-	7	79	NQ	-	NQ	-	NQ	-
Antraceno	NQ	-	NQ	-	NQ	-	NQ	-	NQ	-	NQ	-
Fluoranteno	NQ	-	7	153	28	54	7	12	26	97	13	62
Pireno	NQ	-	9	123	30	53	7	7	31	78	15	58
Criseno	NQ	-	19	163	50	49	9	65	91	91	27	62
Benzo(a)Antraceno	10	22	19	158	52	37	18	7	82	84	22	35
Benzo(b)fluoranteno	14	90	17	159	45	41	11	9	89	80	23	47
Benzo(k)fluoranteno	8	98	13	152	34	39	NQ	-	58	75	12	54
Benzo(a)pireno	6	87	10	165	28	41	6	65	53	80	16	46
Indeno	NQ	-	7	162	19	36	6	12	38	74	9	35
Dibenzo	16	40	13	150	34	39	7	12	65	79	11	34
Benzo(ghi)perileno	15	30	13	121	30	44	7	66	54	77	13	27

REC: Recuperação

CV: Coeficiente de variação

NQ: Não Quantificável

* Método de extração validado para *Spartina alterniflora* (SUGAUARA, 2022)

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

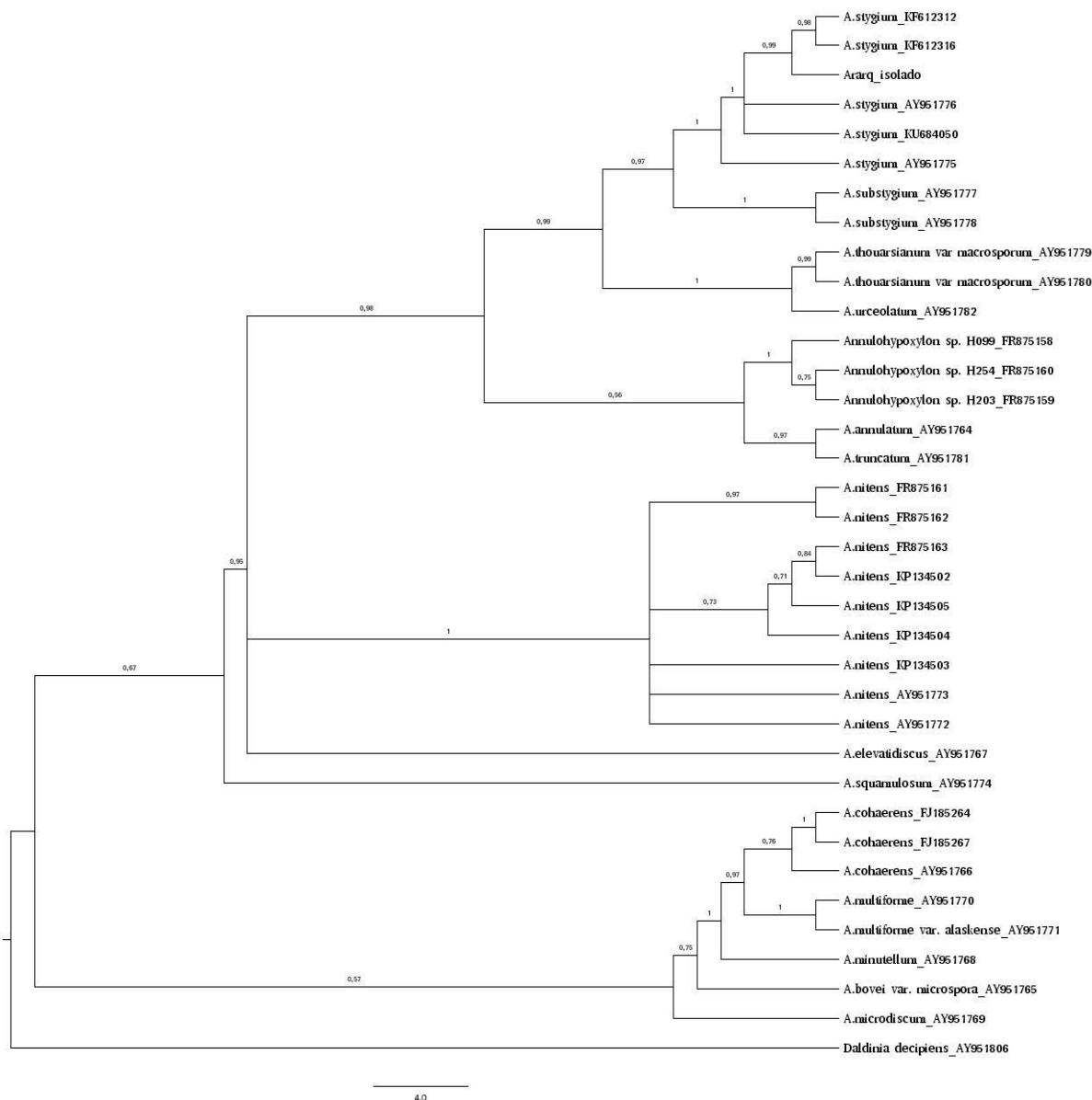
Segundo a ANVISA a validação analítica deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2022). A recuperação é o parâmetro que indica a veracidade do experimento em estudo, ou seja, o quanto o valor de concentração encontrado ao final do experimento de extração se aproxima da concentração que foi adicionada no processo de fortificação. De acordo com os resultados obtidos nos experimentos de extração de HPAs, em amostras de BDA, este método não é adequado para a extração de HPAs desta matriz. Mesmo variando os solventes de extração o método não foi capaz de recuperar quantidade aceitável dos compostos em estudo, pois os valores de coeficiente de variação obtidas foram muito além dos 20% aceitáveis e as recuperações ficaram fora dos 70-140%.

A não adequação deste método de extração talvez tenha se dado pela volatilização dos HPAs durante a liofilização. No caso das interações dos HPAs com a planta são muito mais intensas devido ao caráter apolar de sua cera e membranas, o que não ocorrer com nosso meio de cultivo, o qual tem características opostas. Possivelmente um método utilizando partição líquido/líquido seja mais eficiente.

4.8. Análise filogenética

SA-F02 e SA-R03 foram enviados para identificação e mostraram tratar-se do mesmo microrganismo, sendo que a análise filogenética (Figura 13) os identificou como *Annulohypoxylon stygium*.

Figura 13. A árvore filogenética de consenso de regra de maioria de 50% da análise bayesiana de sequências de α -actina *Annulohypoxylon* spp.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

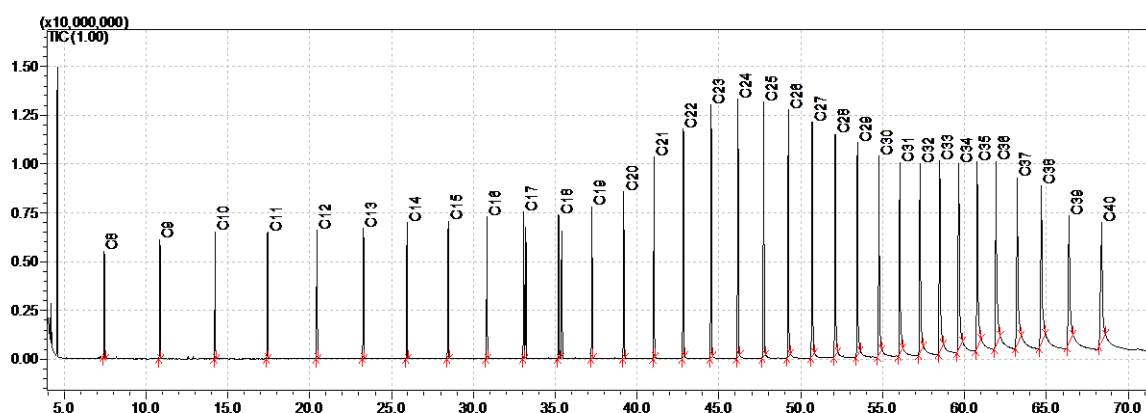
O número acima dos ramos indica valores de probabilidade posteriores. As árvores são desenhadas em escala, com comprimentos de ramificação medidos no número de substituições por local. Visualização da árvore (FIGTREE_V1.4.3, 2018).

4.9. Avaliação dos compostos orgânicos voláteis (COVs) de *Annulohypoxylon stygium*

4.9.1. Identificação dos compostos adsorvidos pela fibra (HS-SPME)

Para a identificação dos compostos inicialmente foi calculado o índice de retenção de cada constituinte usando a equação de VAN DEN DOOL; KRATZ, (1963), tendo como referência uma série homóloga de alcanos (C_8 - C_{40}) (Figura 14).

Figura 14. Cromatograma da série homóloga de alcanos C_8 - C_{40} .



Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

O índice de retenção é o número obtido pela interpolação do tempo de retenção do componente de interesse com os tempos de retenção de dois padrões da série homóloga de alcanos eluídos imediatamente anterior e posterior ao componente de interesse, como exemplificado na Figura 15.

The chromatogram displays two traces over a time range from 13.75 to 17.75 minutes. The y-axis represents intensity, scaled by 1,000,000, ranging from 0.0 to 7.0. The black trace shows two prominent peaks: one at approximately 14.25 minutes labeled tR_n and another at approximately 17.45 minutes labeled tR_{n+1} . The purple trace shows a series of peaks, with the most significant one at approximately 15.35 minutes labeled t_x . Other smaller peaks are visible in the purple trace at approximately 14.00, 14.25, 14.75, 15.00, 15.25, 15.75, 16.00, 16.25, 16.75, and 17.00 minutes.

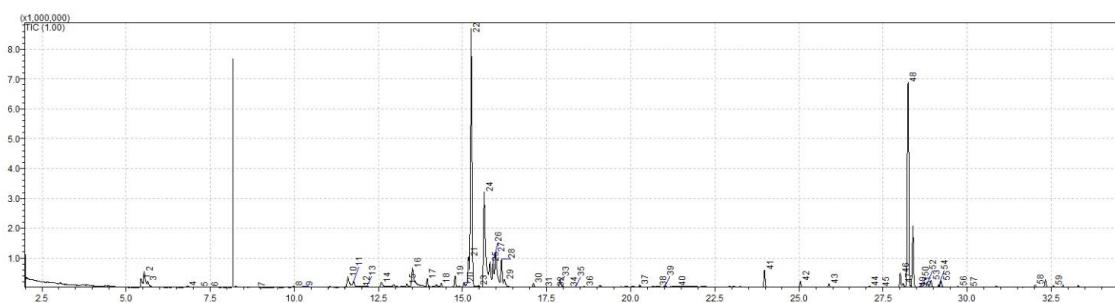
Calculado o IR (IRcal = 1032), a identificação do Eucaliptol foi feita pela similaridade do espectro de massas por ionização por elétrons (94%) comparado a biblioteca de espectros (NIST, 2017; WILEY 7, 2018) (Figura 16), associado ao índice de retenção da literatura, IR= 1034 (NIST).

[illegible]

63

Seguindo esta mesma metodologia foi possível identificar 26 substâncias no cromatograma (Figura 17) com 6 dias de cultivo (Tabela 8), e 46 substâncias no cromatograma (Figura 18) com 5 dias de cultivo (Tabela 9).

Figura 17. Cromatograma dos COVs de *A. stygium* com 6 dias de cultivo.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

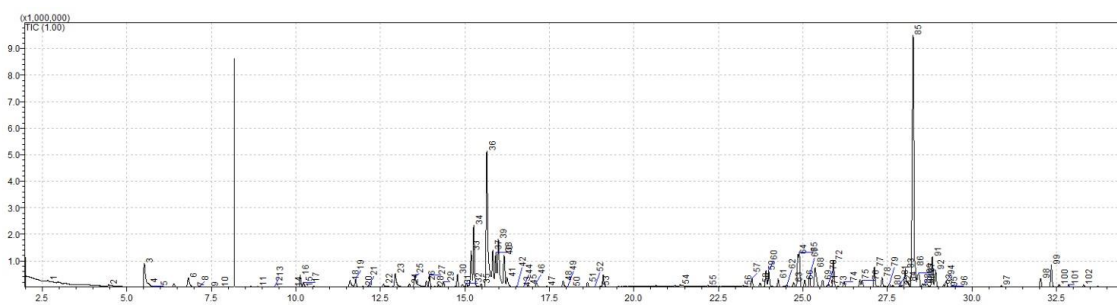
Tabela 8. COVs de *A. stygium* identificados com 6 dias de cultivo.

Pico	IR Experimental	IR Literatura	Similaridade (%)	Composto
2	-	738	93	3-Metil-1-butanol
3	-	736	97	2-Metil-1-butanol
7	841	843	88	Terc-butil etil cetona
8	874	873	94	4-Heptanona
11	926	926	95	α -Tujeno
15	973	976	95	Sabineno
17	991	993	95	Mirceno
18	1.004	1007	92	α -Felandreno
19	1.017	1016	95	α -Terpineno
20	1.025	1024	94	Cimeno
21	1.030	1032	92	Silvestreno
22	1.032	1034	92	Eucaliptol
23	1.039	1036	91	Z-Ocimeno
28	1.060	1059	95	γ -Terpineno
30	1.089	1089	94	Terpinoleno
37	1.194	1193	94	α -Terpineol
43	1.397	1397	94	β -Elemeno
44	1.446	1447	91	α -Guaieno

Continuação Tabela 8				
46	1.482	1481	88	1-Isopropil-4,7-dimetil-1,2,3,4,5,6-hexahidronaftaleno
47	1.485	1391	88	τ -Elemeno
48	1.491	1486	88	β -Chamigreno
49	1.502	1504	83	γ -Cadineno
52	1.515	1512	95	α -Bulneseno
53	1.519	1512	87	cis- Cariofileno
55	1.532	1531	82	cis-Calameneno
59	1.677	1680	85	Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1 α -ol

Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Figura 18. Cromatograma dos COVS de *A. stygium* com 5 dias de cultivo.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Tabela 9. COVs de *A. stygium* identificados com 5 dias de cultivo.

Pico	IR Experimental	IR Literatura	% Similaridade	Composto
1	-	599	96	Ácido acético
3	-	738	97	3-Metil-1-butanol
4	-	736	96	2-Metil-1-butanol
10	804	803	84	Etil butanoato
13	856	859	85	Etil 3-metilbutanoato
15	874	874	89	4-Heptanona
16	878	876	98	Acetato de isoamila
17	881	880	89	2-Metilbutil acetato
19	927	926	95	α -Thujeno
20	933	935	91	α -pineno

Continuação Tabela 9				
23	961	961	97	Benzaldeido
24	974	976	95	Sabineno
26	989	995	98	2,2,4,6,6-Pentametilheptana
27	991	993	94	Mirceno
29	1.004	1006	92	α - Felandreno
31	1.021	1024	91	p- Metilanol
32	1.025	1023	95	Cimeno
34	1.032	1034	94	Eucaliptol
35	1.039	1036	94	Z-Ocimeno
40	1.060	1059	94	γ -Terpineno
42	1.072	1070	89	1-Octanol
53	1.152	1159	94	Acetato de 2-etilhexila
55	1.260	1256	88	Acetato de 2-feniletila
62	1.346	1348	85	7-epi-Silfiperfol-5-eno
65	1.360	1364	85	Ciclosativeno
71	1.393	1393	88	α -Isocomeno
72	1.398	1398	93	β -Elemeno
73	1.403	1404	87	Isocariofileno
74	1.410	1409	85	Longifoleno
75	1.429	1423	94	β - Cariofileno
76	1.432	1438	90	β -Humuleno
77	1.446	1440	94	α -Guaieno
78	1.455	1452	92	β -Barbateno
79	1.463	1459	93	α -Humuleno
82	1.479	1477	89	Alo-Aromadendreno
84	1.485	1489	86	Valenceno
85	1.492	1495	87	β -Chamigreno
88	1.503	1504	90	γ -Cadineno
89	1.505	1496	86	α -Selineno
91	1.515	1512	95	α -Bulneseno
93	1.529	1537	80	Selina-3,7(11)-dieno
94	1.532	1530	84	δ -Cadineno
96	1.538	1535	92	(E)- γ -Bisaboleno
97	1601	1605	93	Dietil Ftalato
99	1.667	1655	93	Pogostol
100	1677	1674	81	Eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

A maioria das substâncias voláteis produzidas por *A. stygium* são encontradas em composição de óleos essenciais, que são utilizados, desde a idade média, como fungicidas, bactericidas, virucidas, antiparasitário, inseticida, com aplicações cosméticas e na medicina, são utilizados, principalmente, em aplicações farmacêuticas, sanitárias, cosméticas, agricultura e alimentícia (BAKKALI *et al.*, 2008).

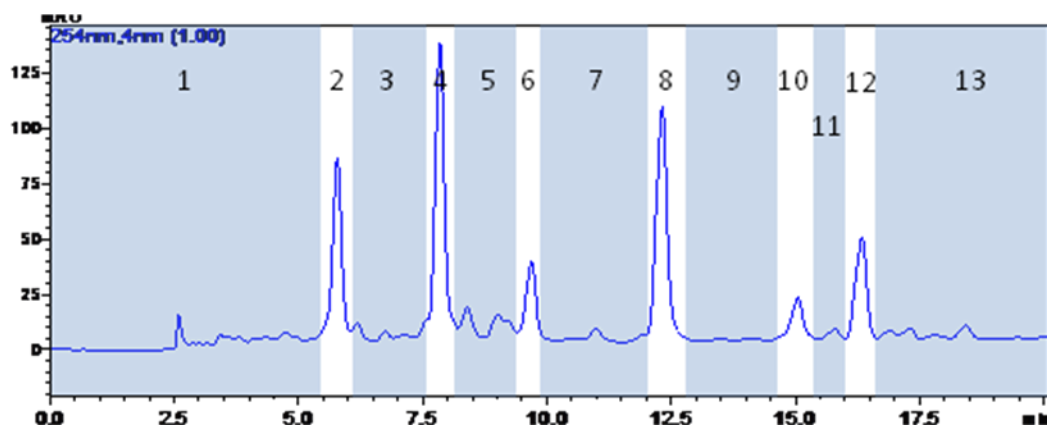
Óleos essenciais de *Myrtus communis* e *Lavandula stoechas* que apresentam entre seus componentes majoritários altos níveis de Eucalyptol, α -pinene e α -thujene, substâncias estas presentes em *A. stygium*, apresentaram atividade fototóxica contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella thyphimurium*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* (ELIUZ; AYAS; GOKSEN, 2017) indicando um possível papel ecológico entre a planta e seus microrganismos hospedeiros.

Dentre os compostos identificados 16 podem ser observados durante ambos os dias, 3-Metil-1-butanol, 2-Metil-1-butanol, 4-Heptanona, α -Thujeno, Sabineno, Mirceno, α -Felandreno, Cimenol, Eucalyptol, Z-Ocimenol, γ -Terpineno, β -Elemeno, α -Guaíeno, β -Chamigreno, γ -Cadineno e α -Bulneseno se a produção destes compostos ocorrerem durante maior períodos poderão ser considerados em estudos futuros de potenciais marcadores quimiotaxonômicos de *A. stygium*.

4.10. Fracionamento do extrato SA-F02-Czapek

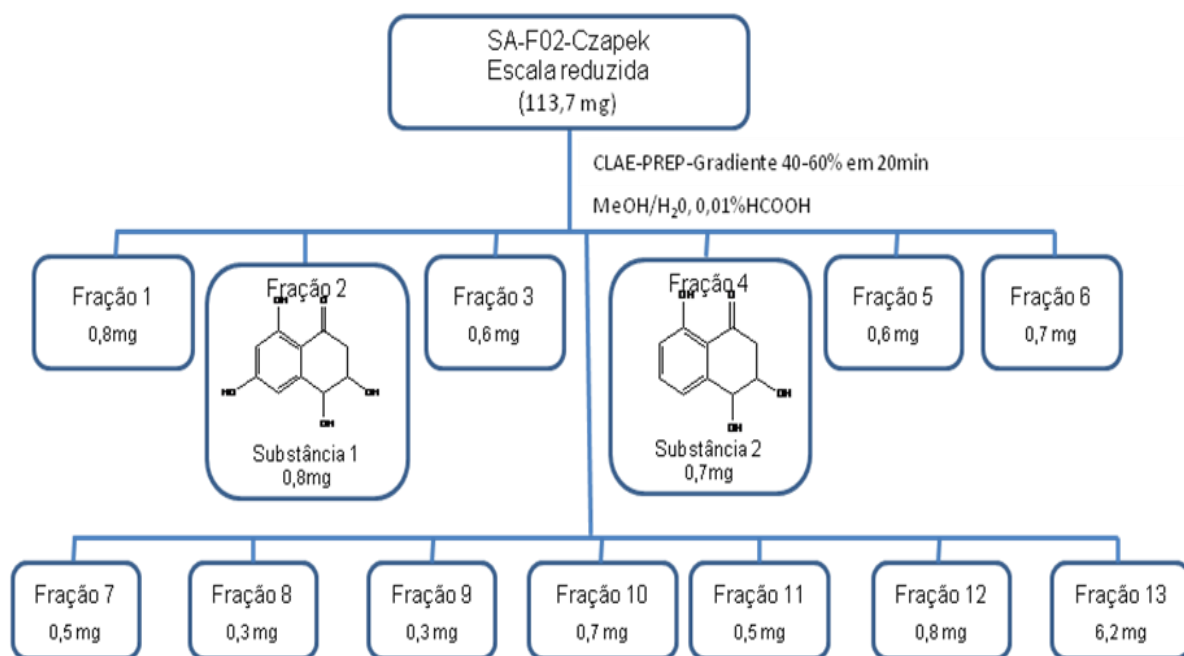
A otimização das condições cromatográficas para o fracionamento do extrato bruto SA-F02 Czapek por CLAE_{anal.}, evidenciou boa separação nas condições testadas, indicando que o extrato bruto poderia ser submetido diretamente a purificação. Os intervalos representados na Figura 19 foram selecionados e conduziu ao isolamento das substâncias **01** e **02** representadas na Figura 20.

Figura 19. Cromatograma CLAE-DAD do fracionamento de SA-F02-Czapek.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Figura 20. Fluxograma do fracionamento de SA-F02-Czapek obtido em escala reduzida

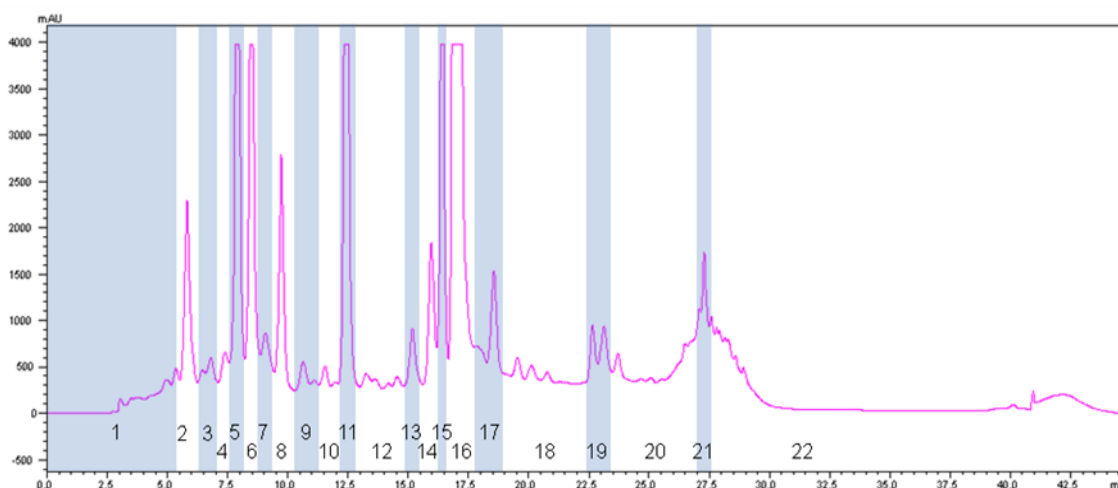


Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

4.11. Fracionamento do extrato SA-F02 Czapek obtido em Escala ampliada

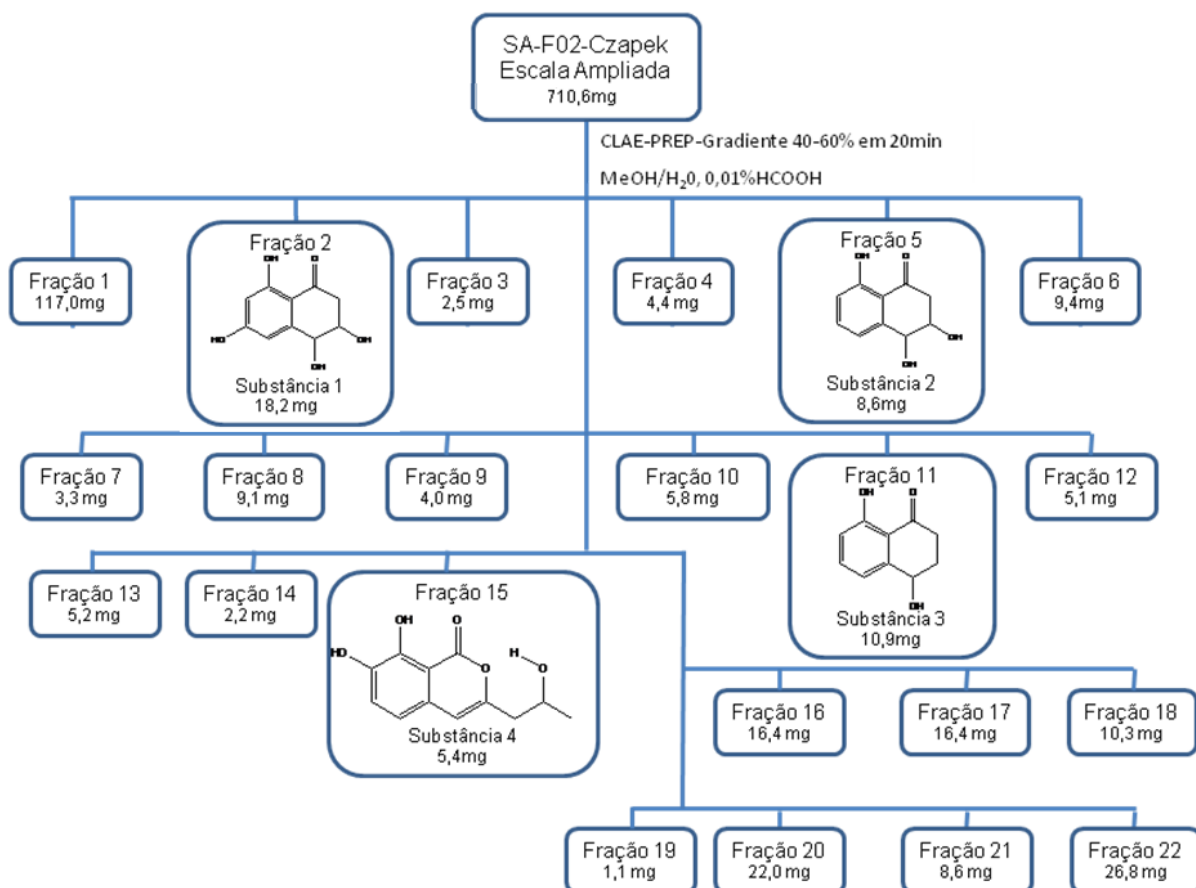
A otimização das condições cromatográficas para o fracionamento do extrato bruto SA-F02 Czapek em escala ampliada por CLAE_{anal.}, evidenciou boa separação nas condições testadas, indicando que o extrato bruto poderia ser submetido diretamente a purificação. Os intervalos representados na Figura 21 foram selecionados e conduziu ao isolamento das substâncias **01**, **02**, **03** e **04** representadas na Figura 22.

Figura 21. Cromatograma do fracionamento de SA-F02-Czapek em escala ampliada



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Figura 22. Fluxograma do fracionamento de SA-F02-Czapek obtido em escala ampliada

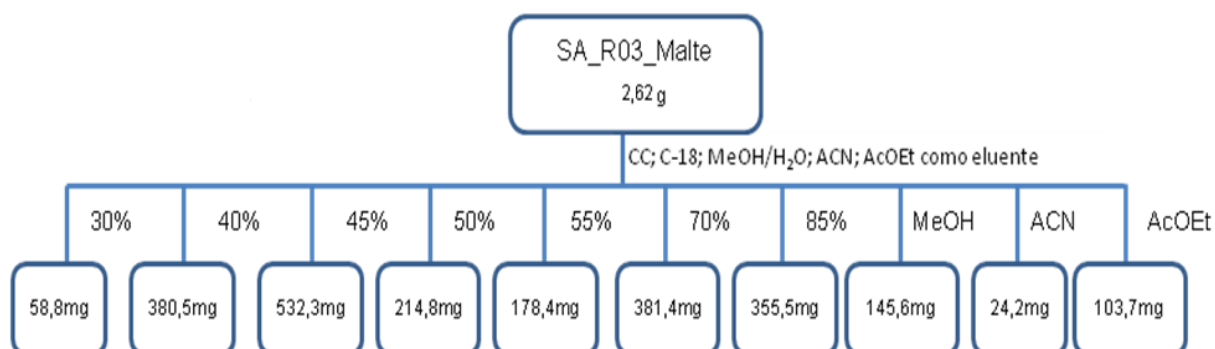


Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

4.12. Fracionamento do extrato SA-R03 Malte obtido em Escala ampliada

O fracionamento de SA-R03 Malte Escala Ampliada resultou em 10 frações como pode ser observado na Figura 23.

Figura 23. Frações de SA-R03-Malte-Escala ampliada

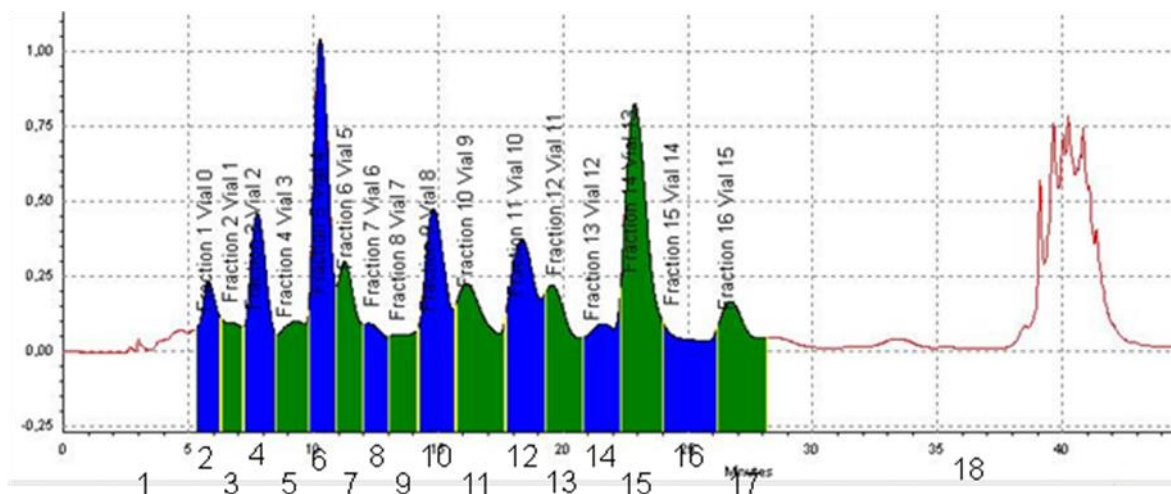


Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

4.13. Fracionamento do extrato SA-R03-Malte-40%

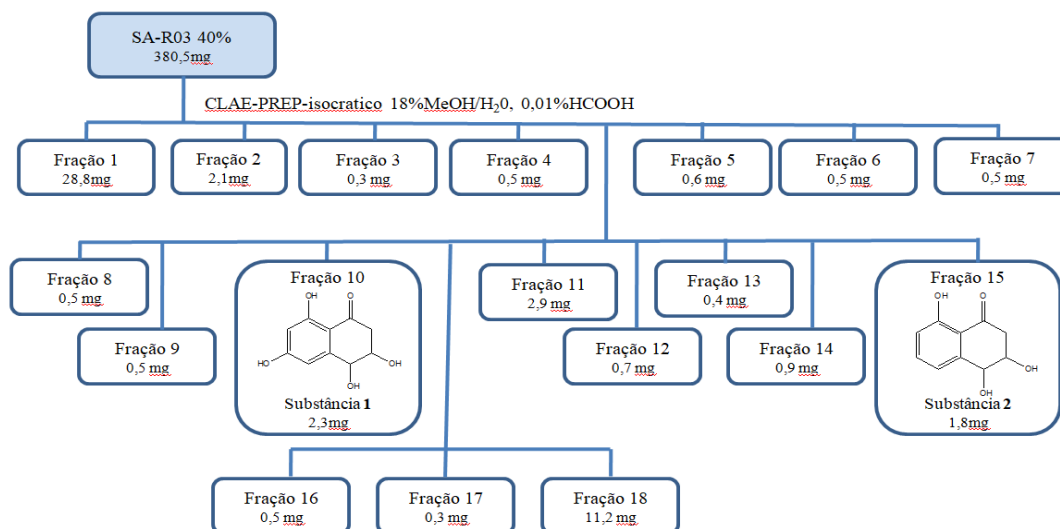
Após a otimização das condições cromatográficas e fracionamento de SA-R03-Malte-40% (380,5 mg) por CLAE conduziu a condições com boa separação, levando-nos a seleção dos intervalos representados na Figura 24, possibilitando o isolamento das substâncias 01 e 02 representadas na Figura 25.

Figura 24. Cromatograma do fracionamento de SA-R03-Malte-40%



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

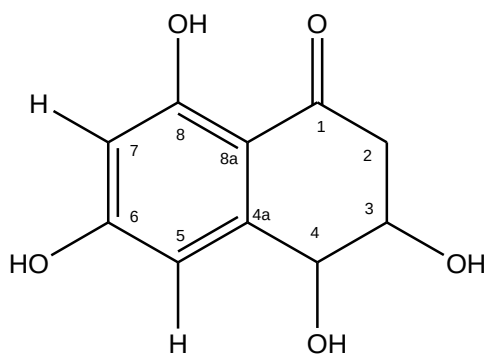
Figura 25. Frações de SA-R03-Malte-40%.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

4.14. Identificação estrutural da substância 01

Figura 26. Estrutura da substância 01

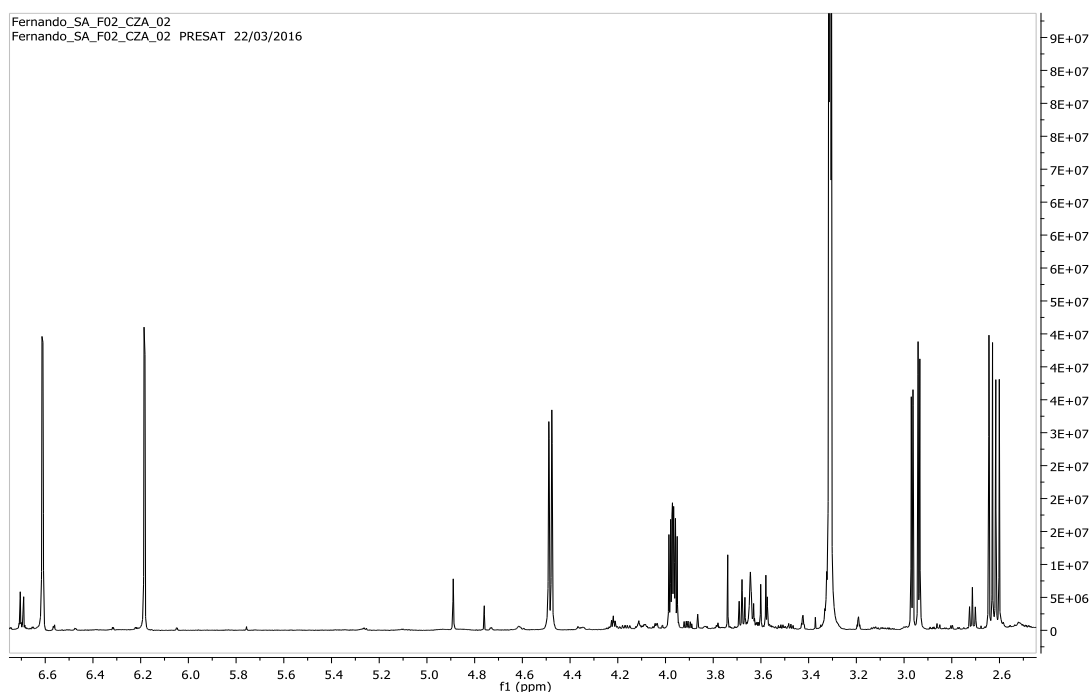


A substância 01 (Figura 26) foi isolada a partir do fracionamento cromatográfico do extrato bruto codificado em SA-F02-Czapek-Fração02 e obtido do cultivo em pequena escala, por CLAE_{prep.}. O espectro de RMN de ¹H

evidenciou tratar-se de uma substância com pureza suficiente para a determinação estrutural sem necessidade de purificação.

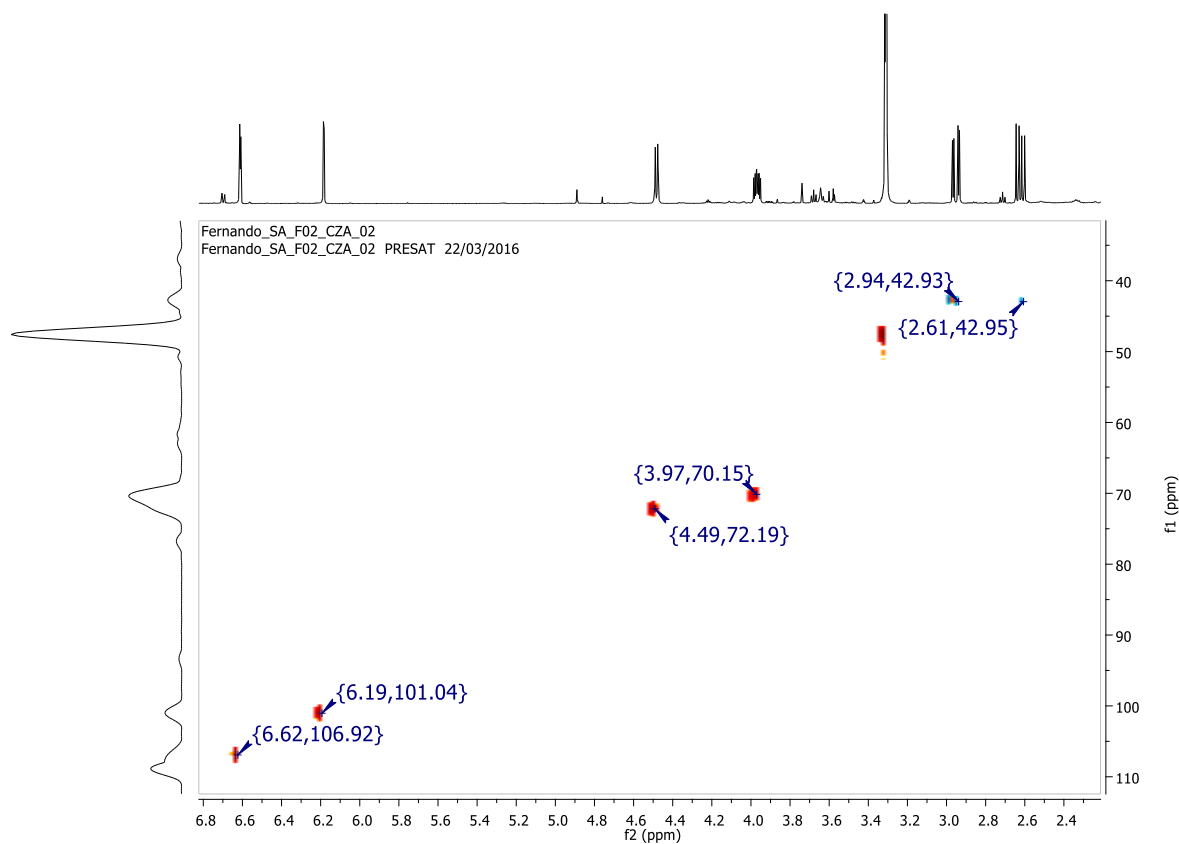
No espectro de RMN de ^1H (Figura 27) foram observados dois dubletos em δ_{H} 6,18 (1H, *d*, $J=2,4\text{Hz}$) e δ_{H} 6,61 (1H, *d*, $J=2,4\text{Hz}$), evidenciando um anel aromático tetrasubstituído com acoplamento *meta*. Também foram observados sinais em δ_{H} 2,63 (1H, *dd*, 17,1 e 8,7Hz) e δ_{H} 2,97 (1H, *dd*, 17,1 e 4,2 Hz) atribuídos ao mesmo carbono por HMQC (Figura 28) evidenciando dois hidrogênios quimicamente não equivalentes. Adicionalmente foram observados dois hidrogênios carbinólicos em δ_{H} 3,98 (1H, *ddd*, 4,2, 7,5 e 8,7Hz) e em δ_{H} 4,49 (1H, *d*, 7,5Hz) se acoplando evidenciando um *diol* vicinal.

Figura 27. Espectro de RMN de ^1H da substância **01** (CD₃OD, 600 MHz).



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

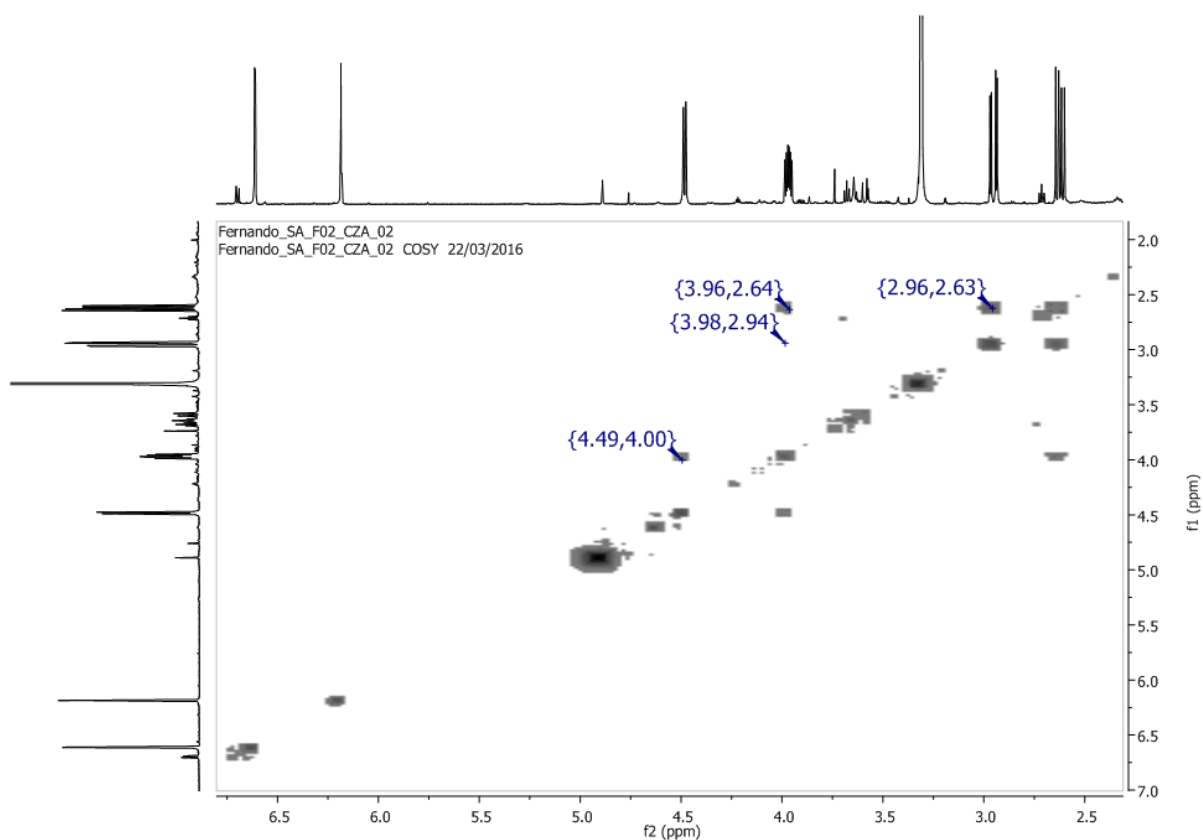
Figura 28. Mapa de contorno de HMQC da substância **01** (CD₃OD, 600 e 125MHz).



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

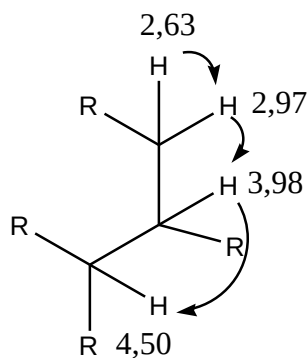
No experimento de COSY (Figura 29) pode-se visualizar a correlação entre os hidrogênios H-2a↔H-2b↔H-3 e H3↔H-4 que nos levou a estrutura parcial que pode ser observado na Figura 30.

Figura 29. Mapa de contorno de COSY da substância **01** (CD₃OD, 600 MHz).



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

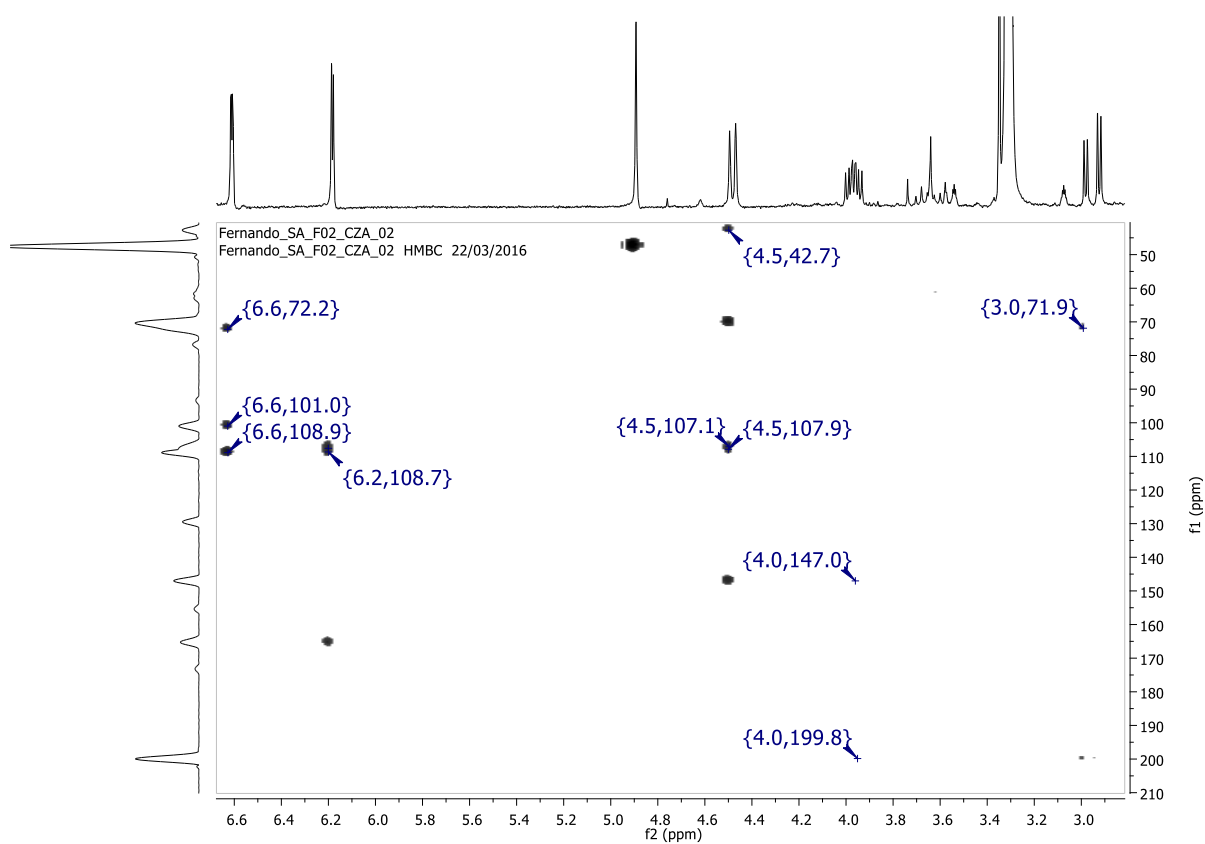
Figura 30. Estrutura parcial da substância **01** e correlações observadas em COSY.



Estes dados associados às correlações observadas no experimento de HMBC (Figura 31) permitiram identificar a substância como 3,4-Dihidro-3,4,6,8-

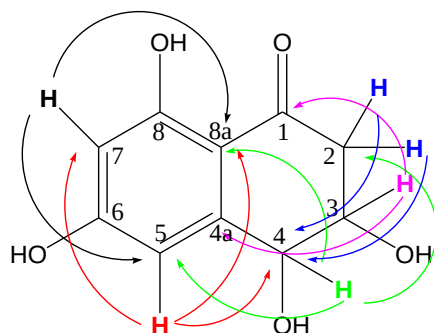
tetrahidroxi-1(2H)-naftalenona (Figura 32), que teve como seu primeiro relato IWASAKI *et al.*, (1973), isolado de *Pyricularia oryzae*. Testes realizados por Evidente *et al.*, 2016 indicaram LC_{50} de $90.6\mu\text{g mL}^{-1}$ para *Artemia salina* L. um crustáceo utilizado em estudos para toxicologia e ecotoxicologia onde doses inferiores a $1000\mu\text{g/mL}$ são consideradas tóxicas.

Figura 31. Mapa de contorno de HMBC da substância **01** (CD_3OD , 600 e 125MHz)



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Figura 32. Representação esquemática das correlações observados no HMBC



Os dados de RMN de ^1H , ^{13}C e correlações de COSY, gHMBC e HMQC estão sumarizados na Tabela 10.

Tabela 10. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 600 e 125 MHz) de **01** (δ em ppm e J em Hz).

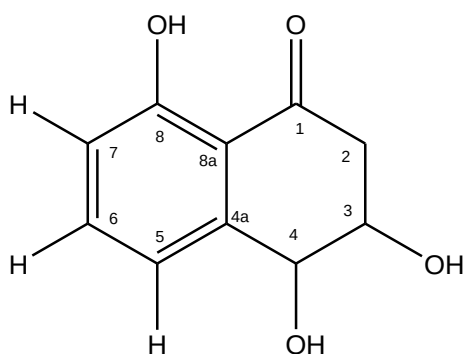
C	^{13}C (δ) Exp	^{13}C (δ) Lit*	H	^1H (δ) Exp	^1H (δ) Lit*	COSY	HMBC
1	199,9	200,0					
2	42,9	42,9	2a	2,63 (<i>dd</i> ; 8,7; 17,1 Hz)	2,63 (<i>dd</i> ; 8,8; 17,6Hz)	2b; 3	C4
			2b	2,97 (<i>dd</i> ; 4,2; 17,1 Hz)	2,96 (<i>dd</i> ; 4,4; 17,6Hz)	2a; 3	C4
3	70,3	70,4	3	3,98 (<i>ddd</i> ; 4,2; 7,5 ; 8,7Hz)	3,97 (<i>ddd</i> ; 4,4;/ 7,8; 8,8Hz)	2a; 2b; 4	C1; C4a
4	72,2	72,3	4	4,48 (<i>d</i> ; 7,5 Hz)	4,49 (<i>d</i> ; 7,8 Hz)	3	C2; C3; C5; C8a
4^a	147,0	143,0					
5	106,9	106,9	5	6,61 (<i>d</i> ; 2,4 Hz)	6,60 (<i>d</i> ; 2,2Hz)	7	C4; C7; C8a
6	165,2	165,0					
7	101,0	101,7	7	6,18 (<i>d</i> ; 2,4, Hz)	6,17 (<i>d</i> ; 2,2Hz)	5	C5; C6. C8; C8a
8	165,2	165,7					
8a	108,5	114,7					

Fonte: Elaborado pelo autor (2018) comparado com *CIMMINO *et al.*, (2016).

4.15. Identificação estrutural da substância 02

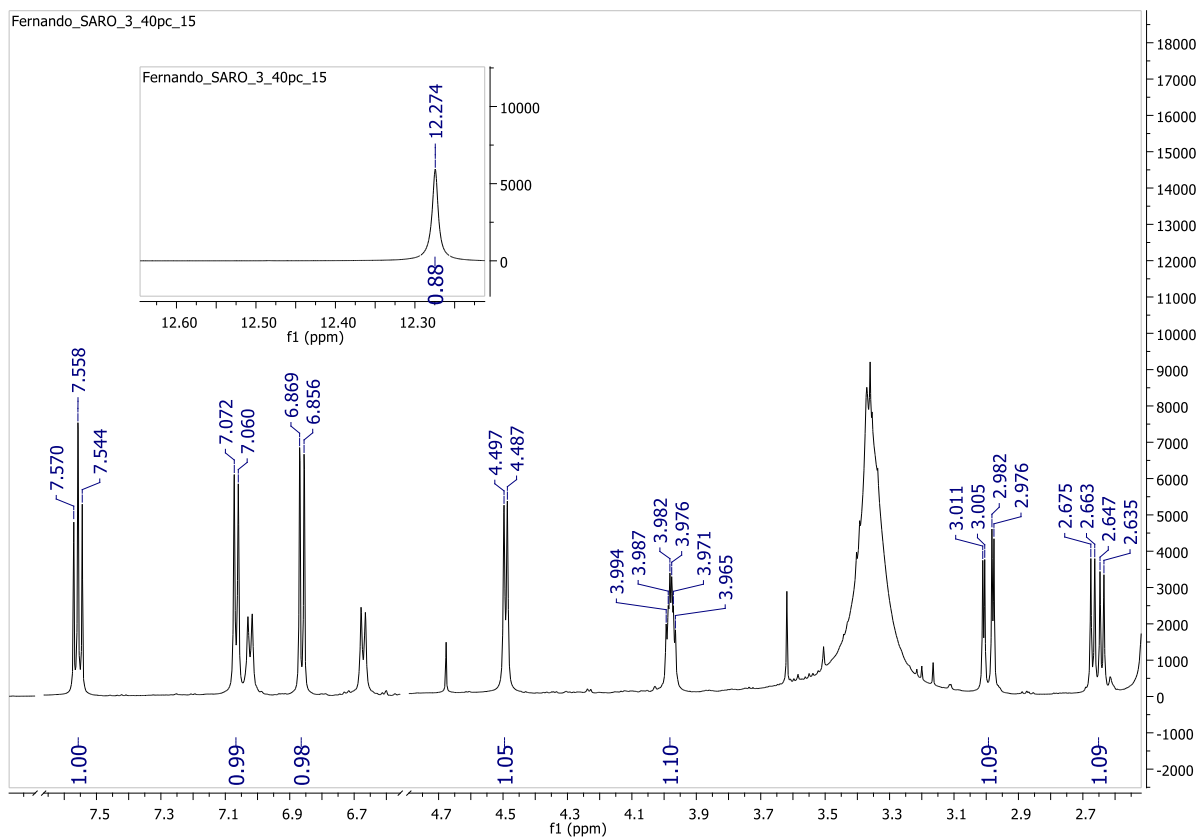
A substância 02 (Figura 33) foi isolada a partir do fracionamento cromatográfico do extrato bruto codificado em SA-F02-Czapek-Fração04 obtido do cultivo em pequena escala, por CLAE e em SA-R03-Malte-40%-Fração 15.

Figura 33. Estrutura da substância 02



A substância 02 apresentou os dados espectroscópicos muito parecidos com os da substância 01, sendo a diferença observada no padrão de substituição do anel aromático. Os dados de RMN de ^1H (Figura 34) evidenciaram três sinais na região dos aromáticos em δ_{H} 7,6 (1H, *t*, $J=7,8$ Hz), δ_{H} 7,1 (1H, *d*, $J=7,8$ Hz) e δ_{H} 6,9 (1H, *d*, $J=7,8$ Hz), indicando um anel aromático trissubstituído. Além de δ_{H} 12,3 (1H, *s*) indicando uma hidroxila quelada.

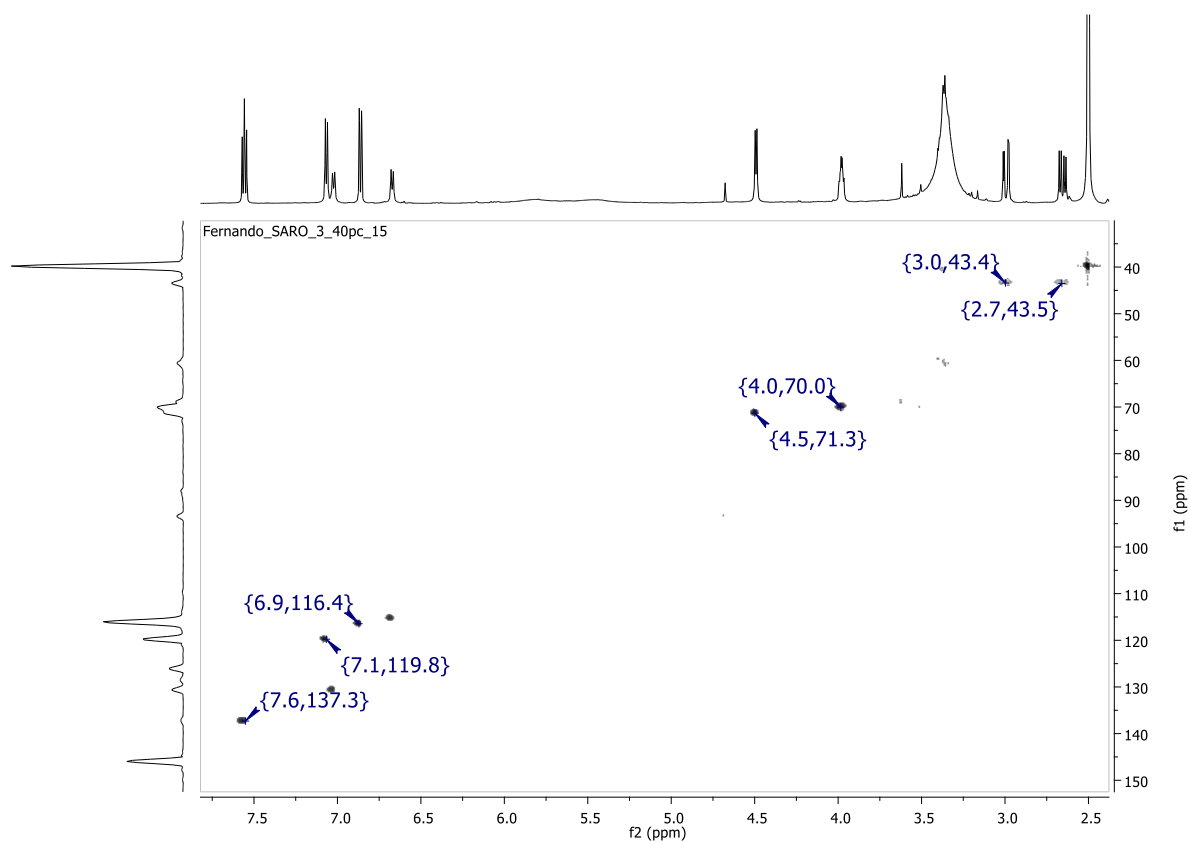
Figura 34. Espectro de RMN de ^1H da substância **02** (DMSO- d_6 , 600 MHz).



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Assim como para a substância **01** foram observados sinais em δ_{H} 2,7 (1H, *dd*, 7,2 e 17,4Hz) e δ_{H} 3,0 (1H, *dd*, 3,6 e 17,4 Hz) atribuídos ao mesmo carbono por HMQC (Figura 35) evidenciando dois hidrogênios quimicamente não equivalentes. Adicionalmente foram observados dois hidrogênios carbinólicos em δ_{H} 4,0 (1H, *ddd*, 3,6, 6,6 e 7,2 Hz) e em δ_{H} 4,5 (1H, *d*, 6,6Hz) se acoplando evidenciando um diol vicinal.

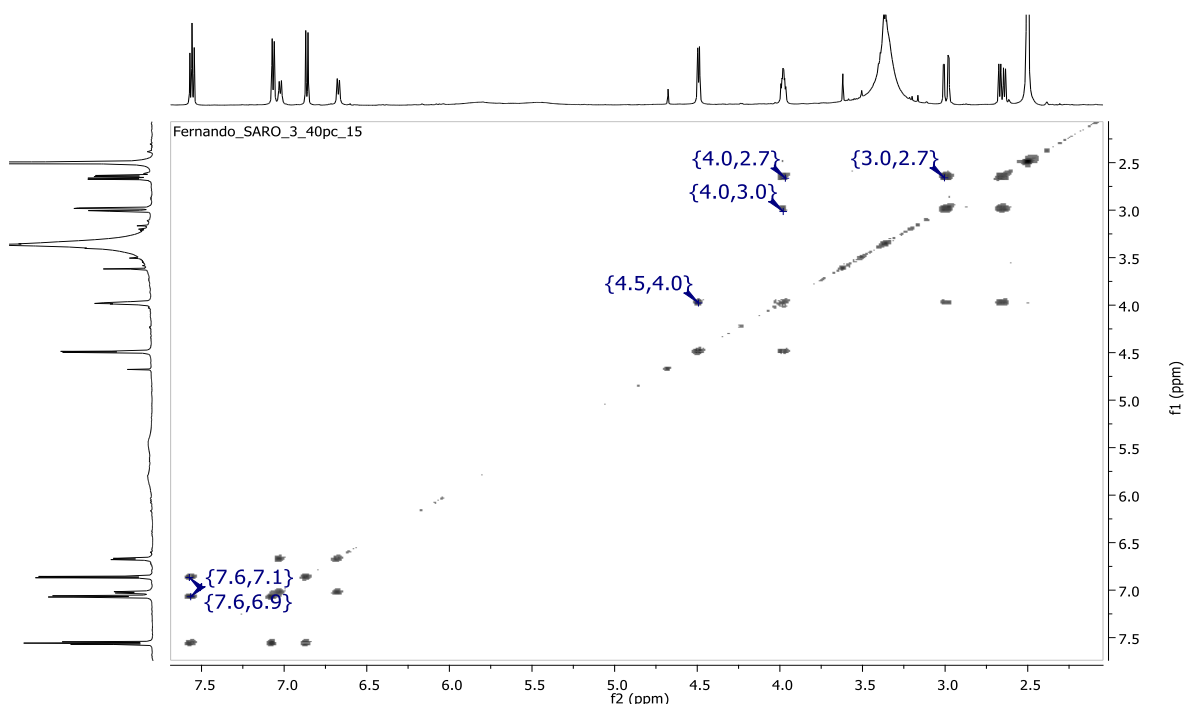
Figura 35. Mapa de contorno de HMQC da substância **02** (DMSO-d₆, 600 e 125MHz).



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

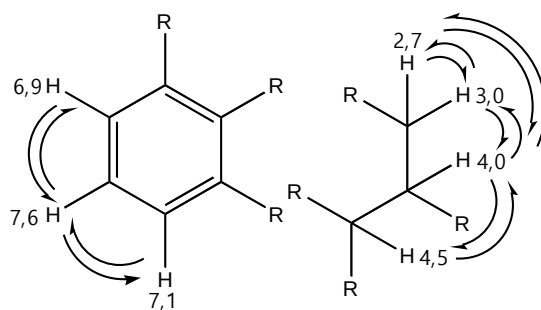
No experimento de COSY (Figura 36) pode-se visualizar a correlação entre os H-2a↔H-2b↔H-3, H-3↔H-4, H5↔H-6 e H6↔H-7 que nos levou as estruturas parciais que podem ser observados na Figura 37.

Figura 36. Mapa de contorno de COSY da substância **02** (DMSO-d₆, 600 MHz).



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

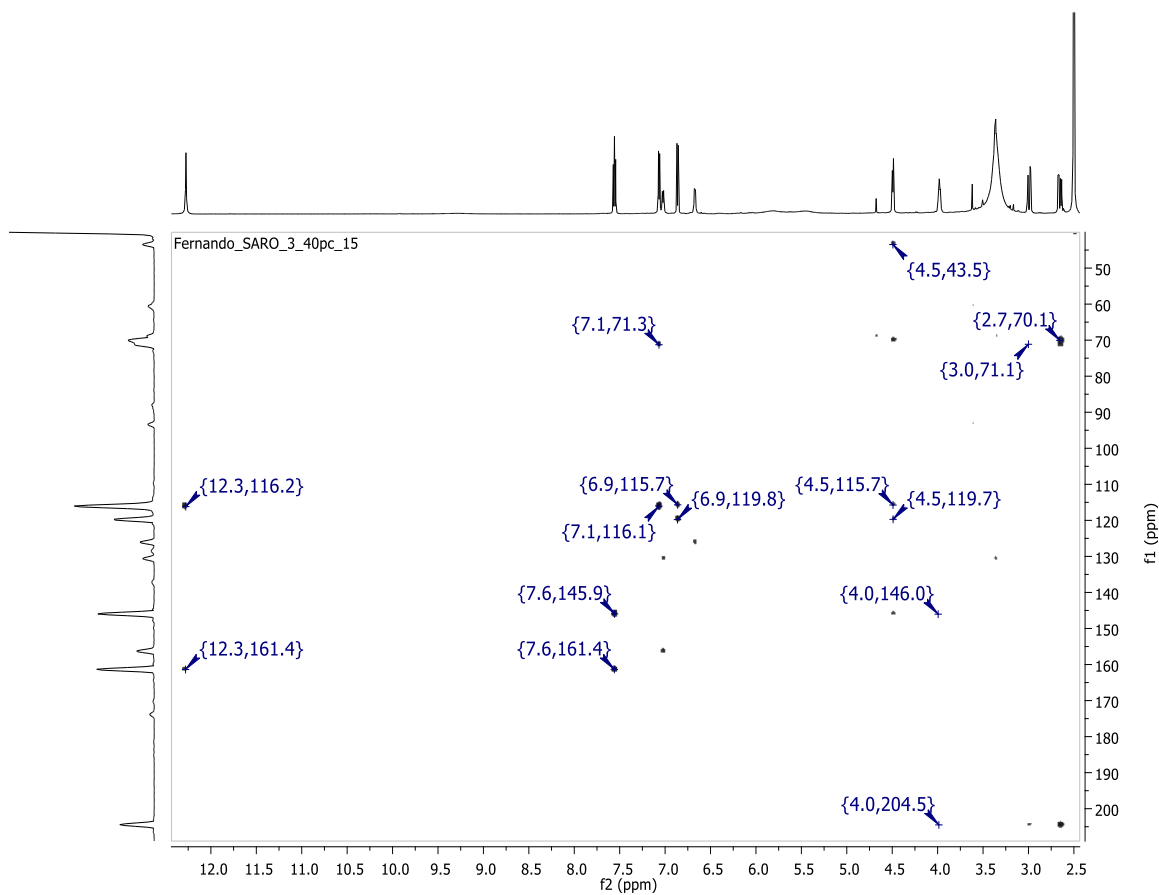
Figura 37. Estruturas parciais da substância **02**.



Estes dados associados às correlações observadas nos mapas de contorno do experimento de HMBC (Figura 38) permitiram identificar a substância como 3,4-dihidro-3,4,8-trihidroxi-1(2H)-naftalenona (Figura 39), que teve como seu primeiro relato IWASAKI *et al.*, (1972), isolado de *Pyricularia oryzae*, esta substância apresenta atividade contra os fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (INÁCIO *et al.*, 2006). A substância **02** também apresenta atividade de inibição das enzimas Inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH), Proteína tirosina fosfatase 1B (PTPIB), Src-homologia

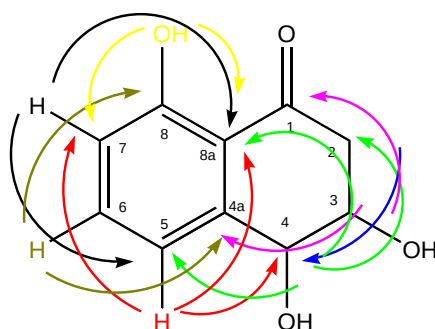
fosfatossinfosfatase (SHP2) (NONG *et al.*, 2013). Estudos realizados por XING *et al.*, (2019) mostraram a esta substância como promissor fármaco antialérgico, tendo IC₅₀ de 28,7 µM comparado ao controle positivo Loratadina IC₅₀ 91,6 µM.

Figura 38. Mapa de contorno de HMBC da substância **02** (DMSO-d₆, 600 e 125MHz).



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Figura 39. Representação esquemática das correlações observados no HMBC



Os dados de RMN de ^1H , ^{13}C e correlações de COSY, gHMBC e HMQC estão sumarizados na Tabela 11

Tabela 11. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 600 e 125 MHz) de **02** (δ em ppm e J em Hz)

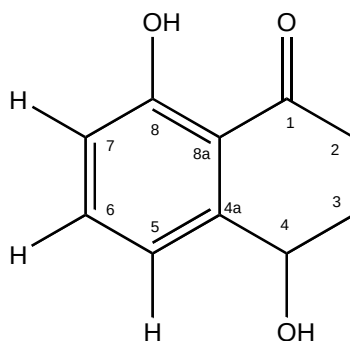
C	^{13}C (δ) Exp	^{13}C (δ) Lit*	H	^1H (δ) Exp	^1H (δ) Lit*	COSY	HMBC
1	204,4	204,53					
2	43,5	43,75	2a	2,65 (<i>dd</i> ; 7,2; 17,4 Hz)	2,88 (<i>q</i> ; 8,1; 17,3 Hz)	2b; 3	C4
			2b	3,00 (<i>dd</i> ; 3,6; 17,4 Hz)	2,96 (<i>q</i> ; 5,0; 17,5 Hz)	2a; 3	C4
3	70,0	70,45	3	3,98 (<i>ddd</i> ; 3,6; 6,6 ; 7,2Hz)	4,27 (<i>m</i>)	2a; 2b; 4	C1; C4a
4	71,3	71,30	4	4,49 (<i>d</i> ; 6,6 Hz)	4,84 (<i>d</i> ; 8,0Hz)	3	C2; C5; C8a
4 ^a	145,9	145,65					
5	119,8	120,09	5	7,07 (<i>d</i> ; 7,8 Hz)	7,09 (<i>d</i> ; 7,5 Hz)	6	C4; C7; C8a
6	137,3	138,02	6	7,56 (<i>t</i> ; 7,8 Hz)	7,52 (<i>t</i> ; 7,5 Hz)	5; 7	C4a; C8
7	116,4	117,87	7	6,86 (<i>d</i> ; 7,8, Hz)	6,85 (<i>d</i> ; 7,5 Hz)	6	C5; C8a
8	161,0	163,14					
8a	115,7	116,76					
			9	12,3 (<i>s</i>)			C7; C8a

Fonte: Elaborado pelo autor (2018) comparado com OUCHBANI *et al.*, (2012).

4.16. Identificação estrutural da substância 03

A substância 03 (Figura 40) foi isolada após fracionamento do extrato bruto produzido em escala ampliada SA-F02-Czapek-Fração11 em escala ampliada.

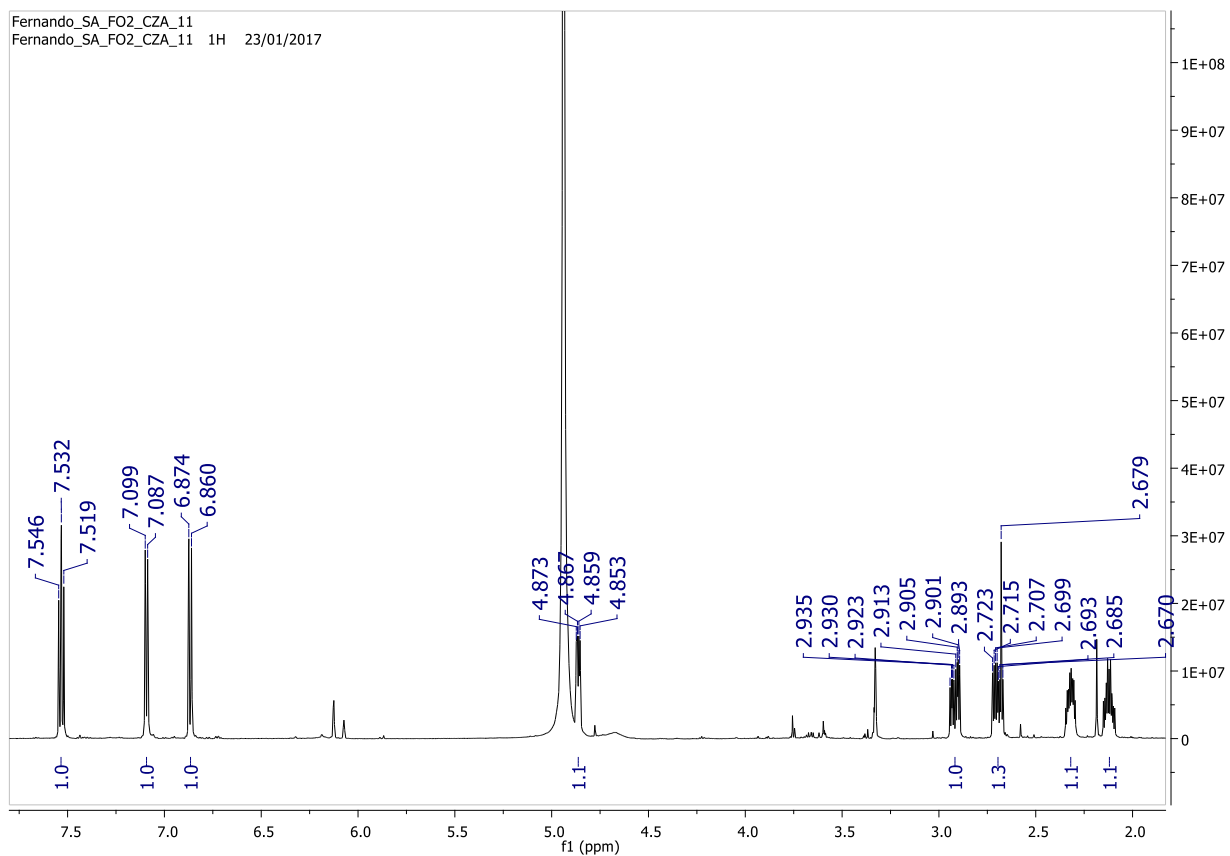
Figura 40. Estrutura da substância 03



A substância 03 apresentou os dados espectroscópicos muito parecidos com os da substância 02, sendo que a principal diferença observada foi a ausência de um carbono carbinólico, sugerindo a redução de C-3 ou C-4 para CH₂.

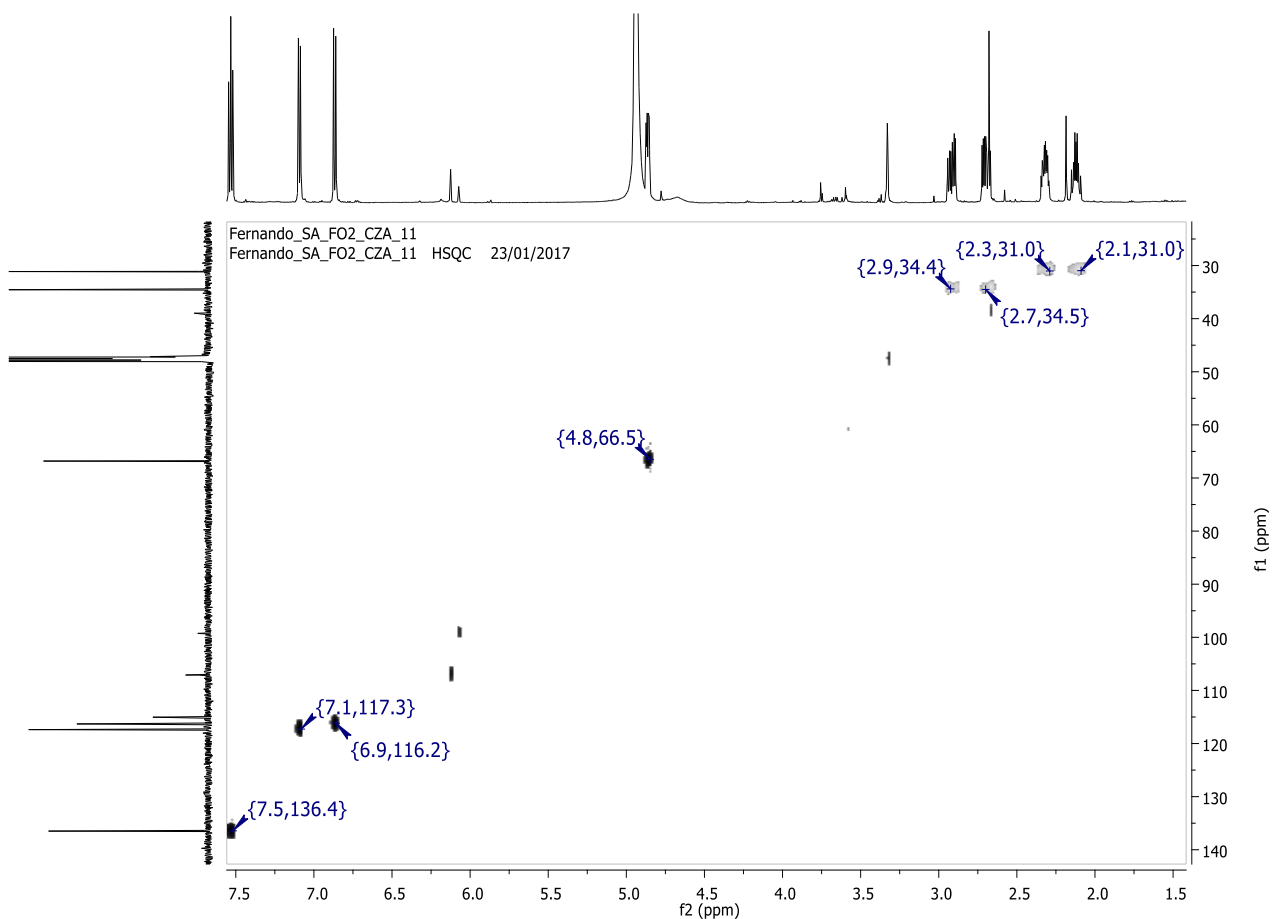
Os dados de RMN de ¹H (Figura 41) evidenciaram três sinais na região dos aromáticos em δ_H 7,5 (1H, *dd*, J=7,8 e 8,4 Hz), δ_H 7,1 (1H, *d*, J=7,8 Hz) e δ_H 6,9 (1H, *d*, J=8,4 Hz), indicando um anel aromático trissubstituído. Foram observados via gHMQC (Figura 42) sinais em δ_H 2,1 (1H, *m*) e δ_H 2,3 (1H, *m*) acoplando com o mesmo carbono (δ_C 31,1) evidenciando dois hidrogênios quimicamente não equivalentes e sinais em δ_H 2,7 (1H, *ddd*, J=4,8; 9,6 e 18,0 Hz) e δ_H 2,9 (1H, *ddd*, J=4,8; 7,2 e 18,0 Hz) acoplando com o mesmo carbono (δ_C 34,5) evidenciando outros dois hidrogênios quimicamente não equivalentes. Adicionalmente foi observado um hidrogênio carbinólico em δ_H 4,9 (1H, *dd*, 3,6, e 8,4Hz).

Figura 41. Espectro de RMN de ^1H da substância **03** (CD_3OD , 600 MHz).



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

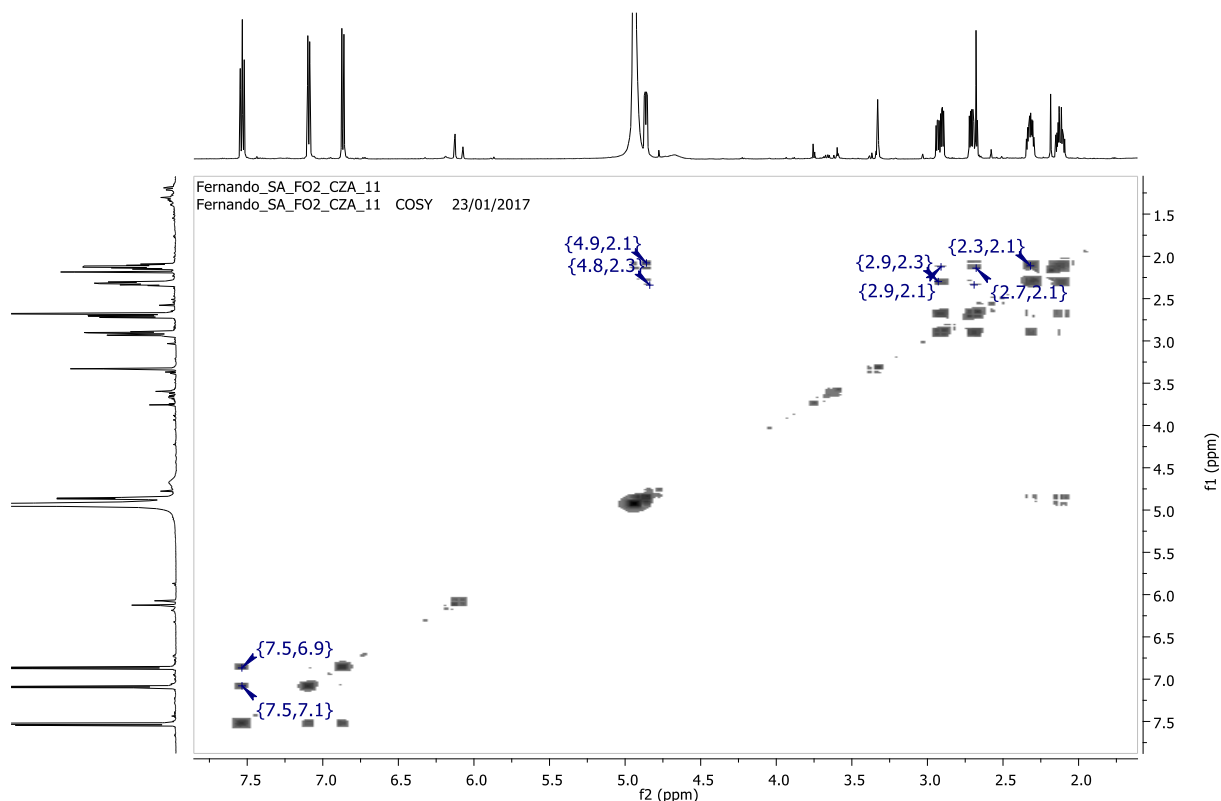
Figura 42. Mapa de contorno de gHMQC da substância **03** (CD₃OD, 600 e 125MHz)



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

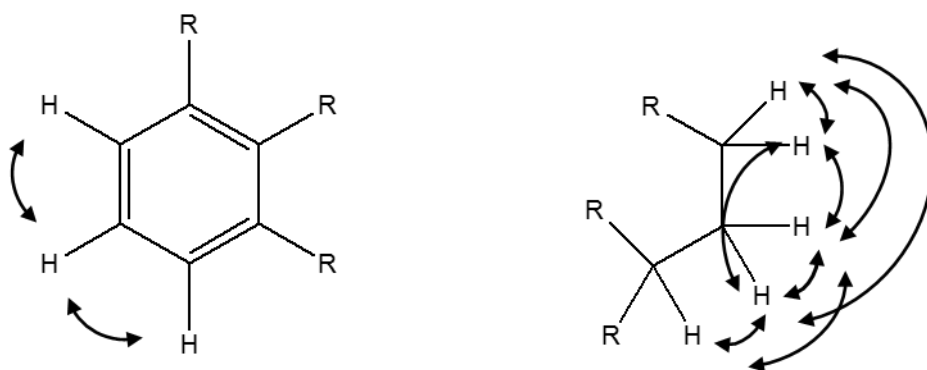
No experimento de COSY (Figura 43) pode-se visualizar a correlação entre os H-2a↔H-2b↔H-3a↔H-3b, H-3a↔H-3b↔H-4, H-5↔H-6 e H-6↔H7 que nos levou as estruturas parciais que observadas na Figura 44.

Figura 43. Mapa de contorno de COSY da substância **03** (CD₃OD, 600 MHz).



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

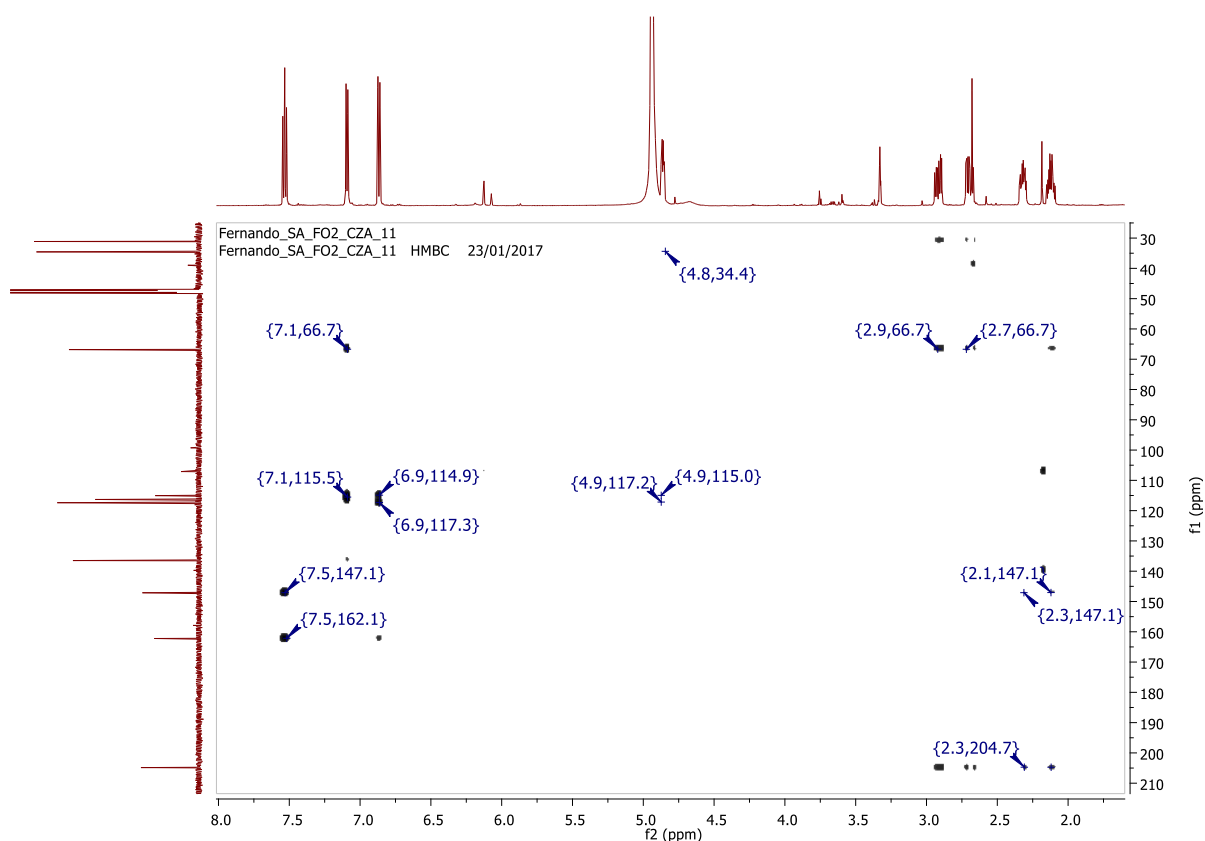
Figura 44. Estruturas parciais da substância **03**.



Estes dados associados às correlações observadas nos mapas de contorno do experimento de HMBC (Figura 45) permitiram identificar a substância **03** como 3,4-dihidro-4,8-dihidroxi-1(2H)-naftalenona (Figura 46). Testes realizados por LI, *et al.*, (2012), indicaram atividade antifúngica para fitopatógenos com concentração

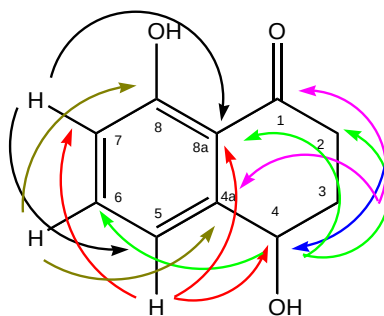
inibitória mínima de 12,5 µg/mL para *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *A. alternata*, *Gibberella saubinetii* e *Colletotrichum gloeosporioides* de 50,0 µg/mL para *Fusarium solani* e *F. oxysporum f. sp. vasinfectum* e de 25,0 µg/mL para *F. oxysporum f. sp. niveum*. além de LC₅₀ de 52.7µg/mL para *Artemia salina*. Adicionalmente HÖLLER; KÖNIG; WRIGHT, (1999) relataram a inibição de *Eurotium repens*; e *Ustilago violacea* em concentrações de 50,0 µg/mL.

Figura 45. Mapa de contorno de HMBC da substância **03** (CD₃OD, 600 e 125MHz)



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Figura 46. Representação esquemática das correlações observados no HMBC



Os dados de RMN de ^1H , ^{13}C e correlações de COSY, gHMBC e HMQC estão sumarizados na Tabela 12.

Tabela 12. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 600 e 125 MHz) da substância **03** (δ em ppm e J em Hz)

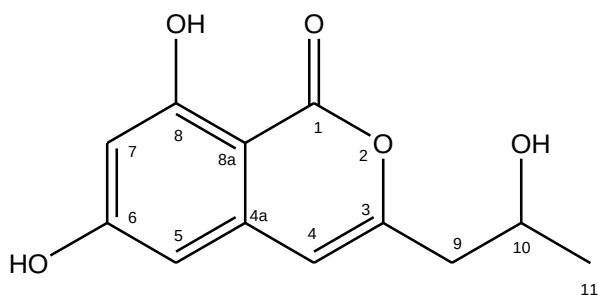
C	^{13}C (δ) Exp	^{13}C (δ) Lit*	H	^1H (δ) Exp	^1H (δ) Lit*	COSY	HMBC
1	204,8	206,0					
2	34,5	36,3	2a	2,7 (<i>ddd</i> ; 4,8; 9,6; 18,0 Hz)	2,62 (<i>m</i>)	2b; 3a; 3b	C4
			2b	2,9 (<i>ddd</i> ; 4,8; 7,2; 18,0 Hz)	2,78 (<i>dt</i> ; 4,8; 9,9; 18,2 Hz)	2a; 3a; 3b	C4
3	31,1	33,0	3a	2,1 (<i>m</i>)	2,00 (<i>m</i>)	2a; 2b; 3b; 4	C1; C4a
			3b	2,3 (<i>ddd</i> ; 4,2; 8,4; 16,5Hz)	2,20 (<i>m</i>)	2a; 2b; 3a; 4	C1; C4a
4	66,5	68,2	4	4,9 (<i>dd</i> ; 3,6; 8,4 Hz)	4,61 (<i>m</i>)	3a; 3b	C2; C5; C8a
4 ^a	147,1	149,5					
5	117,4	118,7	5	7,1 (<i>d</i> ; 7,8 Hz)	7,00 (<i>d</i> ; 7,45Hz)	6	C4; C7; C8a;
6	136,5	137,9	6	7,5 (<i>dd</i> ; 7,8; 8,4 Hz)	7,42 (<i>d</i> ; 7,95 Hz)	5; 7	C4a; C8
7	116,3	117,5	7	6,9 (<i>d</i> ; 8,4 Hz)	6,71 (<i>d</i> ; 8,2 Hz)	6	C5; C8a
8	162,2	163,7					
8a	115,0	116,0					

Fonte: Elaborado pelo autor (2018) comparado com *ZHU et al., (2008).

4.17. Identificação estrutural da substância 04

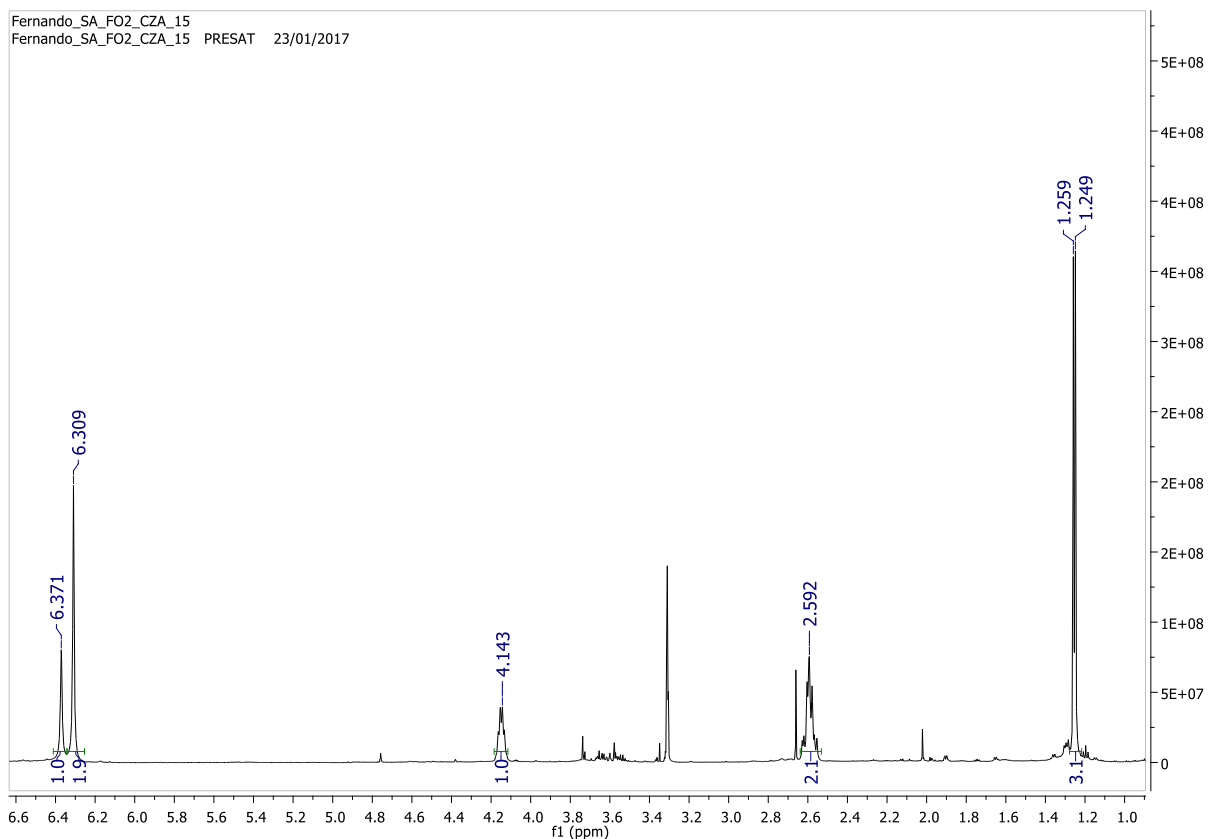
A substância 04 (Figura 47) foi isolada após fracionamento cromatográfico do extrato bruto SA-F02-Czapek-Fração15 obtido em escala ampliada

Figura 47. Estrutura da substância 04



No espectro de RMN de ^1H (Figura 48), foram observados dois singletos largos em δ_{H} 6,3 (2H, s) e δ_{H} 6,4 (1H, s). Também foram observados sinais em δ_{H} 1,3 (3H, d, 6,0 Hz) e δ_{H} 2,6 (2H, m), além de um hidrogênio carbinólico em δ_{H} 4,2 (1H, m).

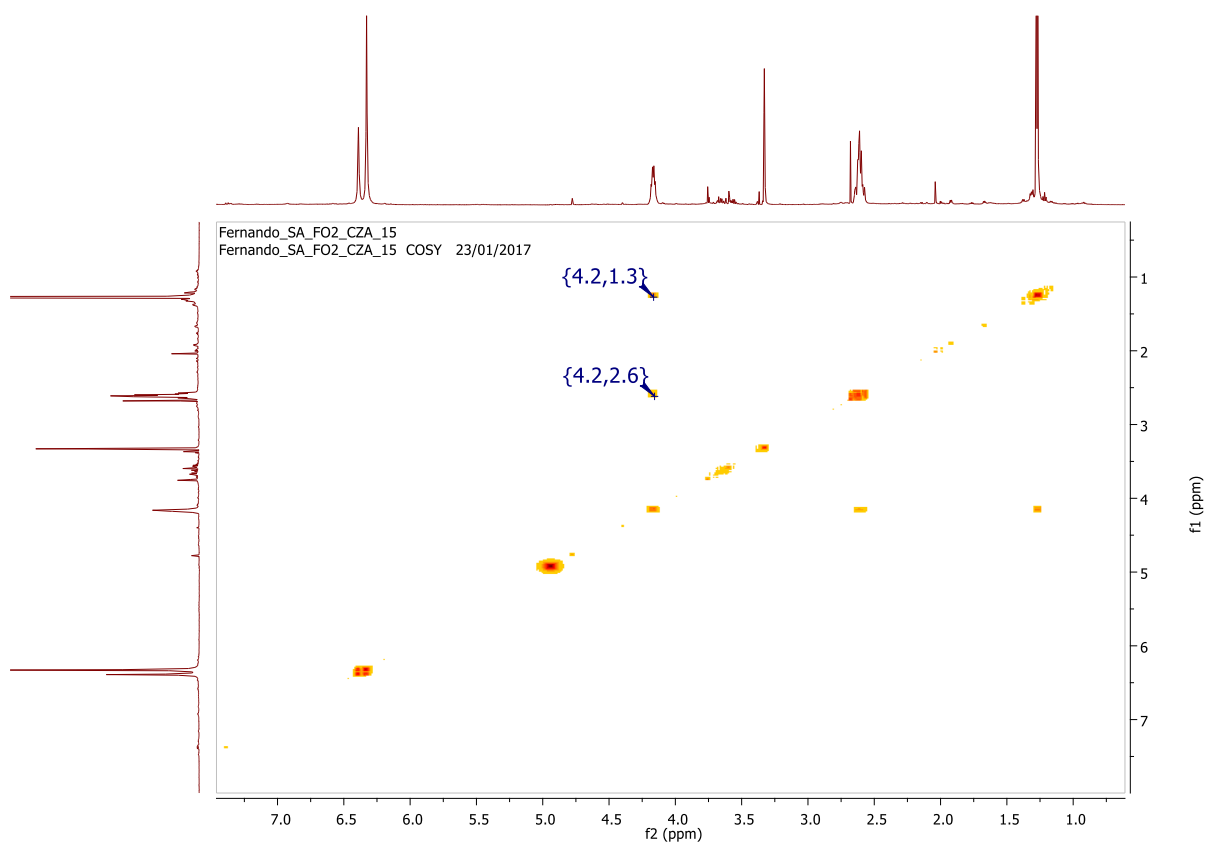
Figura 48. Espectro de RMN de ^1H da substância **04** (CD_3OD , 600 MHz).



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

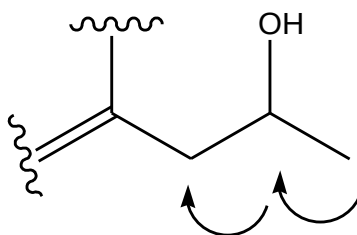
No experimento de COSY (Figura 49) pode-se visualizar a correlação entre os hidrogênios $\text{H-11} \leftrightarrow \text{H-10} \leftrightarrow \text{H-9}$, o que somados as integrações nos levou a estrutura parciais que podem ser observados na Figura 50.

Figura 49. Mapa de contorno de COSY da substância **04** (CD₃OD, 600 MHz).



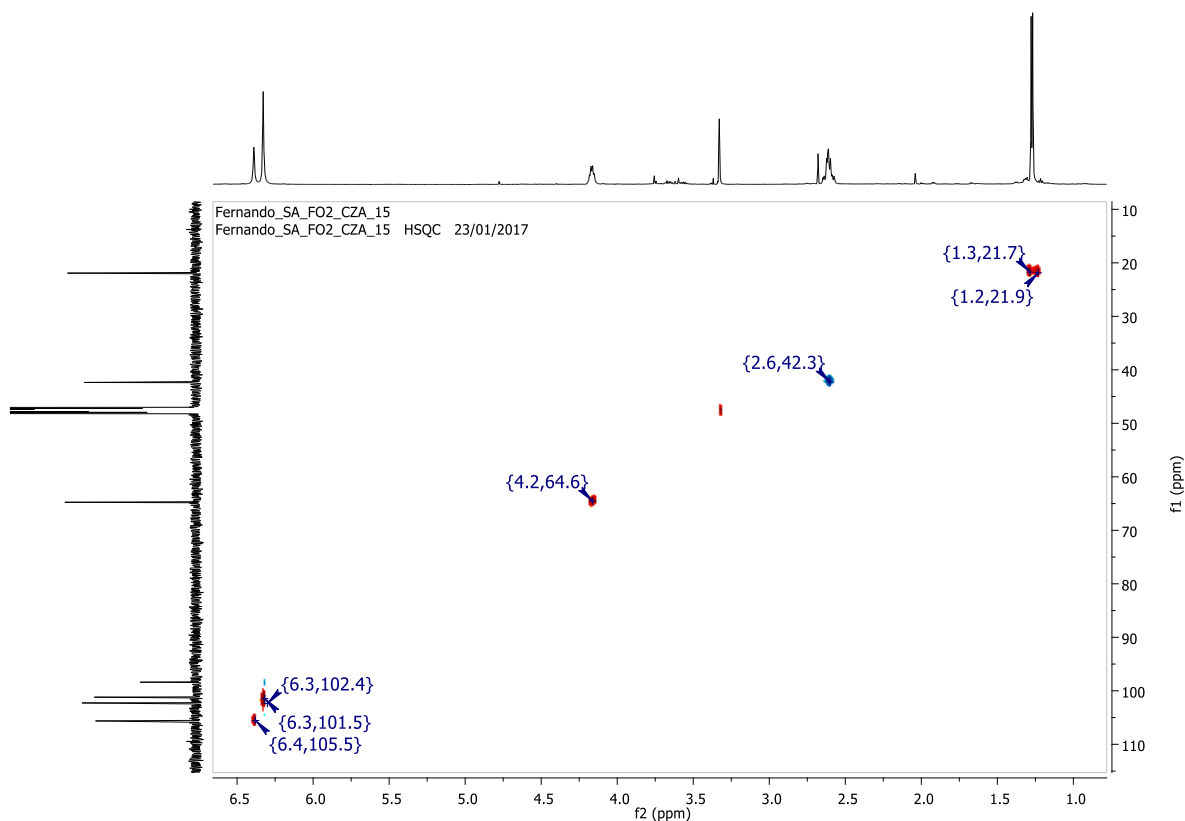
Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Figura 50. Estruturas parciais da substância **04** e correlações observadas em COSY.



Pela análise dos experimentos gHMQC (Figura 51) foi possível observar a correlação entre δ_H 6,4 $\leftrightarrow$ δ_C 105,5, δ_H 6,3 $\leftrightarrow$ δ_C 101,5, δ_H 6,3 $\leftrightarrow$ δ_C 102,4, δ_H 1,3 $\leftrightarrow$ δ_C 21,8, δ_H 2,6 $\leftrightarrow$ δ_C 42,3, δ_H 4,2 $\leftrightarrow$ δ_C 64,6.

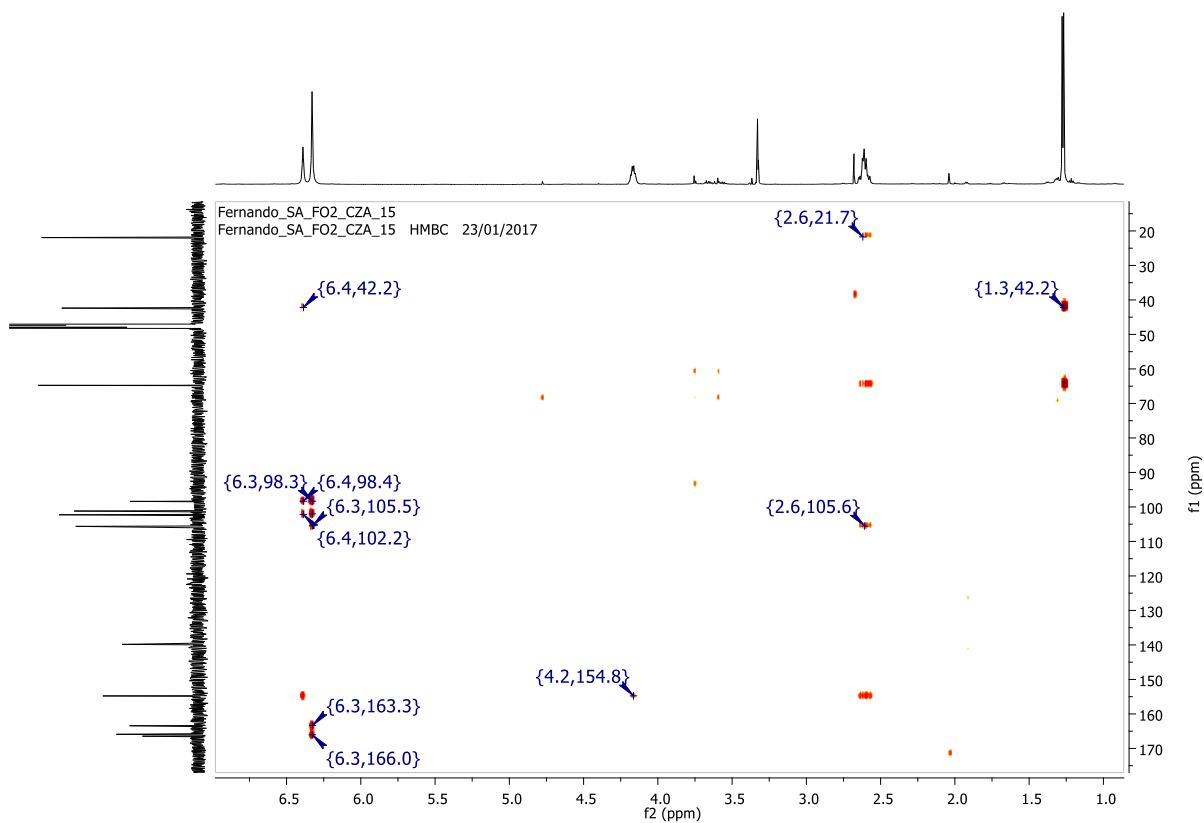
Figura 51. Mapa de contorno de gHMQC da substância **04** (CD₃OD, 600 e 125MHz)



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

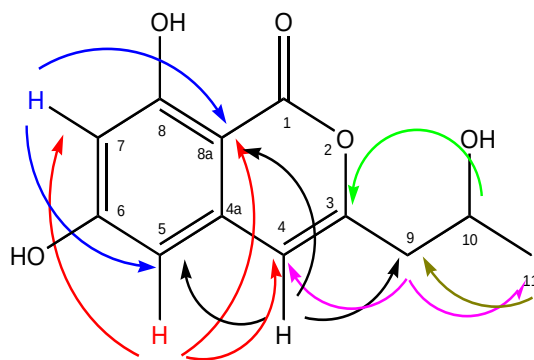
Estes dados associados às correlações observadas nos mapas de contorno do experimento de HMBC (Figura 52) mostraram tratar-se de uma substância com um anel aromático tetrasubstituído com dois hidrogênios em δ_H 6,33 (mesmo deslocamento) um em δ_H 6,39 pertencente a uma dupla ligação conjugada com o sistema aromático. Permitindo identificar a substância **04** como 6,8-dihidroxi-3-(2-hidroxipropil) isocoumarina (Figura 53). Estudos realizados por ZHANG *et al.*, (2019) revelaram atividade antimicrobiana da substância **04** contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *Klebsiella pneumonia*.

Figura 52. Mapa de contorno de HMBC da substância **04** (CD₃OD, 600 e 125MHz)



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Figura 53. Representação esquemática das correlações observados no HMBC



Os dados de RMN de ¹H, ¹³C e correlações de COSY, gHMBC e HMQC estão sumarizados na Tabela 13.

Tabela 13. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 600 e 125 MHz) de **04** (δ em ppm e J em Hz)

C	^{13}C (δ) Exp	^{13}C (δ) Lit*	H	^1H (δ) Exp	^1H (δ) Lit*	COSY	HMBC
1	166,4	167,0					
3	154,8	156,4					
4	105,5	106,3	4	6,39 (s)	6,54(s)		C5; C8a; C9
4^a	139,8	140,9					
5	102,4	103,3	5	6,33 (s)	6,49(d; 1,8Hz)		C4; C7; C8a;
6	165,9	166,4					
7	101,5	102,1	7	6,33 (s)	6,53(d; 1,8Hz)		C5; C8a;
8	163,4	164,3					
8a	98,2	99,7					
9	42,3	43,81	9a	2,60 (m)	2,72 (m)	9b; 10	C3; C4; C10; C11
			9b	2,62 (m)	2,72 (m)	9a; 10	C3; C4; C10; C11
10	64,6	69,61	10	4,2 (m)	4,28 (m; 6,18Hz)	9a; 9b; 11	C3
11	21,8	27,7	11	1,3 (d; 6,0 Hz)	1,35 (d; 6,18 Hz)	10	C9; C10

Fonte: Elaborado pelo autor (2019) e comparado com GREMAUD; TABACCHI, (1994).

5. CONCLUSÕES

Confiamos que os resultados obtidos neste trabalho auxiliem na compreensão da diversidade química produzida pelo fungo endofítico *A. stygium* tendo em vista os poucos estudos direcionados a este microrganismo.

Os fungos endofíticos isolados, produziram extratos bioativos contra *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, principalmente *A. stygium* que apresentou forte atividade de inibição destes fungos fitopatogênicos. Esta observação, levando-se em consideração que os microrganismos foram isolados das folhas caules e raízes saudáveis devem estar exercendo um importante papel ecológico na espécie hospedeira indicando, mesmo que preliminarmente, uma possível simbiose planta-endófito.

A atividade citotóxica nos extratos não foi promissora, assim como a atividade anticolinesterásica onde somente o extrato de Malte de *A. stygium* apresentou-se como candidato viável a produção de metabólitos bioativos.

Os métodos de extração de HPAs em PDA, mesmo já validado para matrizes mais complexas como a planta (*Spartina alterniflora*) e solo (SUGAUARA, 2022), não se apresentou como um método adequado para extração destes compostos nesta matriz.

O estudo dos COVs resultou na identificação de 56 diferentes substâncias entre o quinto e sexto dia de crescimento, onde 16 foram observadas em ambos os dias. Se a produção destes compostos ocorrerem constantemente, durante um período maior, eles podem ser considerados, para estudos futuros, como marcadores quimiotaxonômicos de *A. stygium*.

As Naftalenonas, isoladas neste trabalho, são conhecidas por apresentar diversas atividades biológicas como antifúngica, inibidores de enzimas, além de potencial fármaco já que a substância **02** apresentou IC50 menor que o padrão Loratadina, 28,7µM contra 91,6µM como antialérgico.

Destaca-se ainda a identificação de, 6,8-Dihidroxi-3-(2-hidroxipropil) isocoumarina (**04**) que apresenta atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus*

aureus, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *Klebsiella pneumonia*.

Os resultados obtidos neste trabalho são encorajadores e enriquece o conhecimento sobre a diversidade química de *A. stygium*, onde a identificação de substâncias encontradas reforçam a premissa da simbiose planta-hospedeiro. Neste caso entre *A. stygium* e *Spartina alterniflora*, além de demonstrar o potencial deste microrganismo na produção de metabólitos com potencial para serem utilizados na indústria farmacêutica e contribuir para o estudo de produtos naturais da biodiversidade brasileira.

A maior contribuição deste trabalho foi o início da compreensão do potencial químico e conseqüentemente biológico de *A. stygium*, onde é esperado que a partir deste surjam mais estudos neste sentido. Deste modo no futuro a correlação entre *A. stygium* e a planta hospedeira fique mais compreensivo e que com essas informações possamos influenciar este ecossistema.

REFERÊNCIAS

- ABDOU, A.; ELMAKSSOUDI, A.; EL AMRANI, A.; JAMALEDDINE, J.; DAKIR, M. Recent advances in chemical reactivity and biological activities of eugenol derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, vol. 30, no. 5, p. 1011–1030, 2021. <http://dx.doi.org/10.1007/s00044-021-02712-x>.
- ADELEKE, B. S.; BABALOLA, O. O. Pharmacological potential of fungal endophytes associated with medicinal plants: A Review. **Journal of Fungi**, vol. 7, no. 2, p. 147, 2021. <https://doi.org/10.3390/jof7020147>.
- ALBANESE, S.; FONTAINE, B.; CHEN, W.; LIMA, A.; CANNATELLI, C.; PICCOLO, A.; QI, S.; WANG, M.; DE VIVO, B. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the soils of a densely populated region and associated human health risks: the Campania Plain (Southern Italy) case study. **Environmental Geochemistry and Health**, vol. 37, no. 1, p. 1–20, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10653-014-9626-3>.
- AMÉRICO, J. **Conetividade Insular: Um estudo da presença de Spartina alterniflora nas ilhas de Cananéia e Comprida**. 2010. 84 f. Universidade de São Paulo, 2010.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2022. **tratamento estatístico de validação analítica**. Available at: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2017/publicado-guia-para-tratamento-estatistico-de-validacao-analitica>. Accessed on: 19 Sep. 2022.
- APS. Mensário Estatístico- Autoridade Portuaria de Santos. 2023. **Mensario Estatístico**. Available at: <https://www.portodesantos.com.br/informacoes-operacionais/estatisticas/mensario-estatistico/>. Accessed on: 5 Jan. 2023.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 46, no. 2, p. 446–475, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>.
- BALDWIN, I. T. Plant volatiles. **Current Biology**, vol. 20, no. 9, p. 392–397, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.02.052>.
- BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; MCCOY, K. D.; WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, vol. 4, p. 14–19, 1996. .
- BEZERRA, V. H. S.; CARDOSO, S. L.; FONSECA-BAZZO, Y.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, P. O.; SOUZA, P. M. Protease produced by endophytic fungi: A systematic Review. **Molecules**, vol. 26, no. 22, p. 7062, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26227062>.

BITAS, V.; KIM, H.-S.; BENNETT, J. W.; KANG, S. Sniffing on microbes: Diverse roles of microbial volatile organic compounds in plant health. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, vol. 26, no. 835–843, p. 1–30, 2013. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-12-0249-CR>.

BLASTN. Basic Local Alignment Search Tool. 2017. **base de dados de referência sequência biológica**. Available at: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. Accessed on: 8 Dec. 2017.

BUOSI, D.; FELFILI, J. M. Recuperação de áreas contaminadas por pesticidas organoclorados na Cidade dos Meninos, município de Duque de Caxias, RJ. **Revista Árvore**, vol. 28, no. 3, p. 465–470, 2004. <https://doi.org/10.1590/s0100-67622004000300018>.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes Author (s): Ignazio Carbone and Linda M . Kohn Published by : Mycological Society of America Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/376>. **Mycologia**, vol. 91, no. 3, p. 553–556, 1999. .

CHECKLIST, C. Catalogue of life. 2023. Available at: <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/F>. Accessed on: 8 Jan. 2023.

CHENG, M. J.; WU, M.-D.; CHEN, J.-J.; CHENG, Y.-C.; HSIEH, M.-T.; HSIEH, S.-Y.; YUAN, G.-F.; SU, Y.-S. Secondary metabolites from the endophytic fungus *Annulohyphoxylon stygium* BCRC 34024. **Chemistry of Natural Compounds**, vol. 50, no. 2, p. 237–241, 2014. <https://doi.org/10.1002/hlca.201400091>.

CIMMINO, A.; MADDAU, L.; MASI, M.; EVIDENTE, M.; LINALDEDDU, B. T.; EVIDENTE, A. Further secondary metabolites produced by *Diplodia corticola*, a fungal pathogen involved in cork oak decline. **Tetrahedron**, vol. 72, no. 43, p. 6788–6793, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.09.008>.

CUNHA-LIGNON, M.; MENGHINI, R. P.; SANTOS, L. C. M.; NIEMEYER-DINÓLA, C.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Estudos de Caso nos Manguezais do Estado de São Paulo (Brasil): Aplicação de Ferramentas com Diferentes Escalas Espaço-Temporais. **Revista de Gestão Costeira Integrada**, vol. 9, no. 1, p. 79–91, 2009. <https://doi.org/10.5894/rgci125>.

DINARDI, A. L.; FORMAGI, V. M.; CONEGLIAN, C. M. R.; DE BRITO, N. N.; SOBRINHO, G. D.; TONSO, S.; PELEGRINI, R. Fitorremediação. 2003. **III Fórum de Estudos Contábeis** [...]. Rio Claro, SP.: [s. n.], 2003.

DOMÍNGUEZ, C.; SARKAR, S. K.; BHATTACHARYA, A.; CHATTERJEE, M.; BHATTACHARYA, B. D.; JOVER, E.; ALBAIGÉS, J.; BAYONA, J. M.; ALAM, M. A.; SATPATHY, K. K. Quantification and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in core sediments from Sundarban mangrove Wetland, India. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, vol. 59, no. 1, p. 49–61, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9444-2>.

ELIUZ, E. A. E.; AYAS, D.; GOKSEN, G. In Vitro Phototoxicity and Antimicrobial Activity of Volatile Oil Obtained from Some Aromatic Plants. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, vol. 20, no. 3, p. 758–768, 2017. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2017.1331141>.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, vol. 7, no. 2, p. 88–95, 1961. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).

ESPÓSITO, E.; AZEVEDO, J. L. . **Fungos - Uma Introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. 2th ed. Caxias do Sul: [s. n.], 2010.

FIGTREE_V1.4.3. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology. 2018. **Base de dados árvore filogenética**. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/>. Accessed on: 5 Jun. 2018.

GABRIEL, P. F. Innovative Technologies for Contaminated Site Remediation: Focus on Bioremediation. **Journal of the Air and Waste Management Association**, vol. 41, no. 12, p. 1657–1660, 1991. <https://doi.org/10.1080/10473289.1991.10466961>.

GAO, S.; TIAN, W. J.; LIAO, Z. J.; WANG, G. H.; ZENG, D. Q.; LIU, X. Z.; WANG, X. Y.; ZHOU, H.; CHEN, H. F.; LIN, T. Chemical Constituents from Endophytic Fungus *Annulohyphoxylon cf. stygium* in Leaves of *Anoectochilus roxburghii*. **Chemistry and Biodiversity**, vol. 17, no. 9, p. 1–8, 2020. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000424>.

GBIF. Global Biodiversity Information Facility. 2023. **Spartina alterniflora**. Available at: http://www.gbif.org/species/search?q=Spartina+alterniflora&dataset_key=d7dddbf4-2cf0-4f39-9b2a-bb099caae36c. Accessed on: 10 Mar. 2023.

GENBANK. International Nucleotide Sequence Database Collaboration. 2018. **Base de dados Nucleotide Sequence Database Collaboration**. .

GIRARDI, G. Mangue em mutação. [https://crusta.com.br/biblio/08.Divulgacao/74-Pinheiro%20\(2010\)%20-%20Mangue%20em%20Muta%C3%A7%C3%A3o%20\(R revista%20FAPESP\).pdf](https://crusta.com.br/biblio/08.Divulgacao/74-Pinheiro%20(2010)%20-%20Mangue%20em%20Muta%C3%A7%C3%A3o%20(R revista%20FAPESP).pdf), São Paulo, , p. 36–40, May 2010. .

GREMAUD, G.; TABACCHI, R. Isocoumarins Of The Fungus *Ceratocystis fimbriata* Coffea. **Natural Product Letters**, vol. 5, p. 95–103, 1994. <https://doi.org/10.1080/10575639408044041>.

HIRUMA, K.; GERLACH, N.; SACRISTÁN, S.; NAKANO, R. T.; HACQUARD, S.; KRACHER, B.; NEUMANN, U.; RAMÍREZ, D.; BUCHER, M.; O'CONNELL, R. J.; SCHULZE-LEFERT, P. Root Endophyte *Colletotrichum tofieldiae* Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate Status Dependent. **Cell**, vol. 165, no. 2, p. 464–474, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.028>.

HÖLLER, U.; KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D. Three new metabolites from marine-derived fungi of the genera *coniothyrium* and *microsphaeropsis*. **Journal of Natural Products**, vol. 62, no. 1, p. 114–118, 1999. <https://doi.org/10.1021/np980341e>.

INÁCIO, M. L.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; TREVISAN, H. C.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. da S.; YOUNG, M. C. M.; PFENNING, L. H.; ARAÚJO, Â. R. Antifungal metabolites from *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Cryptocarya mandioccana* Nees (Lauraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, vol. 34, no. 11, p. 822–824, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2006.06.007>.

ITRC. **Technical and Regulatory Guidance Document**. [S. l.: s. n.], 2001. Available at: <http://www.itrcweb.org/Documents>.

IWASAKI, S.; MURO, H.; NOZOE, S.; OKUDA, S. Isolation of 3,4-dihydro-3,4,8-Tryhydroxy- 1 (2H)- Naphtaleone and tenuazonic acid from *Pyricularia oryzae* cava. **Tetrahedron Letter**, vol. 1, no. 1, p. 13–16, 1972. .

KANCHISWAMY, C. N.; MALNOY, M.; MAFFEI, M. E. Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. **Frontiers in Plant Science**, vol. 6, no. Mar, p. 151, 2015. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00151>.

KUSARI, S.; SPITELLER, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? **Natural Product Reports**, vol. 28, no. 7, p. 1203–1207, 2011. <https://doi.org/10.1039/c1np00030f>.

LEMFACK, M. C.; GOHLKE, B. O.; TOGUEM, S. M. T.; PREISSNER, S.; PIECHULLA, B.; PREISSNER, R. MVOC 2.0: A database of microbial volatiles. **Nucleic Acids Research**, vol. 46, no. D1, p. D1261–D1265, 2018. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1016>.

LI, N.; ALFIKY, A.; VAUGHAN, M. M.; KANG, S. Stop and smell the fungi: Fungal volatile metabolites are overlooked signals involved in fungal interaction with plants. **Fungal Biology Reviews**, vol. 30, no. 3, p. 134–144, 2016. DOI 10.1016/j.fbr.2016.06.004. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2016.06.004>.

LI, X. J.; ZHANG, Q.; ZHANG, A. L.; GAO, J. M. Metabolites from *Aspergillus fumigatus*, an endophytic fungus associated with *Melia azedarach*, and their antifungal, antifeedant, and toxic activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 60, no. 13, p. 3424–3431, 2012. <https://doi.org/10.1021/jf300146n>.

MACIEL, O. M. C.; TAVARES, R. S. N.; CALUZ, D. R. E.; GASPAR, L. R.; DEBONSI, H. M. Photoprotective potential of metabolites isolated from algae-associated fungi *Annulohyphoxylon stygium*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, vol. 178, no. September 2017, p. 316–322, 2018. DOI 10.1016/j.jphotobiol.2017.11.018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.11.018>.

MAHUGIJA, J. A.; AHMED, K. N.; MAKAME, Y. M. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contamination in coastal mangrove ecosystems of the Zanzibar archipelago. **Western Indian Ocean-Journal of Marine Science**, vol. 16, no. 1, p. 25–34, 2017. .

MEDINA, R. P.; ARAUJO, A. R.; ANDERSEN, R. J.; SOARES, M. A.; SILVA, F. de A.; SILVA, D. H. S. Aromatic compounds produced by endophytic fungi isolated from red alga *Asparagopsis taxiformis* - *Falkenbergia* stage. **Natural Product Research**, vol. 33, no. 3, p. 443–446, 2019. DOI 10.1080/14786419.2018.1455037. Available at: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1455037>.

MLALA, S.; OYEDEJI, A. O.; GONDWE, M.; OYEDEJI, O. O. Ursolic Acid and Its Derivatives as Bioactive Agents. **Molecules (Basel, Switzerland)**, vol. 24, no. 15, p. 1–25, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24152751>.

MOREIRA, I. T. A.; OLIVEIRA, O. M. C.; TRIGUIS, J. A.; QUEIROZ, A. F. S.; FERREIRA, S. L. C.; MARTINS, C. M. S.; SILVA, A. C. M.; FALCÃO, B. A. Phytoremediation in mangrove sediments impacted by persistent total petroleum hydrocarbons (TPH's) using *Avicennia schaueriana*. **Marine Pollution Bulletin**, vol. 67, no. 1–2, p. 130–136, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.11.024>.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, vol. 65, p. 55–63, 1983. .

NIST. National Institute of Standards and Technology. 2023. **periodicos CAPES**. Available at: <https://webbook.nist.gov/chemistry/>. Accessed on: 19 Dec. 2022.

NONG, X. H.; ZHENG, Z. H.; ZHANG, X. Y.; LU, X. H.; QI, S. H. Polyketides from a marine-derived fungus *Xylariaceae* sp. **Marine Drugs**, vol. 11, no. 5, p. 1718–1727, 2013. <https://doi.org/10.3390/md11051718>.

O'DONELL, K.; CIGELNIK, E. Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* Are Nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, vol. 7, no. 1, p. 103–116, 1997. .

OUCHBANI, T.; IDRISSE, F. E. J.; BOUHFID, R.; PROKSCH, P.; ESSASSI, E. M. *Neonectria macrodidyma* and *embellisia eureka*, two novel producers of brefeldin A and 3,4-Dihydro-3,4,8-trihydroxy-1[2h]-naphthalenone. **Moroccan Journal of Heterocyclic Chemistry**, vol. 11, no. 1, p. 23–35, 2012. .

PEZESHKI, S. R.; HESTER, M. W.; LIN, Q.; NYMAN, J. A. The effects of oil spill and clean-up on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: A review. **Environmental Pollution**, vol. 108, no. 2, p. 129–139, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00244-4](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00244-4).

PIMJUK, P.; MONGKOLTHANARUK, W.; SUWANNASAI, N.; SENAWONG, T.; TONTAPHA, S.; AMORNKITBUMRUNG, V.; MCCLOSKEY, S. A new α -pyrone derivative from *Annulohypoxylon stygium* SWUF09-030. **Journal of Asian Natural Products Research**, vol. 23, no. 12, p. 1182–1188, 2021. <https://doi.org/10.1080/10286020.2020.1856095>.

PIRES, F. R.; SOUZA, C. M. de; CECON, P. R.; SANTOS, J. B. dos; TÓTOLA, M. R.; PROCÓPIO, S. de O.; SILVA, A. A. da; SILVA, C. S. W. Inferências sobre atividade rizosférica de espécies com potencial para fitorremediação do herbicida tebuthiuron. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, vol. 29, no. 4, p. 627–634, 2005. <https://doi.org/10.1590/s0100-06832005000400015>.

RAMIREZ, D.; DUSSAN, J. Landfarmed oil sludge as a carbon source for *Canavalia ensiformis* during phytoremediation. **International Journal of Environmental Science and Technology**, vol. 11, no. 5, p. 1197–1206, 2014. <https://doi.org/10.1007/s13762-014-0575-2>.

RAWAT, S.; PATHAK, S.; GUPTA, G.; SINGH, S. K.; SINGH, H.; MISHRA, A.; GILHOTRA, R. RECENT UPDATES ON DAIDZEIN AGAINST OXIDATIVE STRESS AND CANCER. **EXCLI Journal**, vol. 18, p. 950–954, 2019. <https://doi.org/10.17179/excli2019-1847>.

READMAN, J. W.; FILLMANN, G.; TOLOSA, I.; BARTOCCI, J.; VILLENEUVE, J. P.; CATINNI, C.; MEE, L. D. Petroleum and PAH contamination of the Black Sea. **Marine Pollution Bulletin**, vol. 44, no. 1, p. 48–62, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00189-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00189-8).

ROBL, D.; DOS SANTOS COSTA, P.; BÜCHLI, F.; DA SILVA LIMA, D. J.; DA SILVA DELABONA, P.; SQUINA, F. M.; PIMENTEL, I. C.; PADILLA, G.; DA CRUZ PRADELLA, J. G. Enhancing of sugar cane bagasse hydrolysis by *Annulohypoxylon stygium* glycohydrolases. **Bioresource Technology**, vol. 177, p. 247–254, 2015. <https://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.082>.

ROBL, D.; DOS SANTOS COSTA, P.; RABELO, S. C.; DA SILVA DELABONA, P.; DA SILVA LIMA, D. J.; PADILLA, G.; DA CRUZ PRADELLA, J. G. Use of Ascomycete Extracts in Enzymatic Cocktail Formulations Increases Sugar Cane Bagasse Hydrolysis. **Bioenergy Research**, vol. 9, no. 2, p. 559–565, 2016. <https://doi.org/10.1007/s12155-016-9721-7>.

RONDILLA, R. R. L.; DELA CRUZ, T. E. E.; CHANG, F. R.; NONATO, M. G. Annulohyphoxylon stygium, a Pandanus simplex-associated fungal endophyte with α -glucosidase inhibitory activity. **Studies in Fungi**, vol. 7, p. 1–6, 2022. <https://doi.org/10.48130/SIF-2022-0004>.

SALLA, V.; HARDAWAY, C. J.; SNEDDON, J. Preliminary investigation of Spartina alterniflora for phytoextraction of selected heavy metals in soils from Southwest Louisiana. **Microchemical Journal**, vol. 97, no. 2, p. 207–212, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2010.09.005>.

SEGUNDO, W. O. P. F.; DE OLIVEIRA, R. S.; LIMA, R. M.; SANTIAGO, P. A. L.; DE OLIVEIRA, L. A.; CORTEZ, A. C. A.; LIMA, E. S.; DE SOUZA, É. S.; FRICKMANN, H.; DE SOUZA, J. V. B. Antimicrobial Potential of Metabolites in Fungal Strains Isolated from a Polluted Stream: Annulohyphoxylon stygium WL1B5 Produces Metabolites against Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Positive Escherichia coli. **Antibiotics**, vol. 12, no. 1, p. 1–15, 2023. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010027>.

SEIPKE, R. F.; BARKE, J.; RUIZ-GONZALEZ, M. X.; ORIVEL, J.; YU, D. W.; HUTCHINGS, M. I. Fungus-growing Allomerus ants are associated with antibiotic-producing actinobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, vol. 101, no. 2, p. 443–447, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9621-y>.

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

SISINNO, L. C. L.; PEREIRA, E. A. do N.; DO REGO, D. C. P.; LIMA, G. dos S. V. Polycyclic aromatic hydrocarbons in industrial solid waste: a preliminary evaluation of the potential risk of environmental and human contamination in waste disposal areas. **Cadernos de Saude Publica Saúde Pública**, vol. 19, no. 2, p. 671–676, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2003000200035>.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. **Journal of the National Cancer Institute**, vol. 82, no. 13, p. 1107–1112, 1990. .

SUGAUARA, L. E. **Impacto da poluição ambiental em manguezal brasileiro, bioacumulação de HPAs em Spartina alterniflora**. 2022. 252 f. Tese (Doutora em Química)- Instituto de Química -Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2022.

SUN, L.; LIAO, X.; YAN, X.; ZHU, G.; MA, D. Evaluation of heavy metal and polycyclic aromatic hydrocarbons accumulation in plants from typical industrial sites: potential candidate in phytoremediation for co-contamination.

Environmental Science and Pollution Research, vol. 21, no. 21, p. 12494–12504, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3171-6>.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography.

journal of chromatography, vol. 11, no. 3, p. 463–471, 1963. .

VELHO, A. M. A.; AIUB, C. A. F.; MAZZEI, J. L.; CORRÊA, S. M.; SOARES, M. L. G.; FELZENSZWALB, I. Preliminary Study by Environmental Indicator Measurements of Sediments in a Mangrove Forest in Ilha Grande Bay, Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. **Journal of Environmental Protection**, vol. 03, no. 08, p. 731–739, 2012. <https://doi.org/10.4236/jep.2012.38087>.

WERNER, S.; POLLE, A.; BRINKMANN, N. Belowground communication: impacts of volatile organic compounds (VOCs) from soil fungi on other soil-inhabiting organisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 100, no. 20, p. 8651–8665, 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7792-1>.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics. **PCR Protocols**, no. 1, p. 315–322, 1990. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>.

WHO. IARC. 2011. **Monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans [...]**. [S. l.: s. n.], 2011. p. 125.

WILEY7. Wiley Online Library. 2018. **Base de dados de referência padrão**. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/>. Accessed on: 25 Aug. 2018.

WU, B.; HUSSAIN, M.; ZHANG, W.; STADLER, M.; LIU, X.; XIANG, M. Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. **Mycology**, vol. 10, no. 3, p. 127–140, 2019. <https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1614106>.

WU, J.; FU, Y. S.; LIN, K.; HUANG, X.; CHEN, Y. jing; LAI, D.; KANG, N.; HUANG, L.; WENG, C. F. A narrative review: The pharmaceutical evolution of phenolic syringaldehyde. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, vol. 153, no. May, p. 113339, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113339>.

XIE, R.; WU, R.; TANG, C.; LAI, Y.; GONG, K.; LI, J. Heavy metal accumulation affected by *Spartina alterniflora* invasion in estuarine wetland sediments. **Journal of Natural Resources**, vol. 35, no. 5, p. 1238, 2020. <https://doi.org/10.31497/zrzyxb.20200518>.

XING, C. P.; XIE, C. L.; XIA, J. M.; LIU, Q. M.; LIN, W. X.; YE, D. Z.; LIU, G. M.; YANG, X. W. Penigrisacids A–D, Four New Sesquiterpenes from the Deep-Sea-Derived *Penicillium griseofulvum*. **Marine Drugs**, vol. 17, no. 9, 2019. <https://doi.org/10.3390/md17090507>.

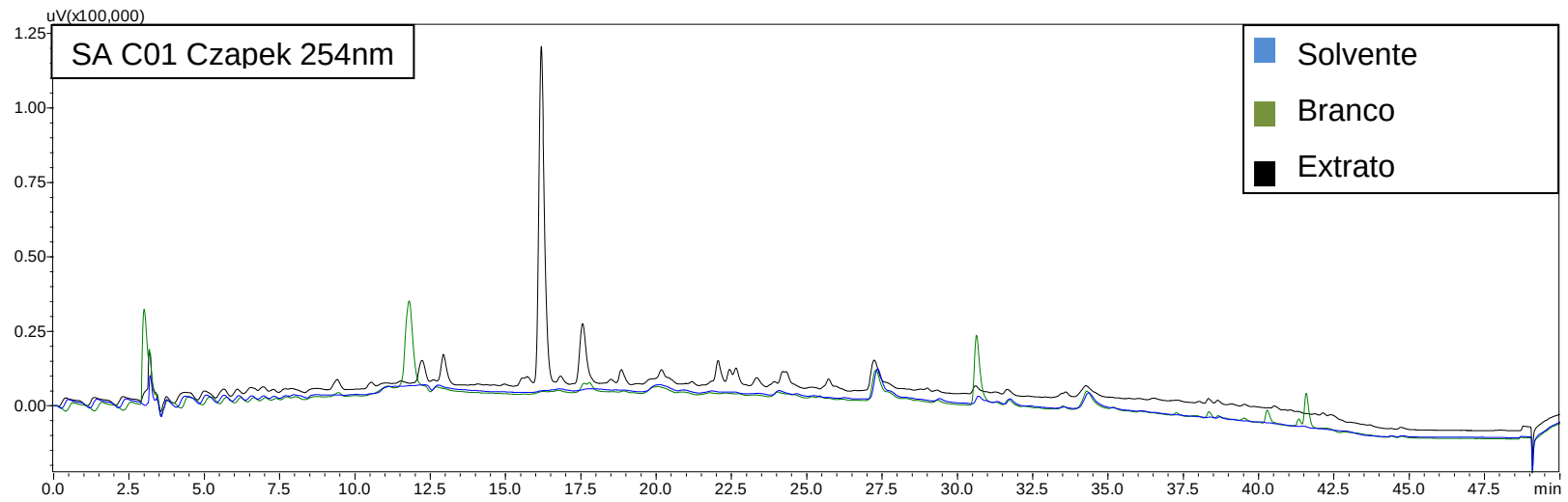
ZHANG, T. Y.; WU, Y. Y.; ZHANG, M. Y.; CHENG, J.; DUBE, B.; YU, H. J.; ZHANG, Y. X. New antimicrobial compounds produced by *Seltsamia galinsogisoli* sp. nov., isolated from *Galinsoga parviflora* as potential inhibitors of FtsZ. **Scientific Reports**, vol. 9, no. 1, p. 1–11, 2019. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-44810-2>.

ZHU, Y.; DONG, J.; WANG, L.; ZHOU, W.; LI, L.; HE, H.; LIU, H.; ZHANG, K. Screening and isolation of anti-nematodal metabolites against *bursaphelenchus xylophilus* produced by fungi and plant. **Annals of Microbiology**, vol. 58, no. 3, p. 347–358, 2008. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8455-3_29.

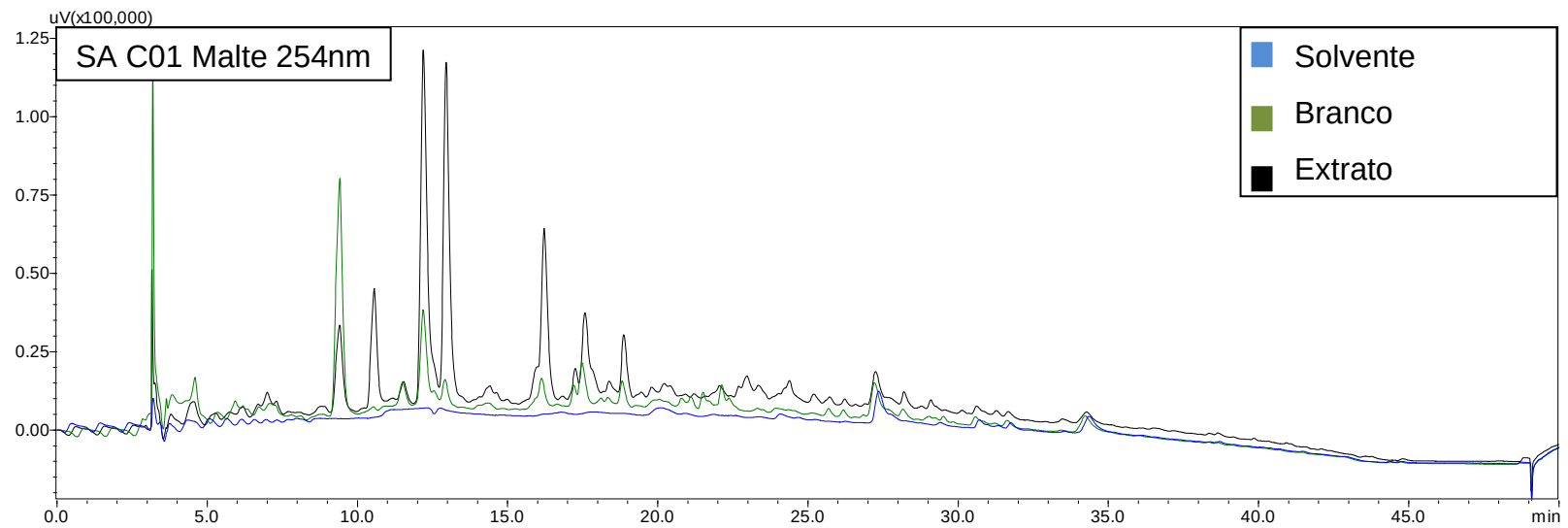
ZYNDA, T. **Phytoremediation— A community fact sheet**. Great Lakes Mid-Atlantic. Center for Hazardous Substance Research.: [s. n.], 2005.

APÊNDICE

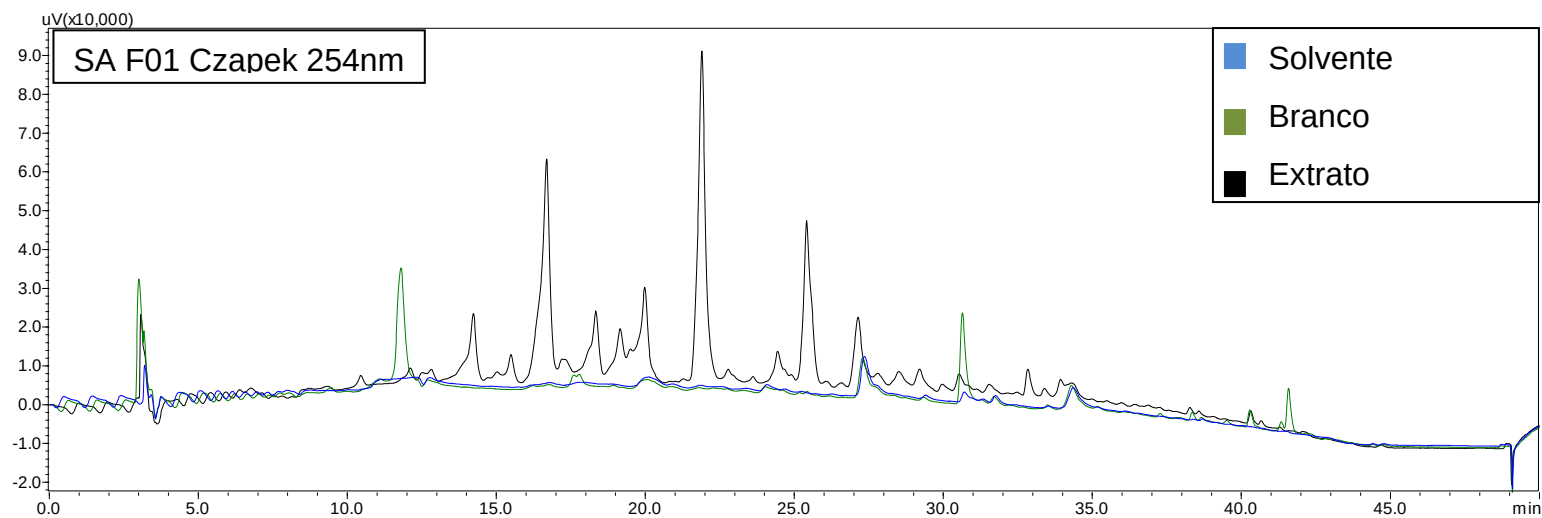
APÊNDICE 1. Cromatograma de SA-C01 em Czapek.



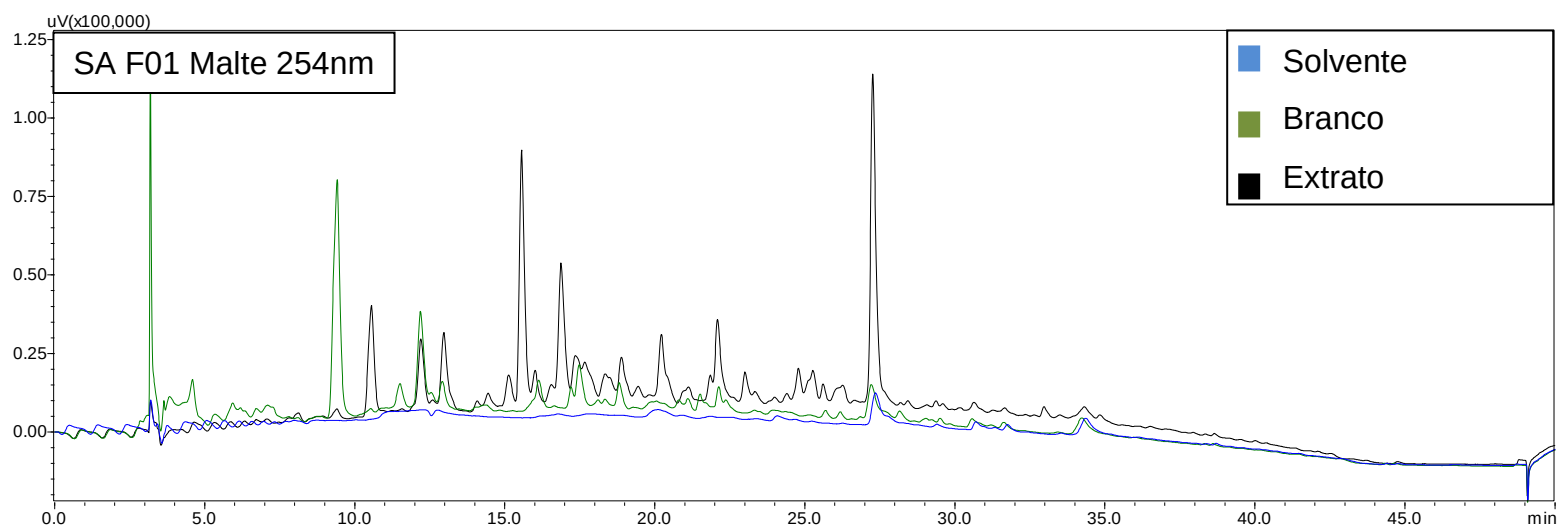
APÊNDICE 2. Cromatograma de SA-C01 em Malte.



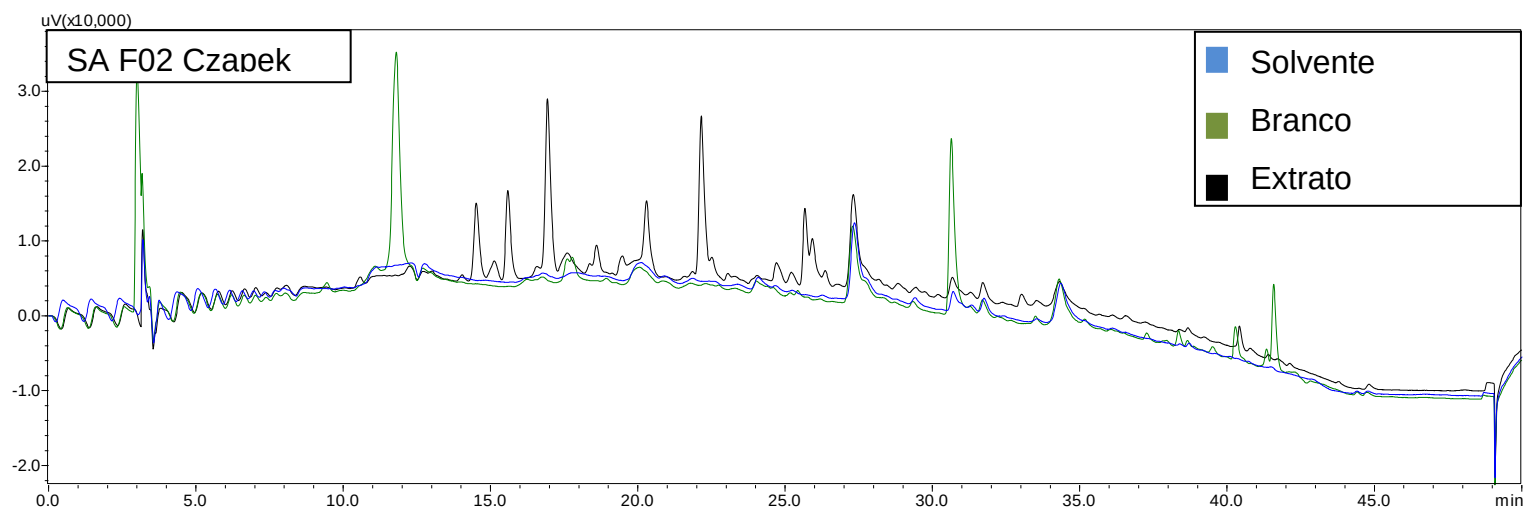
APÊNDICE 3. Cromatograma de SA-F01 em Czapek.



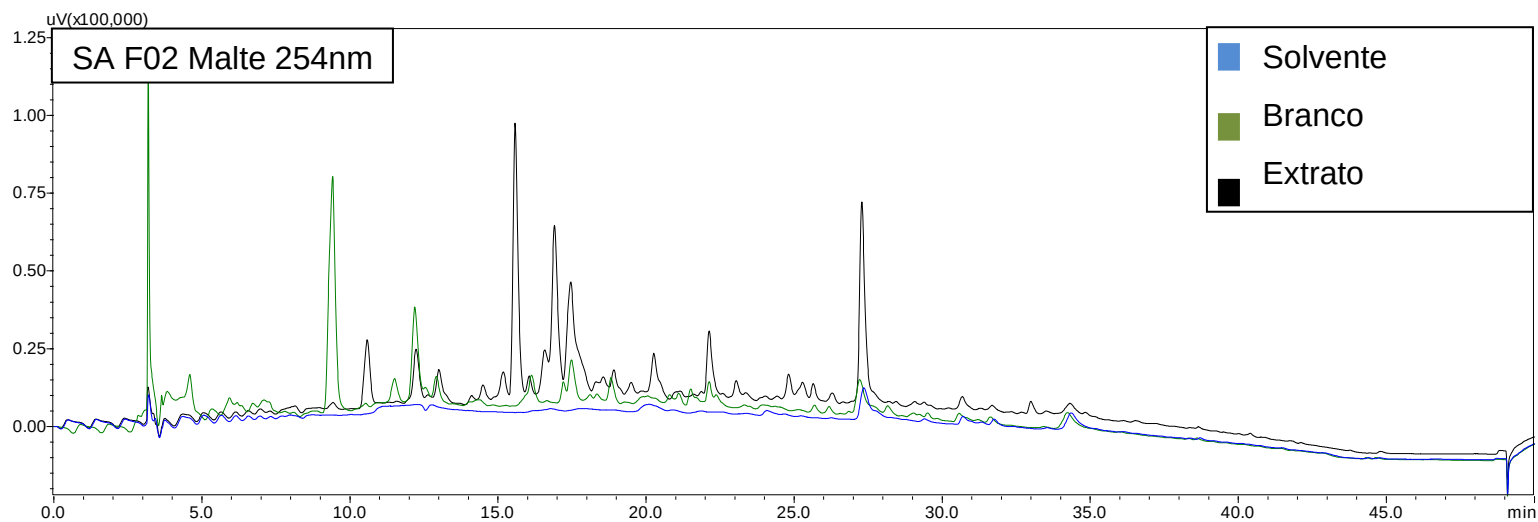
APÊNDICE 4. Cromatograma de SA-F01 em Malte.



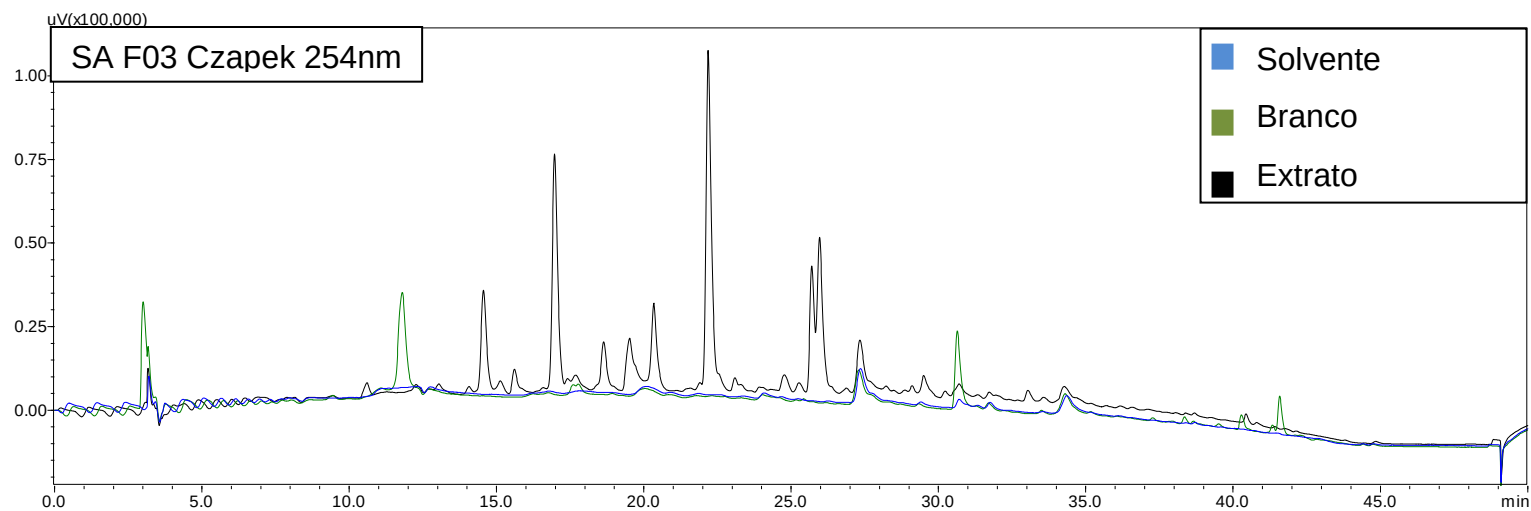
APÊNDICE 5. Cromatograma de SA-F02 em Czapek.



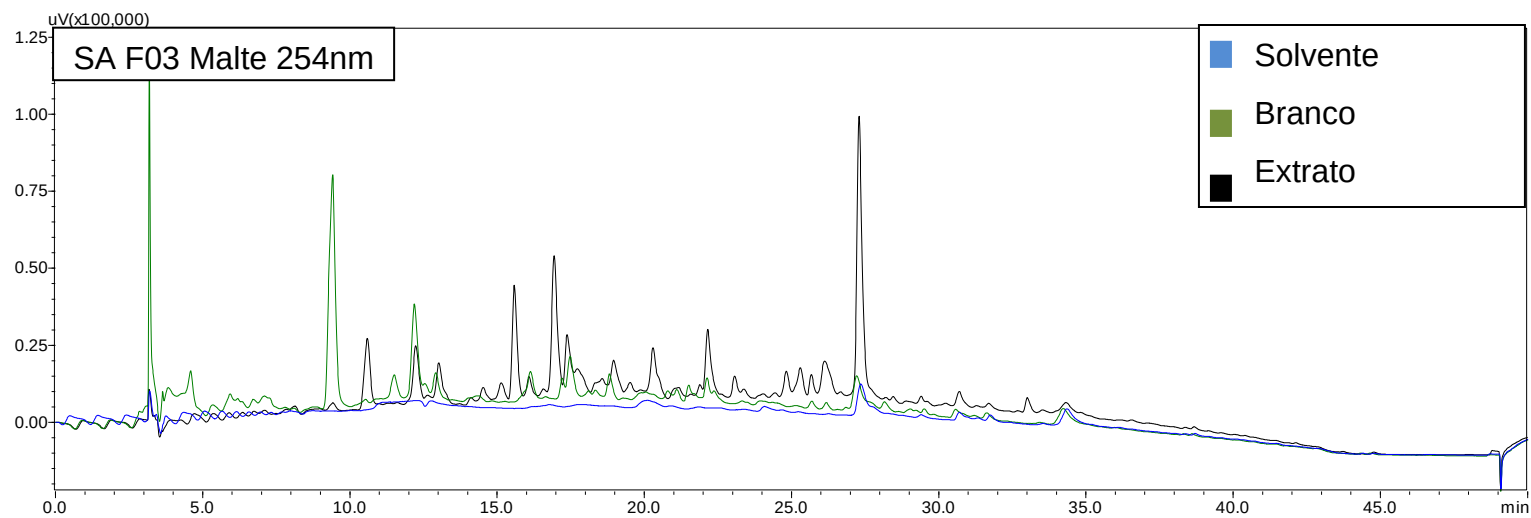
APÊNDICE 6. Cromatograma de SA-F02 em Malte.



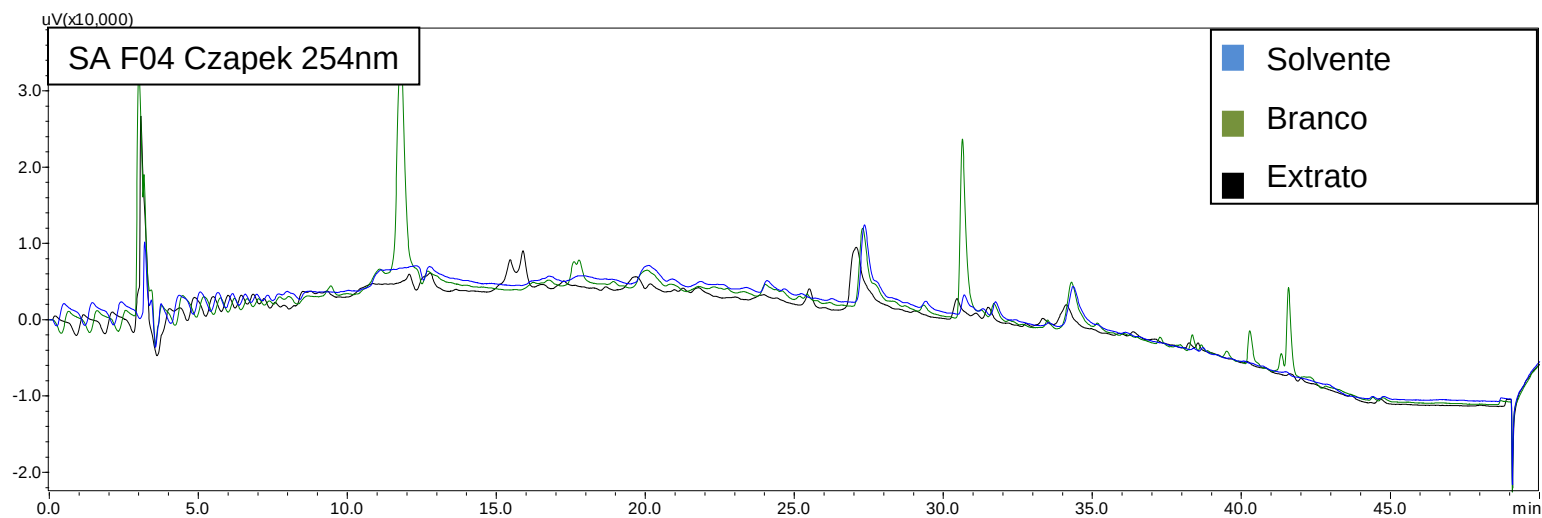
APÊNDICE 7. Cromatograma de SA-F03 em Czapek.



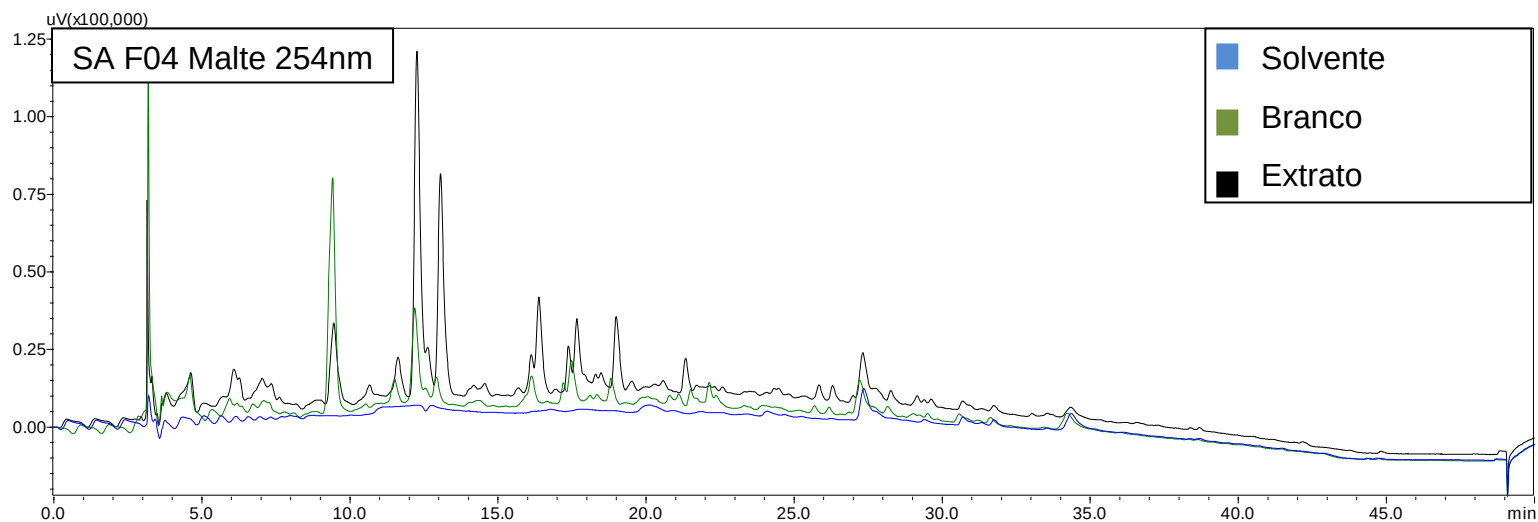
APÊNDICE 8. Cromatograma de SA-F03 em Malte.



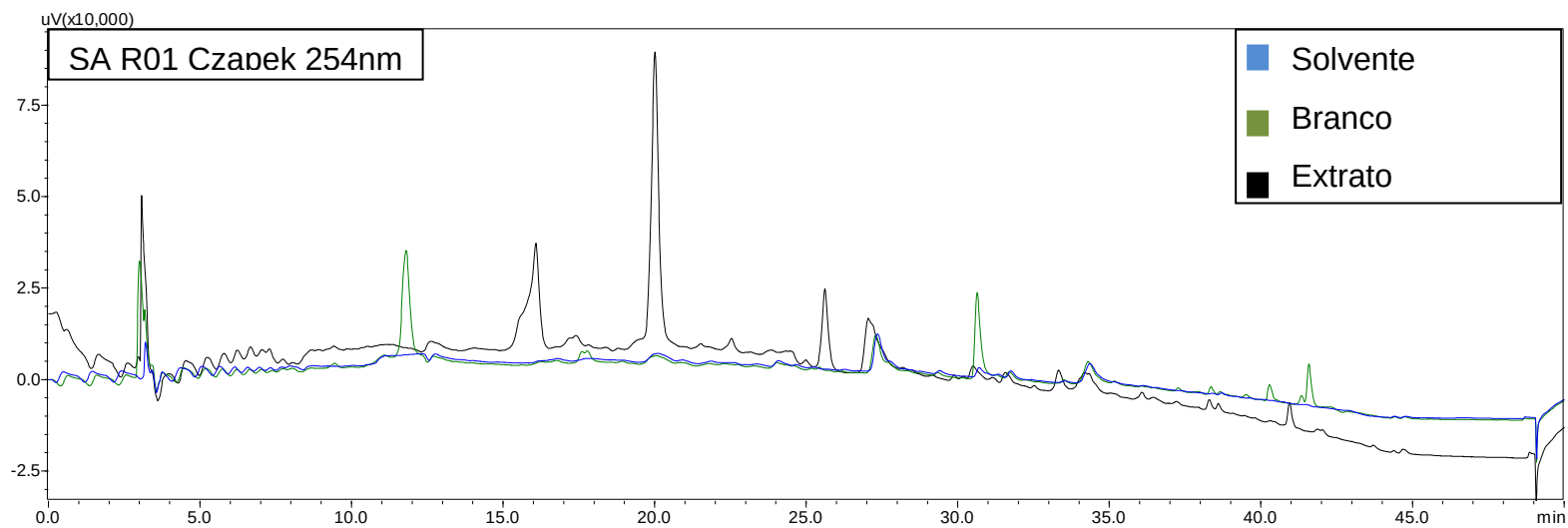
APÊNDICE 9. Cromatograma de SA-F04 em Czapek.



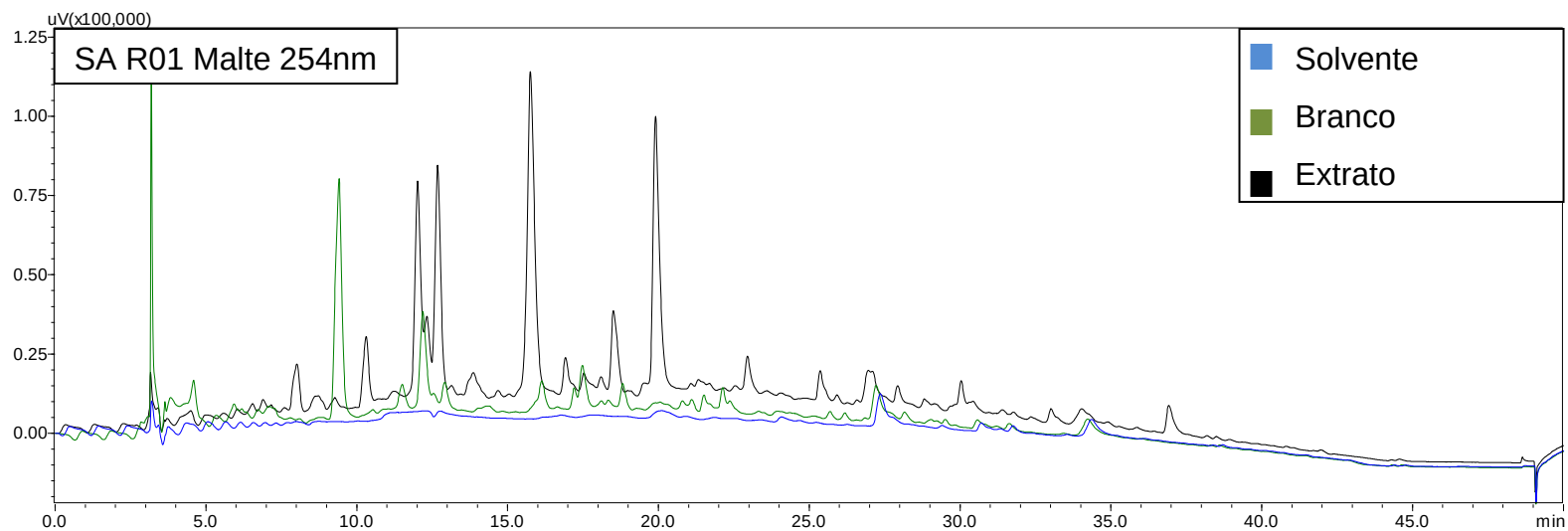
APÊNDICE 10. Cromatograma de SA-F04 em Malte.



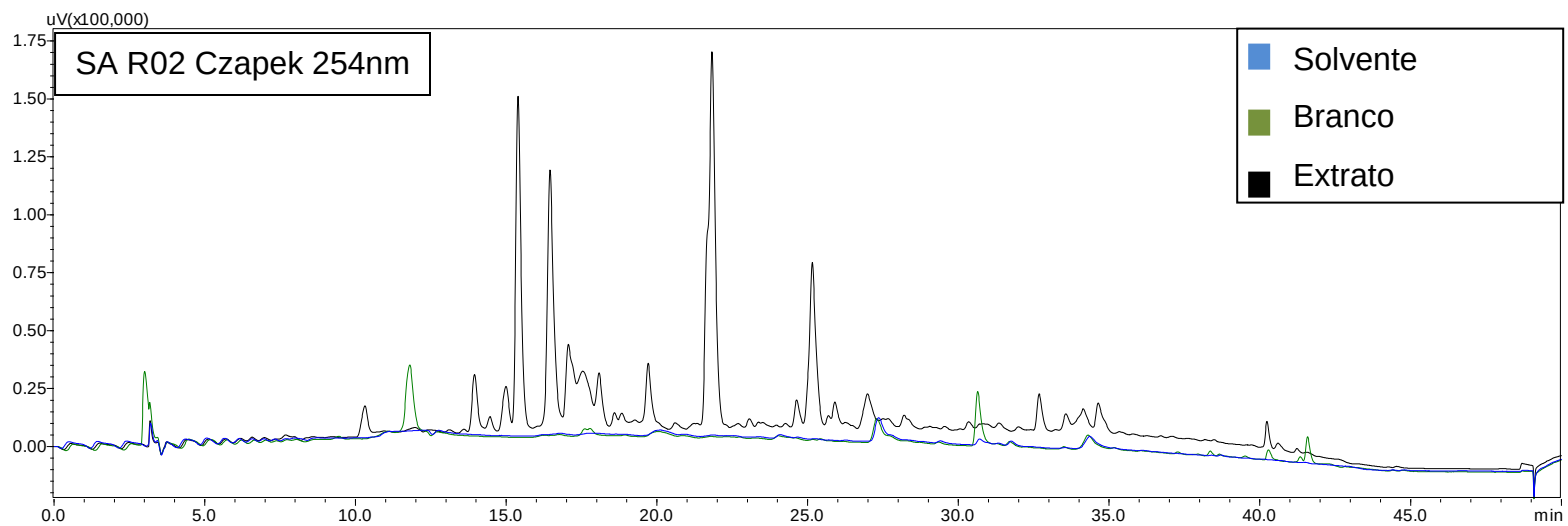
APÊNDICE 11. Cromatograma de SA-R01 em Czapek.



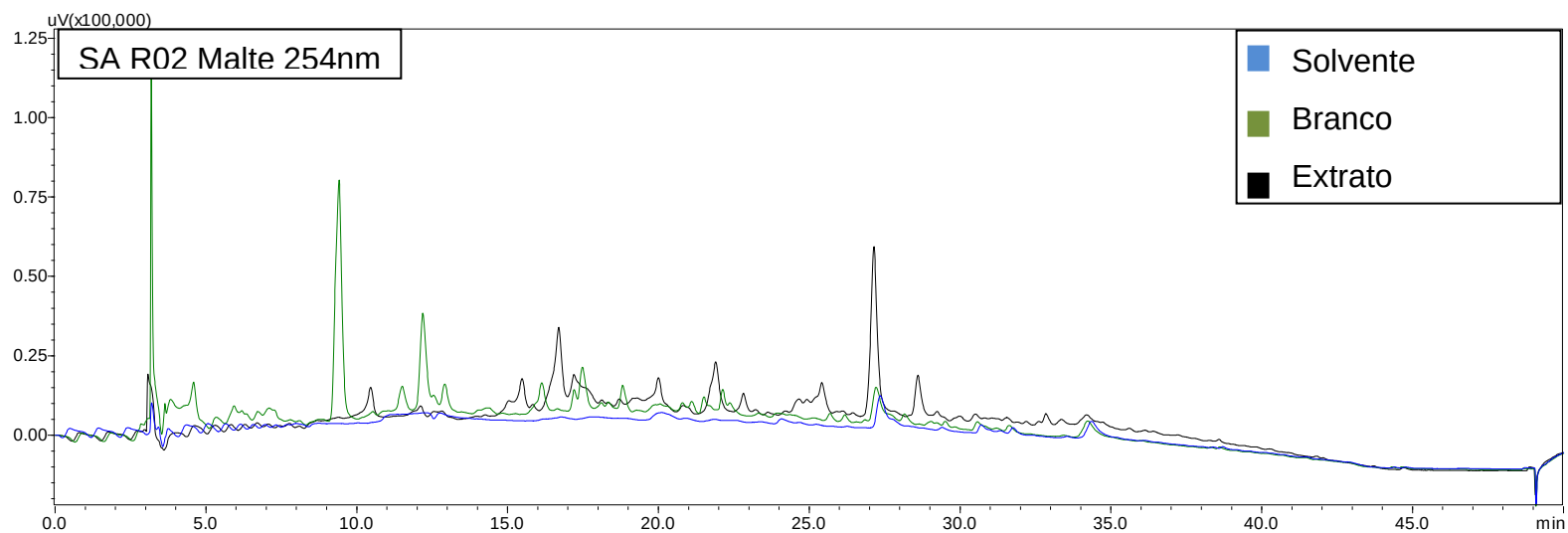
APÊNDICE 12. Cromatograma de SA-R01 em Malte.



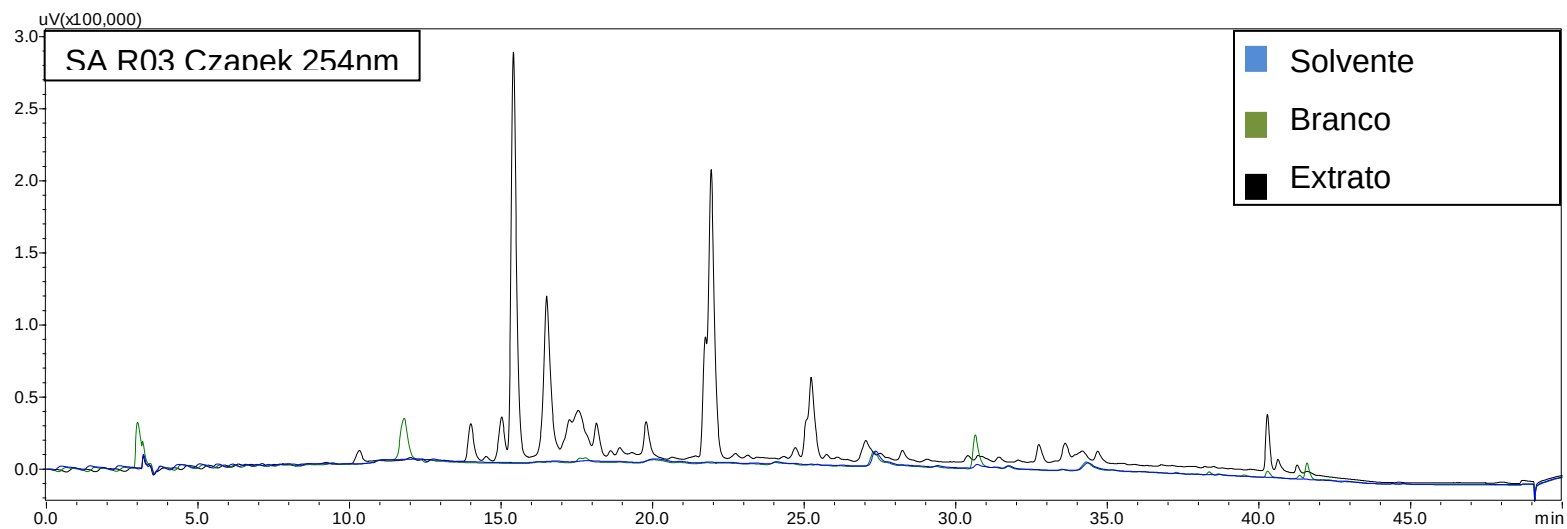
APÊNDICE 13. Cromatograma de SA-R02 em Czapek.



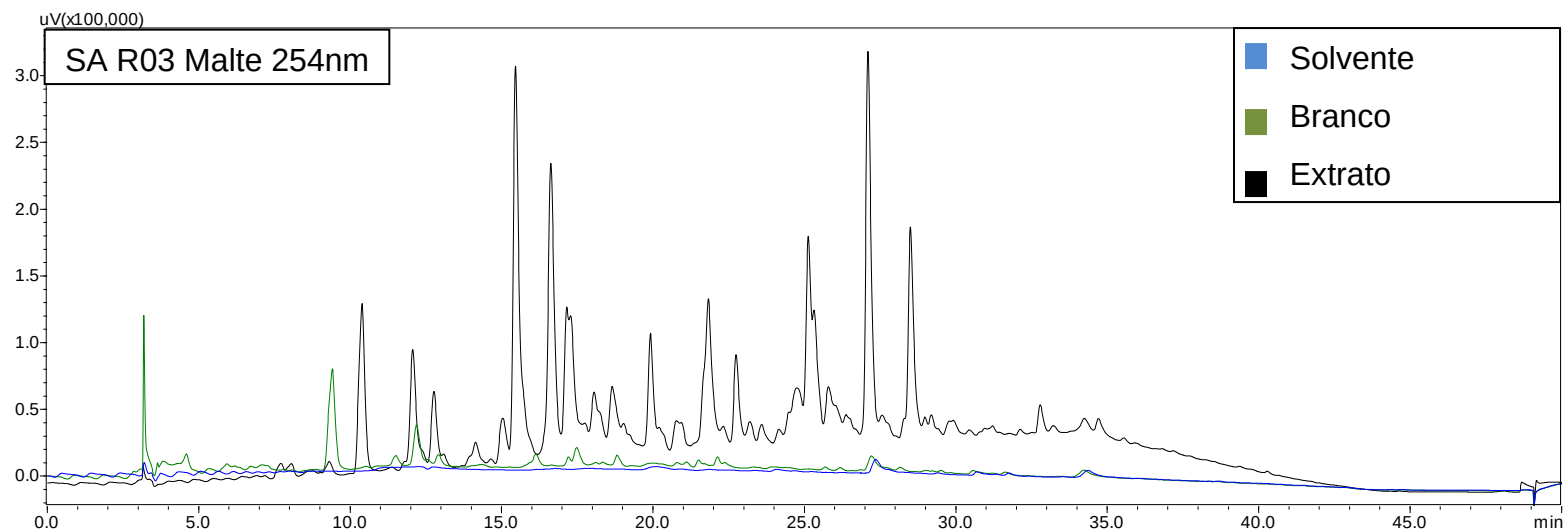
APÊNDICE 14. Cromatograma de SA-R02 em Malte.



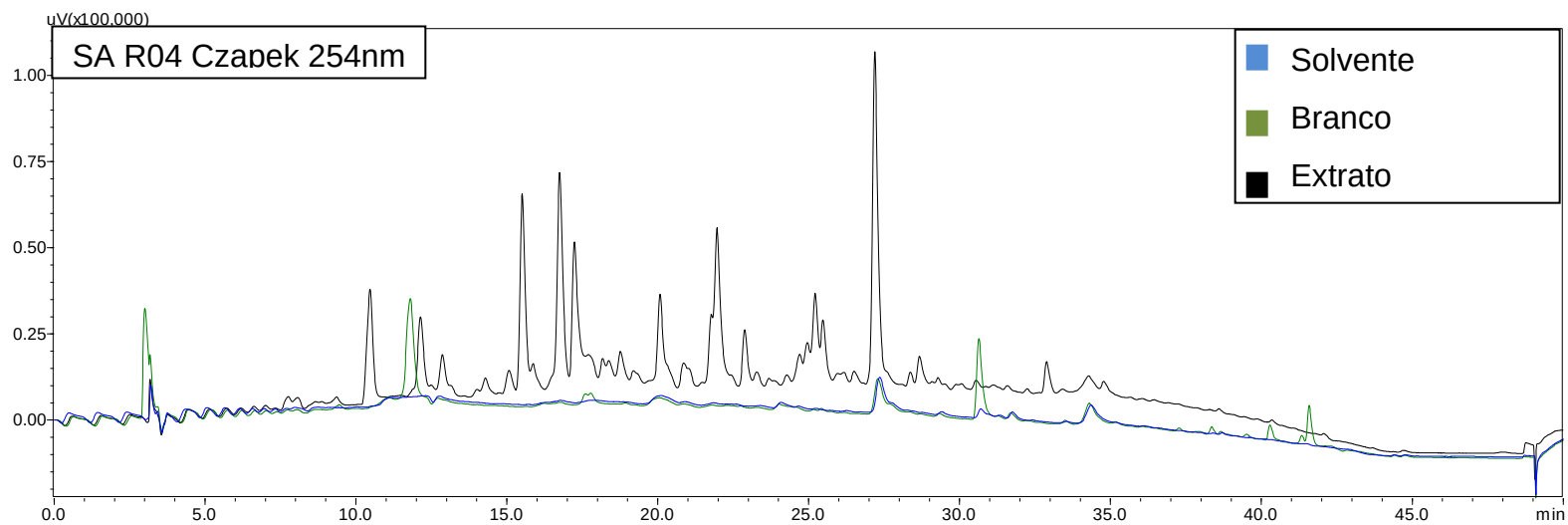
APÊNDICE 15. Cromatograma de SA-R03 em Czapek.



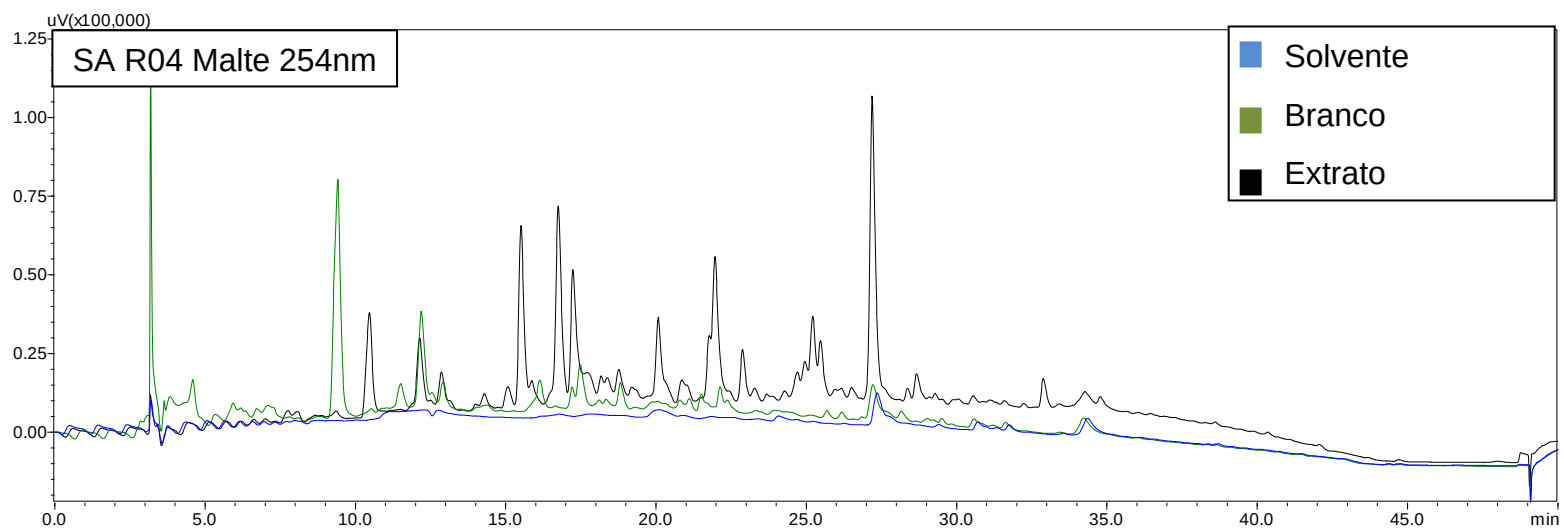
APÊNDICE 16. Cromatograma de SA-R03 em Malte.



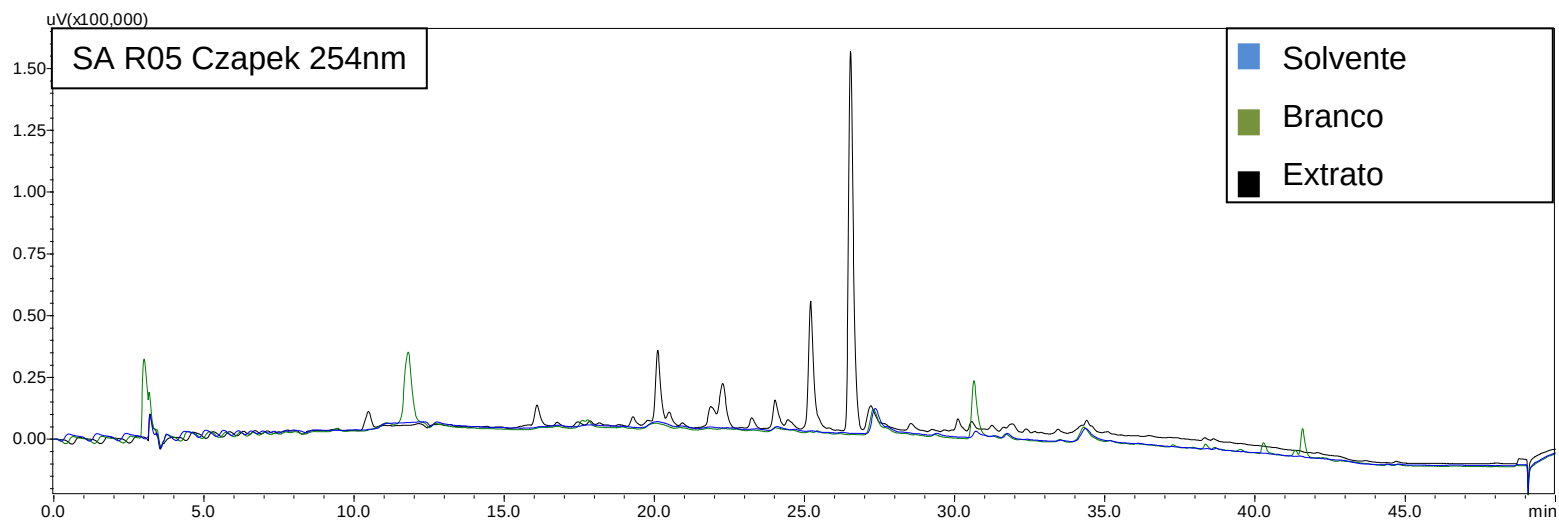
APÊNDICE 17. Cromatograma de SA-R04 em Czapek.



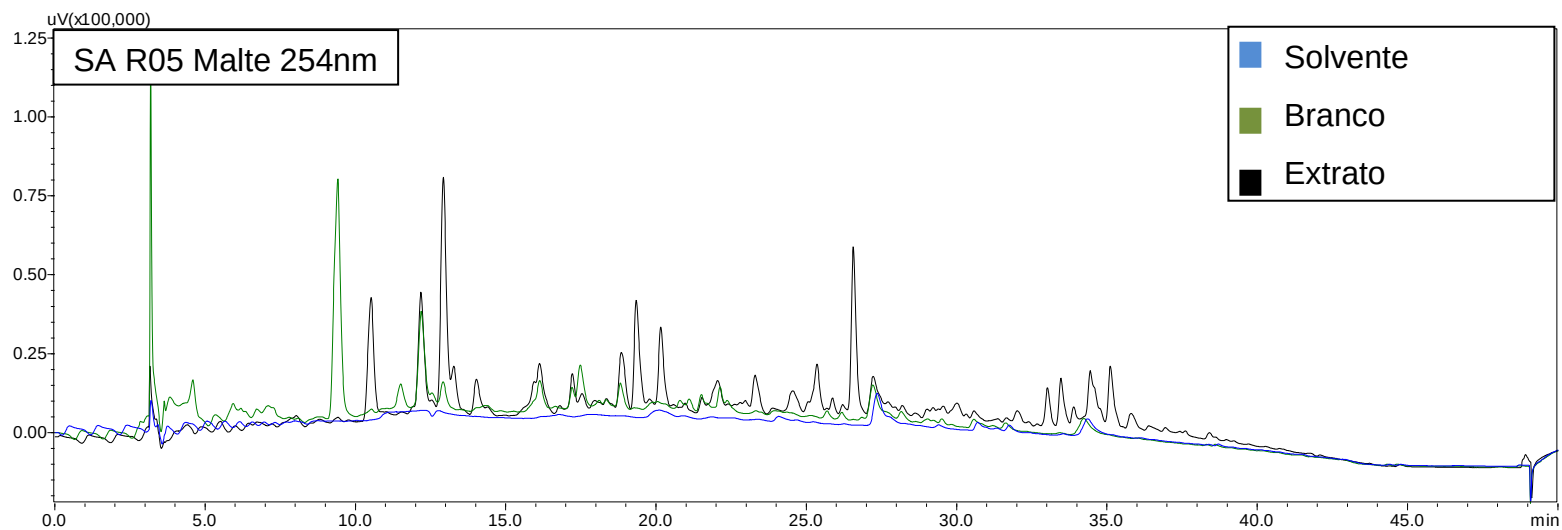
APÊNDICE 18. Cromatograma de SA-R04 em Malte.



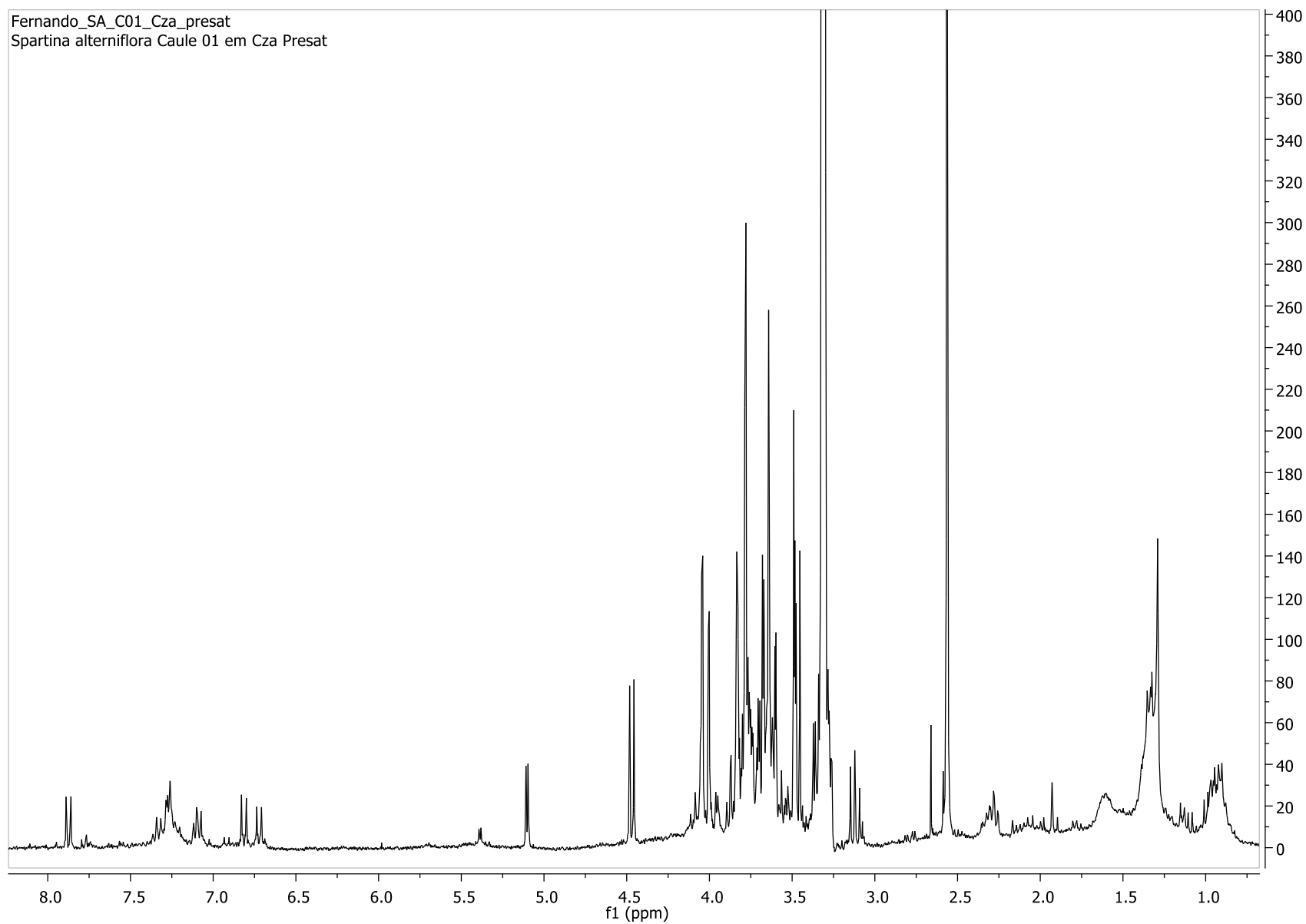
APÊNDICE 19. Cromatograma de SA-R05 em Czapek.



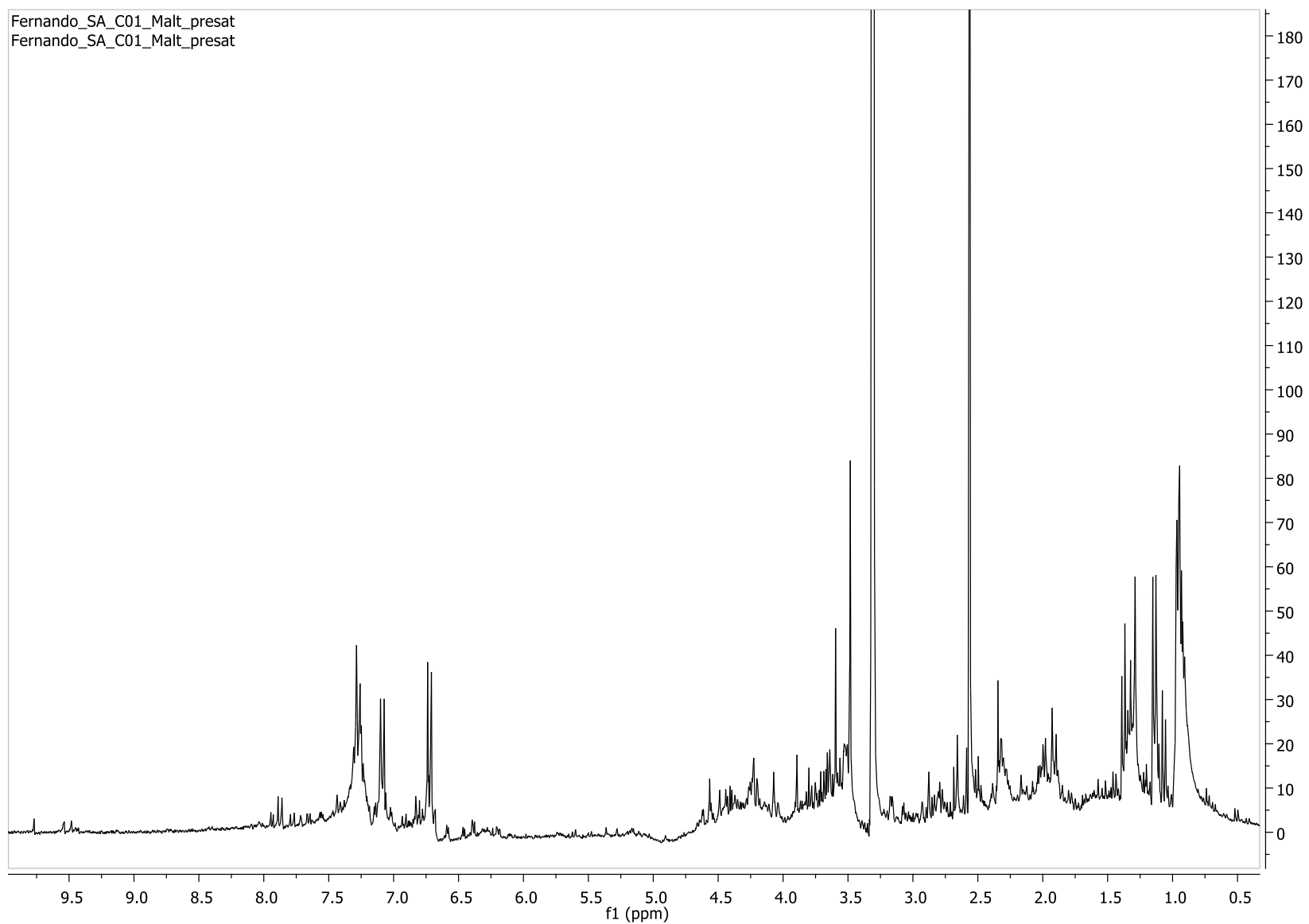
APÊNDICE 20. Cromatograma de SA-R05 em Malte.



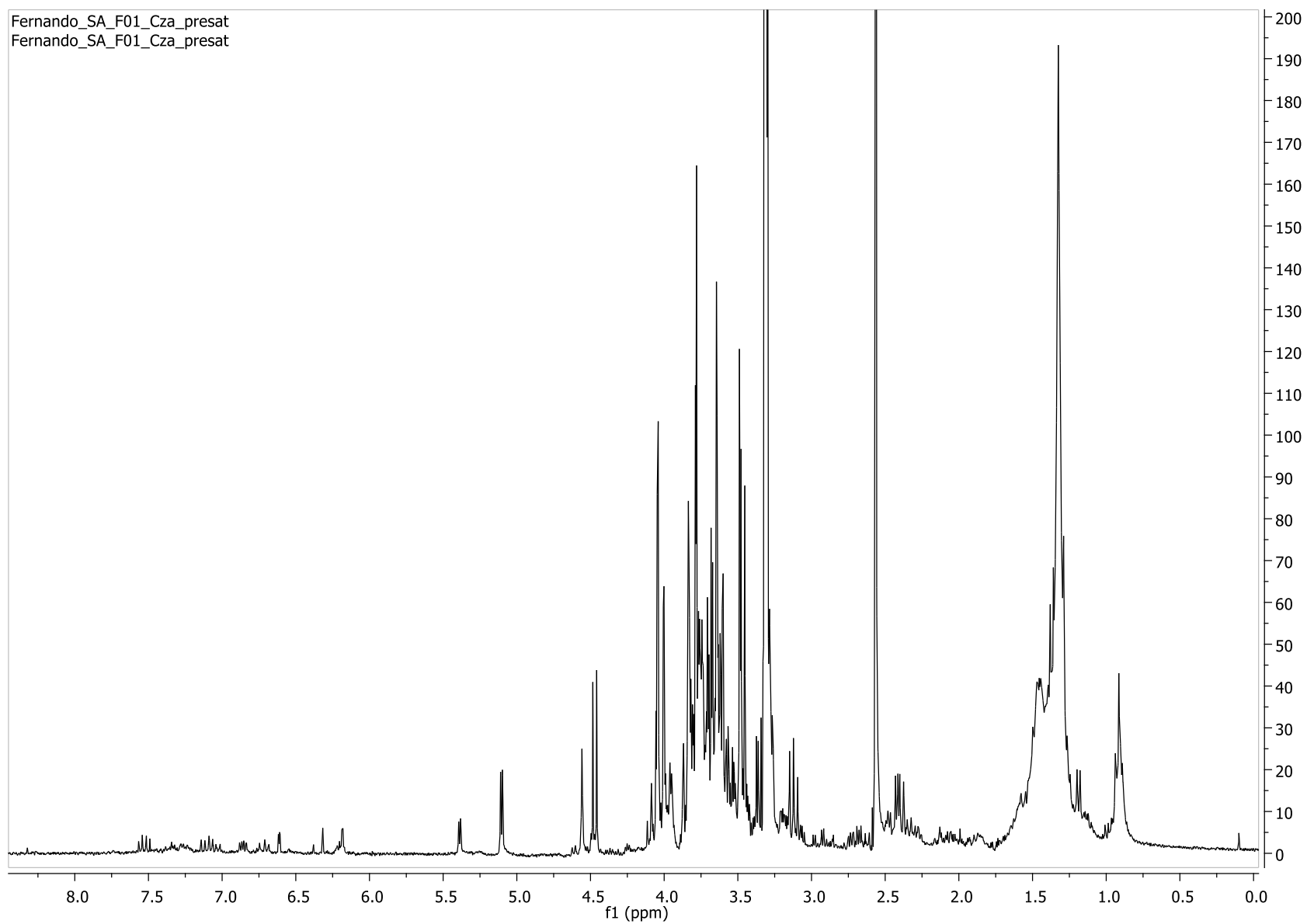
APÊNDICE 21. Espectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-C01 em Czapek.



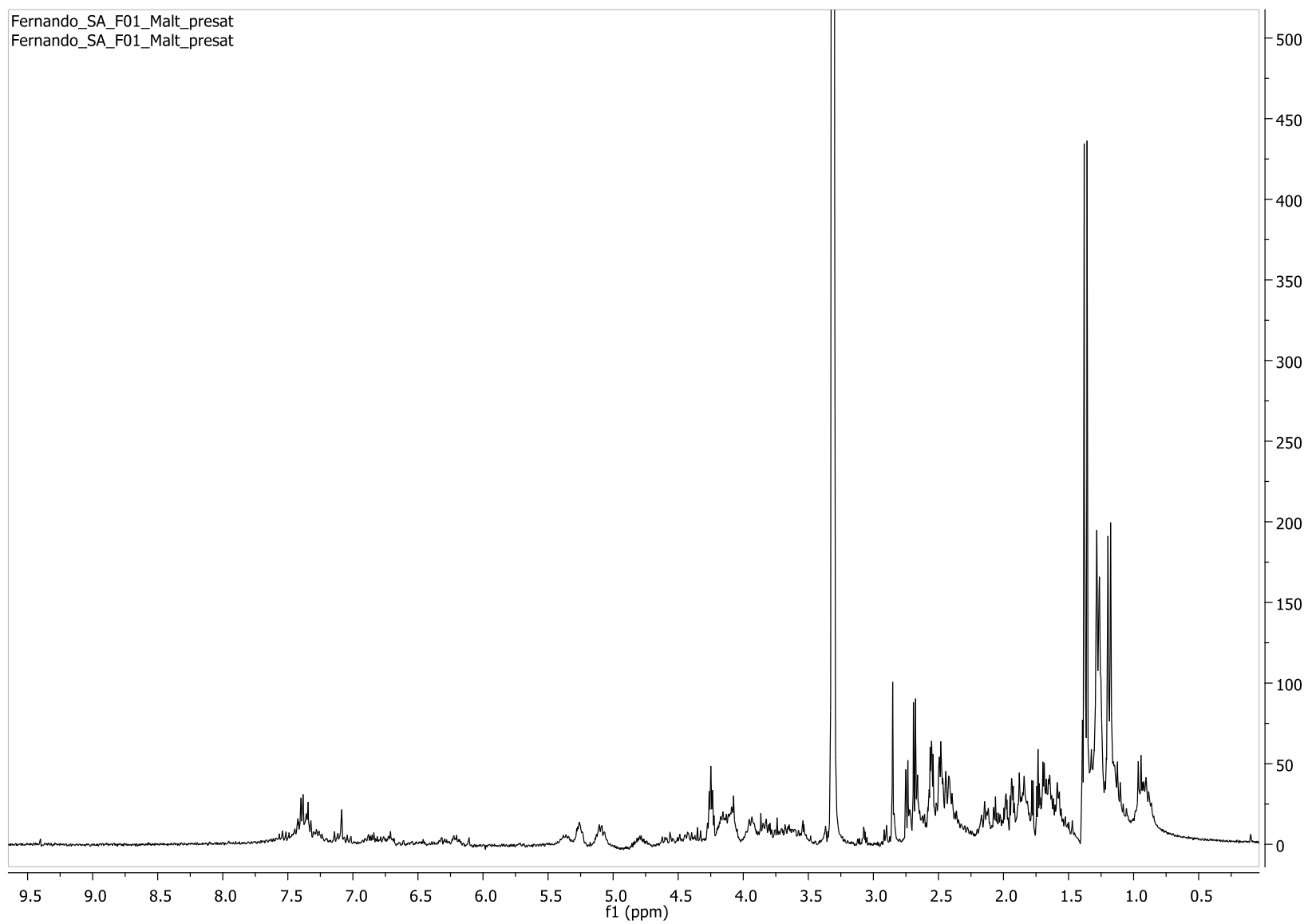
APÊNDICE 22. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-C01 em Malte.



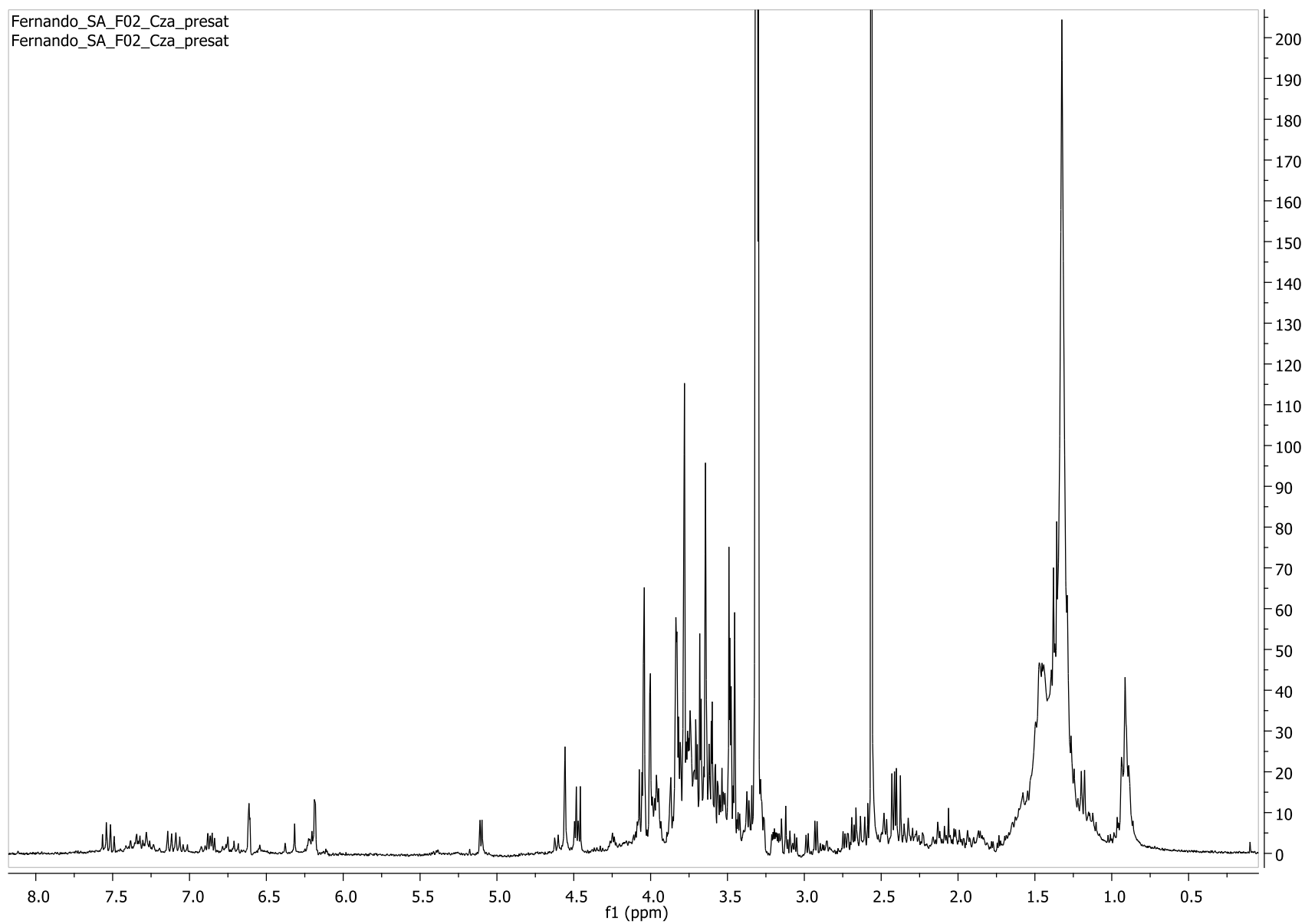
APÊNDICE 23. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-F01 em Czapek.



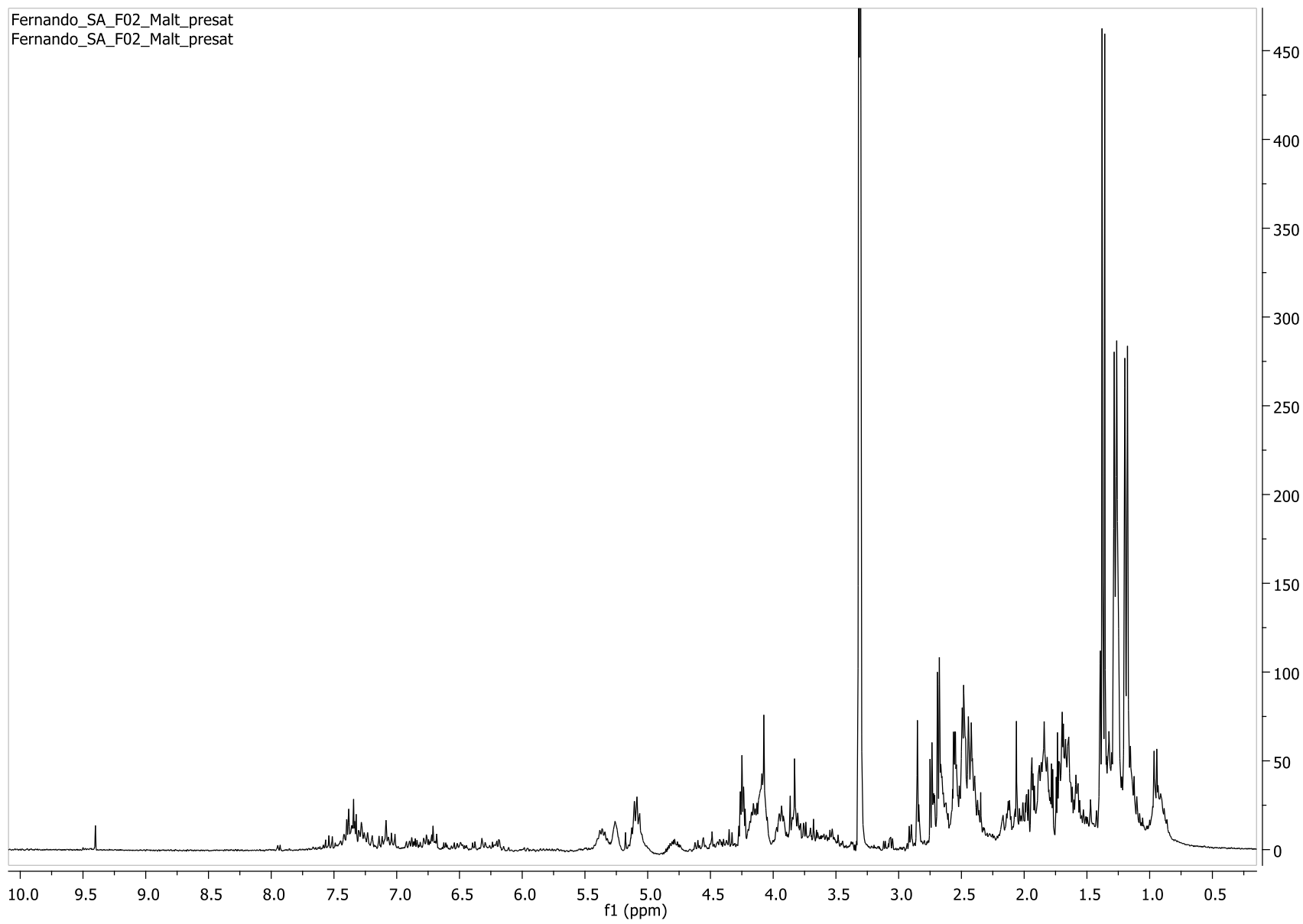
APÊNDICE 24. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-F01 em Malte.



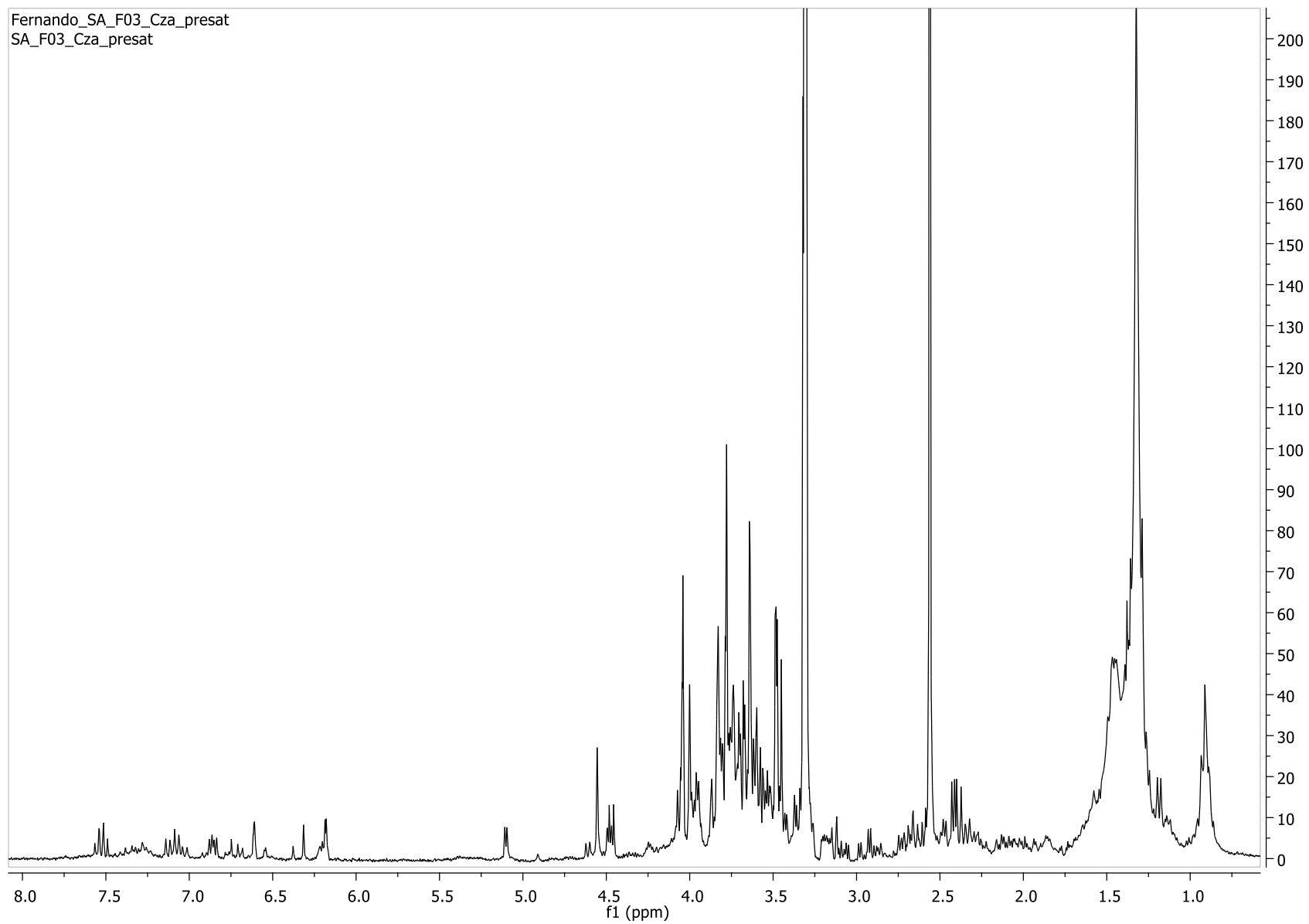
APÊNDICE 25. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-F02 em Czapek.



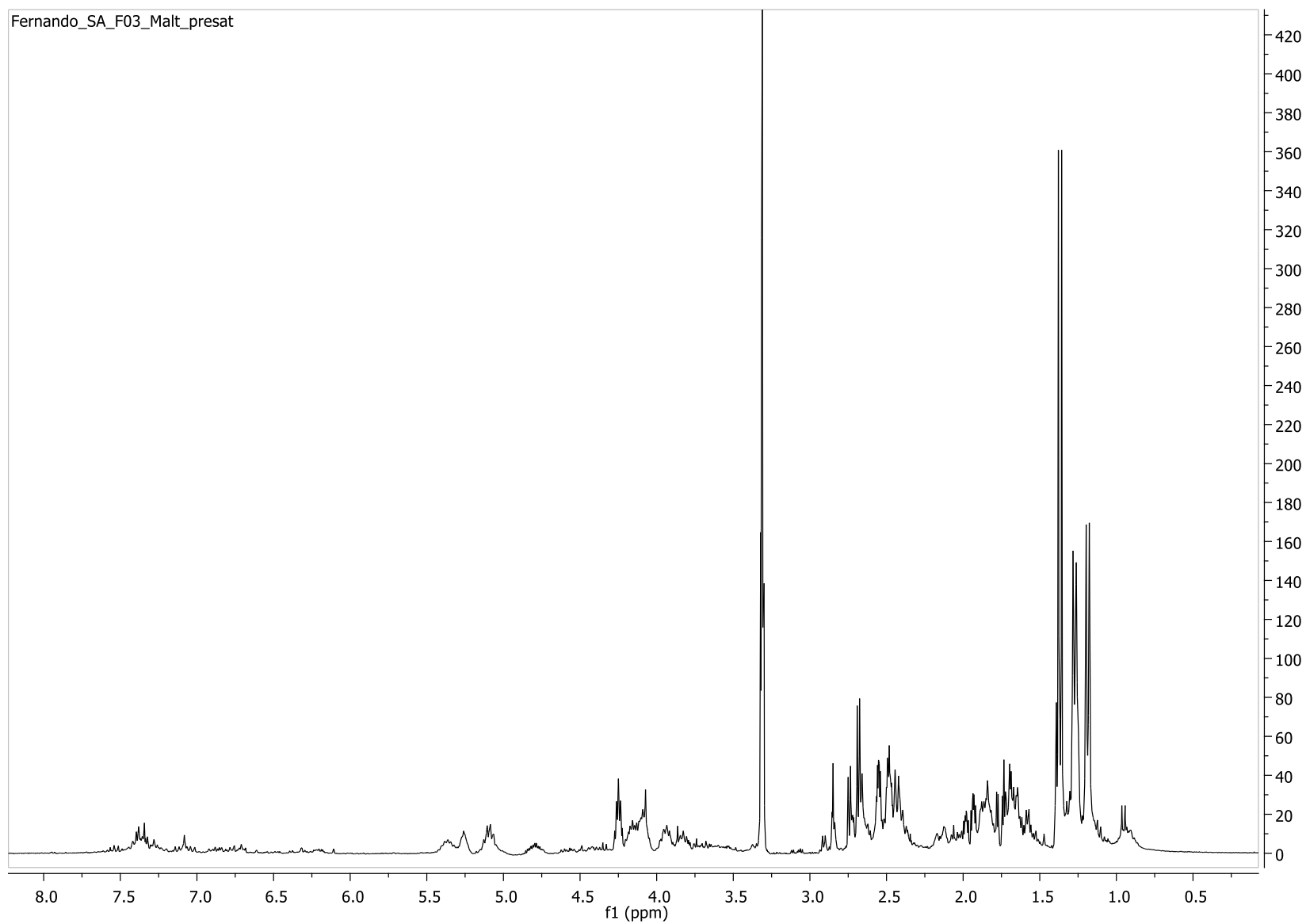
APÊNDICE 26. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-F02 em Malte.



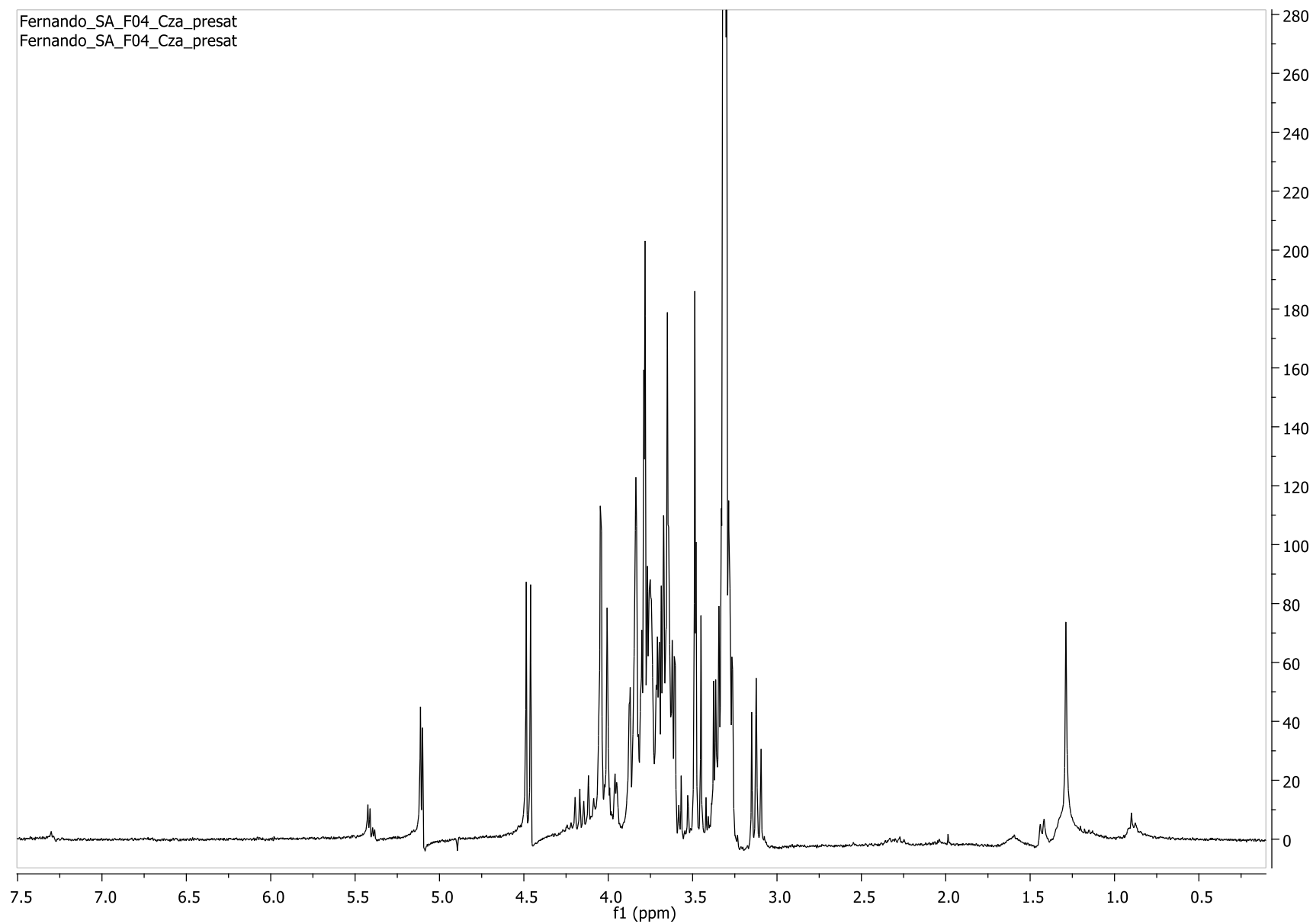
APÊNDICE 27. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-F03 em Czapek.



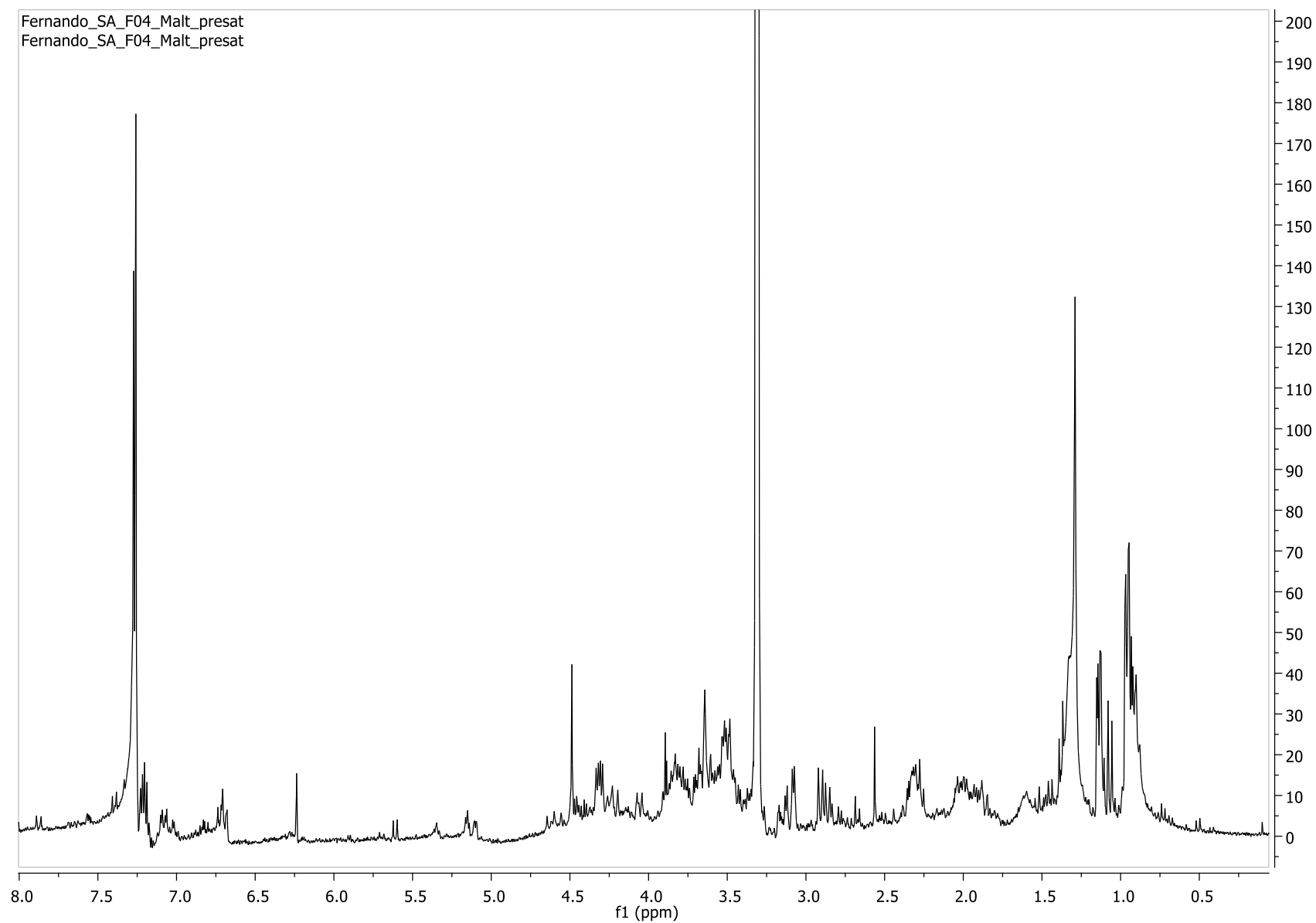
APÊNDICE 28. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-F03 em Malte.



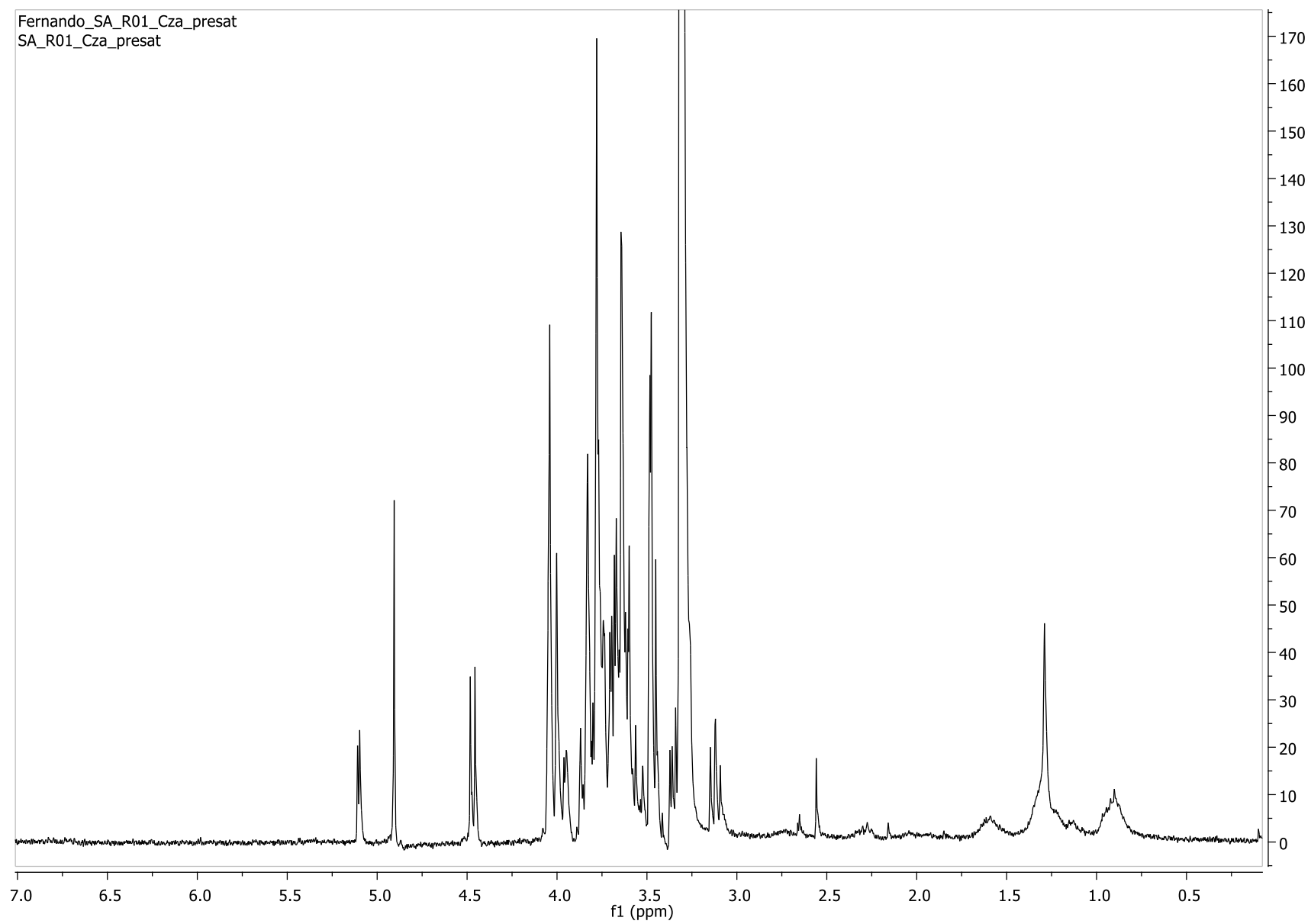
APÊNDICE 29. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-F04 em Czapek.



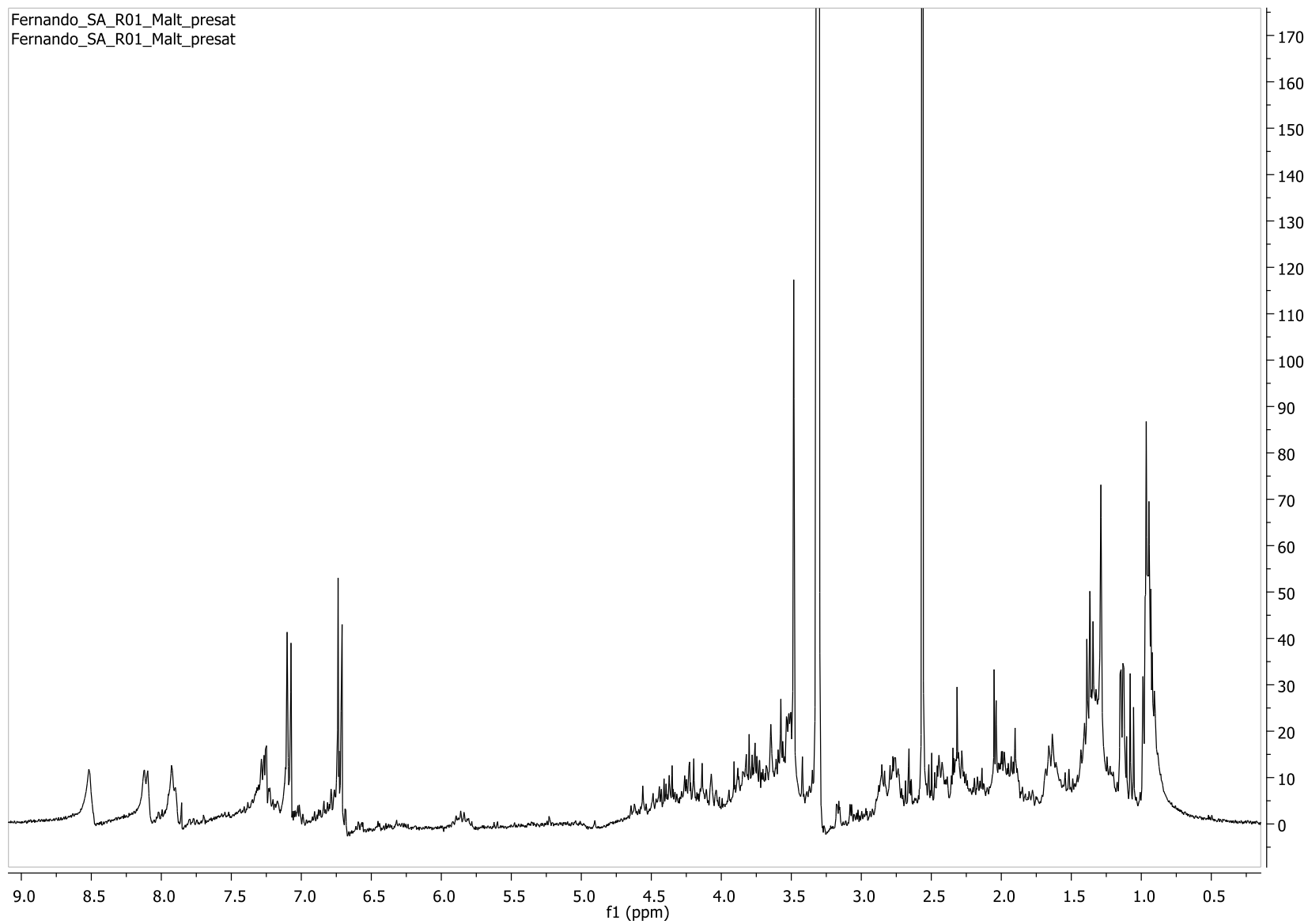
APÊNDICE 30. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-F04 em Malte.



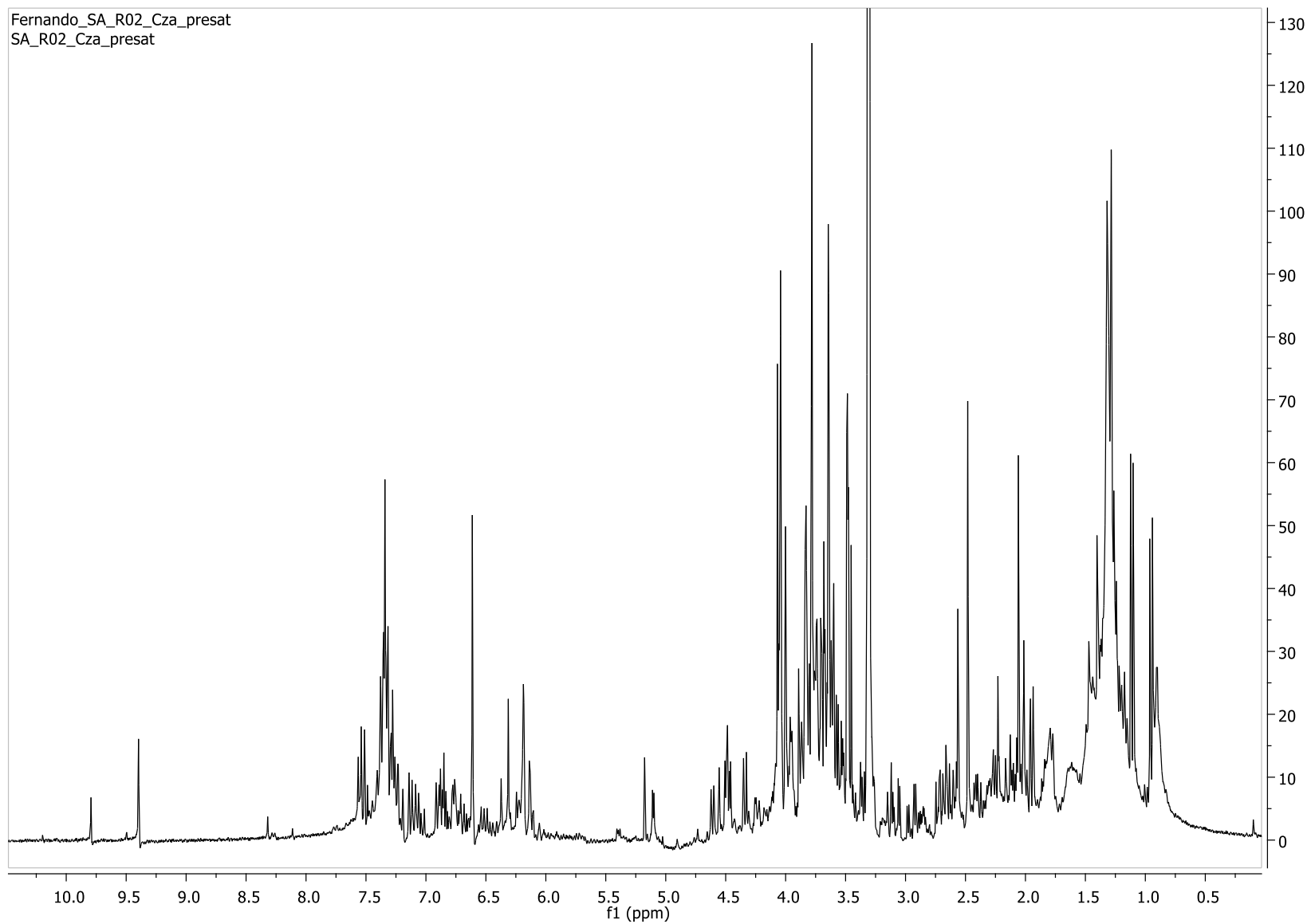
APÊNDICE 31. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-R01 em Czapek.



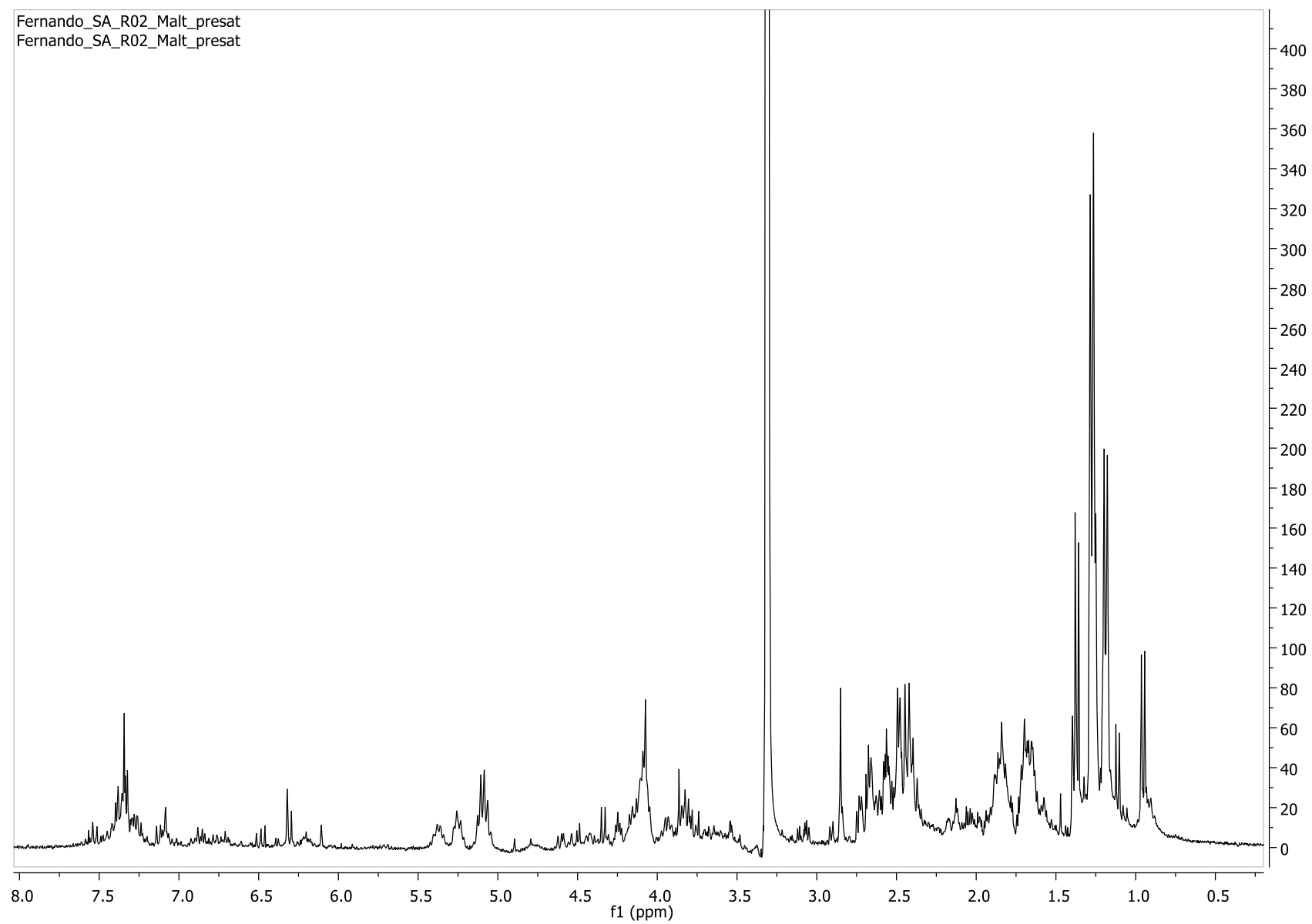
APÊNDICE 32. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-R01 em Malte.



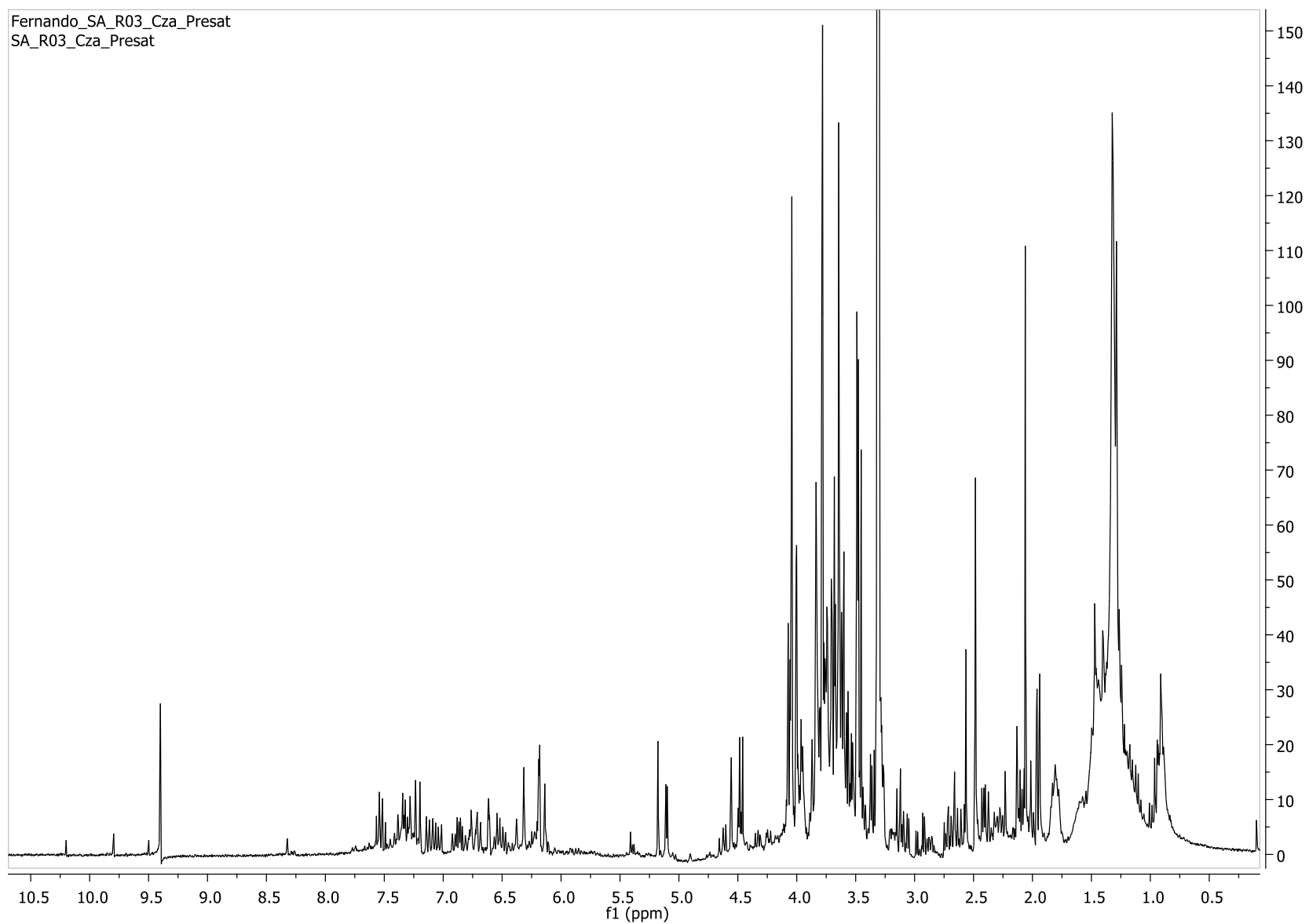
APÊNDICE 33. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-R02 em Czapek.



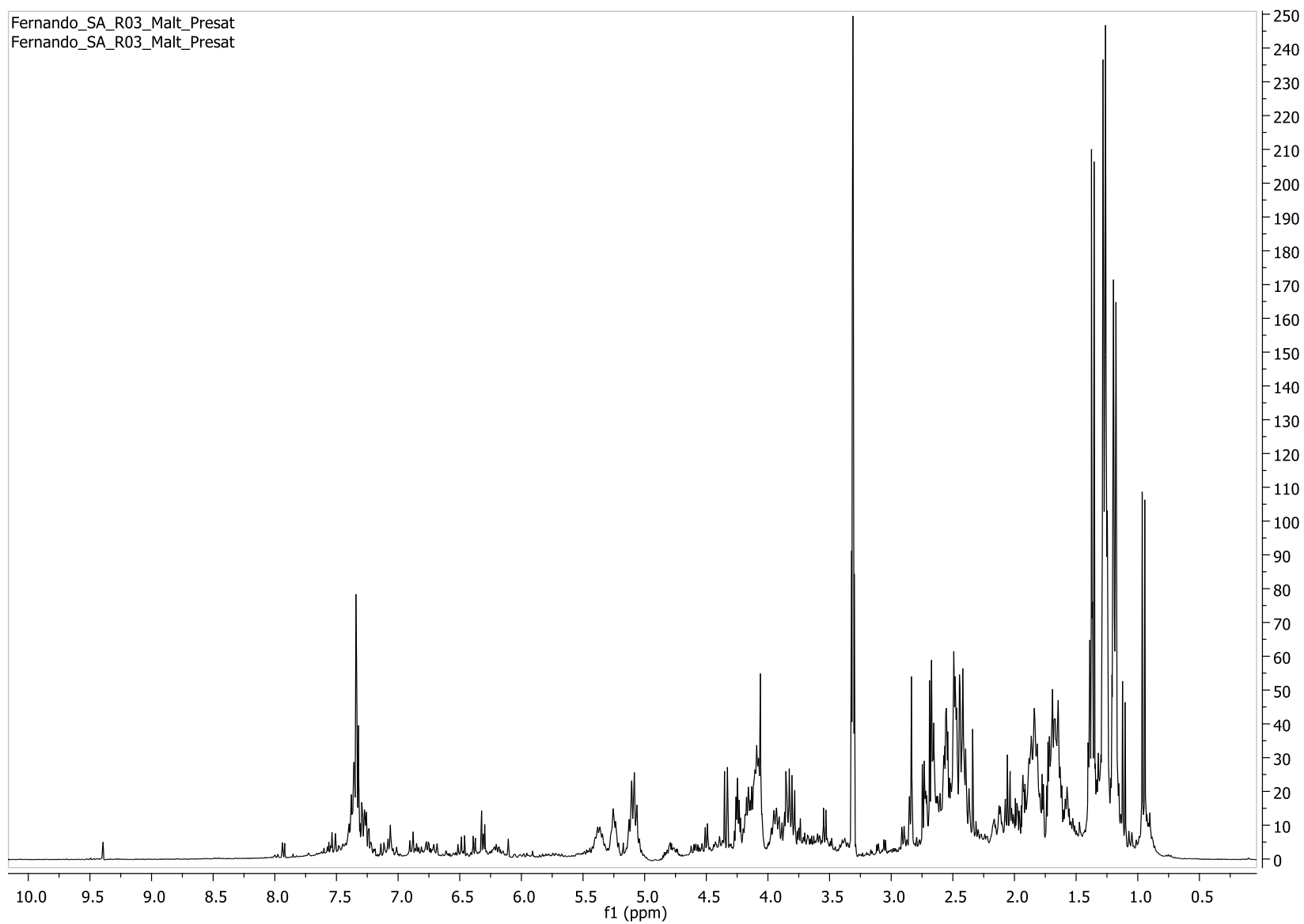
APÊNDICE 34. Espectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-R02 em Malte.



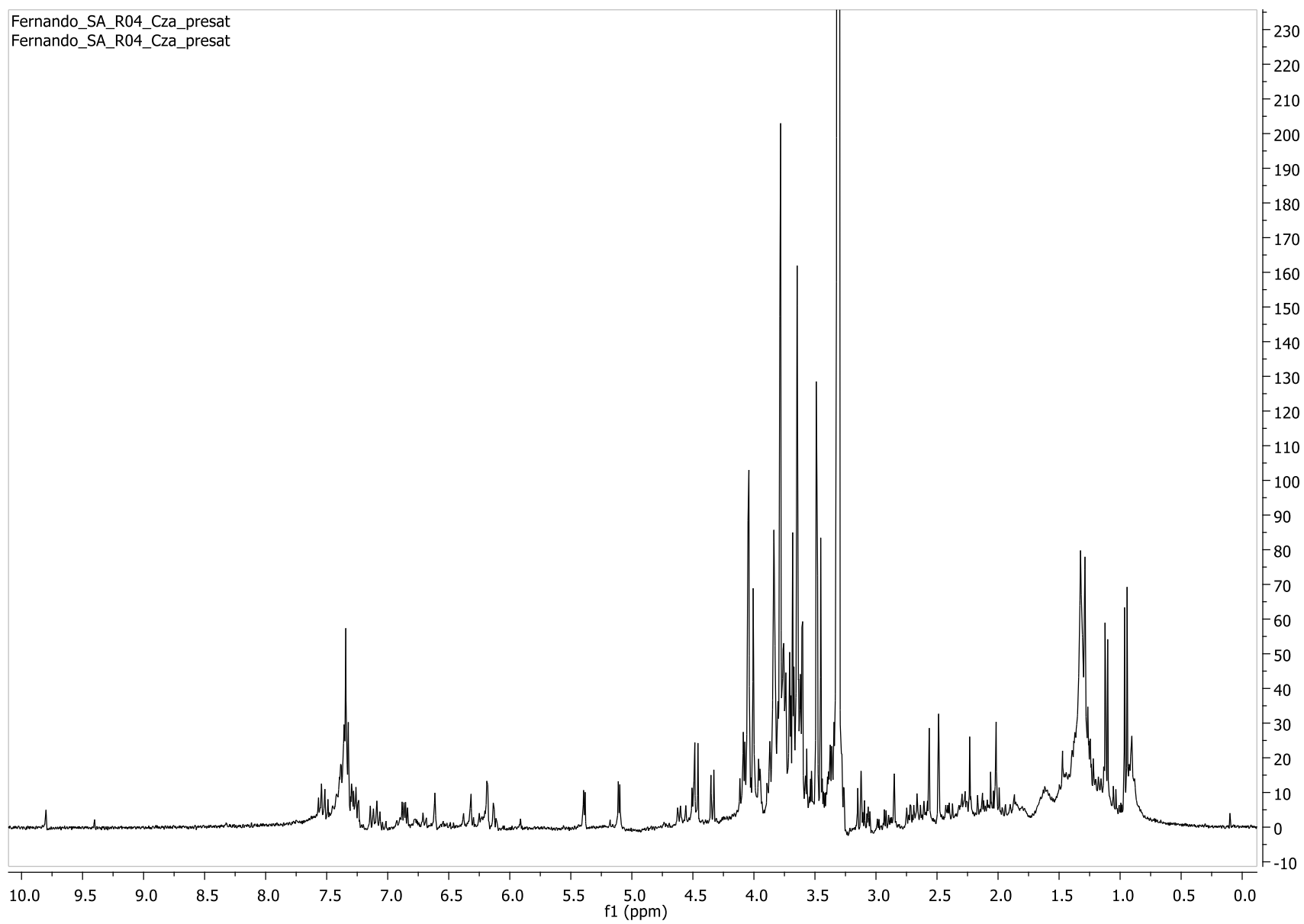
APÊNDICE 35. Espectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-R03 em Czapek.



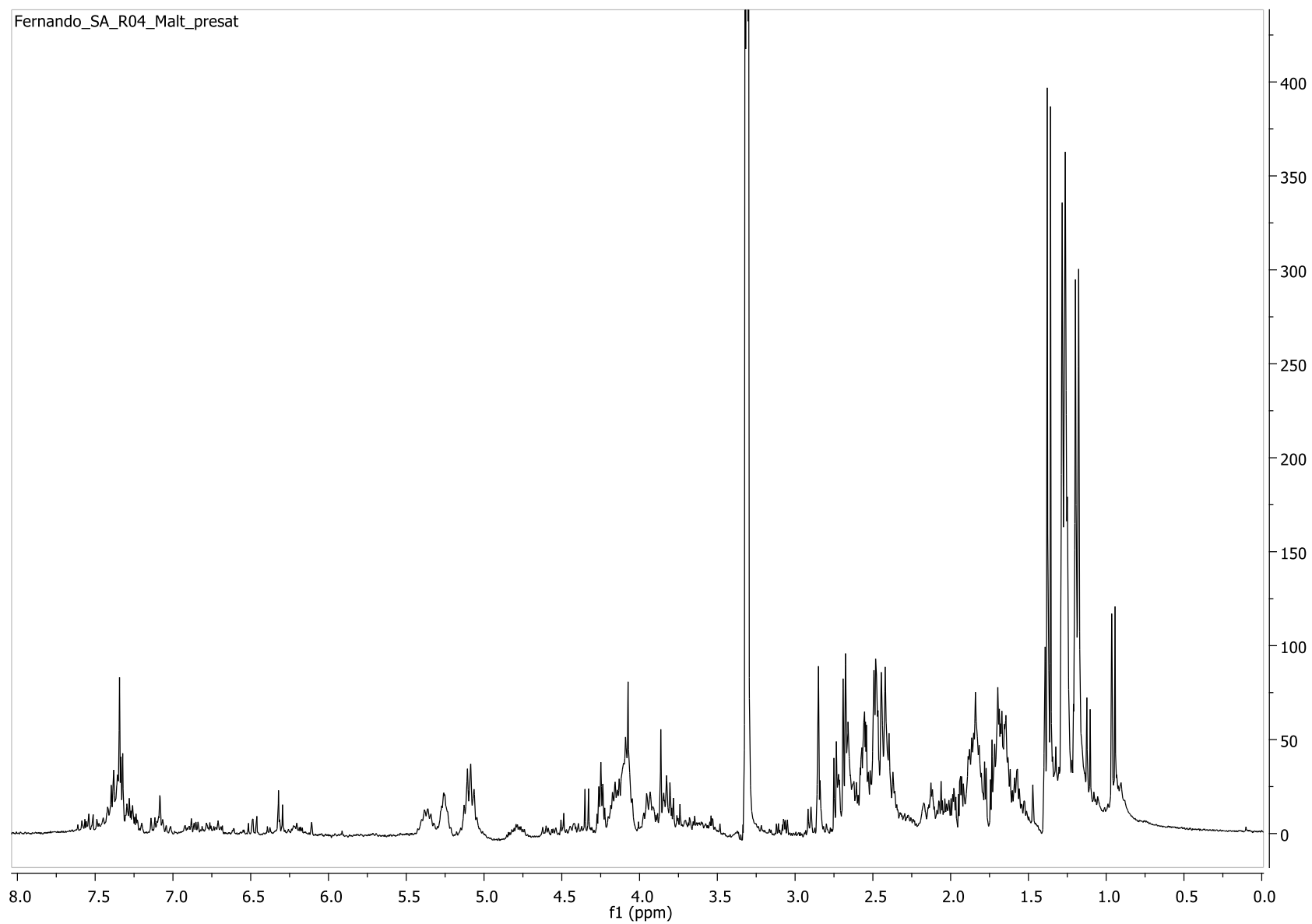
APÊNDICE 36. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-R03 em Malte.



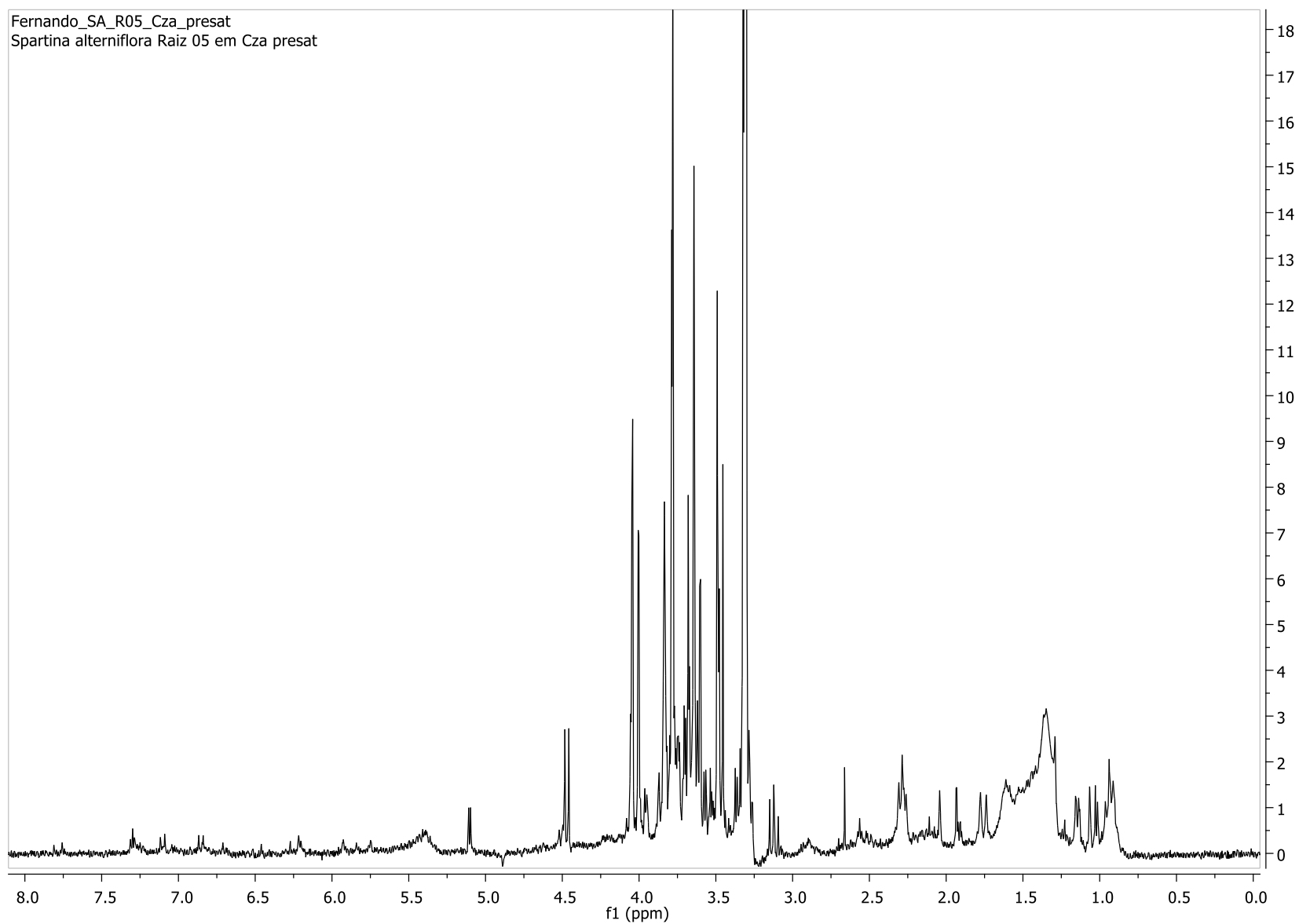
APÊNDICE 37. Espectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-R04 em Czapek.



APÊNDICE 38. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-R04 em Malte.



APÊNDICE 39. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-R05 em Czapek.



APÊNDICE 40. Expectro de RMN de ^1H 300Hz em CD_3OD de SA-R05 em Malte.

