

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 24/07/2022.

UNESP – Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Júlia Dietsche Monfardini

Modulação da produção metabólica de *Botryosphaeria parva*
utilizando a abordagem OSMAC, e sua co-cultura com o
endófito *Pseudofusicoccum stromaticum*

Araraquara
2020

Júlia Dietsche Monfardini

Modulação da produção metabólica de *Botryosphaeria parva*
utilizando a abordagem OSMAC, e sua co-cultura com o endófito
Pseudofusicoccum stromaticum

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Angela Regina Araujo

Araraquara
2020

FICHA CATALOGRÁFICA

M734m Monfardini, Júlia Dietsche
Modulação da produção metabólica de *Botryosphaeria parva* utilizando a abordagem OSMAC, e sua co-cultura com o endófito *Pseudofusicoccum stromaticum* / Júlia Dietsche Monfardini. – Araraquara : [s.n.], 2020
310 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Angela Regina Araujo

1. Produtos naturais. 2. Fungos endofíticos. 3. Metabólitos. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. 5. Ressonância magnética nuclear. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Modulação da produção metabólica de *Botryosphaeria parva* utilizando a abordagem OSMAC e sua co-cultura com o endófito *Pseudofusicoccum stromaticum*"

AUTORA: JÚLIA DIETSCHÉ MONFARDINI

ORIENTADORA: ANGELA REGINA ARAUJO

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

Prof.^a Dr.^a ANGELA REGINA ARAUJO

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

Prof.^a Dr.^a CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE

Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - I

Prof.^a Dr.^a DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA

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

Dr.^a ADRIANA APARECIDA LOPES

Unidade de Biotecnologia / Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP - Ribeirão Preto

Prof.^a Dr.^a ANA HELENA JANUÁRIO

Departamento de Química / Universidade de Franca - UNIFRAN - Franca

Araraquara, 24 de julho de 2020

À minha família,
que me apoiou em minhas decisões e, me deu
forças para continuar trilhando este caminho.

AGRADECIMENTOS

À UNESP e ao Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química-Araraquara, pela possibilidade do desenvolvimento deste trabalho e por ter sido cenário importante de uma etapa da minha vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

À Prof.^a Dr.^a Angela R. Araujo pela orientação, dedicação, compreensão, amizade, obrigada pela confiança, sabedoria e apoio.

À Prof.^a Dr.^a Lourdes Campaner dos Santos e ao Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos que participaram do exame de qualificação, e contribuíram para a finalização deste trabalho.

Aos membros da banca que gentilmente aceitaram o convite para a avaliação desta tese.

A todos os funcionários do IQ da Unesp, principalmente aos professores do departamento de Química Orgânica, por seus ensinamentos e amizade.

Ao querido Nivaldo Boralle pela realização dos espectros de RMN, por estar sempre disposto a compartilhar os seus conhecimentos.

Aos técnicos Marquinhos, João e Juliana.

Às Prof.^a Dr.^a Ilana L. B. C. Camargo, Prof.^a Dr.^a Letícia Costa-Lotufo e Prof.^a Dr.^a Maria Cláudia M. Young pela realização dos ensaios biológicos.

Aos amigos do grupo de pesquisa Carolina, Fernandinho, Isabela, Maria, Fernanda e Karolini.

Aos colegas do Departamento de Química Orgânica em especial aos do NuBBE, pela convivência e que de uma maneira ou de outra colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

E, por fim, aqueles que são as pessoas mais importantes na minha vida, a minha família, que mesmo de “longe” sempre me apoiaram. Dedico a vocês este trabalho, não fosse por vocês, não teria chegado ao lugar que eu cheguei. Pai, Mãe, minha irmã Raquel, minhas avós Elisabeth e Magda (*in memoriam*), meu tio Félix (*in memoriam*) e meu primo Elton.

Nossas maiores barreiras são invisíveis. É o pensamento negativo, a falta de vontade, a vitimização, não encontrar coragem. E tudo isso está dentro de nós. Podemos até ser a própria doença, mas nesse sentido somos também nossa única fonte de cura. Não seja refém de si mesmo.

Gustavo Lacombe

RESUMO

Os micro-organismos constituem uma das mais importantes formas de vida que fornecem substâncias que podem ser utilizadas em diversas áreas, como: farmacêutica, bioquímica, alimentícia e agropecuária. A abordagem OSMAC (*One Strain Many Compounds*), visa, na mudança nos parâmetros de cultivos de micro-organismos, diversificar e aumentar a produção de metabólitos secundários de uma única cepa. O fungo endofítico *Botryosphaeria parva*, oriundo das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels, foi submetido à abordagem OSMAC variando-se os meios de cultivo: Arroz parboilizado (meio sólido), Extr. de Malte, Nutrient, PDB e YM (meios líquidos), e o fungo endofítico *Pseudofusicoccum stromaticum*, oriundo dos frutos maduros de *S. cumini* (L.) Skeels, foi cultivado em meio de Extr. de Malte. Após o período de fermentação de *B. parva* em meio sólido, iniciou-se uma extração direta com CH₃OH, seguida de filtração e evaporação do solvente. O extrato obtido foi solubilizado em AcOEt e realizou-se três partições líq.-líq. com H₂O, em que após a evaporação do solvente orgânico, o extrato obtido foi dissolvido em CH₃CN e foi realizada uma nova partição líq.-líq. com Hexano, e após evaporação da CH₃CN, foi obtido o extrato de interesse. Após o período de fermentação dos endófitos nos meios líquidos, as suspensões micelares foram filtradas a pressão reduzida, separando os micélios dos meios fermentados. Em seguida, os filtrados aquosos foram submetidos a três partições líq.-líq. com AcOEt, e após a evaporação do solvente orgânico, foram obtidos os extratos de *B. parva* e *P. stromaticum*, nos meios líquidos. Os extratos de *B. parva*, em meio de arroz parboilizado e extr. de malte, e o extrato de *P. stromaticum* foram fracionados utilizando técnicas cromatográficas, como Cromatografia em Coluna e/ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência preparativa, em que após os fracionamentos, foram obtidas 33 substâncias oriundas de *B. parva* e 11 substâncias de *P. stromaticum*, caracterizadas por meio de análises espectrométricas (EM, RMN 1D e 2D) e pertencentes à diversas classes químicas, como: terpenos, isocumarinas, dicetopiperazinas, compostos fenólicos, ftaletos, pirazinas, pirrololactonas e pentapeptídeos cíclicos. Dentre as 40 substâncias identificadas, 11 são inéditas: botryosftaleto A (**04**), botryospirazina A (**05**), botryosarina A (**06**), botryosphaerina J (**07**), botryosarina B (**08**), botryosphaerina K (**09**), botryosphaerina L (**20**), 4-hidroxitertastacina (**21**), botryosbenzofuranona A (**26**), botryosbenzenodiol A (**28**), botryosbenzenodiol B (**32**). O estudo da co-cultura dos endófitos foi realizado em meio de ext. de malte e ao final do período de fermentação o caldo fermentado foi submetido a três partições líq.-líq. com AcOEt, e o extrato foi gerado após a evaporação do solvente orgânico. A análise do extrato via CLAE-EM indicou a produção de 13 substâncias que não foram detectadas nas monoculturas, e destas, oito não apresentaram registros em quatro bases de dados (massBank, Metlin, GNPS e Dicionário de Produtos Naturais), sendo consideradas inéditas, mas ainda a serem identificadas. Os estudos relacionados ao *B. parva* e *P. stromaticum* têm como finalidade verificar suas produções metabólicas frente a diferentes estímulos, bem como avaliar o potencial biológico dos extratos, nos ensaios antibacteriano, antiglicante, antioxidante, antifúngico, anticolinesterásico e citotóxico, em que os extratos de *B. parva* apresentaram atividades anticolinesterásica, antifúngica e citotóxica, e o extrato de *P. stromaticum* apresentou atividades antiglicante antioxidante e citotóxica.

Palavras Chave: OSMAC; Co-cultura; *Botryosphaeria parva*; *Pseudofusicoccum stromaticum*; *Syzygium cumini* (L.) Skeels.

ABSTRACT

Microorganisms are one of the most important forms of life that provide substances that can be used in several areas, such as: pharmaceutical, biochemistry, food and agriculture. The OSMAC approach (*One Strain Many Compounds*) aims, in changing the parameters of microorganism cultures, to diversify and increase the production of secondary metabolites from a single strain. The endophytic fungus *Botryosphaeria parva*, from the leaves of *Syzygium cumini* (L.) Skeels, was subjected to the OSMAC approach by varying the culture media: Parboiled rice (solid medium), Malt Ext., Nutrient, PDB and YM (liquid media); and the endophytic fungus *Pseudofusicoccum stromaticum*, from the ripe fruits of *S. cumini* (L.) Skeels, was grown in Malt Ext. After the fermentation period of *B. parva* in solid medium, a direct extraction with MeOH was started, followed by filtration and evaporation of the solvent. The obtained extract was solubilized in AcOEt and three liq.-liq. partitions were performed with H₂O, where after evaporation of the organic solvent, the extract obtained was solubilized in CH₃CN and a new liq.-liq. partition was performed with Hexane, and after evaporation of CH₃CN, the extract of interest was obtained. After the endophytes fermentation period in liquid media, the micellar suspensions were filtered under reduced pressure, separating the mycelia from the fermented media. Then, the aqueous filtrates were subjected to three liq.-liq. partitions with AcOEt, and after evaporation of the organic solvent, extracts of *B. parva* and *P. stromaticum* were obtained in liquid media. *B. parva* extracts in parboiled rice and malt ext., and *P. stromaticum* extract were fractionated using chromatographic techniques, such as Column Chromatography and/or Preparative High Performance Liquid Chromatography, in which after fractionation, 33 substances of *B. parva* and 11 substances of *P. stromaticum* were obtained and characterized by spectrometric analysis (MS, 1D and 2D NMR), belonging to several chemical classes, such as: terpenes, isocoumarins, diketopiperazines, phenolic compounds, phthalides, pyrazines, pyrrololactones and cyclic pentapeptides. Among the 40 substances identified, 11 are unpublished: botryosphthalide A (**04**), botryospyrazine A (**05**), botryosarin A (**06**), botryosphaerin J (**07**), botryosarin B (**08**), botryosphaerin K (**09**), botryosphaerin L (**20**), 4-hydroxyterpestacin (**21**), botryosbenzofuranone A (**26**), botryosbenzenediol A (**28**) and botryosbenzenediol B (**32**). The study of the co-culture of endophytes was carried out in malt ext. and at the end of fermentation period the fermented broth was subjected to three liq.-liq. partition with AcOEt, and the extract was generated after evaporation of the organic solvent. The analysis of the extract via HPLC-MS indicated the production of 13 substances that were not detected in monocultures, and of these, eight did not present records in four databases (massBank, Metlin, GNPS and Dictionary of Natural Products), being considered unpublished, but still to be identified. The studies related to *B. parva* and *P. stromaticum* aim to verify their metabolic production against different stimuli, as well as to evaluate the biological potential of the extracts, in the antibacterial, anti-glycation, antioxidant, antifungal, anticholinesterase and cytotoxic assays, in which the extracts of *B. parva* showed anticholinesterase, antifungal and cytotoxic activities, and the *P. stromaticum* extract showed antioxidant, cytotoxic and antiglycative activities.

Keywords: OSMAC; Co-culture; *Botryosphaeria parva*; *Pseudofusicoccum stromaticum*; *Syzygium cumini* (L.) Skeels.

Lista de Figuras

Figura 01 – Substâncias de origem microbiana que são comercializadas nos dias atuais.	27
Figura 02 – Substâncias produzidas pelo endófito <i>Botryosphaeria parva</i>	31
Figura 03 – Substâncias produzidas pelo endófito <i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	32
Figura 04 – Classificações das benzofuranonas.	36
Figura 05 – Comparação estrutural de uma isocumarina com uma cumarina.	37
Figura 06 – Núcleo base das pirazinas.	42
Figura 07 – Representação estrutural do pirrol e do 2-formilpirrol.	43
Figura 08 – Comparação dos cromatogramas de íons totais (TIC) dos extratos de <i>B. parva</i> nos meios de arroz (verde), ext. de malte (laranja), nutrient (azul); PDB (vermelho) e YM (roxo).	70
Figura 09 – Tabela ANOVA dos extratos obtidos de <i>B. parva</i> em cinco meios de cultivo.	70
Figura 10 – Comparação dos cromatogramas dos extratos de <i>B. parva</i> obtidos em diferentes comprimentos de onda.....	71
Figura 11 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H dos extratos de <i>B. parva</i> nos cinco meios de cultivo estudados, em CD_3OD e 300 MHz.	72
Figura 12 – Representação estrutural das substâncias isoladas de <i>B. parva</i> em meio de cultivo arroz.	74
Figura 13 – Representação estrutural das substâncias identificadas de <i>B. parva</i> em meio de ext. de malte.	76
Figura 14 – Cromatograma do extrato de <i>P. stromaticum</i> obtido em meio de cultivo ext. de malte.	77
Figura 15 – Espectro de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, do extrato do <i>P. stromaticum</i> em meio de cultivo ext. de malte, $\text{DMSO}-d_6$ e 300 MHz.....	77
Figura 16 – Representação estrutural das substâncias identificadas de <i>P. stromaticum</i> em meio de ext. de malte.	79
Figura 17 – Interação entre os endófitos <i>B. parva</i> e <i>P. stromaticum</i> , em placa de Petri contendo meio de cultivo PDA.	80
Figura 18 – Espectro de RMN de ^1H do extrato da co-cultura entre <i>B. parva</i> e <i>P. stromaticum</i> em meio de cultivo Ext. de malte, $\text{DMSO}-d_6$ e 300 MHz.	81
Figura 19 – Cromatogramas de íons totais (A), gráfico de m/z em função do tempo de retenção (B), ampliação de 2 a 14 min. dos TICs (C) e ampliação 2 a 14 min. do gráfico de m/z em função do tempo de retenção (D) dos extratos da co-cultura e das monoculturas dos endófitos <i>B. parva</i> e <i>P. stromaticum</i> em meio de ext. de malte.	82
Figura 20 – Avaliação qualitativa, em cromatoplaça, dos extratos de <i>B. parva</i> para atividade Anticolinesterásica.	89
Figura 21 – Avaliação qualitativa, em cromatoplaça, dos extratos de <i>B. parva</i> para atividade Antifúngica.	90

Figura 22 – Esquema de reação envolvida na redução do radical DPPH• para o ensaio antioxidante.	93
Figura 23 - Efeito da captura dos radicais livres DPPH• dos extratos de <i>B. parva</i> , <i>P. stromaticum</i> e da co-cultura dos endófitos em diferentes concentrações.	94
Figura 24 – Representação estrutural da substância 07	98
Figura 25 – Estrutura parcial A da substância 07	99
Figura 26 – Estrutura parcial B da substância 07	100
Figura 27 – Conexão das estruturas parciais A e B da substância 07 pelas correlações entre H17↔C-7 e H-11↔C-10.	100
Figura 28 – Correlações observadas no espectro de NOESY 1D de 07	100
Figura 29 – Representação estrutural da substância 14	102
Figura 30 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC, e do espectro de NOESY 1D de 14	103
Figura 31 – Representação estrutural da substância 29	104
Figura 32 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC, e do espectro de NOESY 1D de 29	105
Figura 33 – Representação estrutural da substância 33	106
Figura 34 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC, e do espectro de NOESY 1D de 33	107
Figura 35 – Representação estrutural da substância 09	108
Figura 36 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC, e do espectro de NOESY 1D de 09	109
Figura 37 – Representação estrutural da substância 12	110
Figura 38 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC, e do espectro de NOESY 1D de 12	110
Figura 39 – Representação estrutural da substância 31	112
Figura 40 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC, e do espectro de NOESY 1D de 31	113
Figura 41 – Representação estrutural da substância 30	114
Figura 42 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC, e do espectro de NOESY 1D de 30	115
Figura 43 – Diterpenos tetranorlabdanos obtidos de <i>B. parva</i> , em meio de arroz e ext. de malte.	116
Figura 44 – Representação estrutural da substância 20	121
Figura 45 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC, e no espectro de NOESY de 20	123
Figura 46 – Representação estrutural da substância 22	123
Figura 47 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de 22	124
Figura 48 – Representação estrutural da substância 21	126
Figura 49 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de 21	126
Figura 50 – Representação estrutural da substância 06	128
Figura 51 – Correlações observadas nos mapas de contorno de COSY e HMBC, e no espectro de NOESY 1D da substância 06	129
Figura 52 – Representação estrutural da substância 08	130

Figura 53 – Correlações observadas nos mapas de contorno de COSY e HMBC, e no espectro de NOESY 1D da substância 08 .	131
Figura 54 – Representação estrutural da substância 11 .	132
Figura 55 – Correlações observadas nos mapas de contorno de COSY e HMBC da substância 11 .	132
Figura 56 – Representação estrutural da substância 13 .	133
Figura 57 – Correlações observadas nos mapas de contorno de COSY e HMBC da substância 13 .	134
Figura 58 – Representação estrutural da substância 18 .	135
Figura 59 – Correlações observadas nos mapas de contorno de COSY e HMBC da substância 18 .	135
Figura 60 – Isocumarinas obtidas de <i>B. parva</i> , em meio de arroz e ext. de malte.	136
Figura 61 – Representação estrutural da substância 19 .	140
Figura 62 – Correlações observadas nos mapas de contorno de COSY e HMBC da substância 19 .	141
Figura 63 – Representação estrutural da substância 28 .	142
Figura 64 – Correlações observadas nos mapas de contorno de HMBC, e no espectro de NOESY 1D da substância 28 .	143
Figura 65 – Representação estrutural da substância 32 .	143
Figura 66 – Correlações observadas nos mapas de contorno de HMBC, e no espectro de NOESY 1D da substância 32 .	144
Figura 67 – Representação estrutural da substância 03 .	145
Figura 68 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de 03 .	146
Figura 69 – Representação estrutural da substância 04 .	147
Figura 70 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC, e no espectro de NOESY de 04 .	148
Figura 71 – Representação estrutural da substância 26 .	148
Figura 72 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de 26 .	149
Figura 73 – Representação estrutural da substância 01 .	150
Figura 74 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de 01 .	150
Figura 75 – Representação estrutural da substância 02 .	151
Figura 76 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de 02 .	152
Figura 77 – Representação estrutural da substância 39 .	153
Figura 78 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de 39 .	153
Figura 79 – Representação estrutural da substância 34 .	154
Figura 80 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de 34 .	155
Figura 81 – Representação estrutural da substância 38 .	155
Figura 82 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de 38 .	156
Figura 83 – Representação estrutural da substância 15 .	157

Figura 84 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de 15 .	157
Figura 85 – Representação estrutural da substância 05 .	158
Figura 86 – Estrutura parcial A de 05 .	159
Figura 87 – Representação estrutural da substância 17 .	160
Figura 88 – Esquema de fragmentação da substância 17 , obtidas no modo negativo (A) e no modo positivo (B).	161
Figura 89 – Representação estrutural da substância 40 .	162
Figura 90 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de 40 .	163
Figura 91 – Representação estrutural da substância 41 .	164
Figura 92 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de 41 .	165
Figura 93 – Representação estrutural da substância 42 .	166
Figura 94 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de 42 .	166
Figura 95 – Representação estrutural da substância 43 .	167
Figura 96 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de 43 .	168
Figura 97 – Representação estrutural da substância 35 .	169
Figura 98 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de 35 .	170
Figura 99 – Representação estrutural da substância 36 .	171
Figura 100 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de 36 .	171
Figura 101 – Representação estrutural da substância 37 .	172
Figura 102 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de 37 .	173
Figura 103 – Representação estrutural da substância 23 .	174
Figura 104 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC, e nos espectros de TOCSY 1D de 23 .	175
Figura 105 – Representação estrutural da substância 24 .	177
Figura 106 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC, e nos espectros de TOCSY 1D de 24 .	177
Figura 107 – Representação estrutural da substância 25 .	179
Figura 108 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC, e nos espectros de TOCSY 1D de 25 .	180
Figura 109 – Distribuição das substâncias identificadas de <i>B. parva</i> e <i>P. stromaticum</i> .	182

Lista de Tabelas

Tabela 01 – Massas (g) dos meios de cultivo e o volume (mL) de água desmineralizada utilizados no preparo de cada meio para um frasco de Erlenmeyer, no cultivo de <i>B. parva</i> .	54
Tabela 02 – Composição das fases móveis e a massa obtida de cada fração do extrato de <i>B. parva</i> em meio de arroz.	56
Tabela 03 – Massas das subfrações obtidas e seus respectivos códigos, após o processo de precipitação das frações 03 e 06, oriundas do extrato de <i>B. parva</i> em meio de arroz.	56
Tabela 04 – Condições cromatográficas utilizadas para a purificação das frações 01, 02, 04 e 06_P, oriundas do extrato de <i>B. parva</i> em meio de arroz.	57
Tabela 05 – Massas obtidas de cada subfração oriundas das frações 01, 02, 04 e 06_P, oriunda do extrato de <i>B. parva</i> em meio de arroz.	58
Tabela 06 – Massas dos extratos de <i>B. parva</i> provenientes do cultivo nos meios líquidos.	59
Tabela 07 – Composição das fases móveis e a massa obtida de cada fração do extrato oriundo de <i>B. parva</i> em meio de ext. de malte.	59
Tabela 08 – Condições cromatográficas utilizadas na purificação das frações 02 e 03 oriundas do extrato de <i>B. parva</i> em meio de ext. de malte.	60
Tabela 09 – Massas obtidas de cada subfração oriundas das frações 02 e 03 do extrato de <i>B. parva</i> em meio de ext. de malte.	60
Tabela 10 – Composição das fases móveis e a massa obtida de cada fração do extrato oriundo de <i>P. stromaticum</i> em meio de ext. de malte.	62
Tabela 11 – Condições cromatográficas utilizadas na purificação das frações 04-06 oriundas do extrato de <i>P. stromaticum</i> em meio de ext. de malte.	62
Tabela 12 – Massas obtidas de cada subfração oriundas das frações 04-06 do extrato de <i>P. stromaticum</i> em meio de ext. de malte.	63
Tabela 13 – Linhagens bacterianas utilizadas na avaliação de atividade antibacteriana dos extratos obtidos de <i>B. parva</i> , <i>P. stromaticum</i> e da co-cultura de ambos os endófitos.	64
Tabela 14 – Condições de eluição utilizadas na análise de potencial anticolinesterásico dos extratos de <i>B. parva</i> , <i>P. stromaticum</i> e da co-cultura dos endófitos.	65
Tabela 15 – Soluções utilizadas na análise de potencial anticolinesterásico dos extratos de <i>B. parva</i> , <i>P. stromaticum</i> e da co-cultura dos endófitos.	66
Tabela 16 – Condição de eluição utilizadas na análise de potencial antifúngico dos extratos de <i>B. parva</i> , <i>P. stromaticum</i> e da co-cultura dos endófitos.	66
Tabela 17 – Rendimento dos extratos de <i>B. parva</i> referentes às massas dos meios de cultivo utilizados.	69
Tabela 18 – Rendimento do extrato referente à massa do meio de cultivo utilizado para a monocultura <i>P. stromaticum</i> .	76

Tabela 19 – Íons detectados, no modo positivo, nos extratos da co-cultura e das monoculturas de <i>B. parva</i> e <i>P. stromaticum</i> , e registros obtidos em quatro bases de dados.....	83
Tabela 20 – Propostas estruturais para os íons que apresentam registro nos bancos de dados MassBank ⁽⁶⁶⁾ , Metlin ⁽⁶⁷⁾ e GNPS ⁽⁶⁸⁾	84
Tabela 21 – Resultado da atividade antibacteriana dos extratos na concentração de 512 µg.mL ⁻¹	87
Tabela 22 – Percentuais de Inibição de AGE's dos extratos de <i>B. parva</i> , <i>P. stromaticum</i> , Co-cultura dos endófitos e do controle positivo (aminoguanidina), na concentração final de 150 µg. mL ⁻¹	91
Tabela 23 – Valores de percentagem de Inibição de AGE's das frações do extrato de <i>P. stromaticum</i> , e do controle positivo (aminoguanidina), na concentração final de 150 mg. mL ⁻¹	92
Tabela 24 – Valores de EC ₅₀ obtidos na avaliação antioxidante dos extratos de <i>B. parva</i> , <i>P. stromaticum</i> e da co-cultura dos endófitos.	94
Tabela 25 – Valores de EC ₅₀ obtidos na avaliação antioxidante do extrato e frações de <i>P. stromaticum</i>	95
Tabela 26 – Percentual de inibição de crescimento celular (IC%), obtidos nas concentrações de 5 e 50 µg.mL ⁻¹ , dos extratos frente à duas linhagens tumorais (MCF-7: adenocarcinoma de mama e HCT-116: carcinoma de cólon-retal).	96
Tabela 27 – Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 07 , em CD ₃ OD e 14,1T....	101
Tabela 28 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁷⁷⁾ , da substância 13,14,15,16-tetranorlabd-7-eno-19,6β:12,17-diolídeo (14).	103
Tabela 29 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁷⁸⁾ da substância botryosphaerin A (29).....	105
Tabela 30 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁷⁹⁾ , da substância CJ-14445 (33).	107
Tabela 31 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁸⁰⁾ , da substância botryosphaerina F (12).	111
Tabela 32 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁸¹⁾ , da substância oidiolactona E (31).	113
Tabela 33 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁷⁸⁾ , da substância LL-Z1271β (30).	115
Tabela 34 – Dados de RMN de ¹ H (600 MHz) e de ¹³ C (150 MHz) das substâncias 20a e 20b (CD ₃ OD).	122
Tabela 35 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁸²⁾ , da substância terpestacina (22).....	125
Tabela 36 – Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 21 , em CD ₃ OD e 14,1T. ...	127
Tabela 37 – Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 06 , em CD ₃ Ode 14,1 T.	129
Tabela 38 – Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 08 , em CD ₃ OD e 14,1T....	131
Tabela 41 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁸³⁾ , da substância <i>rel.</i> (3 <i>S</i> , 4 <i>R</i>)-4-hidroximeleina (11).	133

Tabela 42 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁸³⁾ , da substância <i>rel.</i> (3 <i>S</i> , 4 <i>S</i>)-4-hidroxiemeleina (13).....	134
Tabela 44 – Comparação dos dados de RMN de ¹ H obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁸⁴⁾ , da substância meleina (18).....	136
Tabela 45 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁸⁵⁾ , da substância botryosphaerona D (19).	141
Tabela 46 – Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 28 , em CD ₃ OD e 14,1T....	143
Tabela 47 – Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 32 , em CD ₃ OD e 14,1T....	144
Tabela 48 – Dados de RMN de ¹ H (600 MHz) e de ¹³ C (150 MHz) das substâncias 03a e 03b (CD ₃ OD).....	146
Tabela 49 – Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 04 , em CD ₃ OD e 14,1T....	147
Tabela 50 – Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 26 , em CD ₃ OD e 14,1T....	149
Tabela 51 – Comparação dos dados de RMN de ¹ H obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁸⁸⁾ , da substância 3-(<i>p</i> -hidroxifenil)-1,2-propanodiol (01).	151
Tabela 52 – Comparação dos dados de RMN de ¹ H obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁹³⁾ , da substância tirosol (02).....	152
Tabela 53 – Comparação dos dados de RMN de ¹ H obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁹⁰⁾ , da substância Acetato de 2-(<i>p</i> -hidroxifenil)etil (39).....	154
Tabela 54 – Comparação dos dados de RMN de ¹ H obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁹¹⁾ , da substância 3-(hidroximetil)fenol (34).	155
Tabela 55 – Comparação dos dados de RMN de ¹ H obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁹²⁾ , da substância Acetato de (3-hidroxibenzil)metil (38).	156
Tabela 56 – Comparação dos dados de RMN obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁹³⁾ , da substância N-(2-feniletil)acetamida (15).....	158
Tabela 57 – Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 05 , em CD ₃ OD e 14,1T....	159
Tabela 58 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁹⁴⁾ , da substância Lumichrome (17).	162
Tabela 59 – Comparação dos dados de RMN de ¹ H obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁹⁶⁾ , da substância 3,4-dihidro-4-(1-metiletil)-3-oxo-1 <i>H</i> -pirrolo[2,1- <i>c</i>][1,4]oxazina-6-carboxaldeído (40).....	164
Tabela 60 – Comparação dos dados de RMN de ¹ H obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁹⁶⁾ , da substância 3,4-dihidro-4-(1-metilpropil)-3-oxo-1 <i>H</i> -pirrolo[2,1- <i>c</i>][1,4]oxazina-6-carboxaldeído (41).....	165
Tabela 61 – Comparação dos dados de RMN de ¹ H obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁹⁶⁾ , da substância 3,4-dihidro-4-(2-metilpropil)-3-oxo-1 <i>H</i> -pirrolo[2,1- <i>c</i>][1,4]oxazina-6-carboxaldeído (42).....	167
Tabela 62 – Comparação dos dados de RMN de ¹ H obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁹⁶⁾ , da substância 3,4-dihidro-4-(fenilmetil)-3-oxo-1 <i>H</i> -pirrolo[2,1- <i>c</i>][1,4]oxazina-6-carboxaldeído (43).....	168
Tabela 63 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁹⁷⁾ , da substância Ciclo(Pro-Ile) (35).....	170
Tabela 64 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁹⁷⁾ , da substância Ciclo(Pro-Leu) (36).	172

Tabela 65 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁹⁷⁾ , da substância Ciclo(Pro-Phe) (37)	173
Tabela 66 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁹⁸⁾ da substância Ciclo(Leu-Leu-Leu-Leu-Val) (23)	175
Tabela 67 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁽⁹⁸⁾ da substância Ciclo (Leu-Leu-Leu-Leu-Ile) (24)	178
Tabela 68 – Dados espectrométricos obtidos da substância Ciclo (Leu-Ile-Leu-Leu-Ile) (25)	180

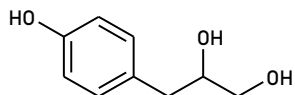
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
Å	Ångström
AChE	Enzima Acetilcolinesterase
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
C18	Adsorvente de Fase Reversa tipo Octadecil Silano
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Sigla em inglês para <i>Espectroscopia Correlacional Homonuclear</i>
cm	Centímetro
δ_c	Deslocamento Químico de Carbono
δ_H	Deslocamento Químico de Hidrogênio
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
D _{int.}	Diâmetro Interno
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo-dubleto
<i>ddd</i>	Duplo-duplo-dubleto
<i>dq</i>	Duplo-quadrupeto
<i>dt</i>	Duplo-tripeto
DPPH•	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EM	Espectrometria de Massas
ESI-qQ-TOF	Sigla em inglês para <i>Ionização por Eletrospray – Tempo de Voo</i>
Fr.	Fração
g	Gramas
H	Altura
HMBC	Sigla em inglês para <i>Correlação Heteronuclear de Ligação Múltipla</i>
HSQC	Sigla em inglês para <i>Correlação Heteronuclear Quântica Única</i>
°C	Graus Celsius
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
Kg	Kilograma
L	Litro
Líq.-líq.	Líquido-líquido
<i>m</i>	Multipeto
mg	Miligrama
min.	Minutos
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitro
mm	Milimêtro
<i>m/z</i>	Razão Massa-Carga
nm	Nanômetro
NOESY	Sigla em inglês para <i>Espectroscopia de efeito nuclear de Overhauser</i>
P.A	Para Análise
p.	Página
PDA	Sigla em inglês para <i>Batata, Dextrose e Agar</i>
PDB	Sigla em inglês para <i>Batata e Dextrose</i>

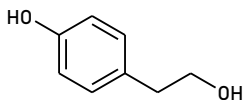
ppm	Parte por milhão
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
s	Singleto
s/	Singleto largo
SPE	Sigla em inglês para <i>Extração em Fase Sólida</i>
T	Tesla
t	Tripleto
TIC	Cromatograma de íons totais
v.	Volume
$V_{\text{inj.}}$	Volume de Injeção
λ	Comprimento de Onda
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
YM	Yeast Mold (meio de caldo de levedura)

Lista de Substâncias

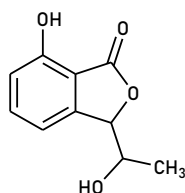
Substância 01
(*B. parva*)



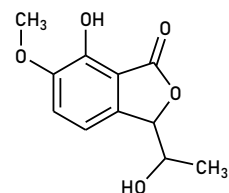
Substância 02
(*B. parva* e *P. stromaticum*)



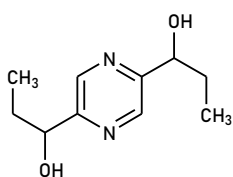
Substância 03
(*B. parva*)



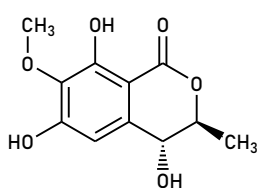
Substância 04
(*B. parva*)



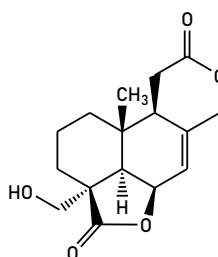
Substância 05
(*B. parva*)



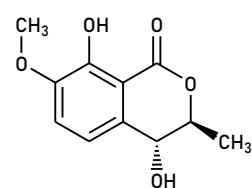
Substância 06
(*B. parva*)



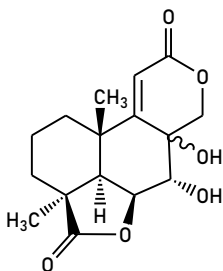
Substância 07
(*B. parva*)



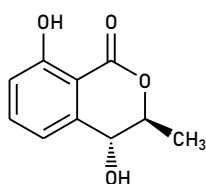
Substância 08
(*B. parva*)



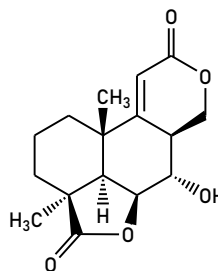
Substância 09
(*B. parva*)



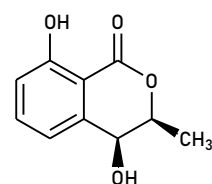
Substância 11
(*B. parva*)



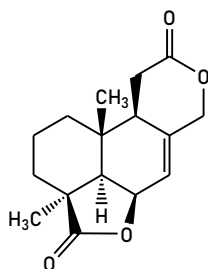
Substância 12
(*B. parva*)



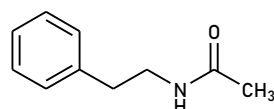
Substância 13
(*B. parva*)



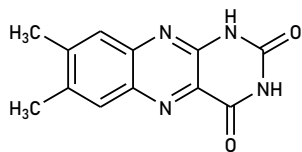
Substância 14
(*B. parva*)



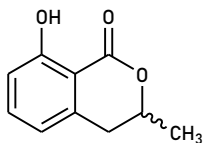
Substância 15
(*B. parva*)



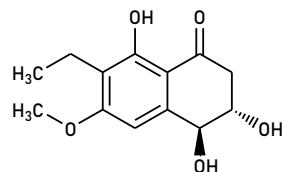
Substância 17
(*B. parva*)



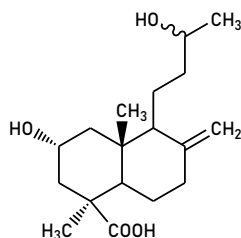
Substância 18
(*B. parva*)



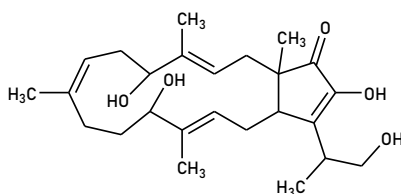
Substância 19
(*B. parva*)



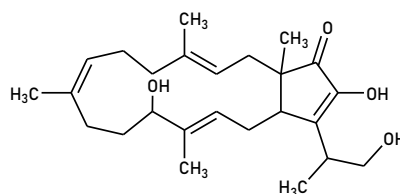
Substância 20
(*B. parva*)



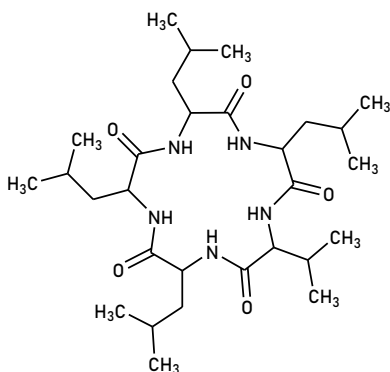
Substância 21
(*B. parva*)



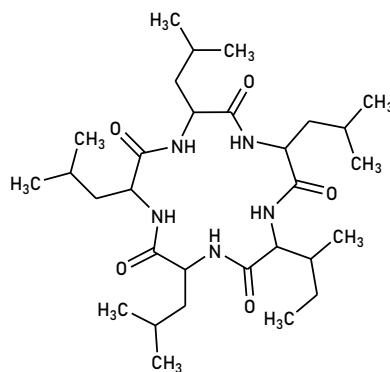
Substância 22
(*B. parva*)



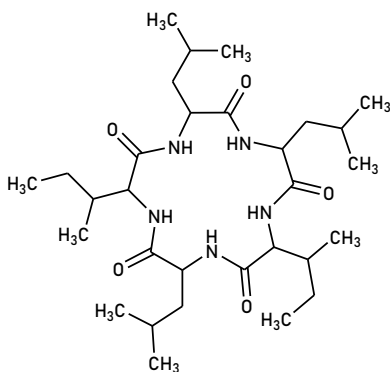
Substância 23
(*B. parva*)



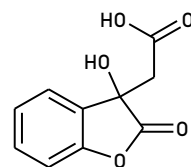
Substância 24
(*B. parva*)



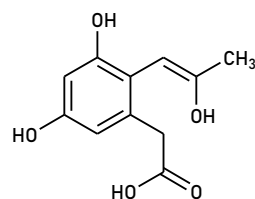
Substância 25
(*B. parva*)



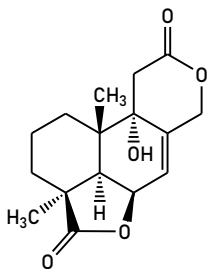
Substância 26
(*B. parva*)



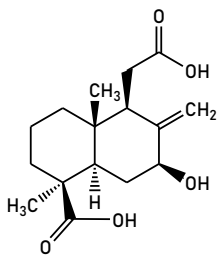
Substância 28
(*B. parva*)



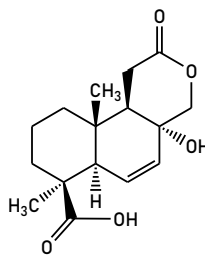
Substância 29
(*B. parva*)



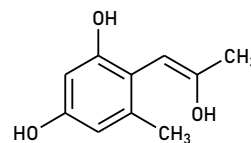
Substância 30
(*B. parva*)



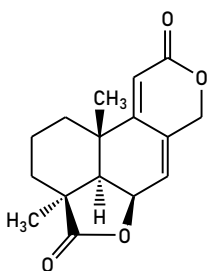
Substância 31
(*B. parva*)



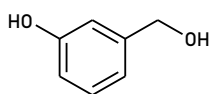
Substância 32
(*B. parva*)



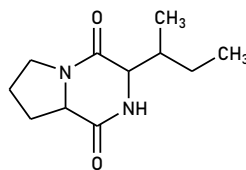
Substância 33
(*B. parva*)



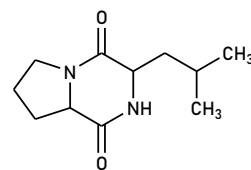
Substância 34
(*P. stromaticum*)



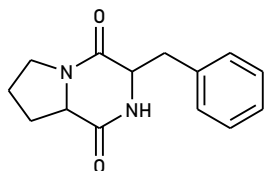
Substância 35
(*P. stromaticum*)



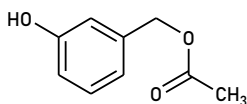
Substância 36
(*P. stromaticum*)



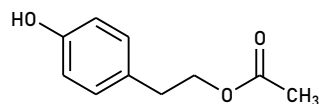
Substância 37
(*P. stromaticum*)



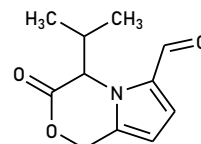
Substância 38
(*P. stromaticum*)



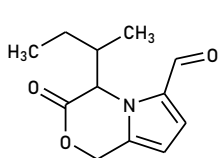
Substância 39
(*P. stromaticum*)



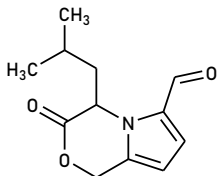
Substância 40
(*P. stromaticum*)



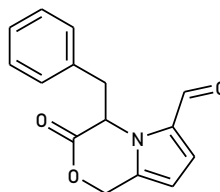
Substância 41
(*P. stromaticum*)



Substância 42
(*P. stromaticum*)



Substância 43
(*P. stromaticum*)



Sumário

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Fungos: generalidades	28
1.2 Fungos endofíticos	29
1.3 Fungos pertencentes à família Botryosphaeriaceae	30
1.3.1 O endófito <i>Botryosphaeria parva</i>	31
1.3.2 O endófito <i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	32
1.4 A abordagem OSMAC	33
1.5 A abordagem da Co-cultura.....	34
1.6 Classes de Metabólitos Secundários	35
1.6.1 Policetídeos.....	35
1.6.1.1 Compostos Fenólicos.....	35
1.6.1.2 Benzofuranonas	36
1.6.1.3 Ftaletos	36
1.6.1.4 Isocumarinas.....	37
1.6.1.5 Naftalenonas.....	38
1.6.2 Terpenoides	38
1.6.2.1 Diterpenos.....	39
1.6.2.2 Sesterterpenos.....	39
1.6.3 Alcaloides.....	40
1.6.3.1 Cicolpeptídeos	41
1.6.3.2 Pirazinas	41
1.6.3.3 Pirróis e seus derivados	42
2 OBJETIVOS.....	44
2.1 Objetivos específicos.....	44
3 MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E TÉCNICAS UTILIZADAS	45
3.1 Manipulação dos Micro-organismos	45
3.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	45
3.3 Cromatografia em Coluna (CC)	45
3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	46
3.4.1 Cromatógrafos com Detector de Arranjo de Diodos (DAD).....	46
3.4.2 Cromatógrafo com Analisador Ion Trap (EM)	46
3.4.3 Cromatógrafo com analisador Q-ToF (EM).....	46
3.5 Preparo das amostras para análises de CLAE-DAD e CLAE-EM	47
3.6 Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D	47
3.7 Solventes e Reagentes utilizados	48

3.8	Outros Equipamentos	48
4	FLUXOGRAMAS	49
4.1	Cultivo de <i>Botryosphaeria parva</i>	49
4.1.1	Cultivo de <i>B. parva</i> em meio de Arroz	50
4.1.2	Cultivo de <i>B. parva</i> em meio de Malte	51
4.2	Cultivo de <i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	52
4.3	Cultivo da Co-cultura dos endófitos	53
5	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	54
5.1	Cultivo de <i>Botryosphaeria parva</i>	54
5.1.1	Cultivo de <i>B. parva</i> no meio Sólido	55
5.1.2	Cultivo de <i>B. parva</i> nos meios Líquidos	58
5.1.2.1	Meio de Ext. de Malte	59
5.2	Cultivo de <i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	61
5.3	Cultivo da Co-cultura de <i>B. parva</i> e <i>P. stromaticum</i>	63
5.4	Ensaio Biológicos e Químicos	64
5.4.1	Ensaio Antibacteriano	64
5.4.2	Ensaio Anticolinesterásico	65
5.4.3	Ensaio Antifúngico	66
5.4.4	Ensaio Antiglicante	66
5.4.5	Ensaio Antioxidante	67
5.4.6	Ensaio Citotóxico	68
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
6.1	Bioprospecção de <i>Botryosphaeria parva</i>	69
6.1.1	Cultivo de <i>B. parva</i> em Arroz Parboilizado	73
6.1.2	Cultivo de <i>B. parva</i> em Ext. de malte	75
6.2	Bioprospecção de <i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	76
6.3	Bioprospecção da Co-cultura dos endófitos	79
6.4	Avaliação das atividades Químicas e Biológicas dos extratos	87
6.4.1	Avaliação da atividade Antibacteriana	87
6.4.2	Avaliação da atividade Anticolinesterásica	88
6.4.3	Avaliação da atividade Antifúngica	89
6.4.4	Avaliação da atividade Antiglicante	90
6.4.5	Avaliação da atividade Antioxidante	92
6.4.6	Avaliação da atividade Citotóxica	95
7	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS	98
7.1	Substância 07	98
7.2	Substância 14	102
7.3	Substância 29	104

7.4 Substância 33.....	106
7.5 Substância 09.....	108
7.6 Substância 12.....	110
7.7 Substância 31.....	112
7.8 Substância 30.....	114
7.9 Comparação dos espectros de RMN de ^1H dos diterpenos tetranorlabdanos	116
7.10 Substância 20.....	121
7.11 Substância 22.....	123
7.12 Substância 21.....	126
7.13 Substância 06.....	128
7.14 Substância 08.....	130
7.15 Substância 11.....	131
7.16 Substância 13.....	133
7.17 Substância 18.....	135
7.18 Comparação dos espectros de RMN de ^1H das isocumarinas.....	136
7.19 Substância 19.....	140
7.20 Substância 28.....	142
7.21 Substância 32.....	143
7.22 Substância 03.....	145
7.23 Substância 04.....	146
7.24 Substância 26.....	148
7.25 Substância 01.....	150
7.26 Substância 02.....	151
7.27 Substância 39.....	153
7.28 Substância 34.....	154
7.29 Substância 38.....	155
7.30 Substância 15.....	157
7.31 Substância 05.....	158
7.32 Substância 17.....	160
7.33 Substância 40.....	162
7.34 Substância 41.....	164
7.35 Substância 42.....	166
7.36 Substância 43.....	167
7.37 Substância 35.....	169
7.38 Substância 36.....	171
7.39 Substância 37.....	172
7.40 Substância 23.....	174

7.41 Substância 24.....	176
7.42 Substância 25.....	179
8 DISTRIBUIÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS	182
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	183
REFERÊNCIAS	185
APÊNDICE	196

1 INTRODUÇÃO

A química de produtos naturais originou-se da curiosidade da humanidade em relação a cores, sabores, odores e curas para doenças humanas, de animais e de vegetais ⁽¹⁾. O termo Produtos Naturais é aplicado a substâncias derivadas de organismos vivos, que são fábricas bioquímicas para a biossíntese de metabólitos primários e secundários ⁽¹⁾. Esses produtos naturais podem ser obtidos de diversas fontes, em que a mais conhecida e utilizada são as plantas ⁽²⁾.

Os produtos naturais, em especial os metabólitos, desempenham papéis ecológicos significativos na maneira como os organismos vivos sobrevivem e, portanto, estão associados ao bem-estar e aptidão geral desses organismos em seus habitats naturais ⁽¹⁾. Esses produtos incluem diversas classes de compostos, tais como: alcaloides, esteroides, terpenos, policetídeos, aminoácidos, proteínas, carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos, entre outros ^(1,2).

Por tentativa e erro, o homem primitivo adquiriu conhecimento biológico que lhe foi útil para determinar quais plantas possuíam valor alimentar e medicinal, e quais deveriam ser evitadas por causa de sua natureza venenosa e perigosa ⁽¹⁾. Dessa forma, ao longo da maior parte da história, a natureza, especialmente as plantas, veem fornecendo uma gama de produtos naturais, que são utilizados em diversas áreas ^(3,4). Com isso, durante as últimas décadas, as pesquisas sobre produtos naturais avançaram muito nos campos da química, da ciência dos alimentos e da ciência dos materiais, em que dentro do contexto industrial, esses produtos são fontes insubstituíveis de óleos, aromas e fragrâncias, resinas, gomas, borracha natural, ceras, saponinas e outros surfactantes, corantes, reguladores de crescimento de plantas e insetos, e muitos outros produtos especializados. Dessa forma, exceto para os minerais e materiais sintéticos, o nosso entorno consiste inteiramente de produtos naturais de origem vegetal, animal e microbiana ^(1,2).

Já no contexto medicinal, esses avanços científicos levaram a descoberta de produtos naturais bioativos, sendo que os primeiros relatos referentes a esses produtos datam do início do século XVII, em que os maiores exemplos são: a estricnina, a morfina, a atropina, a quinina e a colchicina ⁽⁵⁾. A natureza, com seu suprimento de plantas e ervas medicinais, pode ser uma grande fonte de medicamentos baratos, que podem ser complementares à medicina moderna,

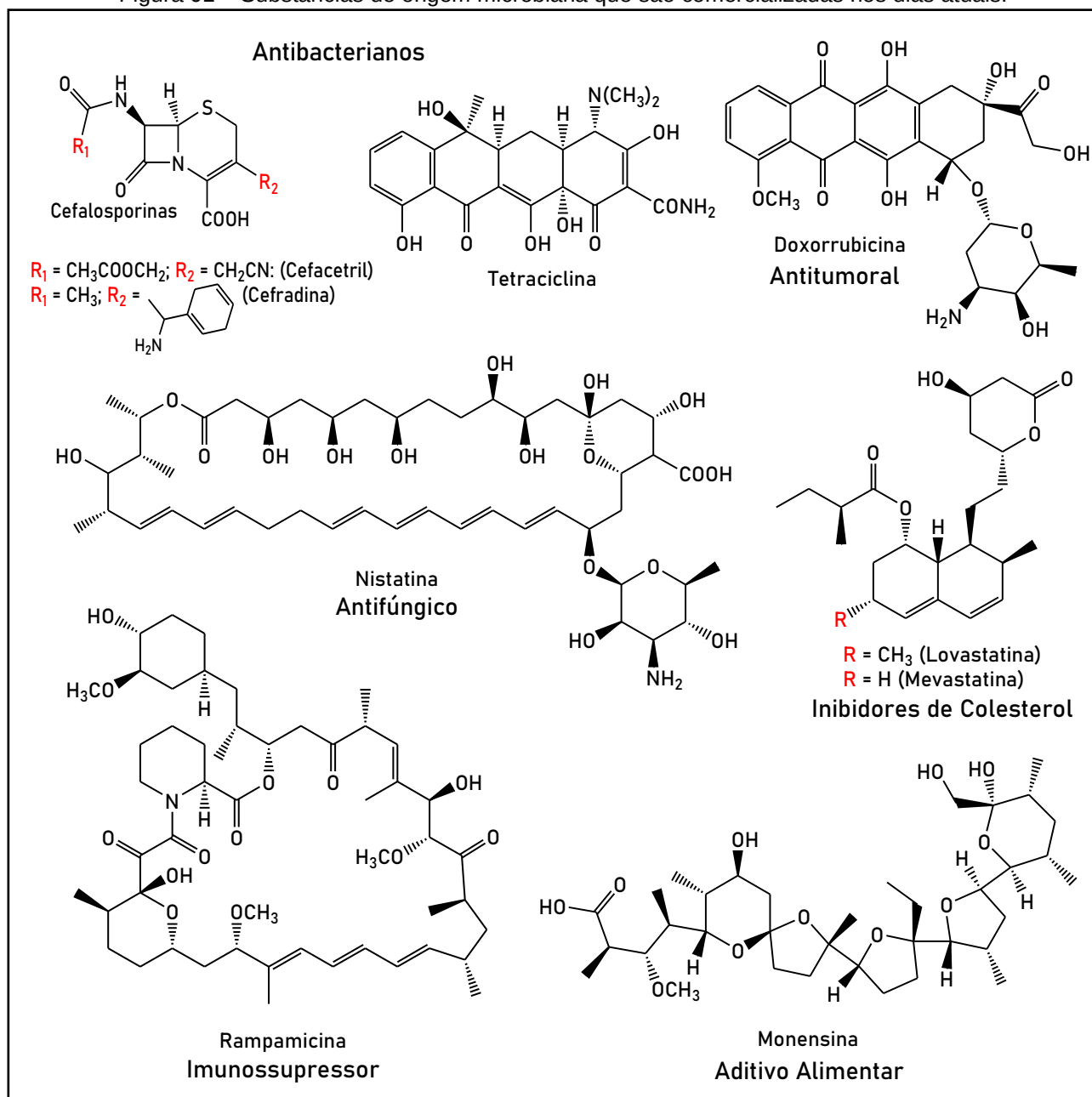
aliviando o sofrimento das pessoas adoecidas. Além disso, com o crescente custo dos cuidados de saúde e manifestações de sérios efeitos colaterais no uso prolongado de alguns fármacos sintéticos, há uma tendência crescente da população mundial de voltar aos medicamentos naturais, ⁽¹⁾ e é por isso, que a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que aproximadamente 80% da população mundial recorre à medicina tradicional como fonte dos primeiros tratamentos farmacológicos ⁽²⁾.

Dessa forma, a maioria dos trabalhos que envolvem produtos naturais está voltada para o isolamento e identificação de substâncias, muitas vezes associadas a ensaios biológicos ⁽⁶⁾. Esses produtos naturais, são produzidos em um estágio específico de desenvolvimento dos organismos vivos, e as condições do ambiente em que esses organismos se encontram, influenciam diretamente a produção dessas substâncias. Portanto, diferentes estratégias têm sido desenvolvidas para aumentar a produção dessas substâncias. Essas estratégias incluem, desde a triagem e seleção dos organismos à sua produção em escala ampliada ⁽⁷⁾.

Com isso, considerando todas as limitações associadas com a produtividade e vulnerabilidade de alguns organismos, como algumas espécies de plantas medicinais, os micro-organismos servem como uma segunda fonte na obtenção de substâncias com potencial farmacêutico ⁽⁷⁾. Uma prova desse potencial, é a penicilina, um antibiótico produzido pelo fungo *Penicilium notatum*.

A descoberta da penicilina em 1928, feita por Alexander Fleming, gerou uma extensa investigação de micro-organismos, principalmente por empresas farmacêuticas, como fontes de novos antibióticos e outras substâncias com atividades biológicas ⁽⁸⁾. Devido a essas investigações no ramo da microbiologia, é que podemos verificar diversos produtos naturais, de origem microbiana sendo comercializados atualmente (Figura 01, p. 27) ^(9,10).

Figura 01 – Substâncias de origem microbiana que são comercializadas nos dias atuais.



Fonte: ilustração adaptada de Buss ⁽¹⁰⁾.

Os micro-organismos são estudados como fontes de produtos naturais por cerca de 60 anos, e constituem uma das mais importantes formas de vida que fornecem ferramentas biotecnológicas que auxiliam na fabricação de produtos químicos e bioquímicos ^(9,10). Uma prova dessa importância, foi uma pesquisa realizada pela Empresa de Comunicações Comerciais (BCC Research) mostrando que o mercado global de produtos de origem microbiana valia, aproximadamente, US\$ 186.3 bilhões em 2018, e a previsão para 2023 é que esse valor chegue a 302.4 bilhões de dólares ⁽¹¹⁾.

No entanto, mesmo com esses valores, o vasto potencial microbiano permanece desconhecido, uma vez que a diversidade dos micro-organismos, a maioria não documentada, de longe, excede a dos animais e plantas. Sendo assim, as pesquisas microbiológicas apresentam grandes oportunidades para novas descobertas em diferentes áreas, como: estudos fisiológicos, bioquímicos, moleculares, controle de doenças, produção de alimentos e medicamentos.

1.1 Fungos: generalidades

A diversidade microbiana e os nichos em que os micro-organismos vivem são enormes e realmente impressionantes, variando desde sedimentos do oceano profundo às piscinas térmicas da Terra ⁽¹²⁾. A ciência da micologia teve um início modesto no século XVIII, muitas vezes como passatempo de domingo para os médicos. Nos dias atuais, os fungos são a preocupação dos taxonomistas, morfologistas, geneticistas, ecologistas, médicos, bioquímicos e microbiologistas comerciais ⁽¹³⁾.

Os fungos diferem fundamentalmente das plantas em sua falta de clorofila, o que significa que eles não são capazes de fotossintetizar o seu próprio alimento, e são, portanto, como animais, adquirindo seus nutrientes no meio ambiente ou de organismos mortos ⁽¹⁴⁾. Constituem um grupo de micro-organismos eucarióticos, uni (leveduriformes) ou pluricelulares (filamentosos), em geral com parede celular e cujas estruturas reprodutivas apresentam uma variedade de formas ^(15,16).

Embora frequentemente inconspícuos, os fungos ocorrem em todos os ambientes da Terra e desempenham papéis muito importantes na maioria dos ecossistemas, tendo, portanto, um papel crítico nos ciclos biogeoquímicos ^(17,18,19). Contudo, pouco se sabe da verdadeira biodiversidade do Reino Fungi, que se estima incluir 2,2–3,8 milhões de espécies, com apenas cerca de 3-8% formalmente classificadas ⁽²⁰⁾. Dessa forma, tem-se constatado nos últimos anos, uma necessidade em se estudar a química dos fungos ^(21,22).

1.2 Fungos endofíticos

Toda espécie vegetal suporta um conjunto de micro-organismos conhecidos como endófitos ⁽⁴⁾, que habitam seus espaços inter- e intracelulares, durante toda ou parte de sua vida ^(21,23) sem causar danos à planta ⁽²⁴⁾.

Os fungos endofíticos encontram-se em um relacionamento biológico com a planta hospedeira, e podem influenciar várias características expressas pelo hospedeiro e desempenhar relevantes funções para a sanidade vegetal, pois podem atuar como agentes controladores de fitopatógenos, no controle de insetos e até na proteção contra herbívoros ⁽²⁵⁾.

Uma característica importante desses organismos é de que eles são generalizados e diversificados na sua ocorrência, e são conhecidos por colonizar plantas que crescem em diferentes regiões ambientais, variando desde o Ártico e Antártica a solos geotérmicos, desertos, oceanos, florestas e mangues ⁽²⁶⁾.

Na última década, estudos demonstraram que os endófitos são capazes de produzir uma variedade de metabólitos, que podem ser úteis na indústria farmacêutica como precursores e/ou novos medicamentos ^(27,28). A alta produtividade desses fungos pode estar relacionada a dois fatores ecológicos: o alto nível de estresse ambiental e intensas interações com outros organismos ⁽²⁹⁾.

Adicionalmente, os fungos endofíticos apresentam vantagens sobre outras fontes de produtos naturais, porque são recursos renováveis e a produção em escala ampliada dos metabólitos pode ser realizada utilizando a tecnologia e o conhecimento sobre as técnicas já existentes ⁽³⁰⁾.

A possibilidade de obtenção de novas substâncias, com potencial biológico oriundas de fungos endofíticos, mostra que esses micro-organismos constituem uma potencial fonte de metabólitos secundários, com possíveis aplicações em diversas áreas, como por exemplo a indústria farmacêutica. Esta observação justifica a importância e o motivo de se realizar o estudo químico e biológico desses micro-organismos.

1.3 Fungos pertencentes à família Botryosphaeriaceae

Os primeiros relatos de fungos pertencentes à família Botryosphaeriaceae foram feitos em 1820 com espécies de *Sphaeria* ^(31,32), e atualmente, essa família abriga 22 gêneros com cerca de 110 espécies devidamente caracterizadas, em que os gêneros que compõe a família são^(33,34):

<i>Alanphillipsia</i> spp.	<i>Endomelanconiopsis</i> spp.	<i>Neoscytalidium</i> spp.
<i>Barriopsis</i> spp.	<i>Eutiarosporella</i> spp.	<i>Phaeobtryon</i> spp.
<i>Botryobambusa</i> spp.	<i>Lasioidipodia</i> spp.	<i>Pseudofusicoccum</i> spp.
<i>Botryosphaeria</i> spp.	<i>Macrophomina</i> spp.	<i>Sakireeta</i> spp.
<i>Cophinforma</i> spp.	<i>Marasasiomyces</i> spp.	<i>Spencermartinsia</i> spp.
<i>Diplodia</i> spp.	<i>Mucoharknessia</i> spp.	<i>Sphaeropsis</i> spp.
<i>Dothiorella</i> spp.	<i>Neodeightonia</i> spp.	<i>Tiarosporella</i> spp.
	<i>Neofusicoccum</i> spp.	

Os fungos pertencentes a essa família são encontrados em quase todas as áreas agrícolas do planeta, ocorrendo em grande número de angiospermas e gimnospermas, as quais infectam ramos lenhosos, folhas, galhos, inflorescências, frutos, colmos de gramíneas e talos de líquens⁽³³⁾.

Estes micro-organismos podem estabelecer infecções no hospedeiro por meio de feridas ou aberturas naturais, como lenticelas e estômatos^(35,36). Uma vez dentro dos tecidos do hospedeiro, eles podem permanecer latentes, vivendo como endófitos e podendo se transformar em patógenos quando o hospedeiro estiver sob estresse de diversas naturezas, como por exemplo: déficit hídrico, desequilíbrio microbiano e ferimentos ^(34,37).

No Brasil, os gêneros *Botryosphaeria*, *Lasioidipodia*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium*, *Macrophomina* e *Pseudofusicoccum* foram detectados, em sua maioria, associados à hospedeiros frutíferos tropicais⁽³⁸⁾.

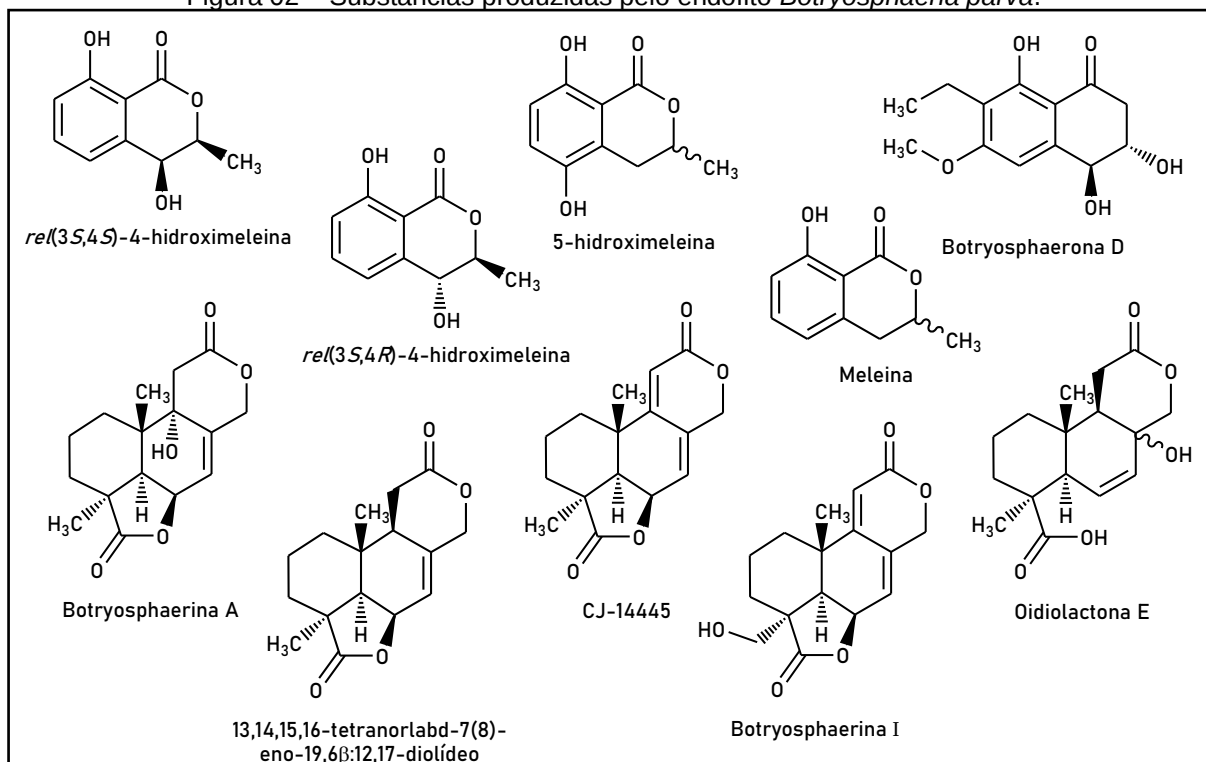
1.3.1 O endófito *Botryosphaeria parva*

Fungos do gênero *Botryosphaeria* são encontrados em regiões temperadas, tropicais e subtropicais ao redor do mundo, no entanto, aparentemente não são encontrados nas regiões polares. Eles ocorrem em uma ampla faixa de famílias de plantas, podendo ocorrer como patógenos, causando cancos e necrose da madeira, ou ocorrer como endófitos, habitando o interior dos tecidos do hospedeiro ⁽³⁹⁾.

Alguns estudos relacionados ao fungo *Botryosphaeria parva*, o mencionam como um fungo patogênico, causador de apodrecimento do tronco, morte dos brotos e necrose de *Vitis vinifera* (uva utilizada na produção de vinho) ^(40,41), sendo possível observar também estes sintomas em outras plantas, como macieiras e pereiras ao redor do mundo ⁽⁴²⁾.

Os estudos químicos descritos para este endófito foram realizados em minha pesquisa de mestrado ⁽⁴³⁾, e sua bioprospecção, quando cultivado em Milho e em Czapek, indicou potencial biológico, como atividade antifúngica, anticolinesterásica e antioxidante, e nos permitiu o isolamento de quatro isocumarinas, uma naftalenona e cinco diterpenos tetranorlabdanos (Figura 02).

Figura 02 – Substâncias produzidas pelo endófito *Botryosphaeria parva*.



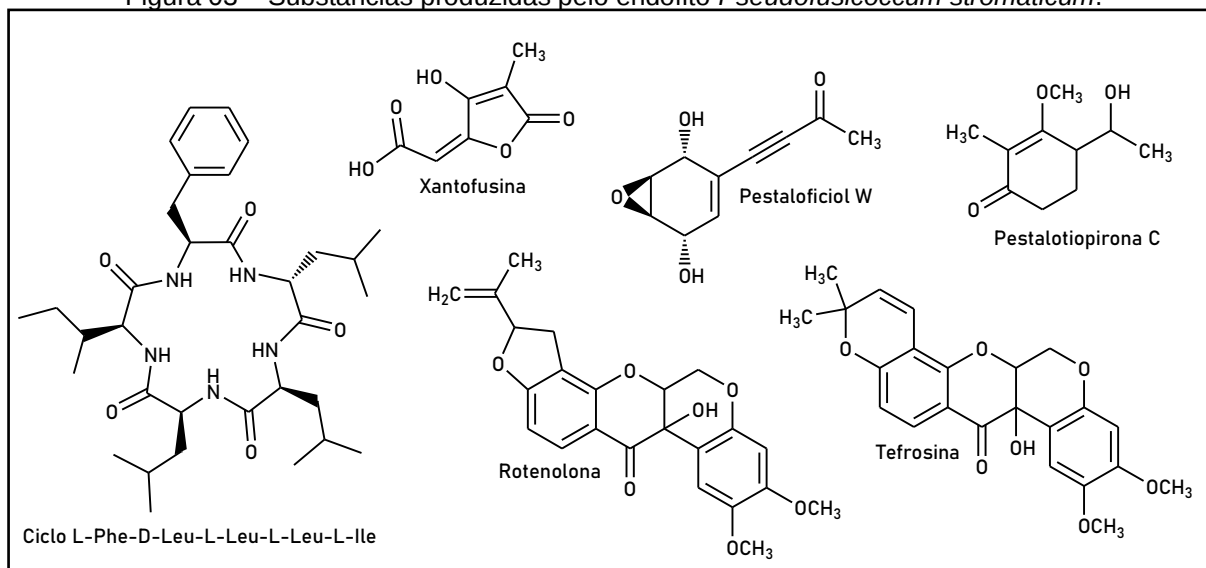
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

1.3.2 O endófito *Pseudofusicoccum stromaticum*

Os fungos do gênero *Pseudofusicoccum*, assim como os fungos do gênero *Botryosphaeria*, são encontrados em hospedeiros de regiões temperadas, tropicais e subtropicais ao redor do mundo^(44,45). O fungo *P. stromaticum* foi isolado pela primeira vez em 2005 na Venezuela de ramos e caules de híbridos de *Eucalyptus*, *Eucalyptus urophylla* vs. *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus* sp. e *Acacia mangium*, no entanto, foi inicialmente atribuído ao gênero *Fusicoccum*, sendo denominado *Fusicoccum stromaticum*, embora possuía conídios mais cilíndricos e envoltos em uma bainha mucosa resistente do que outras espécies desse gênero^(46,47). Apenas em 2006 quando o gênero *Pseudofusicoccum* foi introduzido por Crous⁽³¹⁾ para incluir as espécies de fungos que são morfologicamente similares a *Fusicoccum* e *Neofusicoccum*, mas filogeneticamente distintas de ambos, que passou a ser chamado de *Pseudofusicoccum stromaticum*⁽³³⁾.

Alguns estudos mencionam que o fungo *P. stromaticum* é causador de doenças em mangas e ramos de umbu-cajú e provoca a gomose em *Anacardium*^(48,49), além de ser o responsável pela morte, apodrecimento e podridão de frutos em diversos hospedeiros⁽⁵⁰⁾. No entanto, por ser recentemente isolado como endófito, existem poucas informações a respeito de sua produção metabólica, em que o único estudo dessa natureza foi realizado por Sobreira⁽⁵¹⁾, indicando a produção das substâncias mostradas na Figura 03.

Figura 03 – Substâncias produzidas pelo endófito *Pseudofusicoccum stromaticum*.



Fonte: ilustração adaptada de Sobreira⁽⁵¹⁾, 2020.

1.4 A abordagem OSMAC

Os métodos típicos de fermentação fúngica em meios artificialmente definidos, em alguns casos, são substitutos pobres para mimetizar o habitat natural de fungos endofíticos. Como consequência apenas um subconjunto de vias biossintéticas que codificam a produção de metabólitos secundários são expressas, limitando assim as perspectivas para realizar uma completa busca no potencial de descoberta de novos metabólitos bioativos em micro-organismos ^(52,53,54). Essas vias metabólicas ‘silenciadas’ deram início a muitas abordagens para explorar os fungos como recursos na obtenção de compostos novos e/ou maximizar a produção de substâncias com potencial bioatividade ^(52,54).

A abordagem mais simples é referida como OSMAC (*One Strain Many Compounds*), uma estratégia que, em vez de modificar geneticamente organismos (epigenética), simplesmente visa alterar a produção metabólica, alterando as condições de cultivo, como: fontes de C, N, P e suas concentrações; pH; atividade de água; disponibilidade de oxigênio; luz; temperatura, entre outras ^(52,55).

Um exemplo da utilização da abordagem OSMAC, é o estudo feito por nosso grupo de pesquisa, realizado por Martins ⁽⁵⁶⁾, onde foi observado os efeitos na produção do antifúngico griseofulvina pelo endófito *Xylaria* sp. PR-03, em meio de Czapek, utilizando três variáveis (iluminação, agitação e adição de KCl), onde foi observado que a maior produção de griseofulvina, com base nas três variáveis, estava relacionada com a utilização de iluminação agitação na fermentação do endófito. O estudo complementar relacionado ao período de fermentação do endófito (24-32 dias), indicou um aumento na produção da substância alvo no período de 24 dias, uma estagnação da produção nos períodos de 26-30 dias e um decaimento da produção de griseofulvina a partir de 32 dias de fermentação. Com isso, foi possível verificar que a utilização de iluminação, agitação e fermentação por 24 dias do endófito *Xylaria* sp. PR-03, em Czapek, maximizou a produção de griseofulvina em mais de 150%.

Outro exemplo é o estudo realizado por Ismaiel e colaboradores ⁽⁵⁷⁾, onde foi realizado a estudo de dois endófitos, *Aspergillus fumigatus* e *Alternaria tenuissima*, produtores do antitumoral paclitaxel, frente a diferentes estímulos (meio de cultivo, agitação, temperatura e tempo de incubação, pH e volume de meio) com o objetivo de maximizar a produção desta substância alvo, em que após a otimização do processo de fermentação, foi verificado um aumento da produção de 264% para

Aspergillus fumigatus e 228% para *Alternaria tenuissima*, mostrando que a otimização do processo fermentativo é uma boa abordagem para se aumentar a produção de substâncias de origem microbiana.

Embora uma alteração sistemática dos parâmetros de cultivo possa ser aplicada às cepas selecionadas, a abordagem OSMAC é uma abordagem aleatória que não permite o desenvolvimento de regras comuns a todos os micro-organismos. Mas enquanto não for compreendida a complexa rede de metabolismo secundário e sua regulação, toda modificação é permitida para encontrar novos produtos naturais, e com isso, resultados inesperados podem ser obtidos em qualquer caso, podendo então, ser possível a detecção de vários metabólitos de diferentes classes químicas a partir de uma única estirpe ^(52,54).

1.5 A abordagem da Co-cultura

É sabido que a biossíntese de metabólitos secundários é um processo de alto consumo de energia e, por esse motivo, é bem controlado por sistemas reguladores moleculares. Os micro-organismos podem adaptar seu metabolismo às mudanças nos ambientes, e essa adaptação requer que esses organismos percebam a multiplicidade de sinais extracelulares (ou entradas) e respondam controlando a expressão de um repertório apropriado de genes (saídas) ⁽⁵⁸⁾.

Em vários sistemas de co-cultura, os micro-organismos adaptam as produções de metabólitos secundários para responder às mudanças nas condições ambientais, que envolvem a competição inter-microbiana e a comunicação para a indução de novos metabólitos por meio da ativação de genes silenciosos ⁽⁵⁹⁾.

Esse procedimento também é crucial para a descoberta de substâncias bioativas, porque permite, muitas vezes em combinação com abordagens metabolômicas ^(60,61), a obtenção de novos compostos e/ou substâncias alvo, podendo ser produzidos por meio de co-cultivos projetados racionalmente ^(58,62).

Uma vez que entendermos completamente as complexas redes de interações bióticas, como as percepções do ambiente pelos micro-organismos e seus mecanismos responsivos, as abordagens de co-cultivo serão cada vez mais aplicadas com foco na biologia sintética ^(63,58) e na obtenção de substâncias para uso em medicamentos ^(59,62).

1.6 Classes de Metabólitos Secundários

Os metabólitos secundários podem ser distribuídos em diversas classes químicas, em que essa classificação é feita de acordo com a rota biossintética utilizada pelo organismo ^(1,2). Neste trabalho, após a identificação das substâncias, produzidas pelos endófitos *B. parva* e *P. stromaticum*, foi possível realizar a distribuição das mesmas em três grandes classes: Policetídeos, Terpenoides e Alcaloides.

1.6.1 Policetídeos

Os policetídeos são metabólitos secundários oriundos de organismos vivos, e são normalmente biossintetizados através da condensação de unidades acetil ou malonil, por enzimas especializadas ⁽⁶⁴⁾. Estruturalmente, trata-se de um grupo muito diverso de produtos naturais, com diversas atividades biológicas e propriedades farmacológicas. Nessa classe de substância, pode-se incluir os ácidos graxos, poliacetilenos, prostaglandinas, antibióticos macrólídeos e diversos compostos aromáticos (antraquinonas e tetraciclinas) ⁽⁶⁴⁾.

Os policetídeos de origem fúngica constituem uma grande classe de metabólitos secundários, apresentando uma das maiores diversidades estruturais entre os produtos naturais ^(64,65). A maioria dessas substâncias é ativa em diversos sistemas biológicos ^(64,66). Devido a esse fato, a busca por policetídeos em micro-organismos é apontada como uma boa estratégia para pesquisas de substâncias bioativas.

1.6.1.1 Compostos Fenólicos

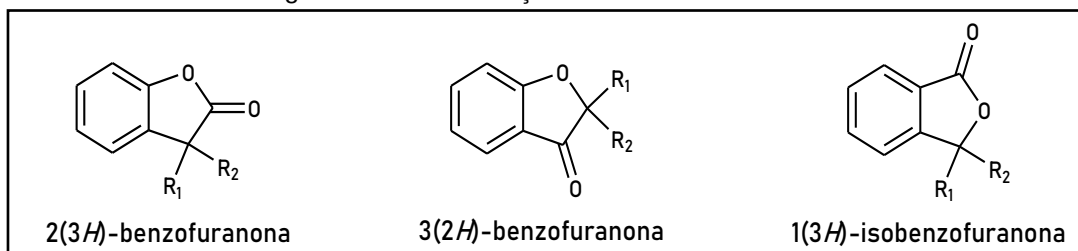
Entre a grande variedade de substâncias bioativas, destacam-se os compostos fenólicos pelas inúmeras quantidades de compostos descritos com grande potencial bioativo e diversidade estrutural ⁽⁶⁷⁾. Estes compostos são metabólitos secundários biossintetizados por diversos organismos e caracterizam-se por possuírem, pelo menos, um anel aromático ao qual se encontra ligado uma ou mais hidroxilas, podendo então, variar entre uma simples molécula fenólica à polímeros complexos de elevado peso molecular ^(67,68).

Como mencionado, compostos fenólicos apresentam uma grande variedade de atividades biológicas, como: antioxidante, antialérgica, cardioprotetiva, anti-inflamatória, antitumoral, entre outras. Devido a diversidade do potencial bioativo dos compostos fenólicos, esta classe de compostos se tornou objeto de grande interesse para a comunidade científica ⁽⁶⁹⁾.

1.6.1.2 Benzofuranonas

Benzofuranonas são uma classe bem conhecida de substâncias que podem ser obtidas via fontes naturais, por exemplo de plantas e/ou de micro-organismos, ou via processos sintéticos utilizando substâncias disponíveis comercialmente ⁽⁷⁰⁾. A estrutura básica das benzofuranonas contém um anel de benzeno fundido com uma furanona (Figura 04). A principal característica estrutural desses compostos é o centro quiral quaternário (ou terciário) fundido na posição 3 (ou 2) do núcleo benzofuran-2(ou 3)-ona, com vários graus de substituição ao seu redor ⁽⁷¹⁾.

Figura 04 – Classificações das benzofuranonas.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Compostos pertencentes à esta classe exibem uma ampla gama de atividades biológicas e farmacêuticas, como propriedades citotóxicas, antibacterianas, antioxidantes e antiamilóides ^(70,71).

1.6.1.3 Ftaletos

A estrutura básica dos ftaletos é a 1(3*H*)-isobenzofuranona, que contém um anel de benzeno fundido com uma γ -lactona entre os átomos de carbono 1 e 3 (Figura 04). Atualmente, todos os compostos de ftaletos naturais conhecidos foram identificados como derivados da 1(3*H*)-isobenzofuranona. As estruturas desses derivados têm a estrutura do núcleo substituída com um ou mais grupos em posições

diferentes ou contêm uma forma reduzida com uma, duas ou nenhuma ligação dupla no anel aromático e várias substituições em posições diferentes ^(72,73).

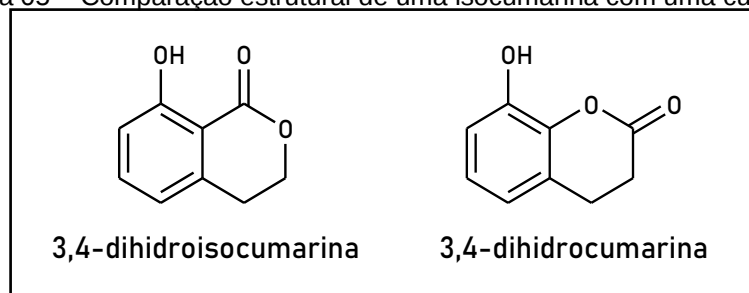
Os ftaletos estão amplamente presentes em plantas, fungos, líquens e hepáticas. Muitas plantas contendo ftaletos têm sido usadas em todo o mundo como remédios fitoterápicos em medicamentos tradicionais e populares, suplementos alimentares e aromas alimentares. Essa classe de substâncias pode apresentar diversas atividades biológicas, tais como: antioxidante, anti-hiperglicêmica, analgésica, inseticida, antifúngica, neurológica entre outras ^(72,73).

Por serem estruturalmente simples e biologicamente ativos, com diversas propriedades benéficas, os ftaletos constituem uma classe principal de compostos para modificação química, a fim de aprimorar suas atividades farmacológicas promissoras ^(72,73).

1.6.1.4 Isocumarinas

As isocumarinas são pentacetídeos aromáticos que possuem um esqueleto base de nove carbonos, contendo um anel aromático fundido à uma delta lactona estruturalmente semelhantes às cumarinas (Figura 05), possuindo como diferença um anel lactônico invertido, podendo apresentar diversos tipos de substituições no anel α -piranona e/ou no anel benzênico ⁽⁷⁴⁾. As isocumarinas podem ser encontradas em uma grande variedade de organismos, como bactérias, líquens e fungos, sendo relatadas de diferentes espécies e gêneros de fungos endofíticos ⁽⁷⁵⁾.

Figura 05 – Comparação estrutural de uma isocumarina com uma cumarina.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Um número, sempre crescente, de isocumarinas vêm sendo descobertas, em que cerca de 400 isocumarinas e dihidroisocumarinas foram isoladas de várias fontes de produtos naturais. No entanto, este número é pequeno em comparação com os de

cumarinas e flavonoides conhecidos. Apesar da biodiversidade apresentada por esta classe, o padrão de substituição não é tão diversificado, em que a maioria da isocumarinas isoladas, são derivadas de isocumarinas conhecidas anteriormente ⁽⁷⁵⁾.

Essa classe de substâncias pode apresentar diversas atividades biológicas, como por exemplo: atividade antimicrobiana, antialérgica, antimalárica, antifúngica; reguladores de crescimento de plantas e fitotoxicidade, entre outras atividades ^(74,75). Devido a inúmeras atividades biológicas e ao enorme valor farmacêutico, esforços têm sido devotados para desenvolver novos métodos para a obtenção e síntese de compostos contendo esta estrutura privilegiada ^(74,75).

1.6.1.5 Naftalenonas

Da mesma forma que as isocumarinas, as naftalenonas também são pentacetídeos aromáticos, no entanto, diferem no esqueleto base, apresentando dez carbonos e, ao invés da presença de uma lactona, apresentam uma cetona cíclica. Esta classe de substâncias também pode apresentar diversos tipos de substituições no anel aromático e/ou no anel cetônico ^(76,77).

Essas substâncias, assim como as isocumarinas, também podem ser encontradas em uma variedade de organismos, sendo as principais fontes destes metabólitos as plantas e fungos. A principal atividade biológica relatada para estas substâncias é a atividade fitotóxica ⁽⁷⁶⁾, mas também podem apresentar atividade anticolinesterásica e anti-inflamatória ⁽⁷⁸⁾.

1.6.2 Terpenoides

Os terpenoides, também conhecidos como isoprenoides, são os produtos naturais mais numerosos e estruturalmente diversos. O nome genérico “terpeno” foi originalmente aplicado aos hidrocarbonetos encontrados na terebintina, em que o sufixo “eno” indica a presença de ligações olefínicas nestes hidrocarbonetos ^(79,80).

Os terpenoides são classificados com base no número e organização estrutural dos carbonos formados pelo arranjo linear de unidades de isopreno (2metilbuta-1,3-dieno), seguidos de ciclização e rearranjos do esqueleto de carbono com uma característica empírica conhecida como regra do isopreno ^(79,80).

Dependendo do número de unidades isoprênicas, os terpenoides são classificados como: hemiterpenoides (C_5), monoterpenoides (C_{10}), sesquiterpenoides (C_{15}), diterpenoides (C_{20}), sesterterpenoides (C_{25}), triterpenoides (C_{30}) e tetraterpenoides (C_{40}) ^(79,80). Esses compostos têm uma variedade de papéis na mediação de interações benéficas ou antagônicas entre organismos, podendo então apresentar uma diversidade de atividades biológicas ^(79,80).

Muitos dos terpenoides conhecidos apresentam um alto valor comercial, nas áreas alimentícias (flavorizantes) e perfumaria, além de apresentarem propriedades com potencial farmacêutico, como: atividade anticarcinogênica (álcool perol e taxol), antimalárica (artemisinina), antiulcera, hepaticida, antimicrobiana ou diurética (glicirrizina) ⁽⁸⁰⁾.

1.6.2.1 Diterpenos

Os diterpenos compreendem um grupo de compostos quimicamente heterogêneos, todos com um esqueleto de 20 carbonos oriundos de quatro unidades de isopreno. Eles podem ser classificados como diterpenos lineares, bi-, tri-, tetra-, penta- ou macrocíclicos, dependendo do núcleo esquelético, e assim serem distribuídos em diversas subclasses (labdanos, clerodanos, abietanos, kauranos, taxanos, entre outras) ^(81,79).

São substâncias amplamente distribuídas na natureza (plantas, micro-organismos, insetos), e tem sido encontradas em diferentes estados de oxidação, desde hidrocarbonetos até compostos altamente oxigenados ^(81,79), e pesquisas aprofundadas sobre bioatividade demonstraram que alguns diterpenóides são valiosos para o tratamento de doenças graves, pois apresentam diversas atividades, como: citotóxica, antileucêmica, anti-inflamatória, antibacteriana, entre outras ⁽⁸¹⁾.

1.6.2.2 Sesterterpenos

Embora pertençam a uma das maiores famílias de produtos naturais, os sesterterpenos são um grupo relativamente pequeno de metabólitos, uma vez que apenas ~1.000 sesterterpenos de origem natural foram reportados, dentre os ~80.000 de terpenoides conhecidos ^(82,83).

Estes metabólitos podem ser obtidos de diversas fontes naturais (como por exemplo plantas, micro-organismos, insetos, esponjas marinha e outros organismos) e caracterizam-se por possuírem cinco unidades de isopreno, sendo então seu esqueleto compostos por 25 carbonos podendo assumir diversas estruturas, como: lineares, mono-, bi-, tri-, tetra- ou macrocíclicas ^(82,83).

A importância dos sesterterpenos reside principalmente no fato de que esses compostos exibem propriedades biológicas potentes como: atividades anti-inflamatória, citotóxica, anticâncer, antimicrobiana, antitubercular e anti-biofilme ⁽⁸⁴⁾.

1.6.3 Alcaloides

A primeira definição de alcaloides foi introduzida por W. Meissner em 1818 e foi atribuída a todos os compostos orgânicos de origem vegetal caracterizados por caráter básico ⁽⁸⁵⁾. Estudos subsequentes indicaram a presença do átomo de nitrogênio em um sistema de anel heterocíclico dentro da estrutura dos alcaloides. De acordo com essa definição, eles foram classificados como aminas primárias, secundárias, terciárias ou quaternárias ⁽⁸⁶⁾.

A partir de então, apoiados por várias pesquisas científicas, os parâmetros que enquadram esse grupo de metabólitos secundários evoluíram, levando à introdução de inúmeras estruturas químicas nesta classe de compostos. Os alcaloides foram estabelecidos para estar presentes no reino vegetal e em animais, incluindo outros organismos, como fungos e organismos marinhos. Além disso, metabólitos com um caráter neutro contendo grupos amida também foram classificados como alcaloides, assim como compostos contendo átomo(s) de nitrogênio incluídos na cadeia lateral, um grupo nitro ou outros grupos funcionais contendo nitrogênio ^(87,88).

A variedade dos tipos de alcaloides confirma a vasta diversidade química deste grupo de metabólitos. As diferenças entre as estruturas químicas influenciam a bioatividade dos compostos, tornando-os alvos para uso clínico na forma de medicamentos para o tratamento de diversas doenças. Numerosos estudos descrevem as possíveis bioatividades e aplicações clínicas, e mostram que modificações estruturais, via semissíntese, pode levar a um aumento da atividade, a uma melhor farmacocinética e a um maior nível de segurança para o uso clínico ⁽⁸⁹⁾.

1.6.3.1 Cicolpeptídeos

Peptídeos são cadeias de aminoácidos, unidos por uma ligação peptídica em uma sequência específica. Estes podem ser de origem diversa, como plantas, animais, micro-organismos, organismos marinhos ou mesmo sintéticos. Muitos podem apresentar um potencial biológico e podem ser utilizados com sucesso no tratamento de muitas doenças ⁽⁹⁰⁾.

Esta classe de substâncias pode ser encontrada de duas formas: linear e ciclizada. No entanto, uma das principais barreiras ao uso terapêutico de peptídeos lineares é sua baixa estabilidade sob condições fisiológicas, onde podem rapidamente serem clivados por enzimas *in vivo*, perdendo sua atividade biológica. Já os peptídeos cíclicos, apresentam uma restrição na liberdade conformacional de cada aminoácido dentro do anel, forçando uma estrutura ordenada, fornecendo, assim afinidades de ligação superiores às ligantes naturais de um receptor ⁽⁹¹⁾.

Nos últimos anos, observou-se um aumento dos estudos com cilo-peptídeos devido à um diversificado potencial biológico, em que podem apresentar mecanismo de ação em várias condições de doenças como câncer, imunidade, doenças cardiovasculares, hipertensão, inflamação, diabetes, infecções microbianas etc. ^(90,91).

Dicetopiperazinas são os menores ciclo-peptídeos, gerados pela condensação de dois aminoácidos, e sua estrutura básica inclui um núcleo de piperazina de seis membros. O anel pirizínico confere maior rigidez estrutural e estabilidade contra a proteólise em relação aos peptídicos acíclicos ^(92,93).

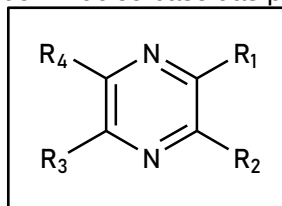
Os produtos naturais com esqueleto de 2,5-dicetopiperazina são estruturalmente diversos e produzidos por uma ampla gama de micro-organismos. Essa diversidade estrutural desses dipeptídeos cíclicos se traduz em uma gama igualmente ampla de atividades biológicas, incluindo efeitos imunossupressores, herbicidas, antibacteriano, antifúngico, antiviral e antitumoral, entre outros ^(92,93).

1.6.3.2 Pirazinas

As pirazinas, também conhecidas como 1,4-diazina, são substâncias compostas por pelo menos um heterocíclico aromático, de seis membros, simétrico contendo dois átomos de nitrogênio nas posições 1 e 4 (Figura 06, p. 42). A estrutura

simétrica da 1,4-diazina é refletida nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (em CDCl_3) com um sinal em δ_{H} 8,59 e um sinal em δ_{C} 145,9 ^(94,95).

Figura 06 – Núcleo base das pirazinas.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

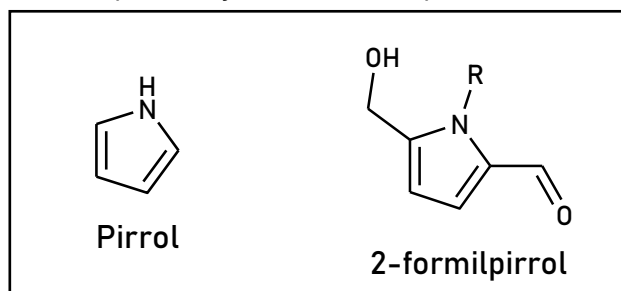
Vários produtos naturais contendo esse núcleo já foram isolados, como por exemplo, a clavulazina isolada de *Clavularia viridis* (coral mole de Okinawa), a botrilazina A do ascidiano vermelho *Botryllus leachi* e a barrenazina de tunicado não identificado coletado em Madagascar. Esse núcleo pode ser o responsável pelo sabor e pelo aroma agradável de vários alimentos ^(94,95).

As pirazinas também podem apresentar diversas atividades biológica, como atividades anti-HIV, antituberculares e antibacterianas, além de também poderem ser usadas como intermediários farmacêuticos, por exemplo, 2-metilpirazina utilizada na síntese da droga antitubercular pirazinamida. Além da pirazinamida, vários outros produtos farmacêuticos com núcleo de pirazina demonstraram numerosos efeitos fisiológicos, como anti-HIV (oltipraz), inibidor de proteassoma (bortezomibe), dependência de narcóticos (varencelina), antibiótico fúngico (ácido aspergílico), doença cardíaca pulmonar (ligustrazina), hipnótico (eszopiclona) e colírio para glaucoma ou hipertensão ocular (brimonidina) ⁽⁹⁴⁾.

1.6.3.3 Pirróis e seus derivados

O pirrol é um composto aromático heterocíclico de cinco membros contendo um átomo de nitrogênio em sua estrutura (Figura 07, p. 43), e substâncias contendo este núcleo podem ser encontradas em diversas fontes naturais e/ou serem de origem sintética. O núcleo pirrólico tem diversas aplicações em compostos terapeuticamente ativos, que incluem fungicidas, antibióticos, drogas anti-inflamatórias, drogas redutoras de colesterol, agentes antitumorais e muito mais ^(96,97).

Figura 07 – Representação estrutural do pirrol e do 2-formilpirrol.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Além disso, podem ser componentes de polímeros e corantes indigóides. Podem também serem utilizados em reações catalíticas em processos de polimerização, na inibição de corrosão, em processos metalúrgicos e na química de luminescência. E também podem ser intermediários na síntese de alcaloides de origem natural biologicamente importantes ^(96,97).

O 5-hidroximetilpirrol-2-carbaldeídos (Figura 07), às vezes chamado de 2-formilpirróis ou pirralinas, foram obtidos de uma grande variedade de fontes naturais, bem como de medicamentos tradicionais e alimentos cozidos ⁽⁹⁸⁾. Sua presença também foi observada em vários produtos processados termicamente, revelando sua provável origem - a reação não enzimática de Maillard - e até o momento nenhuma biossíntese enzimática foi proposta para esses compostos. Independentemente de sua origem, esses compostos exibem uma série de bioatividades valiosas, incluindo efeitos hepatoprotetores, imunoestimuladores, antiproliferativos e antioxidantes ⁽⁹⁸⁾.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em virtude dos resultados apresentados, constata-se que o estudo químico de *B. parva* via abordagem OSMAC, em cinco meios de cultivo (Arroz, Ext. de malte, Nutrient, PDB e YM), apresentou uma produção metabólica diversificada, verificada pelos sinais e picos observados nos experimentos de RMN ^1H e CLAE-DAD, evidenciando que variações dos microcomponentes/nutrientes presentes nos meios de cultivo influenciaram a ativação de diferentes rotas biossintéticas e, portanto, aumentaram a diversidade de metabólitos produzidos pelos micro-organismos.

Os estudos dos extratos obtidos em meio de arroz e ext. de malte, nos permitiu a identificação de 30 metabólitos secundários pertencentes a classes distintas de substâncias, que podem apresentar diversos potenciais biológicos.

Destaca-se ainda que dos metabólitos identificados, ~37% são inéditos: botryosftaleto A (**04**), botryospirazina A (**05**), botryosarina A (**06**), botryosphaerina J (**07**), botryosarina B (**08**), botryosphaerina K (**09**), botryosphaerina L (**20**), 4-hidroxitertastacina (**21**), botryosbenzofuranona A (**26**), botryosbenzenodiol A (**28**) e botryosbenzenodiol B (**32**), mostrando que a utilização da abordagem OSMAC no cultivo de fungos endofíticos pode ser um bom procedimento para a obtenção de substâncias novas. Esses resultados fortalecem a necessidade de mais estudos químicos destes micro-organismos, pois podem ser uma fonte promissora de metabólitos secundários novos e/ou bioativos.

Levando-se em consideração que o endófito *B. parva* foi isolado das folhas de um espécime vegetal saudável de *S. cumini* (L.) Skeels, e que os extratos apresentaram potencial biológico para a maioria dos ensaios estudados, a vertente de uma simbiose endófito-planta não pode ser descartada. Esses dados de potencial biológico são preliminares, no entanto, mostram que fungos endofíticos apresentam um grande potencial na produção de metabólitos secundários bioativos.

O estudo químico de *P. stromaticum*, em meio de ext. de malte, nos permitiu a obtenção e identificação de 11 substâncias, sendo quatro compostos fenólicos, três dicetopiperazinas e quatro pirrololactonas. Destaca-se ainda, que o extrato obtido apresentou potencial antioxidante e antiglicante elevado em comparação com os controles positivos, em que estas potencialidades podem estar relacionadas aos

compostos fenólicos, substâncias reconhecidas pela ação contra estresses oxidativos.

Além disso, levando-se em consideração que este endófito foi isolado dos frutos maduros de *S. cumini* (L.) Skeels, e que os frutos têm atividade antioxidante reconhecida, sugere-se que o endófito *P. stromaticum* possa ser o responsável pela atividade apresentada por estes frutos.

Os resultados obtidos do co-cultivo dos endófitos demonstraram uma produção metabólica diferenciada quando comparada à produção das monoculturas, observando a produção de oito substâncias que não apresentaram registros nas bases de dados pesquisadas sendo, portanto, consideradas inéditas, ainda a serem identificadas. Esta produção metabólica constata que estes micro-organismos são influenciados na presença do outro micro-organismo, e comprova que a prática de co-cultura de micro-organismos pode ser uma boa abordagem para a obtenção de substâncias novas.

Espera-se que os resultados apresentados neste trabalho contribuam para a compreensão da quimiodiversidade dos endófitos *B. parva* e *P. stromaticum*, considerando-se os poucos estudos a eles relacionados.

Os resultados obtidos neste trabalho são muito encorajadores, pois reforçam o conhecimento da grande diversidade química e potencialidade biológica dos metabólitos secundários produzidos por micro-organismos associados a espécies vegetais, principalmente quando considera-se a taxa de extinção da biodiversidade que abriga inúmeros endófitos que nem sequer foram descritos e consequentemente explorados do ponto de vista químico e biológico.

REFERÊNCIAS

- (1) BHAT. S. V.; NAGASAMPAGI. B. A.; SIVAKUMAR. M. **Chemistry of Natural Products**, 4nd ed, New Delhi, India: Narosa Publishing House, 2007, p. 840.
- (2) SPAINHOUR. C. B. Natural products. In: GAD. S. C. (Ed.). **Drug discovery handbook**, New York: Wiley-Interscience, 2005, Chap. 1, p. 12-72.
- (3) BUTLER. M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 2141-2153, 2004.
- (4) STROBEL. G.; DAISY. B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 67, p. 491-502, 2003.
- (5) CRAGG. M. G.; GROTHAUS. P. G.; NEWMAN. D. J. New horizons for old drugs and dugs leads. **J. Nat. Prod.**, v. 77, p. 703-723, 2014.
- (6) PUPO. M. T.; GALLO. M. B. C.; VIEIRA. P. C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Quím. Nova**, v. 30, p. 1446-1455, 2007.
- (7) CHANDRA. S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 95, p. 47-59, 2012.
- (8) PEREIRA. A. L.; PITA. J. R. Alexander Fleming (1881-1955): da descoberta da penicilina (1928) ao Prêmio Nobel (1945). **Rev. Fac. Let.**, v. 6, p. 129-151, 2005.
- (9) IOCA. L. P.; ALLARD. P. M.; BERLINK. R. G. S. Thinking big about small beings – the (yet) underdeveloped microbial natural products chemistry in Brazil. **Nat. Prod. Rep.**, v. 3, p. 646-675, 2014.
- (10) BUSS. A. D.; BUTLER. M. S. **Natural Product Chemistry for Drug Discovery**. Cambridge, UK: RSC. 2010, p. 458.
- (11) McWILLIAMS. A. **Microbial Products** – Technologies, Applications and Global Markets. 2018. Disponível em <<https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/microbial-products-technologies-applications-and-global-markets-report.html>> Acesso em: 28 nov. 2019.
- (12) MITCHELL. A. *et al.* Volatile antimicrobials from *Muscodor crispans*. a novel endophytic fungus. **Microbiology**, v. 156, p. 270-277, 2010.
- (13) MOORE-LANDECKER. E. **Fundamentals of the Fungi**. 4th ed. New Jersey: Pentice Hall, Inc. 1996, 574 p.
- (14) BORGES. W. *et al.* Endophytic fungi: natural products. enzymes and biotransformation reactions. **Curr. Org. Chem.**, v. 13, p.1137-1163, 2009.

- (15) ARAUJO. W. L. *et al.* (Coord.) **Guia prático**: isolamento e caracterização de micro-organismos endofíticos. Piracicaba: Copiadora “Luiz de Queirós”. 2010. 167 p.
- (16) ESPOSITO. E.; AZEVEDO. J. L. **Fungos**: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 2. ed. Caxias do Sul: Ed. UCS. 2010.
- (17) GADD. G. M. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. **Mycol. Res.**, v. 111, p. 3-49, 2007.
- (18) LINDAHL. B. D. *et al.* Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest. **New Phytol.**, v. 173, p. 611-620, 2007.
- (19) BAREA. J. M. *et al.* Microbial co-operation in the rhizosphere. **J. Exp. Bot.**, v. 56, p. 1761-1778, 2005.
- (20) HAWKSWORTH. D. L. LÜCKING. R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. **Microbiol. Spectrum.**, v. 5, p. 1-17, 2017.
- (21) STROBEL. G. A. *et al.* Natural products from endophytic microorganisms. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 257-268, 2004.
- (22) CHEN. Y. L. *et al.* Six-year fertilization modifies the biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a temperate steppe in Inner Mongolia. **Soil Biol. Biochem.**, v. 69, p. 371-381, 2014.
- (23) DAÍ. J. *et al.* Novel highly substituted biaryl ethers, phomosines D–G, isolated from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Adenocarpus foliolosus*. **Europ. J. Organ. Chem.**, v. 23, p. 5100-5105, 2005.
- (24) KHARWAR. R. N. *et al.* Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Nat. Prod. Rep.**, v. 28, p. 1208-1228, 2011.
- (25) PEIXOTO NETO. P. A., S.; AZEVEDO. J. L.; ARAÚJO. W. L. Microorganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotechnol. Ciênc. Desenvolv.**, v. 5, p. 62-76, 2002.
- (26) JALGAONWALA. R. E.; MOHITE. B. V.; MAHAJAM. R. T. A review: natural products from plant associated endophytic fungi. **J. Microbiol. Biotechnol. Res.**, v. 1, p. 21-32, 2011.
- (27) RUSTAMOVA, N. *et al.* Novel secondary metabolites from endophytic fungi: synthesis and biological properties. **Phytochem. Rev.**, doi: 10.1007/s11101-020-09672-x; 2020.
- (28) TOGHUEO, R. M. K.; SAHAL, D.; BOYOM, F. F. Recent advances in inducing endophytic fungal specialized metabolites using small molecule elicitors including epigenetic modifiers. **Phytochemistry**. v. 174, p. 112338-, 2020.

- (29) MAYER. A. M. Plant-fungal interactions: a plant physiologist's viewpoint. **Phytochemistry**, v. 28, p. 311-317, 1989.
- (30) TAKAHASHI. J. A.; LUCAS. E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Quím. Nova**, v. 31, p. 1807-1813, 2008.
- (31) CROUS. P. W. *et al.* Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Stud. Mycol.**, v. 55, p. 235-253, 2006.
- (32) SCHOCH. C. L. *et al.* A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. **Mycologia**, v. 98, p. 1041-1052, 2006.
- (33) PHILLIPS. A.J.L. *et al.* The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Stud. Mycol.**, v. 76, p. 51-167, 2013.
- (34) CHETHANA. K. W. T. *et al.* Trail decryption of molecular research on Botryosphaeriaceae in woody plants. **Phytopathol. Mediterr.**, v. 55, p. 147–171, 2016.
- (35) YAN. J. *et al.* Species of Botryosphaeriaceae involved in grapevine dieback in China. **Fungal Divers.**, v. 61, p. 221–236, 2013.
- (36) MORALES-CRUZ. A. *et al.* Distinctive expansion of gene families associated with plant cell wall degradation, secondary metabolism, and nutrient uptake in the genomes of grapevine trunk pathogens. **BMC Genomics**, v. 16, p. 1–22, 2015.
- (37) PAOLINELLI-ALFONSO. M. *et al.* Global transcriptional analysis suggests *Lasiodiplodia theobromae* pathogenicity factors involved in modulation of grapevine defensive response. **BMC Genomics**, v. 17, p. 615, 2016.
- (38) COUTINHO. I. B. L. **Caracterização molecular e controle de fungos da família Botryosphaeriaceae associados às fruteiras tropicais**. 2016. 131 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2016.
- (39) PHILLIPS. A. J. L. **The Botryosphaeria site**. Caparica: Universidade Nova de Lisboa. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Centro de Recursos Microbiológicos. 2004. Disponível em: <www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/introduction.htm>. Acesso em: 18 nov. 2017.
- (40) NIEKERK. J. M. V. *et al.* DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. **Mycologia**, v. 96, p. 781-798, 2004.
- (41) PHILLIPS. A. J. L. *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevine in Portugal. **Phytopathol. Mediterr.**, v. 41, p. 3-18, 2002.
- (42) ZHAI. L. *et al.* Biological and molecular characterization of four *Botryosphaeria* species isolated from pear plants showing wart and stem canker in China. **Plant Dis.**, v. 98, p. 716-726, 2014.

- (43) MONFARDINI, J. D. **Diterpenos tetranorlabdanos e isocumarinas produzidos por *Botryosphaeria parva*, um fungo endofítico em *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae)**. 2016. 167 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2016.
- (44) ABBA. C.C. *et al.* Phenolic Compounds from Endophytic *Pseudofusicoccum* sp. Isolated from *Annona muricata*. **Trop. J. Nat. Prod. Res.**, v. 2, p. 328-331, 2018.
- (45) MISHRA. A. *et al.* Characterization of *Pseudofusicoccum adansoniae*, an endophytic fungus residing in photosynthetic root of *Tinospora cordifolia*, a Medicinal Plant. **Proc. Natl. Acad. Sci. India B**, v. 89, p. 1319-1326, 2019.
- (46) MOHALI. S. R.; SLIPPERS. B.; WINGFIELD. M. J. Identification of *Botryosphaeriaceae* from *Eucalyptus*, *Acacia* and *Pinus* in Venezuela. **Fungal Divers.**, v. 25, p. 103-125, 2007.
- (47) MOHALI. S. R.; SLIPPERS. B.; WINGFIELD. M. J. Two new *Fusicoccum* species from *Acacia* and *Eucalyptus* in Venezuela based on morphology and DNA sequence data. **Mycological Research**, v. 110, p. 405-413, 2006.
- (48) NETTO, M. S. *et al.* Analysis of phylogeny, distribution, and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species associated with gummosis of *Anacardium* in Brazil, with a new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Biol.**, v. 121, p. 437-451, 2017.
- (49) GONÇALVES, F. J. T. *et al.* Patogenicidade de espécies de *Botryosphaeriaceae* endofíticas de plantas da Caatinga do estado do Ceará em manga e umbu-cajá. **Summa Phytopathol.**, v. 42, p. 43-52, 2016.
- (50) MARQUES, M. W. *et al.* *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* and *Pseudofusicoccum* species associated with mango in Brazil. **Fungal Divers.**, v. 61, p. 195-208, 2013.
- (51) SOBREIRA, A. C. M. *et al.* Endophytic fungus *Pseudofusicoccum stromaticum* produces cyclopeptides and plant-related bioactive rotenoids. **RSC Adv.**, v. 8, p. 35575-35586, 2018.
- (52) BODE, H. B. *et al.* Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. **ChemBioChem**, v. 3, n. 7, p. 619-627, 2002.
- (53) WILLIAMS, R. B. *et al.* Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. **Org. Biomol. Chem.**, v. 6, p. 1895-1897, 2008.
- (54) PAN, R. *et al.* Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: A literature review. **Front. Microbiol.**, v. 10, p. 1-20, 2019.
- (55) GUPTA; V. K. *et al.* **Applications of Microbial Engineering**. 1st ed. Boca Raton, EUA: CRC Press, 2013. 504 p.

- (56) MARTINS, G. F. **Prospecção de griseofulvina, um potente antimicótico, em fungos endofíticos do gênero *Xylaria* sp. isolados de espécies vegetais do Cerrado**. 2016. 204 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2016.
- (57) ISMAIEL, A. A. *et al.* Production of paclitaxel with anticancer activity by two local fungal endophytes, *Aspergillus fumigatus* and *Alternaria tenuissima*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 101, p. 5831-5846, 2017.
- (58) LU, C.; SHEN, Y. Harnessing the potential of chemical defenses from antimicrobial activities. **BioEssays**, v. 26, p. 808-813, 2004.
- (59) NETZKER, T. *et al.* Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. **Front. Microbiol.**, v. 6, p. 1-13, 2015.
- (60) MARMANN, A. *et al.* Co-cultivation - A powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. **Mar. Drugs**, v. 12, p. 1043–1065, 2014.
- (61) WU, C. *et al.* Metabolomics in the natural products field - A gateway to novel antibiotics. **Drug Discov. Today Technol.**, v. 13, p. 11–17, 2015.
- (62) BERTRAND, S. *et al.* Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnol. Adv.**, v. 32 p. 1180–1204, 2014.
- (63) GOERS, L.; FREEMONT, P.; POLIZZI, K. M. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. **J. R. Soc. Interface**, v. 11, p. 1-13, 2014.
- (64) DALEY, D. K., BROWN, K. J., & BADAL, S. Fungal Metabolites. In: **Pharmacognosy**. Academic Press, 2017, p. 413–421.
- (65) SCHÜMANN, J.; HERTWECK, C. Advances in cloning, functional analysis and heterologous expression of fungal polyketide synthase genes. **J. Biotechnol.**, v. 124, p. 690-703, 2006.
- (66) WEISSMAN, K. J. Polyketide biosynthesis: understanding and exploiting modularity. **Philos. Trans. R. Soc., London, Ser. A**, v. 362, p. 2671-2690, 2004.
- (67) PEREZ-GREGORIO, R.; SIMAL-GANDARA, J. A critical review of bioactive food components, and of their functional mechanisms, biological effects and health outcomes. **Curr. Pharm. Des.**, v. 23, p. 2731–2741, 2017.
- (68) BALANGE, A. K.; BENJAKUL, S. Effect of oxidised phenolic compounds on the gel property of mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) surimi. **LWT - Food Sci. Technol.**, v. 42, p. 1059-1064, 2009.
- (69) VILLEGAS-AGUILAR, M. D. C. *et al.* Pleiotropic biological effects of dietary phenolic compounds and their metabolites on energy metabolism, inflammation and aging. **Molecules**, v. 25, p. 596-623, 2020.

- (70) NUNES, J. P. S. *et al.* The antihypersensitive and antiinflammatory activities of a benzofuranone derivative in different experimental models in mice: the importance of the protein kinase c pathway. **Anesth. Analg.**, v. 119, p. 836-846, 2014.
- (71) Li, Y.; Li, X.; Cheng, J. P. Catalytic Asymmetric Synthesis of Chiral Benzofuranones. **Adv. Synth. Catal.**, v. 356, p. 1172 – 1198, 2014.
- (72) LEON, A. *et al.* Phthalides: distribution in nature, chemical reactivity, synthesis, and biological activity. *In: Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, v. 104, p. 127-246, 2017.
- (73) LIN, G.; CHAN, S. S. K.; CHUNG, H. S.; LI, S. L. Chemistry and biological activities of naturally occurring phthalides. *In: Studies in Natural Products Chemistry*, v. 32, p. 611-669, 2005.
- (74) PAL, S.; CHATARE, V.; PAL, M. Isocoumarin and its derivatives: an overview on their synthesis and applications. **Curr. Org. Chem.**, v. 15, p. 782-800, 2011.
- (75) SAEED, A. Isocoumarins, miraculous natural products blessed with diverse pharmacological activities. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 116, p. 290-317, 2016.
- (76) CIMMINO, A. *et al.* Botrytone, a new naphthalenone pentaketide produced by *Botrytis fabae*, the causal agent of chocolate spot disease on *Vicia faba*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, p. 9201-9206, 2011.
- (77) XIAO, W. J. *et al.* New secondary metabolites from the endophytic fungus *Fusarium* sp. HP-2 isolated from “Qi-Nan” agarwood. **Fitoterapia**, v. 130, p. 180-183, 2018.
- (78) CHOU, T. H. *et al.* Orthoquinone and naphthalenone derivatives from *Berrya ammonilla* and their anti-inflammatory activity. **Planta Med.**, v. 78, p. 919-925, 2012.
- (79) LUDWICZUK, A.; SKALICKA-WOŹNIAK, K.; GEORGIEV, M. I. Terpenoids. *In: Pharmacognosy - Fundamentals, Applications and Strategies*. Academic Press, 2017, p. 233-266.
- (80) JAN, S.; ABBAS, N. Chemistry of Himalayan Phytochemicals. *In: Himalayan Phytochemicals*. Elsevier Ltd. 2018, p. 121–166.
- (81) MIN, Z. D. Diterpenes. *In: Introduction to Natural Products Chemistry*. Taylor & Francis Group LLC, 2012, p. 101-123.
- (82) WANG, L. *et al.* Sesterterpenoids. **Nat. Prod. Rep.**, v. 30 p. 455-473, 2013.
- (83) CHRISTIANSON, D. W. Structural and chemical biology of terpenoid cyclases. **Chem. Rev.**, v. 117, p. 11570–11648, 2017.
- (84) MAXIMO, P.; LOURENCO, A. Marine Sesterterpenes: An Overview. **Curr. Org. Chem.**, v. 22, p. 2381-2393, 2018.

- (85) PREININGER, V. The pharmacology and toxicology of the Papaveraceae alkaloids. **Alkaloids Chem. Physio.**, v. 15, p. 207-61, 1975.
- (86) DEWICK, P. M. **Medicinal natural products**: a biosynthetic approach. 3rd ed. The Atrium, United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd; 2009. p. 311-481.
- (87) ANISZEWSKI, T. Alkaloids: secrets of life. *In*: **Alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role**, vol. 5-6, 7-10. The Netherlands: Elsevier B.V; 2007. p. 182.
- (88) FUNAYAMA, A. S.; CORDELL, G. A. **Alkaloids: a treasury of poisons and medicines**. The Netherlands: Elsevier B.V; 2015. p. 1-10.
- (89) KUKULA-KOCH, W. A.; WIDELSKI, J. Alkaloids. *In*: **Pharmacognosy - Fundamentals, Applications and Strategies**. Academic Press, 2017, p. 163-198.
- (90) PRIYA, S. Therapeutic Perspectives of Food Bioactive Peptides: A Mini Review. **Protein Peptide Lett.**, v. 26, p. 664-675, 2019.
- (91) CLARO, B.; BASTOS, M.; GARCIA-FANDINO, R. Design and applications of cyclic peptides. *In*: **Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering**. Woodhead Publishing, 2018, p. 87-129.
- (92) ZHAO, P. *et al.* Non-lipopeptide fungi-derived peptide antibiotics developed since 2000. **Biotechnol. Lett.**, v. 41, p. 651-673, 2019.
- (93) BORGMAN, P.; LOPEZ, R. D.; LANE, A. L. The expanding spectrum of diketopiperazine natural product biosynthetic pathways containing cyclodipeptide synthases. **Org. Biomol. Chem.**, v. 17, p. 2305-2314, 2019.
- (94) RAM, V. J.; SETHI, A.; NATH, M.; PRATAP. R.; Six-Membered Heterocycles. *In*: **The Chemistry of Heterocycles**. Elsevier Ltd. 2019, p. 3-391.
- (95) SATO, N. Pyrazines and their Benzo Derivatives. *In*: **Comprehensive Heterocyclic Chemistry II**, v. 6. Elsevier Science Ltd. 1996, p. 233-278.
- (96) MAL, D., SHOME, B.; DINDA, B. K. Pyrrole and Its Derivatives - Heterocycles. *In*: **Natural Product Synthesis**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2011, p. 187-220.
- (97) BHARDWAJ, V. *et al.* Pyrrole: a resourceful small molecule in key medicinal hetero-aromatics. **RSC Adv.**, v. 5, p. 15233, 2015.
- (98) WOOD, J. M.; FURKERT, D. P.; BRIMBLE, M. A. 2-Formylpyrrole natural products: origin, structural diversity, bioactivity and synthesis. **Nat. Prod. Rep.**, v. 36, p. 289-306, 2019.
- (99) CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne. PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

- (100) CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard. 10th Edition. CLSI document M07-A10. Wayne. PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- (101) MARSTON. A.; KISSLING. J.; HOSTETTMANN. K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochem. Anal.**, v. 13, p. 51-54, 2002.
- (102) LUNCEFORD. N.; GUGLIUCCI. A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v. 76, p. 419-427, 2005.
- (103) FRAIGE. K. *et al.* Dereplication by HPLC-DAD-ESI-MS/MS and screening for biological activities of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). **Phytochem. Anal.**, v. 29, p. 196-204, 2018.
- (104) MOSMANN. T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- (105) **MASSBANK**. MassBank Project 2.1.3 (2006): base de dados preparada por MassBank Consortium© (2017) & NORMAN Association© (2011). Disponível em <<http://www.massbank.jp/Search>> Acesso em: 16 mar. 2020.
- (106) **METLIN**. METLIN™ (2003): base de dados preparada por Scripps Research & Mass Consortium, 2003. Disponível em <https://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage> Acesso em: 16 mar. 2020.
- (107) **GNPS**. Global Natural Products Social Molecular Networking 1.3.7: base de dados preparada por Mingxun Wang e *et al* (2016). Disponível em <<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>> > Acesso em: 16 mar. 2020.
- (108) **DICTIONARY OF NATURAL PRODUCTS**. Dictionary of Natural Products 28.2.: base de dados preparada por CRC Press, Taylor & Francis Group©, 2020. Disponível em <<http://dnp.chemnetbase.com/faces/chemical/ChemicalSearch.xhtml>> Acesso em: 16 mar. 2020.
- (109) SANTOS, N. Q. **A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar**. Texto & Contexto Enfermagem, v. 13, n. Esp, 2004, p. 64-70.
- (110) AWASTHI, M. *et al.* Alzheimer's disease: an overview of amyloid beta dependent pathogenesis and its therapeutic implications along with in silico approaches emphasizing the role of natural products. **J. Neurol. Sci.**, v. 361, p. 256-271. 2016.
- (111) VIEGAS JUNIOR, C. *et al.* New selective acetylcholinesterase inhibitors designed from natural piperidine alkaloids. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 13, p. 4184-4190, 2005.

- (112) MENEZES, C. P.; PÉREZ, A. L. A. L.; LIMA, E. O. *Cladosporium* spp: morfologia, infecções e espécies patogênicas. **Acta Brasiliensis**, v. 1, p. 23-27, 2017.
- (113) OLIVEIRA, C. M. **Estudo químico e biológico dos fungos endofíticos associados com a espécie vegetal *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae)**. 2009. 288 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- (114) GAMBALE, W. *et al.* Library fungi at the University of São Paulo and their relationship with respiratory allergy. **J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.**, v. 3, p. 45-50. 1993.
- (115) ZOPPAS, B.C.A.; VALENCIA-BARRERA, R.M.; FERNANDÉZ-GONZÁLES, D. Distribuição de esporos de *Cladosporium* spp no ar atmosférico de Caxias do Sul, RS, Brasil, durante dois anos de estudo. **Rev. Bras. Alergia Immunopatol.**, v. 34, p. 55-58, 2011.
- (116) BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 52, p. 940-950, 2008.
- (117) NEVES, L. C., Frutos- O remédio do futuro. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 34, p. 957-1306, 2012.
- (118) ARTS, I. C. W.; HOLLMAN, C. H. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 81, p. 317–325, 2005.
- (119) MORAIS, M. L. *et al.* Determinação do potencial antioxidante *in vitro* de frutos do cerrado brasileiro. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 35, p. 355-360, 2013.
- (120) BARRERO, A. F. *et al.* Preparation of bioactive podolactones via a new Pd-catalysed bislactonisation reaction. Synthesis of Oidiolactone C. **Tetrahedron Lett.**, v. 41, p. 5203-5206, July 2000.
- (121) DENG, C. *et al.* A new sesquiterpene from the mangrove endophytic fungus *Aspergillus terreus* (No. GX7-3B). **Nat. Prod. Res.**, v. 27, p. 1882-1887, 2013.
- (122) YUAN, L. *et al.* Labdane and Tetranorlabdane Diterpenoids from *Botryosphaeria* sp. MHF, an Endophytic fungus of *Maytenus hookeri*. **Helv. Chim. Acta.**, v. 92, p. 1118-1125, 2009.
- (123) PETTIT, G. R. *et al.* Antineoplastic agents. 488. Isolation and structure of yukonin from Yukon territory fungus. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 276-278. Jan. 2003.
- (124) HERATH, H. M. T. B. *et al.* Biologically active tetranorditerpenoids from the fungus *Sclerotinia homoeocarpa* causal agent of dollar spot in turfgrass. **J. Nat. Prod.**, v. 72, p. 2091–2097, 2009.

- (125) BARRERO, A. F. *et al.* First synthesis of the antifungal oidiolactone C from trans-communic acid: cytotoxic and antimicrobial activity in podolactone-related compounds. **J. Org. Chem.**, v. 67, p. 2501–2508, 2002.
- (126) JOHN, M. *et al.* Biologically active secondary metabolites from fungi. 12. Oidiolactones A – F, labdane diterpene derivatives isolated from *Oidiodedron truncata*. **J. Nat. Prod.**, v. 62, p. 1218-1221, 1999.
- (127) NARITA, K. *et al.* Total biosynthesis of antiangiogenic agente (-)-Terpestacin by artificial reconstitution of the biosynthetic machinery in *Aspergillus oryzae*. **J. Org. Chem.**, v. 83, p. 7042-7048, 2018.
- (128) DENG, Z. *et al.* A new cinnamic acid derivative from plant-derived endophytic fungus *Pyronema* sp. **Nat. Prod. Res.**, v. 31, p. 2413-2419, 2017.
- (129) RIVERA-CHÁVEZ, J. *et al.* α -Glucosidase inhibitors from a *Xylaria feejeensis* associated with *Hintonia latiflora*. **J. Nat. Prod.**, v. 78, p. 730-735, 2015.
- (130) DIMITRIADIS, C.; GILL, M.; HARTE, M. F. The first stereospecific approach to both enantiomers of mellein. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 8, p. 2153-2158, 1997.
- (131) XU, Y. *et al.* New polyketides isolated from *Botryosphaeria australis* strain ZJ12-1A. **Helv. Chim. Acta**, v. 94, n. 5, p. 897-902, 2011.
- (132) RAHMAN, M. M. GRAY, A. I. A benzoisofuranone derivative and carbazole alkaloids from *Murraya koenigii* and their antimicrobial activity. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1601-1606, 2005.
- (133) MANET, I. *et al.* The photochemistry of 4-chlorophenol in water revisited: the effect of cyclodextrins on cation and carbene reactions. **Chem. Eur. J.**, v. 11, p. 4274-4282, 2005.
- (134) CHEN, H. *et al.* Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 101, p. 5048-5052, 2004.
- (135) LALONDE, R. T.; WONG, C.; TSAI, A. I. M. Polyglucosidic metabolites of Oleaceae. The chain sequence of oleoside aglucon, tyrosol, and glucose units in three metabolites from *Fraxinus Americana*. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 98, p. 3007-3013, 1976.
- (136) ALFARO, C. *et al.* Screening for metabolites from *Penicillium novae-zeelandiae* displaying radical-scavenging activity and oxidative mutagenicity: isolation of gentisyl alcohol. **Mutat. Res.**, v. 539, p. 187-194, 2003.
- (137) ALLEVI, P. *et al.* Lipase-catalysed chemoselective monoacetylation of hydroxyalkylphenols and chemoselective removal of a single acetyl group from their diacetates. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 9, p. 2915-2924, 1998.

- (138) REHMAN, N. U. *et al.* Anti-proliferative potential of cyclotetrapeptides from *Bacillus velezensis* RA5401 and their molecular dockin on G-Protein-Coupled Receptors. **Microb. Pathog.**, v. 123, p. 419-425, 2018.
- (139) DING, Z. G. *et al.* ^1H and ^{13}C NMR assigments of eight nitrogen containing compounds from *Nocardia alba* sp. nov (YIM 30243). **Magn. Reson. Chem.**, v. 47, p. 366-370, 2009.
- (140) BROWN, P.; HORNBECK, C. L.; CRONIN, J. R. Alloxazines and isoalloxazines. Mass spectrometric analysis of riboflavin and related compounds. **Organic Mass Spectrometry**, v. 6, p. 1383-1399, 1972.
- (141) CHANTARAWONG, W. *et al.* Lumichrome Inhibits Human Lung Cancer Cell Growth and Induces Apoptosis via a p53-Dependent Mechanism. **Nutr. Cancer**, v. 71, p. 1390-1402, 2019.
- (142) WANG P. *et al.* Alkaloids from the mangrove-derived actinomycet *Jishengella endophytica* 161111. **Mar. Drugs**, v. 12, p. 477-490, 2014.
- (143) FDHILA, F. *et al.* DD-Diketopiperazines: Antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1299-1301, 2003.
- (144) MARTINS, M. B.; CARVALHO, I. Diketopiperazines: biological activity and synthesis. **Tetrahedron**, v. 63, p. 9923-9932, 2007.
- (145) Kumar, S. N. *et al.* Identification of antimicrobial compound, diketopiperazines, from a *Bacillus* sp. N strain associated with a rhabditid entomopathogenic nematode against major plant pathogenic fungi. **J. Appl. Microbiol.**, v. 113, p. 914-924, 2012.
- (146)MANDER, L.; LIU, H. W. (B.). **Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology** (v. 1), 1st ed, 2010. Elsevier LTD, United Kingdom, 2010, p. 210.
- (147) LI, G. *et al.* Three cyclic pentapeptides and a cyclic lipopeptide produced by endophytic *Fusarium decemcellulare* LG53. **RSC Adv.**, v. 6, p. 54092-54098, 2016.
- (148) POOJARY, B.; BELAGALI, S. L. Synthesis, characterization and biological evaluation of cyclic peptides: viscumamide, yunnanin A and evolidine. **Z. Naturforsch. B**, v. 60, p. 1313 –1320, 2005.