

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

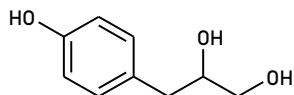
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

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-quadruplete
<i>dt</i>	Duplo-triplete
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>	Multiplete
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>

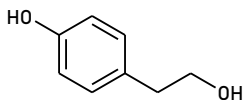
ppm	Parte por milhão
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
s	Singleto
s/	Singleto largo
SPE	Sigla em inglês para <i>Extração em Fase Sólida</i>
T	Tesla
t	Tripleto
TIC	Cromatograma de íons totais
v.	Volume
$V_{\text{inj.}}$	Volume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

Lista de Substâncias

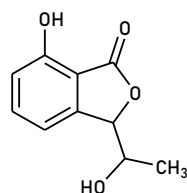
Substância 01
(*B. parva*)



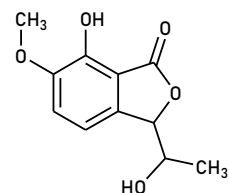
Substância 02
(*B. parva* e *P. stromaticum*)



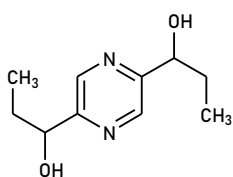
Substância 03
(*B. parva*)



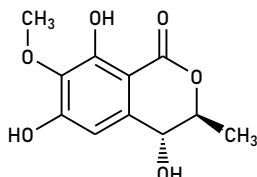
Substância 04
(*B. parva*)



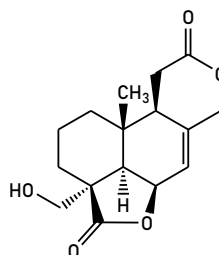
Substância 05
(*B. parva*)



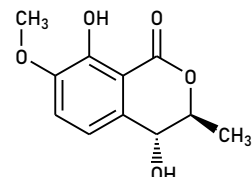
Substância 06
(*B. parva*)



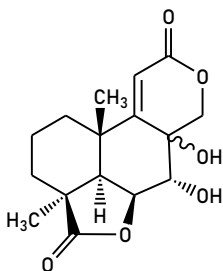
Substância 07
(*B. parva*)



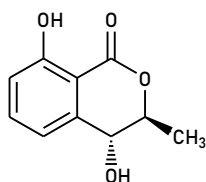
Substância 08
(*B. parva*)



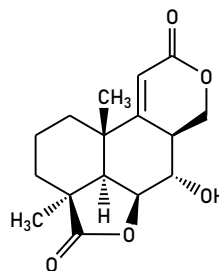
Substância 09
(*B. parva*)



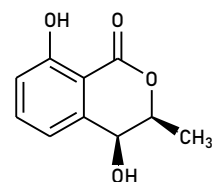
Substância 11
(*B. parva*)



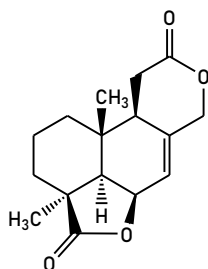
Substância 12
(*B. parva*)



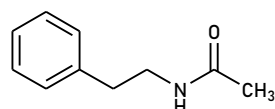
Substância 13
(*B. parva*)



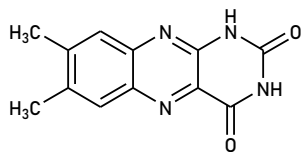
Substância 14
(*B. parva*)



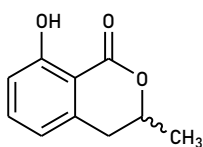
Substância 15
(*B. parva*)



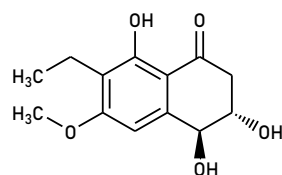
Substância 17
(*B. parva*)



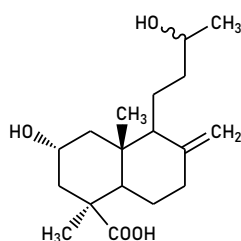
Substância 18
(*B. parva*)



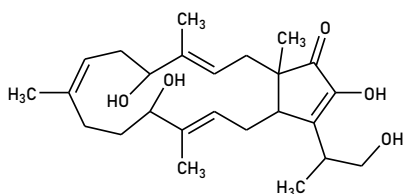
Substância 19
(*B. parva*)



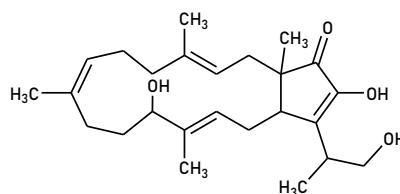
Substância 20
(*B. parva*)



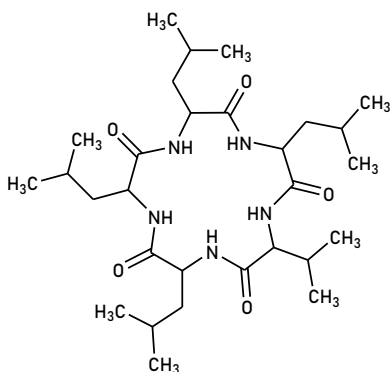
Substância 21
(*B. parva*)



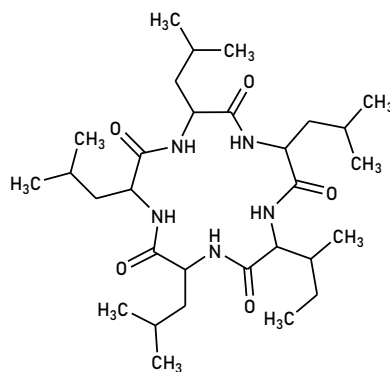
Substância 22
(*B. parva*)



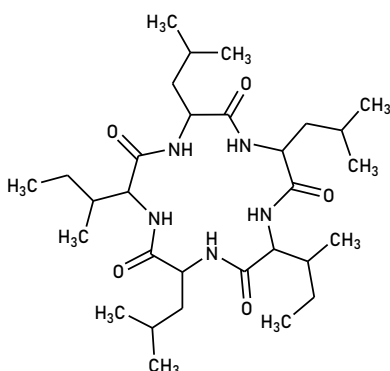
Substância 23
(*B. parva*)



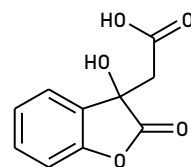
Substância 24
(*B. parva*)



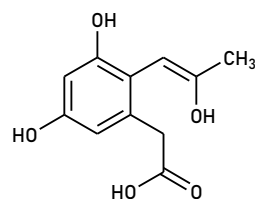
Substância 25
(*B. parva*)



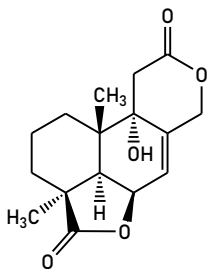
Substância 26
(*B. parva*)



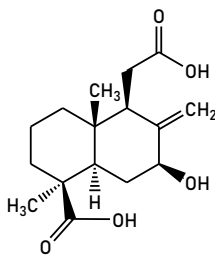
Substância 28
(*B. parva*)



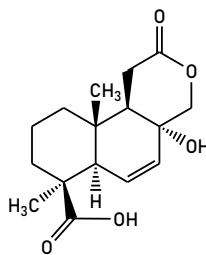
Substância 29
(*B. parva*)



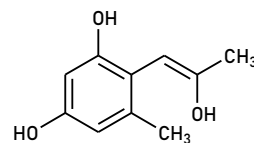
Substância 30
(*B. parva*)



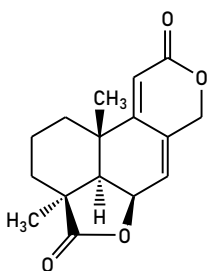
Substância 31
(*B. parva*)



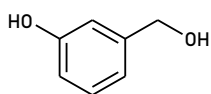
Substância 32
(*B. parva*)



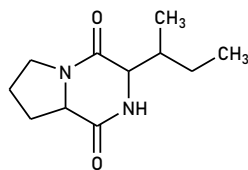
Substância 33
(*B. parva*)



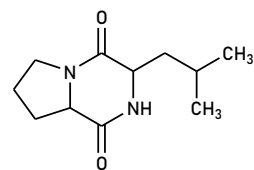
Substância 34
(*P. stromaticum*)



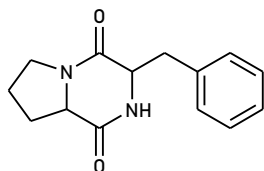
Substância 35
(*P. stromaticum*)



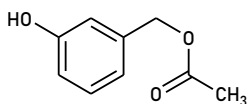
Substância 36
(*P. stromaticum*)



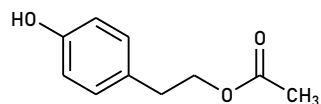
Substância 37
(*P. stromaticum*)



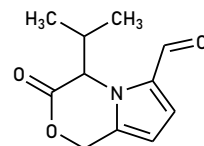
Substância 38
(*P. stromaticum*)



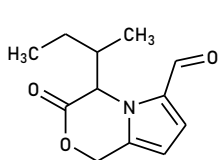
Substância 39
(*P. stromaticum*)



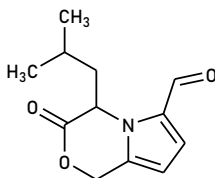
Substância 40
(*P. stromaticum*)



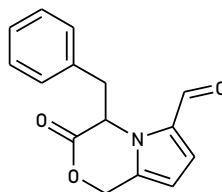
Substância 41
(*P. stromaticum*)



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,

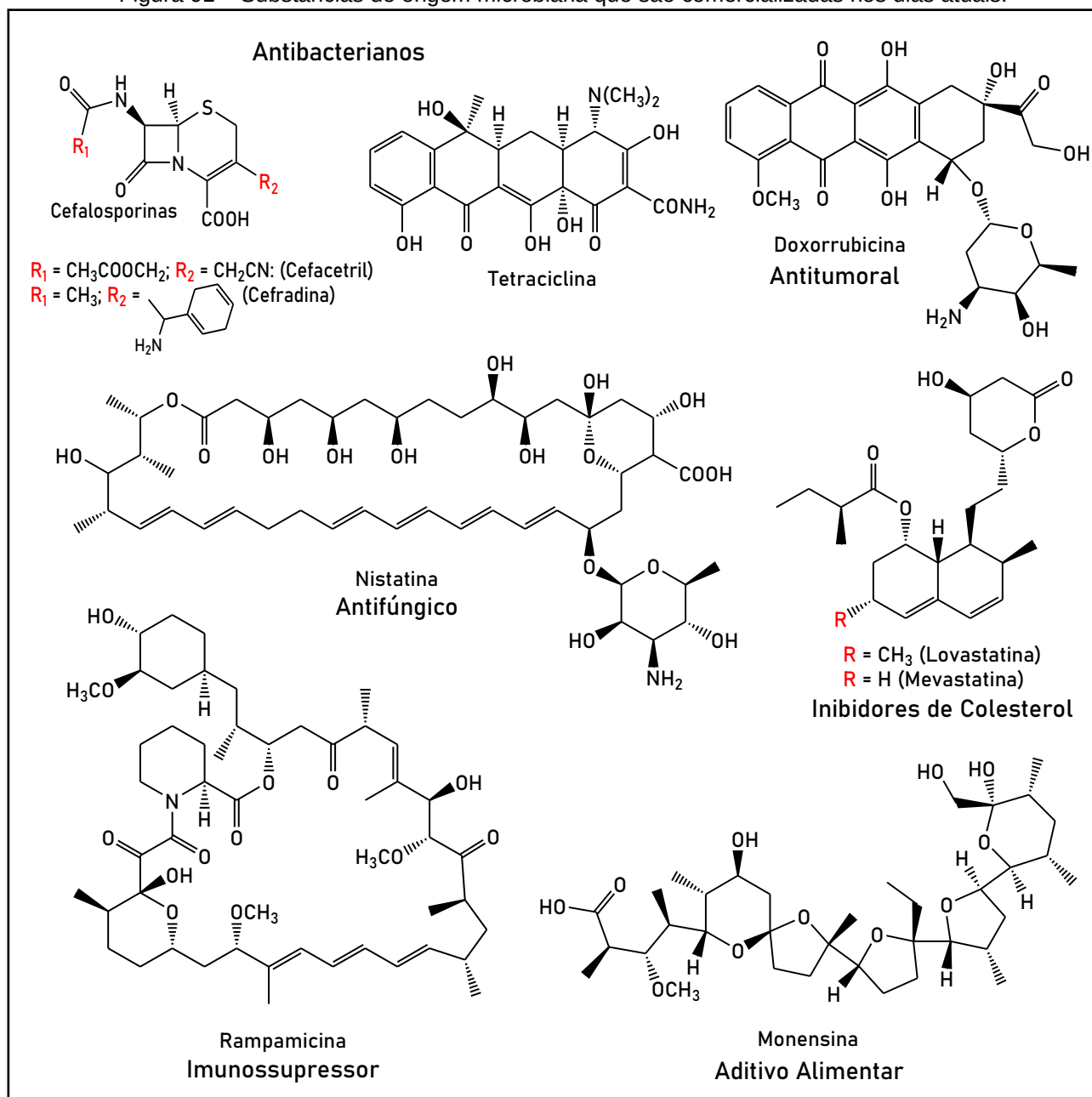
aliviando o sofrimento das pessoas adoecidas. Além disso, com o crescente custo dos cuidados de saúde e manifestações de sérios efeitos colaterais no uso prolongado de alguns fármacos sintéticos, há uma tendência crescente da população mundial de voltar aos medicamentos naturais, ⁽¹⁾ e é por isso, que 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⁾.

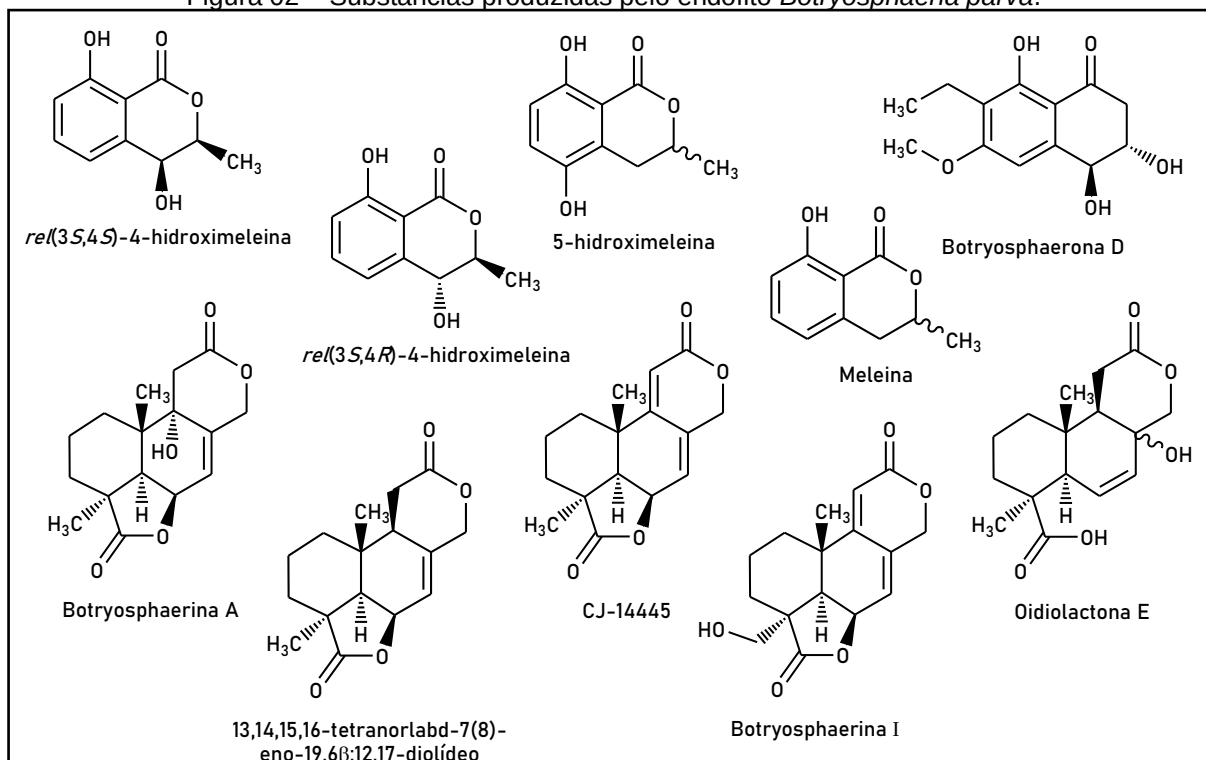
1.3.1 O endófito *Botryosphaeria parva*

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 cancrios 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*.



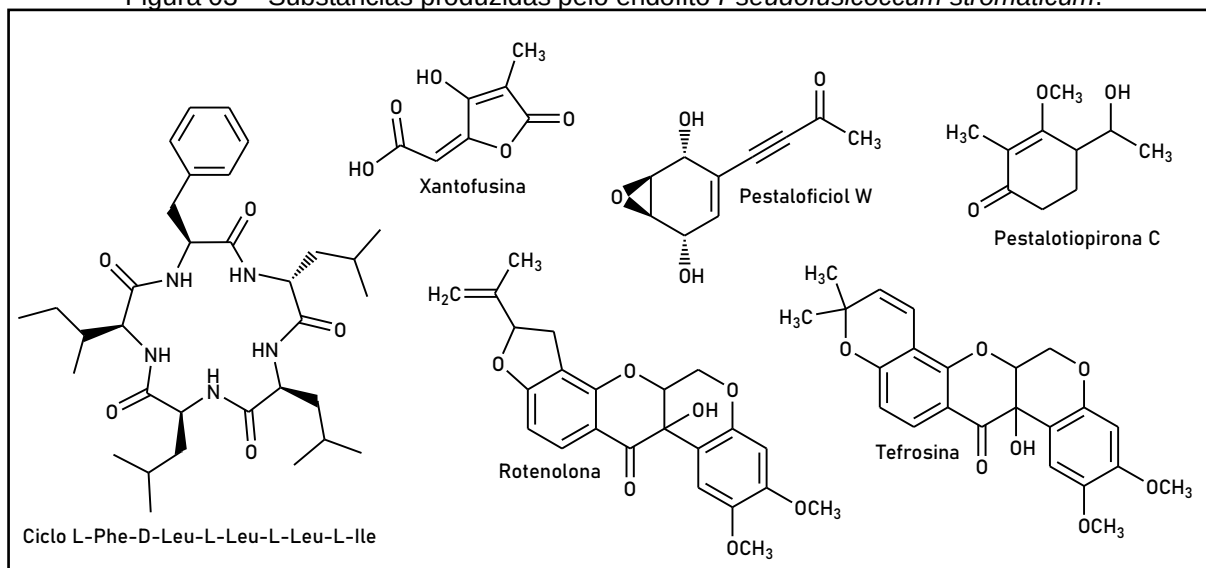
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

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

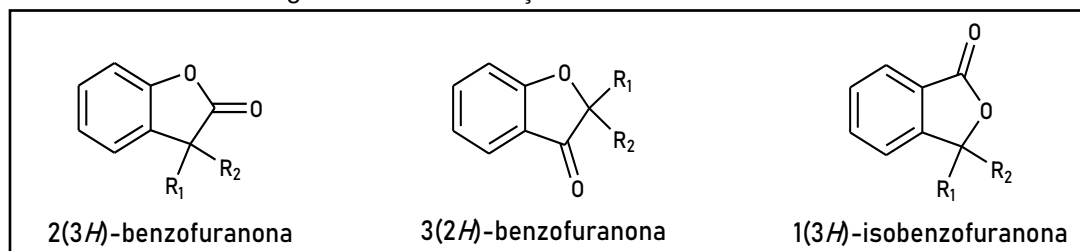
Entre a grande variedade de substâncias bioativas, destacam-se os compostos fenólicos pelas inúmeras quantidades de compostos descritos com grande potencial bioativo e diversidade estrutural ⁽⁶⁷⁾. Estes compostos são metabólitos secundários biossintetizados por diversos organismos e caracterizam-se por 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 na 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).

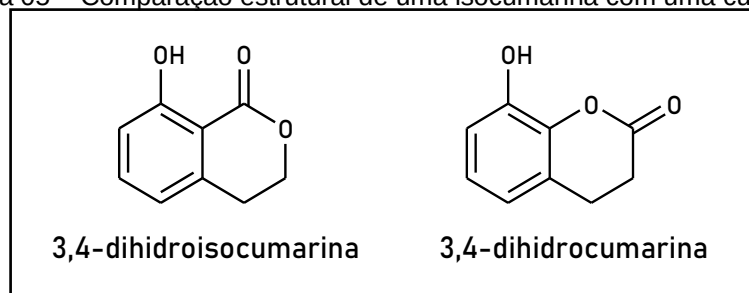
Os ftaletos estão amplamente presentes em plantas, fungos, líquens e hepáticas. Muitas plantas contendo ftaletos têm sido usadas em todo o mundo como remédios fitoterápicos em medicamentos tradicionais e populares, suplementos alimentares e aromas alimentares. Essa classe de substâncias pode apresentar 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 marinhas e outros organismos) e caracterizam-se por possuírem cinco unidades de isopreno, sendo então seu esqueleto composto por 25 carbonos podendo assumir diversas estruturas, como: lineares, mono-, bi-, tri-, tetra- ou macrocíclicas ^(82,83).

A importância dos sesquiterpenos 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 ciclopeptídeos 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 ciclopeptídeos, 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).

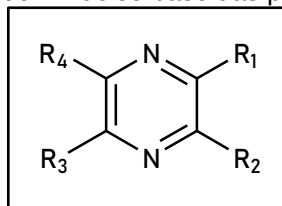
Os produtos naturais com esqueleto de 2,5-dicetopiperazina são estruturalmente diversos e produzidos por uma ampla gama de micro-organismos. Essa diversidade estrutural desses dipeptídeos cíclicos se traduz em uma gama igualmente ampla de atividades biológicas, incluindo efeitos imunossupressores, herbicidas, 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.

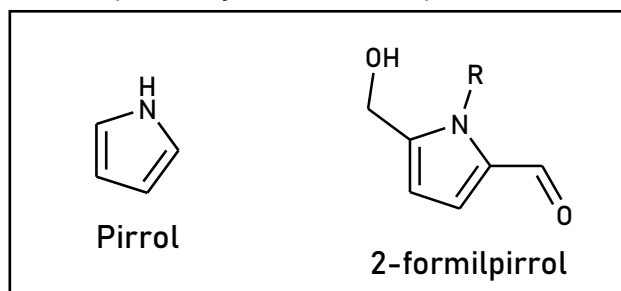
Vários produtos naturais contendo esse núcleo já foram isolados, como por exemplo, a clavulazina isolada de *Clavularia viridis* (coral mole de Okinawa), a botrilazina A do ascidiano vermelho *Botryllus leachi* e a barrenazina de tunicado não identificado coletado em Madagascar. Esse núcleo pode ser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

2 OBJETIVOS

Estudar quimicamente a produção metabólica dos endófitos *Botryosphaeria parva*, via abordagem OSMAC, e *Pseudofusicoccum stromaticum* associados à espécie vegetal *Syzygium cumini* (L.) Skeels, bem como o estudo da co-cultura de ambos os endófitos.

2.1 Objetivos específicos

Cultivar o fungo endofítico *Botryosphaeria parva* em escala ampliada em cinco meios de cultura (Extrato de Malte, PDB, YM, Nutrient e Arroz) para a obtenção dos respectivos extratos;

Cultivar o fungo endofítico *Pseudofusicoccum stromaticum* em escala ampliada no meio de cultura Extrato de Malte para a obtenção do respectivo extrato;

Realizar a co-cultura dos endófitos em meio de cultivo Extrato de Malte em escala ampliada para a obtenção dos respectivos extratos;

Fracionar todos os extratos até o isolamento dos metabólitos secundários, utilizando métodos cromatográficos convencionais, como: Cromatografia em Coluna (CC) e CLAE-DAD_{preparativa} (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa);

Determinar ou elucidar as estruturas das substâncias isoladas, utilizando métodos espectrométricos, como: RMN de ^1H , de ^{13}C , 1D e 2D, e Espectrometria de Massas;

Submeter os extratos brutos e as substâncias puras a ensaios biológicos para avaliação do potencial antibacteriano, antioxidante, antifúngico, antiglicante, anticolinesterásico e citotóxico.

3 MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E TÉCNICAS UTILIZADAS

Este item compreende uma descrição detalhada dos materiais e equipamentos utilizados na obtenção e fracionamento de cada extrato, bem como as técnicas utilizadas na preparação e análises das amostras.

3.1 Manipulação dos Micro-organismos

Todo o procedimento de manipulação dos endófitos *Botryosphaeria parva* e *Pseudofusicoccum stromaticum* foi realizado em Capela de Fluxo Laminar (Pachame® PA 310-Série 172-99 e SterilGARD® Advance).

3.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para estas análises foram utilizadas cromatoplaças comerciais de sílica gel em fase normal (Macherey-Nagel: DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254) e a visualização foi feita por irradiação ultravioleta (254 e 366 nm).

3.3 Cromatografia em Coluna (CC)

Foram realizadas três separações cromatográficas em coluna à pressão reduzida, em que foi utilizado adsorvente de fase reversa C18 (Polygroprep® 60-50 Å, Macherey-Nagel), em todos os fracionamentos, e coluna de vidro nas seguintes condições:

- Extrato em meio de Arroz (*B. parva*): $D_{int} = 3,5$ cm e preenchimento do adsorvente de $H = 30$ cm, empacotamento realizado a seco;
- Extrato em meio de Ext. de malte (*B. parva*): $D_{int} = 2,5$ cm e preenchimento do adsorvente de $H = 15$ cm, empacotamento realizado a seco;
- Extrato em meio de Ext. de malte (*P. stromaticum*): $D_{int} = 1,0$ cm e preenchimento do adsorvente de $H = 25$ cm, empacotamento realizado a seco;

3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para as análises de perfil cromatográfico das amostras, foram utilizados cromatógrafos com detectores diferentes, listados a seguir.

3.4.1 Cromatógrafos com Detector de Arranjo de Diodos (DAD)

Para as análises em modo analítico, foi utilizado um Cromatógrafo Líquido da Shimadzu (bombas: LC-20AT; injetor automático: SIL-20A; detector ultravioleta, em arranjo de diodos: SPD-M20A; módulo de comunicação: CBM-20A; degaseificador: DGU-20A₃; software: LC-Solution), e coluna de fase reversa C18 – 2 (Phenomenex LUNA: 250 mm x 4,60 mm e 5 µm).

Para as purificações em modo semipreparativo, foi utilizado um Cromatógrafo Líquido da Shimadzu (bombas: LC-6AD; injetor manual; detector ultravioleta, em arranjo de diodos; SPD-38-M20A; módulo de comunicação: CBM-20A; degaseificador: DGU-20^a5R; software: LC-Solution), e coluna de fase reversa C18 – 2 semipreparativa (Phenomenex LUNA: 250 mm x 10,0 mm e 5 µm).

3.4.2 Cromatógrafo com Analisador Ion Trap (EM)

Para as análises de CLAE-EM de baixa resolução, foi utilizado um Cromatógrafo Líquido da Shimadzu (bombas: LC-20AD; injetor automático: SIL-20AHT; detector ultravioleta, em arranjo de diodos: SPD-M20A; módulo de comunicação: CBM-20A; degaseificador: DGU-20A₃; software: HighStar), e coluna de fase reversa C18–2 (Phenomenex LUNA: 250 mm x 4,60 mm e 5 µm). O Espectrômetro de Massas utilizado foi um espectrômetro da Bruker (Amazon SL) com fonte de ionização Eletrospray (ESI); analisador Ion Trap e software MassControl. Na manipulação dos dados, utilizou-se o software DataAnalysis da Bruker.

3.4.3 Cromatógrafo com analisador Q-ToF (EM)

Para as análises de CLAE-EM de alta resolução, foi utilizado um Cromatógrafo Líquido de Ultra Performance Acquity H-Class da Waters®, composto

dos módulos: Bomba quaternária (Quaternary Solvent Manager); Detector de Arranjo de Diodos (DAD e λ Detector); Forno de coluna e Injetor automático (Sample Manager – FTN); coluna de fase reversa (Waters Acquity UPLC HSS T3 1,8 μ m 2,1 x 100 mm) e pre-coluna (Waters Acquity UPLC HSS T3 1,8 μ m VanGuard 2,1 x 5 mm).

O Espectrômetro de Massas utilizado foi um espectrômetro Xevo G2-XS QToF, com fonte de ionização Eletrospray (ESI); analisador Q-ToF (Quadrupole – Time of Flight) e software MassLinx. Na manipulação dos dados, utilizou-se o software MassLinx da Waters®.

3.5 Preparo das amostras para análises de CLAE-DAD e CLAE-EM

Nas análises de CLAE-DAD_{analítica}, 5,0 mg das amostras foram dissolvidos em pequena quantidade de solução 90% de MeOH em H₂O com auxílio de ultrassom. Em seguida, as soluções foram aplicadas em cartuxo de SPE de RP18, previamente ativado com metanol. As soluções coletadas foram secas, e as massas obtidas foram dissolvidas na concentração de 5 mg.mL⁻¹ em 90% de MeOH em H₂O. Estas soluções foram filtradas com filtro de membrana Millipore® (0,22 μ m) em “vials” de 2 mL. Nas etapas de purificação em CLAE-DAD_{semiprep.}, as amostras foram submetidas à mesma etapa de preparação, em que a concentração final das amostras foi de 20 mg.mL⁻¹.

Nas análises de CLAE-EM, as amostras, na concentração de 1 mg.mL⁻¹ em 90% de MeOH em H₂O, foram aplicadas a cartuxo de SPE de RP18, previamente ativado com metanol. As soluções coletadas foram centrifugadas a 10.000 rpm por três minutos, e os sobrenadantes foram separados em “vials” de 2 mL para análise.

3.6 Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D

As análises de perfil químico (RMN 1D e 2D) foram realizadas nos espectrômetros:

- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear – Bruker Fourier 300 (7,0 T), usando sonda dual ¹H/¹³C 5 mm.

- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear – Bruker Advance III 600 HD (14,1 T), utilizando as sondas BBFO-Z plus SmartProbe Broadband Observe e Triple Inverse TCI Cryo-probehead, ambas de 5 mm.

Os espectros foram registrados em CD₃OD, ou DMSO-*d*₆, como solventes deuterados.

3.7 Solventes e Reagentes utilizados

- Deuterados: Merck e Sigma-Aldrich;
- Não deuterados: Merck, J. T. Baker;
- Água deionizada;
- Proteína Albumina (BSA): Sigma-Aldrich;
- Aminoganidina (AG): Sigma-Aldrich;
- Metilglioxal (MGO): Sigma-Aldrich;
- Rutina: Sigma-Aldrich;
- DPPH•: Sigma-Aldrich;

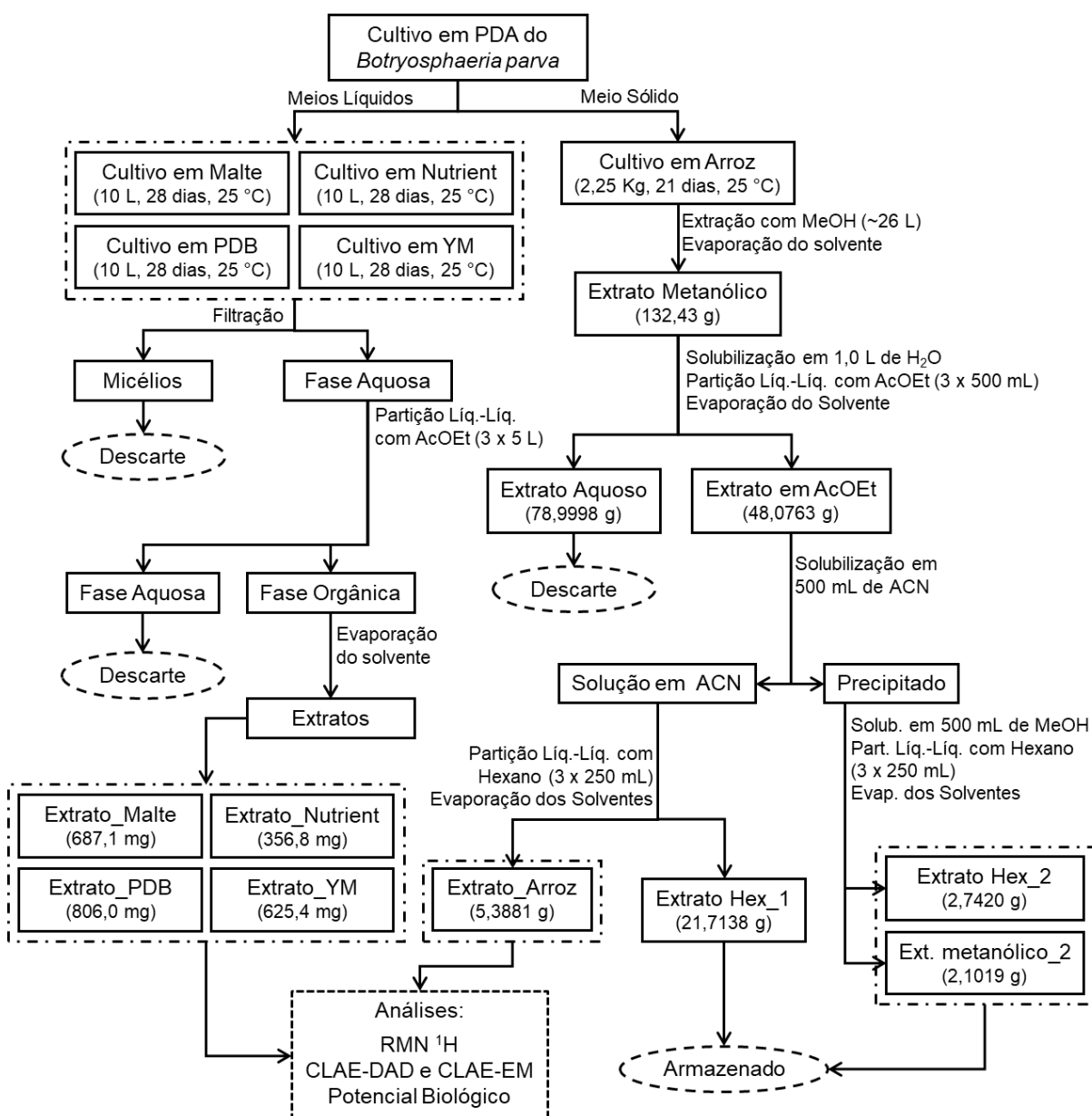
3.8 Outros Equipamentos

- Autoclave vertical (Phoenix Luferco – AV-137);
- Balança Analítica (Mettler Toledo – AG204);
- Balança Semi-analítica (Gehaka – BG2000);
- Câmara Ultravioleta (CAMAG Reprostar 3);
- Evaporador Rotativo (Heidolph);
- Espectrofotômetro (Synergy – BioTek HT);
- Ultrapurificador de água (Milli-Q, Millipore);

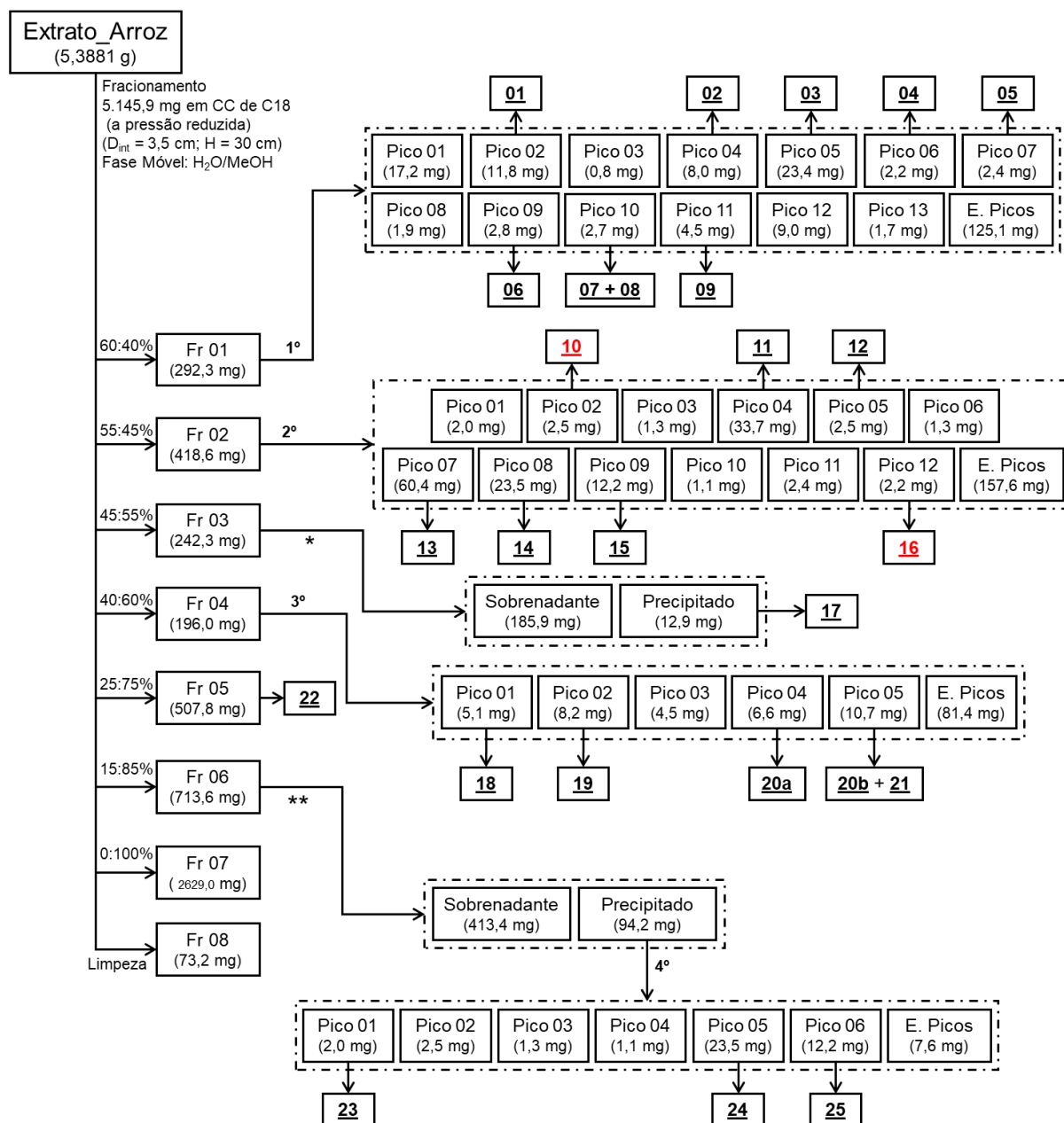
4 FLUXOGRAMAS

Este item compreende, de forma simplificada, uma representação esquemática do processo de obtenção dos extratos de cada endófito, bem como a obtenção das substâncias puras de cada extrato.

4.1 Cultivo de *Botryosphaeria parva*



4.1.1 Cultivo de *B. parva* em meio de Arroz



Obs.: as substâncias em vermelho ainda estão em fase de determinação estrutural.

* – Processo de Precipitação com Acetona de 200 mg da fração 03.

** – Processo de Precipitação com Acetona de 500 mg da fração 06.

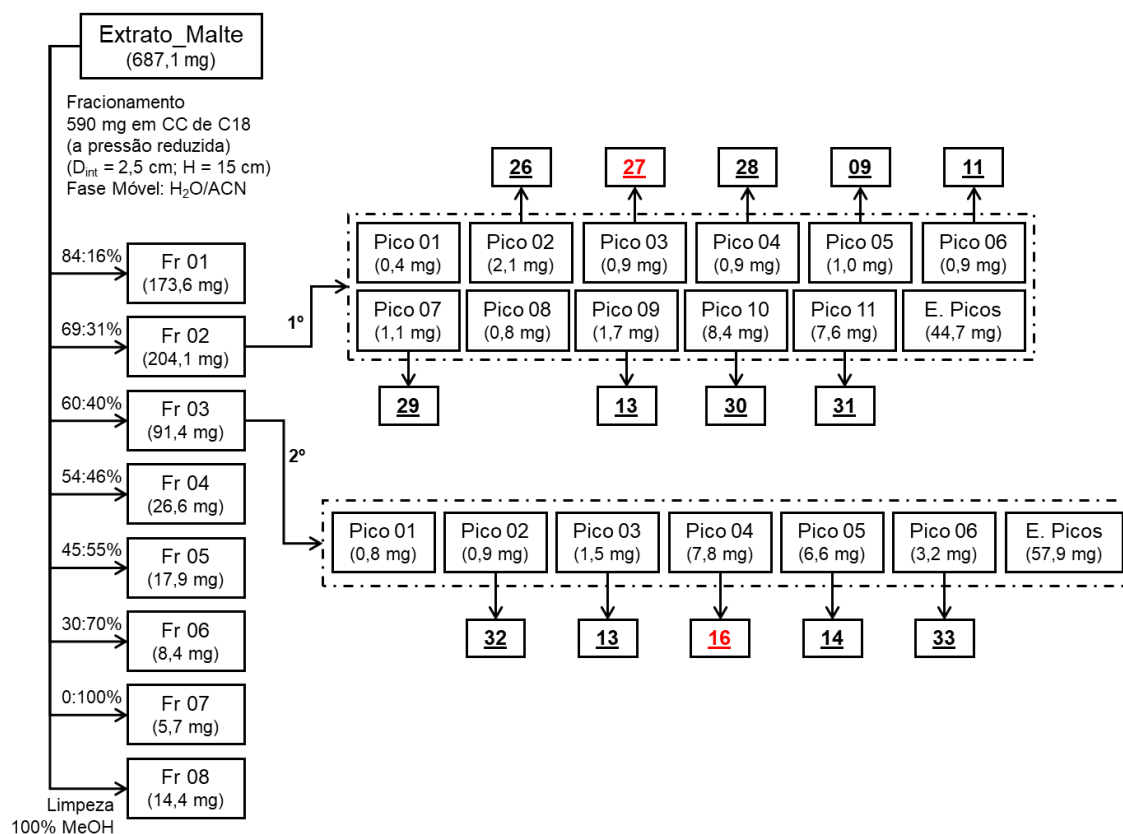
1° Fracionamento – CLAE-DAD_{semiprep}; 241,0 mg (20 mg.mL⁻¹); Isocrático 15% ACN por 50 min.; Vazão de 3 mL.min⁻¹; V: 150 µL.

2° Fracionamento – CLAE-DAD_{semiprep}; 320,2 mg (20 mg.mL⁻¹); Isocrático 35% MeOH por 50 min.; Vazão de 3 mL.min⁻¹; V_{injeção}: 100 µL.

3° Fracionamento – CLAE-DAD_{semiprep}; 120,8 mg (20 mg.mL⁻¹); Isocrático 60% MeOH por 35 min.; Vazão de 3 mL.min⁻¹; V_{injeção}: 200 µL.

4° Fracionamento – CLAE-DAD_{semiprep}; 51,1 mg (20 mg.mL⁻¹); Isocrático 80% MeOH por 45 min.; Vazão de 3 mL.min⁻¹; V_{injeção}: 250 µL.

4.1.2 Cultivo de *B. parva* em meio de Malte

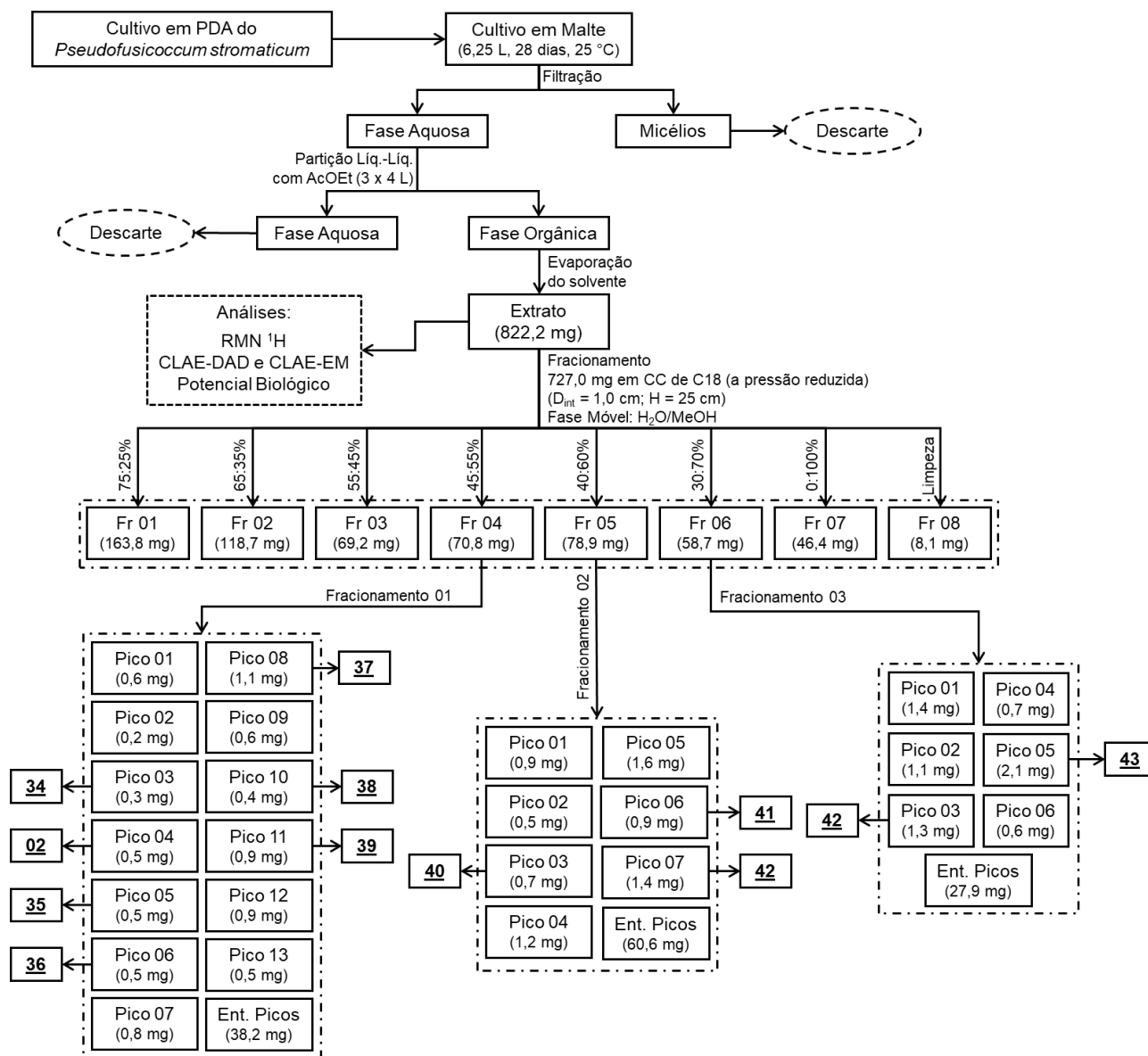


Obs.: a substância em vermelho ainda esta em fase de determinação estrutural.

1º Fracionamento – CLAE-DAD_{semiprep.}; 75,1 mg (20 mg.mL⁻¹); Isocrático 15% ACN por 22' → isoc. 20% de 23 a 50';
Vazão de 3 mL.min⁻¹; V_{injeção}: 200 µL.

2º Fracionamento – CLAE-DAD_{semiprep.}; 85,1 mg (20 mg.mL⁻¹); Isocrático 30% ACN; Vazão de 3 mL.min⁻¹; V_{injeção}: 400 µL.

4.2 Cultivo de *Pseudofusicoccum stromaticum*



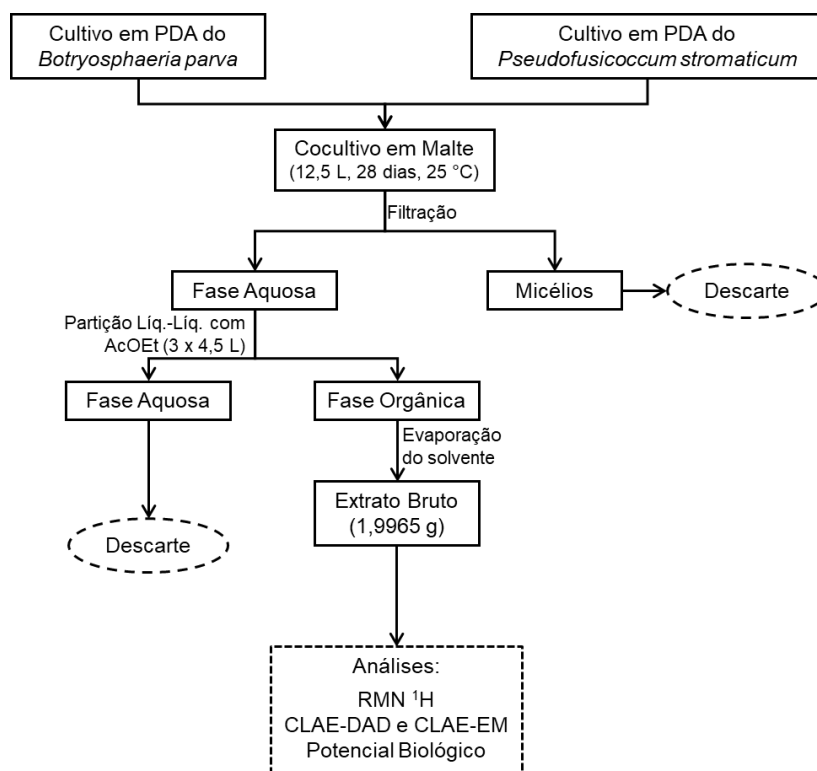
Fracionamentos:

01 – CLAE-DAD_{semiprep.}; Gradiente de 20 a 40% de 5 a 40 min. de ACN/H₂O; Vazão de 3 mL.min⁻¹; V_{injeção}: 100 µL; M_{aplicada} = 50,3 mg.

02 – CLAE-DAD_{semiprep.}; Isocrático 50% MeOH/H₂O por 25 min. e Isocrático 60% MeOH/H₂O de 26 a 45 min. Vazão de 3 mL.min⁻¹; V_{injeção}: 150 µL; M_{aplicada} = 76,4 mg.

03 – CLAE-DAD_{semiprep.}; Isocrático 60% MeOH/H₂O por 25 min. Vazão de 3 mL.min⁻¹; V_{injeção}: 200 µL; M_{aplicada} = 49,6 mg.

4.3 Cultivo da Co-cultura dos endófitos



5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Este item compreende uma descrição detalhada da obtenção de cada extrato e substâncias puras, bem como os bioensaios realizados.

5.1 Cultivo de *Botryosphaeria parva*

O fungo endofítico *B. parva*, isolado das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels pela Dr.^a Vanessa Mara Chapla e preservado em água deionizada, foi inoculado em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo meio de cultura sólido PDA (meio de batata, dextrose e ágar) para obtenção de massa micelar suficiente para cultivo em escala ampliada. Em cada frasco de Erlenmeyer, preparados de acordo com a Tabela 01, inoculou-se $\frac{1}{4}$ da placa de Petri contendo o endófito.

- 25 frascos de Erlenmeyer (500 mL) com meio de cultivo Arroz (2,250 kg de arroz parboilizado “Tio João”);
- 50 frascos de Erlenmeyer (500 mL) com meio de cultivo Ext. de malte (Kavsi – Liofilchem, totalizando 10 L de meio de cultivo);
- 50 frascos de Erlenmeyer (500 mL) com meio de cultivo Nutrient (meio de extrato de carne bovina e digestão enzimática de gelatina, Acumedia – Neogen Corporation, totalizando 10 L de meio de cultivo);
- 50 frascos de Erlenmeyer (500 mL) com meio de PDB (meio de batata e dextrose, Acumedia – Neogen Corporation, totalizando 10 L de meio de cultivo);
- 50 frascos de Erlenmeyer (500 mL) com meio de YM (meio de ext. de malte com digestão enzimática de gelatina, dextrose e ext. de levedura, Acumedia – Neogen Corporation, totalizando 10 L de meio de cultivo).

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 *B. parva*.

Arroz		Ext. de Malte		Nutrient		PDB		YM	
Massa	V _{Água}	Massa	V _{Água}	Massa	V _{Água}	Massa	V _{Água}	Massa	V _{Água}
90,0	75	4,0	200	1,6	200	4,8	200	4,2	200

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

Em seguida, os meios preparados foram esterilizados em autoclave vertical por um período de 15 minutos a uma temperatura de aproximadamente 121 °C. O meio de arroz foi esterilizado mais duas vezes com uma diferença de 24 horas entre as esterilizações.

Após a inoculação do endófito nos meios preparados, as culturas foram mantidas sob temperatura controlada de 25 °C por 21 dias (meio de arroz) e 28 dias (meios líquidos). A obtenção e tratamento dos extratos até a obtenção das substâncias puras podem ser visualizados nos itens a seguir.

5.1.1 Cultivo de *B. parva* no meio Sólido

Após o período de incubação, a cultura sólida foi triturada com auxílio de uma bagueta e iniciou-se uma extração direta com metanol P.A (~26 L), seguida de filtração à pressão reduzida. Posteriormente, o solvente foi evaporado em evaporador rotativo, obtendo-se o respectivo extrato (132,43 g). O extrato metanólico foi dissolvido em 1,0 L de água desmineralizada, e com a solução resultante fez-se três partições líquido-líquido, utilizando em cada partição 500 mL de AcOEt P.A, totalizando 1,5 L de extrato orgânico. Em seguida, o solvente orgânico foi evaporado, originando o respectivo extrato (48,0763 g), e parte da fase aquosa foi armazenada para estudos futuros.

O extrato obtido foi dissolvido em 500 mL de acetonitrila P.A, e com a solução fez-se três partições líquido-líquido com hexano P.A (3 x 250 mL). O extrato de interesse (5,3881 g) foi obtido após a evaporação da acetonitrila. O extrato hexânico foi armazenado para estudos futuros. Parte do extrato em AcOEt não foi solúvel em acetonitrila, dessa forma, o precipitado foi dissolvido em metanol P.A, e com a solução resultante fez-se três partições líquido-líquido com hexano P.A. Após a evaporação dos solventes, foram obtidos os extratos metanólico 2 e hexânico 2, ambos armazenados.

O extrato de interesse (extrato em Acetonitrila) foi submetido às análises de RMN de ^1H , Ensaios Biológicos (antibacteriano, anticolinesterásico, antifúngico, antiglicante, antioxidante e citotóxico) e de CLAE-DAD e CLAE-EM, nas condições: eluição em Gradiente Exploratório (95-5 a 0-100% de $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ em 40 minutos); Coluna C18 (Phenomenex LUNA: 250 mm x 4,60 e 5 um); Vazão: 1,0 mL.min⁻¹; $V_{\text{injeção}}$: 30 μL (DAD) e 1 μL (EM); λ : 200–800 nm; [Amostra]: 5,0 (DAD) e 1,0 mg.mL⁻¹ (EM).

O extrato foi submetido a uma nova análise de CLAE-DAD_{analítica} com um sistema eluente de H₂O/MeOH em gradiente exploratório, e com base nos resultados obtidos, foi realizado um fracionamento desse extrato por Cromatografia em Coluna, de acordo com o item 3.3 (p. 45). Utilizou-se metanol P.A para a ativação da fase estacionária. A separação foi feita utilizando pressão reduzida, aplicando-se na coluna 5,1459 g do extrato. A Tabela 02 mostra a composição das fases móveis utilizadas, e as respectivas massas obtidas após o fracionamento.

Tabela 02 – Composição das fases móveis e a massa obtida de cada fração do extrato de *B. parva* em meio de arroz.

Fração	H ₂ O/MeOH	Massa (mg)
01	60:40 %	292,3
02	55:45 %	418,6
03	45:55 %	242,3
04	40:60 %	196,0
05	25:75 %	507,8
06	15:85 %	713,6
07	0:100 %	2629,0
08	Limpeza	73,2
Rendimento	98,6%	

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

As frações coletadas foram submetidas às análises de RMN de ¹H, e CLAE-DAD_{analítica} nas condições descritas anteriormente.

Destas, as frações 03 e 06 foram submetidas à um processo de precipitação com acetona P.A. A Tabela 03 mostra as massas das subfrações obtidas após esse processo, em que as massas utilizadas das frações 03 e 06 foram de 200 e 510 mg, respectivamente.

Tabela 03 – Massas das subfrações obtidas e seus respectivos códigos, após o processo de precipitação das frações 03 e 06, oriundas do extrato de *B. parva* em meio de arroz.

	Fração 03		Fração 06	
	Sobrenadante	Precipitado	Sobrenadante	Precipitado
Código	FR_3_S	FR_3_P	FR_6_S	FR_6_P
Massa (mg)	185,9	12,9	413,4	94,2

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

As frações 01, 02, 04 e 06_P foram submetidas à purificação via CLAE-DAD_{semiprep.}, nas condições descritas na Tabela 04 (p. 57), otimizadas anteriormente no modo analítico.

Tabela 04 – Condições cromatográficas utilizadas para a purificação das frações 01, 02, 04 e 06 P, oriundas do extrato de *B. parva* em meio de arroz.

Condição	Fração 01
Eluição	Isocrático com 15% de ACN em H ₂ O por 50 min.
Coluna	C18 (250 mm x 10,0 mm e 5 µm)
Vazão	3 mL.min ⁻¹
V _{injeção}	150 µL
λ	210; 254 e 290 nm
[Amostra]	20 mg.mL ⁻¹
M _{aplicada}	241,0 mg
Condição	Fração 02
Eluição	Isocrático com 35% de MeOH em H ₂ O por 50 min.
Coluna	C18 (250 mm x 10,0 mm e 5 µm)
Vazão	3 mL.min ⁻¹
V _{injeção}	100 µL
λ	210; 254; 290 e 366 nm
[Amostra]	20 mg.mL ⁻¹
M _{aplicada}	320,2 mg
Condição	Fração 04
Eluição	Isocrático com 60% de MeOH em H ₂ O por 35 min.
Coluna	C18 (250 mm x 10,0 mm e 5 µm)
Vazão	3 mL.min ⁻¹
V _{injeção}	200 µL
λ	210; 254; 290 e 366 nm
[Amostra]	20 mg.mL ⁻¹
M _{aplicada}	120,8 mg
Condição	Fração 06 P
Eluição	Isocrático com 80% de MeOH em H ₂ O por 45 min.
Coluna	C18 (250 mm x 10,0 mm e 5 µm)
Vazão	3 mL.min ⁻¹
V _{injeção}	250 µL
λ	210 nm
[Amostra]	20 mg.mL ⁻¹
M _{aplicada}	51,1 mg

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

As subfrações coletadas, Tabela 05 (p. 58), foram analisadas por CLAE-DAD_{analítica} nas mesmas condições utilizadas em suas purificações. As subfrações que apresentaram maior pureza cromatográfica foram analisadas por RMN 1D e 2D (¹H, ¹³C, COSY, HSQC e HMBC) com o intuito de identificar ou elucidar os compostos presentes em cada subfração.

Tabela 05 – Massas obtidas de cada subfração oriundas das frações 01, 02, 04 e 06_P, oriundas do extrato de *B. parva* em meio de arroz.

Fração 01	Massa (mg)	Fração 01	Massa (mg)
Fr. 01_1	14,7	Fr. 01_8	2,0
Fr. 01_2	10,9	Fr. 01_9	2,8
Fr. 01_3	1,0	Fr. 01_10	2,8
Fr. 01_4	7,5	Fr. 01_11	2,2
Fr. 01_5	21,9	Fr. 01_12	9,2
Fr. 01_6	2,1	Fr. 01_13	1,4
Fr. 01_7	2,5	-----	-----
Fração 02	Massa (mg)	Fração 02	Massa (mg)
Fr. 02_1	1,7	Fr. 02_7	60,4
Fr. 02_2	1,2	Fr. 02_8	3,8
Fr. 02_3	2,7	Fr. 02_9	4,1
Fr. 02_4	33,7	Fr. 02_10	2,7
Fr. 02_5	6,0	Fr. 02_11	2,4
Fr. 02_6	3,7	Fr. 02_12	2,2
Fração 04	Massa (mg)	Fração 04	Massa (mg)
Fr. 04_1	4,0	Fr. 04_4	6,2
Fr. 04_2	4,1	Fr. 04_5	1,6
Fr. 04_3	4,0	-----	-----
Fração 06_P	Massa (mg)	Fração 06_P	Massa (mg)
Fr. 06_P_01	2,0	Fr. 06_P_04	1,1
Fr. 06_P_02	2,5	Fr. 06_P_05	23,5
Fr. 06_P_03	1,3	Fr. 06_P_06	12,2

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

5.1.2 Cultivo de *B. parva* nos meios Líquidos

Após a inoculação do endófito nos meios de cultivo líquidos (ext. de malte, nutrient, PDB e YM), estes foram mantidos sob temperatura controlada de 25 °C por 28 dias, em modo estático, com agitação manual a cada 24 horas.

Terminado o período fermentativo, as suspensões micelares foram filtradas a pressão reduzida, separando os micélios dos caldos fermentados. Em seguida, os filtrados foram submetidos a três partições líquido-líquido com Acetato de Etila P.A. (3 x 5,0 L, para cada meio de cultivo). Após a evaporação do solvente orgânico, foram obtidos os quatro extratos de interesse (Tabela 06, p. 59).

Tabela 06 – Massas dos extratos de *B. parva* provenientes do cultivo nos meios líquidos.

Extrato	Massa (mg)
Ext. de malte	687,1
Nutrient	356,8
PDB	806,0
YM	625,4

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

Esses extratos foram submetidos às análises de RMN de ^1H , Ensaios Biológicos e de CLAE-DAD e CLAE-EM, nas condições: eluição em Gradiente Exploratório (95-5 a 0-100% de $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ em 40 minutos); Coluna C18 (Phenomenex LUNA: 250 mm x 4,60 e 5 μm); Vazão: 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $V_{\text{injeção}}$: 30 μL (DAD) e 1 μL (EM); λ : 200–800 nm; [Amostra]: 5,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (DAD) e 1,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (EM).

5.1.2.1 Meio de Ext. de Malte

O extrato foi submetido a uma nova análise de CLAE-DAD_{analítica} com um sistema eluente de $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ em gradiente (95-5 a 30-70% de $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ de 5-40 minutos), e com base nos resultados obtidos, esse extrato foi fracionado por Cromatografia em Coluna, de acordo com o item 3.3 (p. 45). Utilizou-se acetonitrila P.A para ativação da fase estacionária. A separação foi feita utilizando pressão reduzida, aplicando-se 590 mg do extrato. A Tabela 07 mostra a composição das fases móveis utilizadas, e as respectivas massas obtidas após o fracionamento.

Tabela 07 – Composição das fases móveis e a massa obtida de cada fração do extrato oriundo de *B. parva* em meio de ext. de malte.

Fração	$\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$	Massa (mg)
01	85:15 %	173,6
02	70:30%	204,1
03	60:40 %	91,4
04	54:46 %	26,6
05	45:55 %	17,9
06	30:70 %	8,4
07	0:100 %	5,7
08	Limpeza	14,4
Rendimento	91,9%	

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

As frações coletadas foram submetidas a análises de RMN de ^1H , e CLAE-DAD_{analítica}, na condição padronizada. Com base nos resultados obtidos, foram

escolhidas as frações 02 e 03 para purificação via CLAE-DAD_{semiprep.}, nas condições mostradas na Tabela 08, otimizadas anteriormente no modo analítico.

Tabela 08 – Condições cromatográficas utilizadas na purificação das frações 02 e 03 oriundas do extrato de *B. parva* em meio de ext. de malte.

Condição	Fração 02
Eluição	Isocrático com 15% ACN por 22 min., e isocrático 20% de ACN de 23 a 50 min.
Coluna	C18 (250 mm x 10,0 mm e 5 µm)
Vazão	3 mL.min ⁻¹
V _{injeção}	150 µL
λ	254; 290; 366 e 210 nm
[Amostra]	20 mg.mL ⁻¹
M _{aplicada}	75,1 mg
Condição	Fração 03
Eluição	Isocrático com 30% de ACN por
Coluna	C18 (250 mm x 10,0 mm e 5 µm)
Vazão	3 mL.min ⁻¹
V _{injeção}	400 µL
λ	254; 290; 366 e 210 nm
[Amostra]	20 mg.mL ⁻¹
M _{aplicada}	85,1

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

Destas purificações, foram coletadas 11 subfrações de 02 e seis de 03, em que a Tabela 09 mostra as massas obtidas de cada subfração. Estas foram analisadas por CLAE-DAD_{analítica}, nas mesmas condições de eluição utilizadas em suas purificações. As subfrações que apresentaram maior pureza cromatográfica foram analisadas por RMN 1D e 2D com o intuito de identificar ou elucidar os compostos presentes em cada fração.

Tabela 09 – Massas obtidas de cada subfração oriundas das frações 02 e 03 do extrato de *B. parva* em meio de ext. de malte.

Fração 02	Massa (mg)	Fração 02	Massa (mg)
Fr. 02_01	0,4	Fr. 02_07	1,1
Fr. 02_02	2,1	Fr. 02_08	0,6
Fr. 02_03	0,9	Fr. 02_09	1,7
Fr. 02_04	0,9	Fr. 02_10	3,0
Fr. 02_05	1,0	Fr. 02_11	7,6
Fr. 02_06	0,9	-----	-----
Fração 03	Massa (mg)	Fração 03	Massa (mg)
Fr. 03_01	0,8	Fr. 03_04	4,0
Fr. 03_02	0,9	Fr. 03_05	6,6
Fr. 03_03	1,5	Fr. 03_06	3,2

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

5.2 Cultivo de *Pseudofusicoccum stromaticum*

O fungo endofítico *P. stromaticum*, isolado dos frutos maduros de *Syzygium cumini* (L.) Skeels pela Dr.^a Vanessa Mara Chapla e preservado em água deionizada, foi inoculado em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo meio de cultura sólido PDA (meio de batata, dextrose e ágar) para obtenção de massa micelar suficiente para cultivo em escala ampliada. O meio de cultivo foi preparado utilizando 5,0 g de ext. de malte com 250 mL de água deionizada (totalizando 6,25 L de meio).

Após a preparação do meio, este foi esterilizado em autoclave vertical por um período de 15 minutos a uma temperatura de aproximadamente 121 °C. Após a inoculação do endófito no meio preparado, a cultura foi mantida em modo estático sob temperatura controlada de 25 °C por 28 dias.

Ao final do período de fermentação, a suspensão micelar foi filtrada separando o micélio do filtrado. O filtrado aquoso foi submetido à partição líquido-líquido com AcOEt P.A (3 x 4 L), totalizando 12 L de fase orgânica. Posteriormente, o solvente orgânico foi evaporado em evaporador rotativo, originando o extrato de interesse (822,2 mg). A fase aquosa foi descartada em lugar apropriado.

O extrato foi submetido às análises de RMN de ¹H, ensaios biológicos (antibacteriano, antiglicante, antioxidante e citotóxico) e de CLAE-DAD_{analítica} e CLAE-EM, nas condições: eluição em Gradiente Exploratório (95-5 a 0-100% de H₂O/ACN em 40 minutos); Coluna C18 (Phenomenex LUNA: 250 mm x 4,60 e 5 µm); Vazão: 1,0 mL.min⁻¹; V_{injeção}: 30 µL (DAD) e 1 µL (EM) ; λ: 200 – 800 nm; [Amostra]: 5,0 mg.mL⁻¹ (DAD) e 1,0 mg.mL⁻¹ (EM).

O extrato foi fracionado por Cromatografia em Coluna, de acordo com o item 3.3 (p. 45). Utilizou-se metanol P.A para ativação da fase estacionária. A separação foi feita utilizando pressão reduzida, aplicando-se 727,0 mg do extrato. A Tabela 10 (p. 62) mostra a composição das fases móveis utilizadas, e as respectivas massas obtidas após o fracionamento.

Tabela 10 – Composição das fases móveis e a massa obtida de cada fração do extrato oriundo de *P. stromaticum* em meio de ext. de malte.

Fração	H ₂ O/MeOH	Massa (mg)
01	75:25 %	163,8
02	65:35 %	118,7
03	55:45 %	69,3
04	45:55 %	70,8
05	40:60 %	58,7
06	30:70 %	78,9
07	0:100 %	46,4
08	Limpeza	8,1
Rendimento	84,5 %	

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

As frações coletadas foram submetidas a análises de RMN de ¹H, e CLAE-DAD_{analítica}, na condição descrita anteriormente. Com base nos resultados obtidos, foram escolhidas as frações 04-06 para purificação via CLAE-DAD_{semiprep.}, nas condições mostradas na Tabela 11, otimizadas anteriormente no modo analítico.

Tabela 11 – Condições cromatográficas utilizadas na purificação das frações 04-06 oriundas do extrato de *P. stromaticum* em meio de ext. de malte.

Condição	Fração 04
Eluição	Gradiente de 20-40% ACN de 5-40 min.
Coluna	C18 (250 mm x 10,0 mm e 5 µm)
Vazão	3 mL.min ⁻¹
V _{injeção}	100 µL
λ	254; 290; 366 e 210 nm
[Amostra]	20 mg.mL ⁻¹
M _{aplicada}	75,1 mg
Condição	Fração 05
Eluição	Isocrático 50% MeOH por 25 min., e isocrático 60% de 26-45 min.
Coluna	C18 (250 mm x 10,0 mm e 5 µm)
Vazão	3 mL.min ⁻¹
V _{injeção}	150 µL
λ	254; 290; 366 e 210 nm
[Amostra]	20 mg.mL ⁻¹
M _{aplicada}	85,1
Condição	Fração 06
Eluição	Isocrático de 50% de MeOH por 25 min.
Coluna	C18 (250 mm x 10,0 mm e 5 µm)
Vazão	3 mL.min ⁻¹
V _{injeção}	200 µL
λ	254; 290; 366 e 210 nm
[Amostra]	20 mg.mL ⁻¹
M _{aplicada}	49,6

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

Destas purificações, foram coletadas 13 subfrações de 04, sete de 05 e seis de 06, em que a Tabela 12 mostra as massas obtidas de cada subfração. Estas foram analisadas por CLAE-DAD_{analítica}, nas mesmas condições de eluição utilizadas em suas purificações. As subfrações que apresentaram maior pureza cromatográfica foram analisadas por RMN 1D e 2D com o intuito de identificar ou elucidar os compostos presentes em cada fração.

Tabela 12 – Massas obtidas de cada subfração oriundas das frações 04-06 do extrato de *P. stromaticum* em meio de ext. de malte.

Fração 04	Massa (mg)	Fração 04	Massa (mg)
Fr. 04_01	0,6	Fr. 04_08	1,1
Fr. 04_02	0,2	Fr. 04_09	0,6
Fr. 04_03	0,3	Fr. 04_10	0,4
Fr. 04_04	0,5	Fr. 04_11	0,9
Fr. 04_05	0,5	Fr. 04_12	0,9
Fr. 04_06	0,5	Fr. 04_13	0,5
Fr. 04_07	0,8	-----	-----
Fração 05	Massa (mg)	Fração 05	Massa (mg)
Fr. 05_01	0,3	Fr. 05_05	0,6
Fr. 05_02	0,1	Fr. 05_06	0,6
Fr. 05_03	0,4	Fr. 05_07	0,9
Fr. 05_04	0,4	-----	-----
Fração 06	Massa (mg)	Fração 06	Massa (mg)
Fr. 06_01	1,4	Fr. 06_04	0,7
Fr. 06_02	1,1	Fr. 06_05	2,1
Fr. 06_03	1,3	Fr. 06_06	0,6

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

5.3 Cultivo da Co-cultura de *B. parva* e *P. stromaticum*

Os fungos endofíticos *B. parva* e *P. stromaticum* foram inoculados, separadamente, em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo meio de cultura sólido PDA para obtenção de massa micelar suficiente para cultivo em escala ampliada. Deste material, $\frac{1}{8}$ da placa de Petri de cada endófito foi inoculado em cada frasco de Erlenmeyer, contendo meio de ext. de malte (5,0 g de meio em 250 mL de água deionizada, totalizando 12,5 L, previamente esterilizado em autoclave vertical por 15 minutos a uma temperatura de aproximadamente 121 °C).

Após a inoculação dos endófitos no meio preparado, a cultura foi mantida em modo estático sob temperatura controlada de 25 °C por 28 dias.

Ao final do período de fermentação, a suspensão micelar foi filtrada separando o micélio do filtrado. O filtrado aquoso foi submetido à partição líquido-líquido com AcOEt P.A (3 x 6,25 L), totalizando ~19 L de fase orgânica. Posteriormente, o solvente orgânico foi evaporado em evaporador rotativo, originando o extrato de interesse (1,9965 g). A fase aquosa foi descartada em lugar apropriado.

O extrato foi submetido às análises de RMN de ^1H , ensaios biológicos (antibacteriano, antiglicante, antioxidante e citotóxico) e de CLAE-DAD_{analítica} e CLAE-EM, nas condições: eluição em Gradiente Exploratório (95-5 a 0-100% de $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ em 40 minutos); Coluna C18 (Phenomenex LUNA: 250 mm x 4,60 e 5 μm); Vazão: 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $V_{\text{injeção}}$: 30 μL (DAD) e 1 μL (EM); λ : 200 – 800 nm; [Amostra]: 5,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (DAD) e 1,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (EM).

5.4 Ensaios Biológicos e Químicos

Os extratos foram submetidos à ensaios biológicos e químicos para verificação das atividades antibacteriana, anticolinesterásica, antifúngica, antiglicante, antioxidante e citotóxico.

5.4.1 Ensaio Antibacteriano

O ensaio antibacteriano foi realizado no Instituto de Física de São Carlos – Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular (LEMiMo) – USP, pela aluna de iniciação científica Ana Flávia S. de Camargo sob orientação da Prof.^a Dr.^a Ilana L. B. C. Camargo. Os extratos foram submetidos à avaliação da inibição de crescimento de bactérias super-resistentes, listadas na Tabela 13.

Tabela 13 – Linhagens bacterianas utilizadas na avaliação de atividade antibacteriana dos extratos obtidos de *B. parva*, *P. stromaticum* e da co-cultura de ambos os endófitos.

Linhagens Bacterianas	Tipo
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 35984)	Gram-positiva
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	Gram-positiva
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	Gram-positiva
<i>Enterococcus faecium</i> (ATCC 700221)	Gram-positiva
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 700603)	Gram-negativa
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	Gram-negativa
<i>Acinetobacter baumannii</i> (ATCC 19606)	Gram-negativa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Gram-negativa

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

Os extratos foram diluídos em DMSO para a preparação da solução estoque 100 vezes concentrada. Posteriormente, a solução estoque foi diluída em 1:100 em caldo Mueller-Hinton Cátion Ajustado (MHCA). Em seguida, cada extrato foi testado a $512 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a 1% de DMSO, ou na maior concentração em que foi possível dissolver o extrato sem que houvesse precipitação, de acordo com o preconizado pelo CLSI⁽⁹⁹⁾. A adição do inóculo foi realizada de acordo com CLSI⁽¹⁰⁰⁾ para o método de microdiluição em caldo.

Para o controle negativo foi adicionado caldo MHCA 1% DMSO juntamente com a bactéria sem compostos ativos, para observar o crescimento da mesma. Já para o controle positivo, foi utilizado apenas o caldo MHCA 1% DMSO, sem material biológico.

A incubação foi realizada a 37 °C e a leitura visual dos resultados foi feita após 24 horas. Os ensaios foram realizados em duplicata.

5.4.2 Ensaio Anticolinesterásico

O ensaio anticolinesterásico foi realizado no Instituto de Botânica de São Paulo – Seção de Fisiologia Vegetal – pela Dr.^a Cynthia Murakami, com orientação da Prof.^a Dr.^a Maria Cláudia Marx Young.

Os extratos foram submetidos à avaliação da enzima acetilcolinesterase (AChE), de acordo com a literatura⁽¹⁰¹⁾, utilizando cromatoplasmas de sílica gel. A Tabela 14 mostra a quantidade aplicada de cada extrato nas cromatoplasmas, bem como as condições de eluição para cada extrato. Após a eluição das amostras, as placas foram secas e em seguida foram nebulizadas com a **Solução A** (Tabela 15, p. 66), e incubadas em câmara úmida fechada, a 37 °C por 2 minutos. Posteriormente, as cromatoplasmas foram nebulizada com a **Solução D** (Tabela 15, p. 66). Utilizou-se 0,05 μg do controle positivo Fisostigmina.

Tabela 14 – Condições de eluição utilizadas na análise de potencial anticolinesterásico dos extratos de *B. parva*.

Endófito	Extrato	M _{aplicada} (μg)	Condição de Eluição
<i>B. parva</i>	Arroz	200	80:10:10 CHCl ₃ /Acetona/MeOH
	Malte	200	
	Nutrient	200	
	PDB	200	
	YM	200	

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

Tabela 15 – Soluções utilizadas na análise de potencial anticolinesterásico dos extratos de *B. parva*.

Solução A	Acetilcolinesterase dissolvida em 150 mL de Tampão Tris-HCl (50 mM; pH=7,9), estocada a 4 °C. No momento do uso, adicionou-se 0,1% de BSA.
Solução B	250 mg de Acetato de 1-naftalina em 100 mL de etanol P.A.
Solução C	400 mg do sal “Fast Blue” B em 160 mL de água desmineralizada.
Solução D	Mistura de 10 mL da Solução B com 40 mL da Solução C.

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

5.4.3 Ensaio Antifúngico

O ensaio antifúngico foi realizado no Instituto de Botânica de São Paulo – Seção de Fisiologia Vegetal – pela Dr.^a Cynthia Murakami, com orientação da Prof.^a Dr.^a Maria Claudia Marx Young.

A atividade fúngica dos extratos foi determinada pela técnica de bioautografia para a detecção da atividade fungitóxica, pela nebulização dos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* (concentração de 5×10^7 esporos. mL⁻¹, em solução de glicose e sais) em cromatoplasmas de sílica gel. A Tabela 16 mostra a quantidade aplicada de cada extrato nas cromatoplasmas, bem como as condições de eluição para cada extrato. Após a eluição dos extratos, as placas foram secas e em seguida foram nebulizadas pela solução com os esporos dos dois fungos. Posteriormente, as cromatoplasmas foram incubadas a 25 °C por 48 horas, verificando a presença de halos de inibição do crescimento dos fungos, em comparação com o controle positivo Nistatina (5µg).

Tabela 16 – Condição de eluição utilizadas na análise de potencial antifúngico dos extratos de *B. parva*.

Endófito	Extrato	M_{aplicada} (µg)	Condição de Eluição
<i>B. parva</i>	Arroz	400	80:10:10 CHCl ₃ /Acetona/MeOH
	Malte	400	
	Nutrient	400	
	PDB	400	
	YM	400	

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

5.4.4 Ensaio Antiglicante

O ensaio de avaliação de atividade antiglicante foi realizado no Laboratório de Bioensaios-NuBBE do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química – UNESP – Araraquara/SP.

As atividades antiglicantes dos extratos, frente ao agente glicante metilglioxal (MGO), foram determinadas pelo sistema de albumina de soro bovino (BSA)/(MGO) de acordo com o método descrito na literatura^(102,103).

No desenvolvimento do método, analisou-se 150 µg.mL⁻¹ de cada extrato em um volume total de solução de reação de glicação de 3,0 mL, que incluiu 1,0 mg.mL⁻¹ de BSA, 5 mM de MGO e tampão Fosfato (pH 7,4 e 10 mM, contendo 150 mM de NaCl). Após o preparo das soluções, estas foram incubadas a 37 °C, na ausência de luz, por 72 horas com agitação constante (150 rpm). Posteriormente, 250 µL das soluções foram transferidos para microplaca preta de 96 poços. A leitura da fluorescência foi feita em triplicata e com um comprimento de onda de excitação de 370 nm e comprimento de onda de emissão de 440 nm, realizada em espectrofotômetro. Utilizou-se controle negativo (ausência de aminoguanidina) e controle positivo (10 mM de aminoguanidina) para averiguação do teste.

A porcentagem de inibição da formação de AGE's para cada extrato foi calculado utilizando a equação:

$$\% \text{ Inibição AGEs} = \frac{(Fl_{CN} - Fl_{bCN}) - (Fl_{Ext} - Fl_{bExt})}{(Fl_{CN} - Fl_{bCN})} \times 100\%$$

em que Fl_{CN} e Fl_{bCN} , são as fluorescências do controle negativo e seu branco respectivamente; e Fl_{Ext} e Fl_{bExt} , são as fluorescências dos extratos e seus brancos, respectivamente.

5.4.5 Ensaio Antioxidante

O ensaio de avaliação de atividade antioxidante foi realizado no Laboratório de Bioensaios-NuBBE do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química – UNESP – Araraquara/SP.

O potencial antioxidante dos extratos, frações foi avaliado de acordo com a redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•), por meio do monitoramento espectrofotométrico em 517 nm, utilizando rutina como controle positivo. O procedimento foi realizado em triplicata, pela adição de uma alíquota de 200 µL da solução metanólica de DPPH• (0,04 g.L⁻¹) a 100 µL das soluções das amostras em placas de 96 poços. As placas foram mantidas na ausência de luz por 1 hora.

Os extratos e frações foram testados nas concentrações finais de 128, 64, 32, 16, 8, 4 e 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e o controle positivo nas concentrações finais de 64, 32, 16, 8, 4, 2, e 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A variação na absorbância da solução de DPPH• com o controle e com as amostras foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm. Ao final do procedimento, a aptidão de redução do DPPH• pelos controles e amostras foi calculada com base na equação:

$$\% \text{ Captura DPPH} = \left(\frac{\text{Abs. Controle Neg.} - \text{Abs. Amostra}}{\text{Abs. Controle negativo}} \right) \times 100$$

As concentrações efetivas (EC_{50}) para observar 50% do efeito de captura do radical DPPH•, foram obtidas por meio da regressão linear das curvas analíticas das amostras utilizando o programa EXCEL.

5.4.6 Ensaio Citotóxico

O ensaio de avaliação citotóxica foi realizado pelo método MTT no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas - USP – São Paulo/SP, pela aluna Helori Vanni Forastieri, com orientação da Prof.^a Dr.^a Letícia V. Costa-Lotufo.

Os extratos foram diluídos em DMSO puro estéril para a concentração estoque de 10 mg.mL^{-1} . Foi utilizado controle positivo doxorrubicina.

As células tumorais foram plaqueadas na concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ cél. mL^{-1} , em placas de 96 poços. Após 24 horas, os extratos foram adicionados a cada poço nas concentrações de 5 e 50 μM , em duplicata, e incubados por 72 horas em estufa a 5% de CO_2 a 37 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e substituído por solução de sal de tetrazolium-MTT em meio de cultura (0,5 mg.mL^{-1}), e as placas foram incubadas por 3 horas. Após esse período, o sobrenadante foi, novamente, removido e a placa foi seca. Em seguida, o precipitado, contendo azul de formazan de MTT, foi dissolvido em 150 μL de DMSO puro e a absorbância da solução obtida foi lida em espectrofotômetro de placa a 570 nm⁽¹⁰⁴⁾.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este item compreende os resultados obtidos da bioprospecção das culturas isoladas dos endófitos *Botryosphaeria parva* e *Pseudofusicoccum stromaticum*, bem como os resultados obtidos da bioprospecção da co-cultura de ambos os endófitos.

6.1 Bioprospecção de *Botryosphaeria parva*

Os extratos brutos produzidos por *B. parva* foram obtidos de acordo com a metodologia descrita anteriormente, e a Tabela 17 mostra o rendimento dos extratos considerando a massa de cada meio de cultivo utilizado.

Tabela 17 – Rendimento dos extratos de *B. parva* referentes às massas dos meios de cultivo utilizados.

Extratos	M _{Extrato} (g)	M _{Meio de Cultivo} (g)	Rendimento (%)
Arroz	5,3881	2250	0,24
Ext. de malte	0,6871	200	0,34
Nutrient	0,3568	80	0,45
YM	0,6254	210	0,30
PDB	0,8060	240	0,34

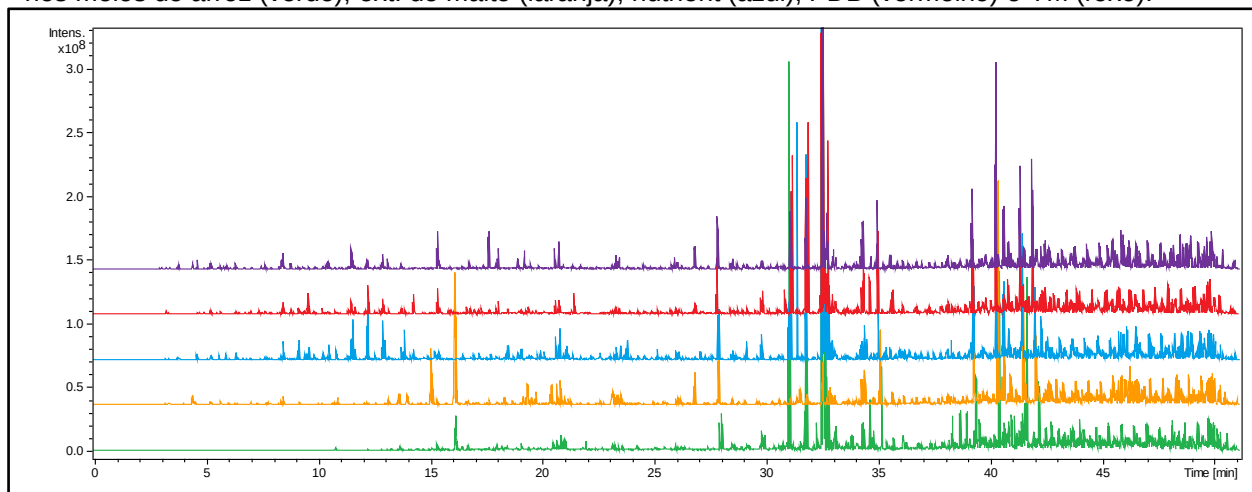
Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

É possível observar que ocorreu uma pequena variação dos rendimentos dos extratos, em que era esperado um rendimento diferenciado principalmente nos meios de cultivos considerados ricos em nutrientes.

Com isso, os extratos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), realizada por meio da análise de CLAE-EM de baixa resolução utilizando um sistema eluente de gradiente exploratório com H₂O/ACN (Figura 08, p. 70), com o objetivo de comparar a média da população amostral, e assim identificar se a média das razões massa carga (*m/z*) desses extratos diferem significativamente entre si. A tabela ANOVA (Figura 09, p. 70) foi gerada utilizando o programa EXCEL e considerando um nível de significância (α) de 0,05.

Pelos resultados obtidos, verifica-se que as médias dos valores *m/z* dos extratos não diferem entre si, uma vez que o valor calculado de F (teste de Fisher) é menor que o valor de F_{crítico}, e o valor de P é maior que o nível de significância aplicado.

Figura 08 – Comparação dos cromatogramas de íons totais (TIC) dos extratos de *B. parva* nos meios de arroz (verde), ext. de malte (laranja), nutrient (azul); PDB (vermelho) e YM (roxo).



Condição: Coluna de C18 (250 x 4,60 mm; 5 μ m); gradiente exploratório 5-100% de ACN em H₂O de 0-40 min., com limpeza da coluna com 100% ACN de 40-50 min., e fase móvel modifica com 0,1 % de Ácido Fórmico; Vazão: 1 mL.min⁻¹; V_{inj.} = 1,0 μ L; Energia de ionização 4.500 V; [Amostra] = 1,0 mg.mL⁻¹. Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Figura 09 – Tabela ANOVA dos extratos obtidos de *B. parva* em cinco meios de cultivo.

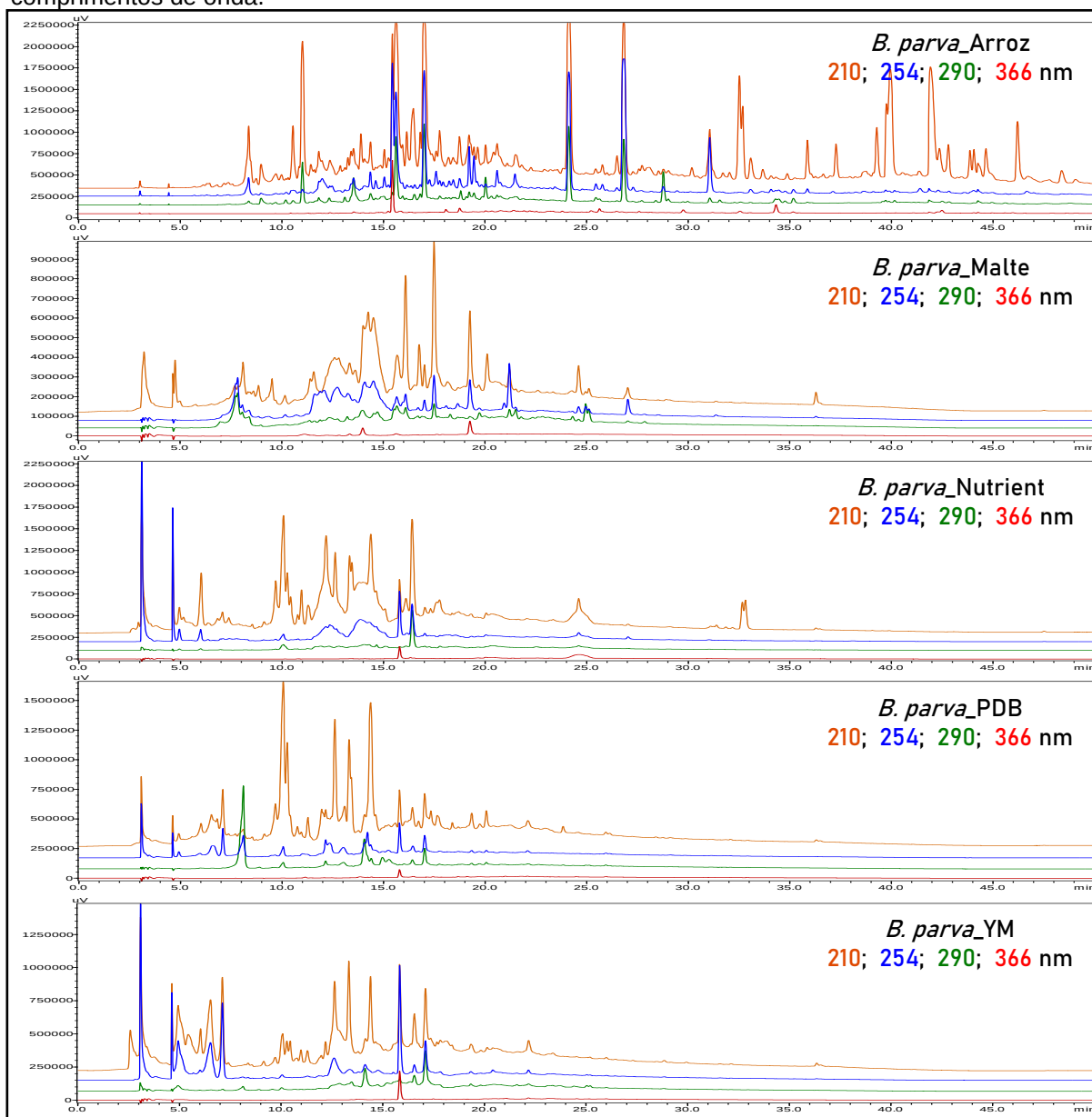
Anova: fator único						
RESUMO						
<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
Ext. Arroz	300	152720	509,07	21612,70		
Ext. Malte	300	145826	486,09	23152,19		
Ext. Nutrient	300	144060	480,20	24187,17		
Ext. PDB	300	151174	503,91	23888,96		
Ext. YM	300	148649	495,50	25109,57		
ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	172800,81	4	43200,20	1,83	0,12	2,38
Dentro dos grupos	35267226,10	1495	23590,12			
Total	35440026,91	1499				

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Tendo em vista que o resultado da tabela ANOVA indica apenas a similaridade entre as médias das *m/z* dos extratos de *B. parva*, foram realizadas análises de CLAE-DAD e RMN de ¹H para verificação de diferenças pontuais entre esses extratos, e a Figura 10 (p. 71) mostra a comparação dos cromatogramas de cada extrato de *B. parva*, em que é possível observar que para o mesmo sistema eluente os extratos

obtidos nos meios líquidos (ext. de malte, nutrient, PDB e YM) evidenciaram que as substâncias produzidas pelo endófito apresentaram polaridade média a alta, enquanto que para o extrato obtido em meio sólido (arroz) evidenciou-se a produção de substâncias com diferentes polaridades, abrangendo toda a faixa de polaridade. Essa análise mostra que a produção metabólica de *B. parva* depende da natureza dos nutrientes presentes em cada meio de cultivo.

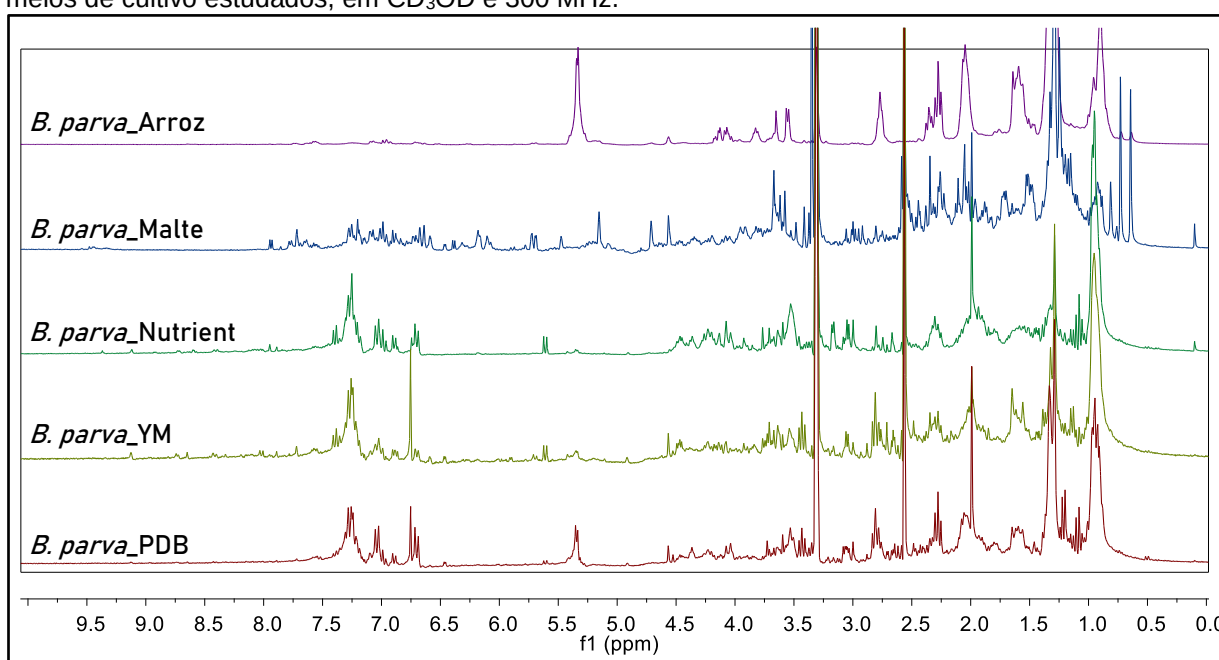
Figura 10 – Comparação dos cromatogramas dos extratos de *B. parva* obtidos em diferentes comprimentos de onda.



Condição: Coluna de C18 (250 x 4,60 mm; 5 μ m); gradiente de 5 a 100% de ACN em H₂O por 40 min., com limpeza da coluna com 100% ACN de 40-50 min.; Vazão= 1 mL.min⁻¹; V_{inj.} = 30 μ L; [amostra] = 5 mg.mL⁻¹. Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Os espectros de RMN de ^1H desses extratos (Figura 11), apresentaram sinais característicos de hidrogênios aromáticos (δ 6,5-8), vinílicos (δ 5-6,5), carbinólicos (δ 3-4,5), e hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos (δ 0,5-3). A comparação desses espectros sustenta a afirmação feita anteriormente, de que a natureza do meio de cultivo influencia a produção metabólica do endófito, uma vez que é possível observar diferenças nos sinais de hidrogênios aromáticos, vinílicos e carbinólicos de cada extrato.

Figura 11 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H dos extratos de *B. parva* nos cinco meios de cultivo estudados, em CD_3OD e 300 MHz.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Os cromatogramas dos extratos de *B. parva* foram comparados com os cromatogramas dos extratos dos Brancos (meios de cultivo sem a inoculação do endófito) (Apêndice 01, p. 196), e verificou-se que três dos cinco extratos (extratos em Nutrient, PDB e YM) apresentavam picos com o mesmo tempo de retenção aos dos extratos dos Brancos, evidenciando a existência de metabólitos provenientes dos meios de cultivo nos extratos de interesse. Portanto, devido à essa observação, os extratos obtidos nestes meios foram armazenados e, deu-se continuidade ao estudo dos extratos obtidos em meio de Arroz Parboilizado e Ext. de malte.

6.1.1 Cultivo de *B. parva* em Arroz Parboilizado

O extrato obtido em meio de cultivo de arroz foi submetido à uma nova análise cromatográfica utilizando um sistema de eluição MeOH/H₂O e a partir deste, realizou-se o fracionamento de acordo com o item 5.1.1 (p. 55). As sete frações obtidas foram submetidas à mesma condição de análise de CLAE-DAD_{analítica}, (Apêndice 02, p. 197).

A comparação desses cromatogramas mostra que ocorreu separação das substâncias do extrato bruto, e, ao observar o cromatograma da Fr. 05, verifica-se que este contém apenas um pico majoritário. Dessa forma, essa fração foi submetida às análises de RMN uni- (¹H e ¹³C) e bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC), e nos permitiu identificar a substância majoritária **22**.

Os espectros de RMN de ¹H dessas frações (Apêndice 03, p. 198), confirmam a separação das substâncias presentes no extrato. Observa-se também que a Fr. 01-04 apresentaram sinais de hidrogênios aromáticos, quando comparada às outras três frações. As frações 05 e 07 apresentaram alguns sinais de hidrogênios vinílicos, e a Fr.06 apresentou, diferentemente das demais, vários sinais de hidrogênios carbinólicos mesmo sendo uma fração de baixa polaridade, considerando que foi a penúltima fração a ser eluída da CC em fase reversa.

O processo de purificação das substâncias foi iniciado com as frações 03 e 06, que após o processo de precipitação (item 4.1.1, p. 50), as frações obtidas foram submetidas a análises de CLAE-DAD_{analítica} (Apêndice 04 e Apêndice 05, p. 198 e 199).

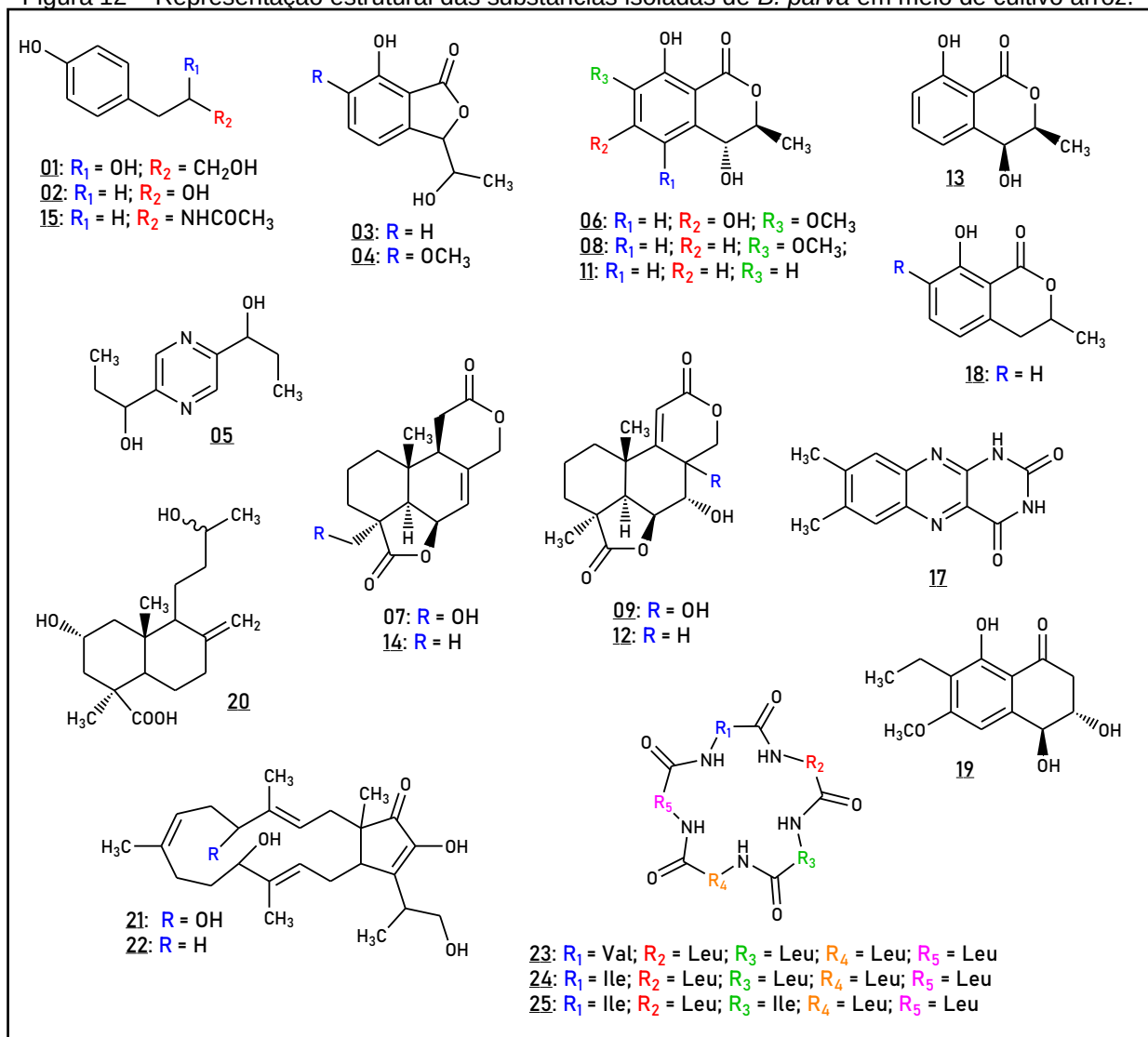
Por apresentar maior pureza cromatográfica, a subfração Fr_03_P foi submetida a análises de RMN 1D (¹H e ¹³C) e 2D (COSY; HSQC e HMBC) e Espectrometria de Massas, sendo possível identificar a substância **17**.

Já a subfração Fr_06_P, por apresentar duas substâncias majoritárias, foi escolhida para fracionamento em CLAE-DAD_{semiprep.}, coletando-se seis subfrações, que foram analisados por CLAE-DAD_{analítica} na mesma condição de purificação, e as subfrações que apresentaram maior pureza cromatográfica foram analisadas por RMN 1D e 2D para identificação das substâncias.

As frações 01, 02 e 04, foram purificadas via CLAE-DAD_{semiprep.}, obtendo-se 13, 12 e cinco subfrações de Fr. 01, 02 e 04, respectivamente. Essas subfrações foram analisadas via CLAE-DAD_{analítica} nas mesmas condições de purificação, e as que apresentaram maior pureza cromatográfica foram analisadas por RMN 1D e 2D para identificação das substâncias.

A análise dos dados de RMN 1D e 2D nos permitiu identificar as substâncias, 3-(*p*-hidroxifenil)-1,2-propanodiol (**01**), tirosol (**02**), 3-(1-hidroxi-etil)-7-hidroxi-faleta (**03**), botryosfaleta A (**04**), botryospirazina (**05**), botryosarina A (**06**), botryosphaerina J (**07**), botryosarina B (**08**), botryosphaerina K (**09**), (3*S*, 4*R*)-4-hidroximeleina (**11**), botryosphaerina F (**12**), (3*S*, 4*S*)-4-hidroximeleina (**13**), (4*S*, 5*R*, 6*R*, 9*R*, 10*R*)-13,14,15,16-tetranorlabd-7(8)-eno-19,6 β :12,17-diolídeo (**14**), N-(2-feniletil)acetamida (**15**), lumichrome (**17**), meleina (**18**), botryosphaerona D (**19**), botryosphaerina L (**20**), 4-Hidroxiterpestacina (**21**), Terpestacina (**22**), Ciclo (Leu-Leu-Leu-Leu-Val) (**23**), Ciclo (Ile-Leu-Leu-Leu-Leu) (**24**) e Ciclo (Ile-Leu-Ile-Leu-Leu) (**25**). A determinação estrutural destas substâncias (Figura 12) está descrita no item 7 (p. 98).

Figura 12 – Representação estrutural das substâncias isoladas de *B. parva* em meio de cultivo arroz.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

6.1.2 Cultivo de *B. parva* em Ext. de malte

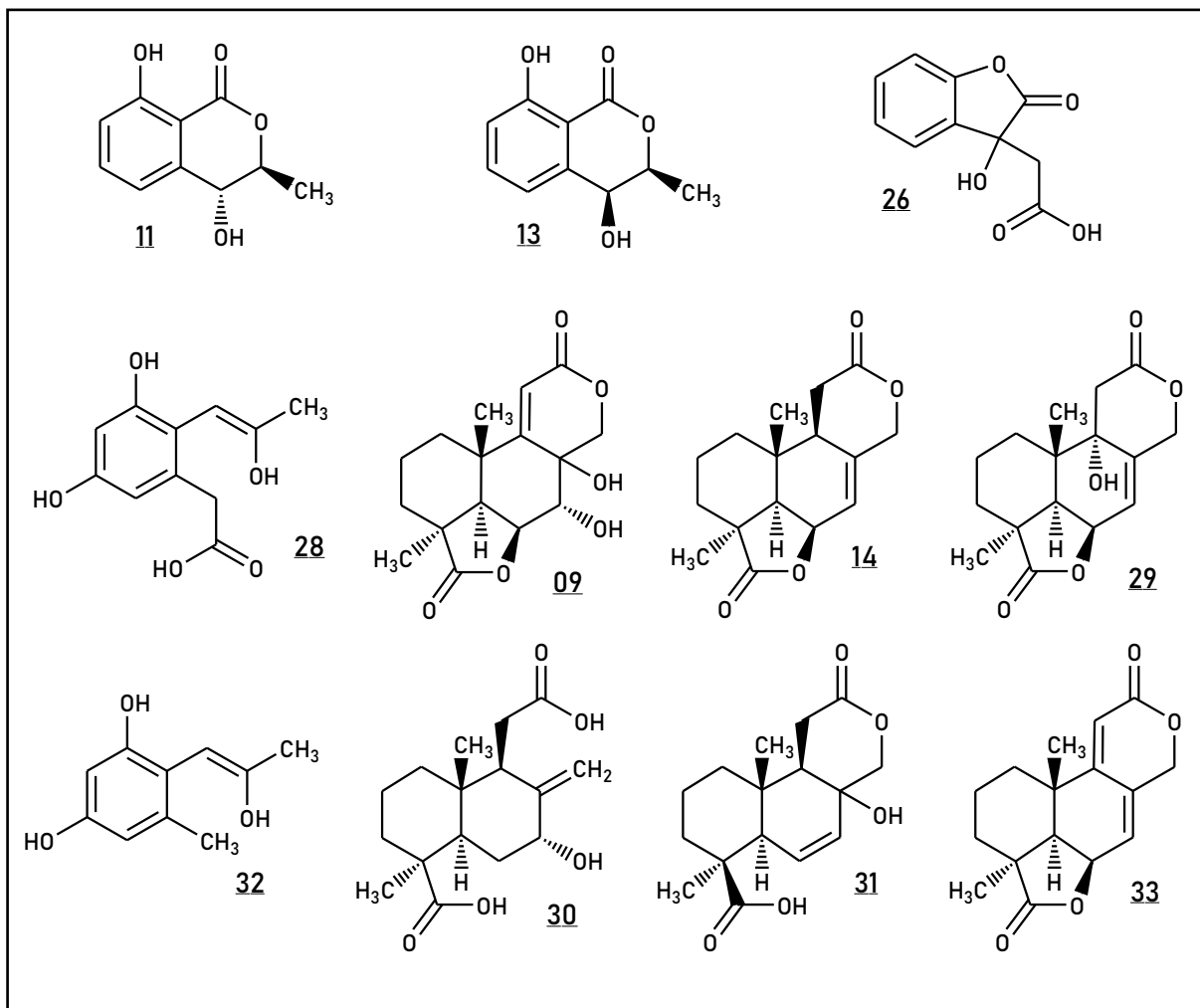
O extrato obtido em meio de cultivo de ext. de malte foi submetido à uma nova análise cromatográfica utilizando um sistema de eluição ACN/H₂O e com base no cromatograma obtido, realizou-se seu fracionamento em coluna cromatográfica com fase reversa C18 (a pressão reduzida). As sete frações de interesse foram submetidas à mesma condição de análise de CLAE-DAD_{analítica}, e os cromatogramas obtidos podem ser observados no Apêndice 06 (p. 200). A comparação desses cromatogramas mostra que ocorreu separação das substâncias do extrato.

Os espectros de RMN de ¹H dessas frações (Apêndice 07, p. 201), reforçam o que foi mencionado anteriormente, que ocorreu a separação das substâncias presentes no extrato. Observou-se também que a Fr. 02 e 03 apresentaram sinais de hidrogênios aromáticos, quando comparada às outras cinco frações, tornando-as interessantes para estudo. Já a fração 05 apresentou alguns sinais de hidrogênios vinílicos e sinais de hidrogênios carbinólicos mesmo sendo uma fração de baixa polaridade.

Como mencionado no procedimento experimental, foi realizado o fracionamento por CLAE-DAD_{semiprep.} das frações 02 e 03. Essa escolha foi feita com base nos resultados obtidos da análise de RMN de ¹H, pois ambas apresentaram mais sinais de hidrogênios aromáticos e vinílicos que as outras frações. Dessa forma, foram obtidas 11 subfrações da Fr. 02 e seis subfrações da Fr. 03, que foram submetidas à análise de CLAE-DAD_{analítica} (Apêndice 08 e Apêndice 09, p. 202 e 203), na mesma condição de suas purificações, e as subfrações que apresentaram maior pureza cromatográfica foram analisadas por RMN 1D e 2D (COSY; HSQC e HMBC) com o intuito de identificar/elucidar as substâncias isoladas.

A análise dos dados obtidos, nos permitiu identificar as substâncias botryosphaerina K (**09**), (3*S*, 4*R*)-4-hidroximeleina (**11**), hidroximeleina (**13**), (4*S*, 5*R*, 6*R*, 9*R*, 10*R*)-13,14,15,16-tetranorlabd-7(8)-eno-19,6 β :12,17-diolídeo (**14**), botryosbenzofuranona A (**26**), botryosbenzenodiol A (**28**), botryosphaerina A (**29**), LL-Z1271 β (**30**), oidiolactona E (**31**), botryosbenzenodiol B (**32**), e CJ-14445 (**33**) (Figura 13, p. 76). A determinação estrutural destas substâncias está descrita no item 7 (p. 98).

Figura 13 – Representação estrutural das substâncias identificadas de *B. parva* em meio de ext. de malte.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

6.2 Bioprospecção de *Pseudofusicoccum stromaticum*

O extrato bruto produzido por *P. stromaticum* foi obtido de acordo com o procedimento descrito anteriormente, e a Tabela 18 mostra o rendimento do extrato considerando a massa do meio de cultivo utilizado.

Tabela 18 – Rendimento do extrato referente à massa do meio de cultivo utilizado para a monocultura *P. stromaticum*.

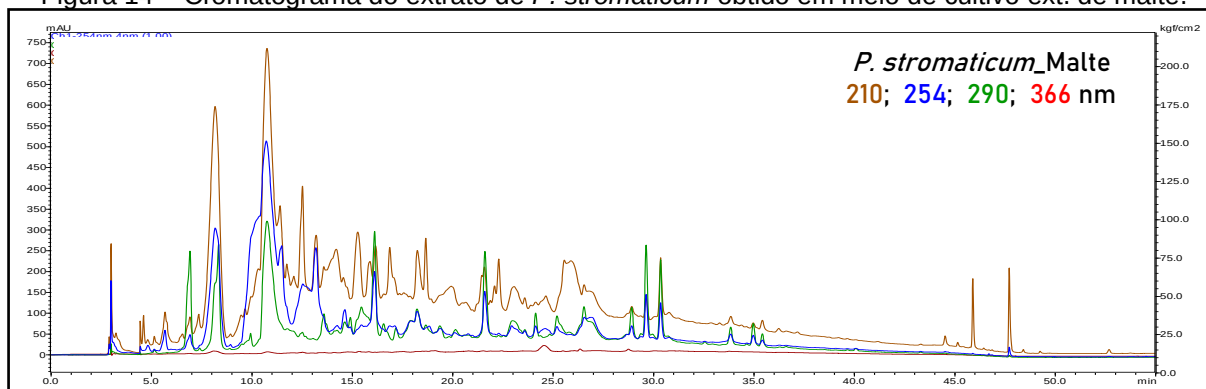
Extrato	M _{Extrato} (g)	M _{Meio de Cultivo} (g)	Rendimento (%)
Ext. de malte	0,8222	100	0,82

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

É interessante observar que o rendimento obtido na cultura isolada do *P. stromaticum* foi aproximadamente 2,5 vezes maior que o rendimento obtido na cultura isolada do *B. parva* no mesmo meio de cultivo.

A Figura 14 mostra o cromatograma do extrato obtido, e é possível observar que para o sistema eluente escolhido (gradiente exploratório com H₂O/ACN) o extrato obtido evidenciou que as substâncias produzidas pelo endófito apresentaram polaridade abrangendo toda a faixa de polaridade (baixa a alta).

Figura 14 – Cromatograma do extrato de *P. stromaticum* obtido em meio de cultivo ext. de malte.

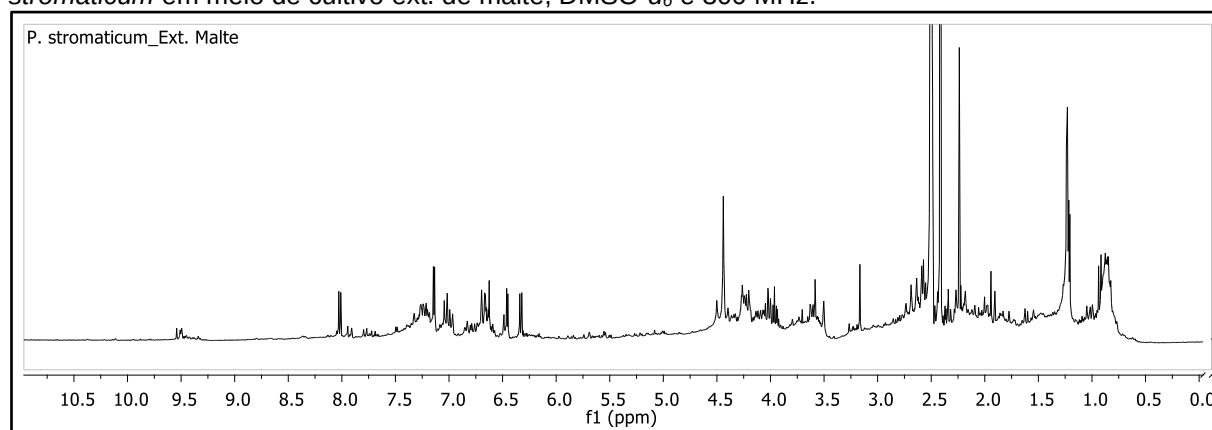


Condição: Coluna de C18 (250 x 4,60 mm; 5 μ m); gradiente de 5 a 100% de ACN em H₂O por 40 min., com limpeza da coluna com 100% ACN de 40-50 min.; Vazão= 1 mL.min⁻¹; V_{inj.} = 30 μ L; [amostra] = 5 mg.mL⁻¹. Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Vale ressaltar que o cromatograma obtido foi comparado com o cromatograma do extrato do Branco (Apêndice 10, p. 203), meio de cultivo sem a inoculação do endófito, e comprovou-se que o extrato bruto não apresentou picos com o mesmo tempo de retenção do extrato do Branco, evidenciando que os picos observados nos cromatogramas são provenientes da produção metabólica do fungo.

O perfil químico desse extrato (Figura 15), apresentou sinais característicos de hidrogênios aromáticos (6,5-8 ppm), carbinólicos (3-4,5 ppm), e hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos (0,5-3 ppm).

Figura 15 – Espectro de RMN de ¹H, com supressão do sinal da água, do extrato do *P. stromaticum* em meio de cultivo ext. de malte, DMSO-*d*₆ e 300 MHz.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O extrato obtido em meio de cultivo de ext. de malte foi submetido à uma nova análise cromatográfica utilizando um sistema de eluição MeOH/H₂O (Apêndice 11, p. 204), e com base no cromatograma obtido, foi fracionado em coluna cromatográfica com fase reversa C18 (a pressão reduzida) conforme o item 5.2 (p. 61). As sete frações de interesse foram submetidas à mesma condição de análise de CLAE-DAD_{analítica}, e os cromatogramas obtidos podem ser observados no Apêndice 11 (p. 204). A comparação desses cromatogramas mostra que a separação das substâncias não foi muito eficiente, principalmente quando comparamos as três primeiras frações.

Essas frações também foram submetidas à análise de RMN de ¹H (Apêndice 12, p. 205), em que pôde-se observar que as frações 02-04 apresentam mais sinais de hidrogênios aromáticos e carbinólicos que as demais frações, enquanto que as frações 05 e 06 apresentaram sinais de hidrogênios de aldeídos mais intensos que as demais, tornando-as interessantes para estudo.

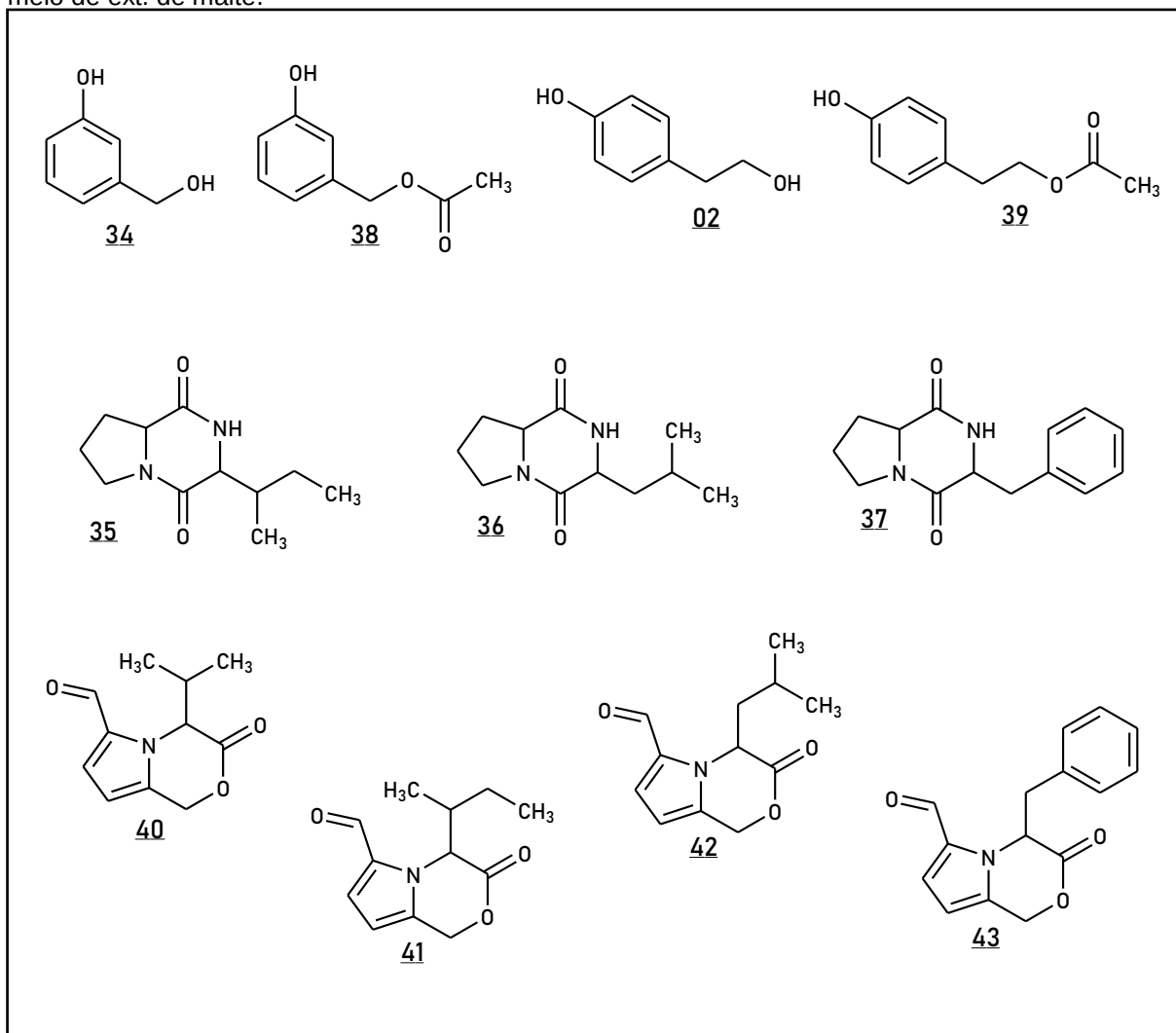
Mesmo sendo interessantes para estudo, as frações 02 e 03 se mostraram complexas cromatograficamente, demandando um tempo de estudo maior. Dessa forma, a purificação das substâncias produzidas por *P. stromaticum* foi iniciada com a fração 04, por ser menos complexa, obtendo-se 13 subfrações que foram submetidas à análise de CLAE-DAD_{analítica}, nas mesmas condições de purificação (Apêndice 13, p. 206), e as que apresentaram maior pureza cromatográfica foram submetidas à análise de RMN 1D (¹H e ¹³C) e 2D (COSY; HSQC e HMBC) com o intuito de identificar/elucidar as substâncias isoladas.

As frações 05 e 06 também foram purificadas, gerando sete e seis subfrações, respectivamente. Essas subfrações foram submetidas à análise de CLAE-DAD_{analítica}, nas mesmas condições de purificação (Apêndice 14, p. 207), e as que apresentaram maior pureza cromatográfica foram submetidas à análise de RMN 1D (¹H e ¹³C) e 2D (COSY; HSQC e HMBC) com o intuito de identificar/elucidar as substâncias isoladas.

A análise dos dados obtidos, nos permitiu identificar as substâncias: 3-(hidroximetil)fenol (**34**), tirosol (**02**), ciclo(Pro-Ile) (**35**), ciclo(Pro-Leu) (**36**), ciclo(Pro-Phe) (**37**), Acetato de (3-hidroxibenzil)metil (**38**), Acetato de 2-(*p*-hidroxifenil)etil (**39**), 3,4-dihidro-4-(1-metiletil)-3-oxo-1*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]oxazina-6-carboxaldeído (**40**), 3,4-dihidro-4-(1-metilpropil)-3-oxo-1*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]oxazina-6-carboxaldeído (**41**), 3,4-dihidro-4-(2-metilpropil)-3-oxo-1*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]oxazina-6-carbox-aldeído (**42**), 3,4-dihidro-4-(fenilmetil)-3-oxo-1*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]oxazina-6-carboxaldeído

(43) (Figura 16). A determinação estrutural destas substâncias está descrita no item 7 (p. 98).

Figura 16 – Representação estrutural das substâncias identificadas de *P. stromaticum* em meio de ext. de malte.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

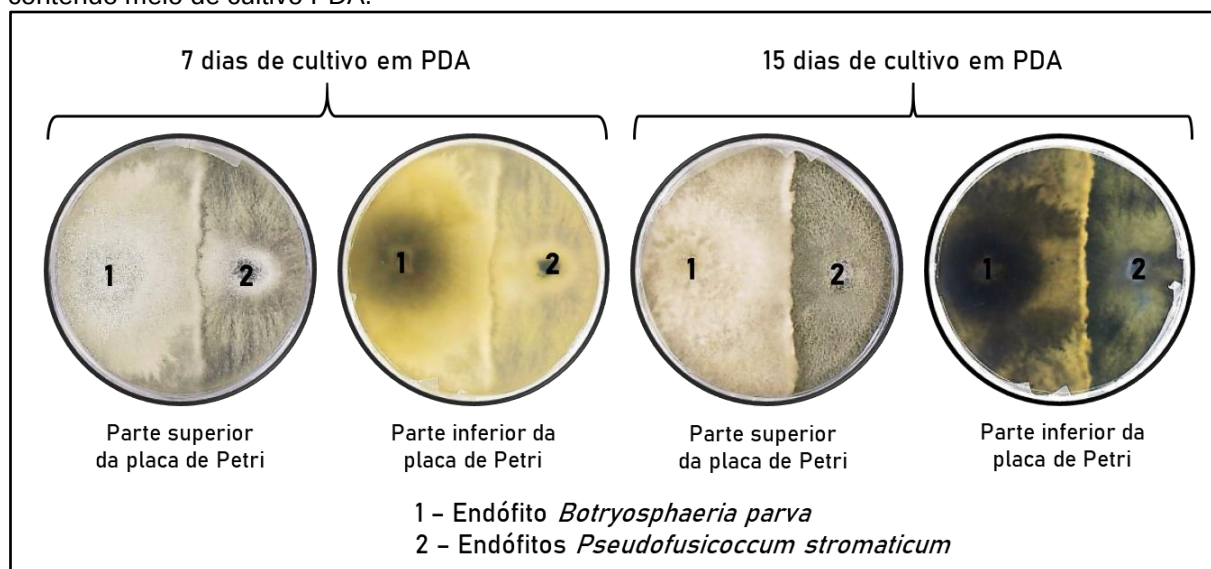
6.3 Bioprospecção da Co-cultura dos endófitos

Inicialmente, foi realizado um teste de crescimento em placa de Petri contendo meio de cultivo PDA com os dois endófitos para o conhecimento da interação entre eles, e para verificação da velocidade de crescimento de um em relação ao outro.

Com o resultado obtido (Figura 17, p. 80), verificou-se que não ocorria a inibição do crescimento de ambos os endófitos, indicando que a interação entre eles

não era antagônica, no entanto, verificou-se que a interação entre os endófitos era do inibição por contato do tipo 'linha de zona' ⁽⁶²⁾, onde é possível observar uma linha bem definida na região que os dois endófitos estão em contato. Neste tipo de interação, a possibilidade de produção de substâncias “não usuais” pelos endófitos pode ser confirmada pela coloração da linha e/ou precipitados de coloração diferentes ⁽⁶²⁾.

Figura 17 – Interação entre os endófitos *B. parva* e *P. stromaticum*, em placa de Petri contendo meio de cultivo PDA.

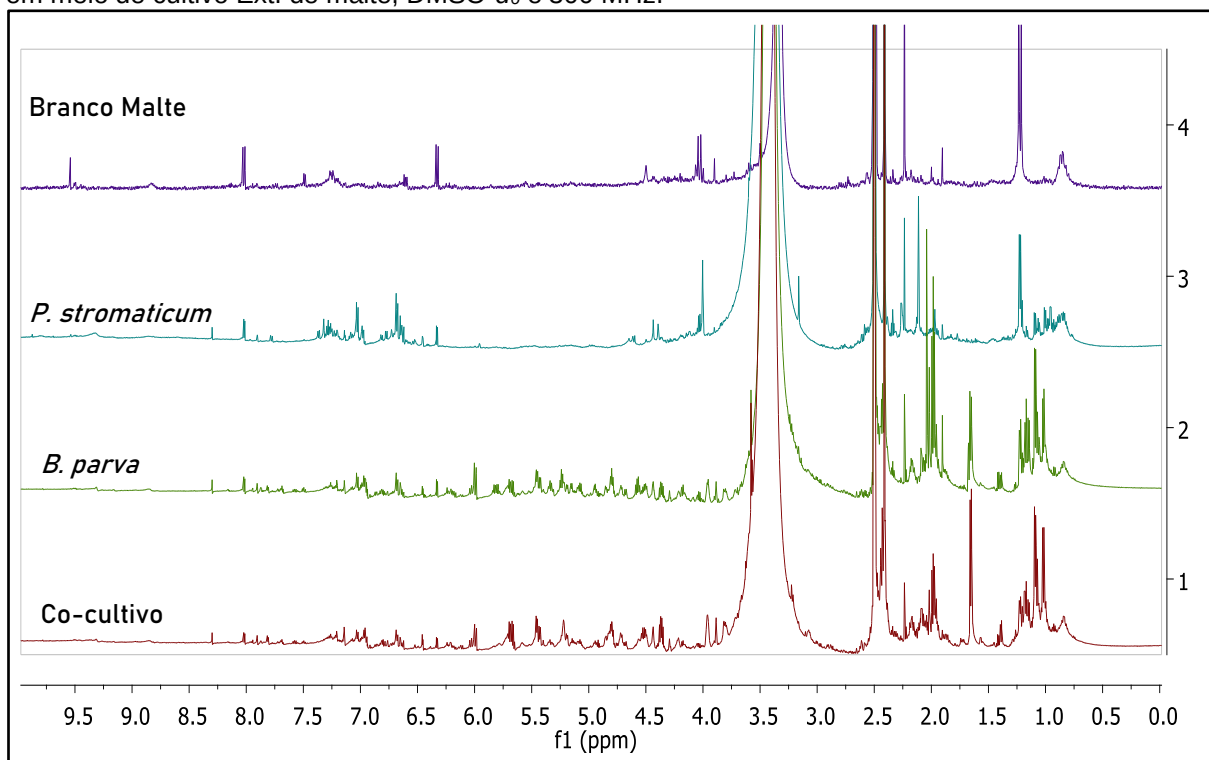


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Dessa forma, após a verificação de interação entre os dois endófitos, foi realizada a obtenção do extrato da co-cultura de acordo com o procedimento descrito no item 5.3 (p. 63). Pela comparação do espectro de RMN de ^1H do extrato da co-cultura com os extratos das monoculturas (Figura 18, p. 81), verificou-se que a produção metabólica da co-cultura é semelhante à produção metabólica da cultura isolada de *B. parva*, indicando que pode ter ocorrido uma inibição da produção metabólica de *P. stromaticum*.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 18, p. 81) apresentou uma variedade de sinais de hidrogênios aromáticos (δ 6,5-8), vinílicos (δ 5-6,5) e carbinólicos (δ 3-4,5), além de apresentar sinais de hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos (δ 0,5-3).

Figura 18 – Espectro de RMN de ^1H do extrato da co-cultura entre *B. parva* e *P. stromaticum* em meio de cultivo Ext. de malte, $\text{DMSO-}d_6$ e 300 MHz.

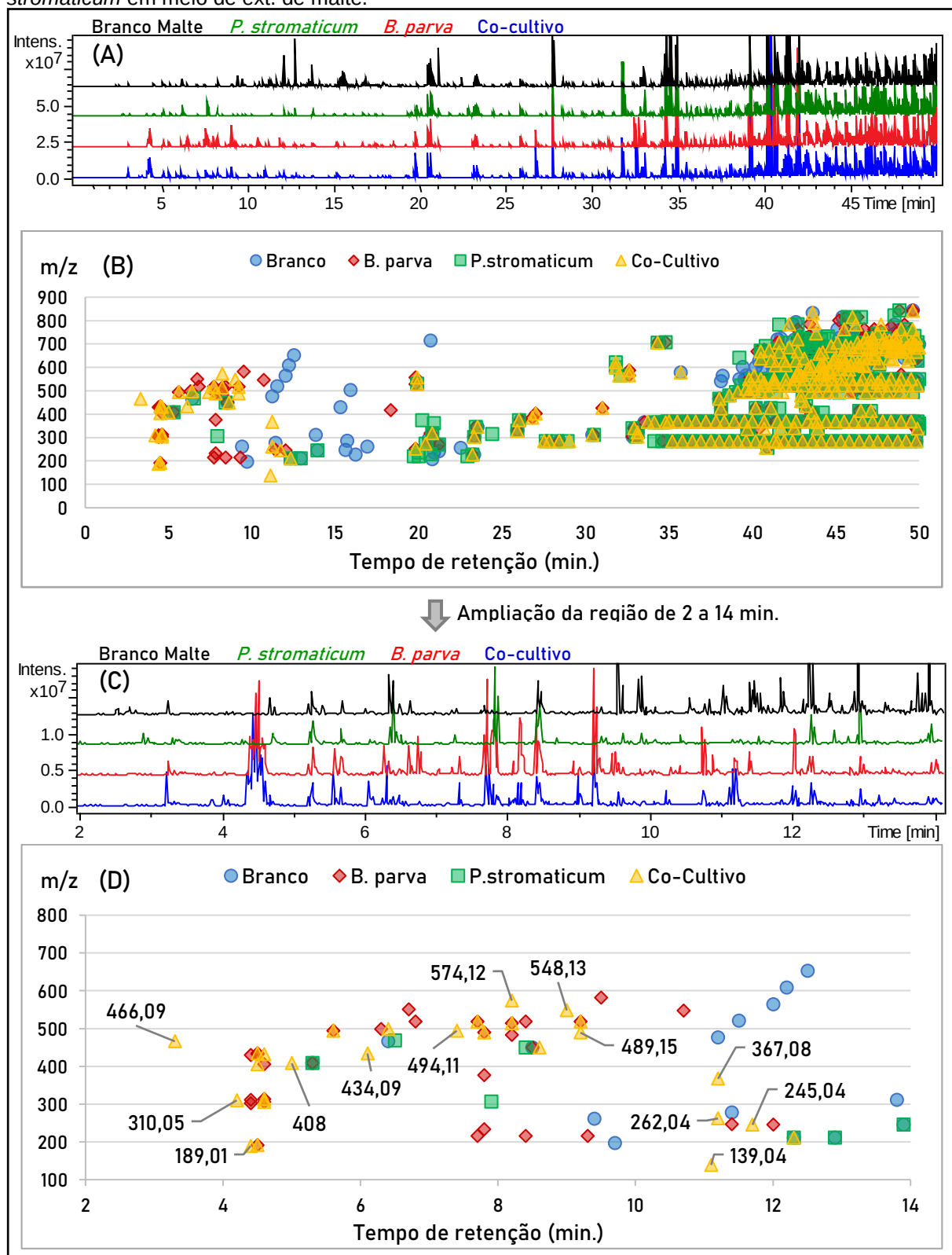


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Como mencionado no procedimento experimental, o extrato da co-cultura foi submetido, juntamente com os extratos das monoculturas, à uma análise de CLAE-EM, de baixa resolução, para verificação da produção de metabólitos diferentes dos produzidos nas culturas isoladas. Ao se observar os resultados obtidos (Figura 19, p. 82), verificou-se que a produção metabólica da co-cultura apresentou maior semelhança com a produção de *B. parva*, como já observado no espectro de RMN de ^1H . No entanto, é incorreto afirmar que a produção metabólica de *P. stromaticum* na co-cultura foi totalmente afetada, pois é possível observar que algumas substâncias produzidas na monocultura também foram produzidas na co-cultura.

Adicionalmente, foi observado a produção de 13 substâncias na co-cultura que não estavam presentes nas monoculturas dos endófitos, verificadas pela comparação dos íons moleculares obtidos para cada extrato (Figura 19 - D, p. 82).

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 TIC (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 *B. parva* e *P. stromaticum* em meio de ext. de malte.



Condição: Coluna de C18 (250 x 4,60 mm; 5 μ m); gradiente exploratório 5-100% de ACN em H_2O de 0-40 min., com limpeza da coluna com 100% ACN de 40-50 min., e fase móvel modifica com 0,1 % de Ácido Fórmico; Vazão: 1 mL.min⁻¹; V_{inj} = 1,0 μ L; Energia de ionização 4.500 V, em modo positivo; [Amostra] = 1,0 mg.mL⁻¹; detecção: ion trap. Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Outro resultado que se destaca, é referente a algumas substâncias presentes nos extratos das monoculturas que não foram detectadas no extrato da co-cultura, confirmando que a produção metabólica desses endófitos sofre interferência na presença do outro micro-organismo. A partir destes resultados, os extratos foram analisados via espectrometria de massas de alta resolução, no modo positivo, para a identificação, via desreplicação, das substâncias produzidas na co-cultura dos endófitos e, das substâncias presentes nos extratos das culturas controle que não foram detectadas no extrato da co-cultura (Tabela 19).

Tabela 19 – Íons detectados, no modo positivo, nos extratos da co-cultura e das monoculturas de *B. parva* e *P. stromaticum*, e registros obtidos em quatro bases de dados.

	Ion Trap		Q-TOF	Registros em Bases de Dados			
	t_R (min)	m/z	m/z	MassBank	Metlin	GNPS	Dicionário de Produtos Naturais
Co-cultura	3,3	466,09	466,0841	-	-	-	-
	4,2	310,05	310,1281	-	1	-	7
	4,4	189,01	189,0533	-	-	-	-
	5,0	408,00	408,0041	-	-	-	-
	6,1	434,09	434,0875	-	-	-	-
	7,4	494,11	494,1073	-	-	-	-
	8,2	574,12	574,3932	-	-	-	-
	9,0	548,13	548,3644	-	-	-	-
	9,2	489,15	489,1401	-	7	1	25
	11,1	139,04	139,0745	-	-	-	-
	11,2	262,04	262,1259	2	-	1	-
<i>B. parva</i>		367,08	367,0823	-	8	-	35
	11,7	245,04	245,1302	1	-	2	15
	6,7	550,11	550,1337	-	1	-	5
	6,8	518,12	518,1081	-	-	-	-
	7,7	215,02	215,0921	-	-	1	61
	7,8	376,11	376,0778	-	-	-	-
		233,05	233,1030	-	2	1	23
	8,4	215,05	215,0921	-	-	1	61
	9,3	215,07	215,0921	-	-	1	61
	9,5	582,17	582,2455	-	-	-	-
	10,7	547,16	547,2009	-	-	-	4
<i>P. stromaticum</i>	18,3	418,11	418,0576	-	-	-	-
	7,9	306,04	306,0558	-	-	-	-
	19,7	221,10	221,1532	1	11	1	51
	20,0	221,11	221,1532	1	11	1	51
		237,09	237,1499	-	-	2	87
	20,2	375,05	375,0707	-	2	-	20
	20,7	230,21	230,2475	1	1	1	1
	20,9	362,35	362,3274	-	-	-	1
	22,9	221,12	221,1532	1	11	1	51
	24,4	315,06	315,0510	-	6	4	50

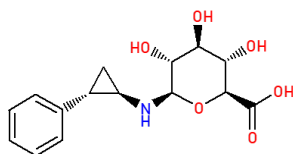
Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

A busca por estes íons em quatro bases de dados (MassBank⁽¹⁰⁵⁾, Metlin⁽¹⁰⁶⁾, GNPS⁽¹⁰⁷⁾ e Dicionário de Produtos Naturais⁽¹⁰⁸⁾) (Tabela 19, p. 83), considerando um erro de 5 ppm, indicou que oito, dos 13 íons detectados apenas na co-cultura, podem ser inéditos, pois não foram encontrados registros em nenhuma das bases utilizadas, sendo necessário um tempo maior de estudo para a obtenção e identificação destas oito substâncias. Os outros cinco íons, por apresentarem registros em pelo menos uma base de dados, podem tratar-se de substâncias conhecidas (Tabela 20, p. 84), no entanto, ainda é necessário um estudo da fragmentação destes íons para identificação destas substâncias.

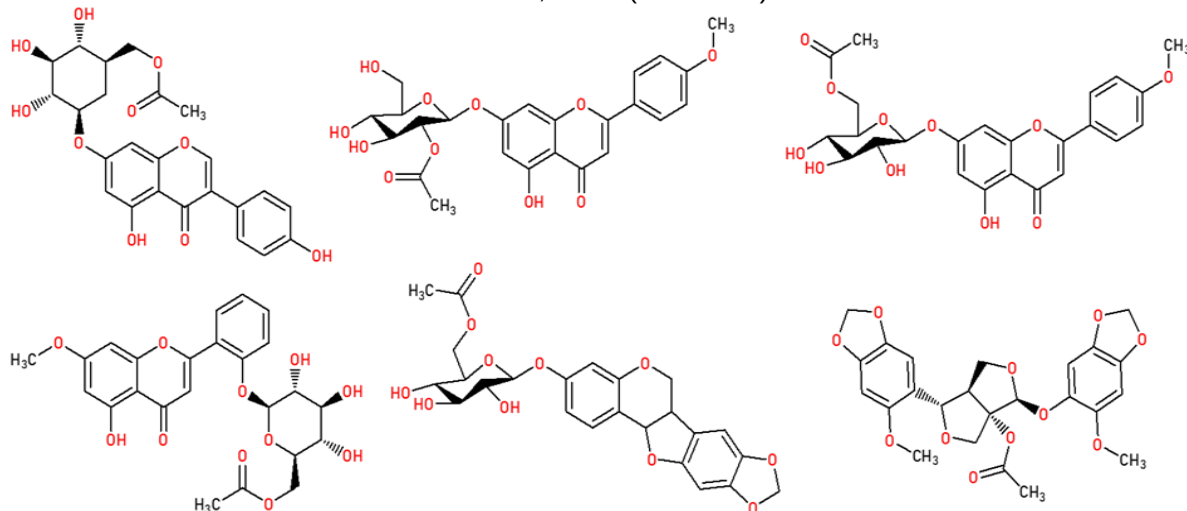
Dos íons detectados nas monoculturas de *B. parva* e *P. stromaticum* que não foram produzidos na co-cultura dos endófitos (Tabela 19, p. 83), verificou-se que cinco também não apresentam registros nas bases de dados utilizadas, sugerindo tratar-se de substâncias inéditas. Os outros íons apresentaram registros em pelo menos uma base de dados, sugerindo tratar-se de substâncias que podem ser conhecidas (Tabela 20, p. 84), e assim como para aos íons detectados na co-cultura, é necessário um estudo da fragmentação destes íons para identificação dessas substâncias que deixaram de ser produzidas na co-cultura dos endófitos.

Tabela 20 – Propostas estruturais para os íons que apresentam registro nos bancos de dados MassBank⁽¹⁰⁵⁾, Metlin⁽¹⁰⁶⁾ e GNPS⁽¹⁰⁷⁾.

m/z : 310,1281 (Co-cultura)

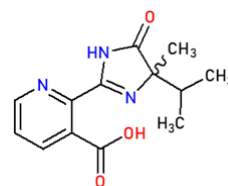
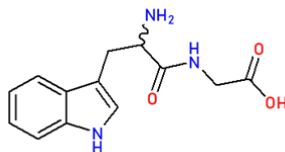
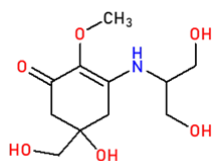


m/z : 489,1401 (Co-cultura)

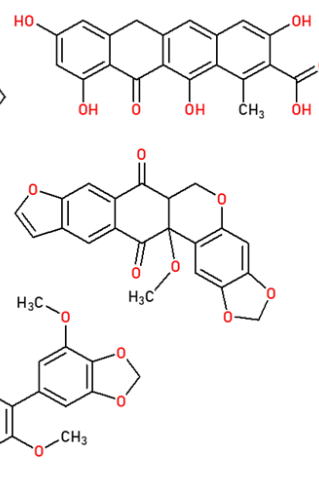
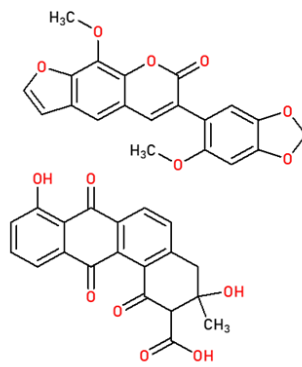
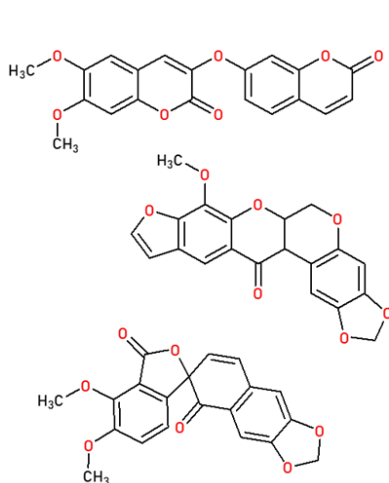


Cont. Tabela 20 – Propostas estruturais para os íons que apresentam registro nos bancos de dados MassBank⁽¹⁰⁵⁾, Metlin⁽¹⁰⁶⁾ e GNPS⁽¹⁰⁷⁾.

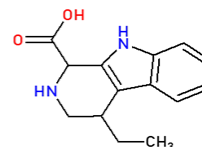
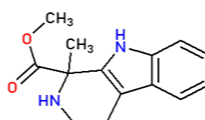
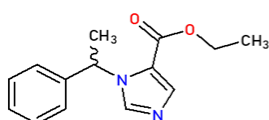
m/z : 262,1259 (Co-cultura)



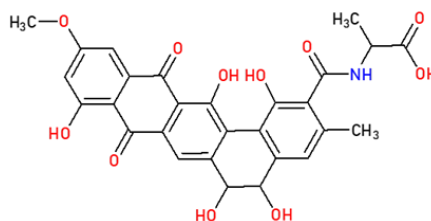
m/z : 367,0823 (Co-cultura)



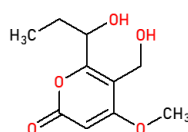
m/z : 245,1302 (Co-cultura)



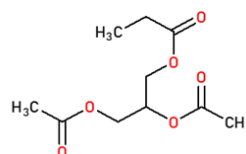
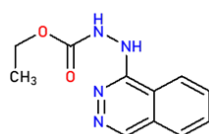
m/z : 550,1337 (*B. parva*)



m/z : 215,0921 (*B. parva*)

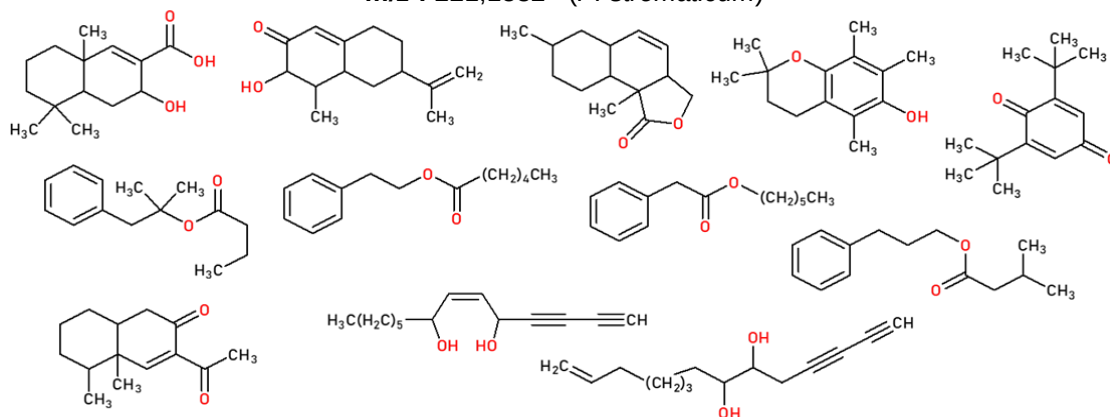


m/z : 233,1030 (*B. parva*)

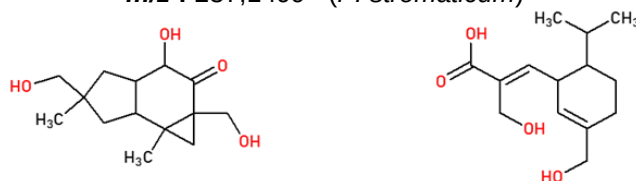


Cont. Tabela 20 – Propostas estruturais para os íons que apresentam registro nos bancos de dados MassBank⁽¹⁰⁵⁾, Metlin⁽¹⁰⁶⁾ e GNPS⁽¹⁰⁷⁾.

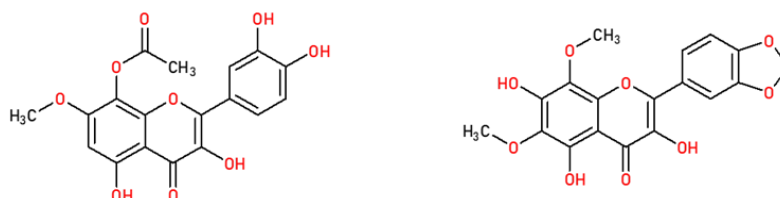
***m/z* : 221,1532 (*P. stromaticum*)**



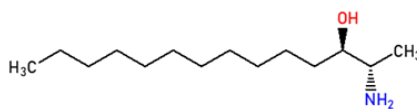
***m/z* : 237,1499 (*P. stromaticum*)**



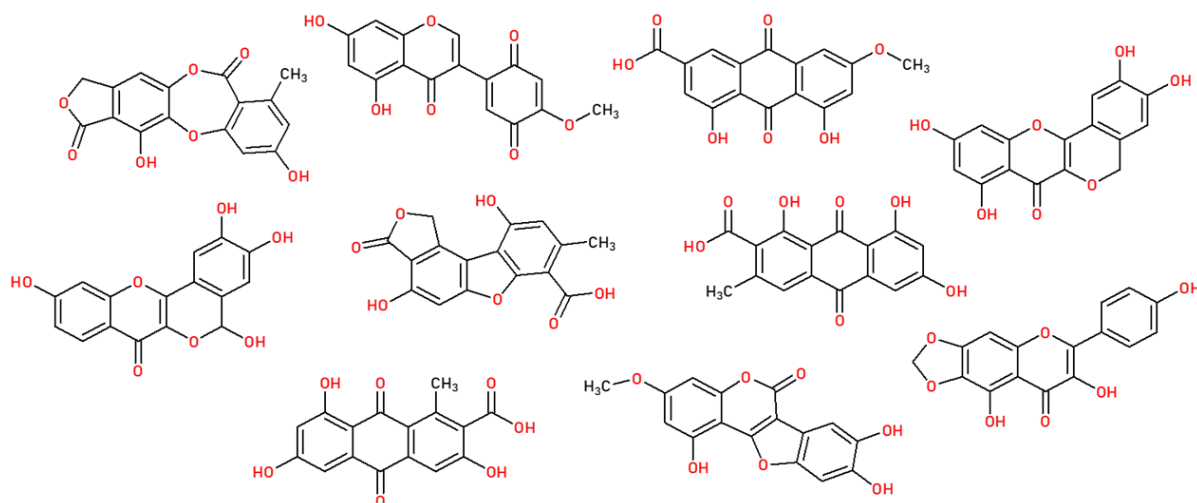
***m/z* : 375,0707 (*P. stromaticum*)**



***m/z* : 230,2475 (*P. stromaticum*)**



***m/z* : 315,0510 (*P. stromaticum*)**



Fonte: tabela e ilustrações adaptadas de MassBank⁽¹⁰⁵⁾, Metlin⁽¹⁰⁶⁾ e GNPS⁽¹⁰⁷⁾, 2020.

6.4 Avaliação das atividades Químicas e Biológicas dos extratos

Como mencionado no Procedimento Experimental, todos os extratos foram submetidos a ensaios químicos e biológicos.

6.4.1 Avaliação da atividade Antibacteriana

As bactérias estão intrinsecamente ligadas às vidas de organismos e aos amplos ambientes em que habitam. Muitas delas são inofensivas, sendo benéficas para seu hospedeiro, pois podem fornecer nutrientes e proteção contra patógenos e doenças, além de limitar a colonização de bactérias nocivas ⁽¹⁰⁹⁾. No entanto as bactérias também estão associadas a diversas enfermidades em humanos, animais e plantas. Este fato, juntamente como surgimento de novas doenças infecciosas, como o reaparecimento de várias infecções que aparentemente haviam ter sido controladas, e o aumento da resistência bacteriana, trouxe a necessidade de pesquisas dirigidas ao desenvolvimento de novos fármacos antibacterianos.

Os extratos de *B. parva*, *P. stromaticum* e da co-cultura dos endófitos, foram testados em oito linhagens de bactérias super-resistentes, sendo quatro gram-positivas: *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. Faecalis* e *E. faecium* e quatro gram-negativas: *K. pneumoniae*, *E. coli*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. Os resultados obtidos para cada uma delas são mostrados na Tabela 21.

Tabela 21 – Resultado da atividade antibacteriana dos extratos na concentração de 512 µg.mL⁻¹.

Linhagens	Concentração inibitória mínima		
	<i>P. stromaticum</i>	<i>B. parva</i>	Co-cultura
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	≤512	>512	>512
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	>512	>512	>512
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	>512	>512	>512
<i>E. faecium</i> ATCC 700221	>512	>512	>512
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	>512	>512	>512
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>512	>512	>512
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	>512	>512	>512
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>512	>512	>512

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

A triagem é considerada positiva quando não ocorre o crescimento bacteriano na concentração testada, nestes casos, a concentração inibitória mínima pode ser de

512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou menor ($\leq 512 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A ocorrência do crescimento bacteriano, indica que a triagem é considerada negativa para a concentração testada, no entanto, este resultado não exclui a possibilidade do extrato apresentar atividade em maiores concentrações, sendo os resultados expressos por $> 512 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

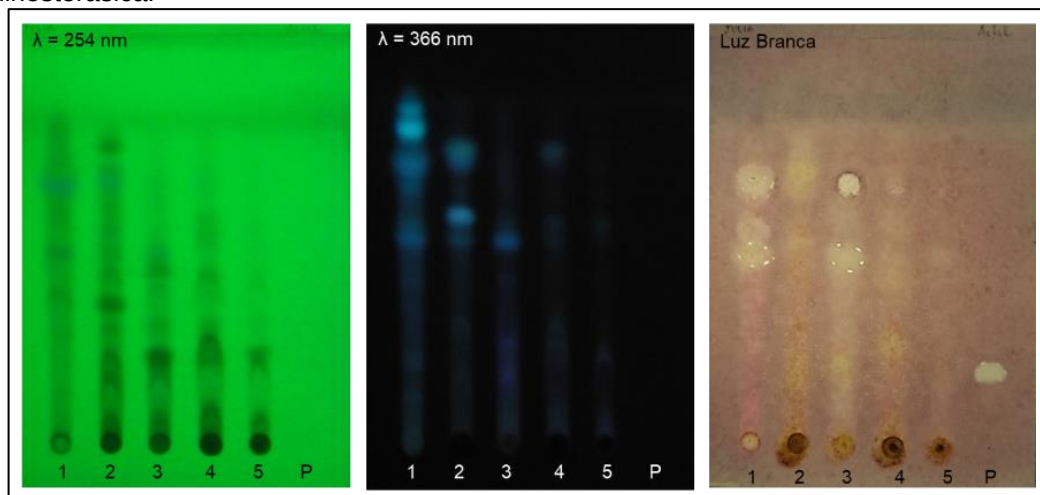
Pelos resultados, observa-se que apenas o extrato da monocultura de *P. stromaticum* apresentou atividade antibacteriana contra *S. epidermidis*, visto que os compostos são considerados ativos apenas se apresentarem valor $\leq 512 \mu\text{g.mL}^{-1}$, indicando um potencial antibacteriano seletivo para esta linhagem. O resultado obtido pode estar diretamente relacionado à ecologia química do endófito, uma vez que os micro-organismos endofíticos podem produzir substâncias bioativas para autodefesa contra micro-organismos fitopatógenos, ou para a proteção do hospedeiro contra estresse bióticos e abióticos.

6.4.2 Avaliação da atividade Anticolinesterásica

Indivíduos que apresentam deficiência de acetilcolina no processo sináptico apresentam uma patologia neurodegenerativa progressiva no sistema nervoso central, chamada de doença de Alzheimer, que causa um comprometimento da memória, dificuldade no raciocínio e alterações comportamentais desse indivíduo⁽¹¹⁰⁾. As alternativas presentes no mercado para reverter, ou amenizar, as causas dessa doença implicam em inibir a enzima acetilcolinesterase (AChE). Dessa forma, a possibilidade de obter novas substâncias, oriundas de estudos fitoquímicos e microbiológicos, que apresentam esse potencial de inibição tem animado e muito os pesquisadores dessa área⁽¹¹¹⁾.

O ensaio para avaliação qualitativa da atividade anticolinesterásica foi definido por meio de manchas brancas em contraste com o fundo roxo avermelhado da cromatoplaça, indicando atividade inibitória positiva da enzima acetilcolinesterase (Figura 20, p. 89), em que foi possível observar que apenas os extratos de *B. parva* em meio de Arroz e Nutrient apresentaram manchas brancas, evidenciando que alguns metabólitos produzidos pelo endófito, nestes extratos, apresentam potencial anticolinesterásico. As manchas brancas são proporcionais à inibição da enzima acetilcolinesterase, portanto quanto mais brancas forem essas manchas, maior potencial inibitório a substância irá apresentar.

Figura 20 – Avaliação qualitativa, em cromatoplaça, dos extratos de *B. parva* para atividade Anticolinesterásica.



1 – Extrato em Arroz; 2 – Extrato em Extr. de Malte; 3 – Extrato em Nutrient; 4 – Extrato em PDB; 5 – Extrato em YM e P – Controle positivo Fisostigmina. Condição: 8:1:1 CHCl₃/Acetona/MeOH (v/v). Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

6.4.3 Avaliação da atividade Antifúngica

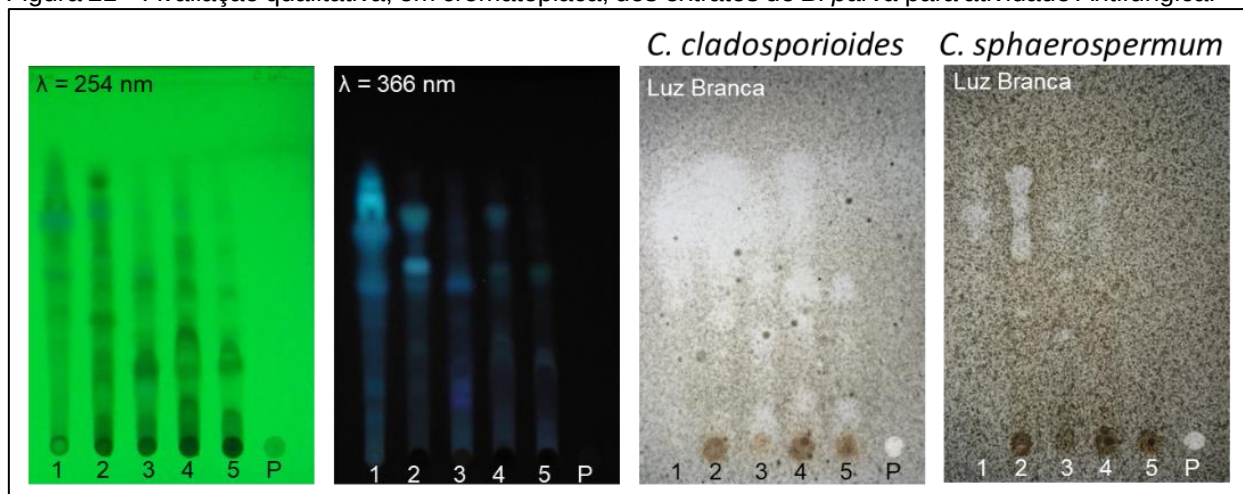
Os fungos fazem parte do ecossistema aerobiológico e apresentam-se em grandes quantidades, devido a sua grande capacidade de colonizar diferentes substratos e crescer em condições ambientais extremas⁽¹¹²⁾. Diversas doenças que ocorrem em plantas, animais e até mesmo em humanos, são devidas à fungos fitopatogênicos e patogênicos^(113,114). Entre os vários gêneros de fungos fitopatogênicos e patogênicos, destaca-se *Cladosporium*, que é considerado um dos mais cosmopolitas e de maior concentração na atmosfera, particularmente em regiões temperadas⁽¹¹⁵⁾.

Os fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides* são espécies bastante comuns, com ocorrência registrada em todas as partes do mundo. Estas espécies estão associadas à rinite e asma alérgica, infecções fúngicas (feo-hifomicoses) cutâneas, subcutâneas e raramente disseminadas⁽¹¹²⁾.

Muitas pesquisas são realizadas para a obtenção de novos agentes antimicóticos, e a bioautografia é um método útil para a localização de substâncias com ação antifúngica encontradas em matrizes complexas, como extratos obtidos de plantas e de cultivo de micro-organismos. Sendo assim, a bioautografia direta, é um ensaio que combina a cromatografia em camada delgada (CCD) e o teste biológico *in situ*, e é considerada uma excelente técnica para conduzir a fácil localização dos compostos ativos em matrizes complexas.

Dessa forma, o potencial antifúngico dos extratos brutos, de *B. parva*, foi executado por bioautografia com a nebulização dos fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. A nebulização da cromatoplaca (Figura 21), após a eluição dos extratos, com as soluções contendo micélios de cada micro-organismo, permitiu a observação da inibição do crescimento dos fungos (manchas brancas) em todos os extratos brutos, indicando a presença de metabólitos secundários com potencial antifúngico nesses extratos.

Figura 21 – Avaliação qualitativa, em cromatoplaca, dos extratos de *B. parva* para atividade Antifúngica.



1 – Extrato em Arroz; 2 – Extrato em Extr. de Malte; 3 – Extrato em Nutrient; 4 – Extrato em PDB; 5 – Extrato em YM e P – Controle positivo Nistatina. Condição: 8:1:1 CHCl_3 /Acetona/MeOH (v/v). Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Esses resultados podem estar diretamente relacionados à ecologia química do endófito, uma vez que os micro-organismos endofíticos podem produzir substâncias bioativas para auto defesa contra micro-organismos fitopatógenos, ou para a proteção do hospedeiro contra estresse bióticos e abióticos. Esses dados confirmam o quão promissores são os fungos endofíticos associados a espécies vegetais na busca por novos metabólitos secundários bioativos.

6.4.4 Avaliação da atividade Antiglicante

As complicações vasculares do diabetes tipo 2 são a principal causa de morbimortalidade nos países desenvolvidos e constituem uma preocupação crescente para as autoridades em todo o mundo. Entre as vertentes que explicam como a hiperglicemia crônica conduz aos danos celulares e teciduais, a formação dos

produtos finais de glicação avançada, chamados de AGE's (*Advanced Glycated End-Products*), é considerada a mais importante ⁽¹¹⁶⁾.

Os AGE's são os produtos finais de reações não enzimáticas entre açúcares redutores e grupos aminos em proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, gerando espécies reativas dicarbonílicas, como desoxiglicosonas, glioxal e metilglioxal ⁽¹⁰³⁾.

Os efeitos patológicos dos AGE's estão relacionados à capacidade destes compostos de modificar as propriedades químicas e funcionais de diversas estruturas biológicas por meio de interações com receptores celulares, promovendo um estresse oxidativo, alterações morfofuncionais e um aumento na expressão de mediadores inflamatórios ⁽¹¹⁶⁾. Dessa forma, o acúmulo desses produtos no organismo, além de gerar complicações no quadro de diabetes, traz complicações à algumas doenças à ela relacionadas, como: artrite, aterosclerose, insuficiência renal crônica, Alzheimer, neuropatia e catarata ⁽¹⁰³⁾.

O potencial antiglicante dos extratos brutos de *B. parva*, *P. stromaticum* e da co-cultura dos endófitos foi verificado seguindo o procedimento descrito anteriormente, e os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 22, que mostra o percentual de inibição dos AGE's formados para cada extrato.

Tabela 22 – Percentuais de Inibição de AGE's dos extratos de *B. parva*, *P. stromaticum*, Co-cultura dos endófitos e do controle positivo (aminoguanidina), na concentração final de 150 µg. mL⁻¹.

Endófito	Extrato	Inibição de AGE's (%)	Desvio (%)
<i>B. parva</i>	Arroz	47,93	2,89
	Malte	51,49	0,68
	Nutrient	39,22	3,28
	PDB	52,42	1,26
	YM	54,02	2,56
<i>P. stromaticum</i>	Malte	79,99	1,79
Co-cultura	Malte	40,26	2,34
Aminoguanidina		95,69	0,17

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

Com os resultados, observa-se que para concentração testada, três dos cinco extratos de *B. parva* apresentaram inibição na produção de AGEs superior a 50%, indicando a produção de substâncias com potencial antiglicante mediano.

Ao observar os resultados para o endófito *P. stromaticum*, verifica-se que o extrato apresenta inibição de AGE's de aproximadamente 80% e devido a essa porcentagem de inibição alta, foi realizado o ensaio com as frações oriundas desse

extrato (Tabela 23), e verificou-se que as frações de menor polaridade apresentaram porcentagens de inibição superior a 70%, indicando a produção de substâncias com potencial antiglicante pelo endófito.

Tabela 23 – Valores de percentagem de Inibição de AGE's das frações do extrato de *P. stromaticum*, e do controle positivo (aminoguanidina), na concentração final de 150 mg. mL⁻¹.

Amostra	Inibição de AGE's (%)	Desvio (%)
Fr. 1	31,33	3,90
Fr. 2	59,67	2,73
Fr. 3	73,59	1,55
Fr. 4	73,14	3,34
Fr. 5	74,99	3,26
Fr. 6	72,84	1,95
Fr. 7	80,72	2,14
Aminoguanidina	95,12	0,18

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

Quando observamos o potencial antiglicante da co-cultura dos endófitos (Tabela 22, p. 91), verifica-se que esse extrato apresentou menor percentual de inibição de AGE's que as monoculturas, mostrando que ocorreu a interferência na produção de substâncias com potencial antiglicante, principalmente por parte do endófito *P. stromaticum*, indicando a ocorrência da inibição de sua produção metabólica na presença do endófito *B. parva*.

Dessa forma, considerando os resultados obtidos para os dois endófitos, e considerando que a espécie vegetal *Syzygium cumini* (L.) Skeels, a qual os endófitos estão associados, é utilizada na medicina tradicional brasileira no tratamento de diabetes, essa potencialidade da planta medicinal pode estar associada às substâncias produzidas pelos endófitos, principalmente por *P. stromaticum*.

6.4.5 Avaliação da atividade Antioxidante

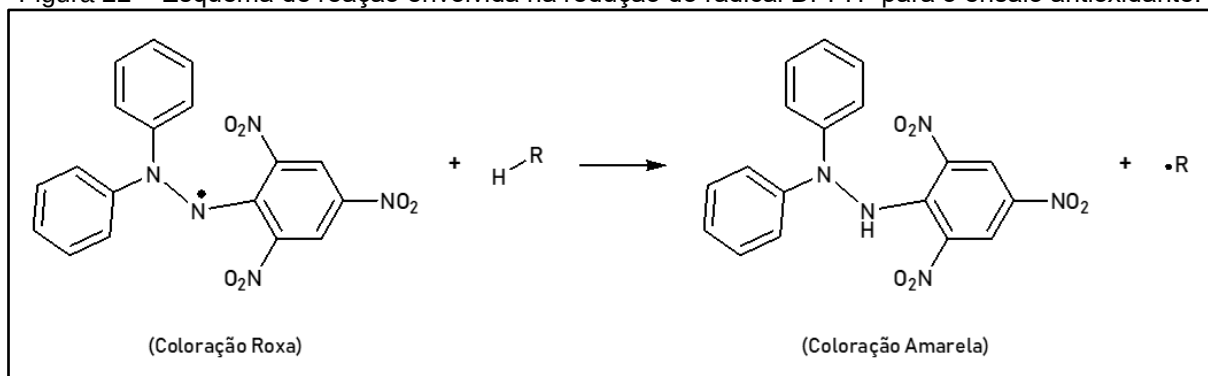
O desequilíbrio entre a produção de radicais livres e antioxidantes em nosso organismo têm sido associado à diversas doenças crônicas não transmissíveis e degenerativas, como por exemplo cânceres, doenças cardíacas, Alzheimer, aterosclerose e até o envelhecimento precoce ⁽¹¹⁷⁾. Por serem altamente reativos, os radicais livres são capazes de causar modificações estruturais em moléculas de DNA,

proteínas, carboidratos e/ou lipídios, levando o organismo à um estado de patológico ou à apoptose ⁽¹¹⁸⁾.

Diante disso, a utilização de compostos bioativos antioxidantes ⁽¹¹⁷⁾, tem-se mostrado uma boa alternativa na proteção do organismo contra os radicais livres, atuando na prevenção e no tratamento de enfermidades ⁽¹¹⁸⁾. Antioxidantes podem ser definidos como quaisquer substâncias que, presentes em baixas concentrações, quando comparados a um substrato oxidável, retardam ou inibem as reações de degradação oxidativa desse substrato de maneira eficaz ⁽¹¹⁹⁾.

Atualmente, diversas técnicas para detecção de atividade antioxidante de substâncias têm sido utilizadas e, dentre essas técnicas, a captura de radicais livres, como o DPPH•, é a estratégia mais simples e comum para esta avaliação. Este ensaio é baseado na mudança de coloração do radical livre DPPH• (roxo) para o radical reduzido (amarelo) na presença de substâncias antioxidantes (Figura 22).

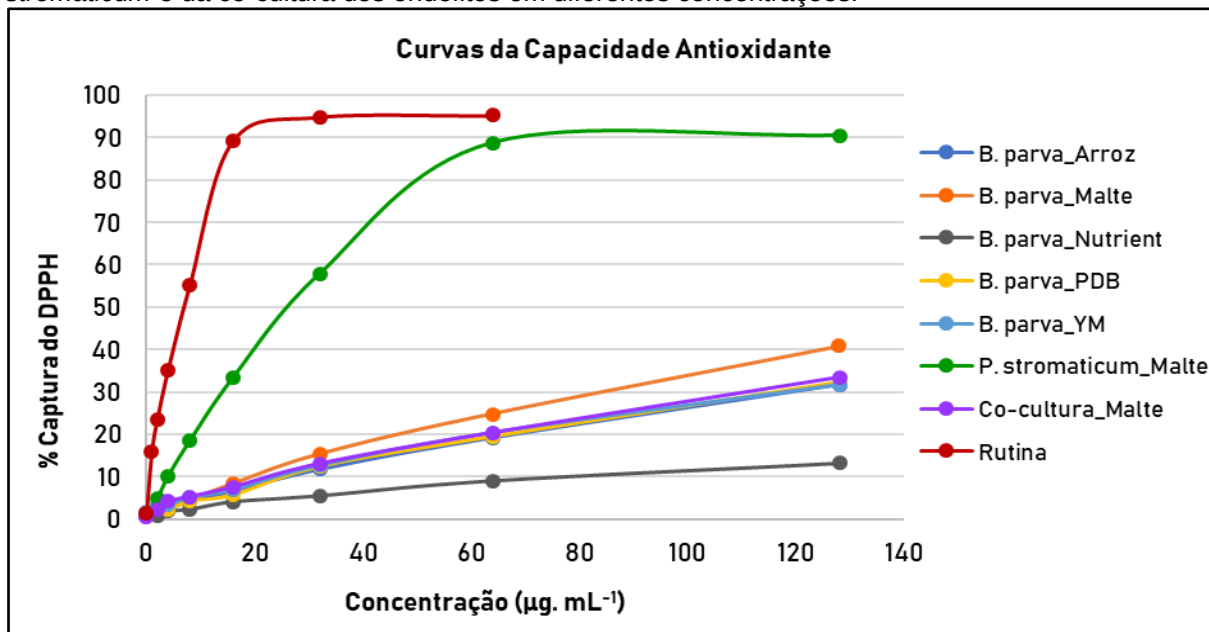
Figura 22 – Esquema de reação envolvida na redução do radical DPPH• para o ensaio antioxidante.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O potencial antioxidante dos extratos de *B. parva*, *P. stromaticum* e da co-cultura dos endófitos foi verificado seguindo o procedimento descrito anteriormente, e os resultados obtidos podem ser observados na Figura 23 (p. 94), que mostra as curvas de porcentagem de captura dos radicais livres DPPH• para cada extrato. Os valores de EC₅₀ (Tabela 24, p. 94) foram calculados a partir da regressão linear de cada curva, tendo em vista a faixa linear de cada curva, de cada extrato e do controle positivo.

Figura 23 - Efeito da captura dos radicais livres DPPH• dos extratos de *B. parva*, *P. stromaticum* e da co-cultura dos endófitos em diferentes concentrações.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Tabela 24 – Valores de EC₅₀ obtidos na avaliação antioxidante dos extratos de *B. parva*, *P. stromaticum* e da co-cultura dos endófitos.

Endófito	Extrato	EC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	Desvio (µg.mL ⁻¹)
<i>B. parva</i>	Arroz	198,73	3,78
	Malte	151,63	0,85
	Nutrient	496,55	6,14
	PDB	194,70	4,05
	YM	198,33	1,38
<i>P. stromaticum</i>	Malte	32,06	0,33
Co-cultura	Malte	188,00	2,52
Rutina		7,74	0,03

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

Pelos resultados apresentados, verifica-se que o extrato mais ativo de *B. parva* é o extrato obtido em meio de ext. de malte, no entanto, quando comparado ao controle positivo Rutina, pode-se aferir que este extrato apresenta um potencial ~20 vezes menor que o controle, indicando uma baixa atividade antioxidante.

O extrato de *P. stromaticum* apresentou uma atividade antioxidante boa, sendo aproximadamente 4,5 vezes mais ativo que o extrato de *B. parva*, em meio de ext. de malte. Devido à essa atividade antioxidante, o ensaio foi realizado para as frações oriundas deste extrato, e pelos resultados (Tabela 25, p. 95) verificou-se que para este caso, quanto menor a polaridade da fração maior o potencial antioxidante da mesma, sendo então, a Fr. 7 mais ativa.

Tabela 25 – Valores de EC₅₀ obtidos na avaliação antioxidante do extrato e frações de *P. stromaticum*.

Amostra	EC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	Desvio (µg.mL ⁻¹)
Fr. 1	145,60	1,43
Fr. 2	67,73	2,77
Fr. 3	41,65	4,15
Fr. 4	41,02	0,15
Fr. 5	27,88	0,44
Fr. 6	29,93	0,14
Fr. 7	16,33	1,07
Rutina	7,78	0,04

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

Levando em consideração os resultados obtidos desta análise e os resultados obtidos no ensaio antiglicante (Tabela 23, p. 92), é possível verificar a existência de uma correlação entre os potenciais apresentados em ambos os ensaios. Sabendo que um estresse oxidativo apresenta um papel importante no processo de glicação, a presença de substâncias com potencial antioxidante no extrato de *P. stromaticum* inibiria não somente a produção de radicais livres no organismo, como também, neste caso, inibe a produção dos AGE's, como pode ser observado pelas atividades obtidas para Fr. 7.

Quando comparamos as atividades dos extratos das monoculturas em ext. de malte e a co-cultura dos endófitos (Tabela 24, p. 94), verifica-se que o potencial antioxidante do extrato da cultura mista, é menor que o potencial antioxidante dos extratos das monoculturas. Este resultado indica a inibição da produção de substâncias potencialmente ativas pelos dois endófitos, principalmente pelo endófito *P. stromaticum*, mostrando a interferência de sua produção metabólica na presença do endófito *B. parva*. Este resultado é corroborado com o resultado do ensaio antiglicante (Tabela 22, p. 91), em que também verifica-se uma diminuição de atividade, confirmando a correlação de que a inibição da produção de substâncias capazes de impedir o estresse oxidativo influencia não somente no potencial antioxidante do extrato como também no potencial antiglicante do mesmo.

6.4.6 Avaliação da atividade Citotóxica

A neoplasia é o termo designado para uma proliferação anormal, autônoma e descontrolada de células de um determinado tecido corporal, comumente conhecida como tumor, podendo ser benigna ou maligna (cânceres). Essas proliferações

descontroladas podem deixar de ser em um tecido, ou local específico, e se propagar para outras partes do corpo produzindo novos tumores ⁽²⁴⁾.

Atualmente, existe um número limitado de tratamento de tumores, e esses tratamentos podem apresentar alguns efeitos colaterais no indivíduo doente, além de apresentar um alto custo associado, o que torna o tratamento particularmente desafiador. Além disso, muitos tratamentos não são eficazes, e certos tipos de tumores apresentam resistência aos medicamentos comumente utilizados, agravando a complexidade do tratamento ⁽²⁴⁾. Dentro deste contexto, os estudos com produtos naturais desempenham um papel importante na obtenção de substâncias com potencial citotóxico.

A atividade citotóxica de todos os extratos está apresentada na Tabela 26 com seus respectivos percentuais de inibição.

Tabela 26 – Percentual de inibição de crescimento celular (IC%), obtidos nas concentrações de 5 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, dos extratos frente à duas linhagens tumorais (MCF-7: adenocarcinoma de mama e HCT-116: carcinoma de cólon-retal).

Endófito	Meio de Cultivo	MCF-7				HCT-116			
		5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	
		IC (%)	EPM (%)	IC (%)	EPM (%)	IC (%)	EPM (%)	IC (%)	EPM (%)
<i>B. parva</i>	1	-18,67	7,80	8,48	13,56	13,82	6,69	59,16	5,20
	2	-7,86	9,84	2,19	3,41	4,63	9,06	33,68	3,79
	3	-49,46	8,13	-8,60	9,76	-9,16	11,38	45,06	1,68
	4	-13,14	2,18	-2,48	9,39	21,61	6,26	45,66	3,38
	5	-26,54	3,30	-5,56	3,19	5,57	6,24	35,67	8,14
<i>P. stromaticum</i>	2	-35,96	11,00	21,44	2,64	-25,11	12,85	33,75	14,89
Co-cultura	2	-14,04	7,81	-17,65	15,29	3,97	6,42	37,81	5,93

1 – Arroz; 2 – Ext. de malte; 3 – Nutrient; 4 – PDB e 5 – YM. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

Com os resultados obtidos, verificou-se que nenhum extrato pode ser considerado muito ativo, em ambas as concentrações para as duas linhagens testadas. No entanto, verificou-se que para as células de carcinoma de cólon-retal (HCT-116), os extratos de *B. parva* na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentaram porcentagem de inibição mediana, diferente do observado para a linhagem de adenocarcinoma de mama (MCF-7), indicando a produção de substâncias com potencial citotóxico seletivo para as células de carcinoma de cólon-retal.

Diferentemente do observado para os extratos de *B. parva*, o extrato de *P. stromaticum* em meio de ext. de malte apresentou, na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$,

uma baixa atividade para ambas as linhagens testadas. Já para o extrato da co-cultura dos endófitos em meio de ext. de malte, na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, verifica-se que o potencial de inibição para a linhagem HCT-116 é semelhante aos potenciais das monoculturas para a mesma linhagem, no entanto, é possível observar uma grande diminuição do potencial citotóxico para a linhagem MCF-7 quando comparado com o percentual de inibição da monocultura de *P. stromaticum*. Este resultado, mostra a interferência no metabolismo de *P. stromaticum* na produção de substâncias com potencial citotóxico para a linhagem MCF-7.

7 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS

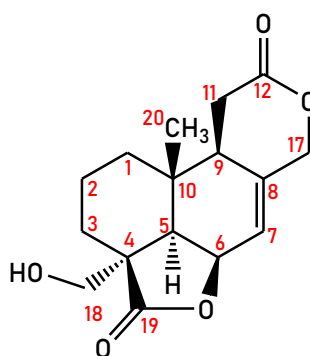
Neste item estão compreendidos os dados espectrométricos que auxiliaram a determinação estrutural ou identificação das substâncias isoladas.

A determinação das substâncias produzidas pelos endófitos *B. parva* e *P. stromaticum* serão apresentadas não na sequência em que foram obtidas, ou do meio de cultivo onde foram produzidas, mas sim por classe e por similaridade estrutural.

7.1 Substância 07

A substância 07 (Fr. 01_10 do extrato de *B. parva* em meio de arroz; Figura 24) foi obtida como um sólido amorfo branco, e sua fórmula molecular, $C_{16}H_{20}O_6$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D.

Figura 24 – Representação estrutural da substância 07.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

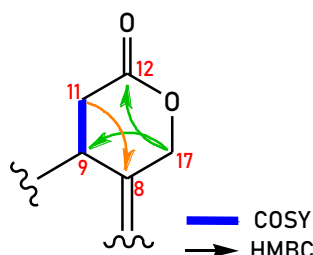
O espectro de RMN de ^{13}C (Apêndice 16, p. 208) e o mapa de contorno HMBC (Apêndice 19, p. 210) evidenciaram 16 átomos de carbono, sendo: dois carboxílicos (δ_C 183,1 e 176,0); dois quaternários (δ_C 34,0 e 49,6); dois carbonos sp^2 (δ_C 120,7 e 138,4); três carbonos carbinólicos (δ_C 67,5; 71,2 e 75,3); dois carbonos metínicos sp^3 (δ_C 45,6 e 48,2); quatro carbonos metilênicos (δ_C 18,6; 24,1; 29,9 e 32,5), e um carbono metílico (δ_C 18,4).

O espectro de RMN de 1H (Apêndice 15, p. 208) apresentou um sinal intenso em δ_H 0,85 (s, δ_C 18,4; 3H, H-20), característico de metila. Observou-se também, um sinal em δ_H 6,10 (s, δ_C 120,7; 1H, H-7), atribuído a um hidrogênio vinílico; e sinais em

δ_H 4,81 (*d*, δ_C 71,2; $J = 12,1$ Hz; 1H, H-17') e δ_H 4,88 (*d*, δ_C 71,2; $J = 12,1$ Hz; 1H, H-17'') atribuídos a dois hidrogênios carbinólicos diastereotópicos. Adicionalmente, foram observados sinais em δ_H 2,55 (*d*, δ_C 29,9; $J = 8,7$ Hz; 1H, H-11') e 2,72 (*dd*, δ_C 29,9; $J = 13,1$ e 4,7 Hz; 1H, H-11''), atribuídos à hidrogênios metilênicos α a carbonila, e um sinal em 2,53 (*s*l, δ_C 45,6; 1H, H-9), característico de hidrogênio metínico de junção de anel.

Estas últimas observações, juntamente com as correlações observadas no mapa de contorno de HMBC (Apêndice 19, p. 210) entre os hidrogênios H-17 com os carbonos C-9/C-12, e dos hidrogênios H-11 com o carbono C-8, nos permitiu propor uma unidade δ lactona (Figura 25).

Figura 25 – Estrutura parcial A da substância **07**.

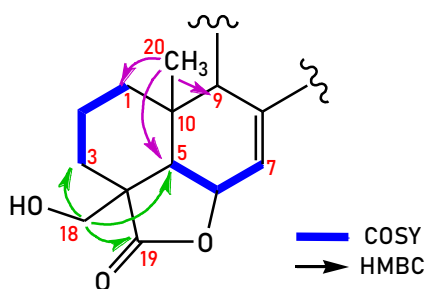


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Adicionalmente, foram observados sinais em δ_H 5,19 (*ddd*, δ_C 75,3; $J = 5,4$; 3,4 e 1,6 Hz; 1H, H-6); δ_H 3,71 (*d*, δ_C 67,5; $J = 11,1$ Hz; 1H, H-18') e δ_H 3,66 (*d*, δ_C 67,5; $J = 11,1$ Hz; 1H, H-18''), característicos de hidrogênios carbinólicos; e o sinal em δ_H 2,26 (*d*, δ_C 48,2; $J = 5,4$ Hz; 1H, H-5), foi atribuído ao segundo hidrogênio de junção de anel. A visualização dos multipletos em 1,64 e 1,74; 1,94 e 1,62; 1,63 e 1,33 ppm, correlacionados pelo mapa de contorno COSY (Apêndice 17, p. 209) evidenciaram uma unidade $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$. Os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos pela análise do mapa de contorno do experimento de HSQC (Apêndice 18, p. 209).

Também foram observadas, no mapa de contorno de COSY, as correlações spin-spin entre os hidrogênios $\text{H-5} \leftrightarrow \text{H-6} \leftrightarrow \text{H-7}$, e pelo mapa de contorno HMBC foram observadas as correlações entre $\text{H-18} \leftrightarrow \text{C-3/C-5/C-19}$ e $\text{H-20} \leftrightarrow \text{C-1/C-5/C-9}$. A observação destas correlações foram importantes nos permitindo visualizar a estrutura parcial B (Figura 26, p. 100).

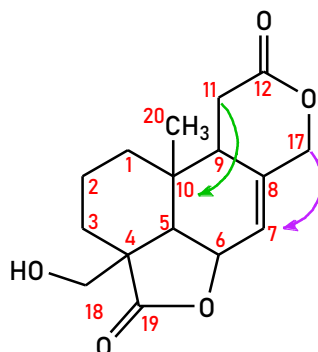
Figura 26 – Estrutura parcial B da substância **07**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

As estruturas parciais A e B foram conectadas pelas correlações observadas no mapa de contorno de HMBC entre H-17 com C-7 e de H-11 com C-10 (Figura 27).

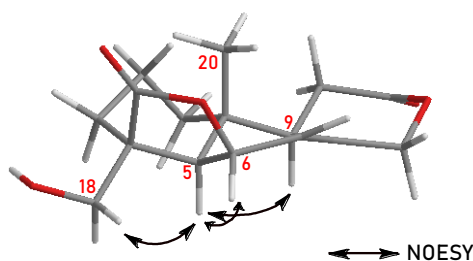
Figura 27 – Conexão das estruturas parciais A e B da substância **07** pelas correlações entre H17↔C-7 e H-11↔C-10.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A configuração relativa de **07** foi determinada pelo experimento de NOESY 1D (Apêndice 20, p. 210), onde foi possível observar a correlação de H-5 com H-6/H-9/H-18, indicando que estes hidrogênios se encontram na mesma face do anel. A ausência da correlação entre H-20 com os hidrogênios H-18, H-5 e H-6 sugere que H₃C-20 apresenta outra orientação (Figura 28).

Figura 28 – Correlações observadas no espectro de NOESY 1D de **07**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O levantamento bibliográfico, realizado na *Web of Science* e *SciFinder*, não trouxe resultados, indicando tratar-se de uma substância inédita, a qual foi identificada como *rel.* (4*S*, 5*R*, 6*R*, 9*R*, 10*R*)-18-hidroxi-13,14,15,16-tetranorlabd-7(8)-eno-19,6 β :12,17-diolídeo, e nomeada botryosphaerina J, um diterpeno das classes dos tetranorlabdanos. Este nome foi atribuído seguindo o critério adotado para outras substâncias da mesma série, nomeadas como botryosphaerinas A-I.

Tabela 27 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **07**, em CD_3OD e 14,1T.

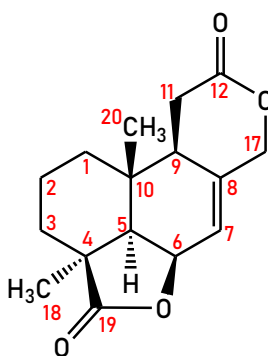
Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult., J (Hz)	HMBC
01	32,5	1,33 1,63	<i>m</i> <i>m</i>	C-2/C-5/C-10/C-20
02	18,6	1,64 1,74	<i>m</i> <i>m</i>	C-1/C-3/C-4/C-10
03	24,1	1,62 1,94	<i>m</i> <i>m</i>	C-1/C-2/C-4/C-5/C-18
04	49,6	-----	-----	-----
05	48,2	2,26	<i>d</i> (5,4)	C-4/C-9/C-10/C-18/C-19/C-20
06	75,3	5,19	<i>ddd</i> (5,4; 3,4 e 1,6)	-----
07	120,7	6,10	<i>m</i>	C-9/C-17
08	138,4	-----	-----	-----
09	45,6	2,53	<i>sl</i>	C-12
10	34,0	-----	-----	-----
11	29,9	2,55 2,72	<i>d</i> (8,7) <i>dd</i> (13,1 e 4,7)	C-8/C-10/C-12
12	176,0	-----	-----	-----
17	71,2	4,81 4,88	<i>dd</i> (13,7 e 1,3) <i>d</i> (13,7)	C-7/C-8/C-9/C-12
18	67,5	3,66 3,71	<i>d</i> (11,1) <i>d</i> (11,1)	C-3/C-5/C-19
19	183,1	-----	-----	-----
20	18,4	0,85	<i>s</i>	C-1/C5/C-9/C-10

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.2 Substância 14

A substância 14 (Fr. 02_8 do extrato de *B. parva* em meio de arroz, Fr. 03_5 do extrato de *B. parva* em meio de ext. de malte; Figura 29) foi obtida como um óleo amarelado, e sua fórmula molecular, $C_{16}H_{20}O_4$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados apresentados na literatura ⁽¹²⁰⁾.

Figura 29 – Representação estrutural da substância 14.

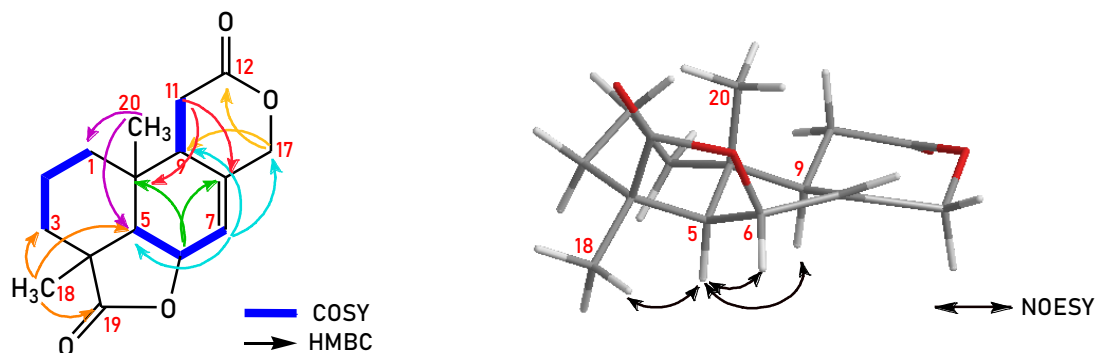


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O espectro de RMN de 1H (Apêndice 21, p. 211) apresentou um perfil espectroscópico similar à substância 07, tratando-se de outro derivado tetranorlabdânico, em que a diferença estrutural entre 07 e 14 se encontra na ausência dos hidrogênios metilênicos carbinólicos em C-18 em 07 e na presença de uma segunda metila em 14.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 24, p. 212). Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 30, p. 103; Apêndice 23 e Apêndice 25, p. 212 e 213) nos permitiu visualizar a estrutura de 14. Assim como para 07, a configuração relativa de 14 foi determinada pelo experimento de NOESY 1D (Apêndice 26, p. 213), onde foi possível observar a correlação de H-5 com H-6/H-9/H-18, indicando que estes hidrogênios se encontram na mesma face do anel. A ausência da correlação entre H-20 com os hidrogênios H-18, H-5 e H-6 sugere que H_3C-20 apresenta outra orientação (Figura 30, p. 103).

Figura 30 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC, e do espectro de NOESY 1D de **14**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A comparação com os dados da literatura ⁽¹²⁰⁾ (Tabela 28) permitiram identificar a substância **14** como *rel.* (4*S*, 5*R*, 6*R*, 9*R*, 10*R*)-13,14,15,16-tetranorlabd-7(8)-eno-19,6 β :12,17-diolídeo, também obtida dos endófitos *Aspergillus terreus* ⁽¹²¹⁾ e *Botryosphaeria* sp. ⁽¹²²⁾, e estudos biológicos mostraram que esta possui atividade citotóxica contra células MCF-7 (adenocarcinoma de mama) ⁽¹²²⁾.

Tabela 28 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁽¹²⁰⁾, da substância 13,14,15,16-tetranorlabd-7-eno-19,6 β :12,17-diolídeo (**14**).

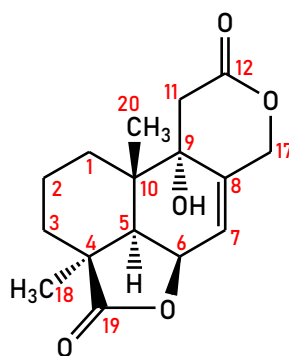
Posição	Experimental*			Literatura**		
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult., J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult., J (Hz)
01	33,0	1,35	<i>m</i>	32,3	1,05-1,22	<i>m</i>
		1,60	<i>m</i>			
02	18,6	1,62	<i>m</i>	17,6	1,45-1,49	<i>m</i>
		1,74	<i>m</i>		1,44-1,57	<i>m</i>
03	29,0	1,51	<i>m</i>	27,8	1,81-1,88	<i>m</i>
		2,07	<i>m</i>		2,18-2,22	<i>m</i>
04	43,9	----	----	42,5	----	----
05	51,7	2,01	<i>d</i> (5,2)	51,2	1,82	<i>dd</i> (5,1)
06	74,5	5,08	<i>ddd</i> (5,2; 3,6 e 1,8)	72,2	4,93	<i>m</i>
07	120,5	6,11	<i>m</i>	119,2	6,03	<i>m</i>
08	140,3	----	----	138,4	----	----
09	45,7	2,48	<i>m</i>	44,9	2,61	<i>m</i>
10	34,7	----	----	33,6	----	----
11	29,9	2,52	<i>m</i>	29,2	2,43	<i>m</i>
		2,70	<i>dd</i> (14,7 e 6,3)		2,31	<i>m</i>
12	175,9	----	----	172,4	----	----
17	71,2	4,80	<i>m</i>	69,9	4,72	<i>dd</i> (14,2 e 1,2)
		4,87	<i>m</i>		4,80	<i>d</i> (14,2)
18	24,3	1,33	<i>s</i>	24,2	1,32	<i>s</i>
19	184,3	----	----	181,3	----	----
20	18,0	0,81	<i>s</i>	17,5	0,85	<i>s</i>

*em CD₃OD, 150 e 600 MHz. **em CDCl₃, 75 e 300 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.3 Substância 29

A substância 29 (Fr. 02_7 do extrato de *B. parva* em meio de ext. de malte; Figura 31) foi obtida como um sólido cristalino incolor, e sua fórmula molecular, $C_{16}H_{20}O_5$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados apresentados na literatura ⁽¹²²⁾.

Figura 31 – Representação estrutural da substância 29.

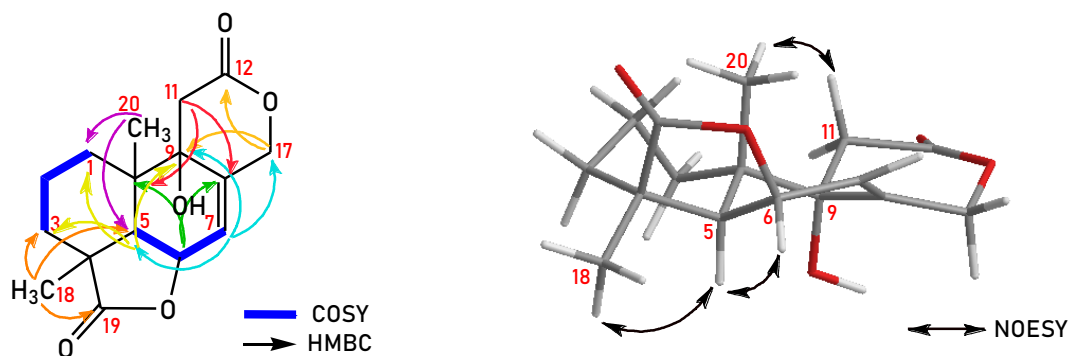


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O espectro de RMN de 1H (Apêndice 27, p. 214) apresentou um perfil espectroscópico similar à substância 14, tratando-se de outro derivado tetranorlabdânico, em que a diferença estrutural entre 14 e 29 se encontra na ausência de um hidrogênio metínico de junção de anel em C-9 em 14 e na presença de um carbono quaternário carbinólico em 29.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 30, p. 215). Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 32, p. 105; Apêndice 29 e Apêndice 31, p. 215 e 216) nos permitiu visualizar a estrutura de 29. Assim como para as substâncias anteriores, a configuração relativa de 29 foi determinada pelo experimento de NOESY 1D (Apêndice 32, p. 216), onde foi possível observar a correlação de H-5 com H-6/H-18, indicando que estes hidrogênios se encontram na mesma face do anel. A ausência da correlação entre H-20 com estes hidrogênios sugere que H_3C-20 apresenta outra orientação, e a correlação de H_3C-20 com H-11" indica que a hidroxila em C-9 se encontra na mesma face do anel que $H_3C-18/H-5/H-6$ (Figura 32, p. 105).

Figura 32 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC, e do espectro de NOESY 1D de **29**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A comparação com os dados da literatura ⁽¹²²⁾ (Tabela 29) permitiram identificar a substância **29** como *rel.* (4*S*, 5*R*, 6*R*, 9*S*, 10*S*)-13,14,15,16-tetranorlabd-7(8)-eno-19,6 β :12,17-diolídeo, nomeada botryosphaerina A, obtida também do endófito *Botryosphaeria* sp. ⁽¹²²⁾.

Tabela 29 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁽¹²²⁾ da substância botryosphaerina A (**29**).

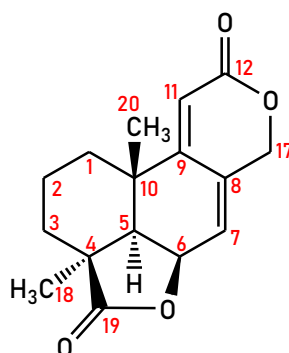
Posição	Experimental*			Literatura**		
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult., J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult., J (Hz)
01	27,1	1,29	<i>m</i>	26,5	1,21-1,25	<i>m</i>
		1,85	<i>m</i>		2,09-2,11	<i>m</i>
02	18,9	1,60	<i>m</i>	18,2	1,50-1,53	<i>m</i>
		1,75	<i>m</i>		1,60-1,64	<i>m</i>
03	29,0	1,50	<i>m</i>	28,3	1,44-1,49	<i>m</i>
		2,06	<i>m</i>		2,18-2,22	<i>m</i>
04	44,0	----	----	42,8	----	----
05	44,6	2,54	<i>d</i> (5,1)	43,8	2,90	<i>d</i> (5,1)
06	74,0	5,04	<i>m</i>	72,5	5,01-5,02	<i>m</i>
07	121,0	6,09	<i>m</i>	119,3	6,05	<i>sl</i>
08	140,8	----	----	140,9	----	----
09	73,4	----	----	72,6	----	----
10	39,0	----	----	38,2	----	----
11	38,2	2,62	<i>d</i> (15,2)	38,0	3,01	<i>sl</i>
		2,85	<i>d</i> (15,2)			
12	174,5	----	----	171,8	----	----
17	70,1	4,99	<i>dd</i> (14,7 e 1,1)	69,2	5,04	<i>s</i>
		4,94	<i>d</i> (14,7)			
18	24,6	1,35	<i>s</i>	24,3	1,28	<i>s</i>
19	184,8	----	----	182,2	----	----
20	22,6	0,89	<i>s</i>	22,1	1,03	<i>s</i>

*em CD₃OD, 150 e 600 MHz. **em C₅D₅N, 100 e 400 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.4 Substância 33

A substância 33 (Fr. 03_6 do extrato de *B. parva* em meio de ext. de malte; Figura 33) foi obtida como um sólido cristalino incolor, e sua fórmula molecular, $C_{16}H_{18}O_4$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados apresentados na literatura ⁽¹²³⁾.

Figura 33 – Representação estrutural da substância 33.

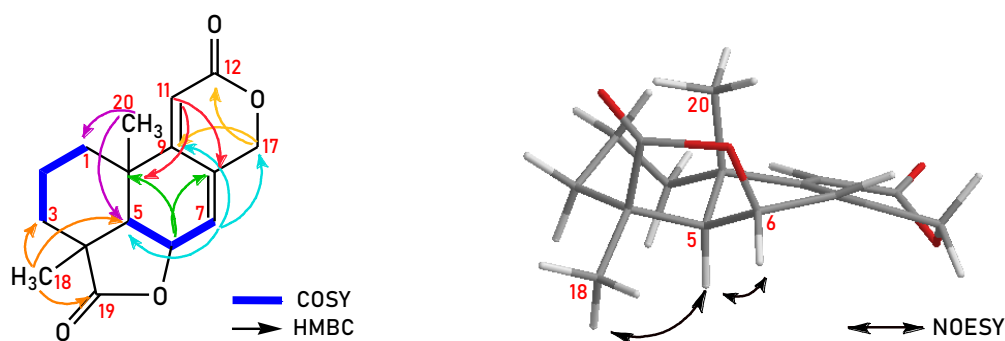


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O espectro de RMN de 1H (Apêndice 33, p. 217) apresentou um perfil espectroscópico similar à substância 29, tratando-se de outro derivado tetranorlabdânico, em que a diferença estrutural entre 29 e 33 se encontra na ausência do carbono quaternário carbinólico em C-9 em 29 e na presença de dois carbonos sp^2 em 33. Estas observações, associadas à blindagem sofrida no carbono da carbonila em C-12, que passou de δ_c 174,5 para 166,4, evidencia a perda de água, sugerindo que a carbonila em C-12 passou a ser conjugada com uma insaturação.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 36, p. 218). Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 34, p. 107; Apêndice 35 e Apêndice 37, p. 218 e 219) nos permitiu visualizar a estrutura de 33. Assim como para as substâncias anteriores, a configuração relativa de 33 foi determinada pelo experimento de NOESY 1D (Apêndice 38, p. 219), onde foi possível observar a correlação de H-5 com H-6/H-18, indicando que estes hidrogênios se encontram na mesma face do anel. A ausência da correlação entre H-20 com estes hidrogênios sugere que H₃C-20 apresenta orientação trans a H-6/H-18 e H-5 (Figura 34, p. 107).

Figura 34 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC, e do espectro de NOESY 1D de **33**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A comparação com os dados da literatura ⁽¹²³⁾ (Tabela 30) permitiram identificar a substância **33** como *rel.* (4*S*, 5*R*, 6*R*, 10*S*)-13,14,15,16-tetranorlabd-7(8),9(11)-dieno-19,6 β :12,17-diolídeo, nomeada CJ-14445, distribuída em uma variedades de fungos, tais como: *Sclerotinia homoeocarpa* ⁽¹²⁴⁾, *Penicilium* sp. e *Botryosphaeria* sp. ⁽¹²²⁾. Estudos biológicos mostraram que esta possui atividade antileveduriforme ⁽¹²⁵⁾, antifúngica ⁽¹²²⁾, citotóxica e fitotóxica ⁽¹²⁴⁾.

Tabela 30 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁽¹²³⁾, da substância CJ-14445 (**33**).

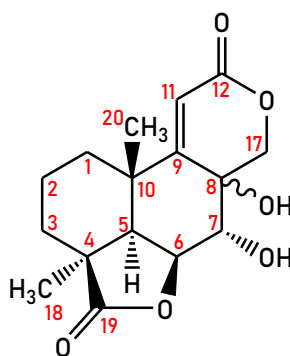
Posição	Experimental*			Literatura**		
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult., J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult., J (Hz)
01	30,5	1,70	<i>m</i>	29,6	1,67	<i>m</i>
		1,77	<i>m</i>		1,74	<i>m</i>
02	18,4	1,73	<i>m</i>	17,3	1,70	<i>m</i>
		1,84	<i>m</i>		1,87	<i>m</i>
03	28,9	1,55	<i>m</i>	27,7	1,56	<i>m</i>
		2,20	<i>m</i>		2,27	<i>m</i>
04	44,3	----	----	42,8	----	----
05	48,7	2,10	<i>d</i> (4,7)	47,9	1,94	<i>d</i> (5,0)
06	73,3	5,18	<i>td</i> (4,7 e 1,5)	71,3	5,04	<i>m</i>
07	123,4	6,32	<i>m</i>	121,8	6,22	<i>m</i>
08	133,6	----	----	132,3	----	----
09	161,2	----	----	158,7	----	----
10	36,2	----	----	35,0	----	----
11	112,2	5,78	<i>d</i> (1,7)	111,8	5,78	<i>d</i> (2,0)
12	166,4	----	----	163,6	----	----
17	70,9	4,97	<i>d</i> (13,6)	69,6	4,89	<i>d</i> (14,0)
		5,04	<i>dt</i> (13,6 e 1,9)		4,99	<i>m</i>
18	24,3	1,33	<i>s</i>	24,1	1,35	<i>s</i>
19	183,7	----	----	180,9	----	----
20	25,2	1,17	<i>s</i>	24,7	1,19	<i>s</i>

* em CD₃OD, 150 e 600 MHz.** em CDCl₃, 125 e 500 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.5 Substância 09

A substância 09 (Fr. 01_11 do extrato de *B. parva* em meio de arroz, e Fr. 02_5 do extrato de *B. parva* em meio de ext. de malte; Figura 35) foi obtida como um óleo amarelado, e sua fórmula molecular, $C_{16}H_{20}O_6$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D.

Figura 35 – Representação estrutural da substância 09.



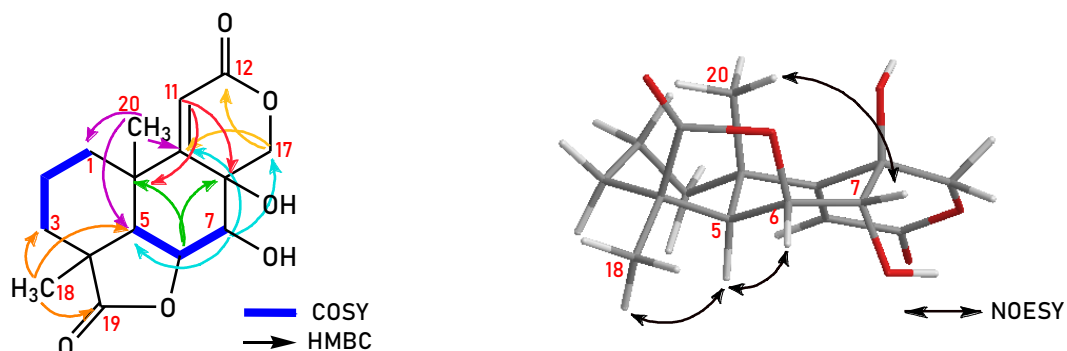
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O espectro de RMN de 1H (Apêndice 39, p. 220) apresentou um perfil espectroscópico similar à substância 33, tratando-se de outro derivado tetranorlabdânico, em que as diferenças estruturais entre 09 e 33 se encontram na ausência de dois carbonos sp^2 em C-7/C-8 em 33 e na presença de dois carbonos carbinólicos sp^3 em C-7/C-8 em 09.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 42, p. 221). Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 36, p. 109; Apêndice 41 e Apêndice 43, p. 221 e 222) nos permitiu visualizar a estrutura de 09. A configuração relativa de 09 foi determinada pelo experimento de NOESY 1D (Apêndice 44, p. 222), onde foi possível observar a correlação de H-5 com H-6/H-18, indicando que estes hidrogênios se encontram na mesma face do anel.

A ausência da correlação entre H-20 com estes hidrogênios sugere que H_3C -20 apresenta outra orientação (Figura 36, p. 109). Também foi observado a correlação de H_3C -20 com H-7, indicando que a hidroxila em C-7 se encontra na mesma face do anel que H_3C -18/H-5/H-6.

Figura 36 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC, e do espectro de NOESY 1D de **09**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O levantamento bibliográfico, realizado na *Web of Science* e *SciFinder*, não trouxe resultados, indicando tratar-se de uma substância inédita, a qual foi identificada como *rel.* (4*S*, 5*R*, 6*S*, 7*R*, 8, 10*S*)-7,8-dihidroxi-13,14,15,16-tetranorlabd-9(11)-eno-19,6 β :12,17-diolídeo, e nomeada botryosphaerina K, este nome foi atribuído seguindo o critério adotado para outras substâncias da mesma série, nomeadas como botryosphaerinas A-I.

Tabela 30 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **09**, em CD_3OD e 14,1T.

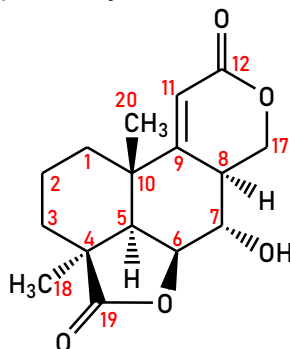
Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult., J (Hz)	HMBC
01	34,3	1,93 1,58	<i>m</i> <i>m</i>	C-2/C-5/C-10/C-20
02	18,1	1,78 1,67	<i>m</i> <i>m</i>	C-1/C-3/C-4/C-10
03	28,1	2,12 1,50	<i>m</i> <i>m</i>	C-1/C-2/C-4/C-5/C-18
04	42,4	-----	-----	-----
05	47,6	2,53	<i>d</i> (5,5)	C-4/C-10/C-18/C-19/C-20
06	84,3	4,82	<i>t</i> (5,5)	C-7/C-10
07	71,9	4,21	<i>d</i> (5,5)	C-6/C-17
08	68,3	-----	-----	-----
09	166,4	-----	-----	-----
10	35,9	-----	-----	-----
11	115,3	5,87	<i>s</i>	C-8/C-9/C-10/C-12/C-20
12	168,2	-----	-----	-----
17	76,0	4,58 4,36	<i>d</i> (12,1) <i>d</i> (12,1)	C-8/C-9/C-12
18	24,6	1,34	<i>s</i>	C-3/C-4/C-5/C-19
19	183,9	-----	-----	-----
20	27,6	1,16	<i>s</i>	C-1/C5//C-9/C-10

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.6 Substância 12

A substância 12 (Fr. 02_5 do extrato de *B. parva* em meio arroz; Figura 37) foi identificada em mistura, e sua fórmula molecular $C_{16}H_{20}O_5$ foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados apresentados na literatura ⁽¹²¹⁾.

Figura 37 – Representação estrutural da substância 12.

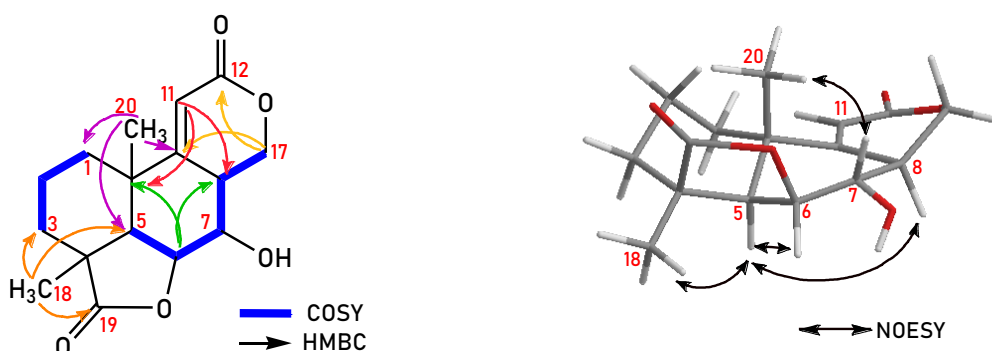


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O espectro de RMN de 1H (Apêndice 45, p. 223) apresentou um perfil espectroscópico similar à substância 09, tratando-se de outro derivado tetranorlabdânico, em que as diferenças estruturais entre 09 e 12 se encontram na ausência de um carbono carbinólico em C-8 em 09 e na presença de um carbono metínico sp^3 em C-8 em 12.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 48, p. 224). Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 38; Apêndice 47 e Apêndice 49, p. 224 e 225) nos permitiu visualizar a estrutura de 12.

Figura 38 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC, e do espectro de NOESY 1D de 12.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Assim como para as substâncias anteriores, a configuração relativa de **12** foi determinada pelo experimento de NOESY 1D (Apêndice 50, p. 225), onde foi possível observar a correlação de H-5 com H-6/H-8/H-18, indicando que estes hidrogênios se encontram na mesma face do anel. A ausência da correlação entre H-20 com estes hidrogênios sugere que H₃C-20 apresenta outra orientação (Figura 38, p. 110). Também foi observado a correlação de H₃C-20 com H-7, indicando que a hidroxila em C-7 se encontra na mesma face do anel que H₃C-18/H-5/H-6/H-8.

A comparação com os dados da literatura ⁽¹²¹⁾ (Tabela 31) permitiram identificar a substância **12** como *rel.* (4*S*, 5*R*, 6*S*, 7*S*, 8*S*, 10*S*)-7-hidroxi-13,14,15,16-tetranorlabd-9(11)-eno-19,6 β :12,17-diolídeo, nomeada botryosphaerina F, obtida também de *Aspergillus terreus*, e estudos biológicos mostraram que esta substância possui atividade citotóxica contra células MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e HL-60 (leucemia promielótica humana) ⁽¹²¹⁾.

Tabela 31 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁽¹²¹⁾, da substância botryosphaerina F (**12**).

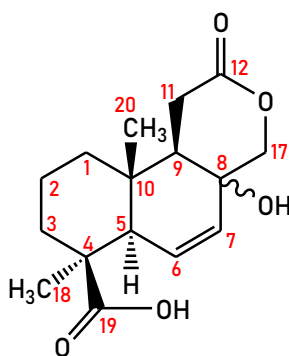
Posição	Experimental*			Literatura**		
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult., J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult., J (Hz)
01	34,2	1,52	<i>m</i>	34,2	1,53	<i>m</i>
		1,89	<i>m</i>		1,90	<i>m</i>
02	18,5	1,63	<i>m</i>	18,4	1,67	<i>m</i>
		1,72	<i>m</i>		1,73	<i>m</i>
03	29,0	1,47	<i>m</i>	28,9	1,50	<i>m</i>
		2,12	<i>m</i>		2,15	<i>m</i>
04	43,3	----	----	43,3	----	----
05	48,3	2,25	<i>d</i> (5,4)	48,0	2,27	<i>d</i> (5,4)
06	85,4	4,78	<i>t</i> (5,4)	85,3	4,79	<i>dd</i> (5,4 e 5,4)
07	69,8	4,18	<i>dd</i> (11,8 e 5,4)	69,3	4,18	<i>dd</i> (11,4 e 5,4)
08	38,7	2,91	<i>m</i>	38,6	2,93	<i>m</i>
09	167,3	----	----	167,2	----	----
10	37,2	----	----	37,1	----	----
11	113,1	5,82	<i>d</i> (2,7)	113,1	5,83	<i>d</i> (2,7)
12	171,2	----	----	171,1	----	----
17	71,2	4,15	<i>dd</i> (12,9 e 10,8)	71,2	4,15	<i>dd</i> (12,8 e 10,8)
		4,65	<i>dd</i> (10,8 e 5,4)		4,65	<i>dd</i> (10,8 e 5,4)
18	25,0	1,32	<i>s</i>	24,9	1,33	<i>s</i>
19	183,9	----	----	183,7	----	----
20	26,6	1,10	<i>s</i>	26,6	1,12	<i>s</i>

* em CD₃OD, 150 e 600 MHz. ** em CDCl₃, 100 e 400 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.7 Substância 31

A substância 31 (Fr. 02_11 do extrato de *B. parva* em meio ext. de malte; Figura 39) foi identificada em mistura, e sua fórmula molecular $C_{16}H_{22}O_5$ foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados apresentados na literatura ⁽¹²⁶⁾.

Figura 39 – Representação estrutural da substância 31.



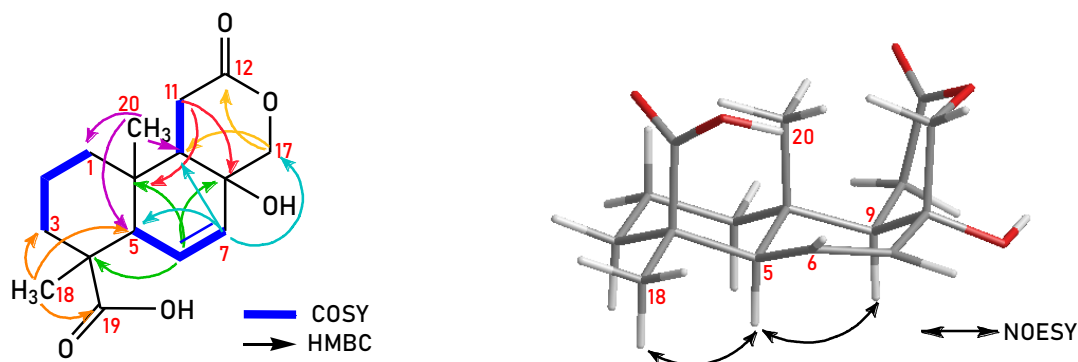
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O espectro de RMN de 1H (Apêndice 51, p. 226) apresentou um perfil espectroscópico similar à substância 12, tratando-se de outro derivado tetranorlabdânico, em que a principal diferença observada entre 12 e 31 se encontra na ausência de dois carbonos metínicos carbinólicos em 12, e na presença de dois carbonos metínicos sp^2 em 31.

Esta observação, evidencia a abertura da γ lactona em C-6 e a isomerização da ligação dupla de $\Delta^{9,11}$ para $\Delta^{6,7}$. A isomerização da ligação dupla é verificada pela presença em 31 de hidrogênios metilênicos α a carbonila em C-11.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 54, p. 227). Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 40, p. 113; Apêndice 53 e Apêndice 55, p. 227 e 228) nos permitiu visualizar a estrutura de 31. A configuração relativa de 31 foi determinada pelo experimento de NOESY 1D (Apêndice 56, p. 228), em que foi possível observar a interação/correlação entre H-5/H-9/H-18, colocando-os no mesmo plano do anel. A ausência da correlação entre H-20 com estes hidrogênios sugere que H_3C -20 apresenta outra orientação (Figura 40, p. 113).

Figura 40 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC, e do espectro de NOESY 1D de **31**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A comparação dos dados com os dados apresentados na literatura ⁽¹²⁶⁾ (Tabela 32) nos permitiu identificar **31** como *rel.* ácido (4*S*, 5*R*, 8, 9*R*, 10*S*)-8-hidroxi-13,14,15,16-tetranorlabd-6(7)-eno-12,17-olideo-19-óico, nomeada oidiolactona E, obtida também dos endófitos *Oidioedron truncata* ⁽¹²⁶⁾ e *Sclerotinia homoeocarpa* ⁽¹²⁴⁾, e estudos biológicos mostraram que esta possui atividade citotóxica e fitotóxica ⁽¹²⁴⁾.

Tabela 32 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁽¹²⁶⁾, da substância oidiolactona E (**31**).

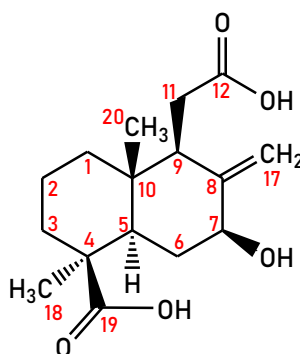
Posição	Experimental*			Literatura**		
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult., J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult., J (Hz)
01	38,6	1,75	<i>m</i>	37,7	1,05-1,22	<i>m</i>
02	20,0	1,10	<i>m</i>	19,2	1,45-1,49	<i>m</i>
03	38,3	1,52	<i>m</i>	37,5	1,44-1,57	<i>m</i>
04	44,0	1,85	<i>m</i>	42,9	1,81-1,88	<i>m</i>
05	52,7	2,23	<i>m</i>	51,7	2,18-2,22	<i>m</i>
06	136,0	----	----	134,4	----	----
07	122,7	1,96	<i>dd</i> (1,7 e 3,0)	122,7	2,04	<i>dd</i> (1,7 e 3,0)
08	86,4	6,66	<i>dd</i> (10,4 e 3,0)	84,2	6,65	<i>dd</i> (3,0 e 10,4)
09	50,8	5,71	<i>dd</i> (10,4 e 1,7)	49,7	5,73	<i>dd</i> (1,7 e 10,4)
10	37,3	----	----	36,5	----	----
11	32,8	84,2	<i>d</i> (9,5)	31,7	2,35	<i>d</i> (17,8)
12	179,9	49,7	<i>dd</i> (18,2 e 9,5)	176,4	2,95	<i>dd</i> (9,1 e 17,8)
17	69,5	36,5	----	69,0	----	----
18	28,6	2,25	<i>d</i> (11,8)	28,0	3,46	<i>d</i> (11,4)
19	180,5	3,60	<i>d</i> (11,8)	177,9	3,66	<i>d</i> (11,4)
20	12,7	1,29	<i>s</i>	12,1	1,30	<i>s</i>
		0,73	<i>s</i>		0,76	<i>s</i>

*em CD₃OD, 150 e 600 MHz. **em CDCl₃. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.8 Substância 30

A substância 30 (Fr. 02_10 do extrato de *B. parva* em meio de ext. de malte; Figura 41) foi obtida como um óleo amarelado, e sua fórmula molecular $C_{16}H_{24}O_5$ foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados apresentados na literatura ⁽¹²²⁾.

Figura 41 – Representação estrutural da substância 30.

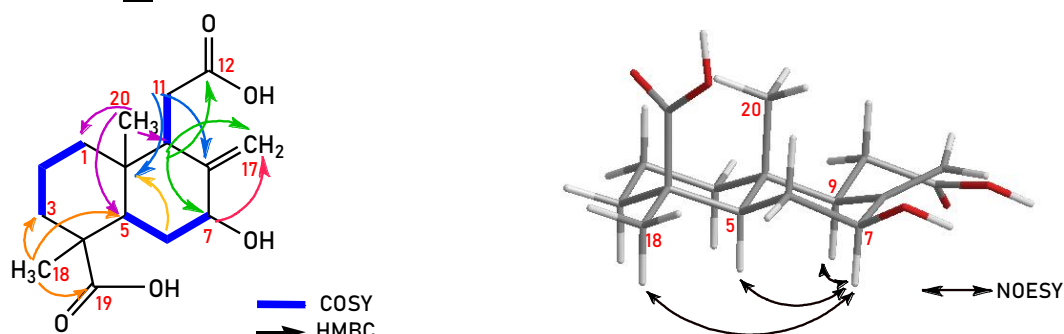


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O espectro de RMN de 1H (Apêndice 57, p. 229) apresentou um perfil espectroscópico similar à substância 31, tratando-se de outro derivado tetranorlabdânico, em que a principal diferença observada entre 30 e 31 se encontra na ausência dos carbonos metínicos sp^2 em 31, e na presença de um carbono metilênico sp^2 , em 30. Esta observação, evidencia a abertura da δ lactona em C-17 e a isomerização da ligação dupla de $\Delta^{6,7}$ para $\Delta^{8,17}$. Adicionalmente, verificou-se a presença de hidrogênios metilênicos sp^3 em C-6 e a presença de hidrogênio metínico carbinólico em C-7 em 30, confirmando a isomerização da dupla ligação, juntamente com a abertura da δ lactona em C-17.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 59, 230). Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 42, p. 115; Apêndice 58 e Apêndice 60, p. 229 e 230) nos permitiu visualizar a estrutura de 30. A configuração relativa de 30 foi determinada pelo experimento de NOESY 1D (Apêndice 61, p. 231), em que foi possível observar a correlação entre H-5/H-9/H-7/H-18, colocando-os no mesmo plano do anel. A ausência da correlação entre H-20 com estes hidrogênios sugere que H_3C -20 apresenta outra orientação (Figura 42, p. 115).

Figura 42 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC, e do espectro de NOESY 1D de **30**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A comparação dos dados com os dados apresentados na literatura ⁽¹²²⁾ (Tabela 33) nos permitiu identificar a **30** como *rel.* ácido (4*S*, 5*R*, 7*S*, 9*R*, 10*R*)-7-hidroxi-13,14,15,16-tetranorlabd-8(17)-eno-12,19-dióico, nomeada LL-Z1271β, distribuída em diversos fungos, tais como: *Botryosphaeria* sp. ⁽¹²²⁾, *Sclerotinia homoeocarpa* ⁽¹²⁴⁾, *Aspergillus wentii* e *Aspergillus terreus* ⁽¹²¹⁾. Estudos biológicos mostraram que esta possui atividade citotóxica contra células HL-60 (leucemia promielótica humana) ⁽¹²¹⁾.

Tabela 33 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁽¹²²⁾, da substância LL-Z1271β (**30**).

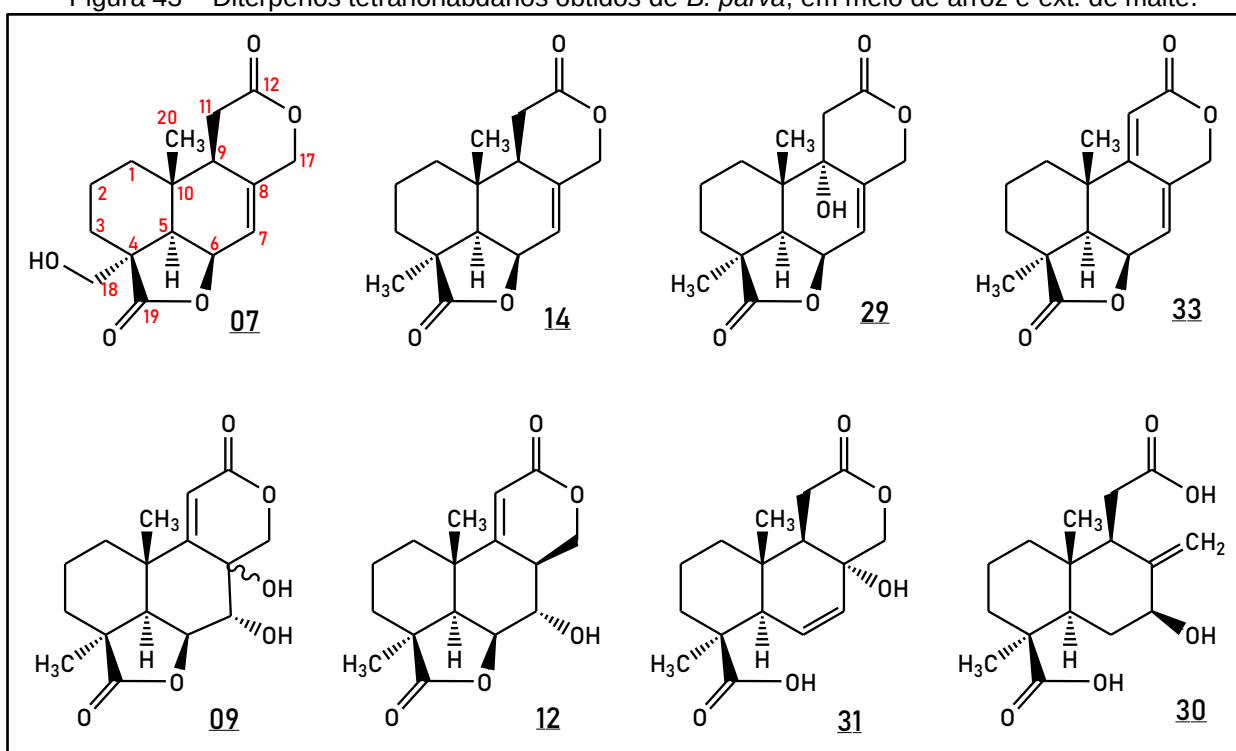
Posição	Experimental*			Literatura**		
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult., J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult., J (Hz)
01	39,8	1,71	<i>d</i> (13,2)	40,1	1,71	<i>t</i> (12,6)
		1,19	<i>dt</i> (13,2 e 3,9)		1,18	<i>d</i> (12,5)
02	20,7	1,90	<i>m</i>	21,0	1,47-1,52	<i>m</i>
		1,53	<i>m</i>		1,86-1,91	<i>m</i>
03	38,9	2,15	<i>d</i> (13,5)	39,1	2,16	<i>d</i> (13,0)
		1,10	<i>dt</i> (13,5 e 4,0)		1,09	<i>t</i> (13,2)
04	44,5	-----	-----	44,8	-----	-----
05	54,3	1,50	<i>dd</i> (13,0 e 2,7)	54,5	1,47-1,50	<i>m</i>
06	35,8	2,28	<i>ddd</i> (12,8; 5,1 e 2,8)	36,0	2,27	<i>d</i> (12,4)
		1,88	<i>m</i>		1,86-1,89	<i>m</i>
07	74,0	3,93	<i>dd</i> (11,7 e 5,0)	74,3	3,94	<i>dd</i> (11,5 e 4,9)
08	152,2	-----	-----	152,3	-----	-----
09	51,4	2,25	<i>dd</i> (10,9 e 3,6)	51,5	2,23	<i>d</i> (10,4)
10	40,3	-----	-----	40,1	-----	-----
11	31,4	2,54	<i>dd</i> (15,9 e 3,6)	31,5	2,55	<i>d</i> (15,5)
		2,41	<i>dd</i> (15,9 e 10,9)		2,40-2,44	<i>m</i>
12	177,6	-----	-----	177,4	-----	-----
17	103,4	5,15	<i>s</i>	103,6	5,14	<i>s</i>
		4,72	<i>s</i>		4,70	<i>s</i>
18	29,1	1,25	<i>s</i>	29,3	1,23	<i>s</i>
19	180,7	-----	-----	180,8	-----	-----
20	13,0	0,64	<i>s</i>	13,3	0,63	<i>s</i>

*em CD₃OD, 150 e 600 MHz. **em CD₃OD, 100 e 400MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.9 Comparação dos espectros de RMN de ^1H dos diterpenos tetranorlabdanos

Como foi mostrado nos itens anteriores, as elucidações estruturais das substâncias pertencentes à classe dos diterpenos tetranorlabdanos, foram realizadas com base nos experimentos de RMN uni- e bidimensionais, e portanto, este item compreende uma comparação dos dados de RMN ^1H das substâncias **07**, **09**, **12**, **14**, **29**, **30**, **31** e **33** (Figura 43; Esquema 01, p. 119 e 120) para melhor compreensão de suas diferenças estruturais.

Figura 43 – Diterpenos tetranorlabdanos obtidos de *B. parva*, em meio de arroz e ext. de malte.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Diante desta comparação, a diferença estrutural de **07** e **14** trata-se da presença/ausência de uma hidroxila em C-18, visto que em **07** os hidrogênios metilênicos diastereotópicos (H-18) se apresentaram com dois dubletos com deslocamento em δ_H 3,70 e 3,65, ambos com acoplamento geminal de 11,1 Hz e em **14** os H-18 se apresentaram com um singleto em δ_H 1,34, integrando para três hidrogênios, indicando a redução de C-18 de **07** para **14**.

A diferença de **14** e **29** também trata-se da ausência/presença de uma hidroxila na estrutura, porém em diferente localidade da apresentada em **07**, em que para **29** não existe sinal de hidrogênio em C-9, tratando-se de um carbono quaternário

oxigenado, e em **14** observa-se o sinal do hidrogênio metínico de junção de anel (H-9) em δ_H 2,52, indicando a oxidação de C-9 de **14** para **29**.

A diferença de **29** e **33** foi verificada pela presença de um dubleto em δ_H 5,77 (H-11), com acoplamento de 1,7 Hz em **33**, ao invés dos dubletos referentes aos hidrogênios metilênicos diastereotópicos em **29** (δ_H 2,83 e 2,63; H-11), indicando que a carbonila em C-12 passou a ser conjugada com uma insaturação, formando um sistema $\alpha:\beta:\gamma:\delta$ insaturado em **33**.

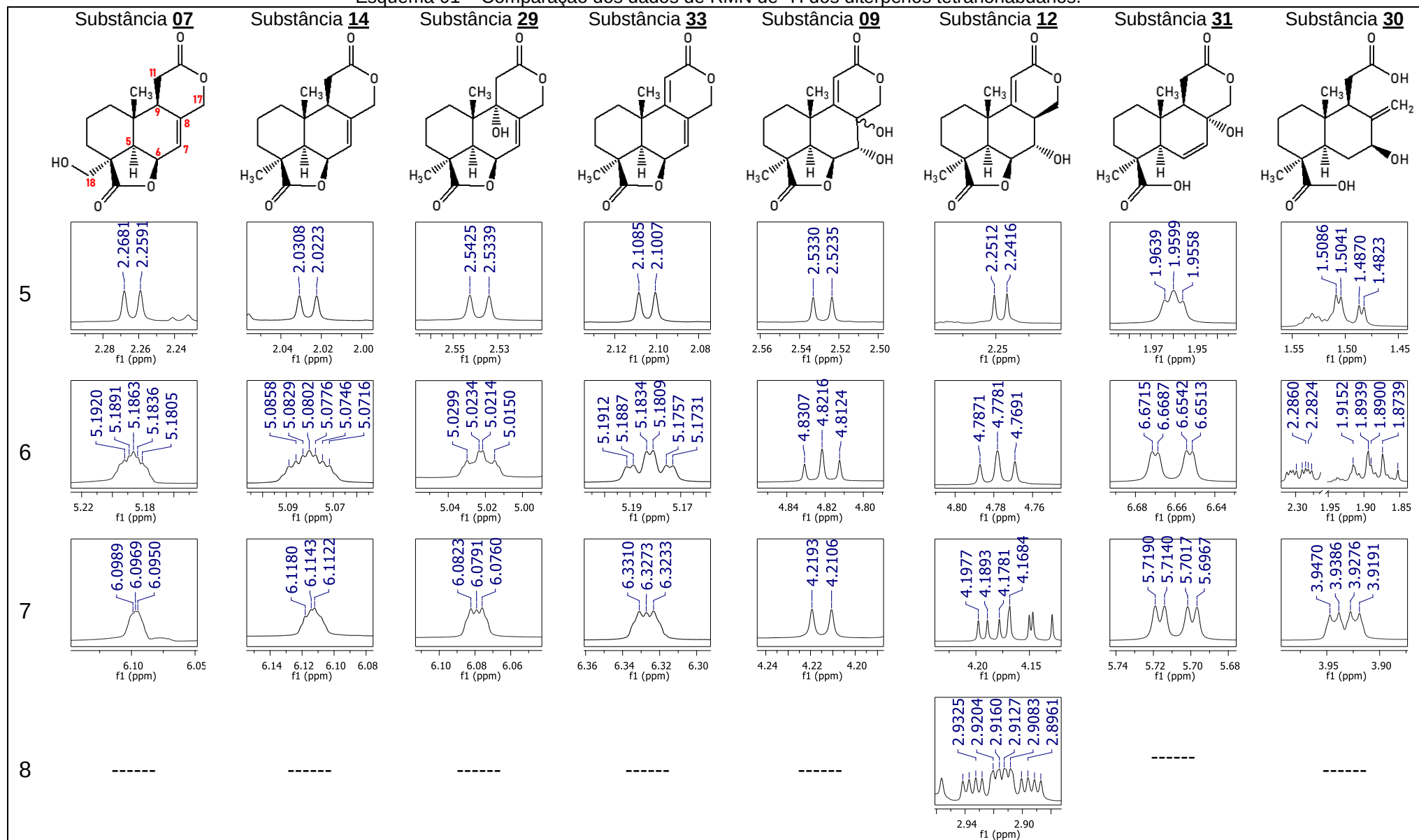
Diferentemente do sistema insaturado observado em **33**, a ausência de uma dupla ligação em **09**, é verificada por um dubleto em δ_H 4,21 (H-7), com acoplamento de 5,5 Hz, indicando que o hidrogênio vinílico H-7 em **33** passou a hidrogênio metínico carbinólico em **09**. Essa diferença é corroborada pela diferença na multiplicidade dos hidrogênios metilênicos carbinólicos H-17, que em **33**, devido à insaturação entre C-7 e C-8, se apresentavam como um dubleto em δ_H 4,96 (13,6 Hz) e um duplo tripleto em δ_H 5,04 (13,6 e 1,9 Hz), indicando um acoplamento geminal e acoplamento a 4J com H-7, e em **09** os hidrogênios H-17 se apresentam apenas como dois dubletos, em δ_H 4,58 e 4,35, ambos com acoplamento geminal (12,0 Hz).

A comparação de **09** e **12**, indica a presença de um segundo hidrogênio metínico de junção de anel (H-8) em **12**, em que é observado no espectro de RMN de 1H um multipeto em δ_H 2,91. Essa diferença também é verificada pela mudança na multiplicidade dos hidrogênios metilênicos carbinólicos H-17, que em **09**, se apresentam como dois dubletos, em δ_H 4,58 e 4,35, ambos com acoplamento geminal (12,0 Hz), e em **12** se apresentam como dois duplos dubletos em δ_H 4,65 e 4,15, ambos com acoplamento geminal (10,9 Hz) e acoplamento a 3J com H-8 de 5,4 e 12,9 Hz, respectivamente.

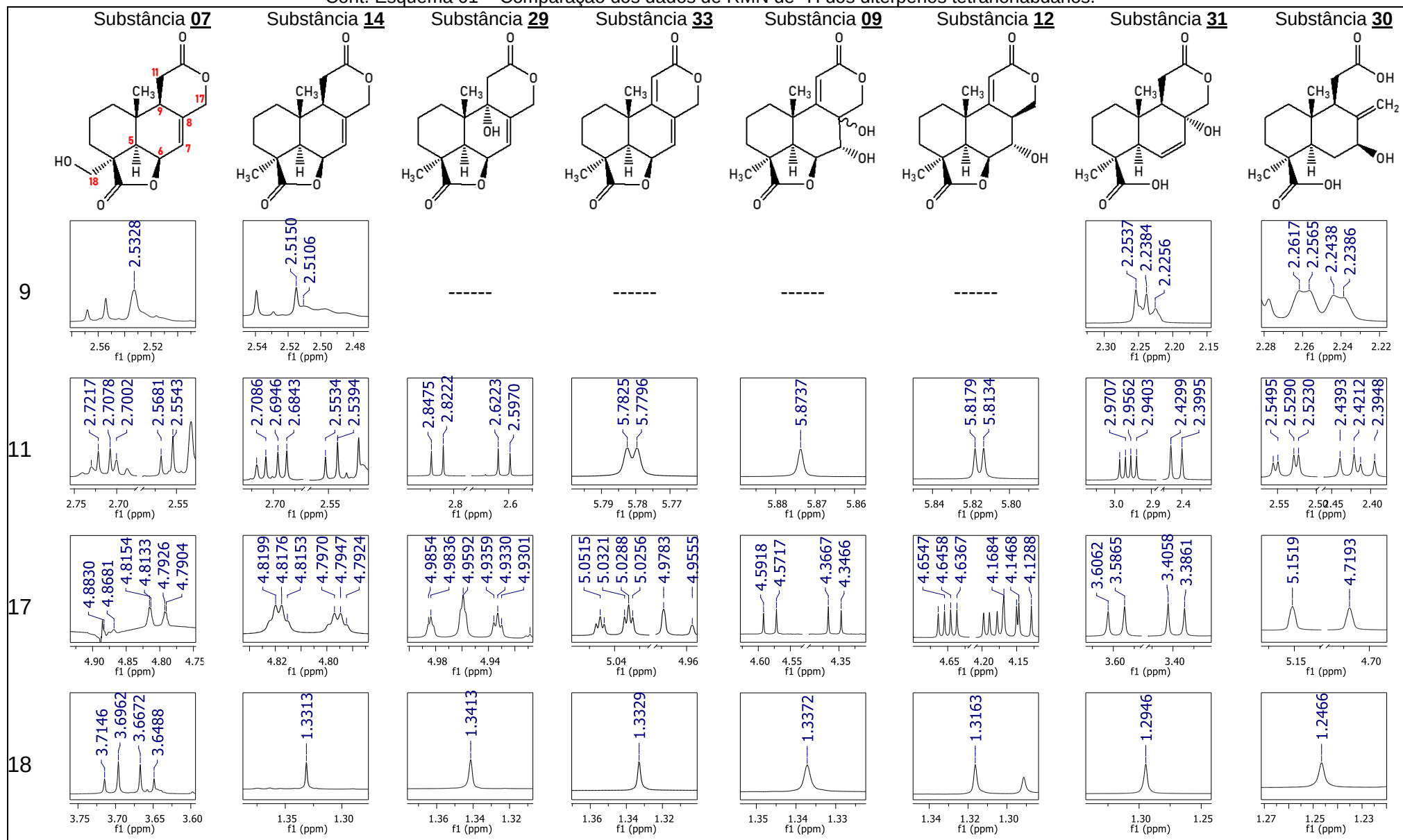
Quando comparamos **12** e **31**, é possível observar a abertura da γ lactona, verificada pela presença de uma dupla ligação entre os carbonos C-6 e C-7 em **31**, indicada pelos duplos dubletos em δ_H 6,67 (10,4 e 3,0 Hz) e 5,71 (10,4 e 1,7 Hz). A presença, em **31**, de um duplo dubleto em δ_H 2,96 (18,2 e 9,5 Hz) e um dubleto em δ_H 2,40 (18,2 Hz) (H-11' e 11''), corroboram com a isomerização da dupla ligação de C-9 e C-11, observada em **12**, para C-6 e C-7 em **31**. Os dubletos observados para os hidrogênios metilênicos H-17 em δ_H 3,60 e 3,40, ambos com acoplamento geminal (11,8 Hz), em **31**, mostram ausência do hidrogênio metínico de junção de anel H-8 observado em **12**, que se apresentavam como dois duplos dubletos em δ_H 4,65 (10,9 e 5,4 Hz) e 4,15 (10,9 e 12,9 Hz).

A diferença de **30** e **31**, se encontra na abertura da δ lactona, verificada pelos singletos observados para os hidrogênios vinílicos H-17 em δ_H 5,15 e 4,71 em **30**, ao invés dos dubletos em δ_H 3,60 e 3,40, de acoplamento geminal (11,8 Hz), observado em **31**. Em **30**, a ausência da dupla ligação, localizada nos carbonos C-6 e C-7, é verificada pelos sinais em δ_H 1,88 (*m*) e 2,28 (*ddd*, $J = 12,8$; 5,1 e 2,8 Hz), indicando que H-6, antes vinílico em **31**, passou a hidrogênios metilênicos diastereotópicos em **30**, e o sinal em δ_H 3,93 (*dd*, $J = 11,7$ e 5,0 Hz), indica que H-7, que também era vinílico em **31**, passou a ser um hidrogênio metínico carbinólico em **30**.

Esquema 01 – Comparação dos dados de RMN de ^1H dos diterpenos tetranorlabdanos.



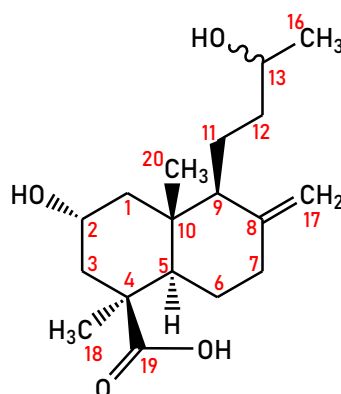
Cont. Esquema 01 – Comparação dos dados de RMN de ^1H dos diterpenos tetranorlabdanos.



7.10 Substância 20

As substâncias 20a (Fr. 4-4, óleo amarelado) e 20b (Fr. 4-5, identificada em mistura), ambas do extrato de *B. parva* em meio arroz (Figura 44), tiveram suas fórmulas moleculares, $C_{18}H_{30}O_4$, determinadas com base nos experimentos de RMN 1D e 2D.

Figura 44 – Representação estrutural da substância 20.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Os espectros de RMN de 1H e ^{13}C (Apêndice 62 - Apêndice 65, p. 231 - 233), apresentaram deslocamentos químicos característicos de diterpenos dinorlabdânicos, em que o espectro de RMN de 1H mostrou a presença de três metilas, dois hidrogênios metínicos carbinólicos, um hidrogênio metínico de junção de anel, um hidrogênio metínico, dois hidrogênios sob dupla ligação e doze hidrogênios metilênicos.

O espectro de RMN de ^{13}C mostrou um total de 18 carbonos, correspondentes à uma carbonila, a uma ligação $C=C$, a dois carbonos quaternários, a dois carbonos carbinólicos, a dois carbonos metínicos, a seis CH_2 e a três CH_3 .

A comparação dos dados espectroscópicos (Tabela 34, p. 122) mostrou que estas substâncias não apresentavam diferenças estruturais, mas sim diferenças de deslocamento químico dos hidrogênios H-11', H-11'' e H-17' em 20a e 20b, em que foi possível verificar o efeito de blindagem de H-11'e H-17' em 20a e desblindagem em de H-11'' em 20b.

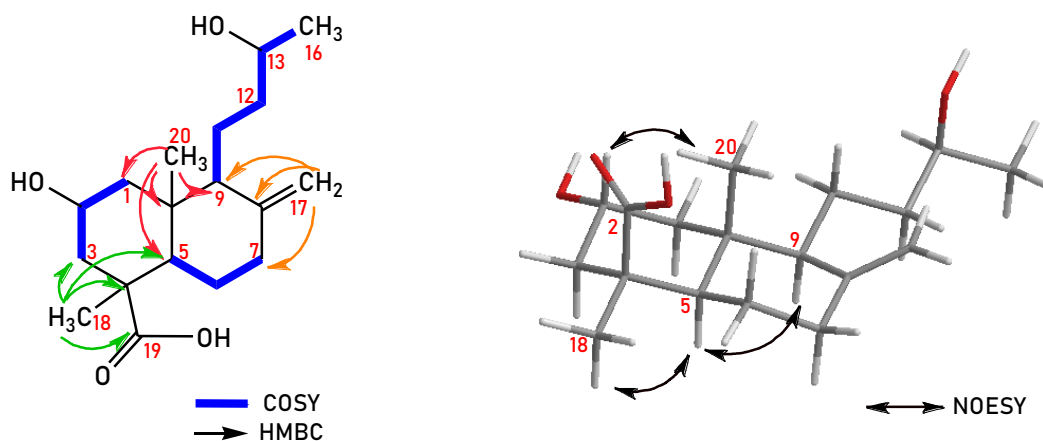
Tabela 34 – Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e de ^{13}C (150 MHz) das substâncias **20a** e **20b** (CD_3OD).

Nº	Substância 20a			Substâncias 20b		
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)
01	49.1	0,99	<i>m</i>	49.1	1.00	<i>m</i>
		2,15	<i>m</i>		2.16	<i>m</i>
02	65.6	4,11	<i>tt</i> (11,5 e 4,3)	65.6	4.11	<i>tt</i> (11,5 e 4,3)
03	47.7	1,00	<i>m</i>	47.7	1.00	<i>m</i>
		2,38	<i>m</i>		2.38	<i>m</i>
04	46.1	-----	-----	46.1	-----	-----
05	56.8	1,33	<i>dd</i> (12,6 e 2,9)	56.8	1.33	<i>dd</i> (12,6 e 2,9)
06	27.1	1,81	<i>dd</i> (13,0 e 3,9)	27.1	1.81	<i>dd</i> (13,0 e 3,9)
		2,01	<i>m</i>		2.01	<i>m</i>
07	39.6	1,93	<i>td</i> (12,7 e 4,3)	39.7	1.94	<i>m</i>
		2,41	<i>m</i>		2.42	<i>m</i>
08	149.0	-----	-----	149.2	-----	-----
09	57.5	1,67	<i>d</i> (10,6)	57.7	1.67	<i>m</i>
10	42.5	-----	-----	42.5	-----	-----
11	21.2	1,50	<i>m</i>	21.4	1.35	<i>m</i>
		1,58	<i>m</i>		1.71	<i>m</i>
12	39.3	1,20	<i>m</i>	39.4	1.24	<i>m</i>
		1,61	<i>m</i>		1.58	<i>m</i>
13	68.9	3,69	<i>m</i>	69.2	3.69	<i>dt</i> (12,8 e 6,2)
16	23.7	1,14	<i>d</i> (6,2)	23.4	1.15	<i>d</i> (6,2)
17	107.8	4,61	<i>s</i>	107.6	4.55	<i>s</i>
		4,88	ϵ		4.88	ϵ
18	29.5	1,26	<i>s</i>	29.5	1.26	<i>s</i>
19	180.7	-----	-----	180.7	-----	-----
20	14.1	0,64	<i>s</i>	14.1	0.64	<i>s</i>

ϵ - sinal de hidrogênio sobreposto com sinal da água. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 67, p. 234). Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 45, p. 123; Apêndice 66 e Apêndice 68, p. 233 e 234) nos permitiu visualizar a estrutura de **20**. A configuração relativa de **20** foi deduzida pelo experimento de NOESY (Apêndice 69, p. 235), onde observou-se os sinais cruzados dos hidrogênios H-5/H-9 e H-5/H-18, em que foi possível os colocar no mesmo plano do anel. As interações entre H-20/H β -1/H-2/H β -3 sugerem que a H $_3$ C-20 apresenta outra orientação (Figura 45, p. 123).

Figura 45 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC, e no espectro de NOESY de **20**.



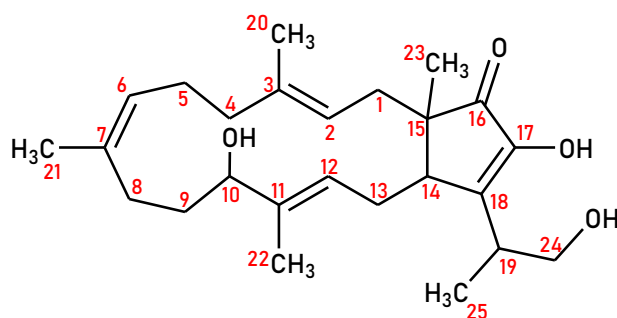
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O levantamento bibliográfico, realizado na *Web of Science* e *SciFinder*, não trouxe resultados, indicando tratar-se de substâncias inéditas, dessa forma, a substância **20** foi identificada como sendo, *rel.* (2*R*, 4*S*, 5*R*, 9*S*, 10*R*, 13)-ácido-2,13-dihidroxi-14,15-dinorlabd-8-en-19-óico, nomeada botryosphaerina L.

7.11 Substância **22**

A substância **22** (Fr. 05 do cultivo de *B. parva* em arroz; Figura 46) foi obtida como um óleo amarelado, e sua fórmula molecular, C₂₅H₃₈O₄, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados apresentados na literatura ⁽¹²⁷⁾.

Figura 46 – Representação estrutural da substância **22**.

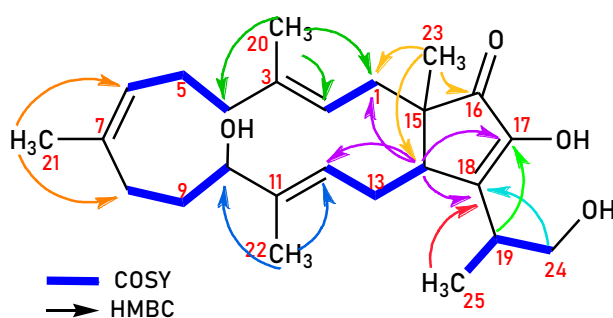


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O espectro de RMN de ^1H (Apêndice 70, p. 235) apresentou sinais característicos de um sesterterpeno, derivado de cinco unidades isoprênicas. Foram observados quatro sinais de hidrogênios metílicos δ_{H} 0,96 (s, 3H; H-23); δ_{H} 1,27 (d, J = 7,1 Hz; 3H; H-25); δ_{H} 1,56 (s, 3H; H-22) e δ_{H} 1,65 (s, 6H; H-20 e H-21); três hidrogênios vinílicos δ_{H} 5,18 (m, 1H; H-6), δ_{H} 5,32 (dd, J = 10,7 e 4,9 Hz; 1H; H-2) e δ_{H} 5,40 (m, 1H; H-12), e sinais de hidrogênios metilênicos entre δ_{H} 1,50 e δ_{H} 2,50. Adicionalmente, foram observados sinais de hidrogênios metínicos em δ_{H} 2,75 (dd, J = 11,3 e 2,3 Hz; 1H; H-14) e δ_{H} 2,61 (sext, J = 6,9 Hz; 1H; H-19).

O espectro de RMN de ^{13}C (Apêndice 71, p. 236) apresentou 25 carbonos, e foi possível observar um sinal em δ_{C} 210,3, característico de cetona. Distinguiu-se também oito carbonos sp^2 (de δ_{C} 123,3 a 152,3), dois carbonos carbinólicos (δ_{C} 77,1 e 65,8), os demais sinais foram atribuídos à carbonos metínico sp^3 , metilênicos e metílicos. Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 73, p. 237). Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 47; Apêndice 72 e Apêndice 74, p. 236 e 237) foi possível visualizar a estrutura de **22**.

Figura 47 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de **22**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Dessa forma, a comparação com os dados presentes na literatura⁽¹²⁷⁾ (Tabela 35, p. 125) permitiram identificar a substância como sendo a terpestacina, distribuída em diversos fungos endofíticos, tais como: *Simplicillium* sp., *Alternaria alternata*, *Fusarium proliferatum* e *Phomopsis* sp.. Estudos biológicos mostraram que esta, possui atividade alelopática⁽¹²⁷⁾ e antibacteriana⁽¹²⁸⁾.

Tabela 35 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁽¹²⁵⁾, da substância terpestacina (**22**).

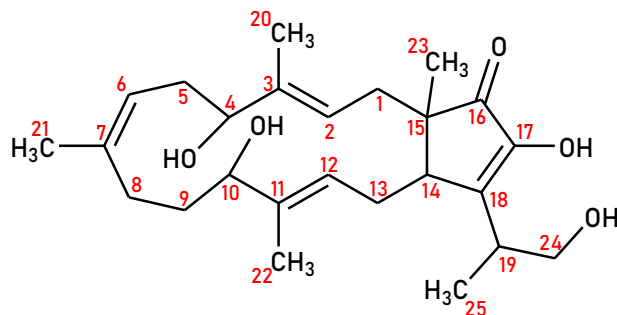
Posição	Experimental*			Literatura**		
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)
01	40,4	2,35 1,73	<i>dd</i> (13,5 e 10,7) <i>m</i>	39,5	1,68-1,80 2,40	<i>m</i> <i>dd</i> (10,4 e 13,7)
02	123,3	5,32	<i>dd</i> (10,7 e 4,9)	121,7	5,25	<i>dd</i> (5,2 e 10,1)
03	138,6	-----	-----	138,3	-----	-----
04	41,4	2,30 2,04	<i>m</i> <i>m</i>	40,5	1,90-2,04 2,22-2,30	<i>m</i> <i>m</i>
05	24,8	2,32 2,12	<i>m</i> <i>m</i>	24,0	2,22-2,30	<i>m</i>
06	125,4	5,18	<i>m</i>	124,5	5,14	<i>m</i>
07	133,7	-----	-----	133,1	-----	-----
08	35,9	2,08 1,78	<i>m</i> <i>m</i>	35,1	1,68-1,80 2,09-2,12	<i>m</i> <i>m</i>
09	30,8	1,77 1,64	<i>m</i> <i>m</i>	30,0	1,68-1,80	<i>m</i>
10	77,1	3,98	<i>dd</i> (9,9 e 4,1)	76,7	4,07	<i>dd</i> (4,0 e 10,1)
11	137,3	-----	-----	136,7	-----	-----
12	130,4	5,40	<i>m</i>	129,1	5,41	<i>m</i>
13	30,1	1,93 2,46	<i>m</i> <i>d</i> (17,1)	29,0	1,90-2,04 245	<i>m</i> <i>d</i> (17,4)
14	50,9	2,75	<i>dd</i> (11,3 e 2,3)	49,8	2,72	<i>dd</i> (2,1 e 11,3)
15	50,2	-----	-----	49,1	-----	-----
16	210,3	-----	-----	208,0	-----	-----
17	149,1	-----	-----	146,8	-----	-----
18	152,3	-----	-----	149,0	-----	-----
19	38,8	2,61	<i>sext</i> (6,9)	37,3	2,68	<i>m</i>
20	15,6	1,65	<i>s</i>	15,5	1,64	<i>s</i>
21	15,4	1,65	<i>s</i>	15,8	1,65	<i>s</i>
22	10,4	1,56	<i>s</i>	10,7	1,58	<i>s</i>
23	17,0	0,96	<i>s</i>	16,4	1,01	<i>s</i>
24	65,8	3,84 3,70	<i>dd</i> (10,4 e 6,9) <i>dd</i> (10,4 e 6,9)	66,3	3,83 3,90	<i>dd</i> (5,5 e 10,4) <i>dd</i> (7,0 e 10,4)
25	14,7	1,27	<i>d</i> (6,9)	14,6	1,30	<i>d</i> (7,3)

*em CD₃OD, 150 e 600 MHz. **em CDCl₃, 125 e 500 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.12 Substância 21

A substância 21 (Fr. 04_5 do cultivo de *B. parva* em arroz; Figura 48) foi identificada em mistura, e sua fórmula molecular, $C_{25}H_{38}O_5$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D.

Figura 48 – Representação estrutural da substância 21.

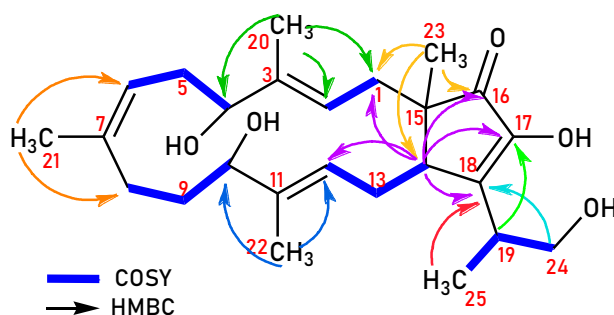


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2018.

O espectro de RMN de 1H (Apêndice 75, p. 238) apresentou um perfil espectroscópico similar à substância 22, tratando-se de outro derivado sesterterpênico, em que a diferença estrutural entre 21 e 22 se encontra na ausência dos hidrogênios metilênicos em C-4 em 22 e na presença de um hidrogênio metínico carbinólico em C-4 em 21, evidenciando a oxidação do carbono C-4 em 21.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 77, p. 239). Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 49; Apêndice 78 e Apêndice 79, p. 239 e 240) nos permitiu visualizar a estrutura de 21.

Figura 49 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de 21.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O levantamento bibliográfico, realizado na *Web of Science* e *SciFinder*, não trouxe resultados, indicando tratar-se de uma substância inédita, a qual foi identificada como 4-hidroxiterpestacina.

Tabela 36 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **21**, em CD_3OD e 14,1T.

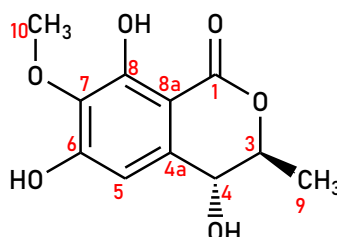
Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult., J (Hz)	HMBC
01	40,0	1,75 2,42	<i>m</i> <i>m</i>	C-2/C-3/C-15
02	125,6	5,51	<i>dd</i> (11,4 e 3,5)	C-4/C-20
03	141,1	-----	-----	-----
04	80,2	3,92	<i>dd</i> (7,4 e 4,3)	C-2
05	33,3	2,16 2,49	<i>m</i> <i>m</i>	-----
06	122,3	4,93	ϵ	C-4/C-8/C-21
07	136,0	-----	-----	-----
08	35,9	1,78 2,09	<i>m</i> <i>m</i>	-----
09	30,7	1,76 1,78	<i>m</i> <i>m</i>	-----
10	76,9	3,93	<i>dd</i> (7,5 e 3,7)	C-12
11	137,4	-----	-----	-----
12	130,3	5,37	<i>d</i> (5,7)	C-10/C-14/C-22
13	30,2	1,64 1,91	<i>m</i> <i>m</i>	-----
14	50,7	2,77	<i>dd</i> (11,7 e 1,9)	C-1/C-15/C-16/C-17/C-18/C-19
15	49,8	-----	-----	-----
16	210,0	-----	-----	-----
17	149,1	-----	-----	-----
18	152,3	-----	-----	-----
19	38,9	2,61	<i>sext</i> (6,8)	C-14/C-17/C-18
20	10,43	1,65	<i>s</i>	C-1/C-2/C-3/C-4
21	15,6	1,70	<i>s</i>	C-6/C-7/C-8
22	10,41	1,55	<i>s</i>	C-10/C-11/C-12
23	17,0	0,91	<i>s</i>	C-1/C-15/C-16
24	65,8	3,70 3,84	<i>dd</i> (10,4 e 6,2) <i>dd</i> (10,4 e 7,1)	C-18/C-19/C-25
25	14,7	1,26	<i>d</i> (6,8)	C-18/C-19/C-24

ϵ - sinal suprimido com o sinal da água. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.13 Substância 06

A substância 06 (Fr. 01_09, oriunda do extrato de *B. parva* em meio de arroz; Figura 50) foi obtida como um sólido incolor cristalino, e sua fórmula molecular $C_{11}H_{12}O_6$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D.

Figura 50 – Representação estrutural da substância 06.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

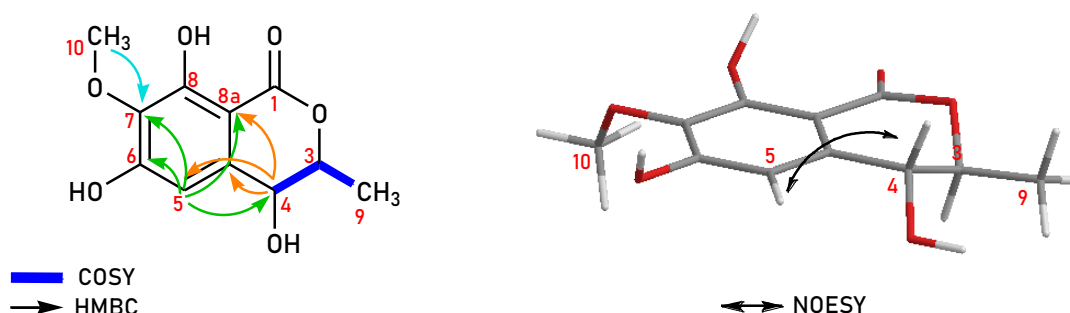
O espectro de RMN de 1H (Apêndice 80, p. 240) apresentou um singlete, integrando para um hidrogênio aromático, em δ_H 6,50 (s, 1H, H-5), característico um sistema aromático pentassubstituído. Também foi possível observar um sinal de hidrogênio metínico oxibenzílico que apresentou deslocamento químico em δ_H 4,42 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, H-4), e um sinal de hidrogênio metínico carbinólico em δ_H 4,64 (qd, $J = 6,6$ e $2,0$ Hz, 1H, H-3).

Adicionalmente foram observados dois sinais intensos, o primeiro em δ_H 1,49 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H, H-9), característico de hidrogênios metílicos, atribuído ao grupo metila ligado ao carbono C-3, e o segundo em δ_H 3,84 (s, 3H, H-10), característico de hidrogênios de metoxila do anel aromático.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 82, p. 241). Com o experimento de COSY (Apêndice 83, p. 242), verificou-se as interações 1H - 1H do hidrogênio carbinólico (H-3) com os hidrogênios metínico oxibenzílicos (H-4) e hidrogênios metílicos (H-9). Pelo experimento de HMBC (Apêndice 84, p. 242), foi possível observar as correlações de H-5 com C-4/C-8a/C-7 e H-4 com C-4a/C-5/C-8a, além da correlação dos hidrogênios H-10 com C-7. Dessa forma, confirmou-se as posições dos carbonos C-4a e C-8a com os deslocamentos característicos de isocumarinas (Figura 51, p. 129).

A posição da metoxila em C-7 foi atribuída a partir dos experimentos de NOESY (Apêndice 85, p. 243) que mostraram uma interação espacial entre o hidrogênio oxibenzílico H-4 e o hidrogênio aromático H-5, além de uma baixa interação espacial entre H-5 e H₃CO- (Figura 51).

Figura 51 – Correlações observadas nos mapas de contorno de COSY e HMBC, e no espectro de NOESY 1D da substância **06**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A configuração relativa de **06** foi atribuída pelo valor da constante de acoplamento entre os hidrogênios H-3 e H-4 comparada com substâncias similares presentes na literatura⁽¹²⁹⁾. O levantamento bibliográfico, realizado na *Web of Science* e *SciFinder*, mostrou tratar-se de uma substância inédita, dessa forma, **06** trata-se de uma substância inédita, a qual foi identificada como *rel.* (3*S*, 4*R*)-4,6-dihidroxi-7-metoximeleina, nomeada botryosarina A.

Tabela 37 – Dados de RMN de ¹H e ¹³C da substância **06**, em CD₃Ode 14,1 T.

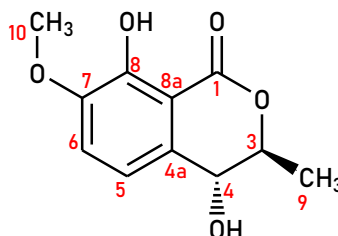
Posição	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)	HMBC
01	171,3	----	----	----
03	79,8	4,64	dq (6,6 e 2,0)	C-4/C-9
04	67,7	4,42	d (2,0)	C-3/C-4a/C-5/C-8a/C-9
04a	139,1	----	----	----
05	108,7	6,50	s	C-1/C-4/C-6/C-7/C-8a
06	158,1	----	----	----
07	136,2	----	----	----
08	ε	----	----	----
08a	101,3	----	----	----
09	16,3	1,49	d (6,6)	C-3/C-4
MeO-	60,9	3,84	s	C-6

ε - valor de carbono não observado. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.14 Substância 08

A substância 08 (Fr. 01_10, oriunda do extrato de *B. parva* em meio de arroz; Figura 52) foi obtida como um sólido incolor cristalino, e sua fórmula molecular $C_{11}H_{12}O_5$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D.

Figura 52 – Representação estrutural da substância 08.



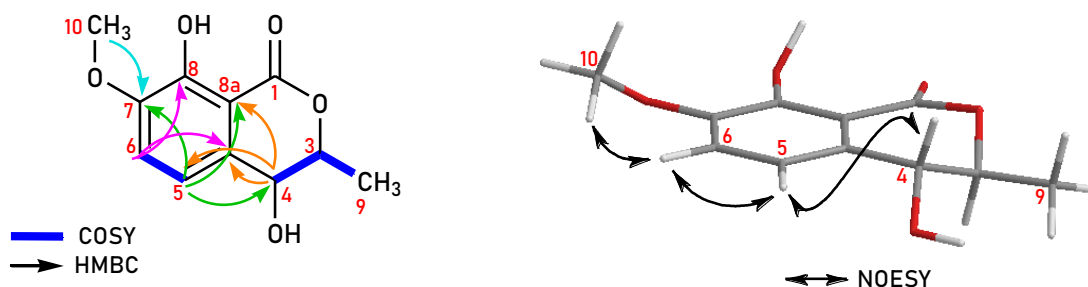
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O espectro de RMN de 1H (Apêndice 86, p. 243) apresentou um perfil espectroscópico similar à substância 06, tratando-se então de uma isocumarina, em que a diferença estrutural entre 06 e 08 se encontra no padrão de substituição do anel aromático, passando de pentassubstituído em 06 para tetrassubstituído em 08, comprovado pela presença de dois sinais em δ_H 7,25 (*d*, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-6) e δ_H 6,95 (*dd*, $J = 8,2$ e $0,2$ Hz, 1H, H-5). Essa observação, quando comparado a 06, evidencia a redução do carbono aromático C-6 em 08.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 88, p. 244). Com o experimento de COSY (Apêndice 89, p. 245), verificou-se as interações 1H - 1H dos hidrogênios aromáticos H-5 e H-6, e do hidrogênio carbinólico (H-3) com o hidrogênio metínico oxibenzílico (H-4) e hidrogênios metílicos (H-9).

Pelo experimento de HMBC (Apêndice 90, p. 245), foi possível observar as correlações mostradas na Figura 53 (p. 131), confirmando-se as posições dos carbonos C-4a e C-8a com os deslocamentos característicos de isocumarinas. A posição da metoxila no C-7 foi atribuída a partir dos experimentos de NOESY (Apêndice 91, p. 246) que indicaram uma interação espacial entre os hidrogênios da metoxila com o hidrogênio aromático H-6, e também mostraram a interação do hidrogênio oxibenzílico H-4 com o hidrogênio aromático H-5 (Figura 53, p. 131).

Figura 53 – Correlações observadas nos mapas de contorno de COSY e HMBC, e no espectro de NOESY 1D da substância **08**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A configuração relativa de **08** foi atribuída pelo valor da constante de acoplamento entre os hidrogênios H-3 e H-4 comparada com substâncias similares presentes na literatura⁽¹²⁹⁾. O levantamento bibliográfico, realizado na *Web of Science* e *SciFinder*, não trouxe resultados, indicando tratar-se de uma substância inédita, a qual foi identificada como *rel.* (3*S*, 4*R*)-4-hidroxi-7-metoximeleina, nomeada botryosarina B.

Tabela 38 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **08**, em CD_3OD e 14,1T.

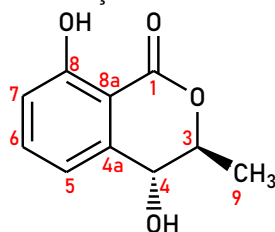
Posição	^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm)	Mult., J (Hz)	HMBC
01	£	----	----	----
03	80,6	4,70	<i>dq</i> (6,6 e 2,0)	----
04	67,5	4,51	<i>d</i> (2,0)	C-3/C-4a/C-5/C-8a
04a	134,2	----	----	----
05	119,5	6,95	<i>dd</i> (8,2 e 0,2)	C-4/C-7/C-8a
06	119,0	7,25	<i>d</i> (8,2)	C-4a/C-8
07	149,9	----	----	----
08	153,2	----	----	----
08a	108,1	----	----	----
09	16,5	1,52	<i>d</i> (6,6)	C-3/C-4
MeO-	56,8	3,89	<i>s</i>	C-7

£ - valor de carbono não observado. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.15 Substância **11**

A substância **11** (Fr. 02_4, oriunda do extrato de *B. parva* em meio de arroz, e Fr. 02_6, oriunda do extrato de *B. parva* em meio de malte; Figura 54, p. 132) foi obtida como um sólido cristalino incolor, e sua fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados apresentados na literatura⁽¹²⁹⁾.

Figura 54 – Representação estrutural da substância **11**.

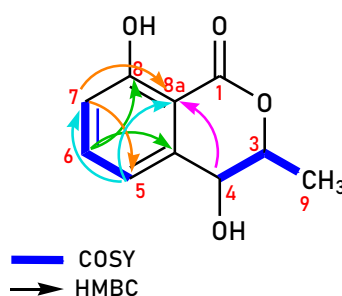


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O espectro de RMN de ^1H (Apêndice 92, p. 246) apresentou um perfil espectroscópico similar à substância **08**, tratando-se então de uma isocumarina, em que a diferença estrutural entre **08** e **11** se encontra no padrão de substituição do anel aromático, passando de tetrassubstituído em **08** para trissubstituído em **11**, comprovado pela presença de três sinais em δ_{H} 7,56 (*dd*, $J = 8,2$ e $7,6$ Hz, 1H, H-6), δ_{H} 6,98 (*m*, 1H, H-7) e δ_{H} 6,97 (*s*, Hz, 1H, H-5).

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 94, p. 247). Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 55; Apêndice 95 e Apêndice 96, p. 248 e 248) nos permitiu visualizar a estrutura de **11**.

Figura 55 – Correlações observadas nos mapas de contorno de COSY e HMBC da substância **11**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A configuração relativa de **11** foi atribuída pelo valor da constante de acoplamento entre os hidrogênios H-3 e H-4 comparada com substâncias similares presentes na literatura⁽¹²⁹⁾. A comparação dos dados com os dados apresentados na literatura⁽¹²⁹⁾ (Tabela 39, p. 133) nos permitiu identificar a **11** como sendo a *rel.* (3*S*, 4*R*)-4-hidroximeleina, obtida também das plantas *Melanorrhoea usitata* e *Ficus auriculata*, como do endófito *Xylaria feejeensis*. Estudos biológicos mostraram que esta possui atividade anti-hiperglicêmica e inibição da enzima αGHY ⁽¹²⁹⁾.

Tabela 39 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁽¹²⁹⁾, da substância *rel.* (3*S*, 4*R*)-4-hidroxiemeleina (**11**).

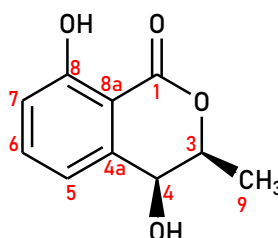
Posição	Experimental*			Literatura**		
	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)
01	ε	-----	-----	171,0	-----	-----
03	80,0	4,71	<i>qd</i> (6,6 e 2,0)	79,9	4,72	<i>qd</i> (6,6 e 2,1)
04	67,5	4,55	<i>d</i> (2,0)	67,6	4,55	<i>d</i> (2,1)
04a	143,2	-----	-----	143,1	-----	-----
05	119,7	6,97	<i>sl</i>	119,8	6,96	<i>d</i> (8,4)
06	137,6	7,55	<i>dd</i> (8,2 e 7,6)	137,7	7,56	<i>dd</i> (8,5 e 7,4)
07	118,5	6,98	<i>m</i>	118,5	6,99	<i>d</i> (7,4)
08	162,6	-----	-----	162,9	-----	-----
08a	108,5	-----	-----	108,4	-----	-----
09	16,4	-----	<i>d</i> (6,8)	16,4	1,52	<i>d</i> (6,6)

ε - valor de carbono não observado. *em CD₃OD, 150 e 600 MHz. **em CD₃OD, 100 e 400 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.16 Substância **13**

A substância **13** (Fr. 02_7, oriunda do extrato de *B. parva* em meio de arroz, e Fr. 03_3, oriunda do extrato de *B. parva* em meio de malte; Figura 56) foi obtida como um sólido cristalino amarelado, e sua fórmula molecular C₁₀H₁₀O₄, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados apresentados na literatura ⁽¹²⁹⁾.

Figura 56 – Representação estrutural da substância **13**.



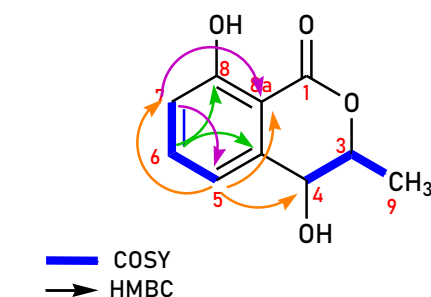
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O espectro de RMN de ¹H (Apêndice 97, p. 249) apresentou um perfil espectroscópico similar à substância **11**, em que foi observado uma diferença de deslocamento químico e multiplicidade dos hidrogênios carbinólicos H-3 e H-4, que em **11** se mostravam como um quarteto de dubletos (H-3) e dubleto (H-4) e em **13** se

mostram como um multipletto integrando para dois hidrogênios. Essa observação, evidencia que **13** trata-se de um estereoisômero de **11**.

Os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 99, p. 250). Essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 57; Apêndice 100 e Apêndice 101, p. 250 e 251) nos permitiu visualizar a estrutura de **13**.

Figura 57 – Correlações observadas nos mapas de contorno de COSY e HMBC da substância **13**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A configuração relativa de **13** foi atribuída pela comparação dos dados obtidos com os dados apresentados na literatura⁽¹²⁹⁾ (Tabela 40) nos permitindo identificar **13** como sendo a *rel.* (3S, 4S)-4-hidroximeleina, obtida também dos endófitos *Lachnum palmae*, *Xylaria feejeensis* e *Botryosphaeria obtusa*. Estudos biológicos mostraram que esta possui atividade anti-hiperglicêmica e inibição da enzima α GHY⁽¹²⁹⁾.

Tabela 40 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura⁽¹²⁹⁾, da substância *rel.* (3S, 4S)-4-hidroximeleina (**13**).

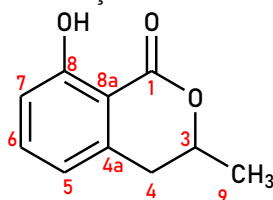
Posição	Experimental*			Literatura**		
	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)
01	170,2	----	----	170,0	----	----
03	81,6	4,55	<i>m</i>	81,6	4,56	<i>m</i>
04	69,5	4,55	<i>m</i>	69,5	4,56	<i>m</i>
04a	144,1	----	----	144,7	----	----
05	117,8	7,08	<i>dd</i> (7,5 e 0,7)	118,5	7,10	<i>d</i> (7,4)
06	137,8	7,57	<i>dd</i> (8,4 e 7,5)	137,6	7,55	<i>dd</i> (8,5 e 7,4)
07	117,7	6,94	<i>dd</i> (8,4 e 0,7)	118,5	6,95	<i>d</i> (8,5)
08	162,9	----	----	163,2	----	----
08a	108,0	----	----	108,4	----	----
09	18,2	1,46	<i>d</i> (6,2)	17,9	1,48	<i>d</i> (6,6)

*em CD₃OD, 150 e 600 MHz. **em CD₃OD, 125 e 500 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.17 Substância **18**

A substância **18** (Fr. 04_1, oriunda do extrato de *B. parva* em meio de arroz; Figura 58) foi obtida como um sólido cristalino amarelado, e sua fórmula molecular $C_{10}H_{10}O_3$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados apresentados na literatura ⁽¹³⁰⁾.

Figura 58 – Representação estrutural da substância **18**.

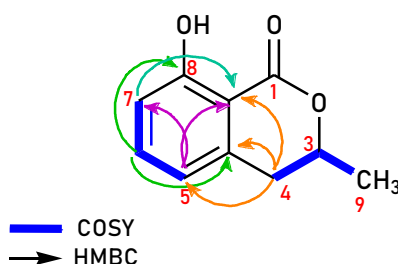


Fonte: ilustração elabora pela autora, 2020.

O espectro de RMN de 1H (Apêndice 102, p. 251) apresentou um perfil espectroscópico similar à substância **13**, em que a diferença entre estas substâncias se deve redução de C-4, onde em **18** é observado os sinais em δ_H 3,02 (*dd*, $J = 16,4$ e 3,3 Hz) e δ_H 2,91 (*dd*, $J = 16,4$ e 11,3 Hz), característicos de hidrogênios metilênicos diastereotópicos.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 103, p. 252). Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 59; Apêndice 104 e Apêndice 105, p. 252 e 253) nos permitiu visualizar a estrutura de **18**.

Figura 59 – Correlações observadas nos mapas de contorno de COSY e HMBC da substância **18**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A comparação dos dados obtidos com os dados apresentados na literatura ⁽¹³⁰⁾ (Tabela 41, p. 136) nos permitiu identificar a **18** como sendo a meleina, obtida também

dos endófitos *Lachnum palmae*, *Cladosporium* sp. e *Xylaria* sp.. Estudos biológicos mostraram que esta substância possui atividade antibacteriana, fitotóxica, larvicidas, fungicida e neurotóxica ⁽⁷⁵⁾.

Tabela 41 – Comparação dos dados de RMN de ^1H obtidos com os dados descritos na literatura ⁽¹³⁰⁾, da substância meleína (**18**).

Posição	Experimental*			Literatura**		
	^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)	^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)
01	ϵ	-----	-----	169,9	-----	-----
03	77,6	4,74	<i>m</i>	76,1	4,73	<i>m</i>
04	35,0	2,91	<i>dd</i> (16,4; 11,3)	34,6	2,93	<i>d</i> (7,3)
		3,02	<i>dd</i> (16,4 e 3,3)			
04a	141,6	-----	-----	139,3	-----	-----
05	116,5	6,84	<i>dt</i> (8,4 e 0,8)	116,2	6,89	<i>d</i> (8,3)
06	137,2	7,44	<i>dd</i> (8,4 e 7,4)	136,1	7,41	<i>m</i>
07	119,2	6,77	<i>dd</i> (7,4 e 0,8)	117,9	6,69	<i>d</i> (7,3)
08	163,2	-----	-----	162,1	-----	-----
08a	109,3	-----	-----	108,2	-----	-----
09	20,6	1,48	<i>d</i> (6,3)	20,8	1,53	<i>d</i> (6,3)

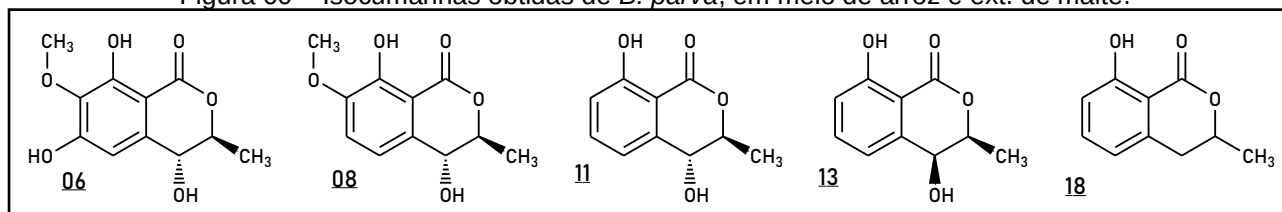
ϵ - valor de carbono não observado. *em CD_3OD , 150 e 600 MHz. **em CDCl_3 , 300 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.18 Comparação dos espectros de RMN de ^1H das isocumarinas

Este item compreende uma comparação dos dados de RMN ^1H das substâncias **06**, **08**, **11**, **13** e **18** para melhor compreensão das diferenças estruturais mostradas nos itens anteriores.

Diante da comparação estrutural das isocumarinas (Figura 60), verifica-se que as diferenças entre as substâncias se encontram na variação do padrão de substituição do anel aromático e na oxidação do carbono C-4 (Esquema 02, p. 138 e 139).

Figura 60 – Isocumarinas obtidas de *B. parva*, em meio de arroz e ext. de malte.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

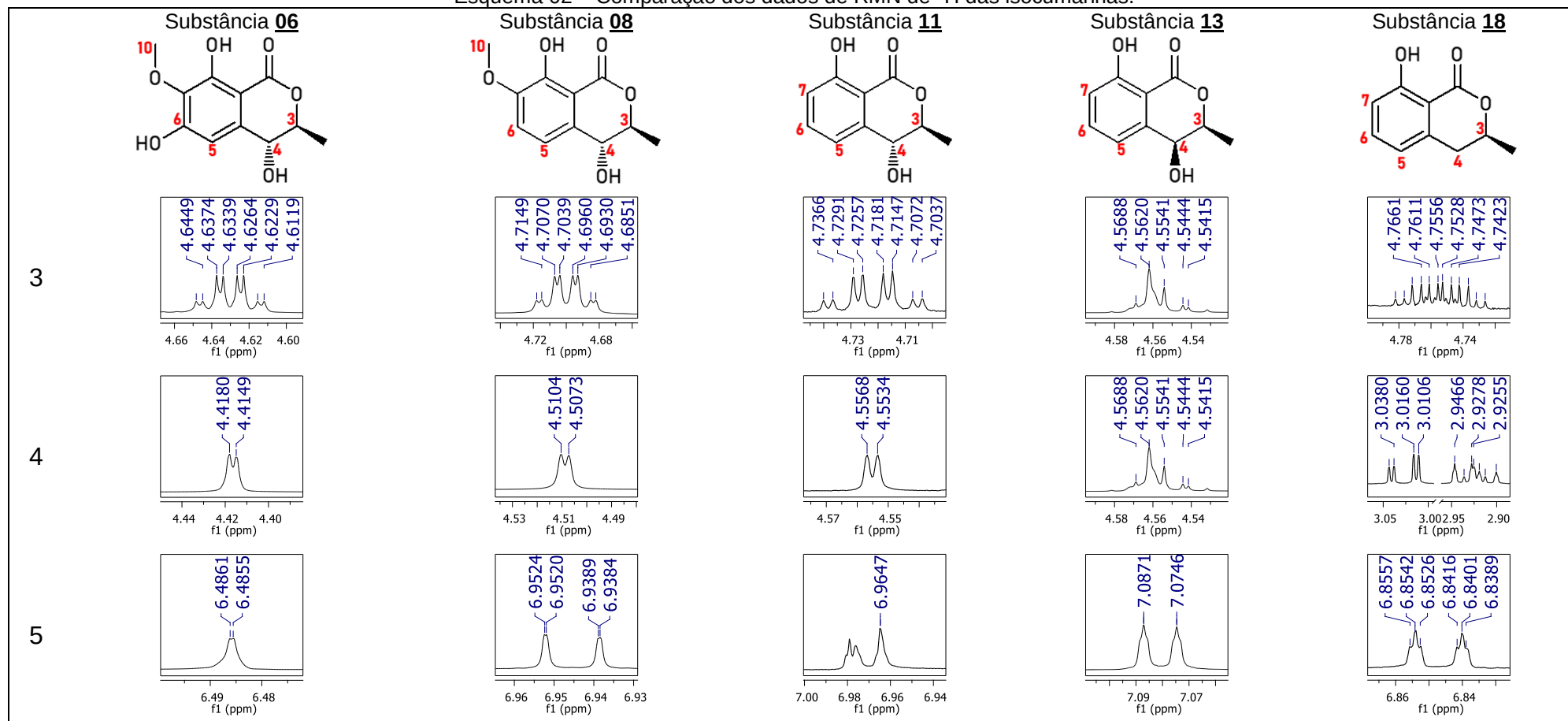
O padrão de substituição de **06** foi verificado pelo singlete em δ_H 6,49 (H-5), tratando-se, portanto, de um anel aromático pentassubstituído. Já para **08**, verifica-se a presença de um dubleto em δ_H 7,25 (8,1 Hz; H-6) e um duplo dubleto em δ_H 6,94 (8,1 e 0,24 Hz, H-5), tratando-se então de um anel aromático tetrassubstituído.

A diferença entre as substâncias **08** e **11**, se encontra no padrão de substituição do anel aromático, que em **08** é tetrassubstituído, e em **11** é trissubstituído, comprovado pela presença de três sinais em δ_H 7,56 (*dd*, $J = 8,2$ e $7,6$ Hz, 1H, H-6), δ_H 6,98 (*m*, 1H, H-7) e δ_H 6,97 (*sl*, Hz, 1H, H-5).

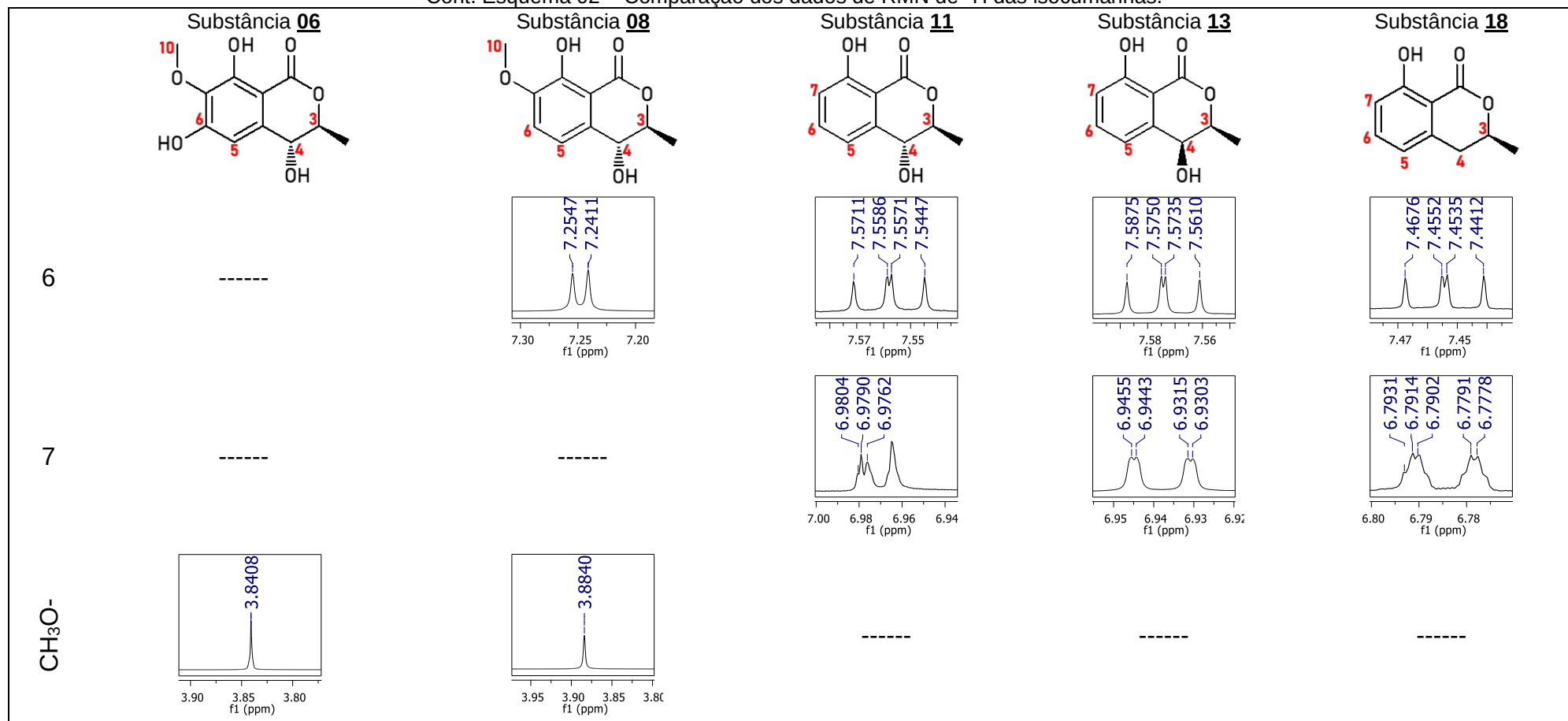
As substâncias **11** e **13** apresentam mesma estrutura, no entanto, verifica-se a diferença no centro estereogênico em C-4, verificada pela multiplicidades dos sinais em δ_H 4,72 (*qd*, $J = 6,6$ e $2,0$ Hz) e δ_H 4,55 (*d*, $J = 2,0$ Hz) para **11**, e δ_H 4,56 (*m*) e δ_H 4,57 (*m*) em **13**.

A comparação de **13** e **18**, mostra a redução de C-4, que em **13** é observado um sinal em δ_H 4,55 (*m*, H-4), característico de hidrogênio metínico oxibenzílico, e em **18** é observado os sinais em δ_H 3,02 (*dd*, $J = 16,4$ e $3,3$ Hz) e δ_H 2,91 (*dd*, $J = 16,4$ e $11,3$ Hz), característicos de hidrogênios metilênicos diastereotópicos.

Esquema 02 – Comparação dos dados de RMN de ^1H das isocumarinas.



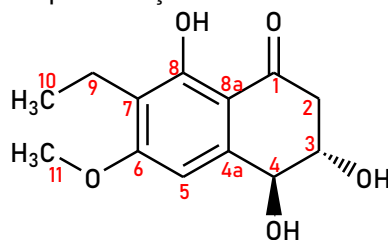
Cont. Esquema 02 – Comparação dos dados de RMN de ^1H das isocumarinas.



7.19 Substância 19

A substância 19 (Fr. 04_4, oriunda do extrato de *B. parva* em meio arroz; Figura 61) foi identificada em mistura, e sua fórmula molecular $C_{13}H_{16}O_4$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados presentes na literatura ⁽¹³¹⁾.

Figura 61 – Representação estrutural da substância 19.

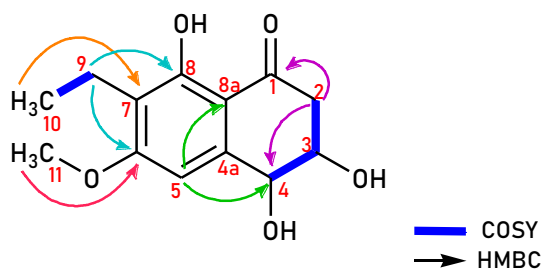


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O espectro de RMN de 1H (Apêndice 106, p. 253) apresentou um singleto, integrando para um hidrogênio aromático, em δ_H 6,83 (s, 1H, H-5), sugerindo um anel aromático pentassubstituído. Observou-se também, um sinal em δ_H 3,99 (ddd, $J = 8,8$; 7,5 e 4,3 Hz, 1H, H-3), e um dubleto em δ_H 4,55 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-4) característicos de hidrogênios metínicos carbinólicos. Outras informações obtidas foram sinais em δ_H 2,99 (dd, $J = 17,1$ e 4,3 Hz, 1H, H-2') e em δ_H 2,65 (dd, $J = 17,1$ e 8,8 Hz, 1H, H-2''), evidenciando estarem posicionados vizinhos a um centro estereogênico; um singleto em δ_H 3,94 (s, 3H, H-11), característico de uma metoxila aromática; um quadrupletto em δ_H 2,63 (q, $J = 7,4$ Hz, 2H, H-9) característico de hidrogênios metilênicos benzílicos, e um tripleto em δ_H 1,05 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H, H-10), característico de hidrogênios metílicos atribuídos ao grupo metila ligado ao carbono C-9.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 107, p. 254). Com o mapa de contorno de COSY (Apêndice 108, p. 254), verificou-se os acoplamentos 1H - 1H dos hidrogênios metilênicos H-2' e H-2'' com os hidrogênios carbinólicos H-3 e H-4. O radical etil também foi confirmado em COSY pelas interações entre H-9 $\leftrightarrow$ H-10. Pelo mapa de contorno de HMBC (Apêndice 109, p. 255), foi observado os principais acoplamentos a 3J que contribuíram para a determinação estrutural da substância 19 (Figura 62, p. 141).

Figura 62 – Correlações observadas nos mapas de contorno de COSY e HMBC da substância **19**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A configuração relativa dos carbonos C-3 e C-4 foi determinada pela constante de acoplamento, em que o valor de J igual a 7,5 Hz indica que os hidrogênios H-3 e H-4 se encontram em uma relação *trans*. A comparação dos dados acima com os dados da literatura⁽¹³¹⁾ (Tabela 42), foi possível determinar a substância **19** como sendo a *rel.* (3*S*, 4*S*)-3,4-dihidro-3,4,8-trihidroxi-6-metoxinaftalen-1(2*H*)-ona, nomeada botryosphaerona D, obtida também dos fungos endofíticos *Aspergillus terreus*⁽¹²¹⁾ e *Botryosphaeria australis*⁽¹³¹⁾.

Tabela 42 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura⁽¹³¹⁾, da substância botryosphaerona D (**19**).

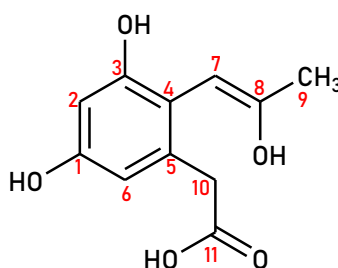
Posição	Experimental*			Literatura**		
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)
01	202,7	-----	-----	201,2	-----	-----
02	44,4	2,65	<i>dd</i> (17,1 e 8,8)	43,7	2,70	<i>dd</i> (9,5 e 17,0)
		2,99	<i>dd</i> (17,1 e 4,3)		2,98	<i>dd</i> (4,4 e 17,0)
03	71,5	3,99	<i>ddd</i> (8,8; 7,5 e 4,3)	70,8	4,01- 4,06	<i>m</i>
04	73,8	4,55	<i>d</i> (7,5)	72,9	4,61	<i>d</i> (<i>overlap</i>)
04a	£	-----	-----	145,1	-----	-----
05	102,5	6,83	<i>s</i>	101,2	6,88	<i>s</i>
06	165,7	-----	-----	163,7	-----	-----
07	119,5	-----	-----	117,2	-----	-----
08	162,9	-----	-----	161,2	-----	-----
08a	111,3	-----	-----	110,1	-----	-----
09	15,6	2,63	<i>q</i> (7,5)	15,1	2,63	<i>q</i> (7,4)
10	13,1	1,05	<i>t</i> (7,5)	12,6	1,06	<i>t</i> (7,4)
11	56,0	3,94	<i>s</i>	55,3	3,94	<i>s</i>

£ - valor de carbono não observado. *em CD₃OD, 150 e 600 MHz. **em C₃D₆O, 150 e 600 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.20 Substância **28**

A substância **28** (Fr. 02_4, oriunda do extrato de *B. parva* em meio de ext. de malte; Figura 63) foi obtida como óleo amarelado, e sua fórmula molecular $C_{11}H_{12}O_5$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D.

Figura 63 – Representação estrutural da substância **28**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

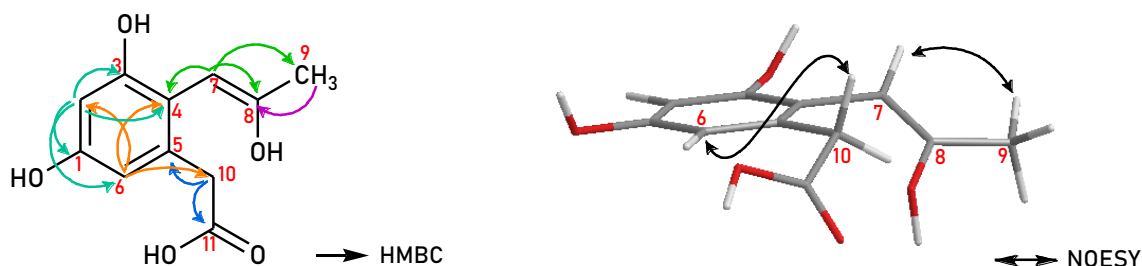
O espectro de RMN de 1H (Apêndice 110, p. 255) apresentou dois dubletos em δ_H 6,77 (*d*, $J = 2,2$; 1H, H-2) e δ_H 6,69 (*d*, $J = 2,2$; 1H, H-6), integrando para um hidrogênio aromático cada, característico de um sistema aromático tetrassubstituído com acoplamento entre os hidrogênios em meta. Também foi possível observar um singlete em δ_H 6,02 (*s*, 1H, H-7), integrando para um hidrogênio olefínico.

Adicionalmente foram observados dois sinais intensos, o primeiro em δ_H 2,34 (*s*, 3H, H-9), característico de hidrogênios metílicos, atribuído ao grupo $-CH_3$ ligado a $C-sp^2$ (C-8), e o segundo em δ_H 4,09 (*s*, 2H, H-10), característico a um $-CH_2-$ (C-10) α -carboxi-benzílico.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no mapa de contorno de HSQC (Apêndice 111, p. 256). Pelo experimento de HMBC (Apêndice 112, p. 256), foi possível observar as correlações mostradas na (Figura 64, p. 143).

A estereoquímica da dupla ligação de **28** foi determinada pela a interação espacial dos hidrogênios H-7 e H-9 (Figura 64, p. 143) observada no espectro de NOESY 1D (Apêndice 113, p. 257), colocando os em uma relação *Z*.

Figura 64 – Correlações observadas nos mapas de contorno de HMBC, e no espectro de NOESY 1D da substância **28**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A busca bibliográfica, realizada na *Web of Science* e *SciFinder*, indicou tratar-se de uma substância inédita, a qual foi identificada como *rel.* Ácido (1,3-dihidroxi-4-((Z)-2-hidroxi-1-enil)fenil)-5-acético, nomeada botryosbenzenodiol A.

Tabela 43 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **28**, em CD_3OD e 14,1T.

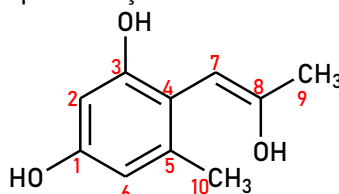
Posição	^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm)	Mult., J (Hz)	HMBC
01	162,3	-----	-----	-----
02	102,3	6,77	d (2,2)	C-1/C-3/C-4/C-6
03	162,3	-----	-----	-----
04	115,4	-----	-----	-----
05	139,2	-----	-----	-----
06	119,3	6,69	d (2,2)	C-2/C-4/C-10
07	110,9	6,02	s	C-4/C-8/C-9
08	167,1	-----	-----	-----
09	19,6	2,34	s	C-7/C-8
10	41,1	4,09	s	C-5/C-11
11	175,0	-----	-----	-----

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.21 Substância **32**

A substância **32** (Fr. 03_2, oriunda do extrato de *B. parva* em meio de ext. de malte; Figura 65) foi obtida como óleo amarelado, e sua fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_3$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D.

Figura 65 – Representação estrutural da substância **32**.

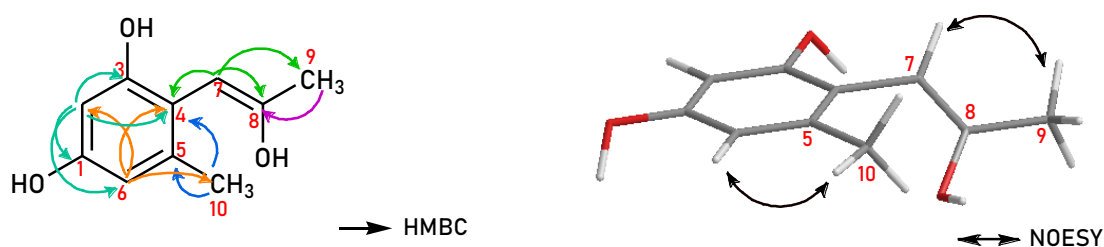


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O espectro de RMN de ^1H (Apêndice 114, p. 257) apresentou um perfil espectroscópico similar à substância **28**, sendo que as diferenças observadas foram a ausência do carbono carboxílico (C-11) e a ausência do carbono metilênico, verificada pela presença de uma metila em δ_{H} 2,23 (s, 3H, H-10), quando comparada à **28**.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 115, p. 258). Pelo mapa de contorno de HMBC (Apêndice 116, p. 258), foi possível observar as correlações mostradas na Figura 66.

Figura 66 – Correlações observadas nos mapas de contorno de HMBC, e no espectro de NOESY 1D da substância **32**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A estereoquímica da dupla ligação de **32** foi determinada pela interação espacial dos hidrogênios H-7 e H-9 (Figura 66) observada no espectro de NOESY 1D (Apêndice 117, p. 259), colocando-os em uma relação Z. O levantamento bibliográfico, realizado na *Web of Science* e *SciFinder*, não trouxe resultados, indicando tratar-se de uma substância inédita, a qual foi identificada como 4-((Z)-2-hidroxiprop-1-enil)-5-metil-1,3-benzenodiol, nomeada botrysobenzenodiol B.

Tabela 44 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **32**, em CD_3OD e 14,1T.

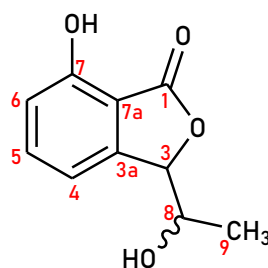
Posição	^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm)	Mult., J (Hz)	HMBC
01	162,2	-----	-----	-----
02	101,4	6,65	d (2,3)	C-1/C-3/C-4/C-6
03	162,2	-----	-----	-----
04	115,7	-----	-----	-----
05	143,6	-----	-----	-----
06	117,7	6,64	dd (2,3 e 0,8)	C-2/C-4/C-10
07	111,2	6,01	d (0,6)	C-4/C-8/C-9
08	166,6	-----	-----	-----
09	19,5	2,32	d (0,6)	C-7/C-8
10	22,9	2,72	s	C-4/C-5/C-6

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.22 Substância **03**

A substância **03** (Fr. 01_5, oriunda do extrato de *B. parva* em meio de arroz; Figura 67) foi obtida como uma mistura de isômeros, e sua fórmula molecular $C_{10}H_{10}O_4$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D.

Figura 67 – Representação estrutural da substância **03**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O espectro de RMN de 1H (Apêndice 118 e Apêndice 119, p. 259 e 260) de **03** apresentou dois conjuntos de sinais na razão de 3:1, onde foi possível observar a presença de uma metila, dois hidrogênios metínicos sendo um carbinólico e o outro oxibenzílico, e três hidrogênios aromáticos para cada conjunto de sinais.

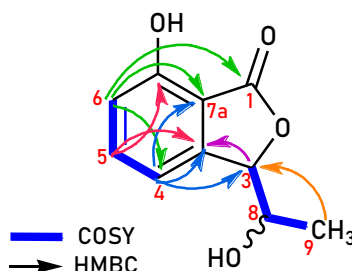
A comparação dos dados obtidos (Tabela 45, p. 146) mostrou que estas substâncias não apresentavam diferenças estruturais, mas sim diferenças de deslocamento químico dos hidrogênios H-8 e H-9, em que foi possível verificar o efeito de blindagem em **03a** e desblindagem em **03b**. Observou-se também uma diferença nas constantes de acoplamento de H-3 e H-8, mostrando que a diferença entre as substâncias reside na configuração de C-8.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 120, p. 260). Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 68, p. 146; Apêndice 121 e Apêndice 122, p. 261 e 261) nos permitiu atribuir a estrutura de planar de **03**.

Tabela 45 – Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e de ^{13}C (150 MHz) das substâncias **03a** e **03b** (CD_3OD).

Nº	Substância 03a			Substâncias 03b		
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)
1	171,9	-----	-----	172,0	-----	-----
3	85,6	5,35	d (4,4)	85,2	5,36	d (3,1)
3a	150,6	-----	-----	150,9	-----	-----
4	115,0	7,06	d (7,7)	114,6	7,05	d (7,5)
5	137,5	7,54	dd (8,0 e 7,7)	137,4	7,54	dd (8,0 e 7,5)
6	116,9	6,90	d (8,0)	116,7	6,90	d (8,0)
7	158,3	-----	-----	158,1	-----	-----
7a	113,1	-----	-----	113,5	-----	-----
8	69,7	4,06	qd (6,5 e 4,4)	68,7	4,20	qd (6,5 e 3,1)
9	17,9	1,27	d (6,5)	18,9	1,27	d (6,5)

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

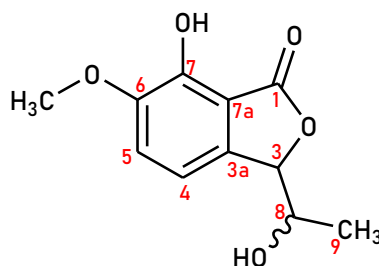
Figura 68 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de **03**.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

As configurações relativas de C-3 e C-8 foram, arbitrariamente, atribuídas, sendo **03a** identificada como *rel.* 3(*R*)-((*S*)-1-hidroxietil)-7-hidroxiftaleto e **03b** identificada como *rel.* 3(*R*)-((*R*)-1-hidroxietil)-7-hidroxiftaleto, ou seus respectivos enantiômeros. O levantamento bibliográfico de **03**, realizado na *Web of Science* e *SciFinder*, indicou tratar-se de uma substância conhecida, no entanto, não há relatos sobre a configuração absoluta ou relativa de C-3 e C-8. Os dados da rotação específica descritos são: $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = -50,0^\circ$; CHCl_3 , c 0,08⁽¹³²⁾.

7.23 Substância **04**

A substância **04** (Fr. 01_6, oriunda do extrato de *B. parva* em meio de arroz; Figura 69, p. 147) foi obtida como óleo amarelado, e sua fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_5$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D.

Figura 69 – Representação estrutural da substância **04**.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A similaridade entre os espectros de RMN de ^1H (Tabela 46, p. 147, Apêndice 123, p. 262) de **04** com a substância **03**, evidenciou que **04** se tratava de um análogo, sendo que a diferença observada, foi a presença de uma metoxila em C-6 em **04**. A oxidação em C-6 ao invés de C-4 foi proposta com base nos valores de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C de C-6 e C-7.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Tabela 46; Apêndice 124, p. 262). Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 70, p. 148; Apêndice 125 e Apêndice 126, p. 263 e 263) foi possível propor a estrutura de **04**.

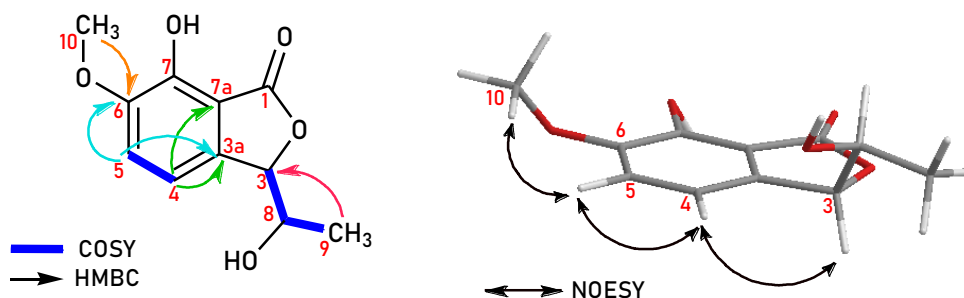
Tabela 46 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **04**, em CD_3OD e 14,1T.

Posição	^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm)	Mult., J (Hz)	HMBC
1	£	-----	-----	-----
3	85,0	5,26	<i>d</i> (4,6)	-----
3a	141,3	-----	-----	-----
4	119,5	7,19	<i>d</i> (8,1)	C-4/C-7
5	124,6	7,22	<i>d</i> (8,1)	C-3a/C-6
6	147,2	-----	-----	-----
7	151,8	-----	-----	-----
7a	119,3	-----	-----	-----
8	69,8	4,01	<i>m</i>	-----
9	18,0	1,17	<i>d</i> (6,5)	C-3/C-8
$\text{CH}_3\text{O-}$	62,6	4,01	<i>s</i>	C-6

£ - valor de carbono não observado. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

Adicionalmente, a posição da metoxila em C-6, foi verificada pelo experimento de NOESY, em que foi possível verificar no espectro os sinais cruzados de H-4 e H-3 (Figura 70, p. 148).

Figura 70 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC, e no espectro de NOESY de **04**.



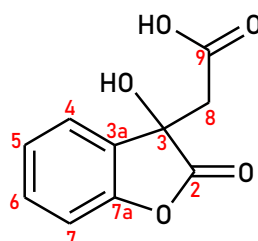
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A busca bibliográfica desta substância, realizada na *Web of Science* e *SciFinder*, não trouxe resultados, indicando tratar-se de uma substância inédita, a qual foi identificada com sendo 3-(1-hidroxietil)-7-hidroxi-6-metoxiflaeto, nomeada botryosftaleto A.

7.24 Substância **26**

A substância **26** (Fr. 02_2, oriunda do extrato de *B. parva* em meio de ext. de malte; Figura 71) foi obtida como um sólido amorfo amarelado, e sua fórmula molecular $C_{11}H_{12}O_5$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D.

Figura 71 – Representação estrutural da substância **26**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O espectro de RMN de 1H (Apêndice 127, p. 264) apresentou quatro sinais, integrando para um hidrogênio aromático cada, em δ_H 7,38 (*d*, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-4), δ_H 7,24 (*dd*, $J = 7,5$ e 1,1 Hz, 1H, H-6), δ_H 7,02 (*t*, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-5) e δ_H 6,87 (*d*, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-7) caracterizando um sistema aromático dissustituído em *orto*.

Adicionalmente foi observado um singlete, integrando para dois hidrogênios em δ_H 2,99 (s, 2H, H-8), característicos de hidrogênios metilênicos α a carboxila.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Tabela 47; Apêndice 128, p. 264).

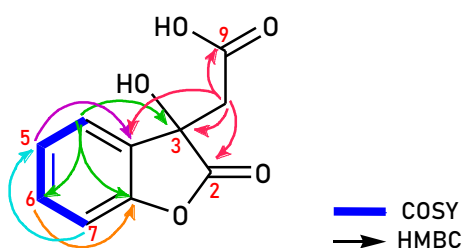
Tabela 47 – Dados de RMN de 1H e ^{13}C da substância **26**, em CD_3OD e 14,1T.

Posição	^{13}C δ (ppm)	1H δ (ppm)	Mult., J (Hz)	HMBC
2	180,9	-----	-----	-----
3	74,3	-----	-----	-----
3a	131,8	-----	-----	-----
4	125,0	7,38	d (7,5)	C-3/C-6/C-7a
5	123,4	7,02	d (7,5)	C-3a/C-7
6	130,6	7,24	dd (7,5 e 1,1)	C-4/C-7a
7	110,9	6,87	d (7,5)	C_3a/C-5
7a	143,3	-----	-----	-----
8	42,3	2,99	s	C-2/C-3/C-3a/C-9
9	173,2	-----	-----	-----

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 72, p. 149; Apêndice 129 e Apêndice 130, p. 265 e 265) foi possível propor a estrutura de **26**.

Figura 72 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de **26**.



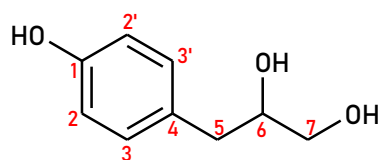
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A busca bibliográfica desta substância, realizada na *Web of Science* e *SciFinder*, não trouxe resultados, indicando tratar-se de uma substância inédita, a qual foi determinada como sendo o Ácido 2,3-dihidro-3-hidroxi-2-oxo-3-benzofuran-acético, nomeada botryosbenzofuranona A.

7.25 Substância 01

A substância 01 (Fr. 01_2, oriunda do extrato de *B. parva* em meio de arroz; Figura 73) foi identificada em mistura, e sua fórmula molecular $C_9H_{12}O_3$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados apresentados na literatura ⁽¹³³⁾.

Figura 73 – Representação estrutural da substância 01.

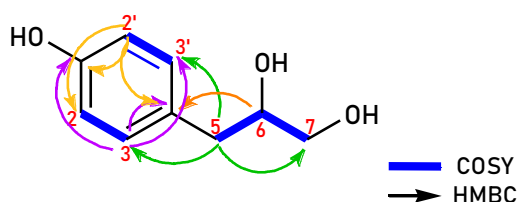


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O espectro de RMN de 1H (Apêndice 131, p. 266) apresentou dois multipletos, integrando para dois hidrogênios aromáticos cada, em δ_H 7,05 (*m*, 2H, H-3 e 3') e em δ_H 6,71 (*m*, 2H, H-2 e 2'), caracterizando um sistema aromático dissustituído em *para*. Adicionalmente, foram observados sinais em δ_H 2,71 (*dd*, $J = 13,8$ e $5,9$ Hz, 1H, H-5') e δ_H 2,59 (*dd*, $J = 13,8$ e $7,4$ Hz, 1H, H-5'') característico de hidrogênios metilênicos benzílicos diastereotópicos. Também foi possível observar um multipeto em δ_H 3,75 (*m*, 1H, H-6), característico de hidrogênio metínico carbinólico, e sinais em δ_H 3,48 (*dd*, $J = 11,2$ e $4,3$ Hz, 1H, H-7') e δ_H 3,42 (*dd*, $J = 11,2$ e $6,3$ Hz, 1H, H-7'') característico de hidrogênios metilênicos carbinólicos diastereotópicos.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 133, p. 267). Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 74; Apêndice 134 e Apêndice 135, p. 267 e 268) foi possível propor a estrutura de 01.

Figura 74 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de 01.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Com a comparação dos dados acima com os dados presentes na literatura⁽¹³³⁾ (Tabela 48) foi possível identificar a substância **01** como 3-(*p*-hidroxifenil)-1,2-propanodiol, obtida também dos organismos *Abies delavayi* e *Nidula niveo-tomentosa*, e estudos de potencial biológico mostraram que esta substância possui atividade antioxidante⁽¹³³⁾.

Tabela 48 – Comparação dos dados de RMN de ¹H obtidos com os dados descritos na literatura⁽¹³³⁾, da substância 3-(*p*-hidroxifenil)-1,2-propanodiol (**01**).

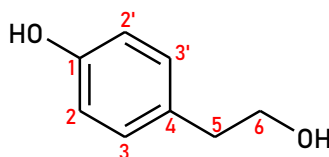
Posição	Experimental*			Literatura**		
	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)
1	156,7	-----	-----	155,2	-----	-----
2 e 2'	116,1	6,71	<i>m</i>	114,6	6,75	<i>m</i>
3 e 3'	131,4	7,05	<i>m</i>	130,0	7,07	<i>m</i>
4	130,8	-----	-----	129,3	-----	-----
5	40,1	2,59	<i>dd</i> (13,8 e 7,4)	38,6	2,67	<i>d</i> (15,0; 2H)
		2,71	<i>dd</i> (13,8 e 5,9)			
6	74,7	3,75	<i>m</i>	73,3	3,78	<i>m</i>
7	66,5	3,42	<i>dd</i> (11,2 e 6,3)	65,0	3,47	<i>d</i> (12,5; 2H)
		3,48	<i>dd</i> (11,2 e 4,3)			

*em CD₃OD, 150 e 600 MHz. **em CDCl₃. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.26 Substância **02**

A substância **02** (Fr. 01_4, oriunda do extrato de *B. parva* em meio de arroz, e Fr. 04_4 do cultivo de *P. stromaticum* em meio de ext. de malte; Figura 75) foi obtida como um óleo amarelado, e sua fórmula molecular C₈H₁₀O₂, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados apresentados na literatura⁽¹³⁴⁾.

Figura 75 – Representação estrutural da substância **02**.



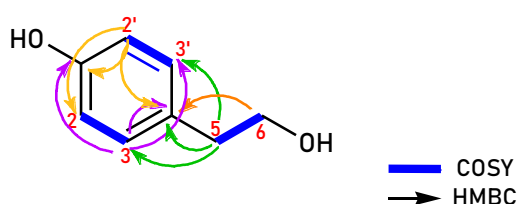
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O espectro de RMN de ¹H (Apêndice 136, p. 268) apresentou um perfil espectroscópico similar à substância **01**, em que a diferença estrutural dessas

substâncias se deve à ausência do hidrogênio metínico carbinólico em **01** e à presença de dois tripletos, integrando para dois hidrogênios cada, característicos de unidade $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ em **02**. Estas informações, quando comparadas a **01**, evidenciaram a cadeia lateral 1-etanol em **02**, ao invés de 1,2-propanodiol.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 137, p. 269). Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 76; Apêndice 138 e Apêndice 139, p. 269 e 270) foi possível propor a estrutura de **02**.

Figura 76 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de **02**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Com a comparação dos dados acima com os dados presentes na literatura⁽¹³⁴⁾ (Tabela 49) foi possível identificar a substância **02** como 2-(*p*-hidroxifenil)etanol, nomeada tirosol, amplamente distribuído em diversos organismos, como a planta *Orobancha crenata* e o endófito *Diaporthe eucalyptorum*. Estudos de potencial biológico mostraram que esta substância é “*quorum-sensing*” e possui atividade antioxidante⁽¹³⁴⁾.

Tabela 49 – Comparação dos dados de RMN de ^1H obtidos com os dados descritos na literatura⁽¹³⁴⁾, da substância tirosol (**02**).

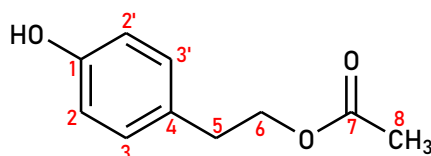
Posição	Experimental*			Literatura**		
	$^{13}\text{C } \delta$ (ppm)	$^1\text{H } \delta$ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)	$^{13}\text{C } \delta$ (ppm)	$^1\text{H } \delta$ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)
1	155,5	-----	-----	155,5	-----	-----
2 e 2'	114,7	6,65	<i>m</i>	114,9	6,65	<i>d</i> (8,5)
3 e 3'	129,6	6,98	<i>m</i>	129,7	7,98	<i>d</i> (8,5)
4	129,4	-----	-----	129,4	-----	-----
5	37,7	2,59	<i>t</i> (7,3)	38,3	2,59	<i>t</i> (6,5)
6	62,4	3,51	<i>t</i> (7,3)	62,6	3,51	<i>t</i> (6,5)

*em DMSO- d_6 , 150 e 600 MHz. **em DMSO- d_6 , 125 e 500 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.27 Substância **39**

A substância **39** (Fr. 04_11 do cultivo de *P. stromaticum* em meio de ext. de malte; Figura 77) foi obtida como um óleo amarronzado, e sua fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_3$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados apresentados na literatura ⁽¹³⁵⁾.

Figura 77 – Representação estrutural da substância **39**.

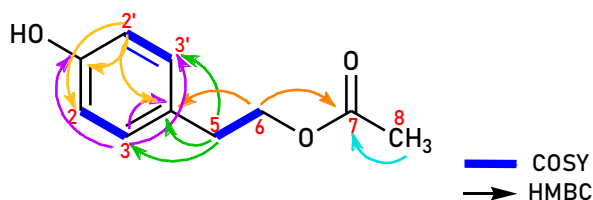


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A substância **39** apresentou dados espectroscópicos (Apêndice 140, p. 270) similares aos da substância **02**, em que as diferenças observadas foram a presença de um sinal intenso em δ_H 1,97 (s, 3H, H-8) e um carbono em δ_C 170,5. Estas observações permitiram aferir a acetilação da hidroxila alifática de **02**.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 141, p. 271). Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 78; Apêndice 142 e Apêndice 143, p. 271 e 272) foi possível propor a estrutura de **39**.

Figura 78 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de **39**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Com a comparação dos dados acima com os dados presentes na literatura ⁽¹³⁵⁾ (Tabela 50, p. 154) foi possível identificar a substância **39** como Acetato de 2-(*p*-hidroxifenil)etil, amplamente distribuída nos endófitos, tais como: *Hypocrea koningii*,

Arthrimum sp. e *Mucor* sp.. Estudos de potencial biológico mostraram que esta substância possui atividade antioxidante.

Tabela 50 – Comparação dos dados de RMN de ^1H obtidos com os dados descritos na literatura ⁽¹³⁵⁾, da substância Acetato de 2-(*p*-hidroxifenil)etil (**39**).

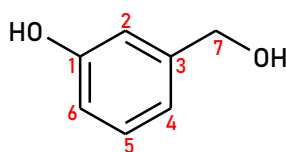
Posição	Experimental*			Literatura**		
	$^{13}\text{C } \delta$ (ppm)	$^1\text{H } \delta$ (ppm)	Multiplicidade, <i>J</i> (Hz)	$^{13}\text{C } \delta$ (ppm)	$^1\text{H } \delta$ (ppm)	Multiplicidade, <i>J</i> (Hz)
1	155,9	-----	-----	155,1	-----	-----
2 e 2'	115,0	6,68	<i>m</i>	115,8	6,70	<i>m</i>
3 e 3'	129,6	7,02	<i>m</i>	130,0	7,05	<i>m</i>
4	129,8	-----	-----	129,8	-----	-----
5	33,4	2,75	<i>t</i> (7,1)	34,3	2,87	<i>t</i>
6	64,4	4,12	<i>t</i> (7,1)	65,7	4,21	<i>t</i>
7	170,5	-----	-----	172,4	-----	-----
8	20,5	1,97	<i>s</i>	21,2	1,99	<i>s</i>

*em DMSO-*d*₆, 150 e 600 MHz. **em CDCl₃, 25 e 100 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.28 Substância **34**

A substância **34** (Fr. 04_3 do cultivo de *P. stromaticum* em meio de ext. de malte; Figura 79) foi obtida como um óleo amarronzado, e sua fórmula molecular C₇H₈O₂, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados apresentados na literatura ⁽¹³⁶⁾.

Figura 79 – Representação estrutural da substância **34**.

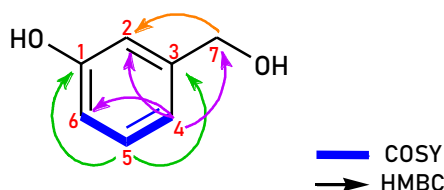


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O espectro de RMN de ^1H (Apêndice 144, p. 272) e de HSQC (Apêndice 145, p. 273) de **34** evidenciaram a presença de um anel aromático meta-dissubstituído e de um carbono metilênico carbinólico.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 145, p. 273). Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 80, p. 155; Apêndice 146 e Apêndice 147, p. 273 e 274) foi possível propor a estrutura de **34**.

Figura 80 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de **34**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A comparação dos dados acima com os da literatura⁽¹³⁶⁾ (Tabela 51) permitiu identificar a substância **34** como 3-(hidroximetil)fenol, obtida também dos endófitos *Phoma* sp. e *Aspergillus* sp., e estudos de potencial biológico mostraram que esta substância possui atividade antioxidante⁽¹³⁶⁾.

Tabela 51 – Comparação dos dados de RMN de ^1H obtidos com os dados descritos na literatura⁽¹³⁶⁾, da substância 3-(hidroximetil)fenol (**34**).

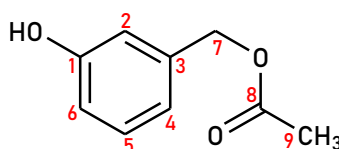
Posição	Experimental*			Literatura**		
	$^{13}\text{C } \delta$ (ppm)	$^1\text{H } \delta$ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)	$^{13}\text{C } \delta$ (ppm)	$^1\text{H } \delta$ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)
1	157,2	-----	-----	158,7	-----	-----
2	113,0	6,73	<i>sl</i>	114,6	6,89	<i>sl</i>
3	144,2	-----	-----	145,5	-----	-----
4	116,7	6,70	<i>d</i> (7,7)	118,8	6,82	<i>d</i> (7,8)
5	128,8	7,08	<i>t</i> (7,7)	130,4	7,15	<i>t</i> (7,8)
6	113,5	6,60	<i>dd</i> (7,7 e 2,2)	114,9	6,72	<i>dd</i> (7,8 e 3,0)
7	62,7	4,40	<i>s</i>	65,0	4,58	<i>s</i>

*em DMSO- d_6 , 150 e 600 MHz. **em Acetona- d_6 , 75 e 300 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.29 Substância **38**

A substância **38** (Fr. 04_10 do cultivo de *P. stromaticum* em meio de ext. de malte; Figura 81) foi obtida como um óleo amarronzado, e sua fórmula molecular $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados apresentados na literatura⁽¹³⁷⁾.

Figura 81 – Representação estrutural da substância **38**.

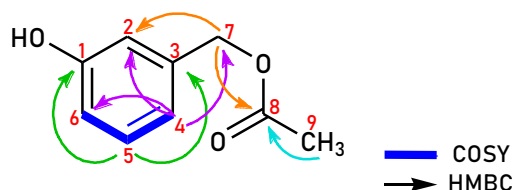


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A substância **38** apresentou dados espectroscópicos parecidos com os da substância **34** (Apêndice 148, p. 274), em que a única diferença observada foi a presença de um sinal intenso em δ_H 2,06 (s, 3H, H-9). Devido ao valor desse deslocamento químico, esse sinal foi atribuído à uma metila ligada à carbono sp^2 . Esta observação, evidencia a acetilação de **34** dando origem ao produto acetilado **38**.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 149, p. 274). Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 82; Apêndice 150 e Apêndice 151, p. 275 e 276) foi possível propor a estrutura de **38**.

Figura 82 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de **38**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Com a comparação dos dados acima com os dados presentes na literatura⁽¹³⁷⁾ (Tabela 52) foi possível identificar a substância **38** como Acetato de (3-hidroxibenzil)metil, e estudos de potencial biológico mostraram que esta substância possui atividade antioxidante⁽¹³⁷⁾.

Tabela 52 – Comparação dos dados de RMN de 1H obtidos com os dados descritos na literatura⁽¹³⁷⁾, da substância Acetato de (3-hidroxibenzil)metil (**38**).

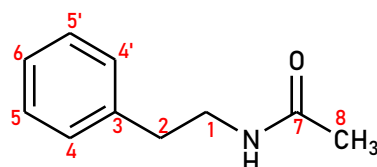
Posição	Experimental*			Literatura**	
	^{13}C δ (ppm)	1H δ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)	1H δ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)
1	157,6	-----	-----	-----	-----
2	114,6	6,74	<i>m</i>	6,82	<i>d</i> (2,1)
3	137,5	-----	-----	-----	-----
4	118,4	6,76	<i>d</i> (7,8)	6,89	<i>d</i> (7,7)
5	129,2	7,15	<i>t</i> (7,8)	7,19	<i>dd</i> (7,7 e 7,7)
6	114,5	6,70	<i>ddd</i> (7,8; 2,5 e 0,9)	6,78	<i>dd</i> (7,7 e 2,1)
7	62,7	4,98	<i>s</i>	5,04	<i>s</i>
8	170,4	-----	-----	-----	-----
9	20,4	2,06	<i>s</i>	2,09	<i>s</i>

*em DMSO- d_6 , 150 e 600 MHz. **em $CDCl_3$, 500 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.30 Substância 15

A substância 15 (Fr. 02_9 do cultivo de *B. parva* em meio de arroz; Figura 83) foi obtida como um óleo amarelado, e sua fórmula molecular $C_{10}H_{13}NO$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados apresentados na literatura ⁽¹³⁸⁾.

Figura 83 – Representação estrutural da substância 15.



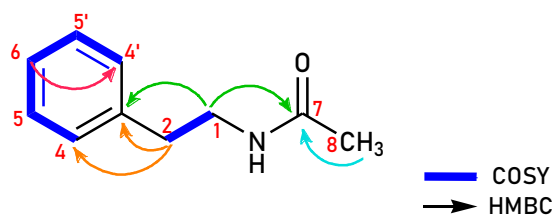
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O espectro de RMN de 1H (Apêndice 152, p. 276) apresentou dois multipletos, integrando para dois hidrogênios aromáticos cada, em δ_H 7,21 (*m*, 2H, H-4 e 4') e em δ_H 7,28 (*m*, 2H, H-5 e 5'), e um multiplete em δ_H 7,18 (*m*, 1H, H-6) integrando para um hidrogênio, caracterizando um sistema aromático monossustituído.

Adicionalmente, foram observados sinal em δ_H 2,78 (*t*, $J = 7,5$ Hz, 2H, H-2) característico de hidrogênios metilênicos benzílicos. Também foi possível observar um triplete em δ_H 3,38 (*t*, $J = 7,5$ Hz, 2H, H-1), característico de hidrogênios metilênicos vizinhos à heteroátomo de N, e sinal em δ_H 1,90 (*s*, 3H, H-5') característico de hidrogênios metílicos α a carbonila.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 153, p. 277). Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 84; Apêndice 154 e Apêndice 155, p. 277 e 278) foi possível propor a estrutura de 15.

Figura 84 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de 15.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A comparação dos dados obtidos com os dados da literatura ⁽¹³⁸⁾ (Tabela 53) possibilitou a identificação de **15** como sendo *N*-(2-feniletil)acetamida, substância presente também no peixe *Ctenopharyngodon idellus* e na planta *Moringa oleífera* Lam..

Tabela 53 – Comparação dos dados de RMN obtidos com os dados descritos na literatura ⁽¹³⁸⁾, da substância *N*-(2-feniletil)acetamida (**15**).

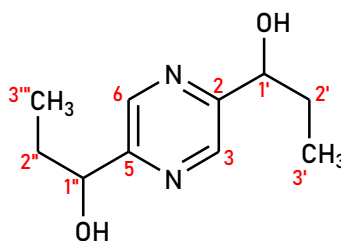
Posição	Experimental*			Literatura**		
	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)
1	41,4	3,38	<i>t</i> (7,5)	40,6	3,51	<i>q</i>
2	36,2	2,78	<i>t</i> (7,5)	35,6	2,81	<i>t</i> (6,6)
3	140,7	-----	-----	138,8	-----	-----
4 e 4'	129,3	7,21	<i>m</i>	128,6	7,24	<i>m</i>
5 e 5'	129,6	7,28	<i>m</i>	128,7	7,31	<i>m</i>
6	126,6	7,18	<i>m</i>	126,5	7,18	<i>m</i>
7	173,4	-----	-----	170,0	-----	-----
8	22,2	1,90	<i>s</i>	23,3	1,95	<i>s</i>
NH	-----	Troca com solvente		-----	5,39	<i>s</i>

*em CD₃OD, 150 e 600 MHz. **em CDCl₃, 150 e 600 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.31 Substância **05**

A substância **05** (Fr. 01_7 do cultivo de *B. parva* em meio de arroz; Figura 85) foi obtida como um óleo amarronzado, e sua fórmula molecular C₁₀H₁₆N₂O₂, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e de Espectrometria de Massas ESI-Qq-TOF, no modo positivo ([M+H] em *m/z* 197,1299; cal. 197,1290; Erro = 4,5 ppm; Apêndice 156, p. 278).

Figura 85 – Representação estrutural da substância **05**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

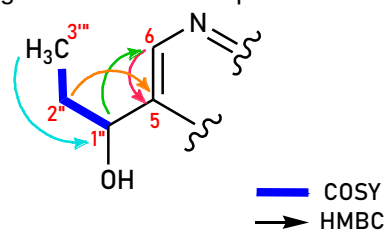
O espectro de RMN de ¹H (Apêndice 157, p. 279) exibiu um singlete em δ_H 8,65 atribuído à hidrogênio aromático (H-3/6); um duplo dubleto em δ_H 4,70 (*dd*, *J* = 7,6 e 5,2 Hz, 1H, H-1'/1'') atribuído à um hidrogênio metínico carbinólico; dois

multipletos, integrando para um hidrogênio cada, em δ_{H} 1,90 e δ_{H} 1,79 (H-2'/2'') atribuídos à hidrogênios metilênicos diastereotópicos, e um tripleto em δ_{H} 0,95 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H, H-3'/3'') atribuído à hidrogênios metílicos.

O espectro de RMN de ^{13}C (Apêndice 158, p. 279) mostrou cinco carbonos que foram atribuídos à: dois carbonos aromáticos (δ_{C} 158,9 e 142,3), um carbono carbinólico (δ_{C} 75,0), um carbono metilênico sp^3 (δ_{C} 31,5) e um carbono metílico (δ_{C} 10,1). Os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos, pela análise dos mapas de contorno do experimento de HSQC (Apêndice 159, p. 280).

As correlações correspondentes de $^1\text{H} \leftrightarrow ^1\text{H}$ e $^1\text{H} \leftrightarrow ^{13}\text{C}$ foram feitas com base nos mapas de contorno COSY e HMBC (Apêndice 160 e Apêndice 161, p. 280 e 281), e nos permitiu propor a estrutura parcial A de **05** (Figura 86).

Figura 86 – Estrutura parcial A de **05**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Com a análise do espectro de massas (Apêndice 156, p. 278), associado com os dados obtidos dos espectros de RMN da substância **05** (Tabela 54), verificou-se que a substância era simétrica, contendo um anel pirazínico, oriundo de duas unidades da estrutura parcial A. O levantamento bibliográfico, realizado na *Web of Science* e *SciFinder*, não trouxe resultados, indicando tratar-se de uma substância inédita, a qual foi identificada como 2,5-(bis-propan-1-ol)-pirazina, nomeada botryospirazina A.

Tabela 54 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **05**, em CD_3OD e 14,1T..

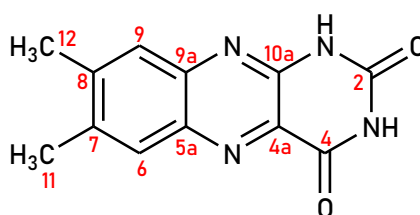
Posição	^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm)	Mult., J (Hz)	HMBC
2 e 5	158,9	-----	-----	-----
3 e 6	142,3	8,65	s	C-2(5)
1' e 1''	75,0	4,70	dd (7,6 e 5,2)	C-2(5)/C-3(6)/C-2'(2'')/C-3'(3'')
2' e 2''	31,5	1,90	m	C-2(5)/C-1'(1'')/C-3'(3'')
		1,79	m	
3' e 3''	10,1	0,95	t (7,4)	C-1'(1'')/C-2'(2'')

Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.32 Substância 17

A substância 17 (Fr. 03_P do extrato de *B. parva* em meio arroz; Figura 87) foi obtida como um sólido amorfo amarelado, com solubilidade reduzida na maioria dos solventes, e sua fórmula molecular $C_{12}H_{10}N_4O_2$ foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D, Espectrometria de Massas ESI-Qq-TOF, no modo negativo ($[M-H]$ em m/z 241,0738; cal. 241,0731; Erro = 2,9 ppm; Apêndice 162, p. 282) e pela comparação com os dados presentes na literatura^(139,140).

Figura 87 – Representação estrutural da substância 17.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O espectro de RMN de ^{13}C (Apêndice 164, p. 283) mostrou 12 sinais de carbono, que foram atribuídos às duas carbonilas de imida (δ_c 160,8 e 150,2), seis carbonos aromáticos quaternários (δ_c 146,5; 144,8; 141,7; 139,0; 138,4 e 130,3), dois carbonos metínicos sp^2 (δ_c 128,8 e 125,9) e dois carbonos de metilas (δ_c 20,3 e 19,7).

O espectro de RMN de 1H (Apêndice 164, p. 283) exibiu seis singletos, dois sinais em δ_H 11,85 (s, NH-3) e δ_H 11,68 (s, NH-1) atribuídos aos hidrogênios das imidas, dois sinais em δ_H 7,92 (s, H-6) e δ_H 7,71 (s, H-9) atribuídos aos hidrogênios aromáticos e dois sinais em δ_H 2,49 (s, H-12) e δ_H 2,46 (s, H-11) atribuídos aos hidrogênios metílicos.

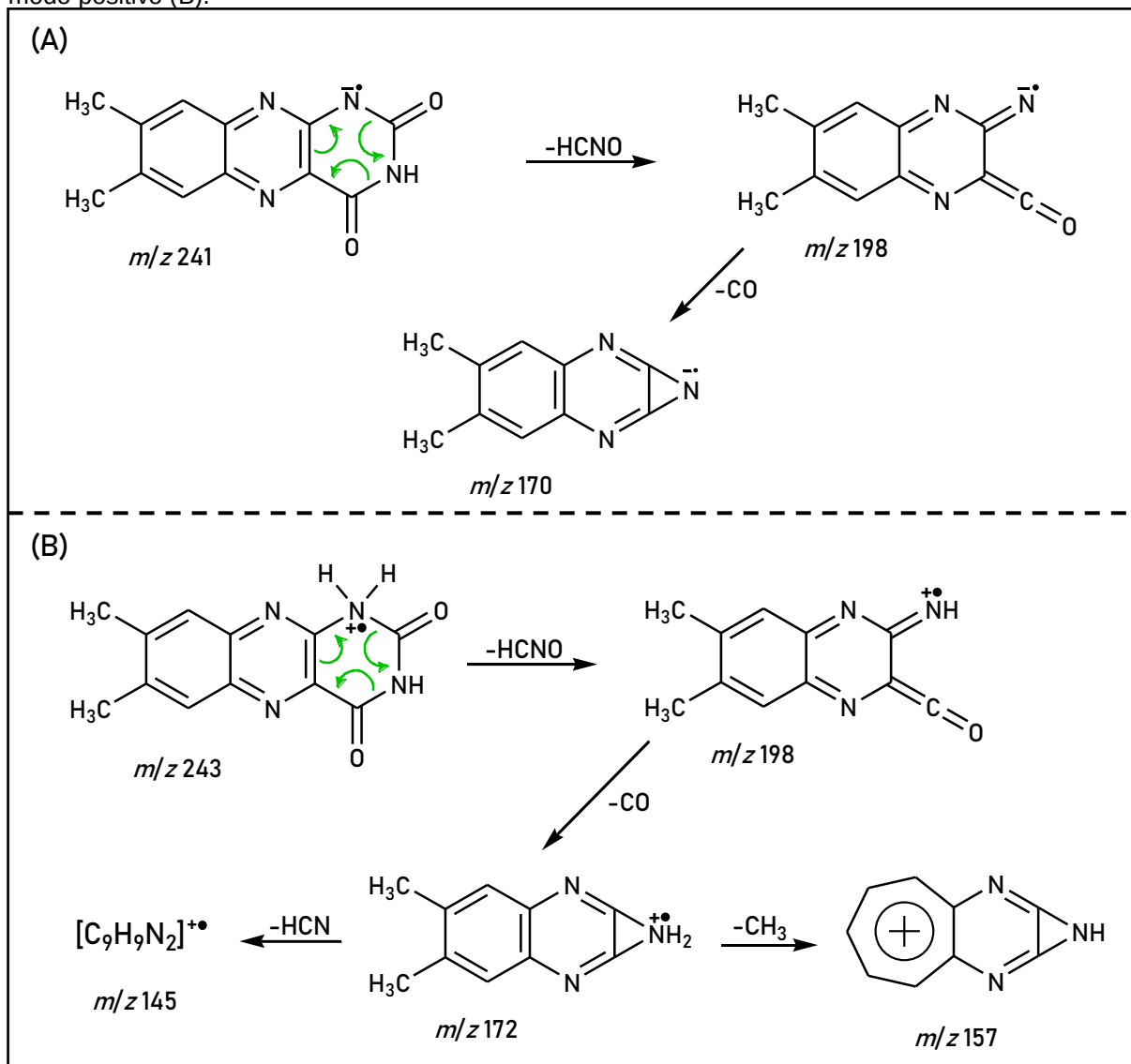
Os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos, pela análise dos mapas de contorno do experimento de HSQC (Apêndice 165, p. 284). As correlações correspondentes de 1H e ^{13}C foram feitas com base no mapa de contorno HMBC (Apêndice 166, p. 284), em que foi possível verificar a interação de H-6 com C-7, C-9a e C-12, e de H-9 com C-5a, C-8 e C-11, confirmando a presença de um anel aromático tetrassubstituído.

Com a análise da fragmentação de 17 (Apêndice 162, p. 282), no modo positivo e negativo, ficou evidente que a fragmentação tem início com a saída do grupo HNCO do anel tautomérico de pirimidina, seguido da saída do grupo CO, em ambos

os modos de análise, como mostrado na Figura 88. Adicionalmente, no modo positivo, verifica-se que do fragmento m/z 172 gerado, é possível observar a eliminação de um CH_3 , verificada pelo sinal de m/z 157, e também da espécie m/z 172 verifica-se a eliminação de HCN verificada pelo sinal de m/z 145.

Dessa forma, a comparação com os dados presentes na literatura ^(139,140) (Tabela 55, p. 162) permitiram identificar a substância como 7,8-dimetilbenzo[g]pteridina-2,4(1H, 3H)-diona, nomeada Lumichrome, presente em alguns fungos, como: *Beauveria bassiana*, *Aspergillus sydowii*, *Neosartorya fennelliae* e *Neosartorya tsunodae*. Estudos de potencial biológico mostraram que esta substância possui atividade citotóxica ⁽¹⁴¹⁾.

Figura 88 – Esquema de fragmentação da substância **17**, obtidas no modo negativo (A) e no modo positivo (B).



Fonte: ilustração adaptada de Brown ⁽¹⁴⁰⁾, 2020.

Tabela 55 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁽¹³⁹⁾, da substância Lumichrome (**17**).

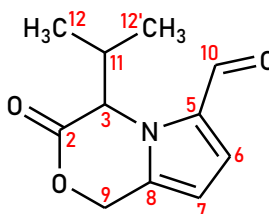
Posição	Experimental*			Literatura**		
	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)
01	-----	11,68	s	-----	11,69	s
02	150,2	-----	-----	150,0	-----	-----
03	-----	11,85	s	-----	11,86	s
04	160,8	-----	-----	160,6	-----	-----
04a	130,3	-----	-----	130,6	-----	-----
05a	138,4	-----	-----	138,4	-----	-----
06	128,8	7,92	s	128,7	7,91	s
07	144,8	-----	-----	144,6	-----	-----
08	139,0	-----	-----	138,9	-----	-----
09	125,9	7,71	s	125,8	7,70	s
09a	141,7	-----	-----	141,6	-----	-----
10a	146,5	-----	-----	146,4	-----	-----
11	20,3	2,49	s	20,2	2,48	s
12	19,7	2,46	s	19,5	2,46	s

*em DMSO-*d*₆, 150 e 600 MHz. **em DMSO-*d*₆, 125 e 500MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.33 Substância **40**

A substância **40** (Fr. 05_3 do cultivo de *P. stromaticum* em meio de ext. de malte; Figura 89) foi obtida como um óleo amarronzado, e sua fórmula molecular C₁₁H₁₃NO₃, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados apresentados na literatura ⁽¹⁴²⁾.

Figura 89 – Representação estrutural da substância **40**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

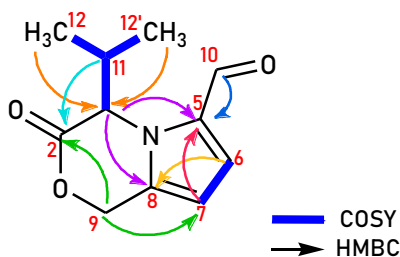
O espectro de RMN de ¹H (Apêndice 167, p. 285) apresentou dois dubletos em δ_H 7,17 (*d*, *J* = 4,0; 1H, H-6) e δ_H 6,34 (*d*, *J* = 4,0; 1H, H-7), integrando para um hidrogênio olefínico cada, caracterizando uma subestrutura de dieno com conformação *s-cis*. Também foi possível observar um singlete em δ_H 9,50 (*s*, 1H, H-

10), que apresentou correlação no mapa de contorno HSQC (Apêndice 169, p. 286) com um carbono em δ_C 179,9, indicando a presença de um grupo aldeído.

Adicionalmente, foram observados sinais em δ_H 5,64 (*d*, *J* = 15,5 Hz, 1H, H-9') e δ_H 5,52 (*d*, *J* = 15,5 Hz, 1H, H-9''), característico de hidrogênios hidroximetilênicos geminais, e em δ_H 5,36 (*d*, *J* = 8,0 Hz, 1H, H-3) característico de hidrogênio metínico α a carbonila. Por fim, foi observado um multiplete em δ_H 2,32 (*m*, 1H, H-11) e dois dubletos em δ_H 0,96 (*d*, *J* = 6,8 Hz, 1H, H-12) e δ_H 0,91 (*d*, *J* = 6,8 Hz, 1H, H-12'), caracterizando um grupo isopropila.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 169, p. 286). Com o mapa de contorno de COSY (Apêndice 170, p. 286), comprovou-se as interações 1H - 1H dos hidrogênios H-6 e H-7, bem como dos hidrogênios H-3/H-11 e H-11 com H-12 e 12' (Figura 90, p. 163). Pelo mapa de contorno de HMBC (Apêndice 171, p. 287) foi possível observar a correlação de H-10 com C-5, de H-9 com C-2 e C-7 e de H-11 com C-2 (Figura 90). Com essas informações, foi possível propor a estrutura base de **40** como sendo uma lactona pirrólica.

Figura 90 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de **40**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Com a comparação dos dados obtidos com os dados presentes na literatura⁽¹⁴²⁾ (Tabela 56, p. 164) foi possível identificar a substância **40** como 3,4-dihidro-4-(1-metiletil)-3-oxo-1*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]oxazina-6-carboxaldeído, presente também nos fungos *Xylaria nigripes* e *Jishengella endophytica*, e nos frutos de *Morus alba*.

Tabela 56 – Comparação dos dados de RMN de ^1H obtidos com os dados descritos na literatura ⁽¹⁴²⁾, da substância 3,4-dihidro-4-(1-metiletil)-3-oxo-1*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]oxazina-6-carboxaldeído (**40**).

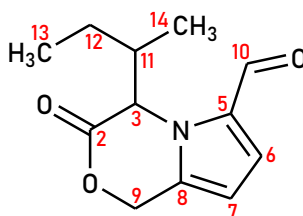
Posição	Experimental*			Literatura**		
	$^{13}\text{C } \delta$ (ppm)	$^1\text{H } \delta$ (ppm)	Multiplicidade, <i>J</i> (Hz)	$^{13}\text{C } \delta$ (ppm)	$^1\text{H } \delta$ (ppm)	Multiplicidade, <i>J</i> (Hz)
2	166,5	-----	-----	166,7	-----	-----
3	62,5	5,36	<i>d</i> (8,0)	63,1	5,36	<i>d</i> (8,0)
5	131,6	-----	-----	131,4	-----	-----
6	125,2	7,17	<i>d</i> (4,0)	125,4	7,17	<i>d</i> (4,0)
7	106,7	6,34	<i>d</i> (4,0)	107,2	6,34	<i>d</i> (4,0)
8	132,4	-----	-----	132,7	-----	-----
9	63,8	5,64	<i>d</i> (15,5)	64,2	5,64	<i>d</i> (15,5)
		5,52	<i>d</i> (15,5)		5,53	<i>d</i> (15,5)
10	179,7	9,50	<i>s</i>	180,2	9,51	<i>s</i>
11	32,0	2,32	<i>m</i>	32,4	2,33	<i>m</i>
12	18,7	0,96	<i>d</i> (6,8)	19,3	0,97	<i>d</i> (6,8)
12'	18,3	0,91	<i>d</i> (6,8)	18,8	0,92	<i>d</i> (6,8)

* e ** em DMSO-*d*₆, 150 e 600 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.34 Substância **41**

A substância **41** (Fr. 05_6 do cultivo de *P. stromaticum* em meio de ext. de malte; Figura 91) foi identificada em mistura, e sua fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_3$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados apresentados na literatura ⁽¹⁴²⁾.

Figura 91 – Representação estrutural da substância **41**.



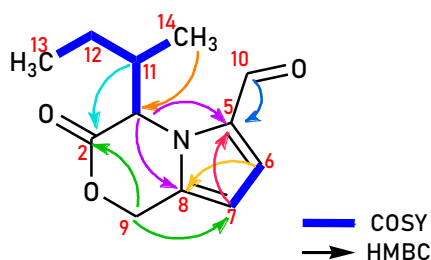
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A substância **41** apresentou dados espectroscópicos parecidos com os da substância **40** (Apêndice 172, p. 287), em que as diferenças observadas foram a presença de hidrogênios metilênicos diastereotópicos δ_{H} 1,38 (*m*, 1H, H-12') e δ_{H} 1,22 (*m*, 1H, H-12'') e a diferença da multiplicidade das metilas, que em **40** se apresentaram como dois dubletos e em **41** se apresentam como um dubleto e um tripleto

(coalescendo). Estas observações, evidenciam que o aminoácido de **41** trata-se da Isoleucina ao invés da Valina, observada em **40**.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 174, p. 288). Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 92; Apêndice 175 e Apêndice 176, p. 289 e 289) foi possível propor a estrutura de **41**.

Figura 92 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de **41**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Com a comparação dos dados obtidos com os dados presentes na literatura ⁽¹⁴²⁾ (Tabela 57) foi possível identificar a substância **41** como 3,4-dihidro-4-(1-metilpropil)-3-oxo-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]oxazina-6-carboxaldeído, presente também no fungo *Jishengella endophytica*, e nos frutos de *Morus alba*.

Tabela 57 – Comparação dos dados de RMN de ¹H obtidos com os dados descritos na literatura ⁽¹⁴²⁾, da substância 3,4-dihidro-4-(1-metilpropil)-3-oxo-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]oxazina-6-carboxaldeído (**41**).

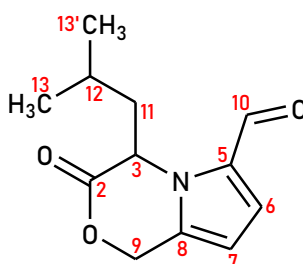
Posição	Experimental*			Literatura**		
	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)
2	166,5	-----	-----	166,5	-----	-----
3	61,5	5,45	d (7,0)	62,0	5,46	d (6,9)
5	131,6	-----	-----	131,2	-----	-----
6	125,5	7,18	d (4,0)	125,6	7,20	d (3,8)
7	106,5	6,33	d (4,0)	107,1	6,34	d (3,8)
8	132,4	-----	-----	132,8	-----	-----
9	63,8	5,63	d (15,6)	64,4	5,64	d (15,6)
		5,53	d (15,6)		5,54	d (15,6)
10	179,7	9,48	s	180,0	9,50	s
11	38,7	2,07	m	39,3	2,08	m
12	25,2	1,38	m	25,8	1,39	m
		1,22	m		1,25	m
13	11,3	0,89	d (7,3)	11,8	0,91	t (7,1)
14	14,9	0,88	d (7,1)	15,5	0,90	d (7,0)

* e ** em DMSO-*d*₆, 150 e 600 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.35 Substância 42

A substância 42 (Fr. 05_7 e Fr. 06_3 do cultivo de *P. stromaticum* em meio de ext. de malte; Figura 93) foi identificada em mistura, e sua fórmula molecular $C_{12}H_{15}NO_3$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados apresentados na literatura ⁽¹⁴²⁾.

Figura 93 – Representação estrutural da substância 42.

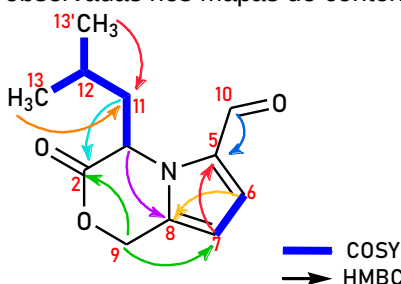


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A substância 42 apresentou dados espectroscópicos parecidos com os da substância 41 (Apêndice 177, p. 290), em que a diferença observada se encontra na multiplicidade das metilas, que em 41 se apresentavam como um dubleto e um tripleto e em 42 se apresentaram como dois dubletos. Esta observação, evidencia que o aminoácido de 42 trata-se da Leucina ao invés da Isoleucina, observada em 41.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 179, p. 291). Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 94; Apêndice 180 e Apêndice 181, p. 291 e 292) foi possível propor a estrutura de 42.

Figura 94 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de 42.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Com a comparação dos dados obtidos com os dados presentes na literatura ⁽¹⁴²⁾ (Tabela 58) foi possível identificar a substância **42** como 3,4-dihidro-4-(2-metilpropil)-3-oxo-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]oxazina-6-carboxaldeído, presente também no fungo *Jishengella endophytica*, e nos frutos de *Morus alba*.

Tabela 58 – Comparação dos dados de RMN de ¹H obtidos com os dados descritos na literatura ⁽¹⁴²⁾, da substância 3,4-dihidro-4-(2-metilpropil)-3-oxo-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]oxazina-6-carboxaldeído (**42**).

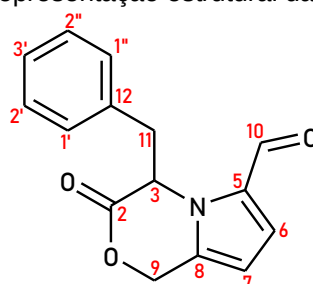
Posição	Experimental*			Literatura**		
	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)
2	167,1	-----	-----	167,5	-----	-----
3	46,0	5,65	dd (10,0 e 5,6)	56,4	5,65	dd (10,2 e 5,7)
5	130,5	-----	-----	130,7	-----	-----
6	124,7	7,14	d (3,8)	125,2	7,14	d (4,0)
7	106,7	6,32	d (3,8)	107,2	6,31	d (4,0)
8	132,0	-----	-----	132,5	-----	-----
9	63,3	5,71	d (15,2)	63,7	5,70	d (15,2)
		5,52	d (15,2)		5,51	d (15,2)
10	179,6	9,49	s	180,1	9,49	s
11	40,9	2,00	m	41,3	2,00	ddd (13,4; 10,2 e 4,3)
		1,60	m		1,60	ddd (13,4; 9,3 e 5,7)
12	24,3	1,65	m	24,7	1,66	m
13	21,2	1,00	d (6,3)	21,6	1,00	d (6,4)
13'	22,9	0,90	d (6,3)	23,3	0,89	d (6,4)

* e ** em DMSO-*d*₆, 150 e 600 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.36 Substância **43**

A substância **43** (Fr. 06_5 do cultivo de *P. stromaticum* em meio de ext. de malte; Figura 95) foi identificada em mistura, e sua fórmula molecular C₁₅H₁₃NO₃, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados apresentados na literatura ⁽¹⁴²⁾.

Figura 95 – Representação estrutural da substância **43**.

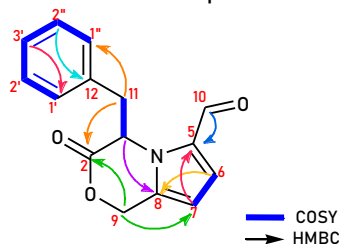


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A substância **43** apresentou dados espectroscópicos parecidos com os da substância **42** (Apêndice 182, p. 292), em que a diferença observada se encontra na ausência de hidrogênios metílicos e na presença de hidrogênios aromáticos em **43**. Estas observações, evidenciam que o aminoácido de **43** trata-se da Fenilalanina ao invés da Leucina, observada em **42**.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 184, p. 293). Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 96; Apêndice 185 e Apêndice 186, p. 294 e 294) foi possível propor a estrutura de **43**.

Figura 96 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de **43**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Tabela 59 – Comparação dos dados de RMN de ^1H obtidos com os dados descritos na literatura ⁽¹⁴²⁾, da substância 3,4-dihidro-4-(fenilmetil)-3-oxo-1H-pirrólo[2,1-c][1,4]oxazina-6-carboxaldeído (**43**).

Posição	Experimental*			Literatura**		
	$^{13}\text{C } \delta$ (ppm)	$^1\text{H } \delta$ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)	$^{13}\text{C } \delta$ (ppm)	$^1\text{H } \delta$ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)
2	166,8	-----	-----	167,2	-----	-----
3	58,6	5,84	<i>t</i> (5,1)	59,0	5,84	<i>t</i> (5,6)
5	130,3	-----	-----	130,7	-----	-----
6	124,8	7,19	<i>d</i> (3,7)	125,4	7,19	<i>d</i> (4,0)
7	105,9	6,16	<i>d</i> (3,7)	106,4	6,17	<i>d</i> (4,0)
8	131,9	-----	-----	132,4	-----	-----
9	63,2	5,24	<i>d</i> (15,1)	63,6	5,24	<i>d</i> (15,1)
		4,05	<i>d</i> (15,1)		4,06	<i>d</i> (15,1)
10	179,5	9,51	<i>s</i>	179,9	9,51	<i>s</i>
11	38,9	3,34 [£]	-----	39,5	3,33	<i>m</i>
12	134,7	-----	-----	135,1	-----	-----
1' e 1''	129,4	6,84	<i>d</i> (7,0)	129,8	6,85	<i>d</i> (7,3)
2' e 2''	128,7	7,24	<i>m</i>	129,1	7,25	<i>t</i> (7,3)
3'	127,7	7,29	<i>m</i>	128,2	7,29	<i>t</i> (7,3)

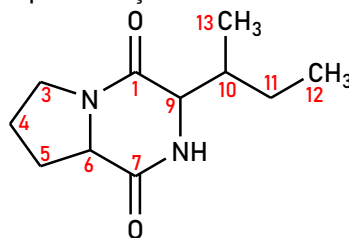
£ - sinal sobreposto com o sinal da água. * e ** em DMSO- d_6 , 150 e 600 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

Com a comparação dos dados obtidos com os dados presentes na literatura ⁽¹⁴²⁾ (Tabela 59, p. 168) foi possível identificar a substância **43** como 3,4-dihidro-4-(fenilmetil)-3-oxo-1*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]oxazina-6-carboxaldeído, presente também no fungo *Jishengella endophytica*, e nos frutos de *Morus alba*.

7.37 Substância **35**

A substância **35** (Fr. 04_5, oriunda do extrato de *P. stromaticum* em meio de extr. de malte; Figura 97) foi obtida como um óleo amarelado, e sua fórmula molecular $C_{11}H_{18}N_2O_2$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados apresentados na literatura ⁽¹⁴³⁾.

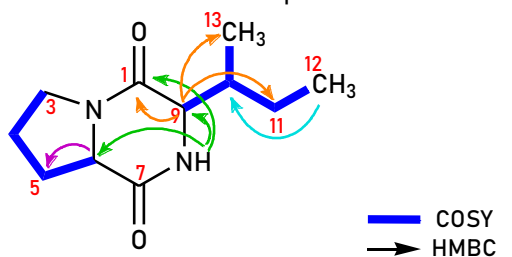
Figura 97 – Representação estrutural da substância **35**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

O espectro de RMN de 1H (Apêndice 187, p. 295) apresentou dois sinais intensos em δ_H 0,98 (*d*, $J = 7,1$ Hz, 3H, H-13) e δ_H 0,82 (*t*, $J = 7,5$ Hz, 3H, H-12), integrando para três hidrogênios cada, que foram atribuídos à duas metilas. Observou-se também, um sinal em δ_H 3,95 (*s*!, 1H, H-9) e δ_H 4,10 (*t*, $J = 7,7$ Hz, 1H, H-6). Adicionalmente, foram visualizados multipletos em δ_H 2,13 (*m*, 1H); δ_H 1,88-1,75 (*m*, 3H) e δ_H 1,37-1,22 (*m*, 2H) atribuídos à três metilenos.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 188, p. 295). As correlações observadas no mapa de contorno HMBC (Apêndice 190, p. 296) entre H-6 $\leftrightarrow$ C-5 e H-9 $\leftrightarrow$ C-1 (Figura 98, p. 170), nos permitiu identificar essa substância como sendo da classe das dicetopiperazinas. Dessa forma, as correlações observadas no mapa de contorno de COSY (Apêndice 189, p. 296) dos H-3 $\leftrightarrow$ H-4 $\leftrightarrow$ H-5 $\leftrightarrow$ H-6 foi possível atribuir a unidade -CH₂CH₂CH₂CH-, atribuída à uma unidade do aminoácido Prolina.

Figura 98 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de **35**.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A presença de duas metilas, uma na forma de duplete e a segunda como um tripleto, associado à correlação observada no mapa de contorno HMBC entre H-13 ↔ C-9, permitiu definir o segundo aminoácido como sendo a Isoleucina. Com a comparação dos dados acima com os dados presentes na literatura⁽¹⁴³⁾ (Tabela 60) foi possível identificar a substância **35** como sendo a Ciclo(Pro-Ile), presente também nos organismos *Aspergillus sp.*, *Bacillus sp.* e *Sarcodon aspratus*. Estudos de potencial biológico mostraram que esta substância possui atividade antibiótica⁽¹⁴⁴⁾.

Tabela 60 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura⁽¹⁴³⁾, da substância Ciclo(Pro-Ile) (**35**).

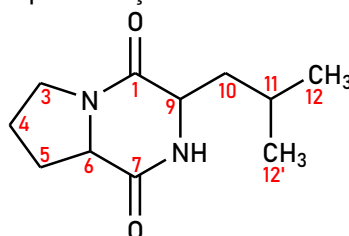
Posição	Experimental*			Literatura**		
	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)	Multip., J (Hz)	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)	Multip., J (Hz)
01	165,2	----	----	170,1	----	----
03	44,3	Sobreposto com sinal da água		45,4	3,61-3,48	<i>m</i>
04	21,8	1,88-1,75	<i>m</i>	22,7	2,01-1,90	<i>m</i>
					1,90-1,81	
05	28,1	2,14	<i>m</i>	28,3	2,31-2,22	<i>m</i>
		1,84	<i>m</i>		2,11-2,02	
06	58,0	4,10	<i>t</i> (7,7)	58,9	4,07	<i>t</i>
07	165,3	----	----	165,0	----	----
09	59,0	3,95	<i>sl</i>	60,4	3,96	<i>brs</i>
10	34,5	2,02	<i>m</i>	35,3	2,42-2,31	<i>m</i>
11	23,7	1,37-1,22	<i>m</i>	24,5	1,52-1,39	<i>m</i>
					1,32-1,11	<i>m</i>
12	11,9	0,82	<i>t</i> (7,5)	12,0	0,92	<i>t</i>
13	14,8	0,98	<i>d</i> (7,1)	15,7	1,05	<i>d</i>
N-H	----	7,95	<i>s</i>	----	5,99	<i>brs</i>

*em DMSO-*d*₆, 150 e 600 MHz. **em CDCl₃, 75 e 300 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.38 Substância 36

A substância 36 (Fr. 04_6, oriunda do extrato de *P. stromaticum* em meio de extr. de malte; Figura 99) foi obtida como um óleo amarelado, e sua fórmula molecular $C_{11}H_{18}N_2O_2$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados apresentados na literatura ⁽¹⁴³⁾.

Figura 99 – Representação estrutural da substância 36.

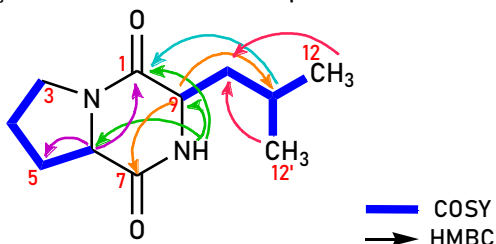


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A substância 36, apresentou espectro de RMN de 1H (Apêndice 191, p. 297) semelhante à substância 35, em que a diferença se encontra na presença de um sinal como duplo dubleto integrando para seis hidrogênios em 36, diferentemente do observado para 35, em que as metilas se apresentavam com um dubleto e como um tripleto. Dessa forma, o segundo aminoácido em 36 trata-se da Leucina ao invés de Isoleucina, observada em 35.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 193, p. 298). Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 100; Apêndice 194 e Apêndice 195, p. 298 e 299) foi possível propor a estrutura de 36.

Figura 100 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de 36.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Com a comparação dos dados acima com os dados presentes na literatura ⁽¹⁴³⁾ (Tabela 61, p. 172) foi possível identificar a substância 36 como sendo a Ciclo(Pro-

Leu), presente também nos organismos *Sordariomycetes* sp., *Chryseobacterium* sp., *Streptomyces cirratus*, entre outros. Estudos de potencial biológico mostraram que esta substância possui atividade antibiótica ⁽¹⁴⁴⁾ e antifúngica ⁽¹⁴⁵⁾.

Tabela 61 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura ⁽¹⁴³⁾, da substância Ciclo(Pro-Leu) (**36**).

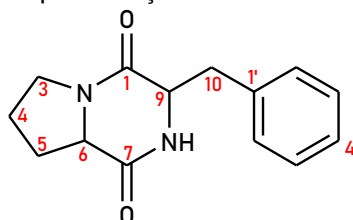
Posição	Experimental*			Literatura**		
	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)	Multip., J (Hz)	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)	Multip., J (Hz)
01	170,4	----	----	170,3	----	----
03	44,9	3,39	<i>m</i>	45,0	3,59-3,49	<i>m</i>
		3,33	<i>m</i>			
04	22,5	1,95-1,71	<i>m</i>	22,6	2,02-1,99	<i>m</i>
					1,94-1,86	<i>m</i>
05	27,4	2,12	<i>m</i>	28,0	2,13	<i>m</i>
		1,90	<i>m</i>			
06	58,3	4,18	<i>t</i> (8,1)	59,1	4,12	<i>t</i>
07	166,6	----	----	166,4	----	----
09	52,4	4,00	<i>t</i> (6,1)	53,2	4,01	<i>brs</i>
10	37,8	1,35	<i>ddd</i> (13,7; 7,5 e 6,1)	38,2	2,01	<i>ddd</i>
		1,75	<i>m</i>		1,76-1,71	<i>m</i>
11	24,1	1,87	<i>m</i>	24,4	1,70-1,69	<i>m</i>
12	21,9	0,86	<i>d</i> (6,1)	23,1	0,94	<i>d</i>
12'	21,9	0,86	<i>d</i> (6,1)	21,1	1,00	<i>d</i>
N-H	----	8,00	<i>s</i>	----	5,91	<i>brs</i>

*em DMSO-*d*₆, 150 e 600 MHz. **em CDCl₃, 75 e 300 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.39 Substância **37**

A substância **37** (Fr. 04_8, oriunda do extrato de *P. stromaticum* em meio de extr. de malte, Figura 101) foi obtida como um óleo amarelado, e sua fórmula molecular C₁₄H₁₆N₂O₂, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados presentes na literatura ⁽¹⁴³⁾.

Figura 101 – Representação estrutural da substância **37**.

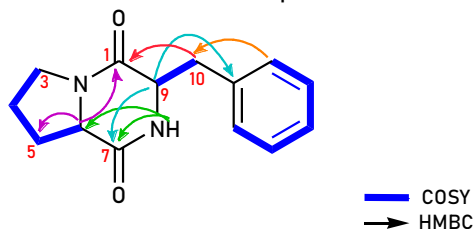


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A substância **37**, apresentou espectro de RMN de ^1H (Apêndice 196, p. 299) semelhante à substância **36**, em que a diferença se encontra na ausência do sinal em δ_{H} 0,86 (*d*, $J = 5,1$ Hz; 6H; H-12 e 12'), referentes à metilas em **36** e na presença de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,19 (*m*, 1H; H-4') e em δ_{H} 7,26 (*m*; 4H; H-2' e 2"/3' e 3") em **37**, evidenciando um sistema aromático monossustituído. Diante dessas observações, pode-se aferir que o segundo aminoácido em **37** trata-se da Fenilalanina ao invés de Leucina, observada em **36**.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 197, p. 300). Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Figura 102; Apêndice 198 e Apêndice 199, p. 300 e 301) foi possível propor a estrutura de **37**.

Figura 102 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC de **37**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Tabela 62 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura⁽¹⁴¹⁾, da substância Ciclo(Pro-Phe) (**37**).

Posição	Experimental*			Literatura**		
	^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)	^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)
01	169,2	----	----	169,4	----	----
03	44,3	3,39	<i>m</i>	45,2	3,69-3,61	<i>m</i>
		3,27	<i>m</i>		3,61-3,50	<i>m</i>
04	21,5	1,72	<i>m</i>	22,2	1,92-1,81	<i>m</i>
05	27,4	2,00	<i>dt</i> (11,8 e 4,8)	28,3	2,38-2,28	<i>m</i>
		1,41	<i>m</i>		2,10-2,00	<i>m</i>
06	58,2	4,07	<i>m</i>	58,9	4,08	<i>t</i>
07	165,2	----	----	164,9	----	----
09	55,5	4,35	<i>t</i> (4,9)	56,1	4,27	<i>dd</i>
10	35,1	3,04	<i>dq</i> (14,2 e 4,9)	36,6	3,59-3,45	<i>m</i>
					2,77	<i>dd</i>
01'	137,5	----	----	135,8	----	----
02' e 02"	129,5	7,26	<i>m</i>	128,9	7,41-7,18	<i>m</i>
03' e 03"	128,1	7,26	<i>m</i>	127,3	7,41-7,18	<i>m</i>
04'	126,3	7,19	<i>m</i>	129,1	7,41-7,18	<i>m</i>
N-H	----	7,98	<i>s</i>	----	5,62	<i>brs</i>

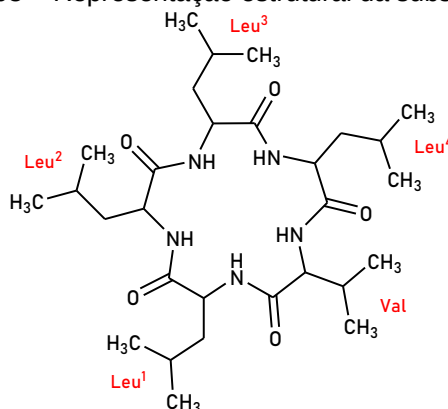
*em DMSO- d_6 , 150 e 600 MHz. **em CDCl₃, 75 e 300 MHz. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

Com a comparação dos dados acima com os dados presentes na literatura ⁽¹⁴³⁾ (Tabela 62, p. 173) foi possível identificar a substância **37** como sendo a Ciclo(Pro-Phe), presente em diversos organismos, como: *Sargassum wightii*, *Sordariomycetes* sp., *Burkholderia vietnamiensis*, *Nigrospora sphaerica*, entre outros. Estudos de potencial biológico mostraram que esta substância possui atividade antibiótica ⁽¹⁴⁴⁾, antifúngica ⁽¹⁴⁵⁾ e antitumoral ⁽¹⁴⁶⁾.

7.40 Substância **23**

A substância **23** (Fr. 06_P_1, oriunda do extrato de *B. parva* em meio de arroz; Figura 103) foi obtida como um sólido incolor amorfo, e sua fórmula molecular $C_{29}H_{53}N_5O_5$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados presentes na literatura ⁽¹⁴⁷⁾.

Figura 103 – Representação estrutural da substância **23**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020,

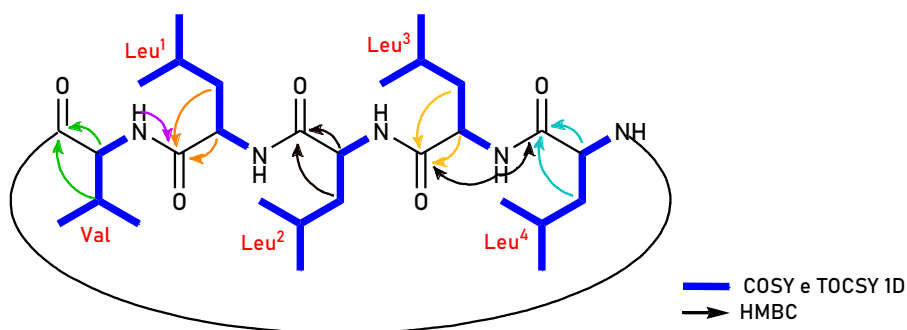
O espectro de RMN de ^{13}C (Apêndice 201, p. 302) evidenciou 29 átomos de carbono, sendo: cinco carboxílicos (δ_c 172,5; 172,3; 171,9; 171,1 e 170,5); cinco carbonos ligados à átomos de N (δ_c 59,0; 55,1; 51,9; 51,5 e 50,5); quatro carbonos metilênicos (δ_c 41,4; 40,1; 39,9 e 38,8); cinco carbonos metínico sp^3 (δ_c 29,2; 24,7; 24,7; 24,6 e 24,3), e os outros dez sinais foram atribuídos à carbonos metílicos.

O espectro de RMN de 1H (Apêndice 200, p. 301) evidenciou cinco sinais de hidrogênios desblindados na região de δ_H 7,50-9,00, integrando para um hidrogênio cada, que foram atribuídos à hidrogênios de amida. Adicionalmente, foram observados quatro sinais na região de δ_H 3,70-4,50, três integrando para um

hidrogênio cada e um integrando para dois hidrogênios, que foram atribuídos à hidrogênios α a carbonila. Por fim, foi observado vários multipletos da região de alto campo, atribuídos à hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 202, p. 302). Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Apêndice 203 e Apêndice 204, p. 303 e 303) e do espectro de TOCSY 1D (Apêndice 205, p. 304), foi possível observar cinco sistemas de spin, verificando a presença de um resíduo de valina (Val) e quatro resíduos de leucina (Leu), sendo possível propor a estrutura de **23** (Figura 104).

Figura 104 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC, e nos espectros de TOCSY 1D de **23**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Com a comparação dos dados obtidos (Tabela 63) com os da literatura⁽¹⁴⁷⁾, foi possível identificar a substância **23** como sendo a Ciclo(Leu-Leu-Leu-Leu-Val), presente também no endófito *Fusarium decemcellulare*.

Tabela 63 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura⁽¹⁴⁵⁾ da substância Ciclo(Leu-Leu-Leu-Leu-Val) (**23**).

Unidade	Nº	Experimental*			Literatura**		
		$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multipl.; J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multipl.; J (Hz)
Leu ¹	1	171,1	-----	-----	171,5	-----	-----
	2	51,9	4,29	td (9,2 e 6,1)	52,2	4,32	m
	3	40,1	1,63	m	40,6	1,44	m
			1,49	m		1,55	m
	4	24,6	1,51	m	25,1	1,44	m
	5	22,8	0,91	d (6,0)	22,6	0,90	m
	5'	22,3	0,86	d (6,0)	23,1	0,86	m
	NH	-----	7,80	sl	-----	7,21	brs

Cont. Tabela 63 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura⁽¹⁴⁷⁾, da substância Ciclo(Leu-Leu-Leu-Leu-Val) (**23**).

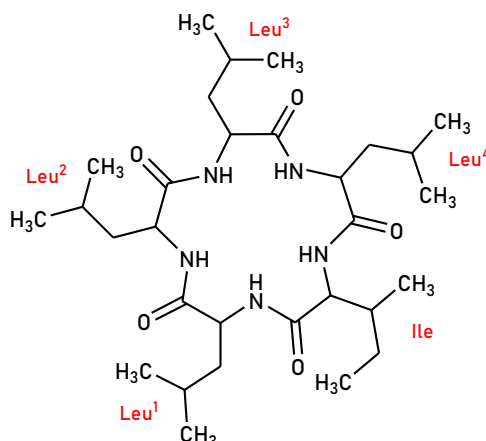
Leu ²	1	172,3	-----	-----	172,0	-----	-----
	2	55,1	3,88	<i>dd</i> (13,9 e 8,1)	52,6	4,07	<i>m</i>
	3	39,8	1,76	<i>m</i>	40,4	1,51	<i>m</i>
			1,52	<i>m</i>			
	4	24,7	1,49	<i>m</i>	24,8	1,59	<i>m</i>
	5	22,8	0,88	<i>d</i> (6,3)	21,1	0,78	<i>d</i> (6,5)
	5'	21,8	0,83	<i>d</i> (6,3)	23,5	0,87	<i>m</i>
	NH	-----	8,35	<i>sl</i>	-----	8,59	<i>d</i> (8,0)
Leu ³	1	172,0	-----	-----	172,1	-----	-----
	2	51,5	4,35	<i>m</i>	52,5	4,17	<i>m</i>
	3	38,8	1,53	<i>m</i>	39,2	1,48	<i>m</i>
			1,38	<i>m</i>		1,37	<i>m</i>
	4	24,7	1,46	<i>m</i>	24,8	1,45	<i>m</i>
	5	22,2	0,90	<i>d</i> (6,5)	22,9	0,88	<i>d</i> (6,0)
	5'	22,6	0,83	<i>d</i> (6,5)	22,5	0,83	<i>m</i>
	NH	-----	8,65	<i>d</i> (6,4)	-----	8,71	<i>d</i> (6,5)
Leu ⁴	1	172,5	-----	-----	173,3	-----	-----
	2	50,5	4,33	<i>m</i>	50,7	4,43	<i>m</i>
	3	41,4	1,41	<i>m</i>	42,2	1,37	<i>m</i>
			1,34	<i>m</i>			
	4	24,3	1,48	<i>m</i>	25,1	1,51	<i>m</i>
	5	22,9	0,86	<i>d</i> (6,5)	23,3	0,88	<i>m</i>
	5'	22,5	0,86	<i>d</i> (6,5)	22,3	0,88	<i>m</i>
	NH	-----	7,74	<i>sl</i>	-----	7,86	<i>d</i> (8,5)
Val	1	170,5	-----	-----	171,7	-----	-----
	2	59,0	4,07	<i>dd</i> (9,2 e 6,0)	65,6	3,20	<i>t</i> (8,5)
	3	29,2	2,16	<i>dq</i> (13,5 e 6,8)	28,2	2,50	<i>m</i>
	4	19,3	0,82	<i>m</i>	20,1	0,83	<i>d</i> (6,0)
	4'	17,6	0,82	<i>m</i>	19,8	0,83	<i>d</i> (6,0)
	NH	-----	8,27	<i>d</i> (9,2)	-----	8,42	br s

* em DMSO-*d*₆, 150 e 600 MHz, ** em DMSO-*d*₆, 125 e 500 MHz, Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.41 Substância **24**

A substância **24** (Fr. 06_P_5, oriunda do extrato de *B. parva* em meio de arroz, Figura 105, p. 177) foi obtida como um sólido incolor amorfo, e sua fórmula molecular C₃₀H₅₅N₅O₅, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados presentes na literatura⁽¹⁴⁷⁾.

Figura 105 – Representação estrutural da substância **24**.

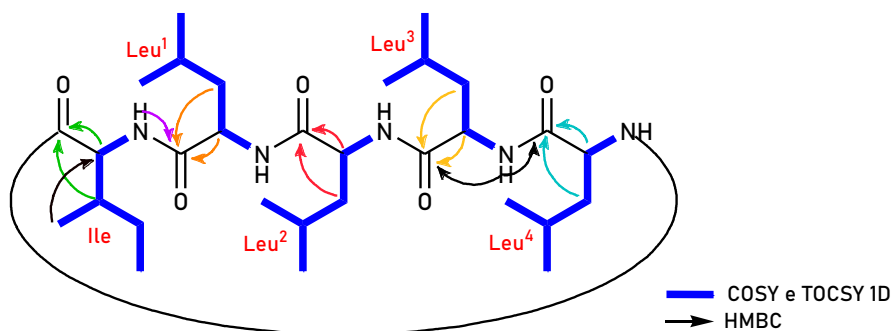


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A substância **24**, apresentou dados espectroscópicos (Apêndice 206 e Apêndice 207, p. 304 e 305) semelhante à substância **23**, em que a diferença é referente à quantidade de carbonos, em que **24** apresentou uma unidade $-CH_2-$ a mais que **23**. Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 208, p. 305).

Com essas informações, associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC (Apêndice 209 e Apêndice 210, p. 306 e 306) e do espectro de TOCSY 1D (Apêndice 211, p. 307), foi possível observar cinco sistemas de spin, verificando a presença de um resíduo de isoleucina (Ile) e quatro resíduos de leucina (Leu), sendo possível propor a estrutura de **24** (Figura 106).

Figura 106 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC, e nos espectros de TOCSY 1D de **24**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Com a comparação dos dados obtidos (Tabela 64) com os da literatura⁽¹⁴⁷⁾, foi possível identificar a substância **24** como sendo a Ciclo(Leu-Leu-Leu-Leu-Ile), presente também no endófito *Fusarium decemcellulare*.

Tabela 64 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura⁽¹⁴⁷⁾ da substância Ciclo (Leu-Leu-Leu-Leu-Ile) (**24**).

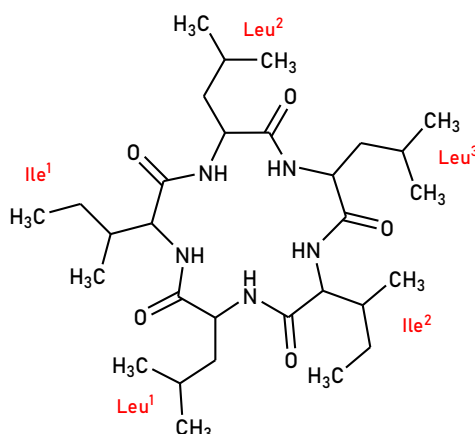
Unidade	Nº	Experimental*			Literatura**		
		$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multipl.; J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multipl.; J (Hz)
Leu ¹	1	174,1	-----	-----	171,3	-----	-----
	2	54,1	4,31	dd (8,9 e 6,3)	52,2	4,32	m
	3	40,6	1,76	m	40,5	1,44	m
			1,64	m		1,54	m
	4	26,3	1,61	m	24,8	1,44	m
	5	23,2	0,99	d (6,3)	22,9	0,88	m
	5'	22,6	0,95	d (6,3)	22,7	0,90	m
	NH	-----	7,85 ^E	-----	-----	7,20	d (6,5)
Leu ²	1	174,7	-----	-----	171,7	-----	-----
	2	57,8	3,92	dd (10,1 e 5,8)	52,5	4,07	m
	3	39,7	1,94	m	40,2	1,50	m
			1,63	m			
	4	26,4	1,68	m	24,7	1,59	m
	5	22,4	0,97	d (6,1)	21,0	0,77	d (6,0)
	5'	21,9	0,95	d (6,1)	23,4	0,86	m
	NH	-----	8,34 ^E	-----	-----	8,60	d (8,0)
Leu ³	1	175,0	-----	-----	172,0	-----	-----
	2	52,8	4,44	dd (8,5 e 6,2)	52,4	4,15	m
	3	42,6	1,56	m	39,0	1,37	m
			1,51	m		1,49	m
	4	26,3	1,68	m	25,1	1,49	m
	5	23,1	0,97	d (6,2)	22,9	0,83	d (6,5)
	5'	22,7	0,95	d (6,2)	22,5	0,88	m
	NH	-----	8,63 ^E	-----	-----	8,73	d (6,0)
Leu ⁴	1	174,8	-----	-----	173,1	-----	-----
	2	53,4	4,40	t (7,4)	50,6	4,44	m
	3	40,2	1,61	m	42,1	1,36	m
			1,52	m			
	4	26,0	1,60	m	25,0	1,52	m
	5	23,1	0,98	d (6,2)	23,6	0,88	m
	5'	22,8	0,92	d (6,2)	22,2	0,88	m
	NH	-----	8,00 ^E	-----	-----	7,86	d (8,5)
Ile	1	173,5	-----	-----	171,6	-----	-----
	2	60,2	4,22	d (6,2)	63,5	3,30	m
	3	37,5	1,94	m	33,6	2,30	m
	4	25,8	1,48	m	25,7	1,03	m
			1,24	m		1,41	m
	5	11,8	0,93	t (7,5)	10,3	0,79	t (6,5)
	6	16,2	0,95	d (6,9)	15,92	0,80	d (6,5)
	NH	-----	8,18 ^E	-----	-----	8,38	br s

* em CD₃OD, 150 e 600 MHz, ** em DMSO-*d*₆, 125 e 500 MHz. ^E - deslocamento de hidrogênio atribuído via sinais cruzados no mapa de contorno COSY. Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

7.42 Substância 25

A substância 25 (Fr. 06_P_6, oriunda do extrato de *B. parva* em meio de arroz, Figura 107) foi obtida como um sólido incolor amorfo, e sua fórmula molecular $C_{30}H_{55}N_5O_5$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D e pela comparação com dados presentes na literatura ⁽¹⁴⁸⁾.

Figura 107 – Representação estrutural da substância 25.



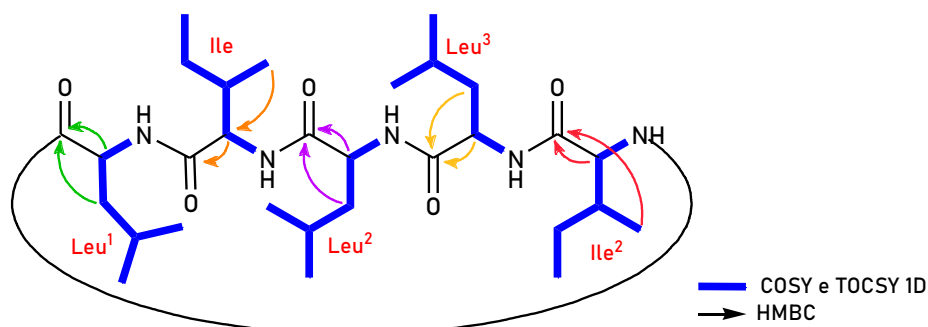
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

A substância 25, apresentou dados espectroscópicos (Apêndice 212 e Apêndice 213, p. 307 e 308) semelhante à substância 24, em que a diferença é referente ao deslocamento químico do hidrogênio α a carbonila de deslocamento δ_H 3,92 (dd, $J = 10,1$ e $5,8$ Hz), em 24, que se apresentou como um dubleto de deslocamento de δ_H 3,37 (d, $J = 11,0$ Hz), em 25, indicando proteção deste hidrogênio.

Adicionalmente, observou-se a presença de um sinal em δ_H 2,45 (ddd, $J = 14,1$; $11,0$ e $3,2$ Hz), integrando para um hidrogênio. Estas observações, evidenciam a mudança de um resíduo de aminoácido de leucina para isoleucina.

Todos os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base no experimento de HSQC (Apêndice 214, p. 308). A interpretação dos dados obtidos do mapa de contorno COSY (Apêndice 215, p. 309) e do espectro de TOCSY 1D (Apêndice 217, p. 310) revelou cinco sistemas de spin, em que foi possível verificar a presença de dois resíduos de isoleucina (Ile) e três resíduos de leucina (Leu). Essas informações, associadas às correlações observadas no mapa de contorno HMBC (Apêndice 216, p. 309) foi possível propor a estrutura base de 25 como sendo outro derivado pentapeptídeo cíclico (Figura 108, p. 180).

Figura 108 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC, e nos espectros de TOCSY 1D de **25**.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Com a comparação dos dados obtidos (Tabela 65) com os da literatura⁽¹⁴⁸⁾, foi possível identificar a substância **25** como sendo a Ciclo(Leu-Ile-Leu-Leu-Ile), presente também nos endófitos *Botryosphaeria mamane*, *Fusarium decemcellulare* e na planta *Viscum album*.

Tabela 65 – Dados espectrométricos obtidos da substância Ciclo (Leu-Ile-Leu-Leu-Ile) (**25**).

Unidade	Nº	Experimental*		
		$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multipl.; J (Hz)
Leu ¹	1	174,9	-----	-----
	2	53,6	4,38	<i>t</i> (7,7)
	3	40,0	1,61 e 1,52	<i>m</i>
	4	26,0	1,59	<i>m</i>
	5	23,3	0,97	<i>d</i> (6,3)
	5'	22,3	0,92	<i>d</i> (6,3)
	NH	-----	7,62 ^E	-----
Ile ¹	1	174,1	-----	-----
	2	65,7	3,37	<i>d</i> (11,0)
	3	34,9	2,45	<i>ddd</i> (14,1; 11,0 e 3,2)
	4	26,8	1,55 e 1,14	<i>m</i>
	5	10,4	0,89	<i>t</i> (7,5)
	6	15,9	0,91	<i>d</i> (6,8)
	NH	-----	<i>w</i>	-----
Leu ²	1	174,8	-----	-----
	2	52,6	4,49	<i>dd</i> (9,1 e 6,1)
	3	42,7	1,55 e 1,51	<i>m</i>
	4	26,3	1,59	<i>m</i>
	5	23,0	0,96	<i>d</i> (6,6)
	5'	22,7	0,96	<i>d</i> (6,6)
	NH	-----	8,63 ^E	-----

Cont. Tabela 65 – Dados espectrométricos obtidos da substância Ciclo (Leu-Ile-Leu-Leu-Ile) (**25**).

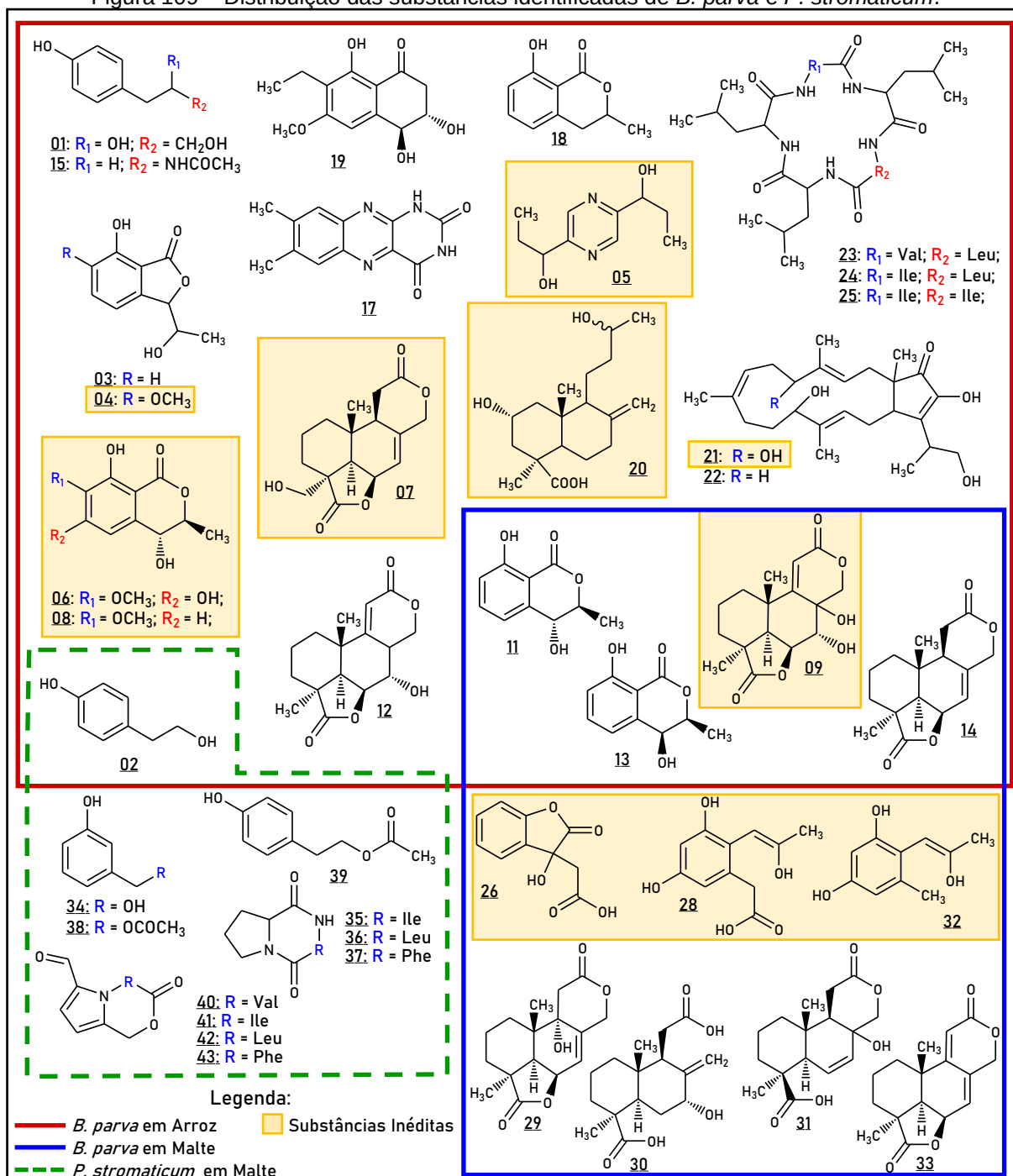
Leu ³	1	173,9	-----	-----
	2	54,1	4,44	<i>dd</i> (7,6 e 7,2)
	3	41,5	1,69 e 1,59	<i>m</i>
	4	26,3	1,57	<i>m</i>
	5	22,8	0,95	<i>d</i> (6,2)
	5'	22,6	0,98	<i>d</i> (6,2)
	NH	-----	8,35 [£]	-----
Ile ²	1	173,2	-----	-----
	2	60,5	4,18	<i>d</i> (6,1)
	3	37,3	1,97	<i>m</i>
	4	25,9	1,47 e 1,27	<i>m</i>
	5	11,8	0,93	<i>t</i> (7,6)
	6	16,2	0,95	<i>d</i> (6,9)
	NH	-----	8,32 [£]	-----

* em CD₃OD, 150 e 600 MHz. £ - deslocamento de hidrogênio atribuído via sinais cruzados no mapa de contorno COSY (^w- sinal cruzado não observado). Fonte: tabela elaborada pela autora, 2020.

8 DISTRIBUIÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

Em resumo, a distribuição das substâncias identificadas de *Botryosphaeria parva* e *Pseudofusicoccum stromaticum* pode ser observada no esquema mostrado na Figura 109.

Figura 109 – Distribuição das substâncias identificadas de *B. parva* e *P. stromaticum*.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

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**, 4th 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.

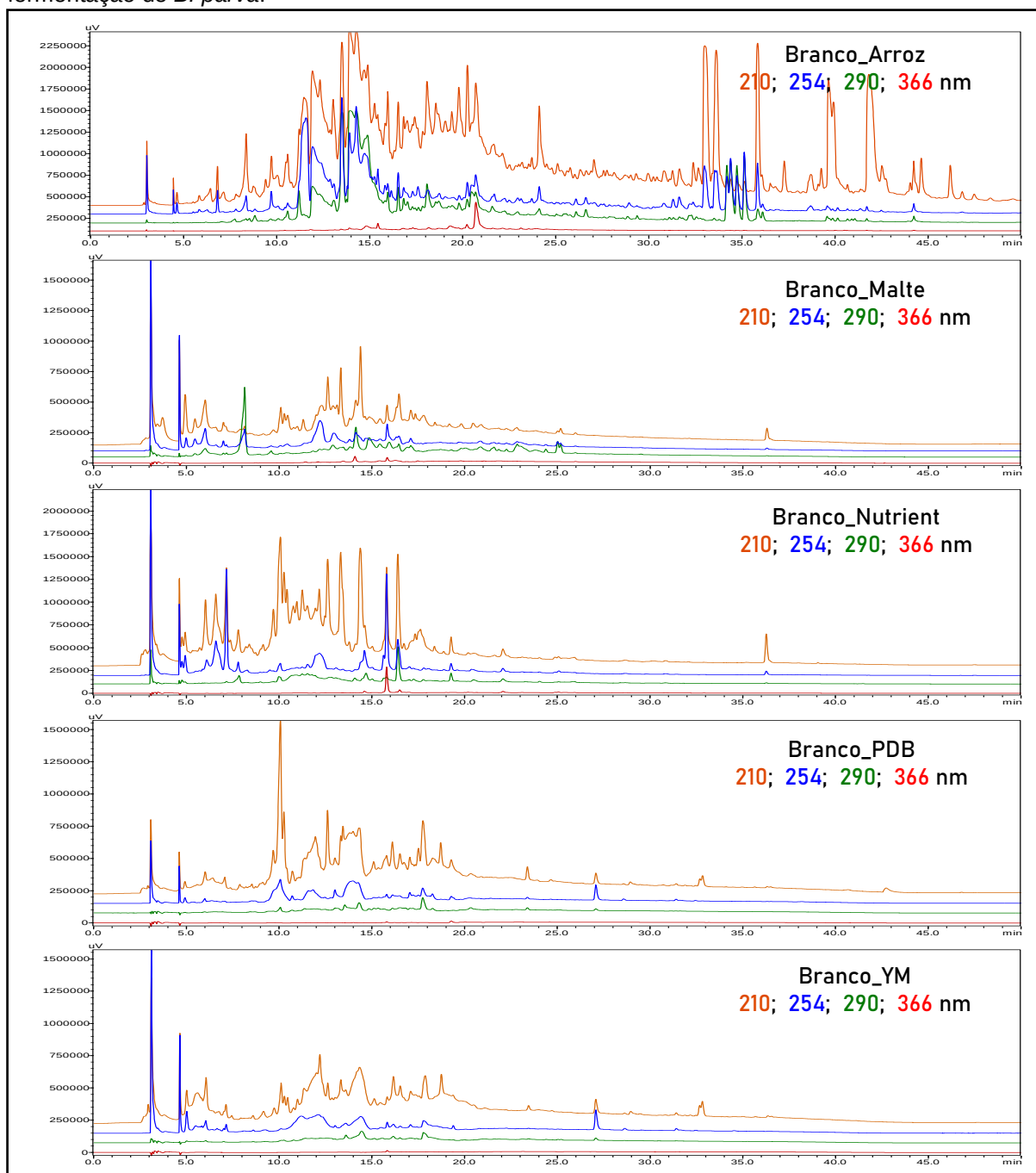
- (112) MENEZES, C. P.; PÉREZ, A. L. A. L.; LIMA, E. O. *Cladosporium* spp: morfologia, infecções e espécies patogênicas. **Acta Brasiliensis**, v. 1, p. 23-27, 2017.
- (113) OLIVEIRA, C. M. **Estudo químico e biológico dos fungos endofíticos associados com a espécie vegetal *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae)**. 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.

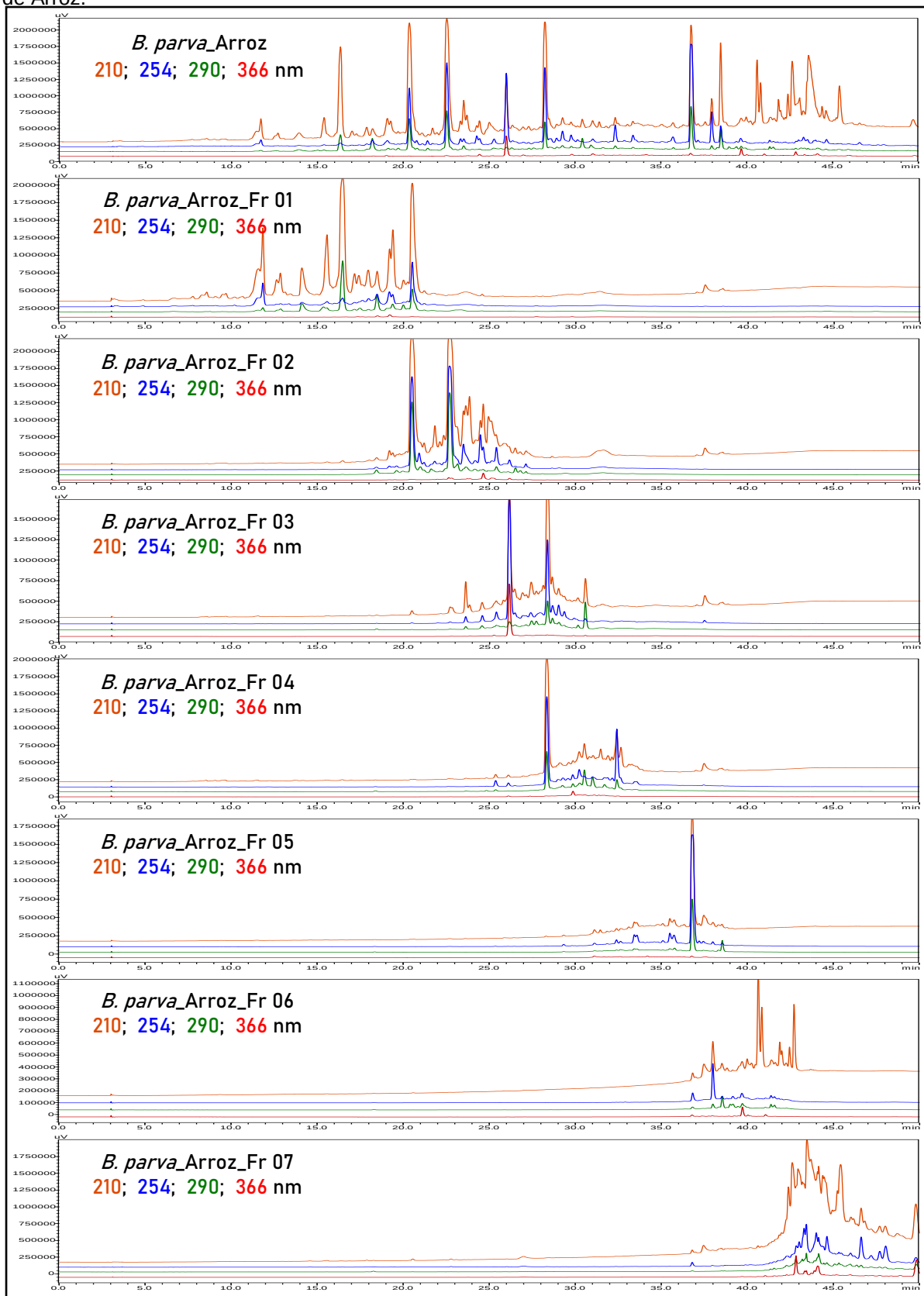
APÊNDICE

Apêndice 01 – Cromatogramas dos extratos dos brancos* dos meios de cultivo utilizados na fermentação de *B. parva*.



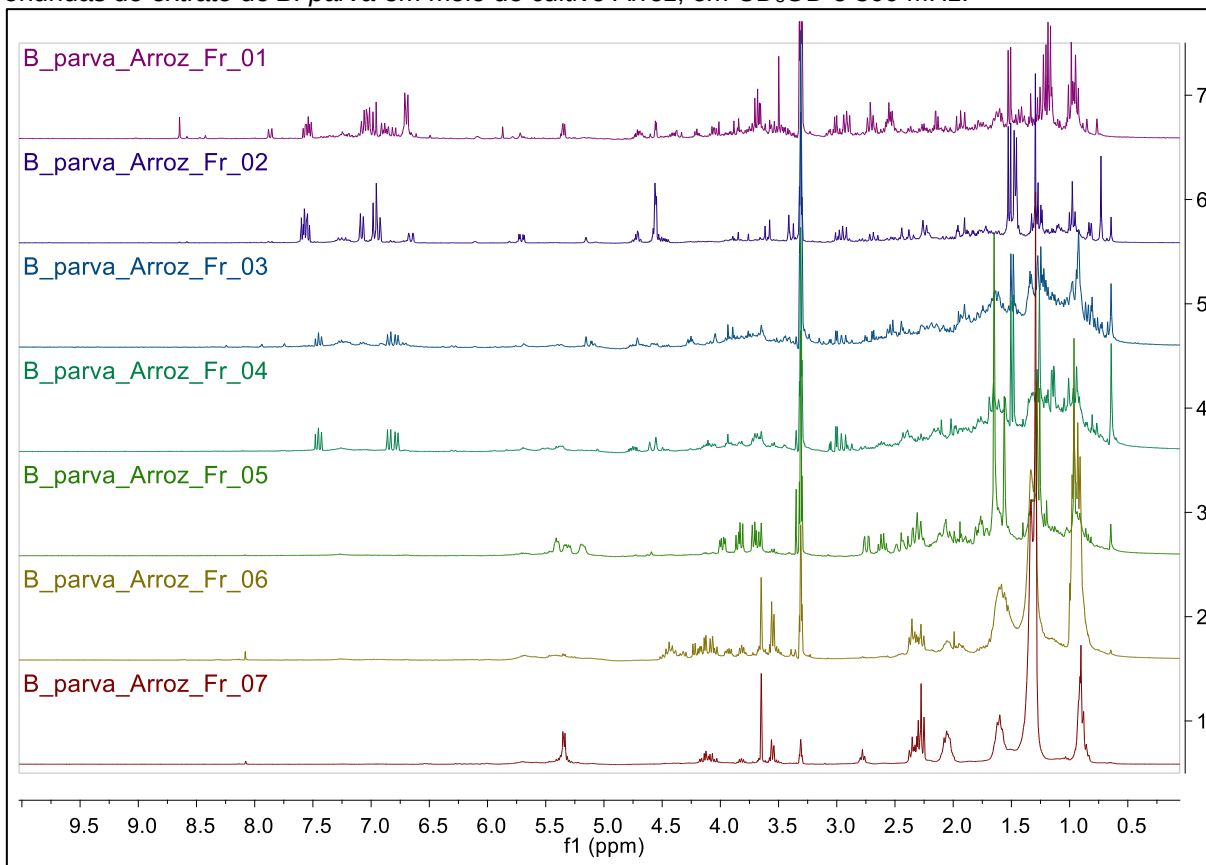
*Extratos dos meios sem a inoculação do endófito. Condição: Coluna de C18 (250 x 4,60 mm; 5 μ m); gradiente de 5 a 100% de ACN em H₂O por 40 min., com limpeza da coluna com 100% ACN de 40-50 min.; Vazão= 1 mL.min⁻¹; V_{inj.} = 30 μ L; [amostra] = 5 mg.mL⁻¹. Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 02 – Comparação dos cromatogramas das frações oriundas do extrato de *B. parva* em meio de Arroz.



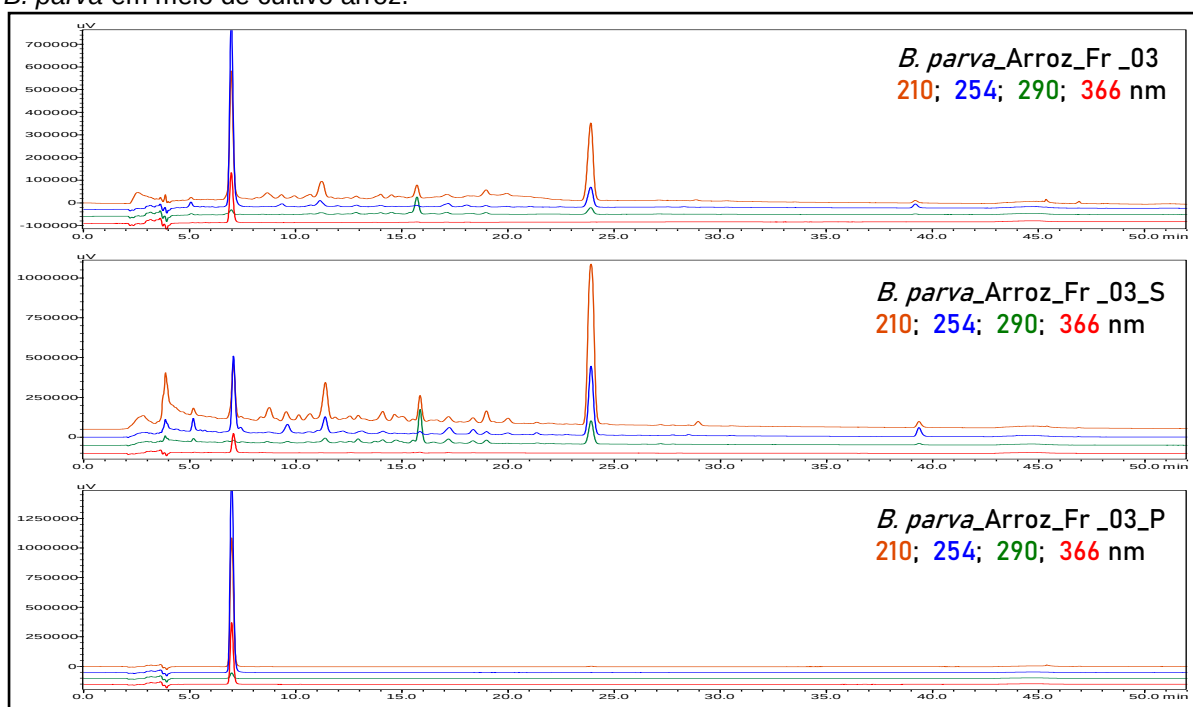
Condição: Coluna de C18 (250 x 4,60 mm; 5 µm); gradiente de 5 a 100% de MeOH em H₂O por 40 min., com limpeza da coluna com 100% MeOH de 40-50 min.; Vazão = 1 mL.min⁻¹; V_{inj.} = 30 µL; [amostra] = 5 mg.mL⁻¹. Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 03 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, das frações oriundas do extrato de *B. parva* em meio de cultivo Arroz, em CD_3OD e 300 MHz.



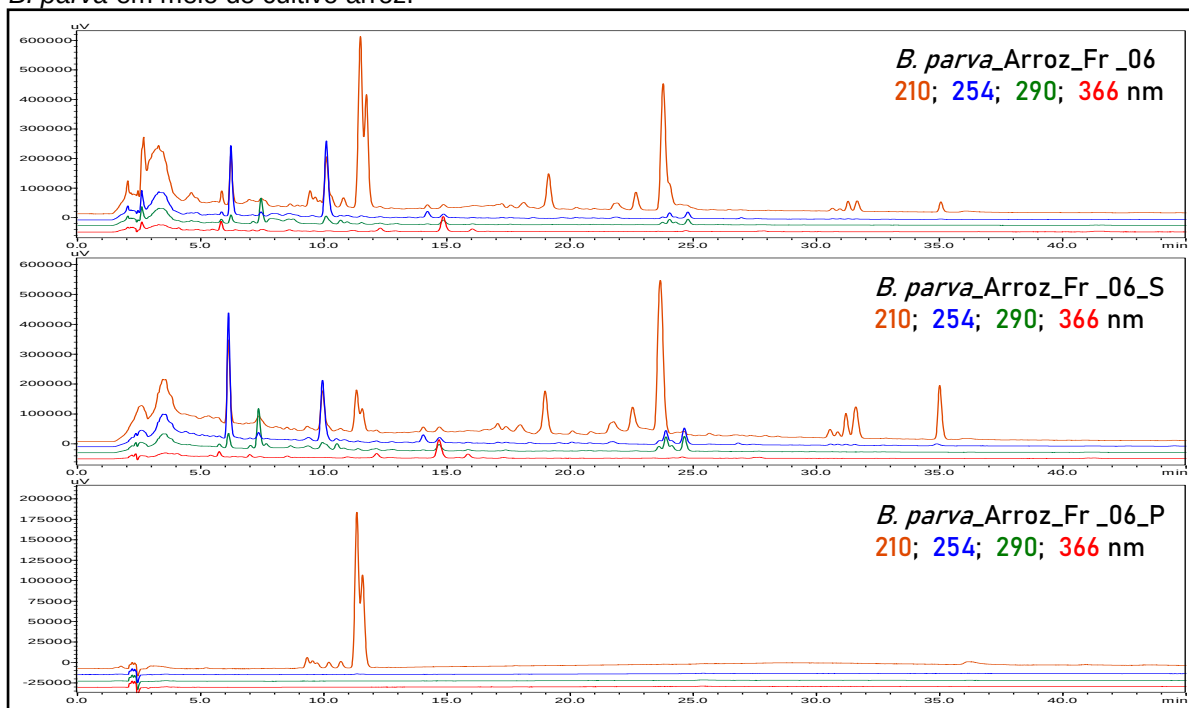
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 04 – Comparação dos cromatogramas das subfrações oriundas da fração 03 do extrato de *B. parva* em meio de cultivo arroz.



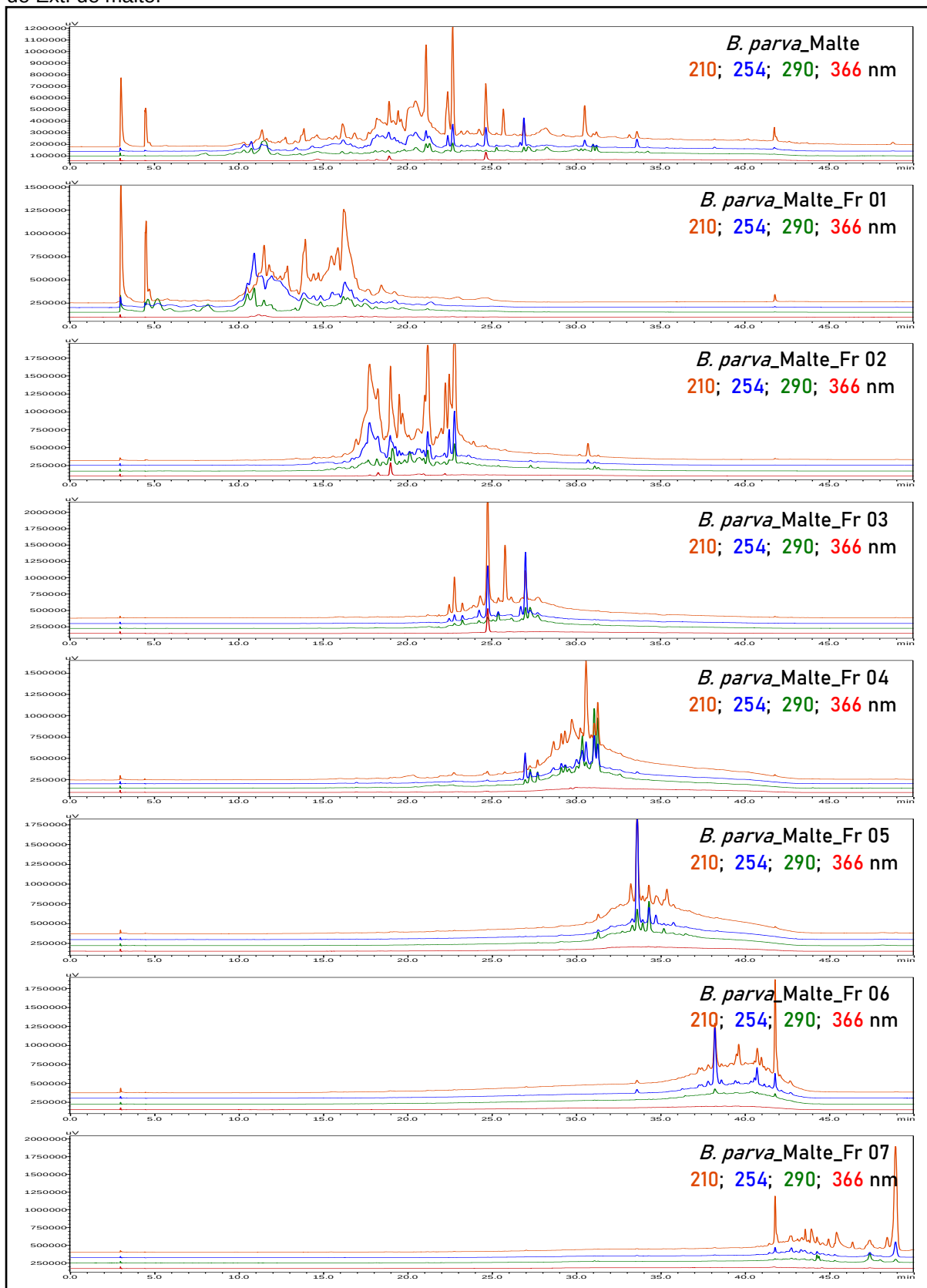
Condição: Coluna de C18 (250 x 4.60 mm; 5 μm); gradiente de 30 a 65% de ACN em H_2O de 5 a 40 min; Vazão = 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $V_{\text{inj.}}$ = 30 μL ; [amostra] = 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2018.

Apêndice 05 – Comparação dos cromatogramas das subfrações oriundas da fração 06 do extrato de *B. parva* em meio de cultivo arroz.



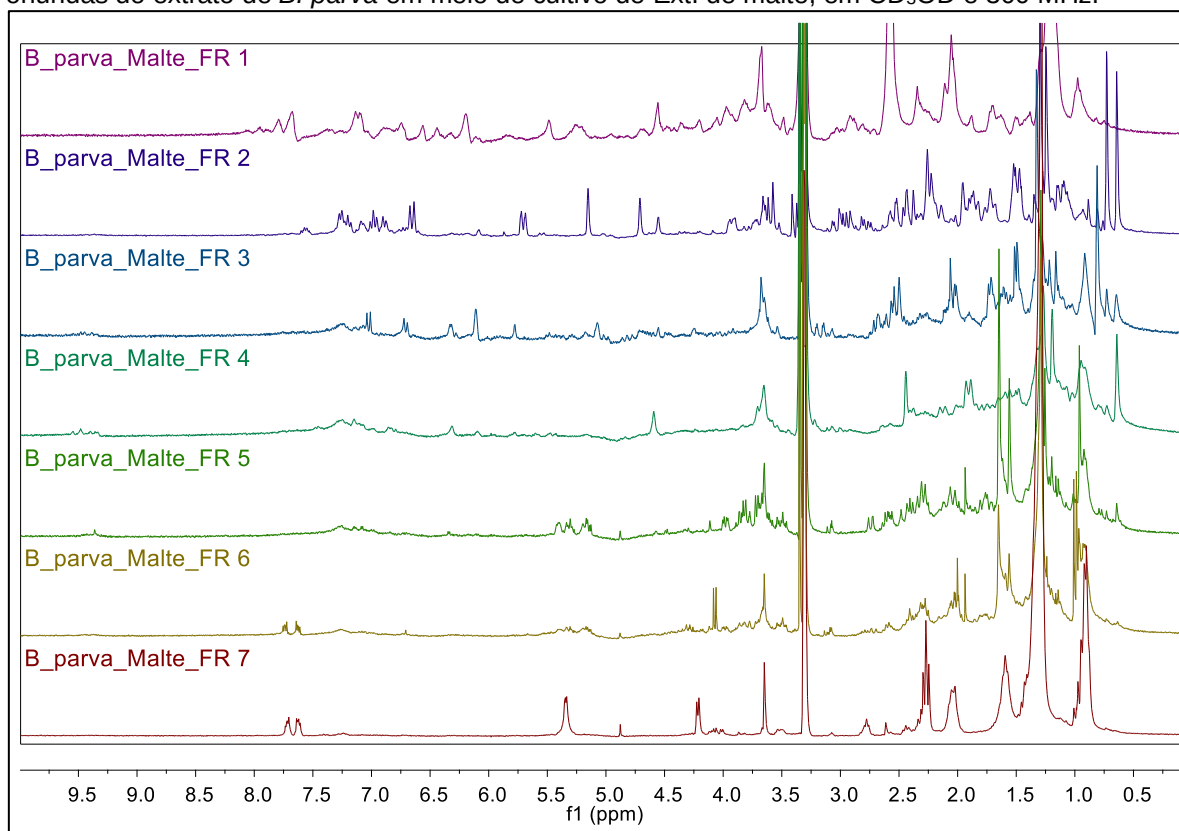
Condição: Coluna de C18 (250 x 4.60 mm; 5 μ m); gradiente de 65 a 100% de ACN em H₂O de 5 a 35 min; Vazão = 1 mL.min⁻¹; V_{inj.} = 30 μ L; [amostra] = 5 mg.mL⁻¹. Fonte: ilustração elaborada pela autora. 2018.

Apêndice 06 – Comparação dos cromatogramas das frações oriundas do extrato de *B. parva* em meio de Ext. de malte.



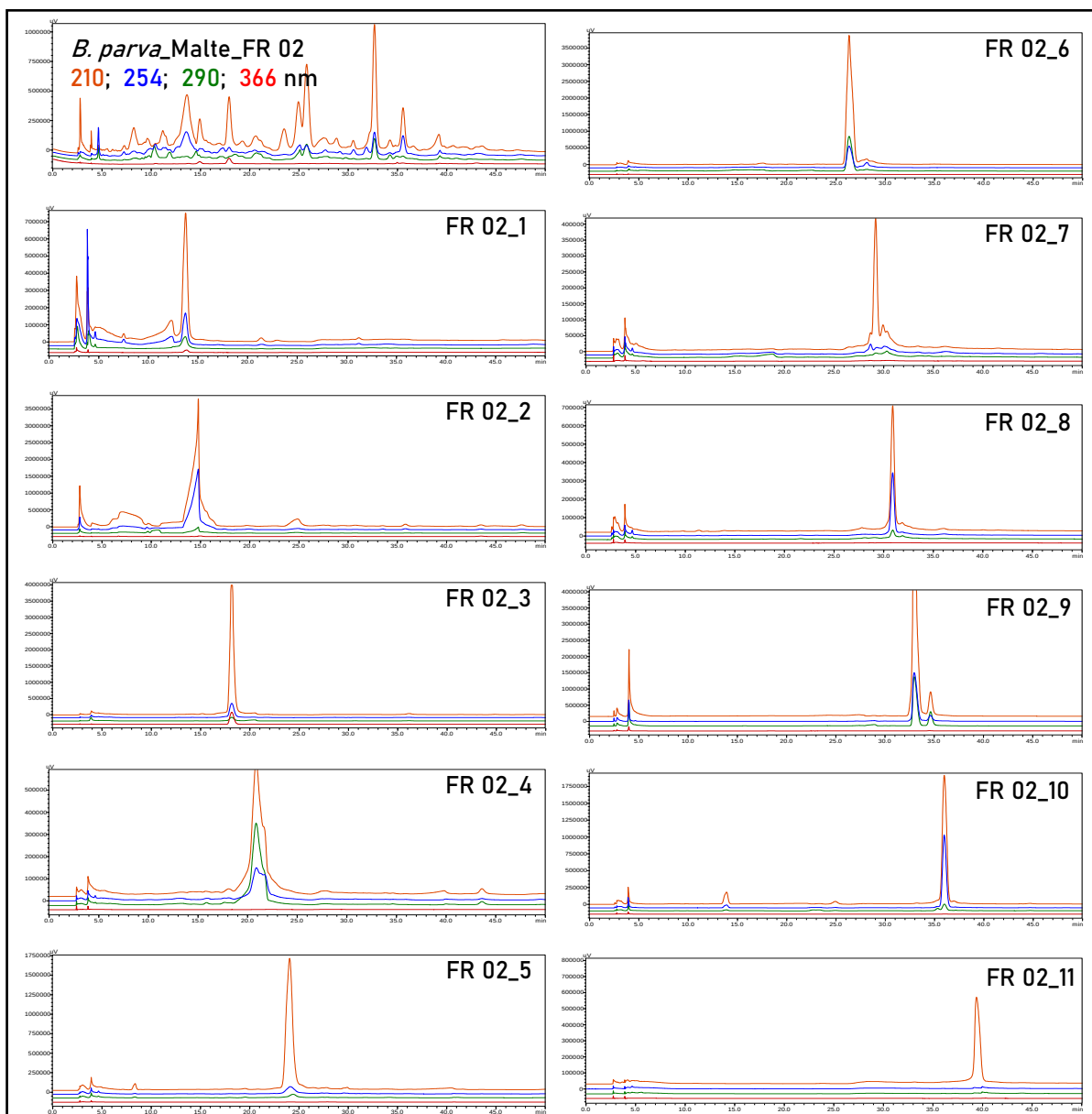
Condição: Coluna de C18 (250 x 4,60 mm; 5 μ m); gradiente de 5 a 100% de ACN em H₂O por 40 min., com limpeza da coluna com 100% ACN de 40-50 min.; Vazão= 1 mL.min⁻¹; V_{inj.} = 30 μ L; [amostra] = 5 mg.mL⁻¹. Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 07 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, das frações oriundas do extrato de *B. parva* em meio de cultivo de Ext. de malte, em CD_3OD e 300 MHz.



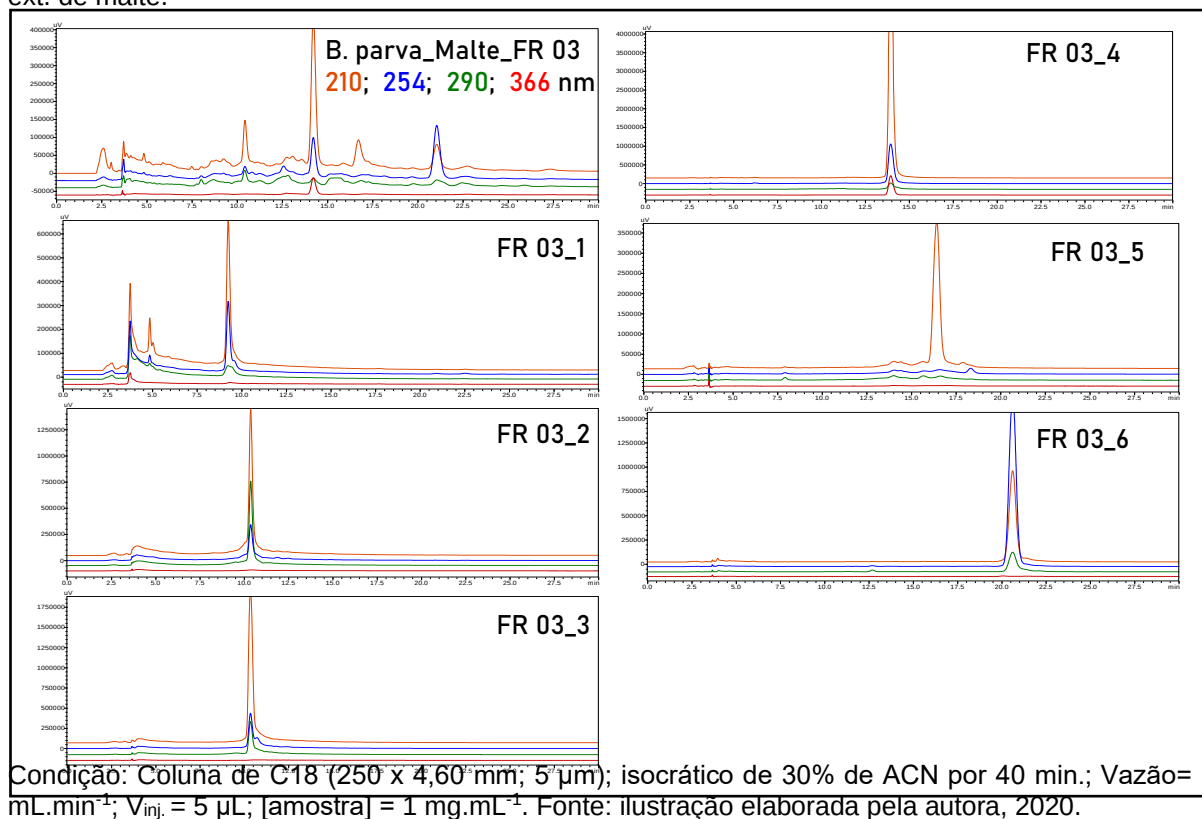
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 08 – Cromatogramas das subfrações oriundas da Fr. 02 do extrato de *B. parva* em meio de ext. de malte.

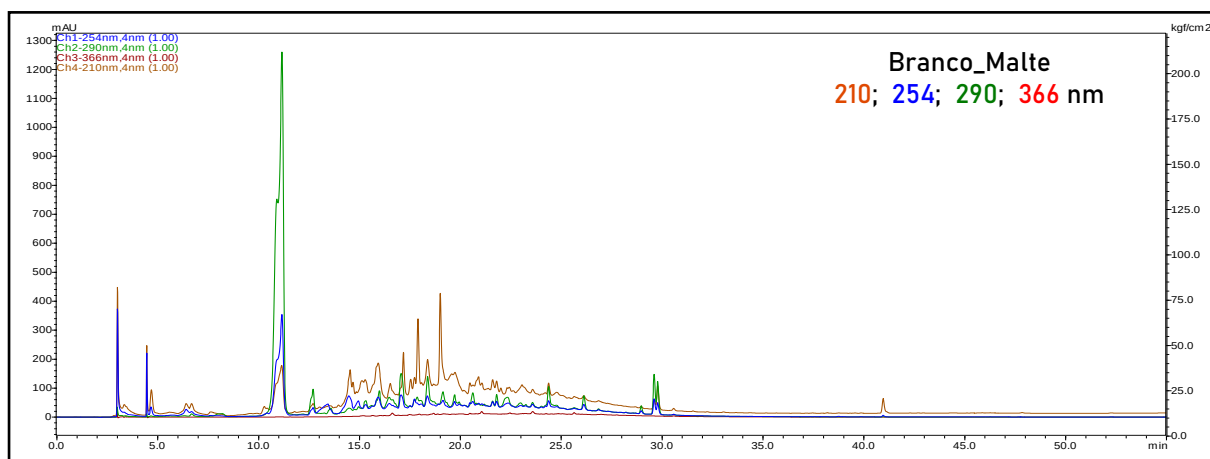


Condição: Coluna de C18 (250 x 4,60 mm; 5 μ m); isocrático de 15% de ACN de 0-22 min→22-23 min de 15-20% de ACN→isocrático de 20% de ACN de 23-50 min.; Vazão= 1 mL.min⁻¹; V_{inj.} = 5 μ L; [amostra] = 1 mg.mL⁻¹. Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 09 – Cromatogramas das subfrações oriundas de Fr. 03 do extrato de *B. parva* em meio de ext. de malte.

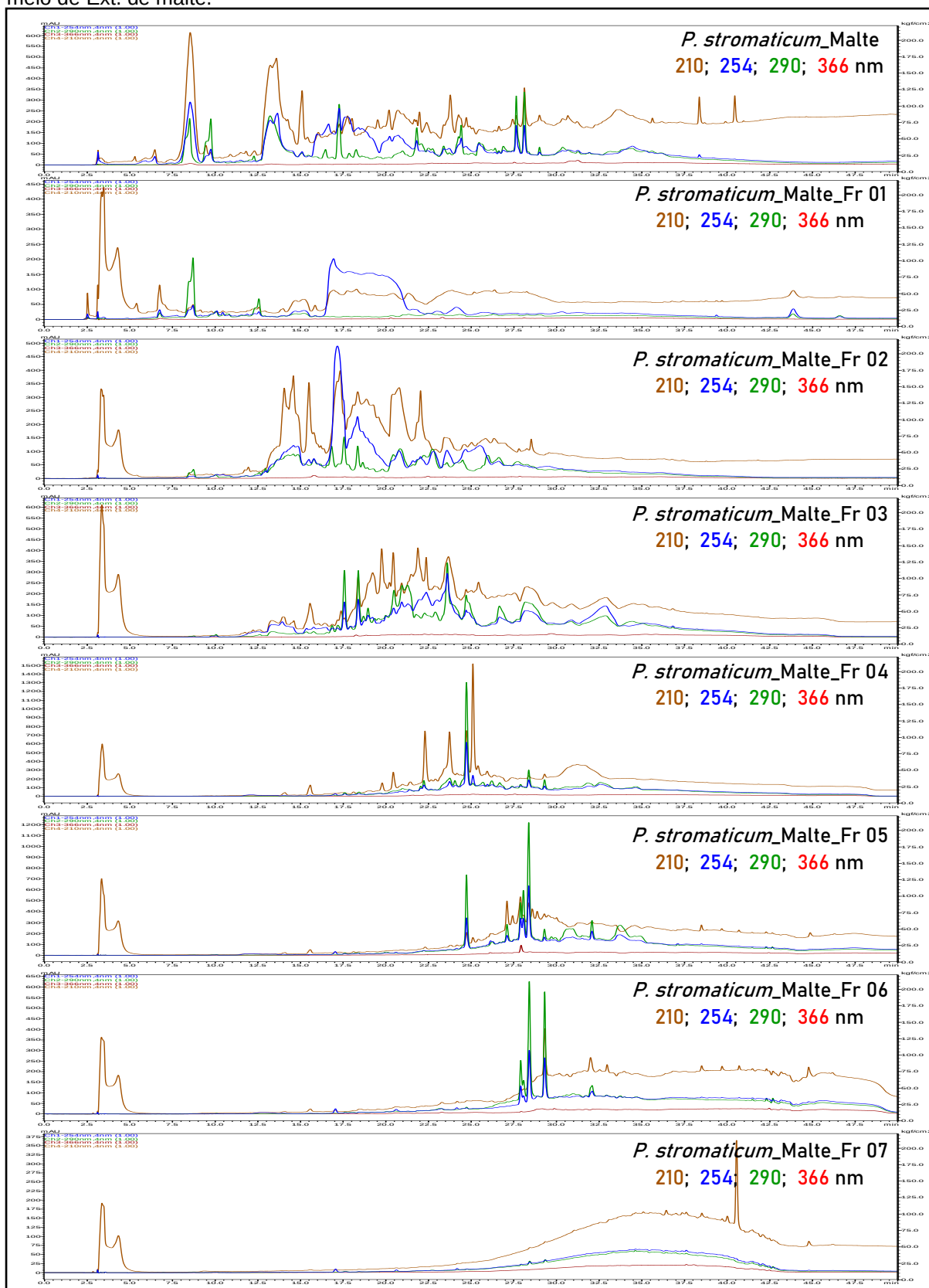


Apêndice 10 – Cromatogramas do extrato do branco* do meio de ext. de malte utilizado na fermentação de *P. stromaticum*.



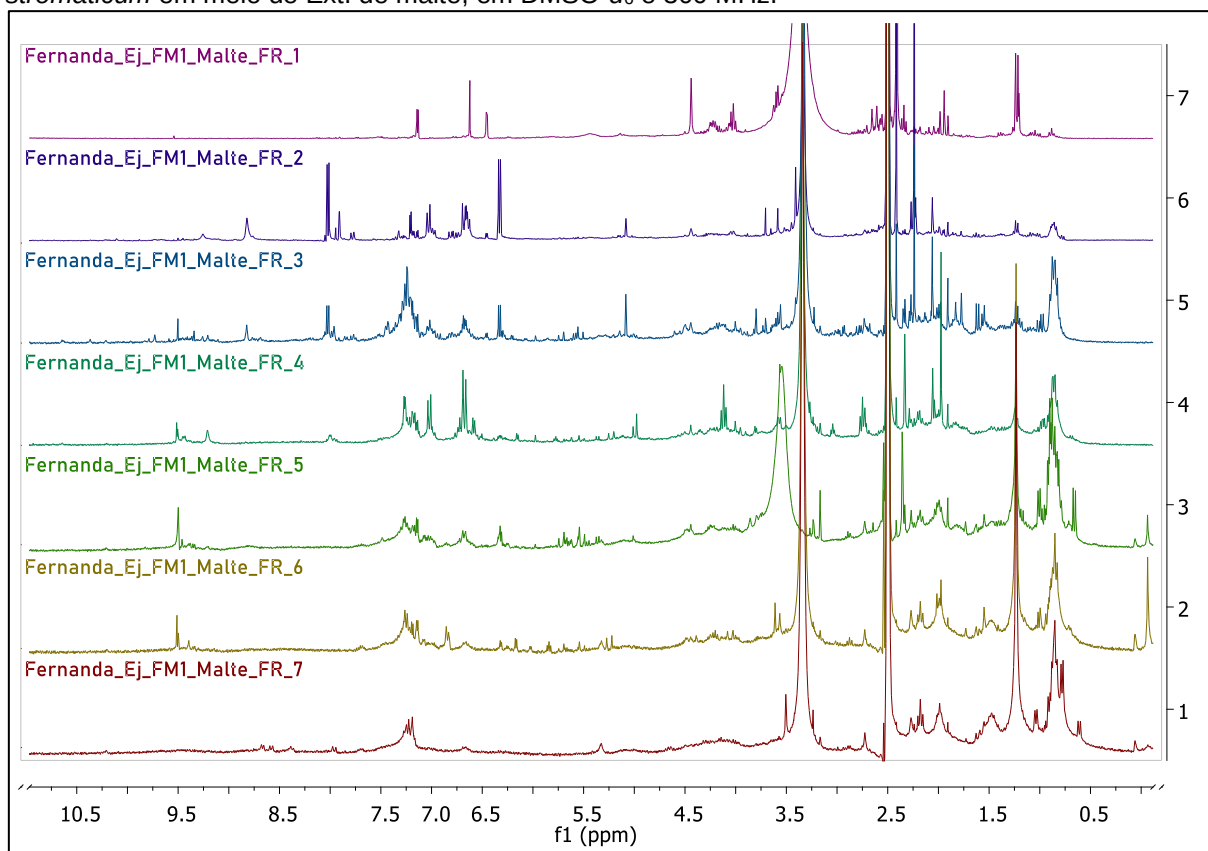
*Extrato do meio sem a inoculação do endófito. Condição: Coluna de C18 (250 x 4,60 mm; 5 μ m); gradiente de 5 a 100% de ACN em H₂O por 40 min., com limpeza da coluna com 100% ACN de 40-50 min.; Vazão= 1 mL.min⁻¹; V_{inj.} = 30 μ L; [amostra] = 5 mg.mL⁻¹. Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 11 – Comparação dos cromatogramas das frações oriundas do extrato de *P. stromaticum* em meio de Ext. de malte.



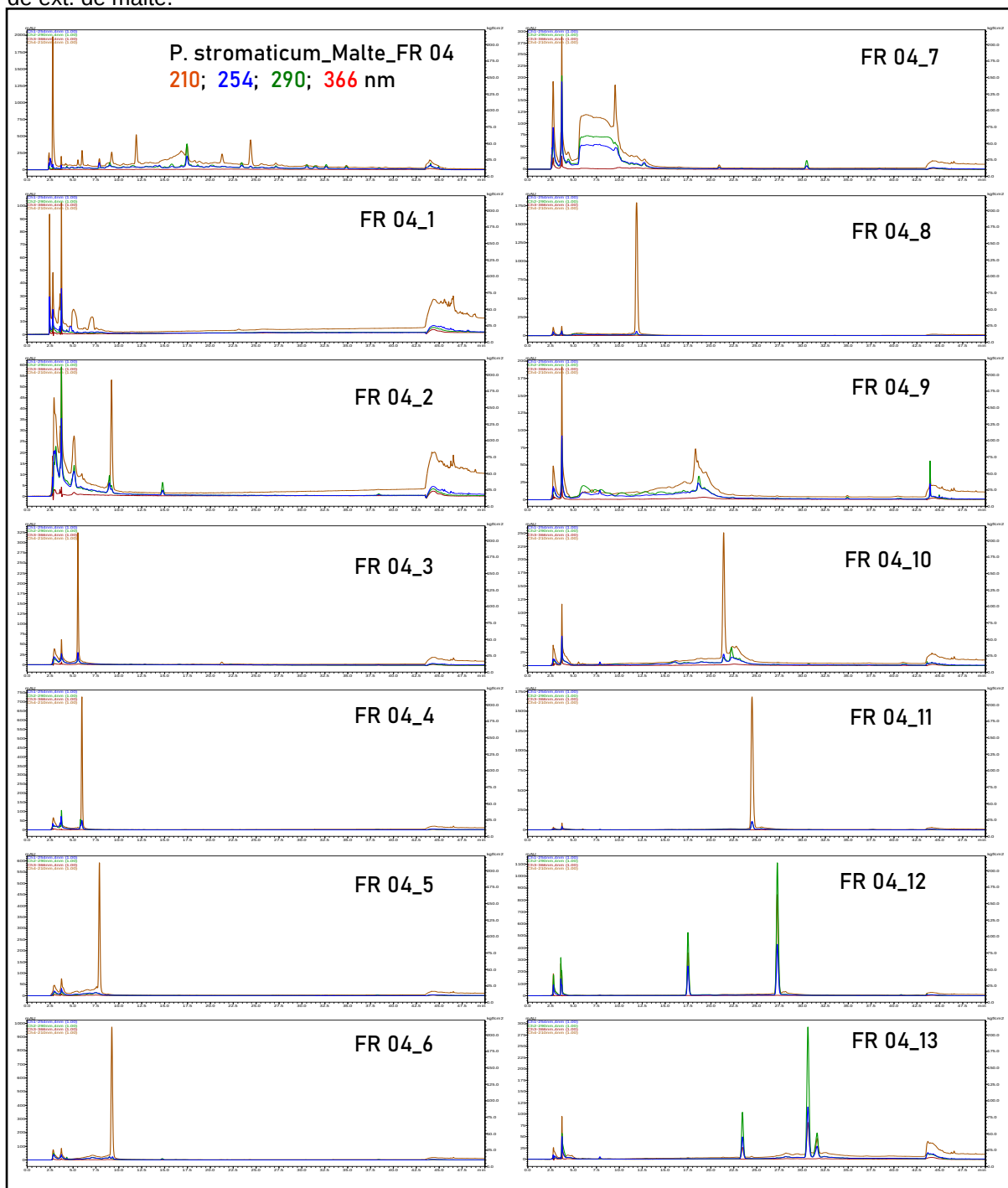
Condição: Coluna de C18 (250 x 4,60 mm; 5 µm); gradiente de 5 a 100% de MeOH em H₂O por 40 min., com limpeza da coluna com 100% MeOH de 40-50 min.; Vazão = 1 mL.min⁻¹; V_{inj.} = 30 µL; [amostra] = 5 mg.mL⁻¹. Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 12 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H das frações oriundas do extrato de *P. stromaticum* em meio de Ext. de malte, em $\text{DMSO}-d_6$ e 300 MHz.



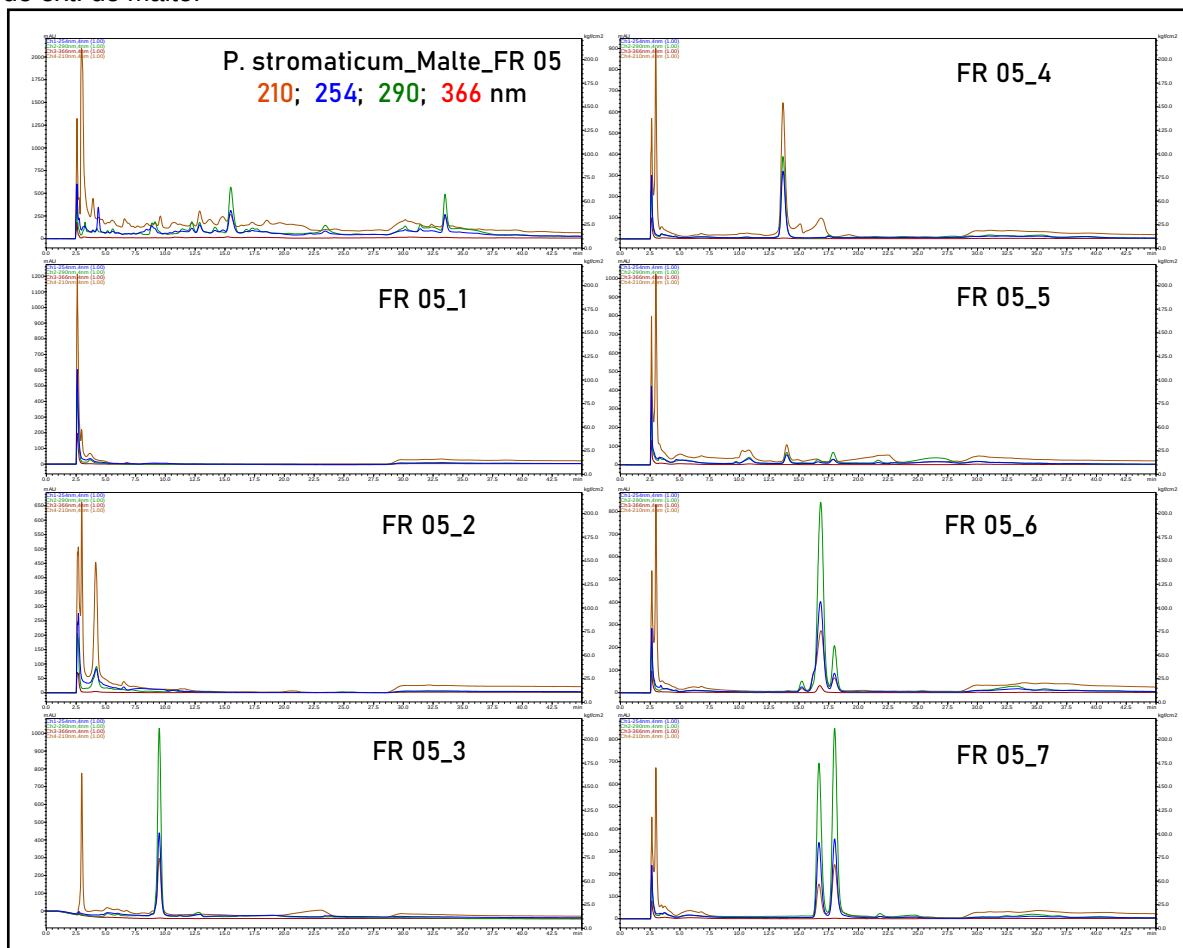
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 13 – Cromatogramas das subfrações da Fr. 04 oriunda do extrato de *P. stromaticum* em meio de ext. de malte.



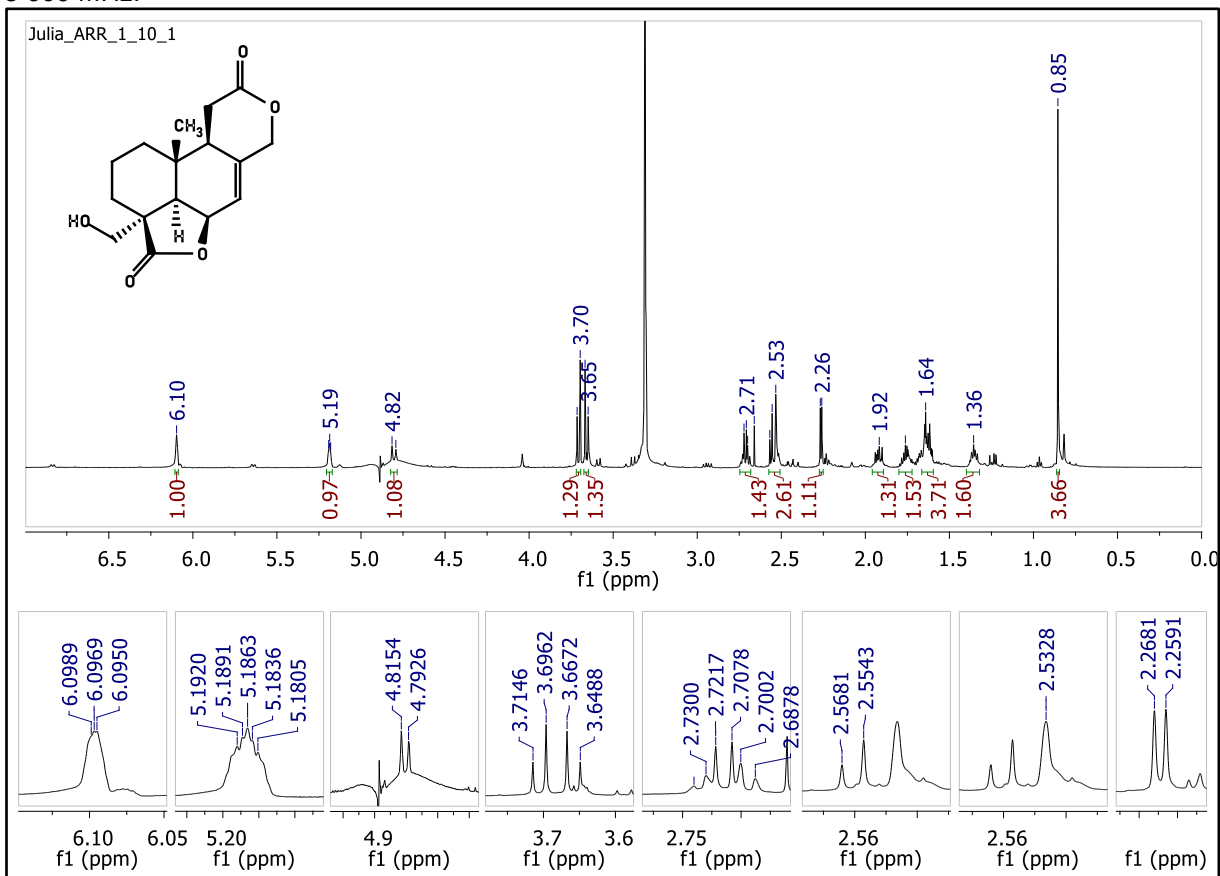
Condição: Coluna de C18 (250 x 4,60 mm; 5 μ m); Gradiente de 20-40% ACN de 5-40 min.; Vazão = 1 mL.min⁻¹; V_{inj.} = 5 μ L; [amostra] = 1 mg.mL⁻¹. Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 14 – Cromatogramas das subfrações da Fr. 04 oriunda do extrato de *P. stromaticum* em meio de ext. de malte.



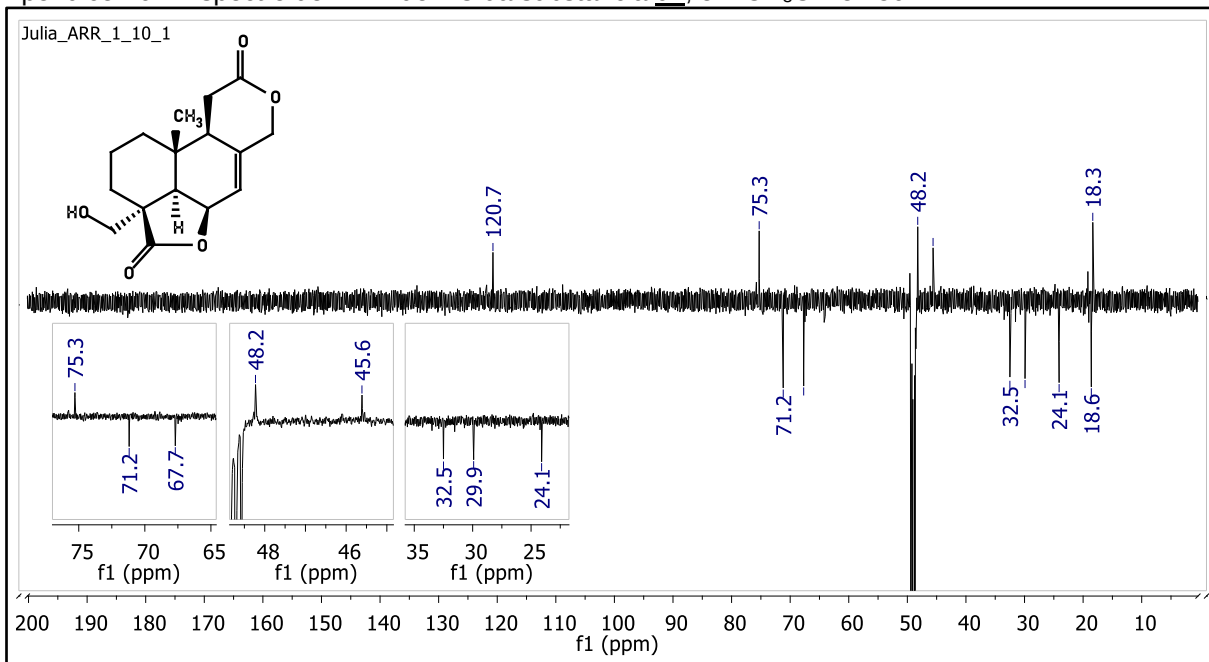
Condição: Coluna de C18 (250 x 4,60 mm; 5 μ m); Isocrático de 50% de MeOH por 25 min., e isocrático de 60% de 26-45 min.; Vazão = 1 mL.min⁻¹; V_{inj.} = 5 μ L; [amostra] = 1 mg.mL⁻¹. Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 15 – Espectro de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, da substância **07**, em CD_3OD e 600 MHz.



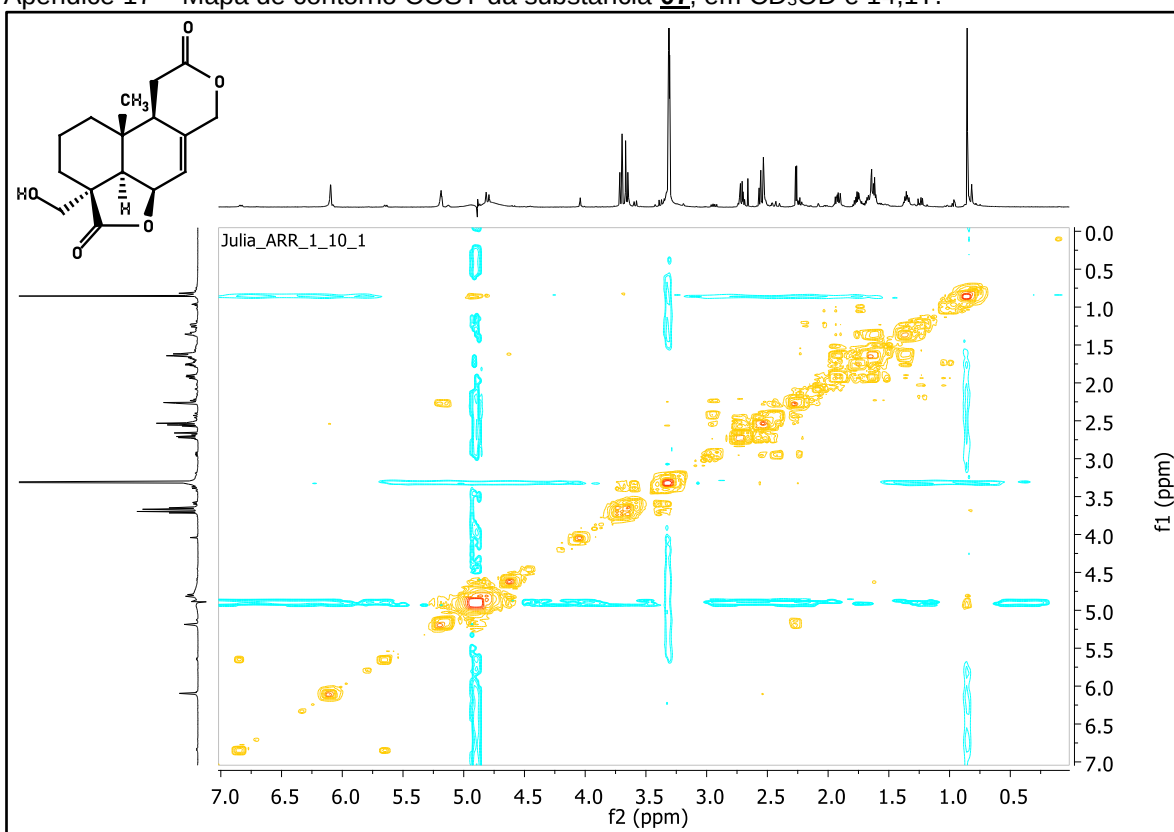
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 16 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **07**, em CD_3OD e 150MHz.



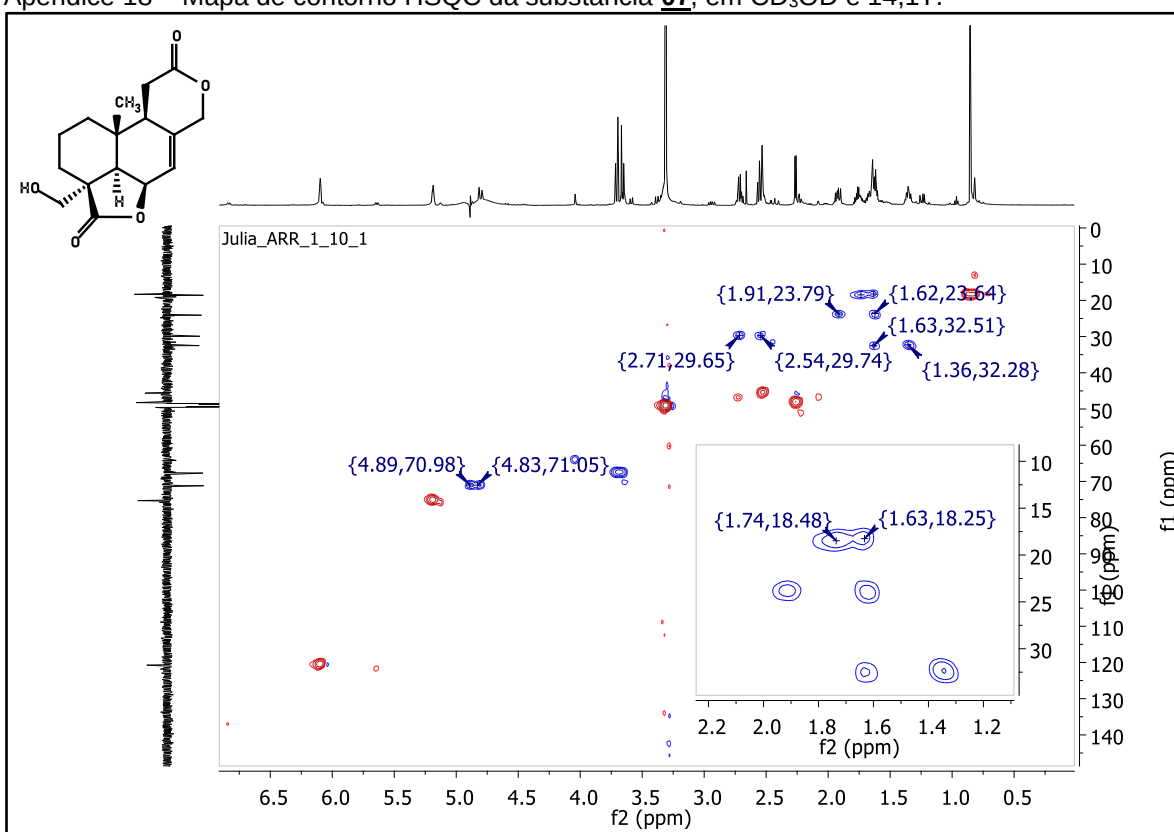
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 17 – Mapa de contorno COSY da substância **07**, em CD₃OD e 14,1T.



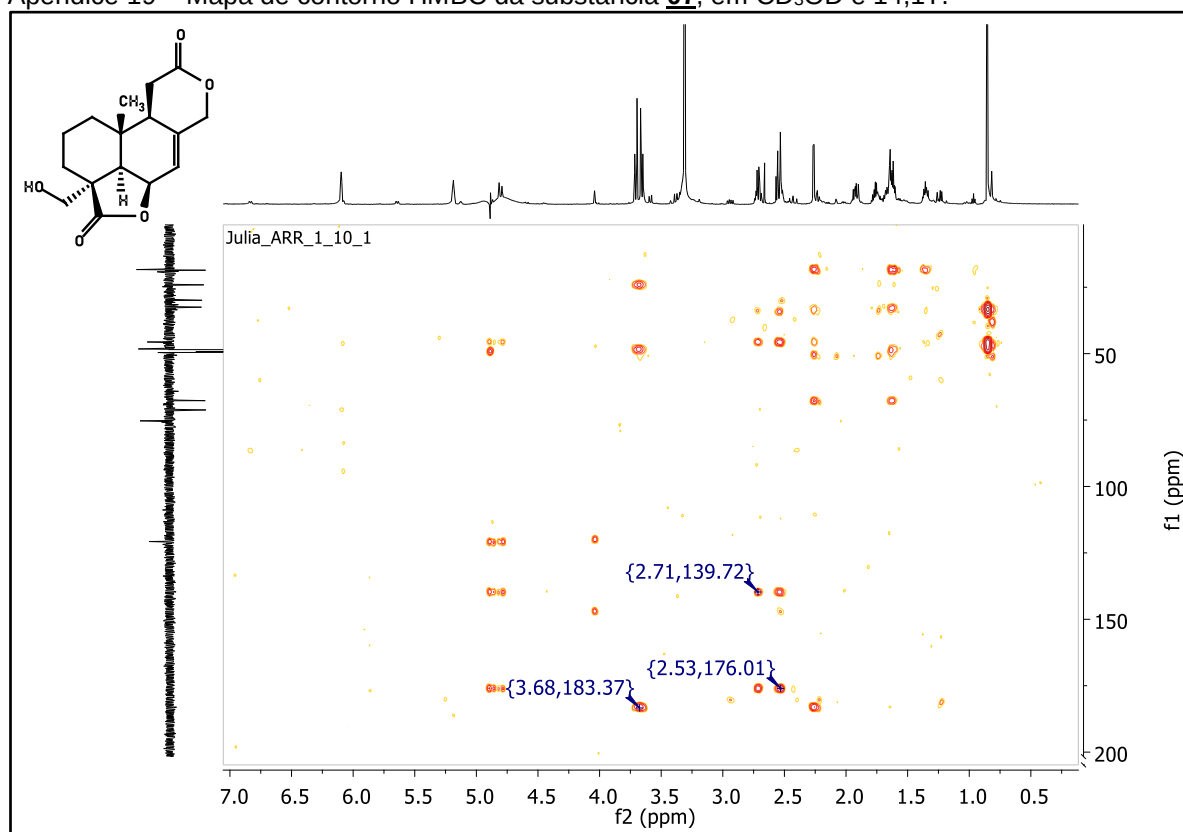
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 18 – Mapa de contorno HSQC da substância **07**, em CD₃OD e 14,1T.



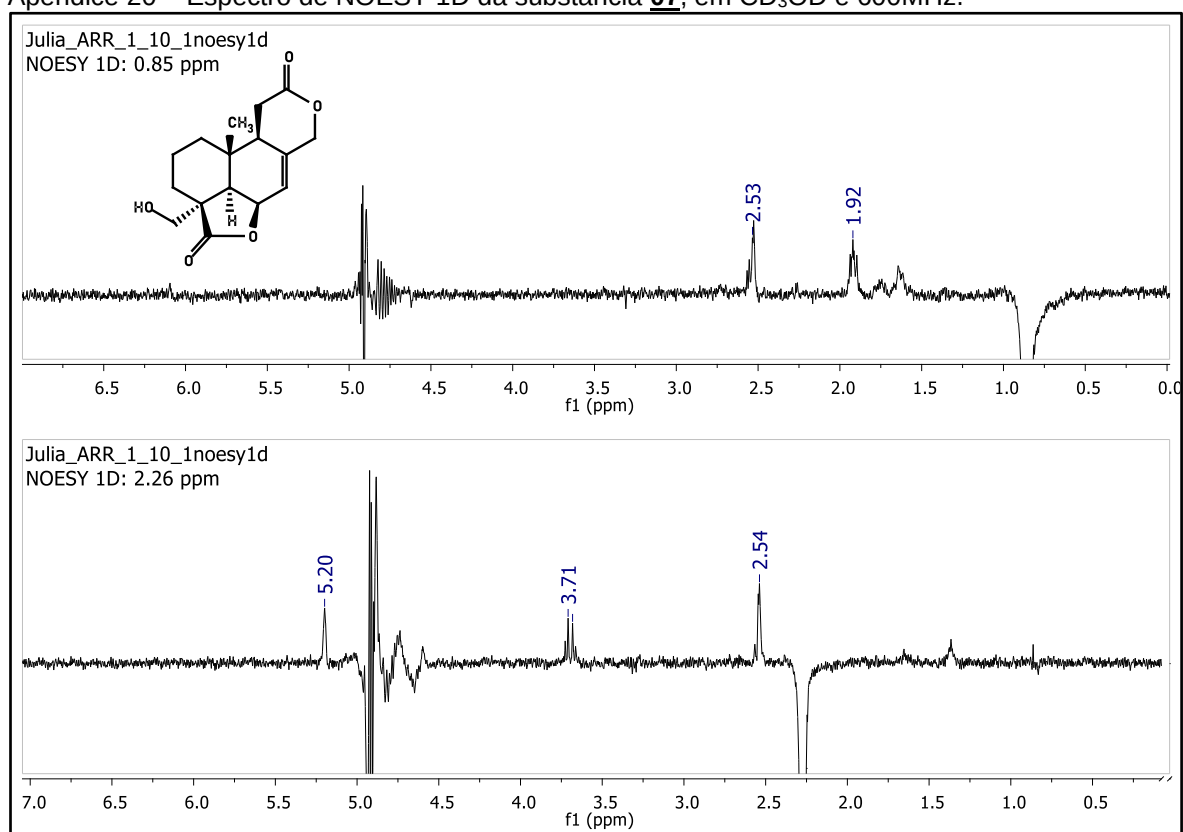
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 19 – Mapa de contorno HMBC da substância **07**, em CD₃OD e 14,1T.



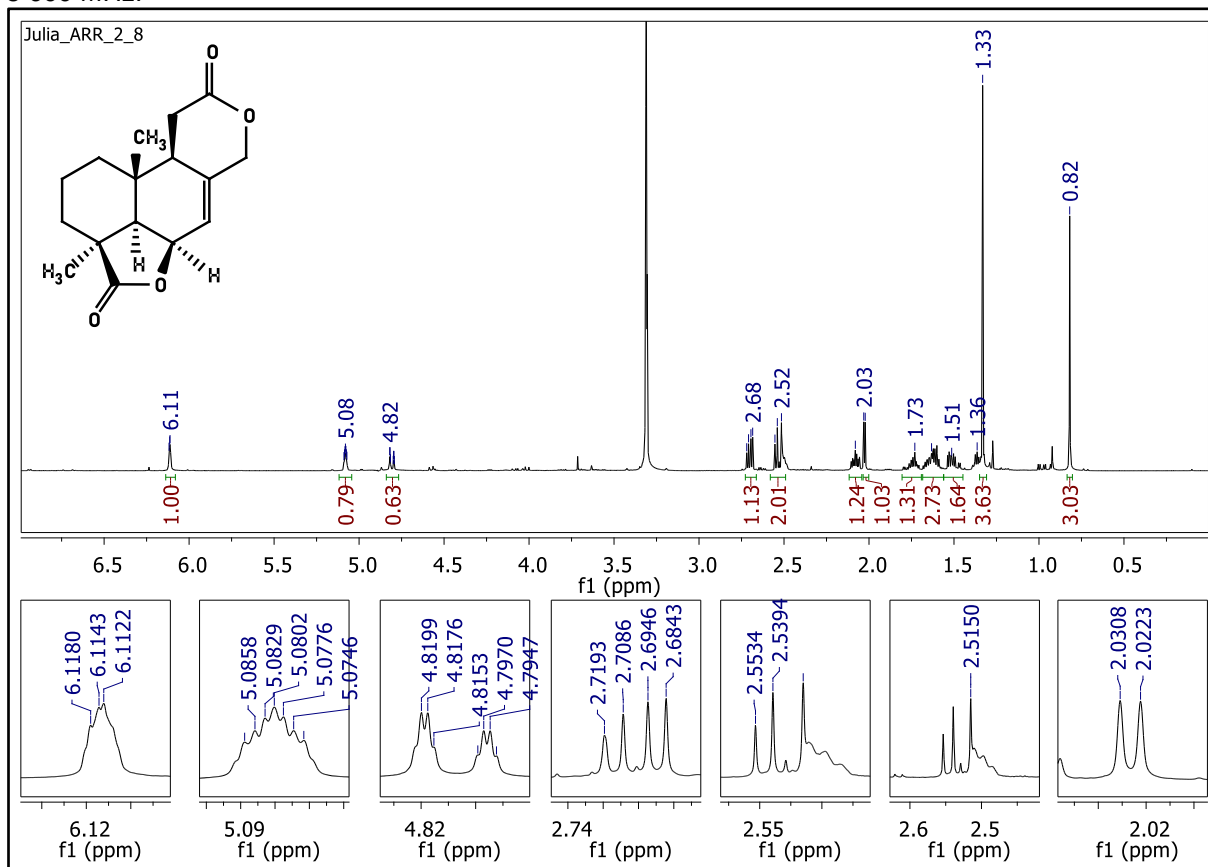
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 20 – Espectro de NOESY 1D da substância **07**, em CD₃OD e 600MHz.



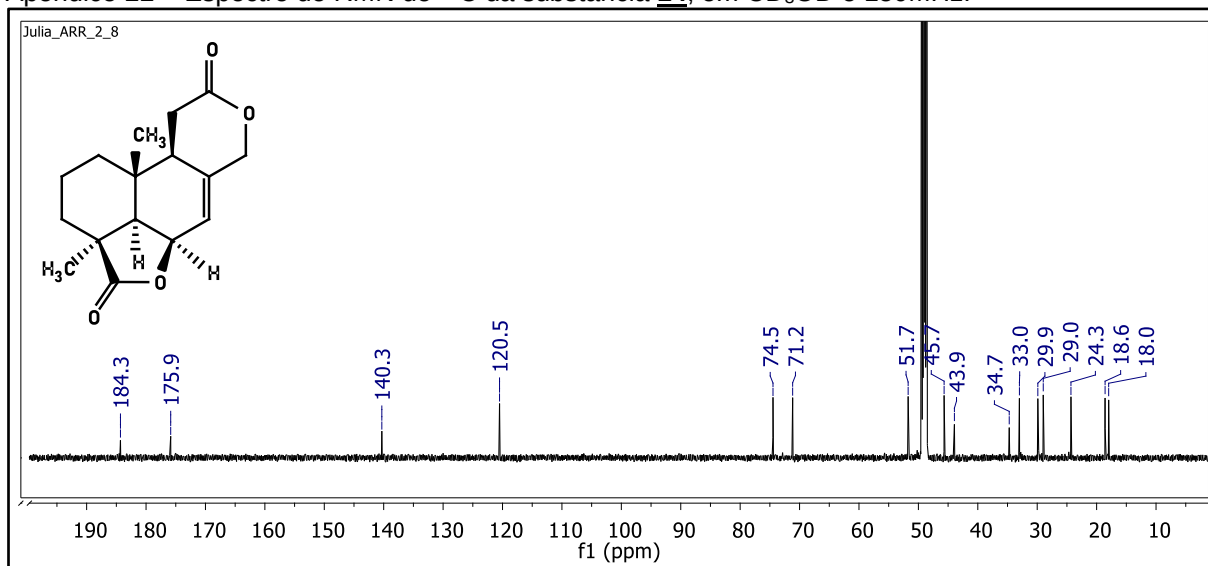
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020

Apêndice 21 – Espectro de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, da substância **14**, em CD_3OD e 600 MHz.

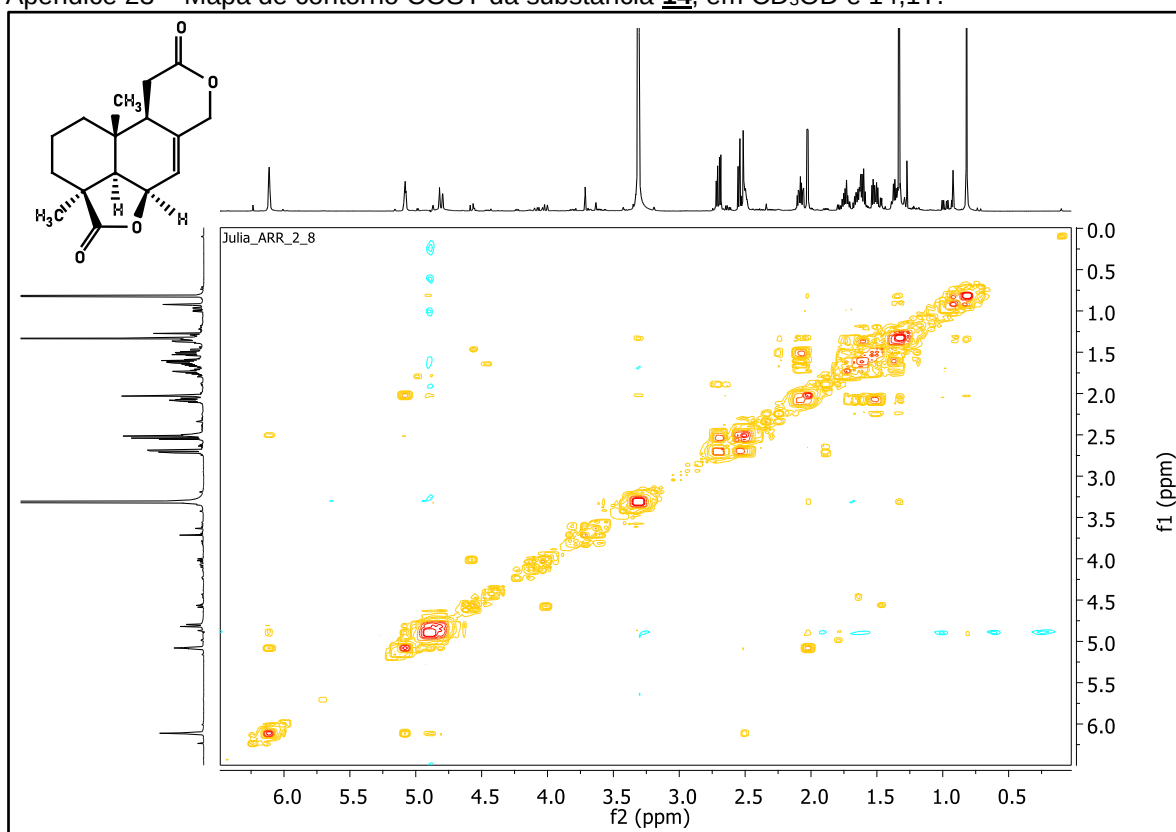


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

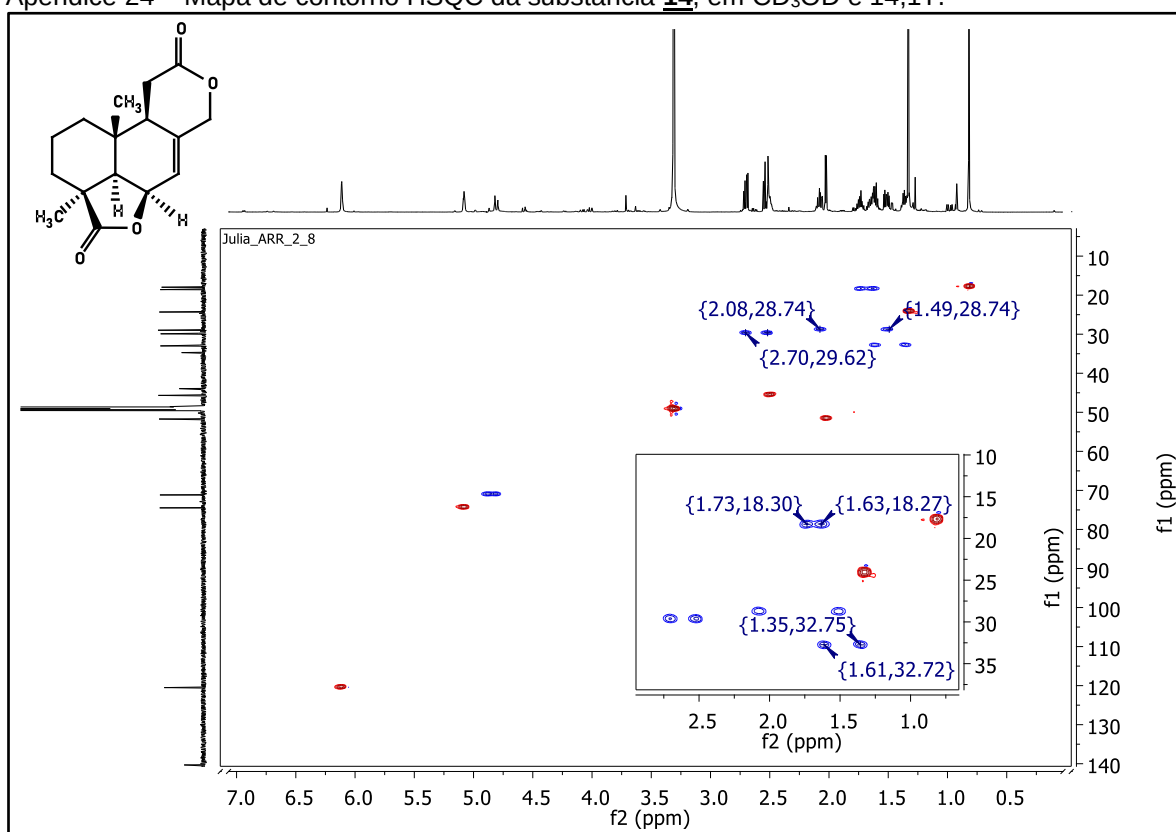
Apêndice 22 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **14**, em CD_3OD e 150MHz.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

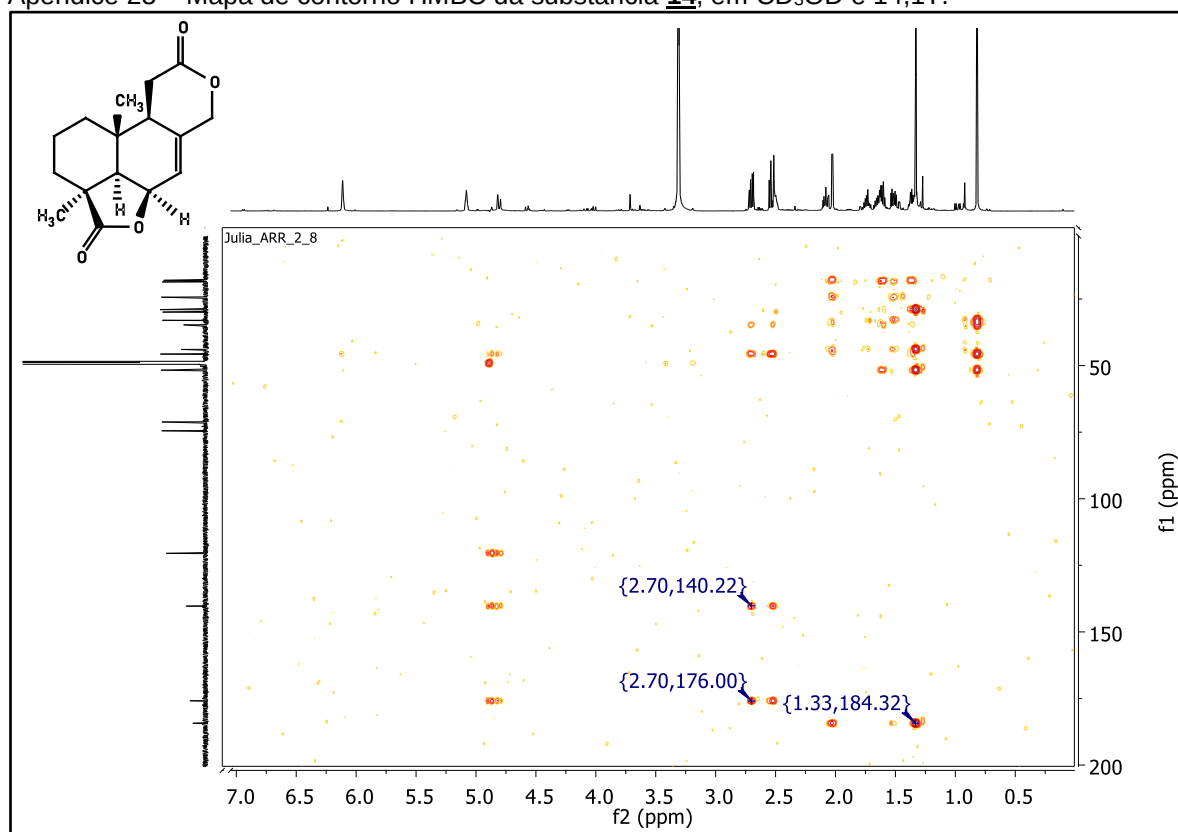
Apêndice 23 – Mapa de contorno COSY da substância **14**, em CD₃OD e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 24 – Mapa de contorno HSQC da substância **14**, em CD₃OD e 14,1T.

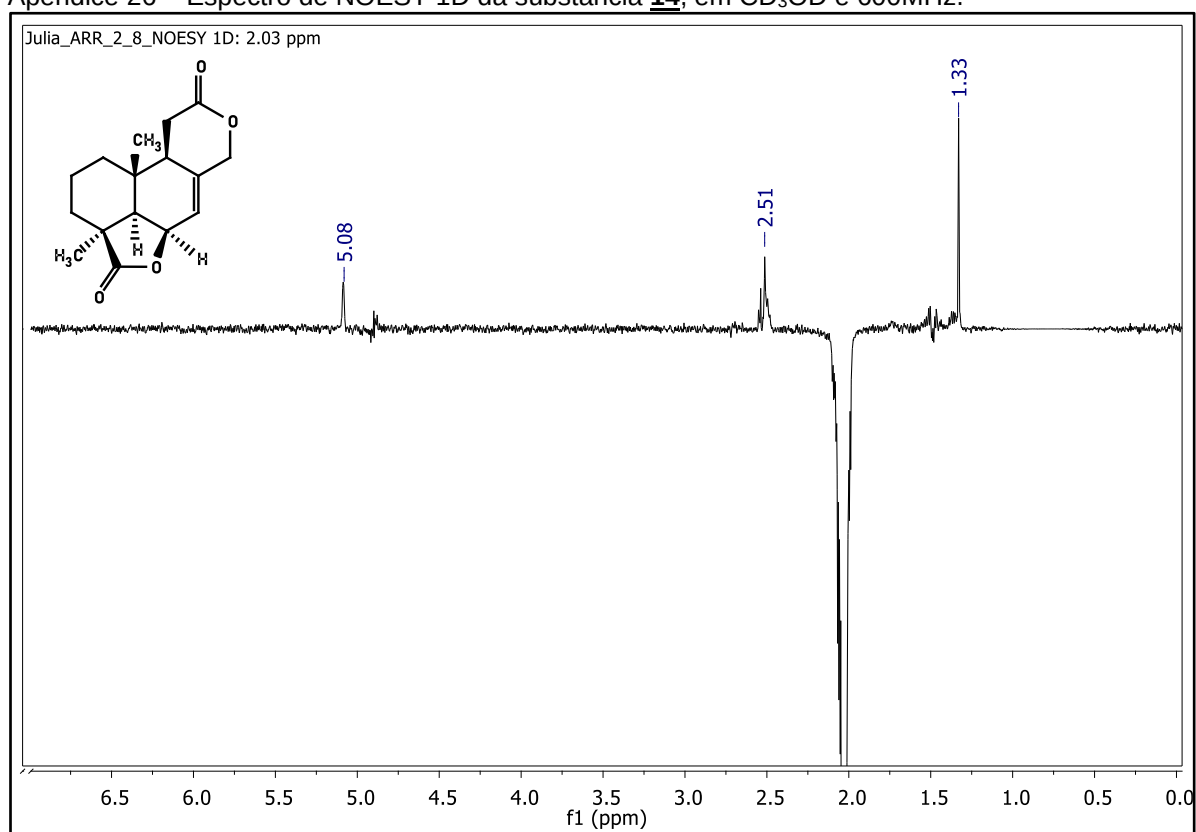
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 25 – Mapa de contorno HMBC da substância **14**, em CD₃OD e 14,1T.



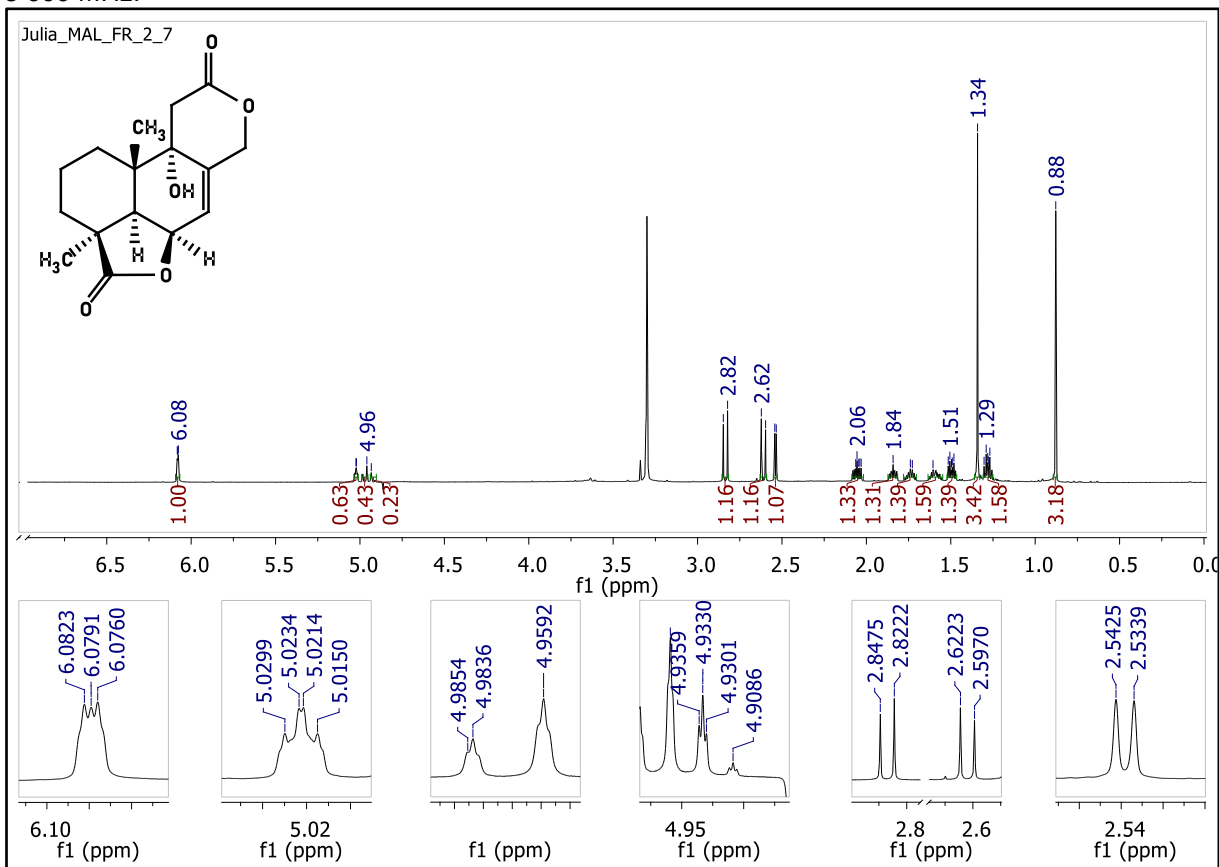
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 26 – Espectro de NOESY 1D da substância **14**, em CD₃OD e 600MHz.



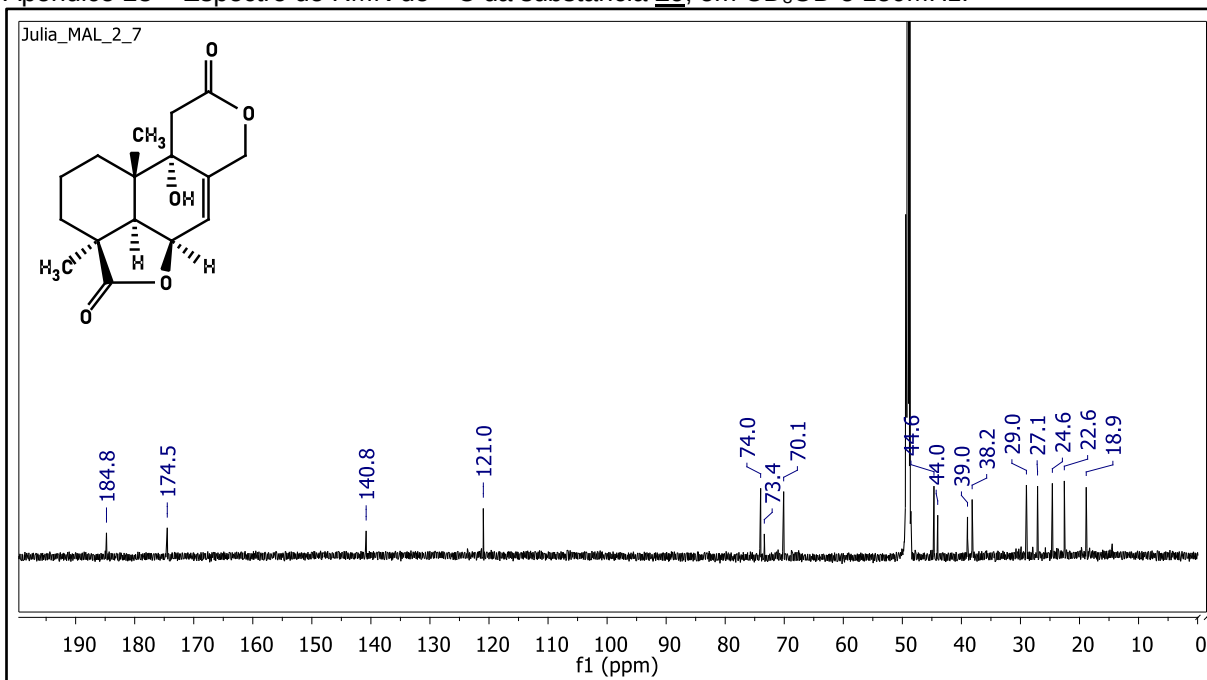
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 27 – Espectro de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, da substância **29**, em CD_3OD e 600 MHz.



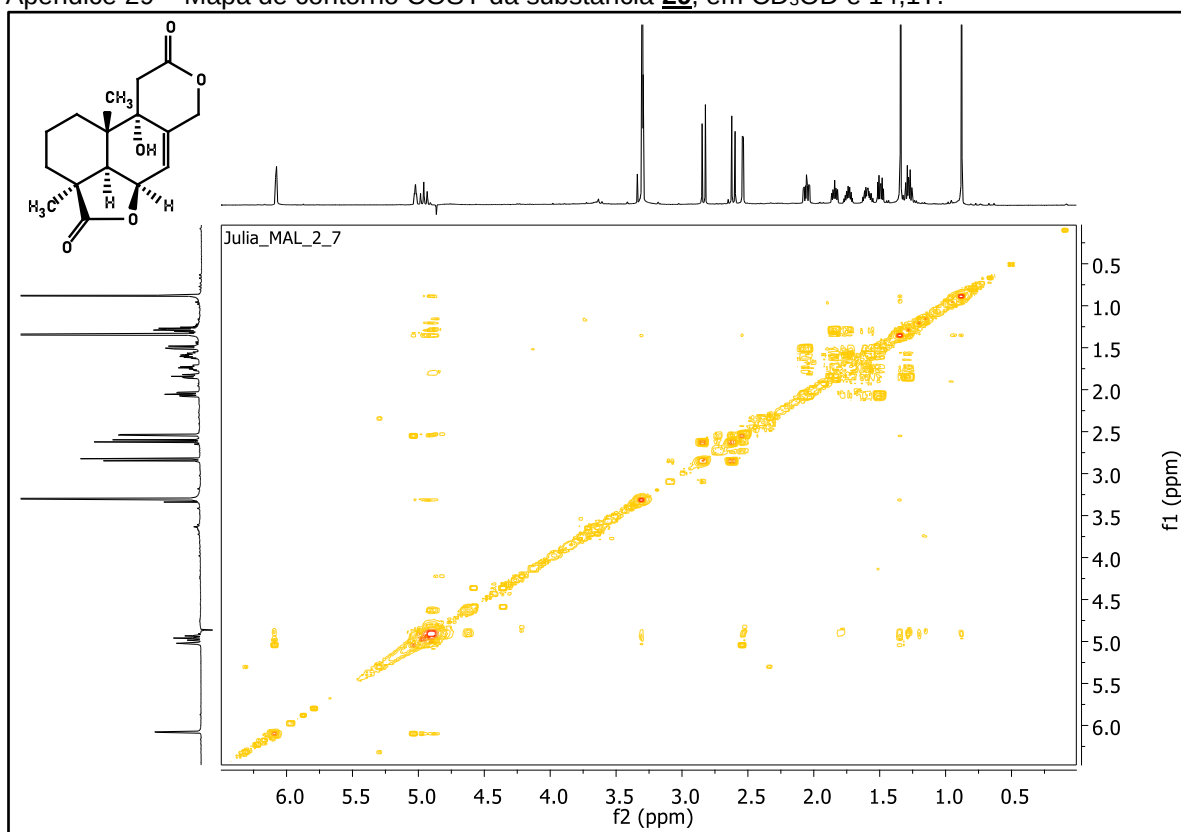
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 28 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **29**, em CD_3OD e 150MHz.



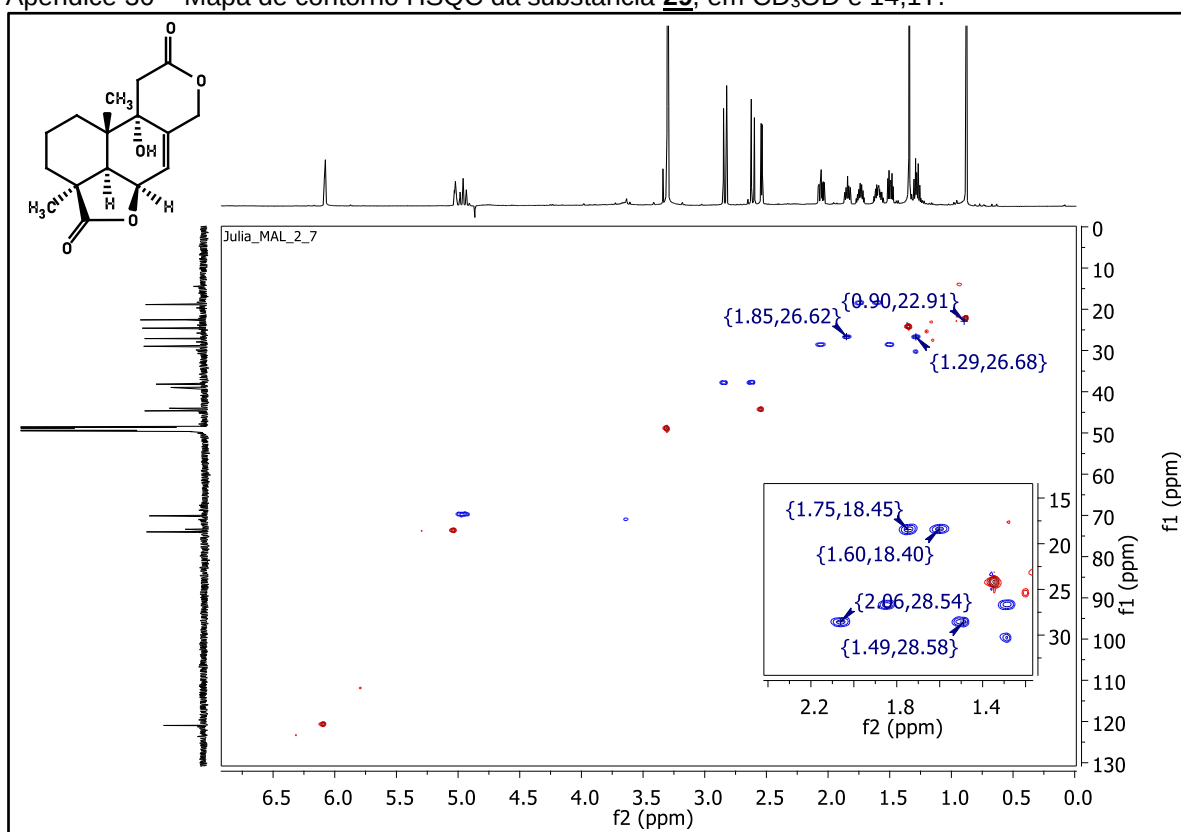
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 29 – Mapa de contorno COSY da substância **29**, em CD₃OD e 14,1T.



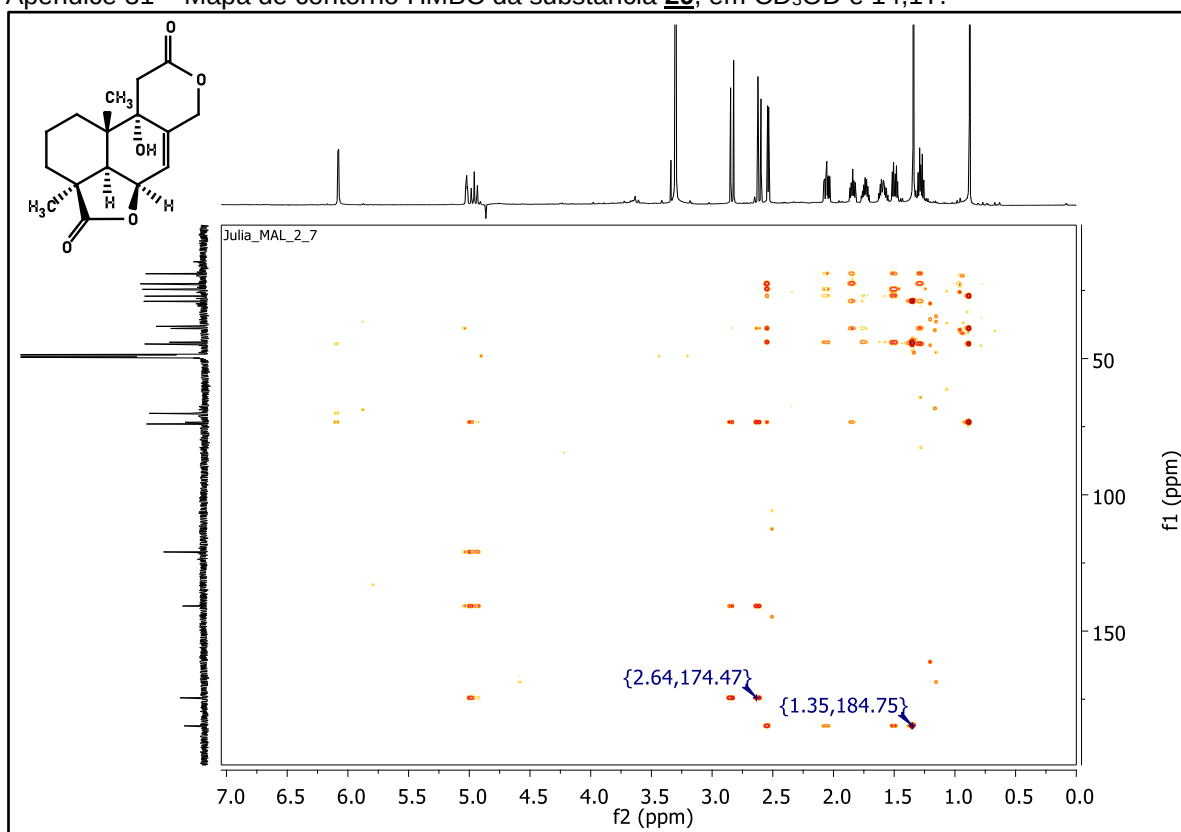
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 30 – Mapa de contorno HSQC da substância **29**, em CD₃OD e 14,1T.



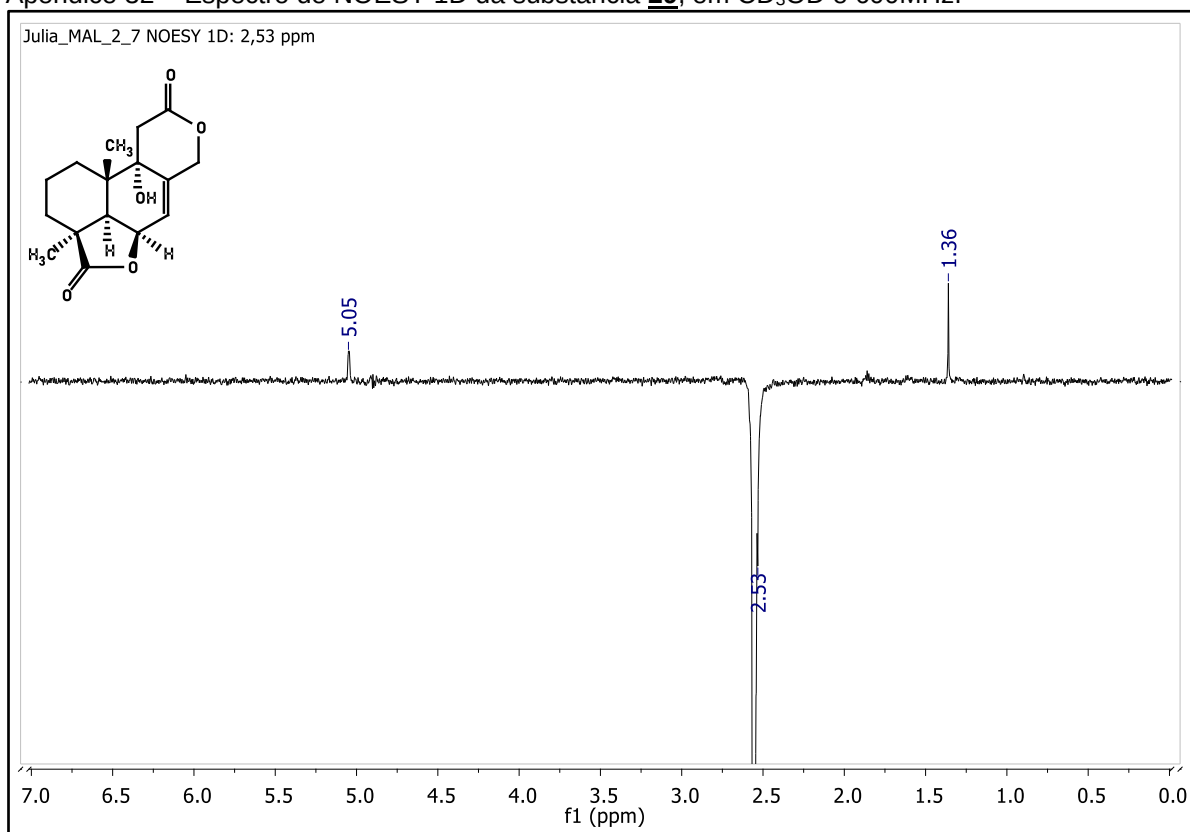
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 31 – Mapa de contorno HMBC da substância **29**, em CD₃OD e 14,1T.



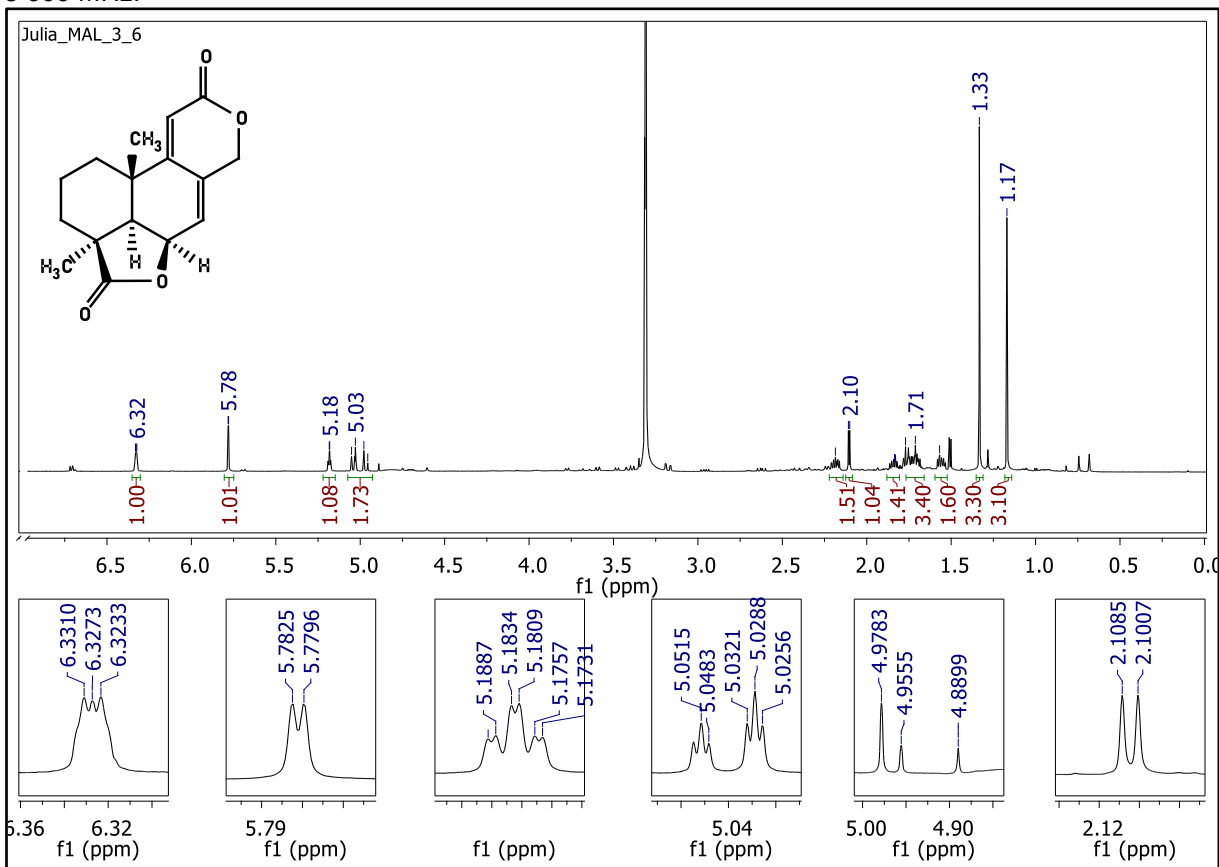
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 32 – Espectro de NOESY 1D da substância **29**, em CD₃OD e 600MHz.



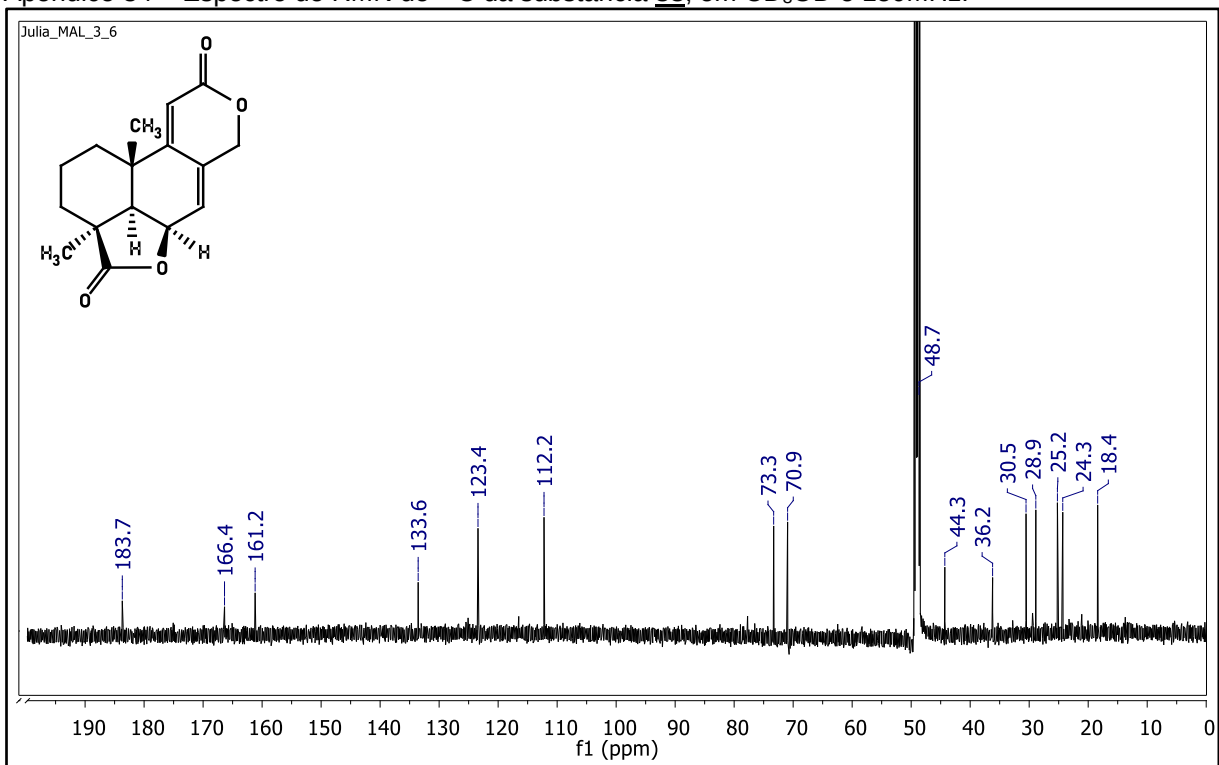
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 33 – Espectro de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, da substância **33**, em CD_3OD e 600 MHz.



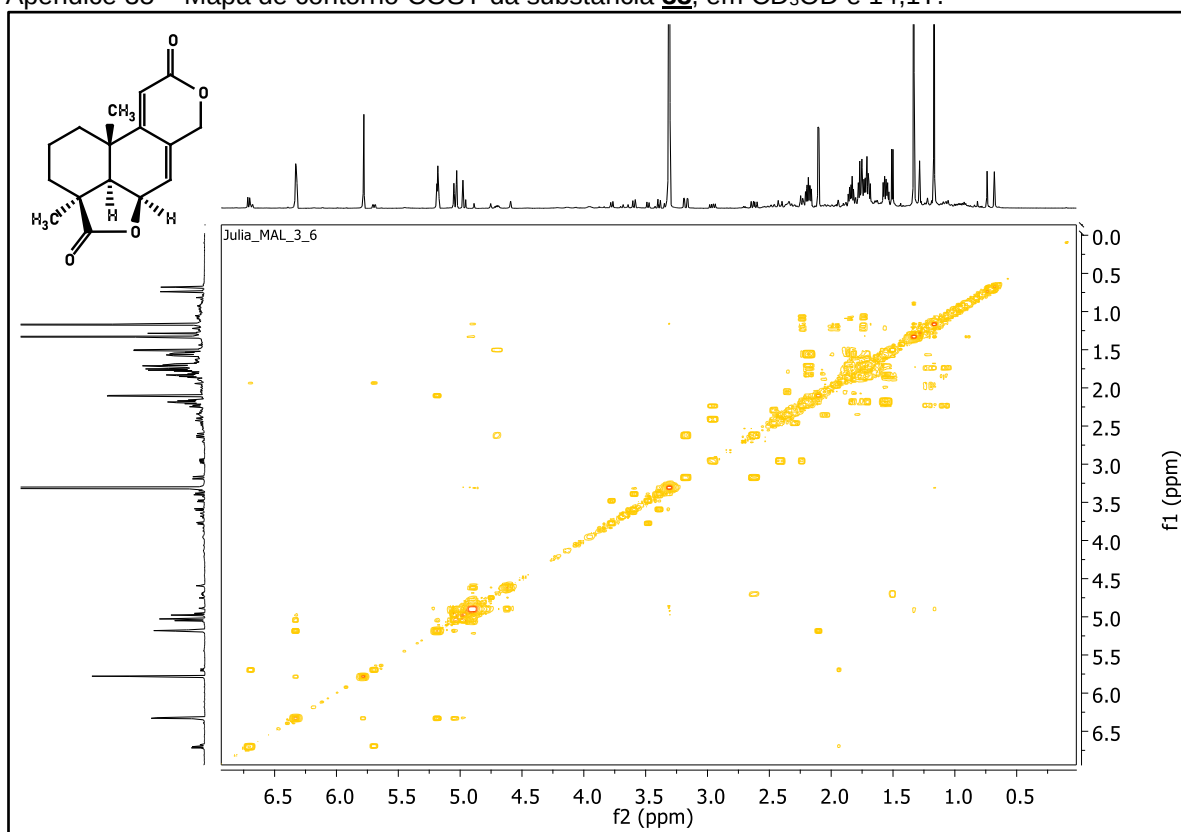
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 34 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **33**, em CD_3OD e 150MHz.



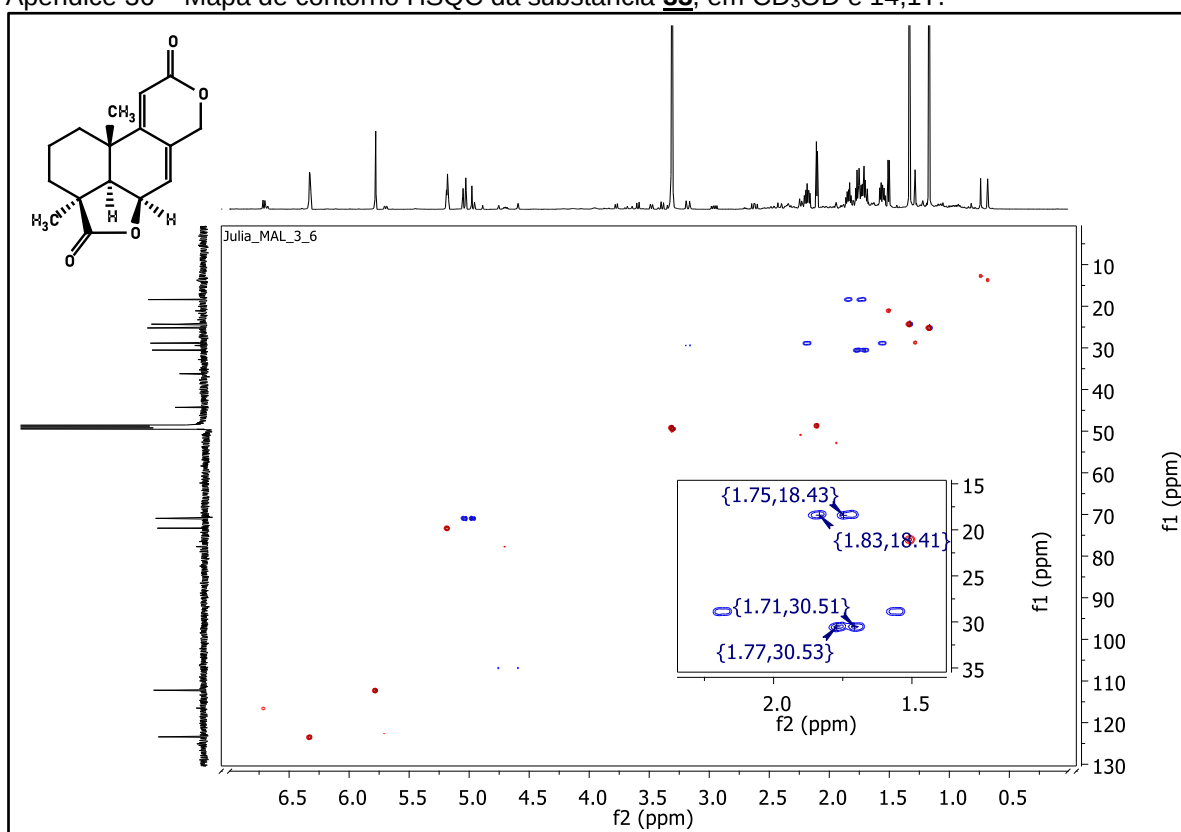
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 35 – Mapa de contorno COSY da substância **33**, em CD₃OD e 14,1T.



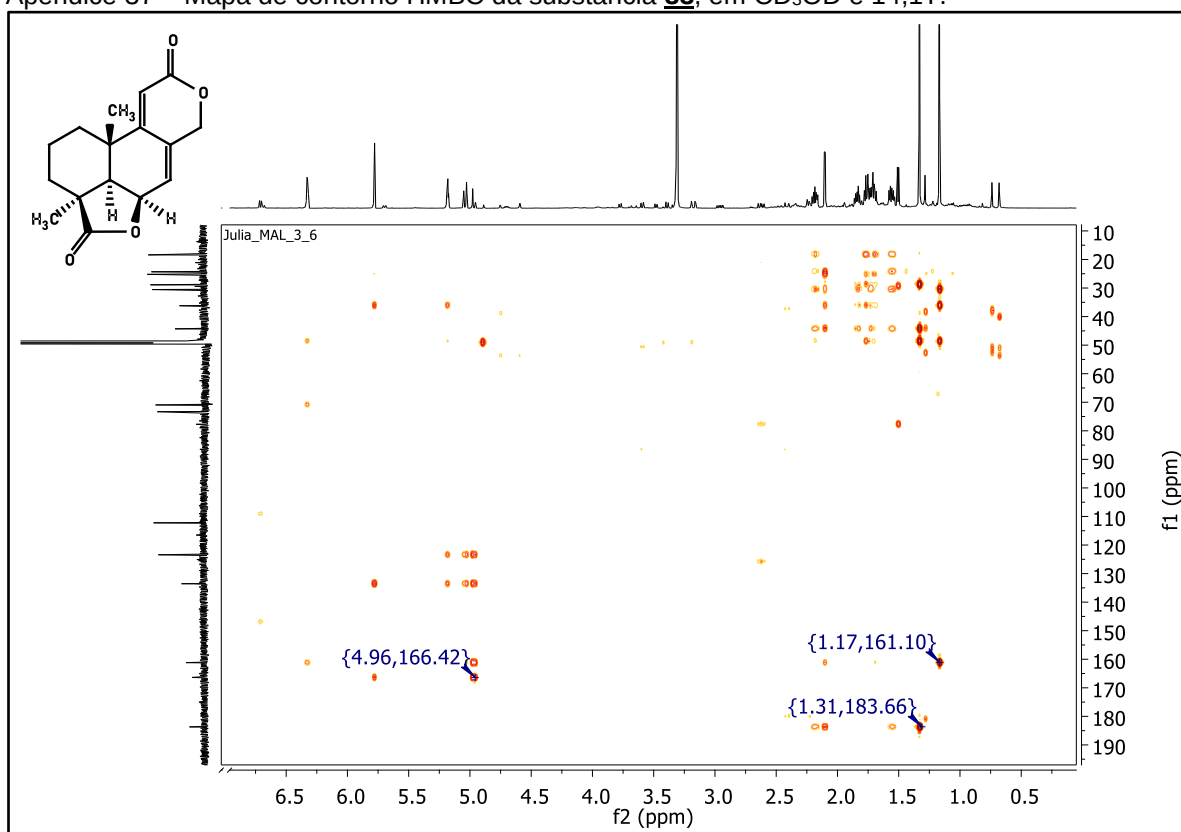
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 36 – Mapa de contorno HSQC da substância **33**, em CD₃OD e 14,1T.



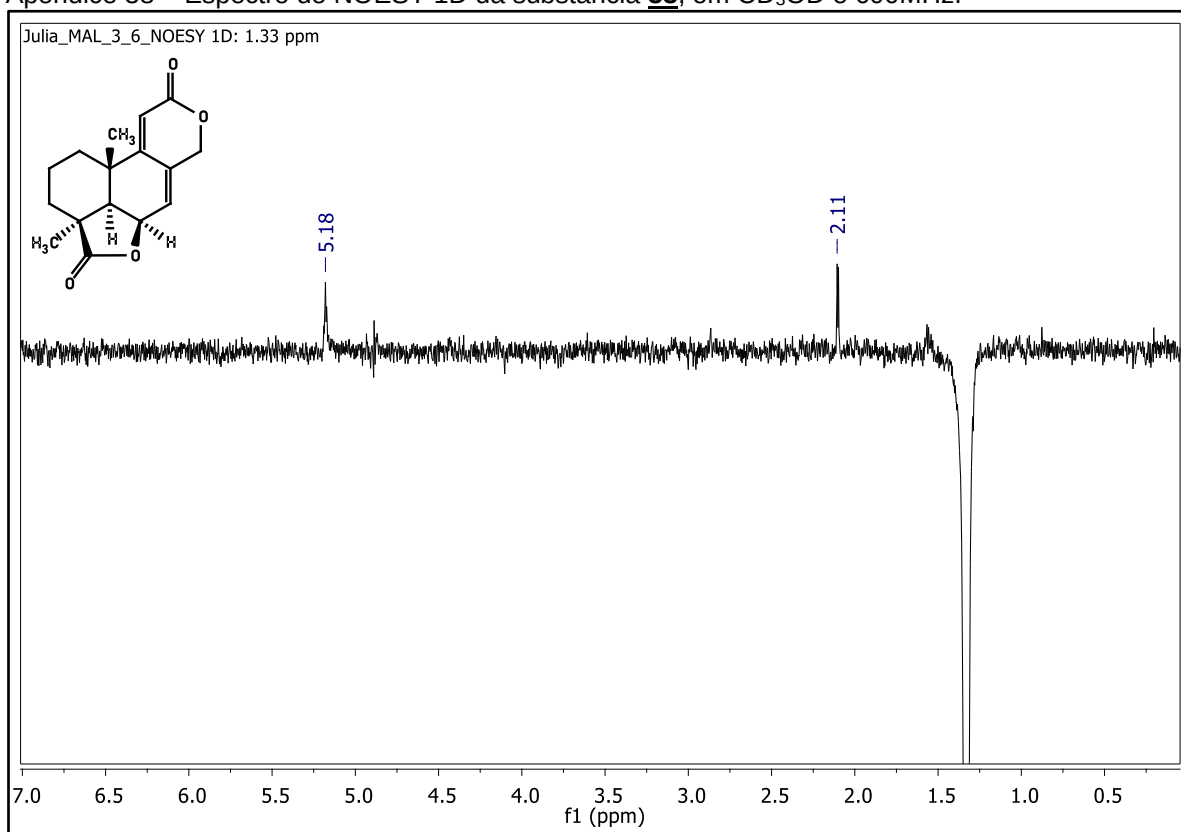
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 37 – Mapa de contorno HMBC da substância **33**, em CD₃OD e 14,1T.



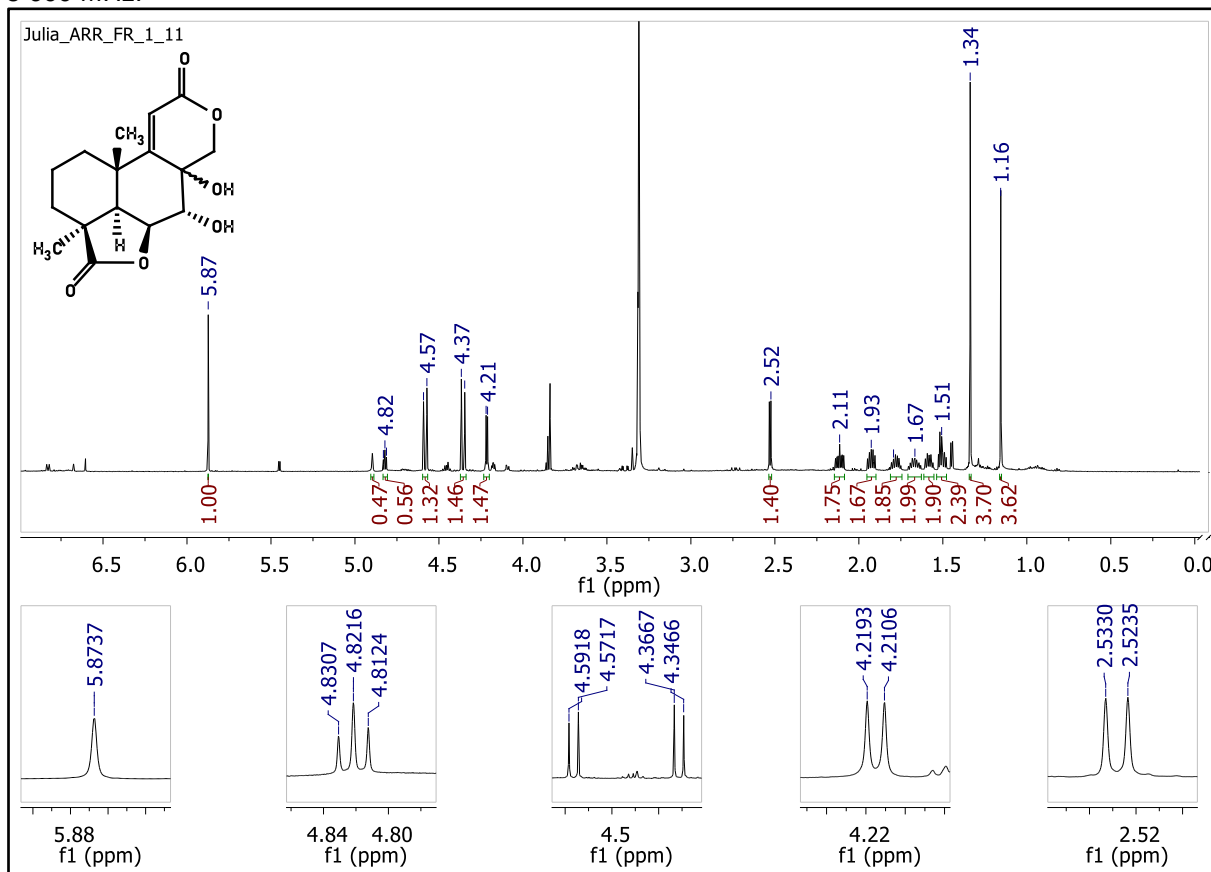
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 38 – Espectro de NOESY 1D da substância **33**, em CD₃OD e 600MHz.



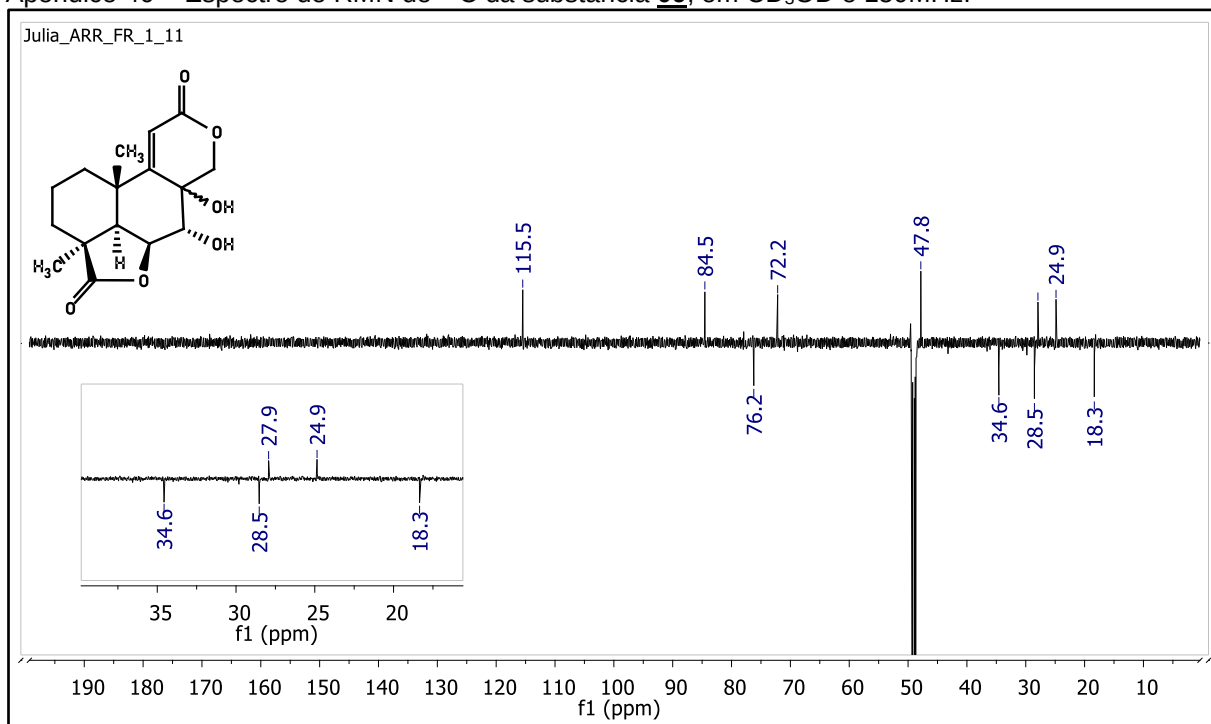
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 39 – Espectro de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, da substância **09**, em CD_3OD e 600 MHz.



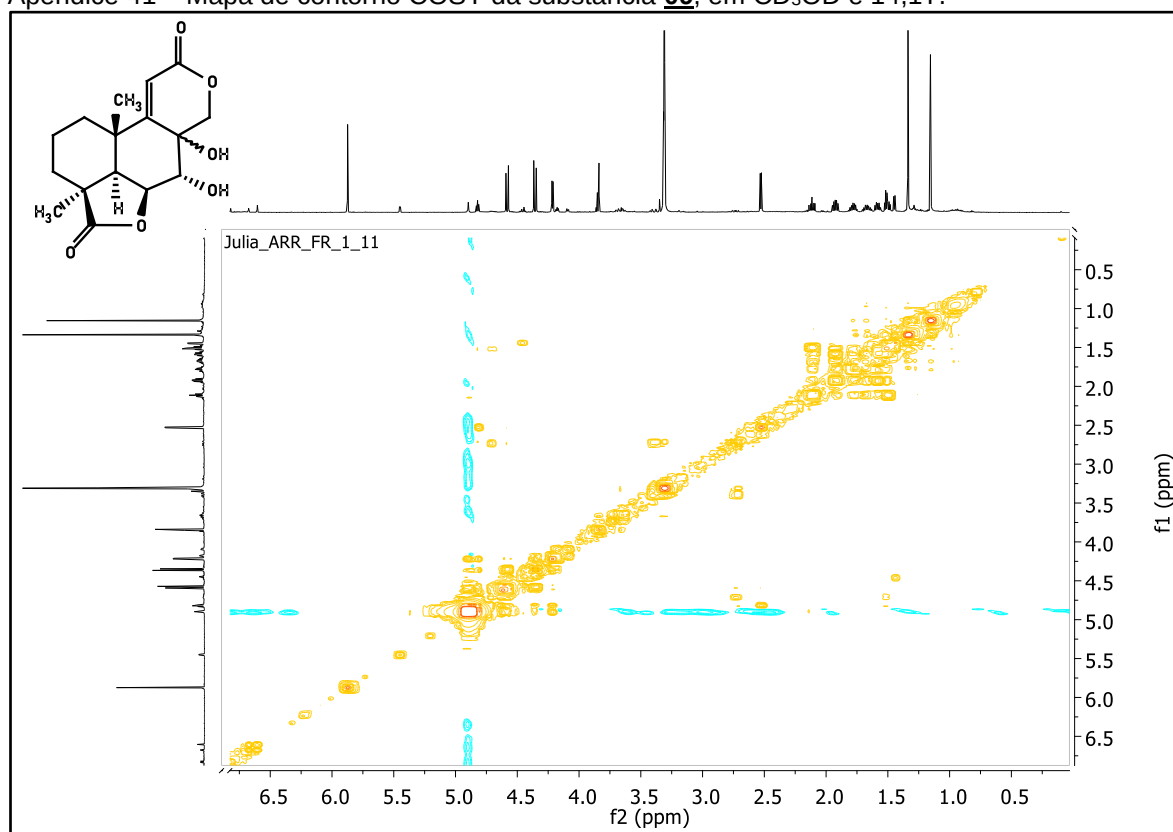
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 40 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **09**, em CD_3OD e 150MHz.



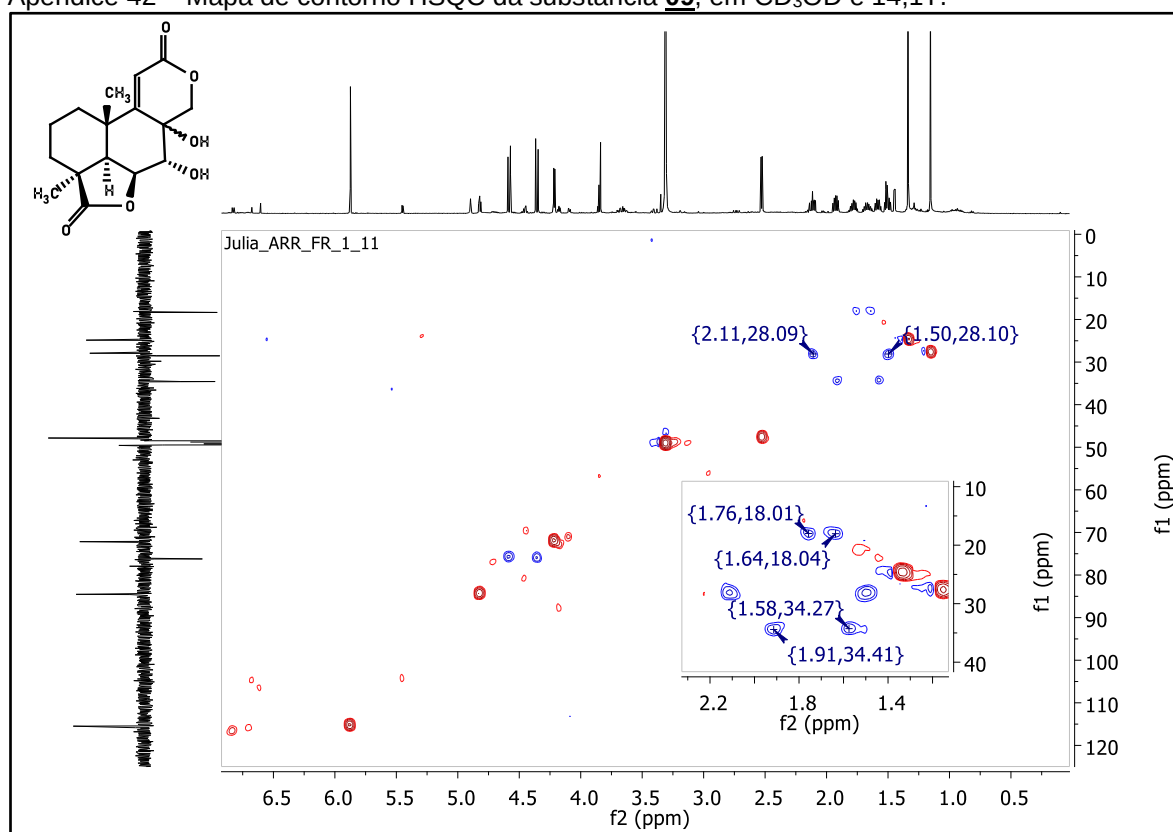
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 41 – Mapa de contorno COSY da substância **09**, em CD₃OD e 14,1T.



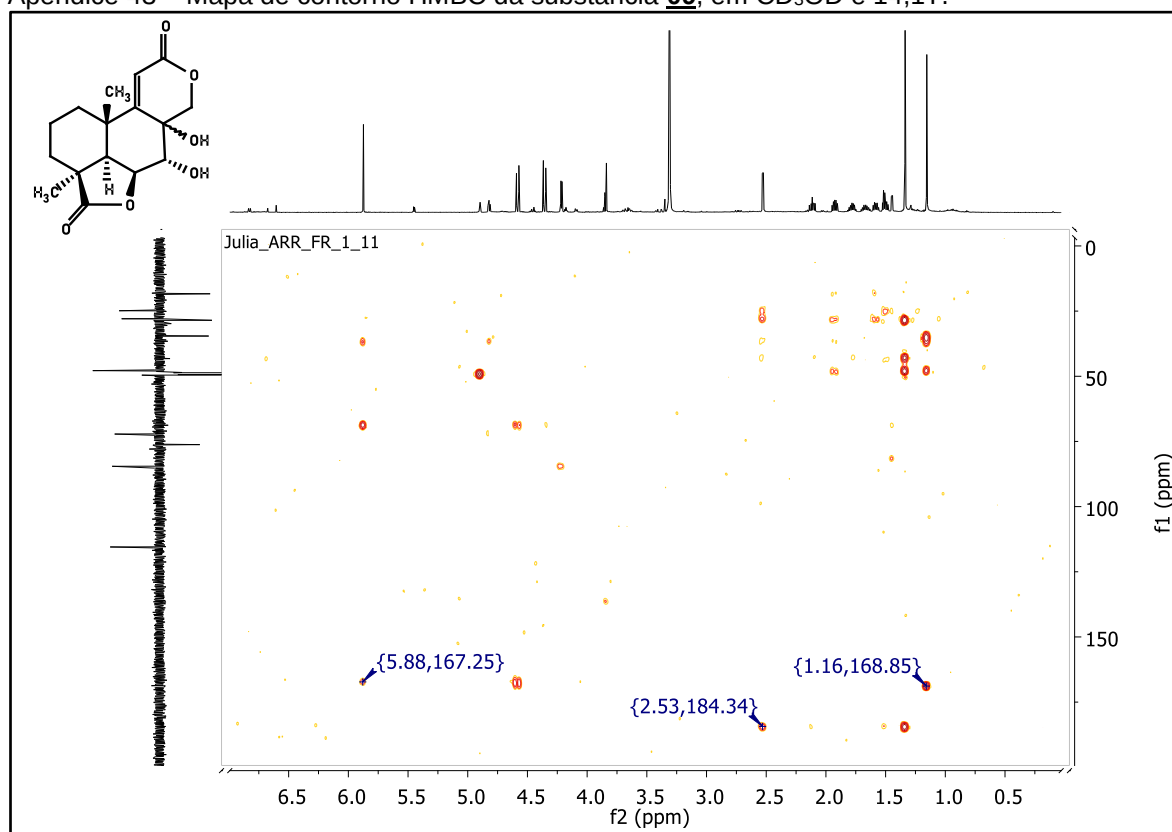
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 42 – Mapa de contorno HSQC da substância **09**, em CD₃OD e 14,1T.



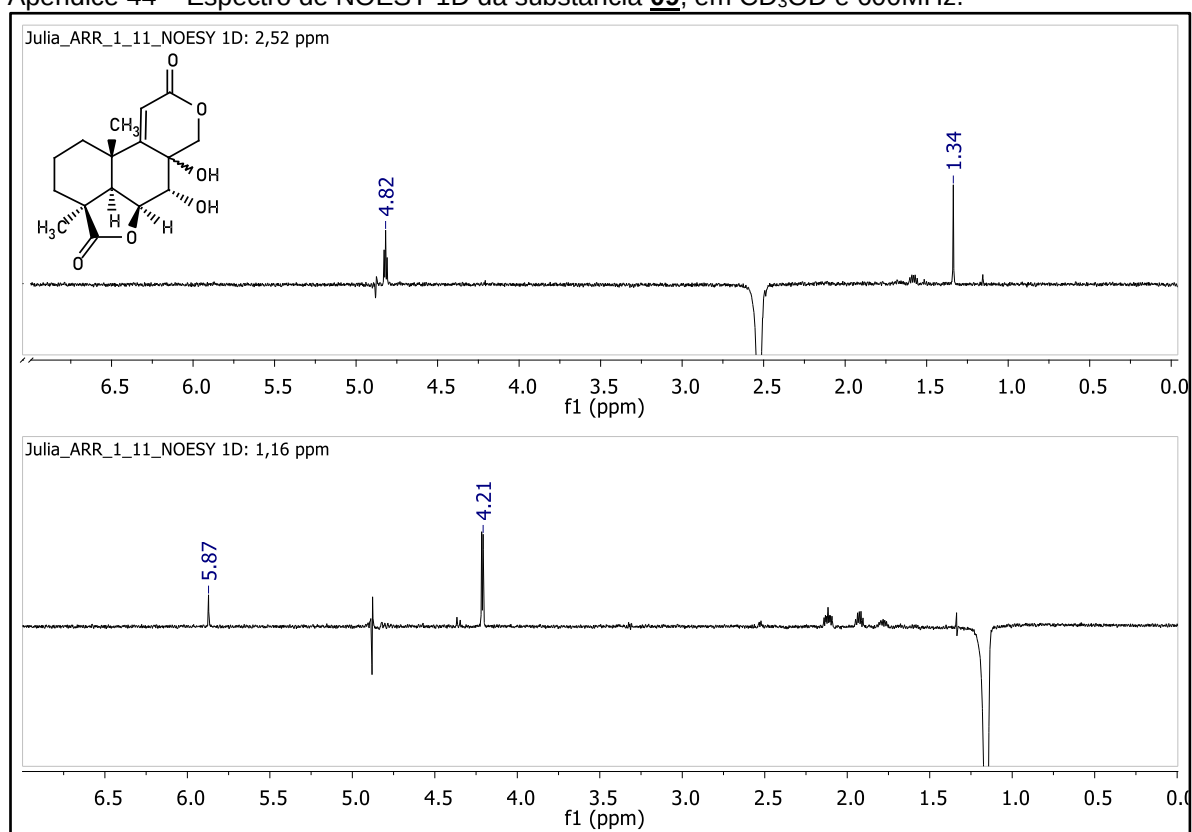
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 43 – Mapa de contorno HMBC da substância **09**, em CD₃OD e 14,1T.



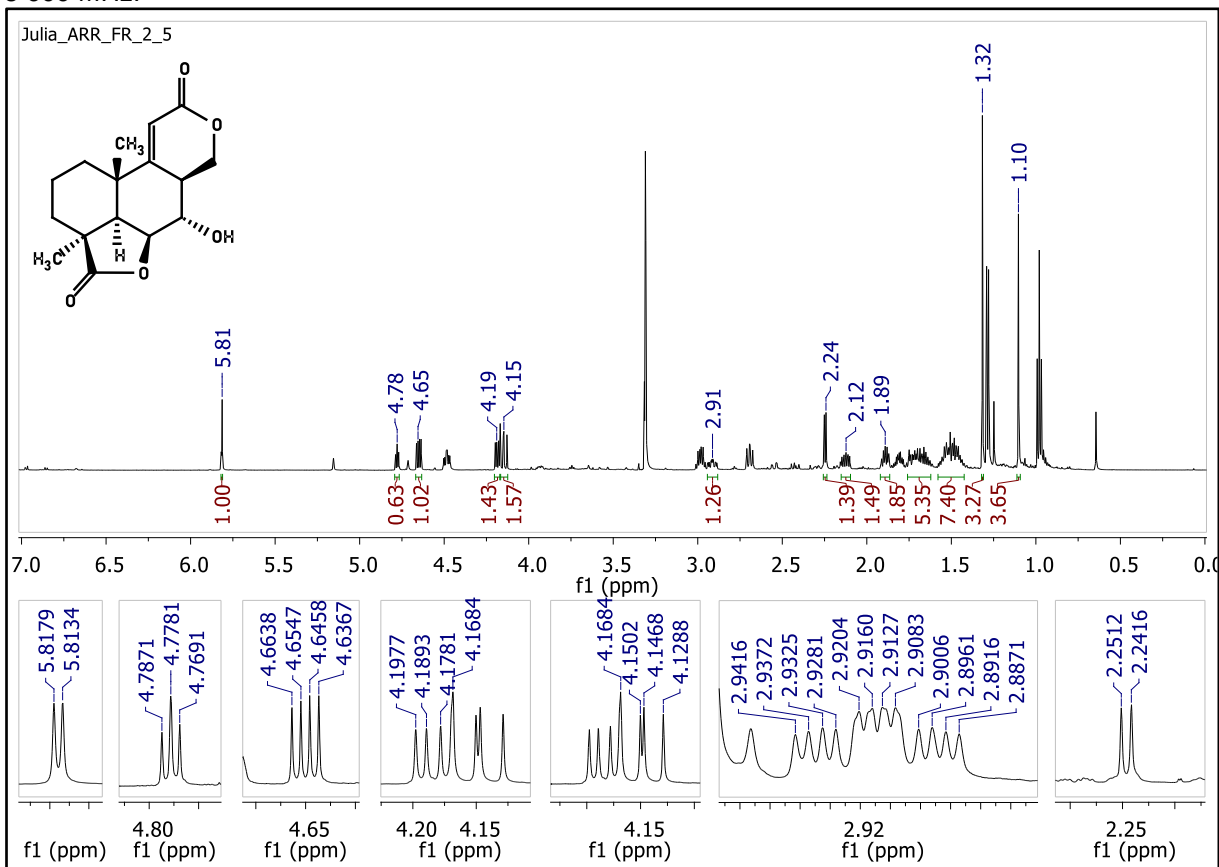
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 44 – Espectro de NOESY 1D da substância **09**, em CD₃OD e 600MHz.



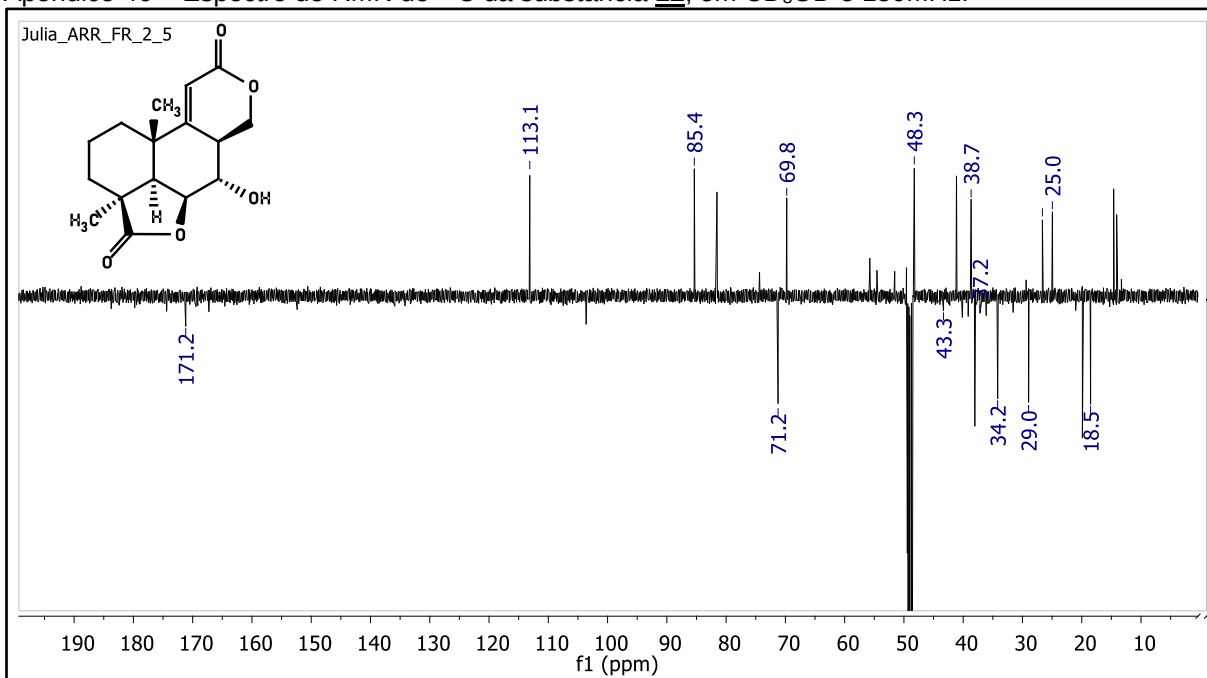
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 45 – Espectro de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, da substância **12**, em CD_3OD e 600 MHz.



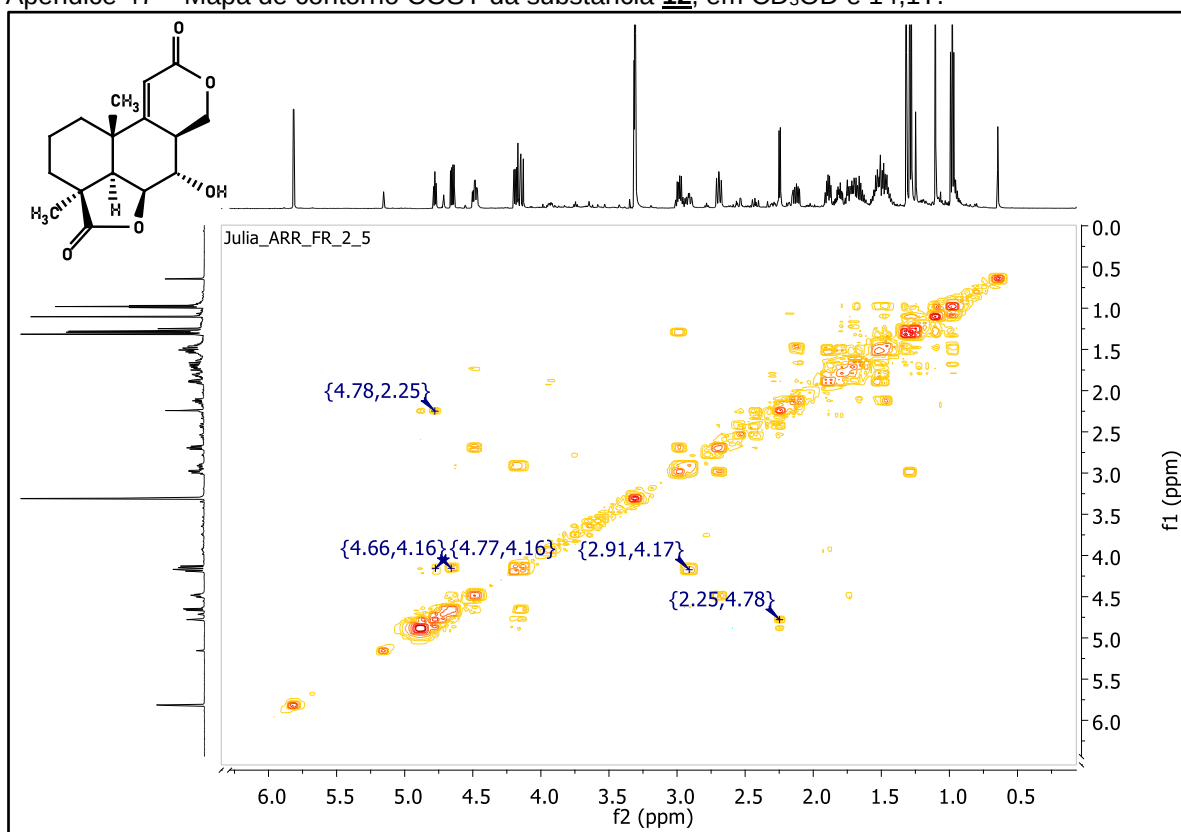
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 46 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **12**, em CD_3OD e 150MHz.



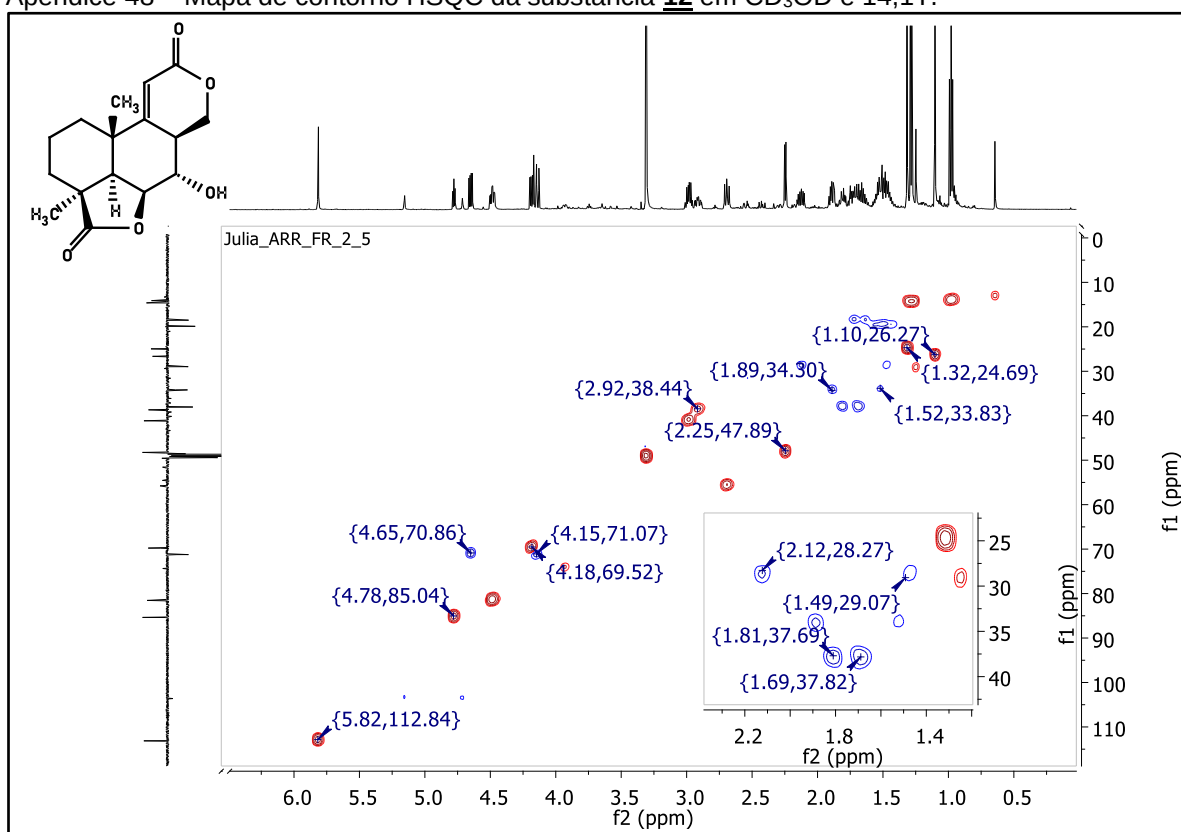
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 47 – Mapa de contorno COSY da substância **12**, em CD₃OD e 14,1T.



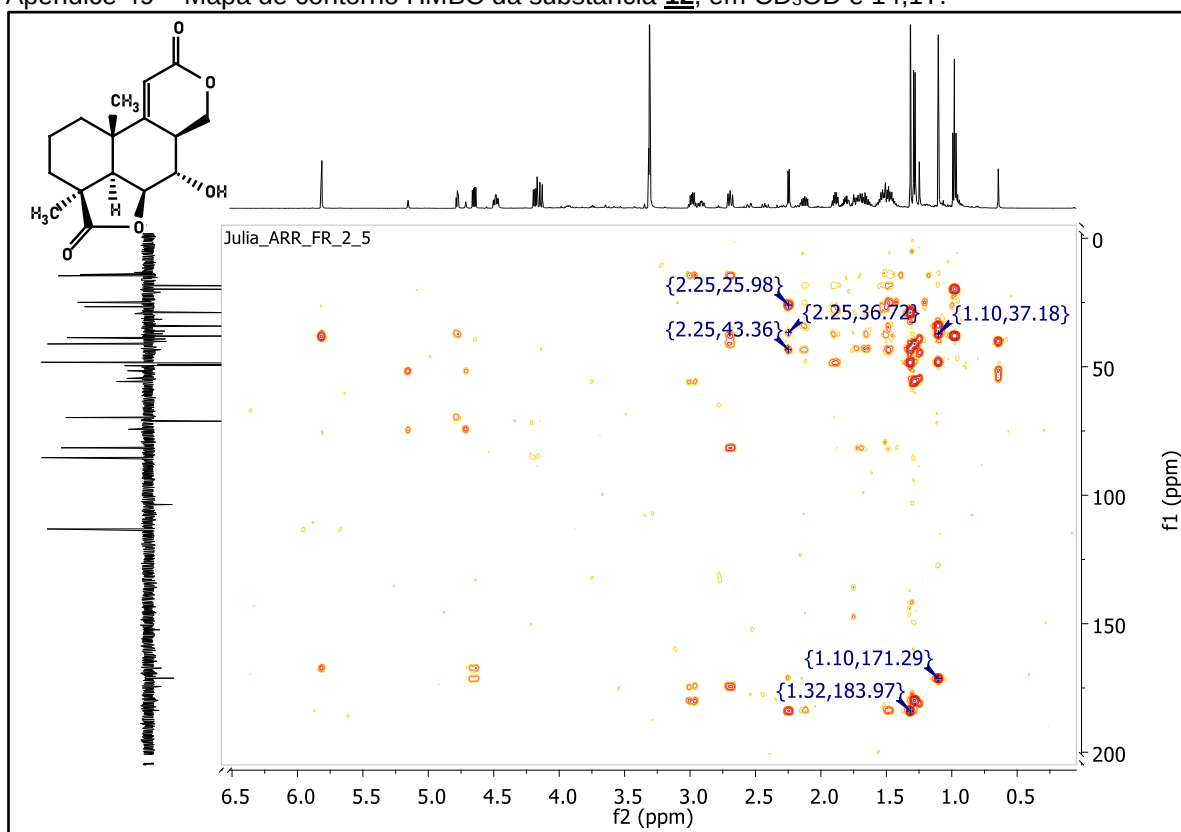
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 48 – Mapa de contorno HSQC da substância **12** em CD₃OD e 14,1T.



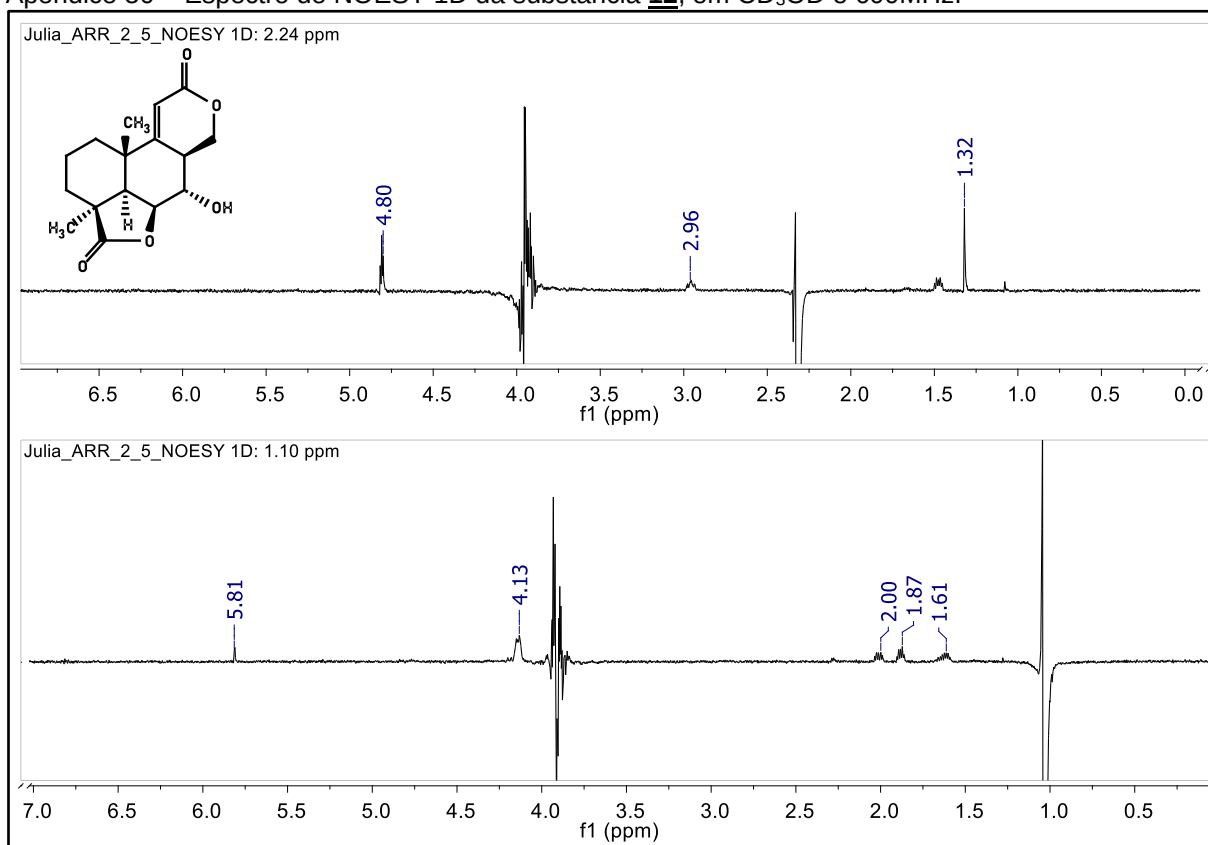
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 49 – Mapa de contorno HMBC da substância **12**, em CD₃OD e 14,1T.



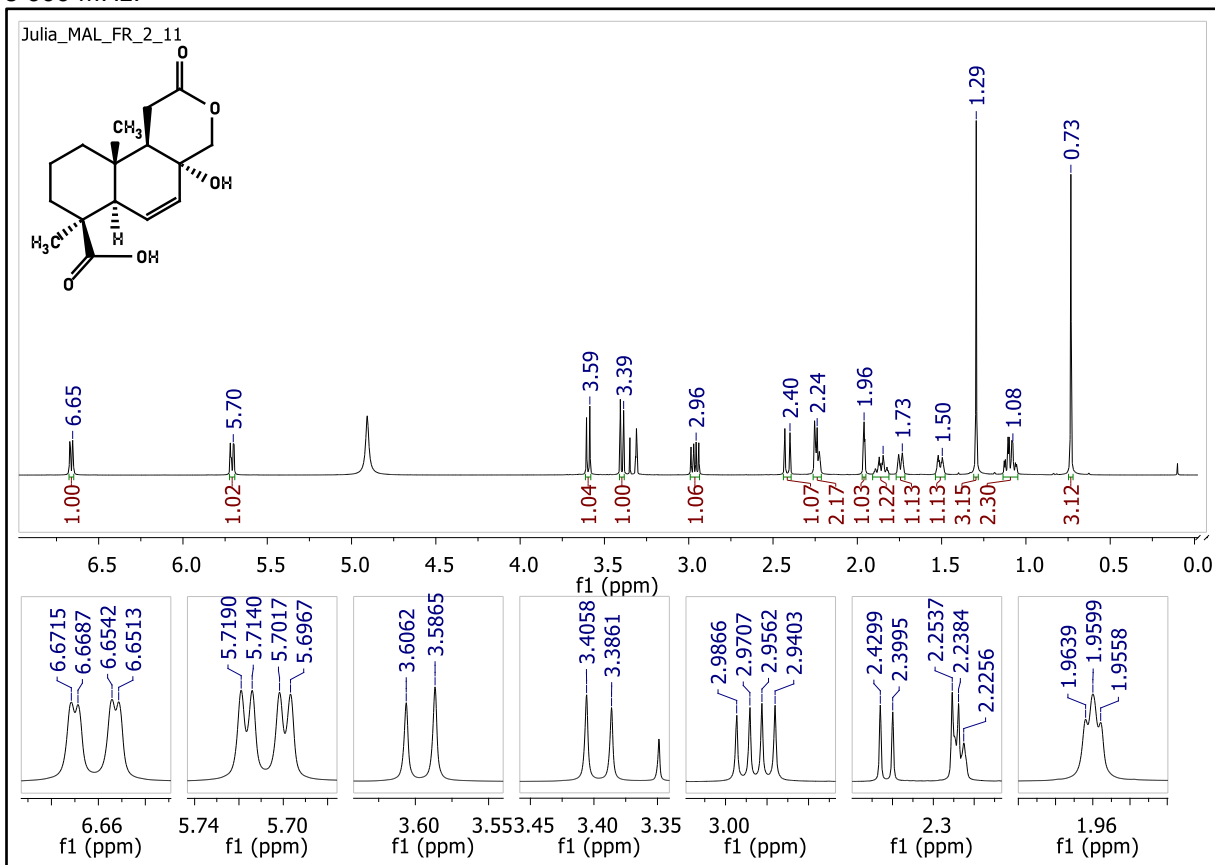
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 50 – Espectro de NOESY 1D da substância **12**, em CD₃OD e 600MHz.



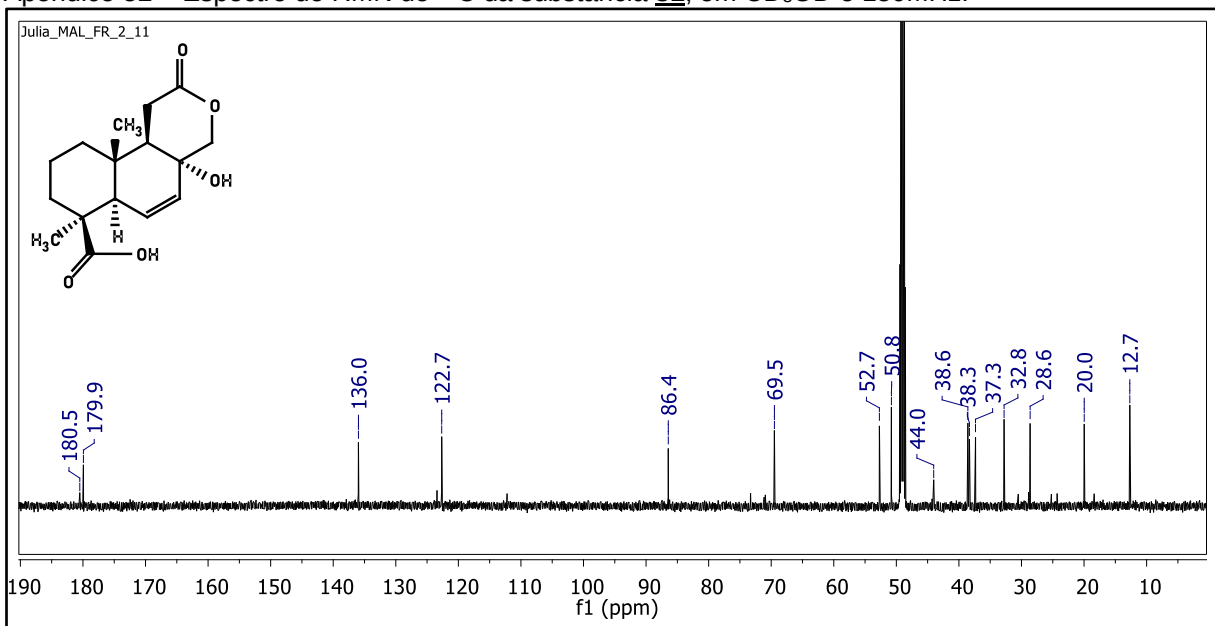
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 51 – Espectro de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, da substância **31**, em CD_3OD e 600 MHz.



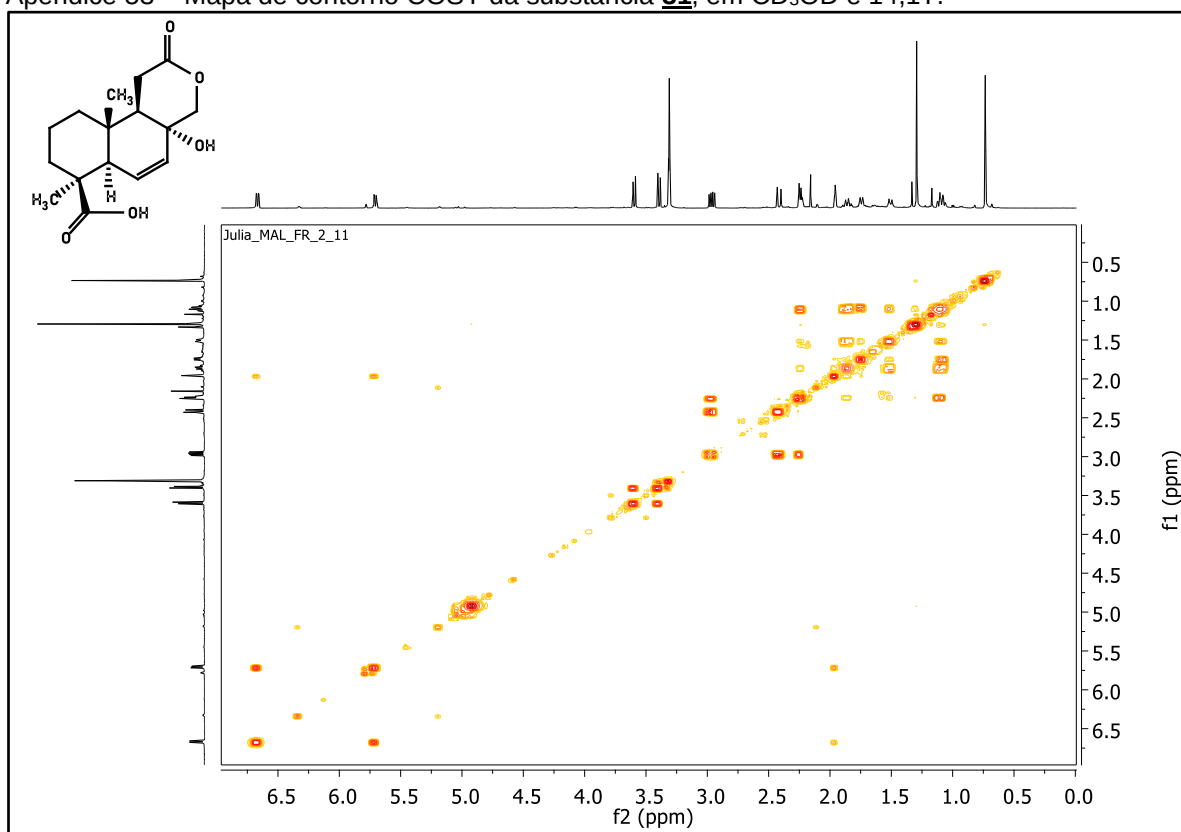
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 52 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **31**, em CD_3OD e 150MHz.



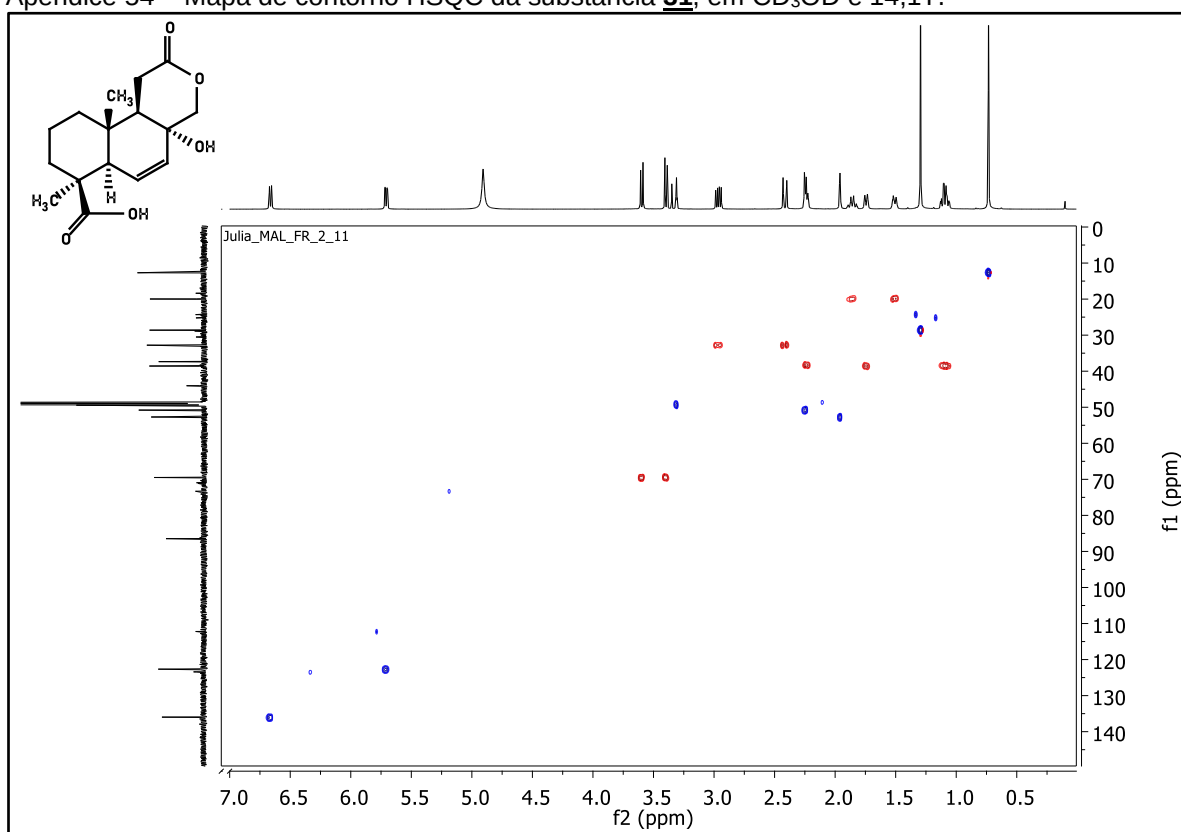
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 53 – Mapa de contorno COSY da substância **31**, em CD₃OD e 14,1T.



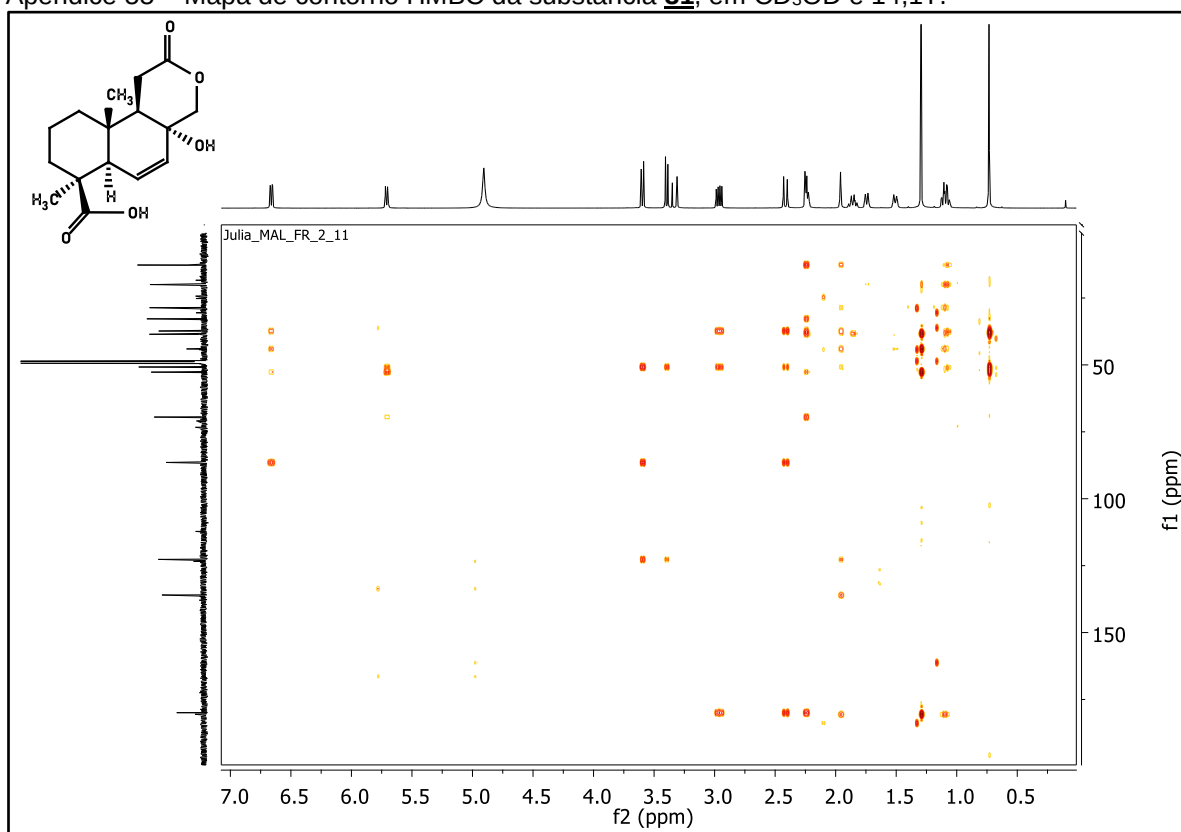
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 54 – Mapa de contorno HSQC da substância **31**, em CD₃OD e 14,1T.



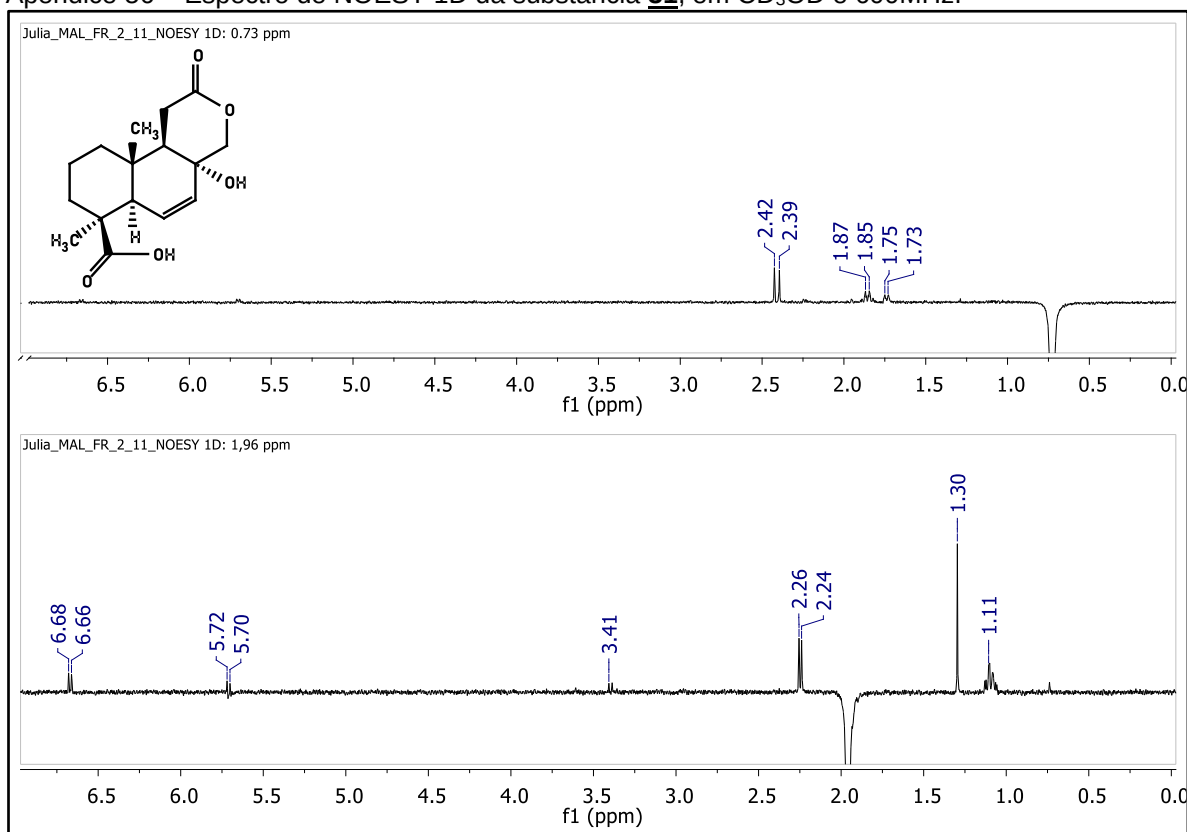
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 55 – Mapa de contorno HMBC da substância **31**, em CD₃OD e 14,1T.



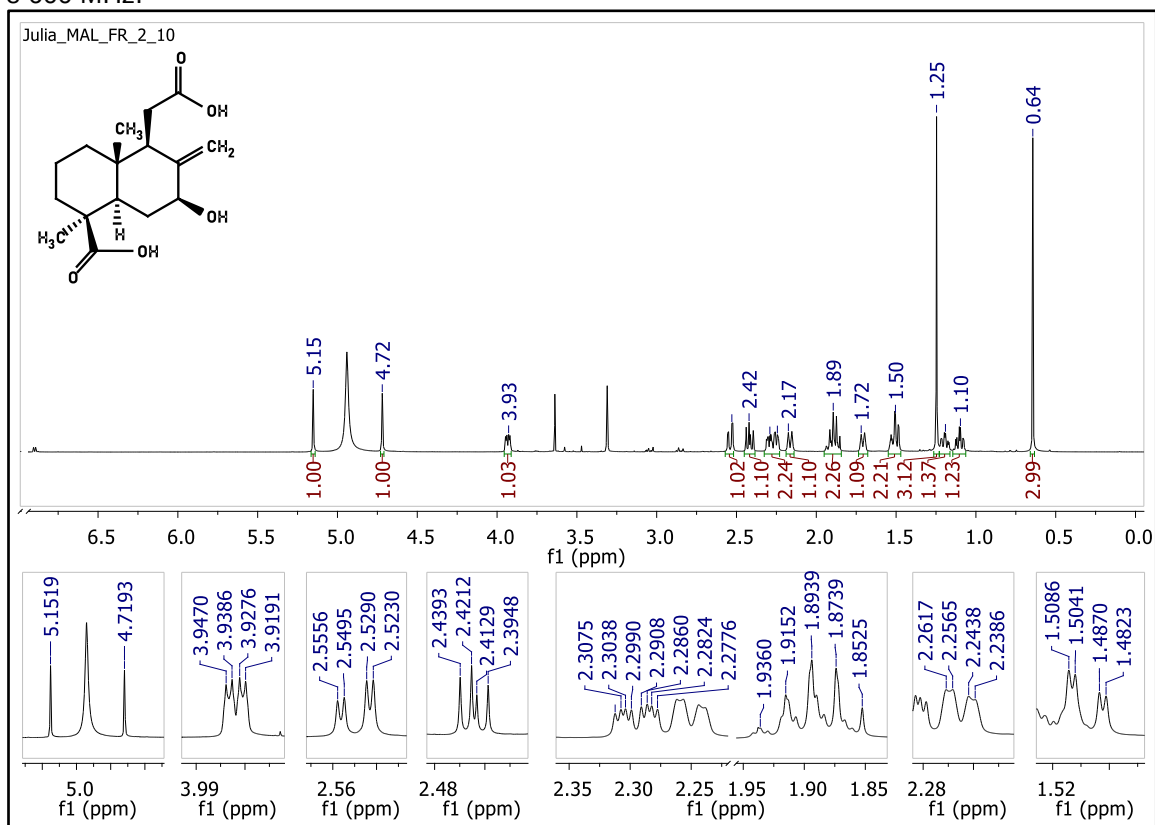
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 56 – Espectro de NOESY 1D da substância **31**, em CD₃OD e 600MHz.



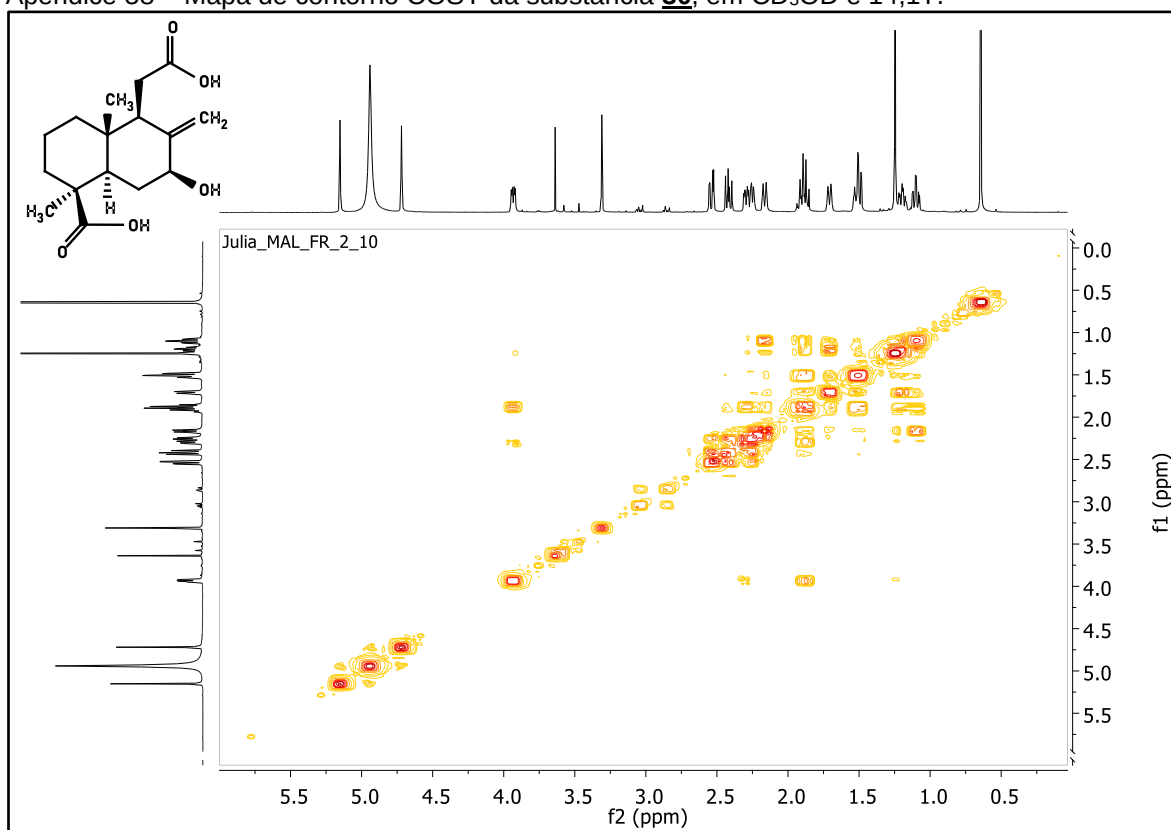
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 57 – Espectro de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, da substância **30**, em CD_3OD e 600 MHz.

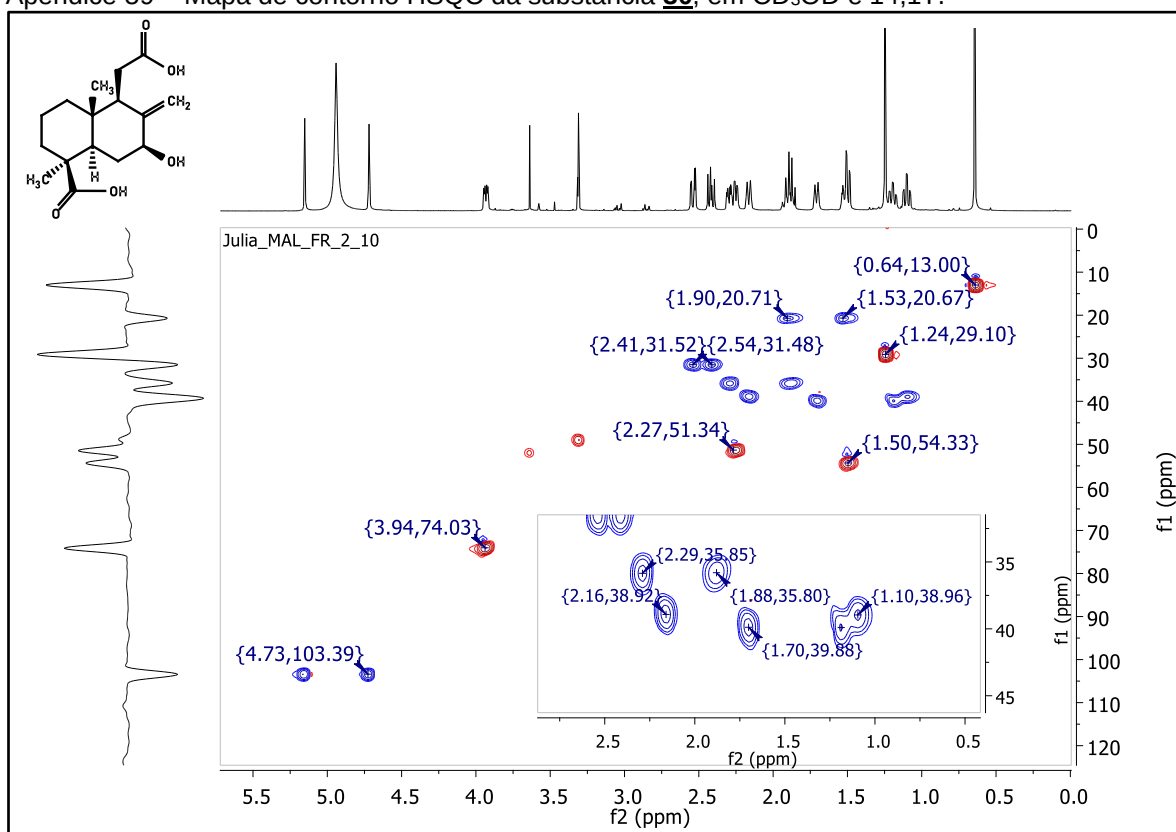


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

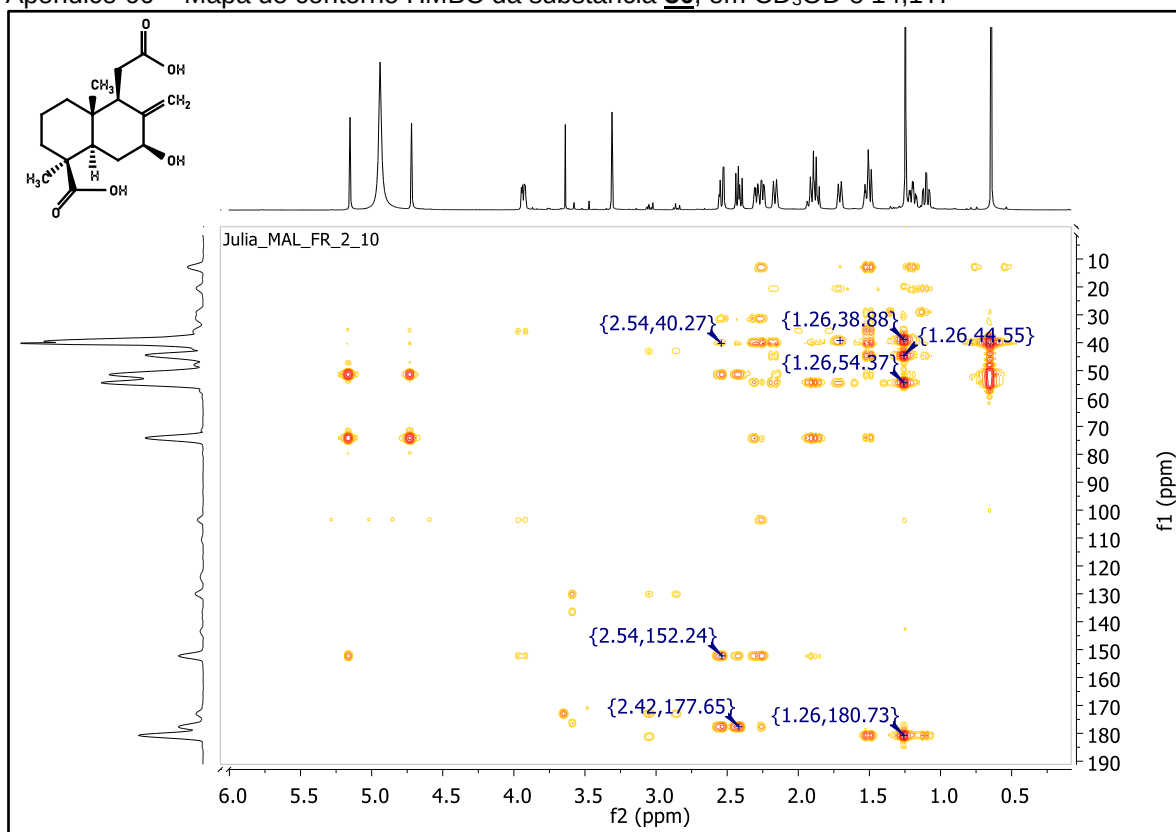
Apêndice 58 – Mapa de contorno COSY da substância **30**, em CD_3OD e 14,1T.



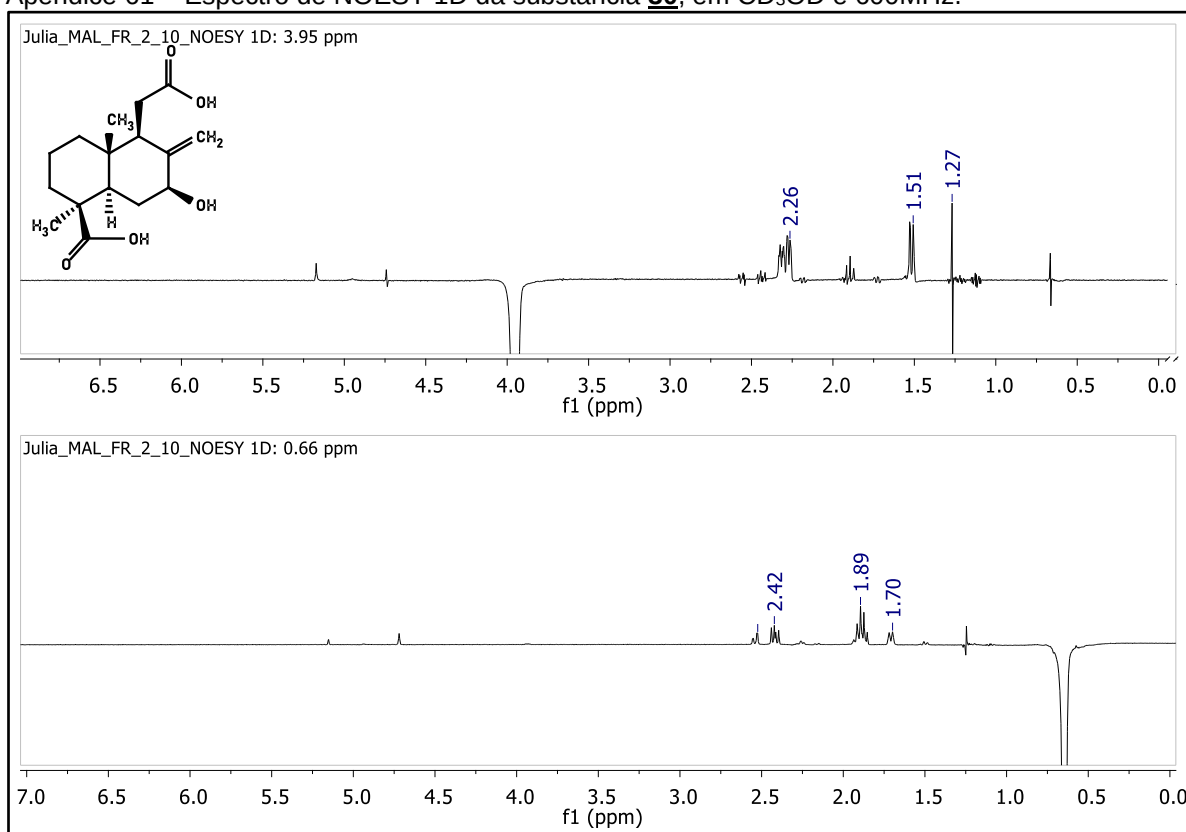
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 59 – Mapa de contorno HSQC da substância **30**, em CD₃OD e 14,1T.

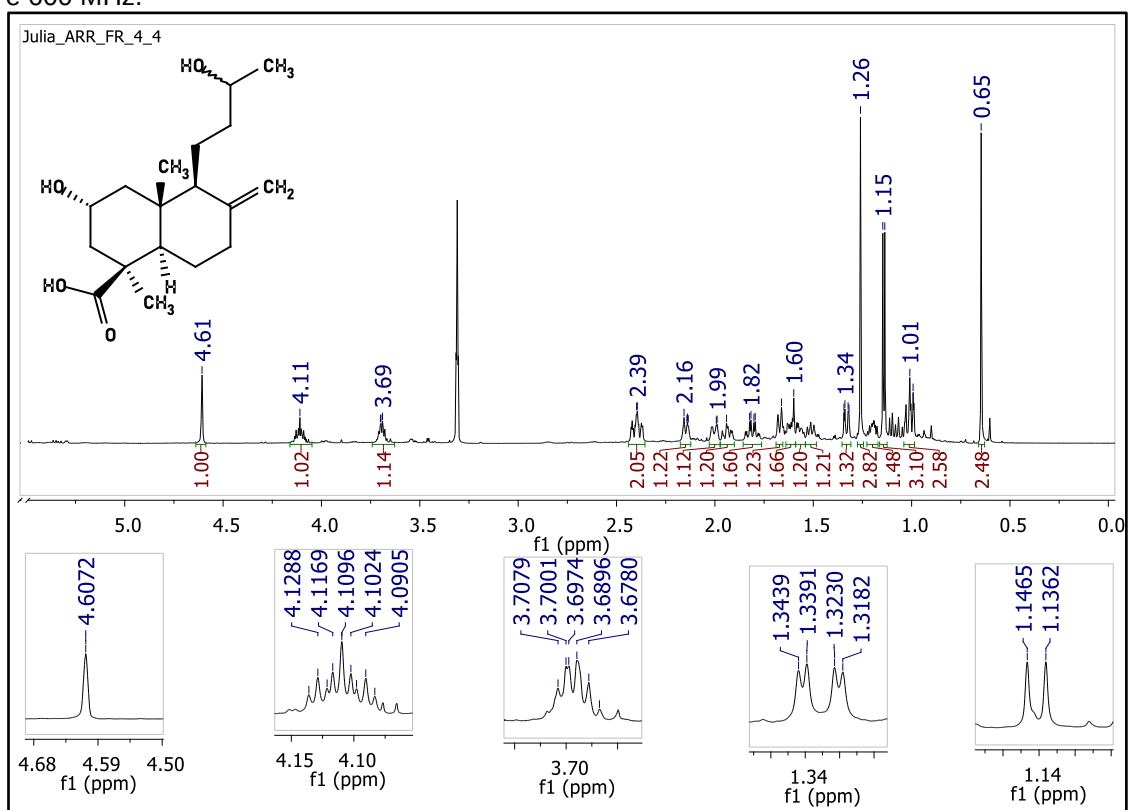
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 60 – Mapa de contorno HMBC da substância **30**, em CD₃OD e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

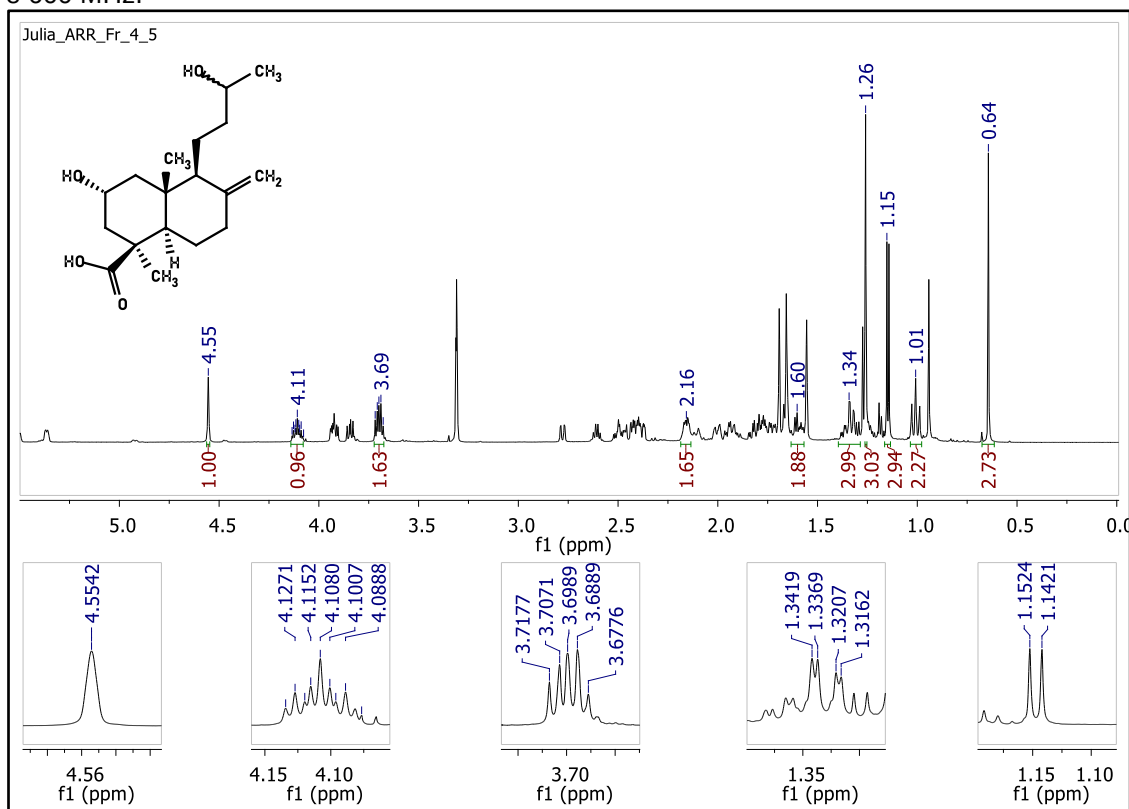
Apêndice 61 – Espectro de NOESY 1D da substância **30**, em CD₃OD e 600MHz.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 62 – Espectro de RMN de ¹H, com supressão do sinal da água, da substância **20a**, em CD₃OD e 600 MHz.

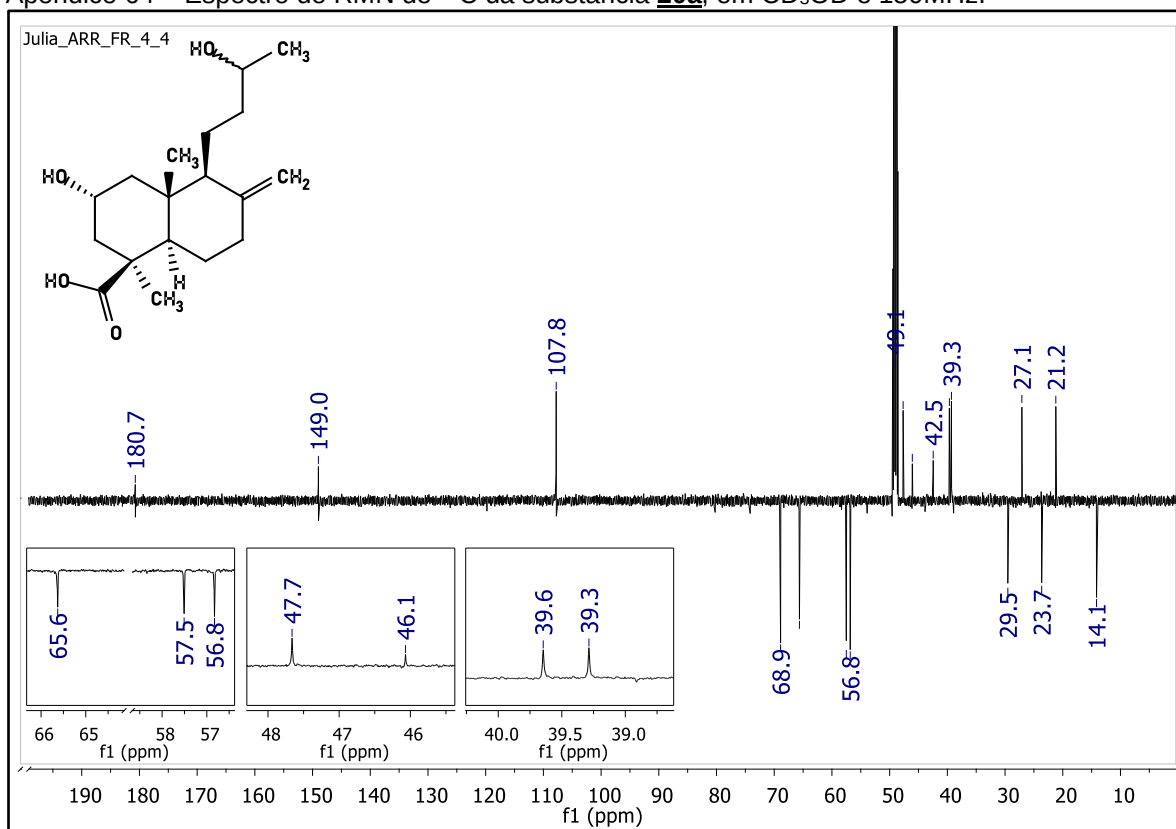
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 63 – Espectro de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, da substância **20b**, em CD_3OD e 600 MHz.



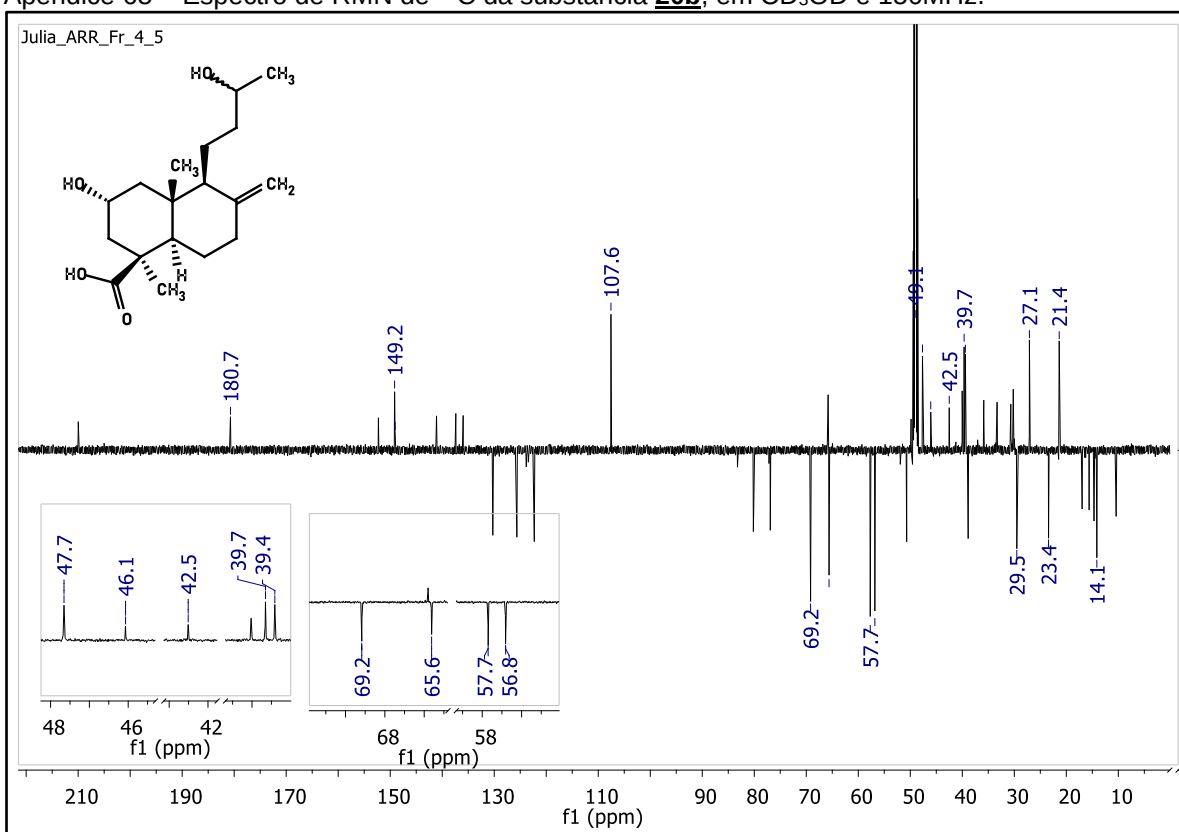
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 64 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **20a**, em CD_3OD e 150MHz.



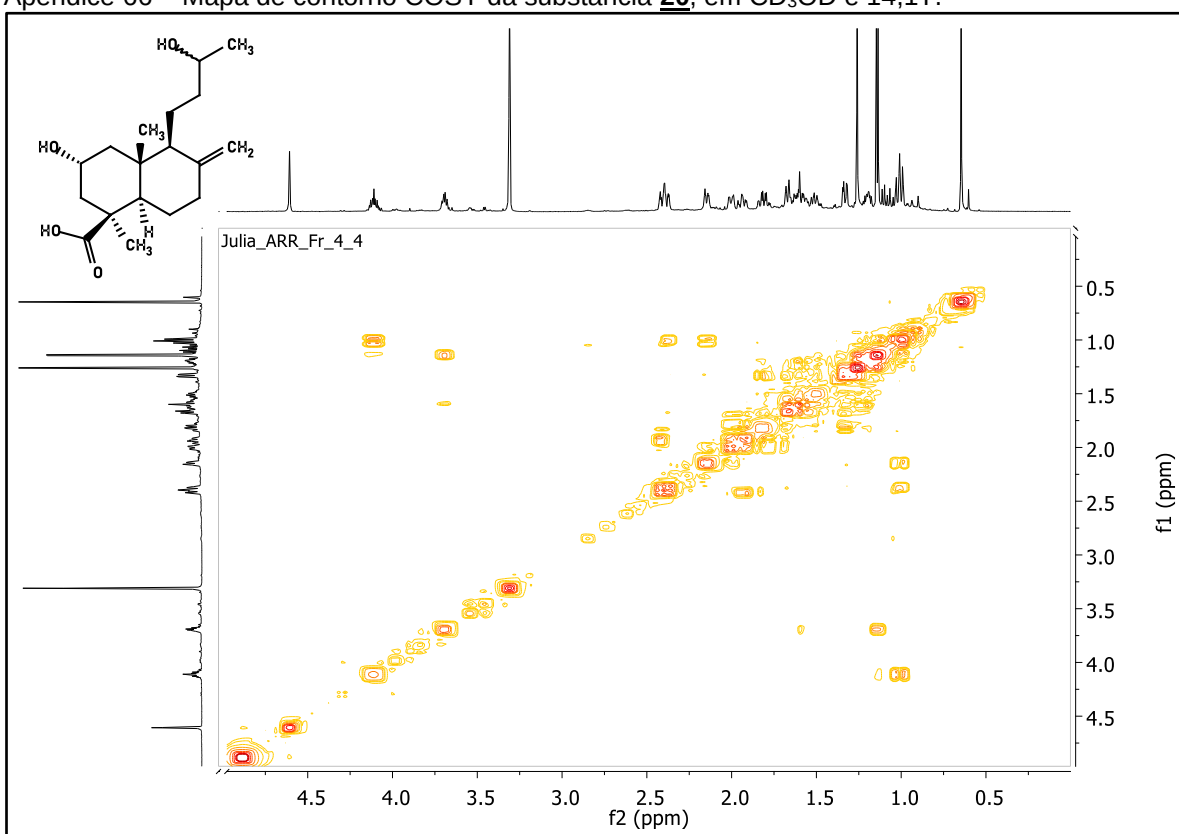
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 65 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **20b**, em CD_3OD e 150MHz.

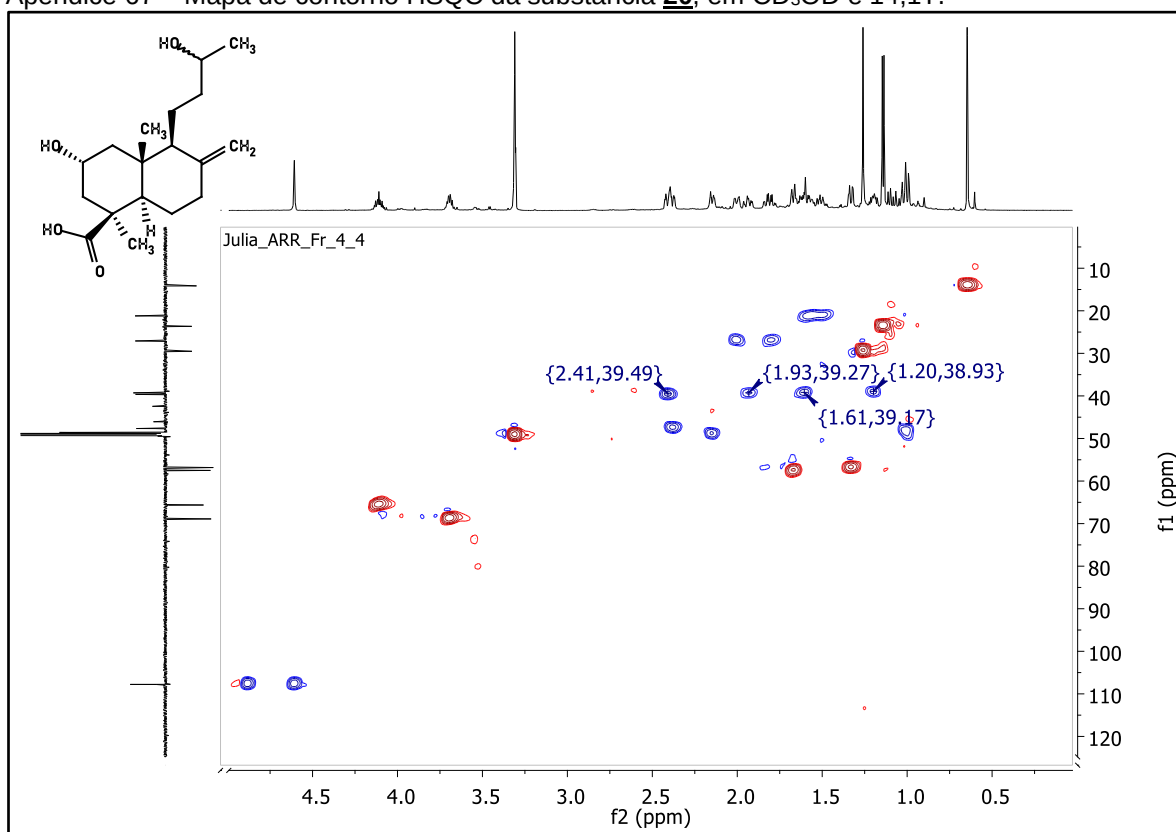


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

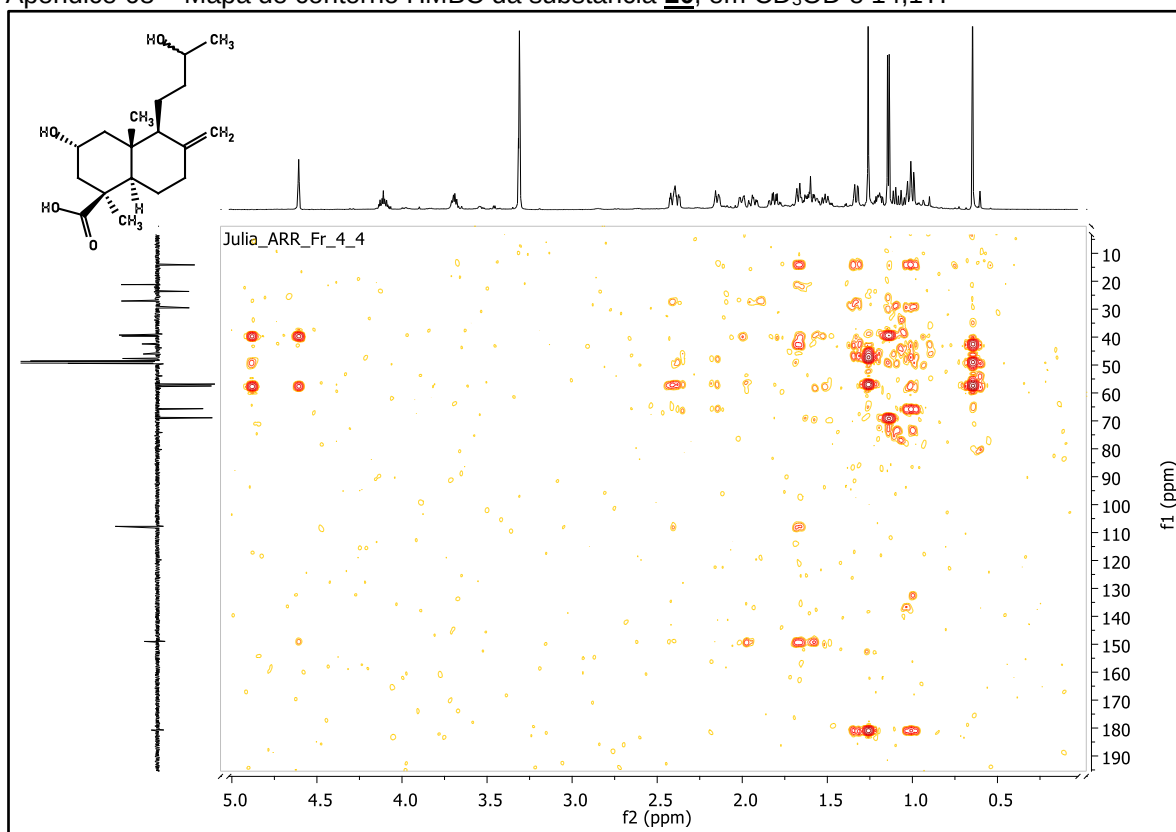
Apêndice 66 – Mapa de contorno COSY da substância **20**, em CD_3OD e 14,1T.



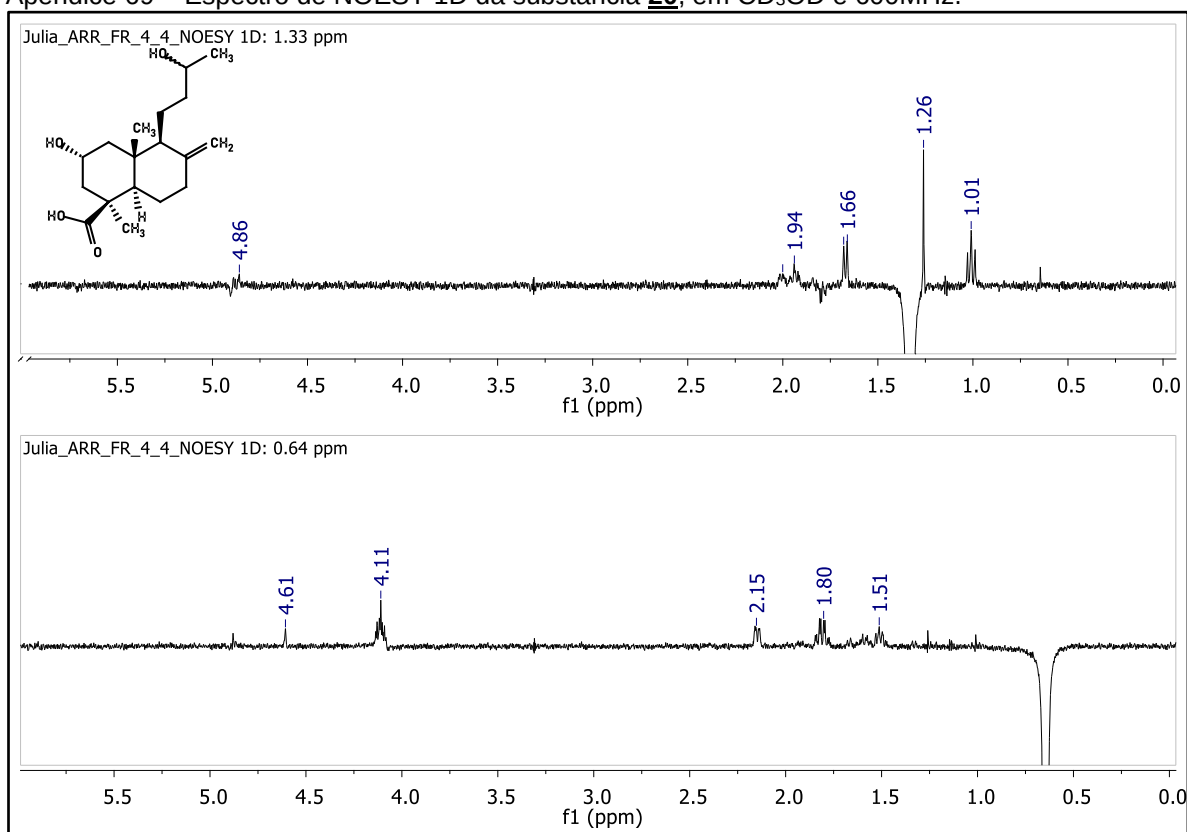
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 67 – Mapa de contorno HSQC da substância **20**, em CD₃OD e 14,1T.

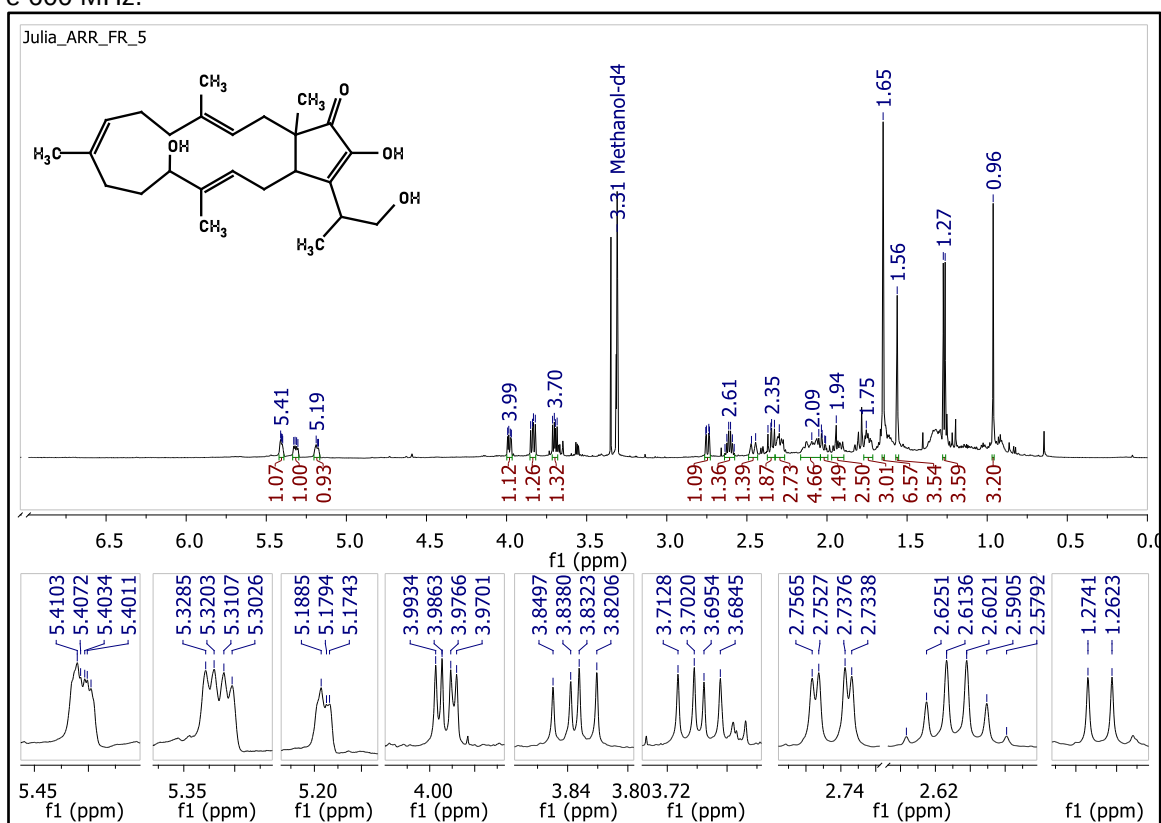
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 68 – Mapa de contorno HMBC da substância **20**, em CD₃OD e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

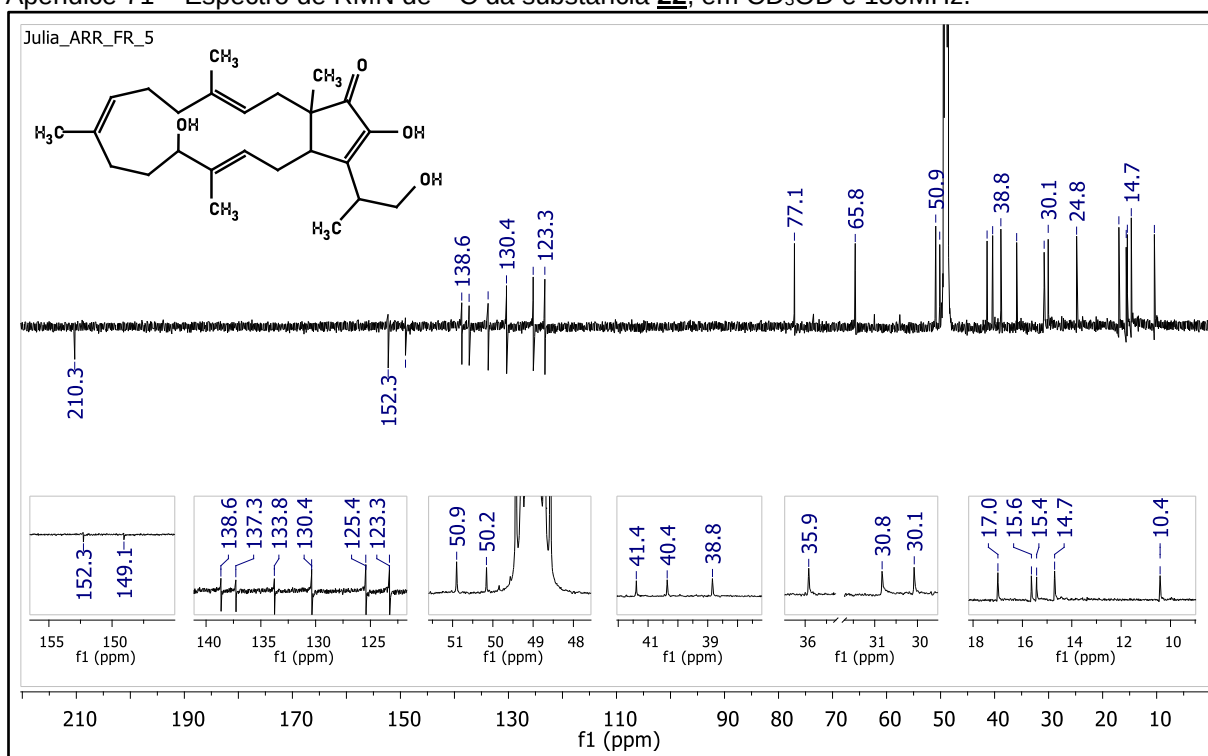
Apêndice 69 – Espectro de NOESY 1D da substância **20**, em CD₃OD e 600MHz.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 70 – Espectro de RMN de ¹H, com supressão do sinal da água, da substância **22**, em CD₃OD e 600 MHz.

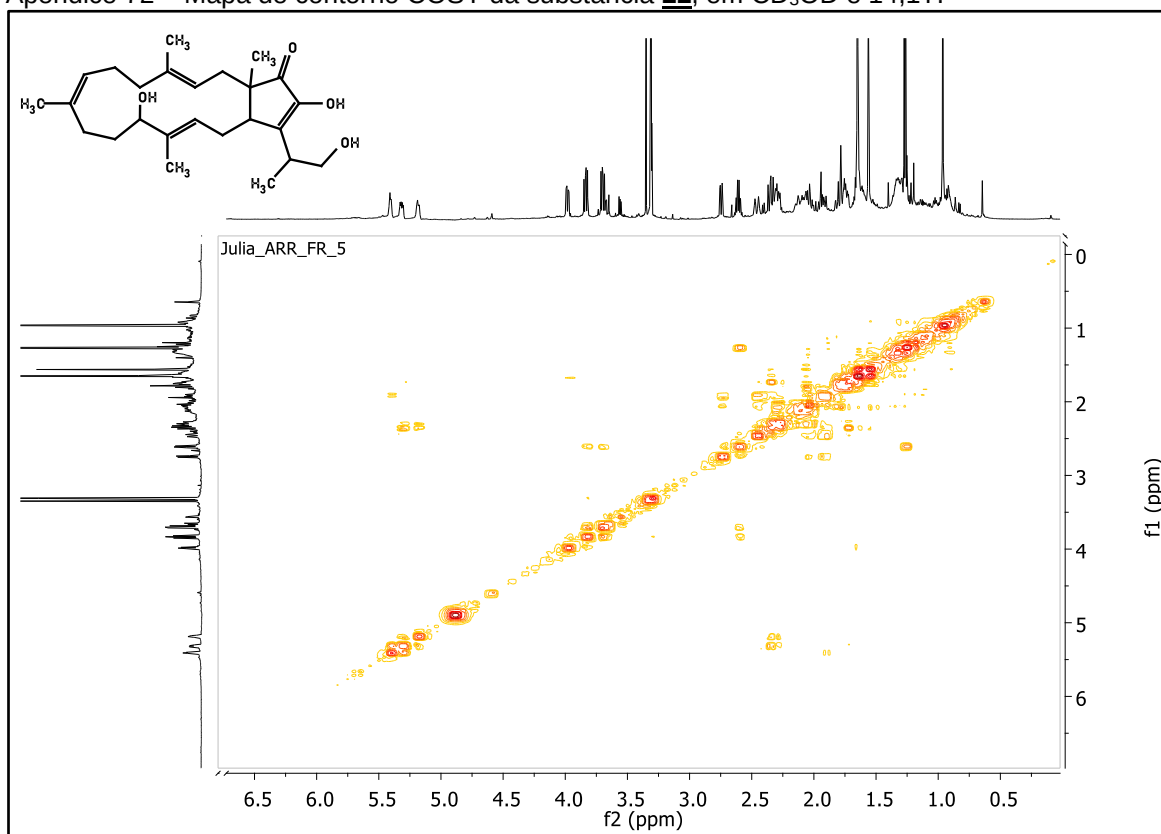
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 71 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **22**, em CD_3OD e 150MHz.

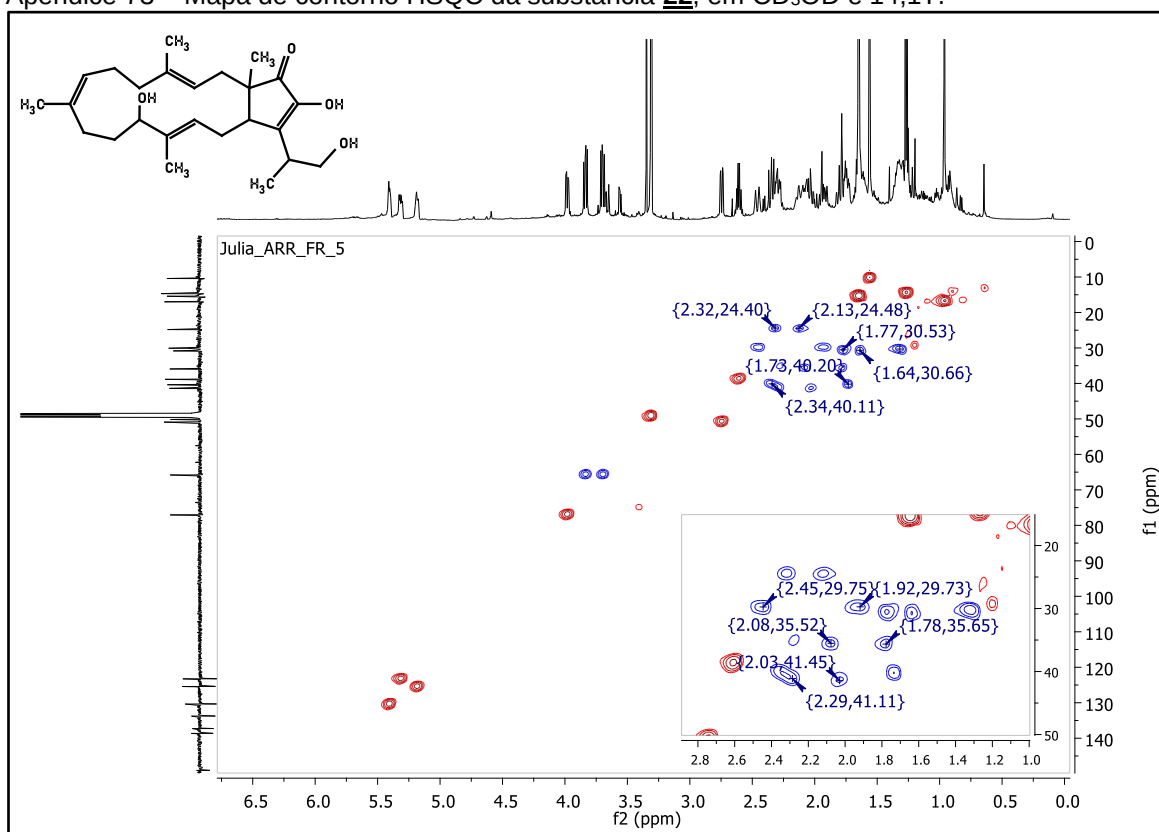


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

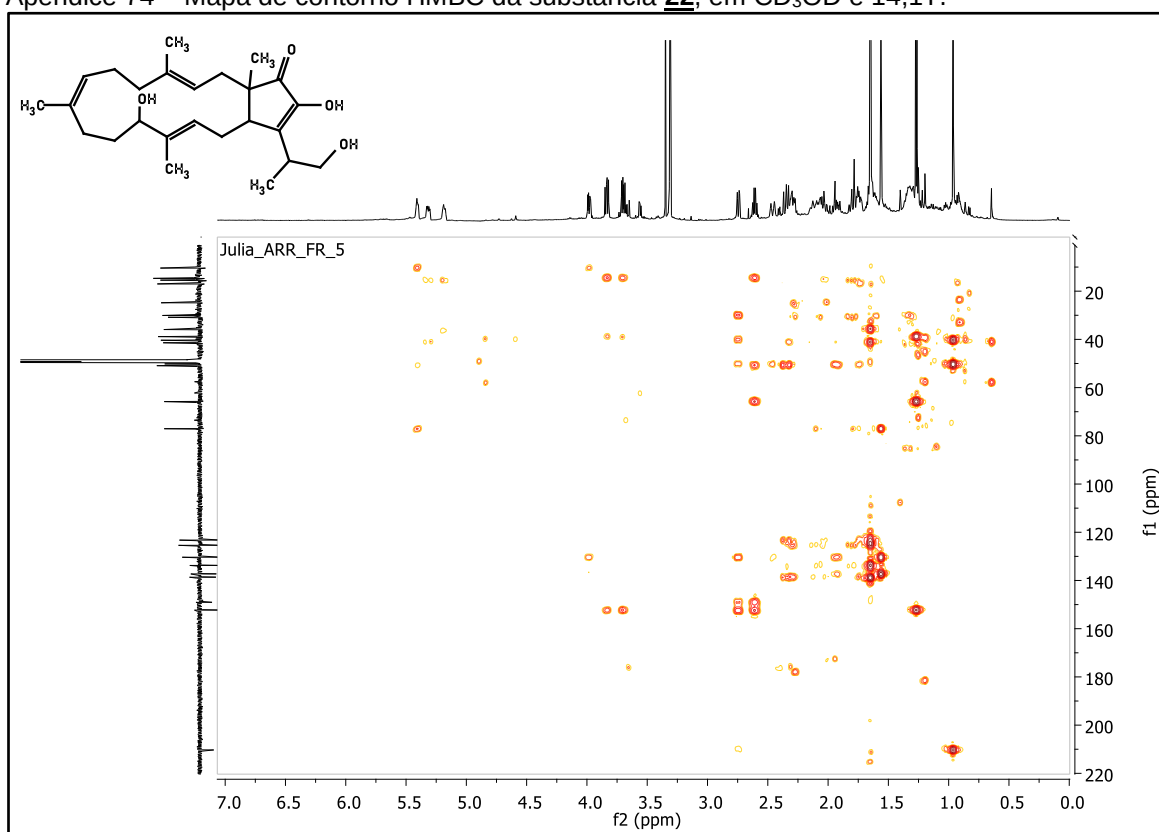
Apêndice 72 – Mapa de contorno COSY da substância **22**, em CD_3OD e 14,1T.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

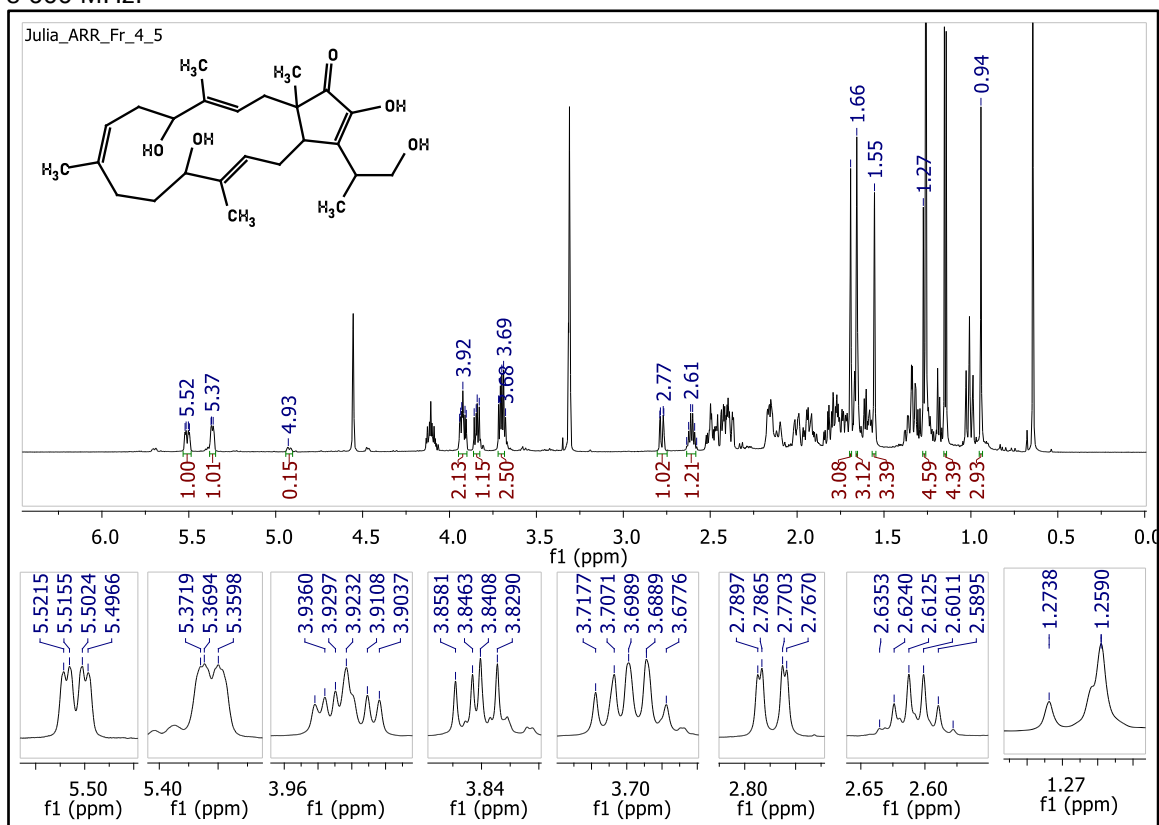
Apêndice 73 – Mapa de contorno HSQC da substância **22**, em CD₃OD e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 74 – Mapa de contorno HMBC da substância **22**, em CD₃OD e 14,1T.

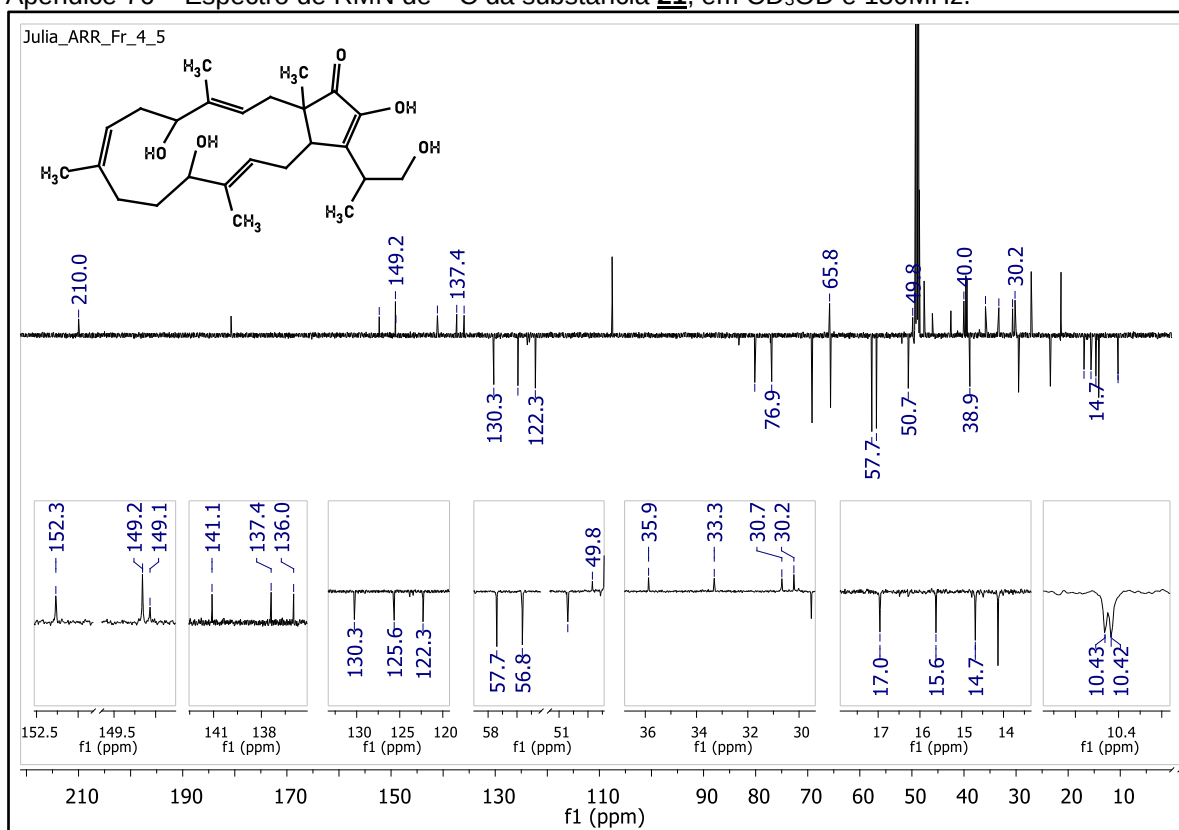
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 75 – Espectro de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, da substância **21**, em CD_3OD e 600 MHz.



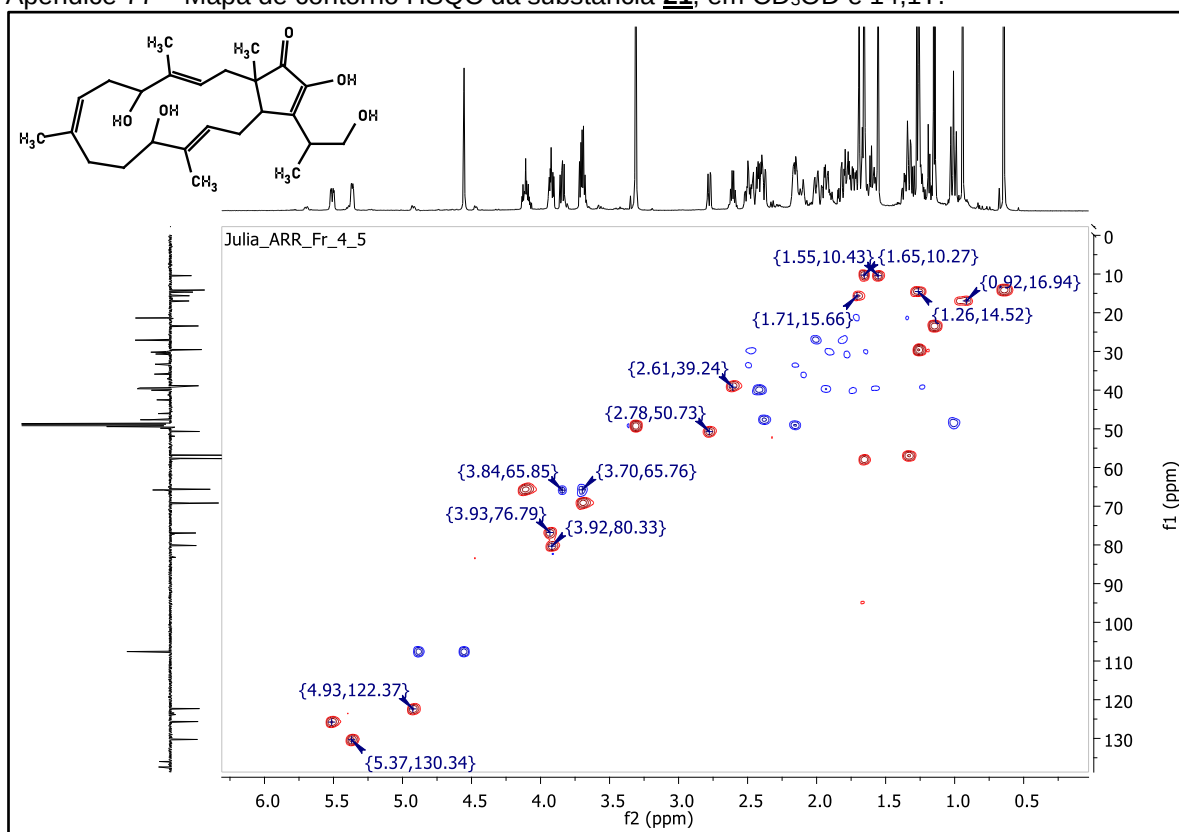
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 76 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **21**, em CD_3OD e 150MHz.



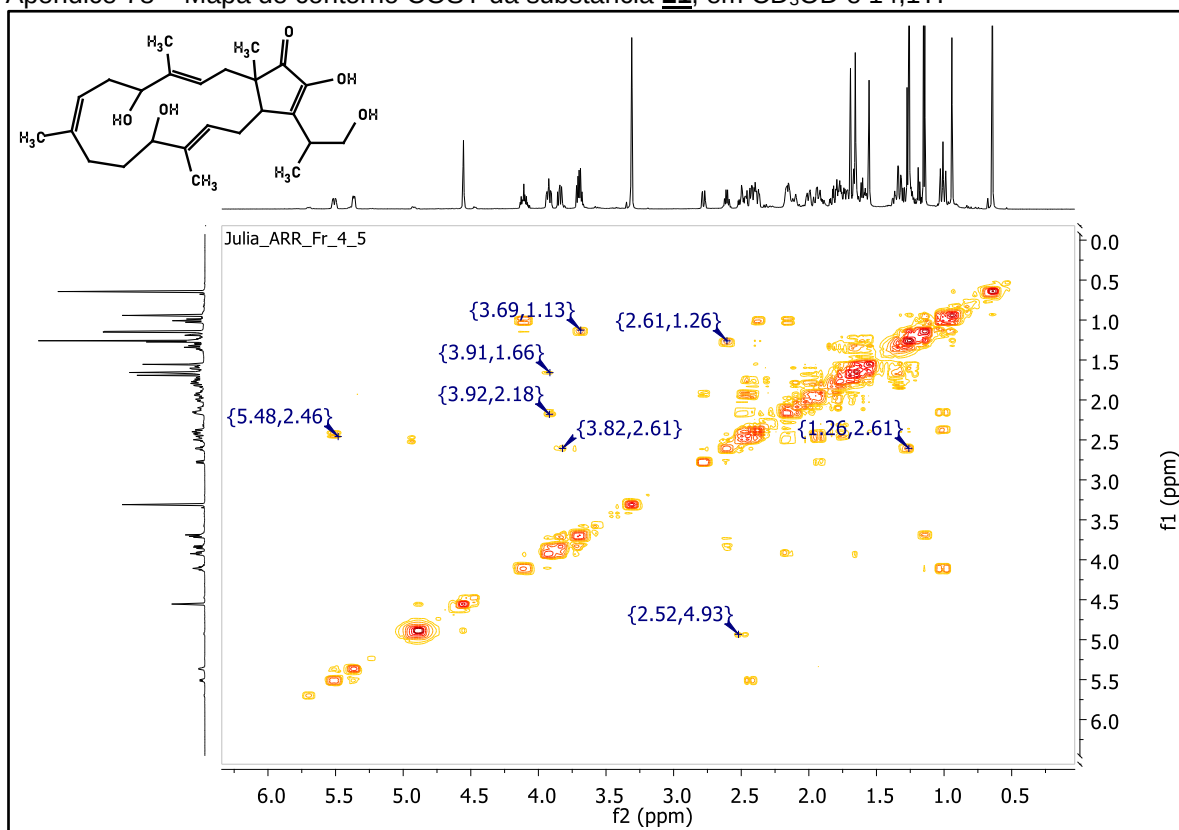
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 77 – Mapa de contorno HSQC da substância **21**, em CD₃OD e 14,1T.



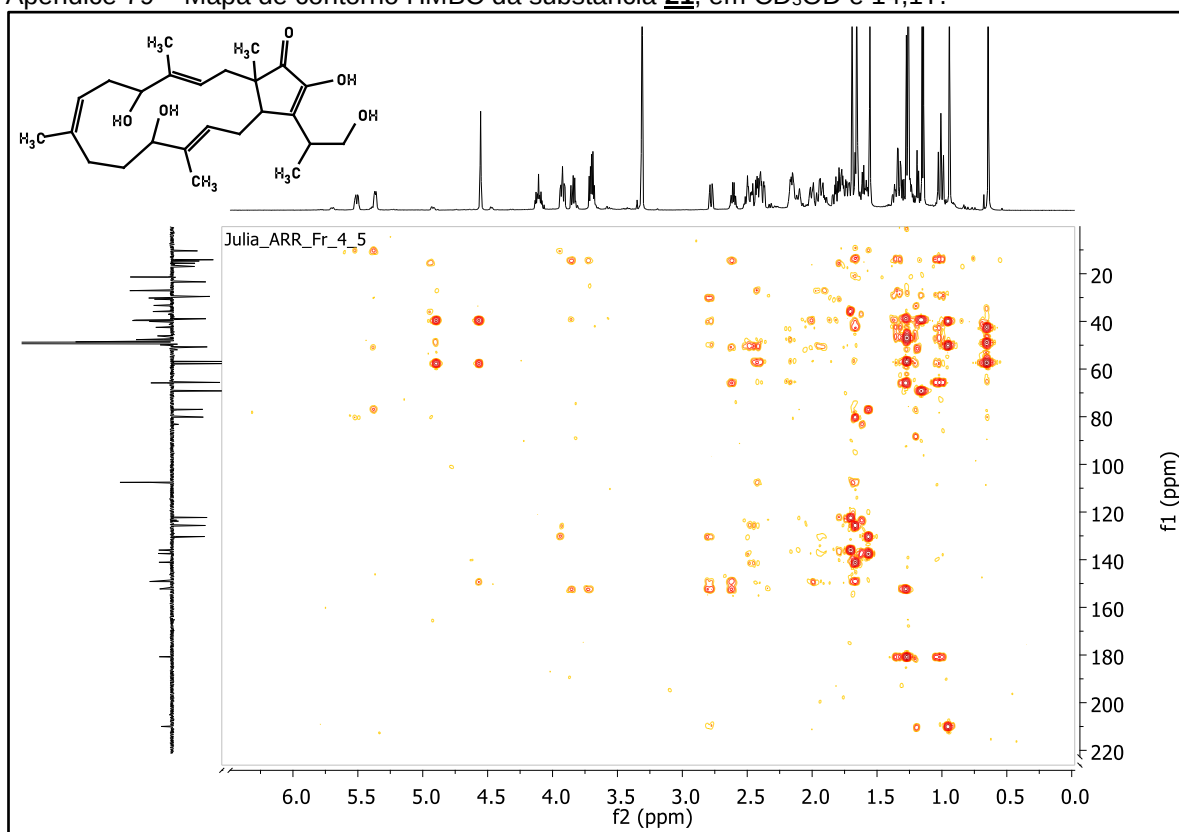
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 78 – Mapa de contorno COSY da substância **21**, em CD₃OD e 14,1T.



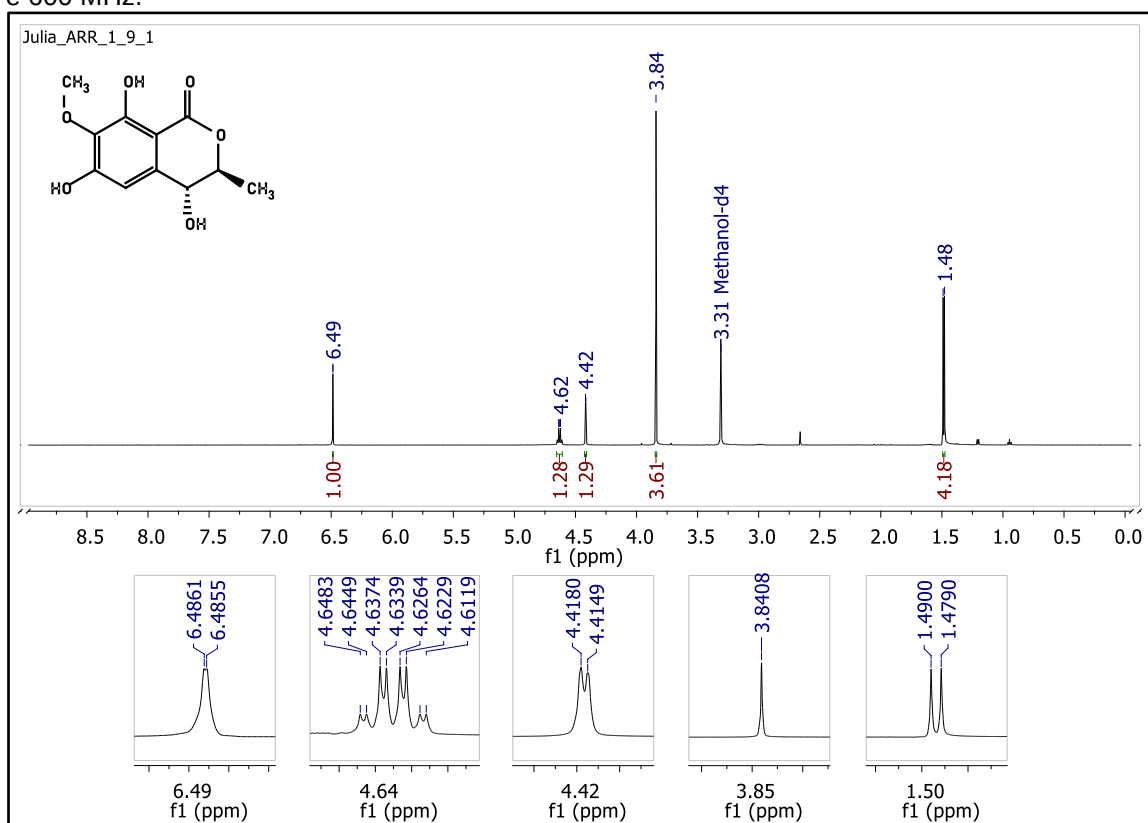
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 79 – Mapa de contorno HMBC da substância **21**, em CD₃OD e 14,1T.



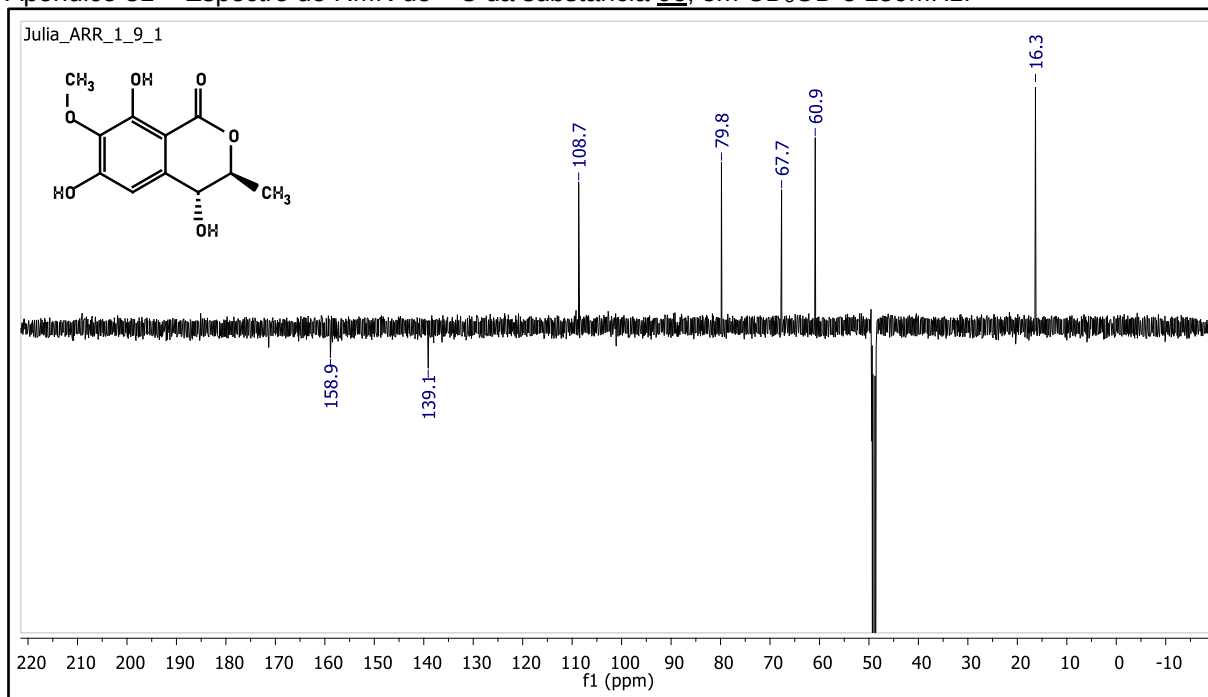
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 80 – Espectro de RMN de ¹H, com supressão do sinal da água, da substância **06**, em CD₃OD e 600 MHz.



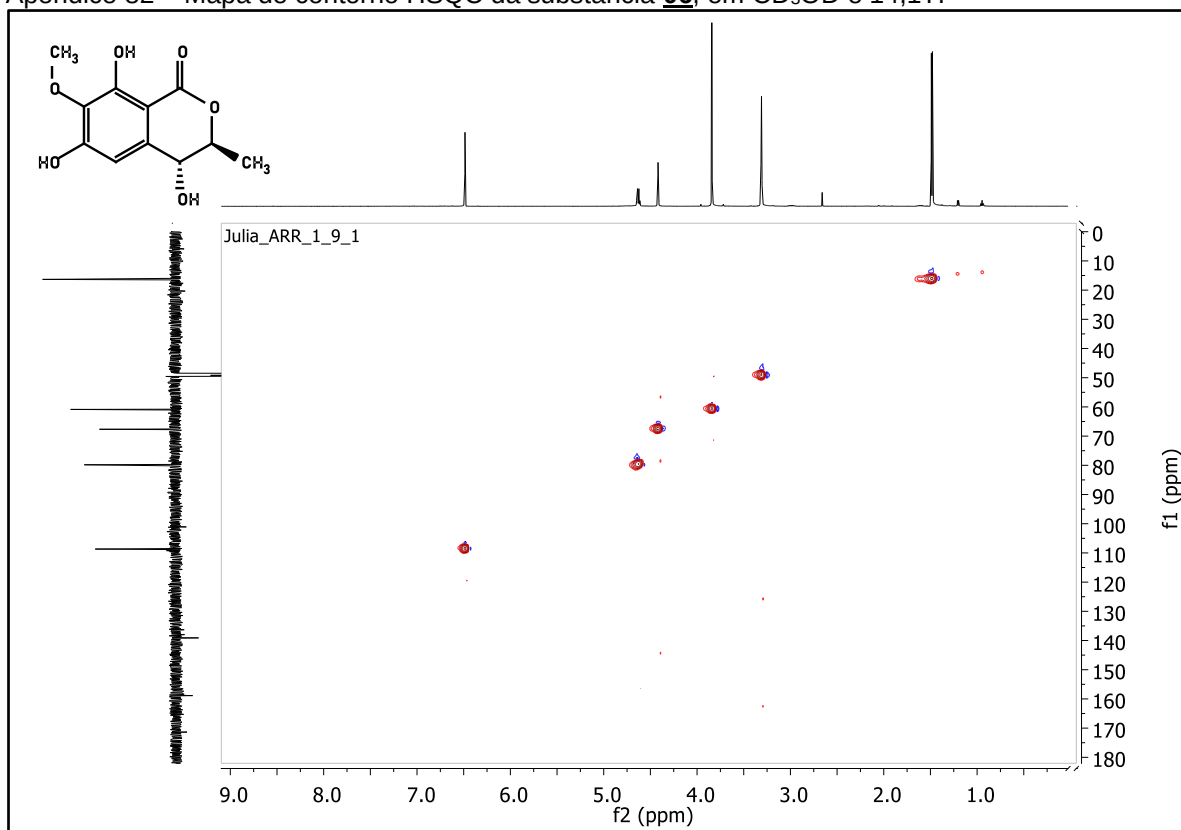
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 81 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **06**, em CD_3OD e 150MHz.

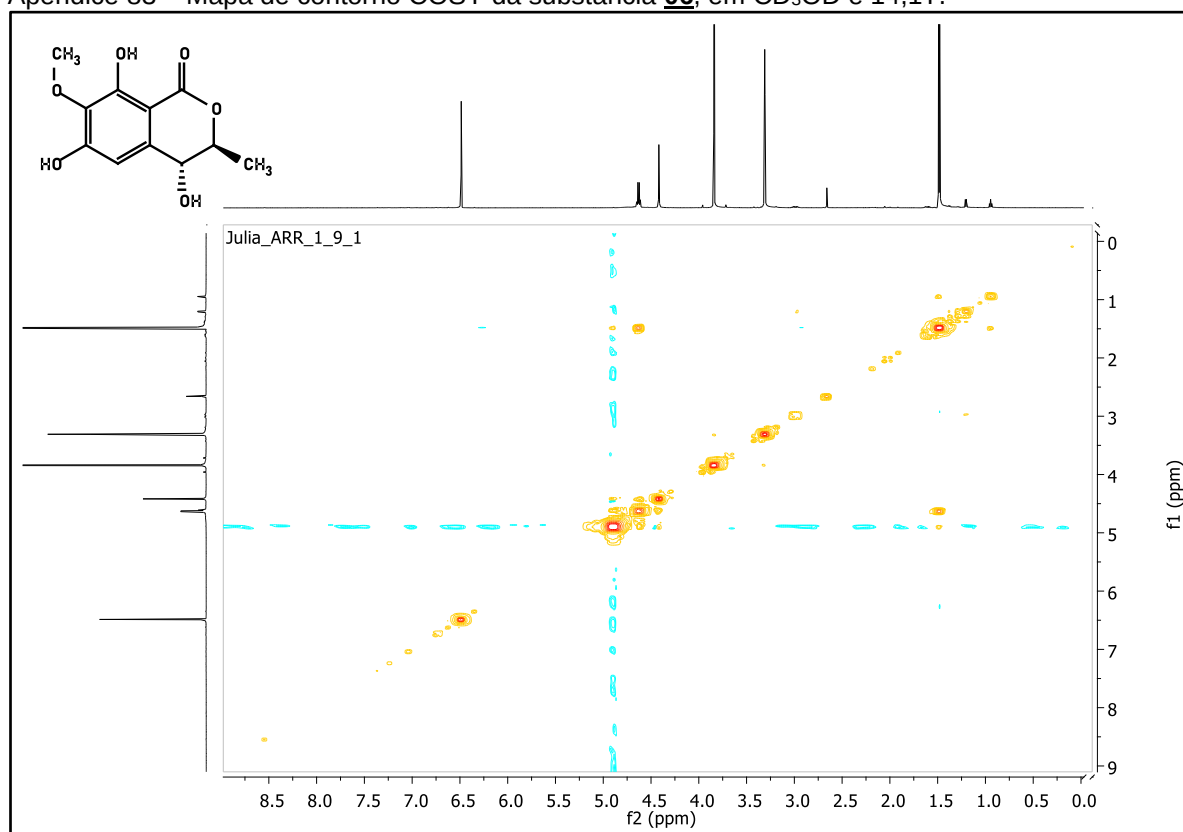


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

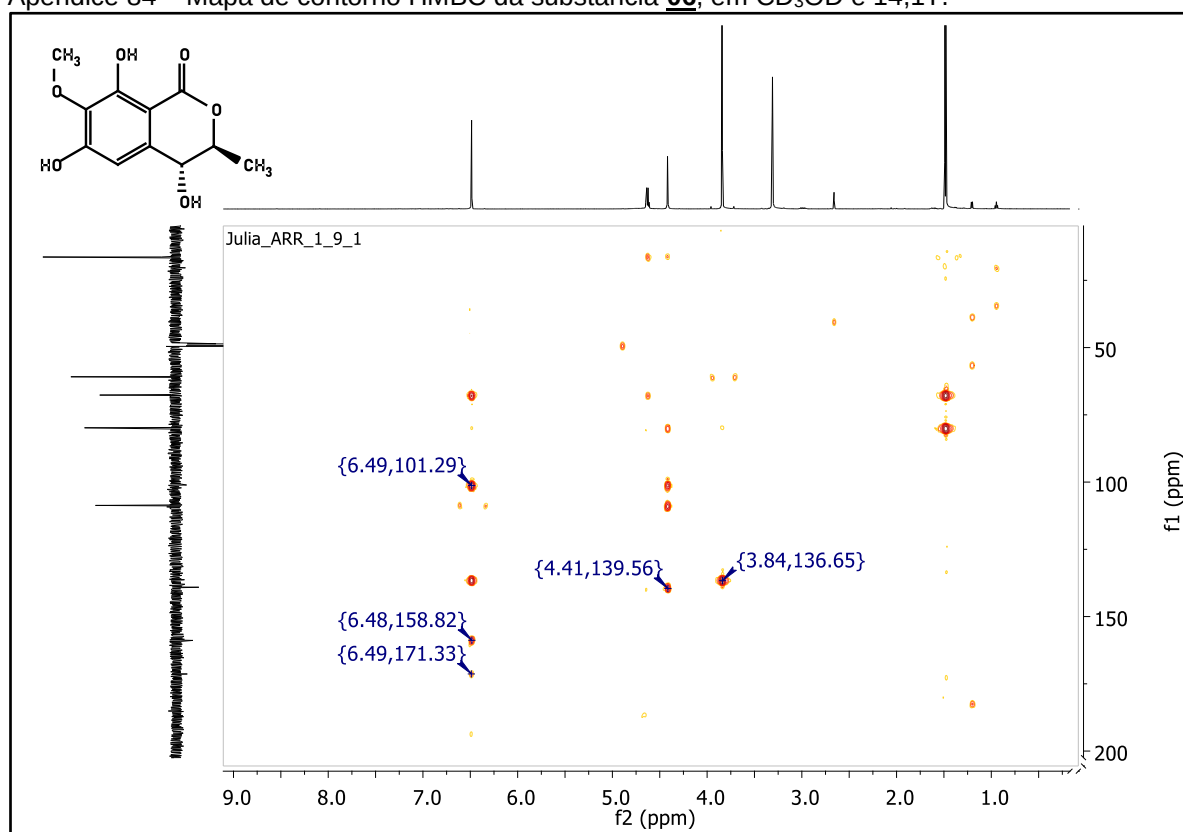
Apêndice 82 – Mapa de contorno HSQC da substância **06**, em CD_3OD e 14,1T.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

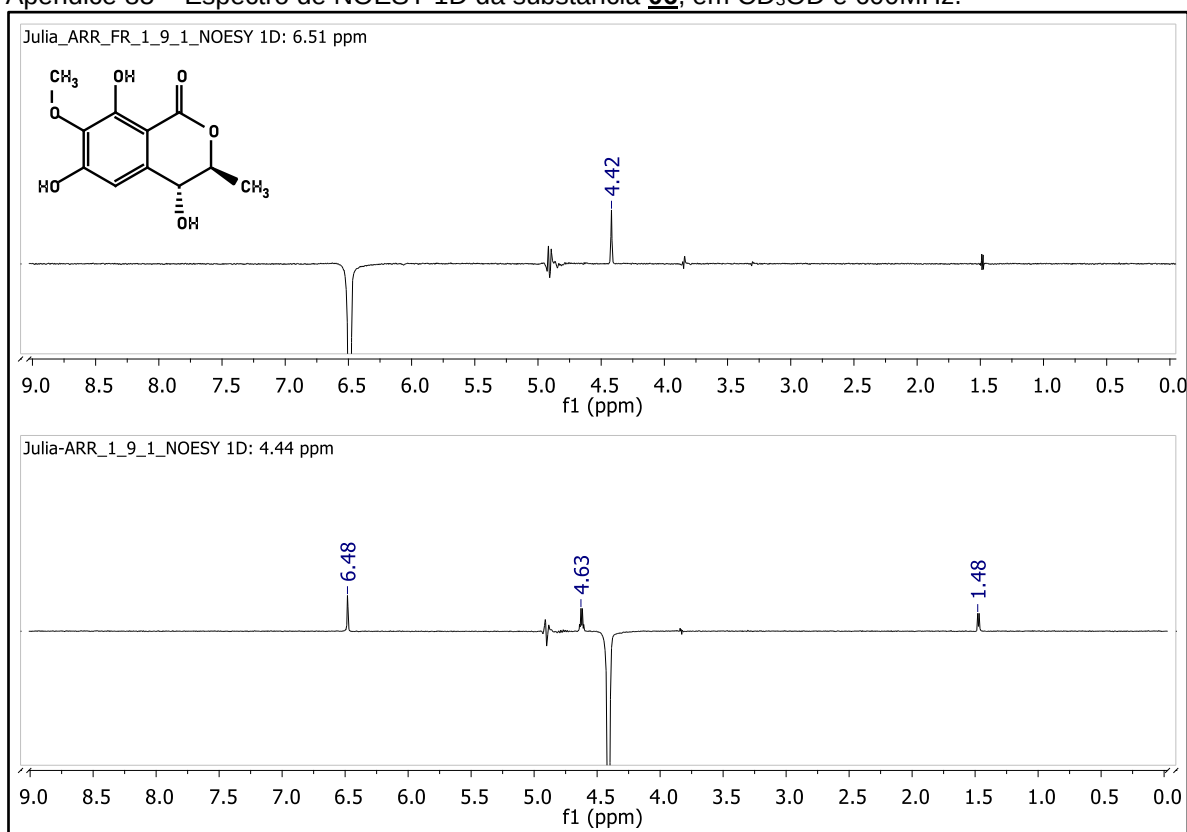
Apêndice 83 – Mapa de contorno COSY da substância **06**, em CD₃OD e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 84 – Mapa de contorno HMBC da substância **06**, em CD₃OD e 14,1T.

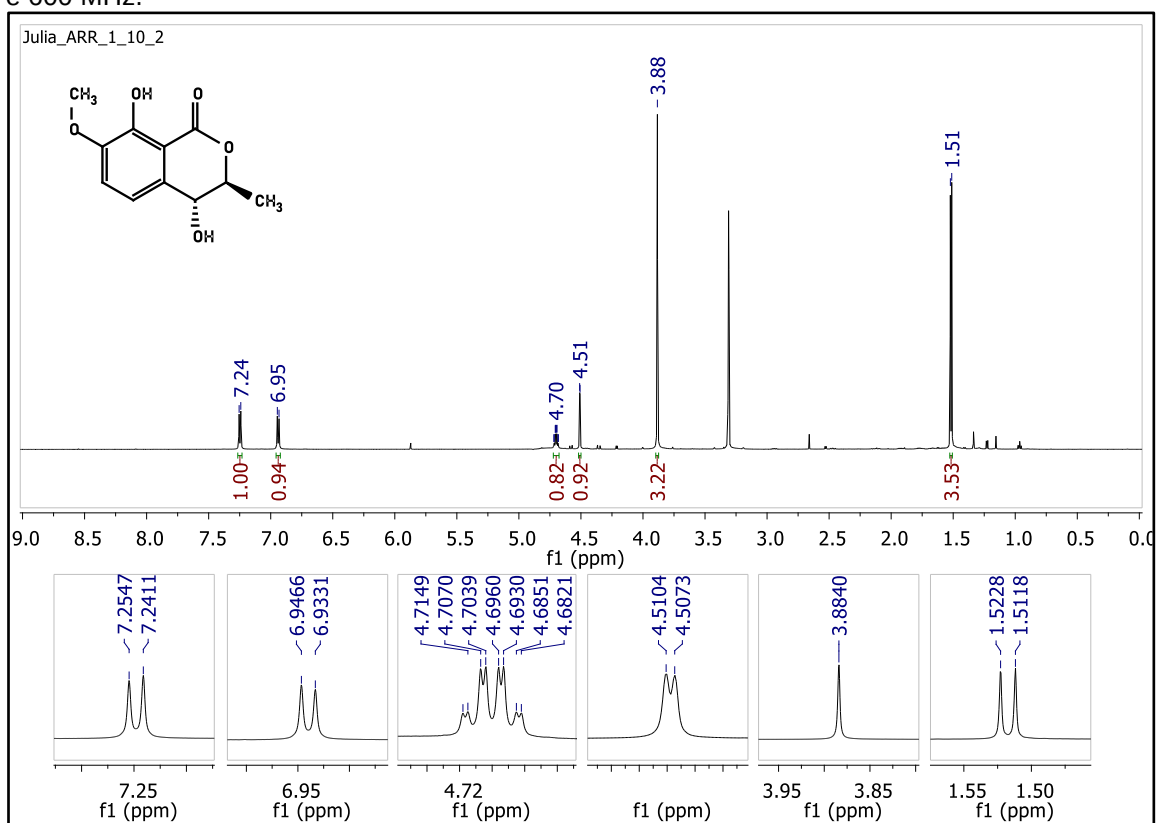
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 85 – Espectro de NOESY 1D da substância **06**, em CD₃OD e 600MHz.



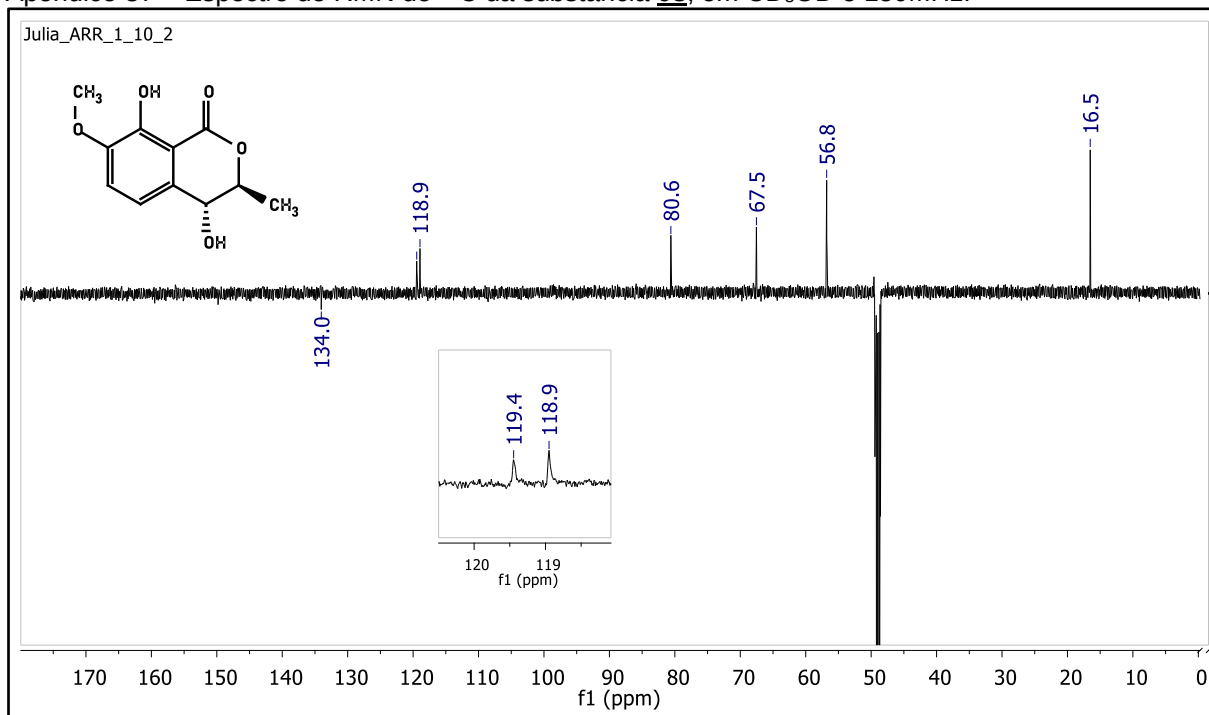
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 86 – Espectro de RMN de ¹H, com supressão do sinal da água, da substância **08**, em CD₃OD e 600 MHz.



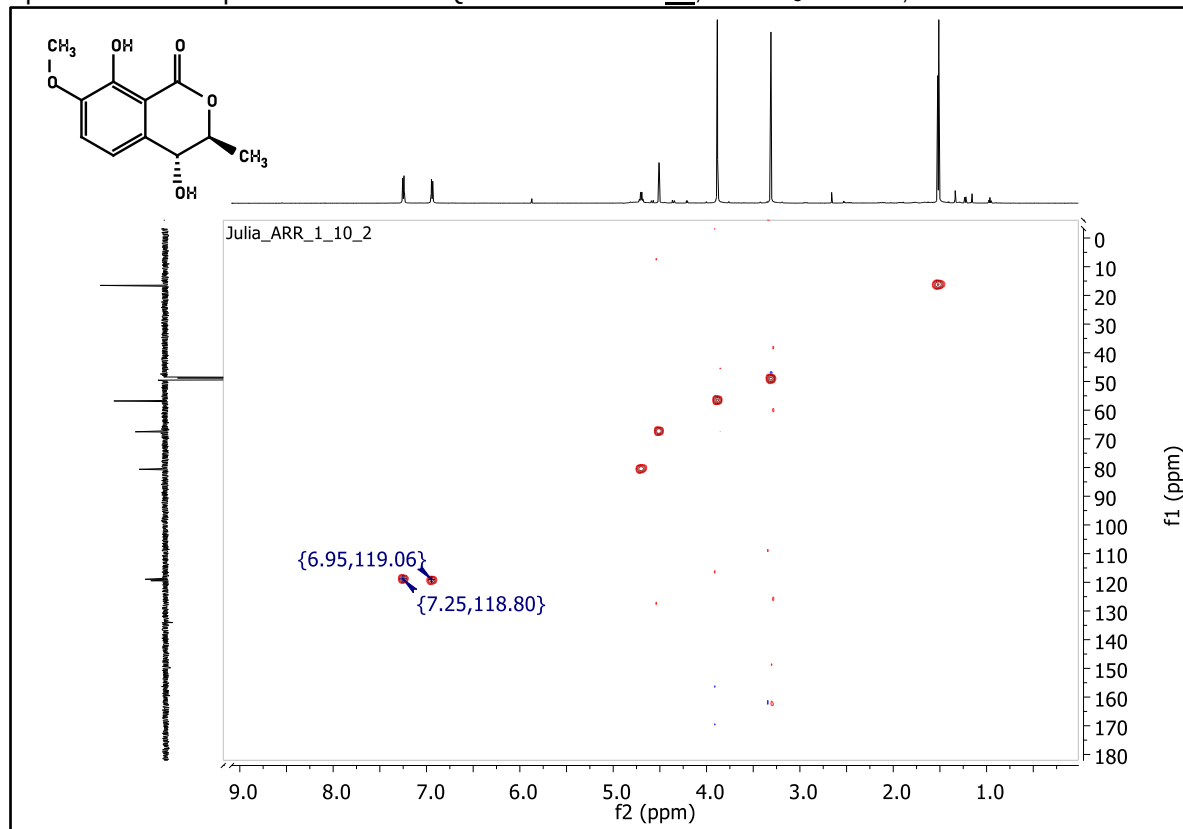
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 87 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **08**, em CD_3OD e 150MHz.

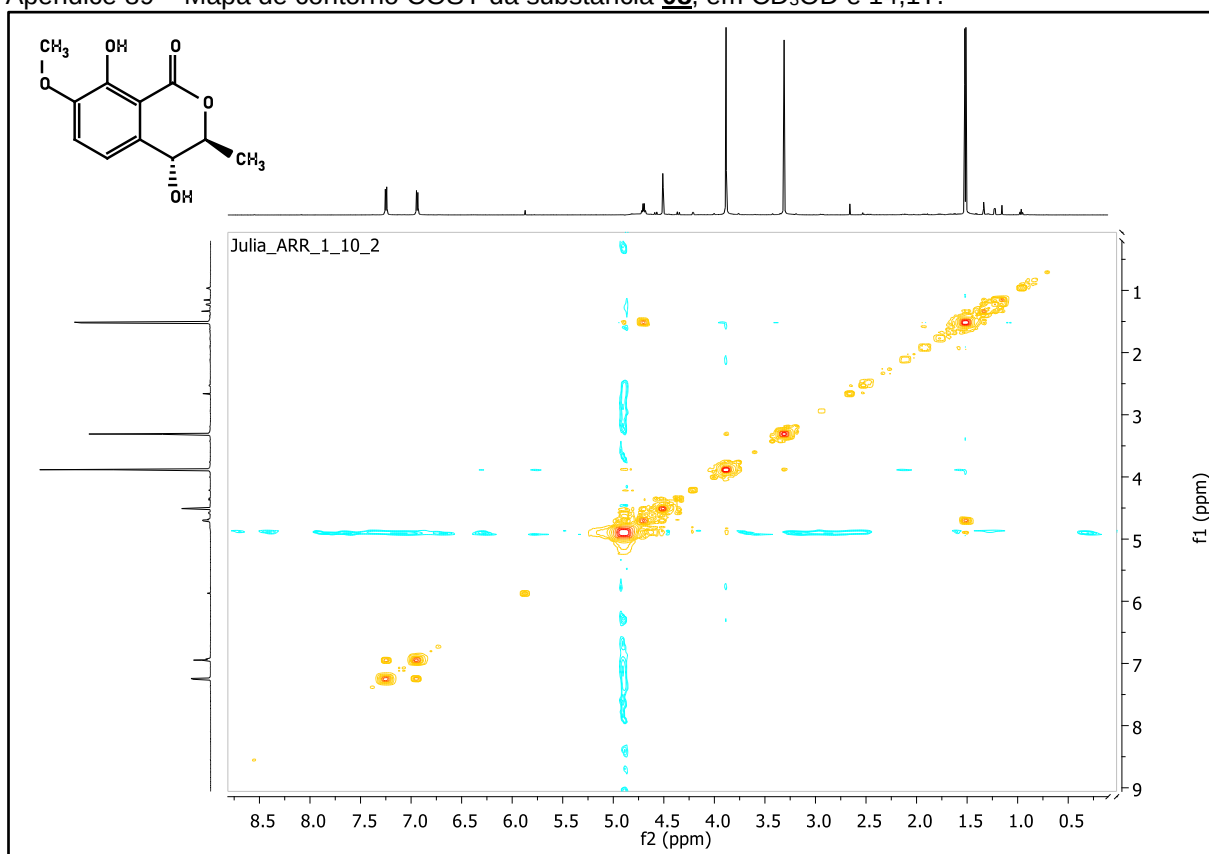


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

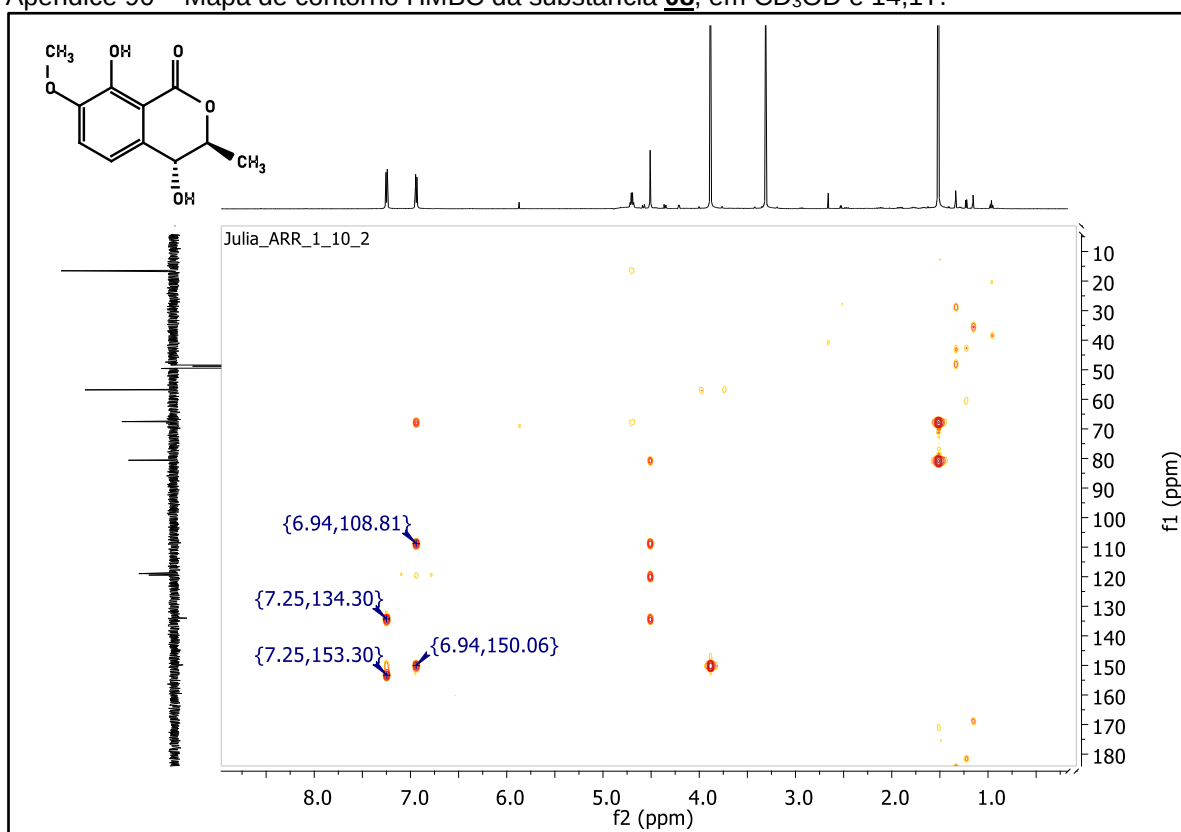
Apêndice 88 – Mapa de contorno HSQC da substância **08**, em CD_3OD e 14,1T.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

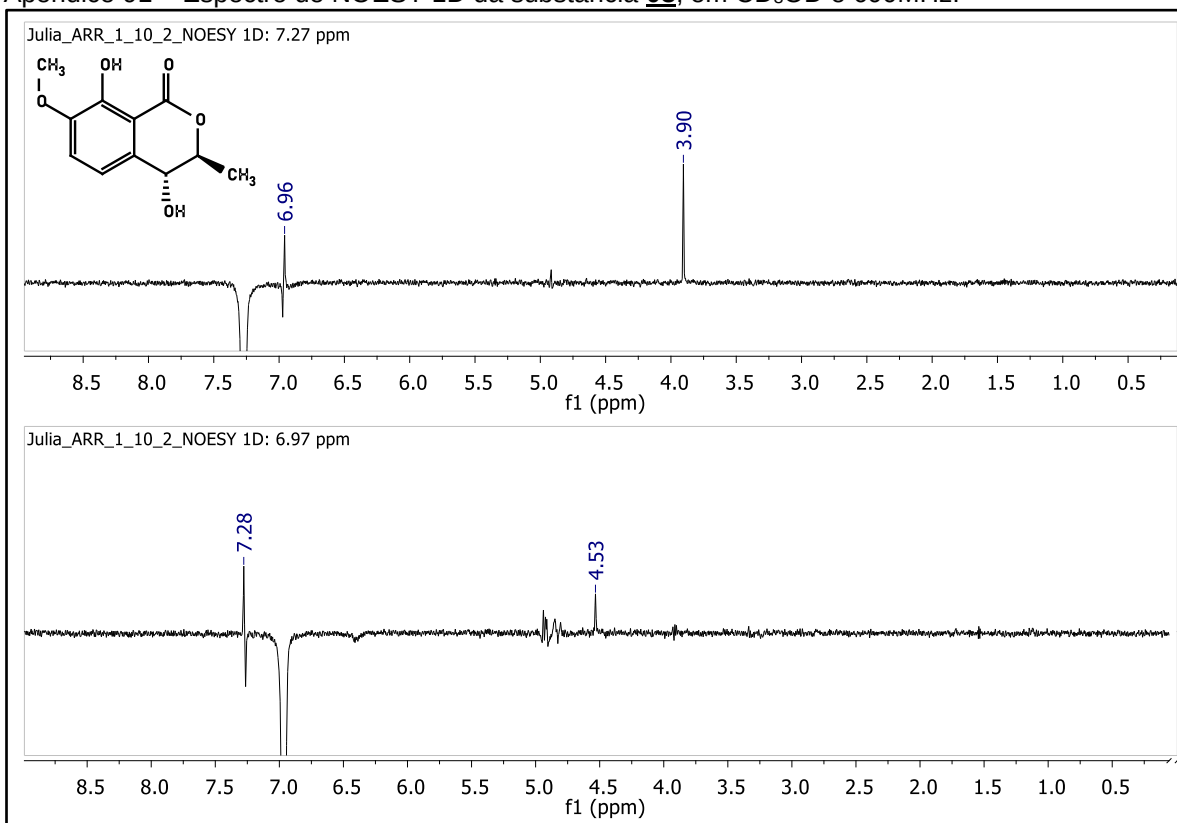
Apêndice 89 – Mapa de contorno COSY da substância **08**, em CD₃OD e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 90 – Mapa de contorno HMBC da substância **08**, em CD₃OD e 14,1T.

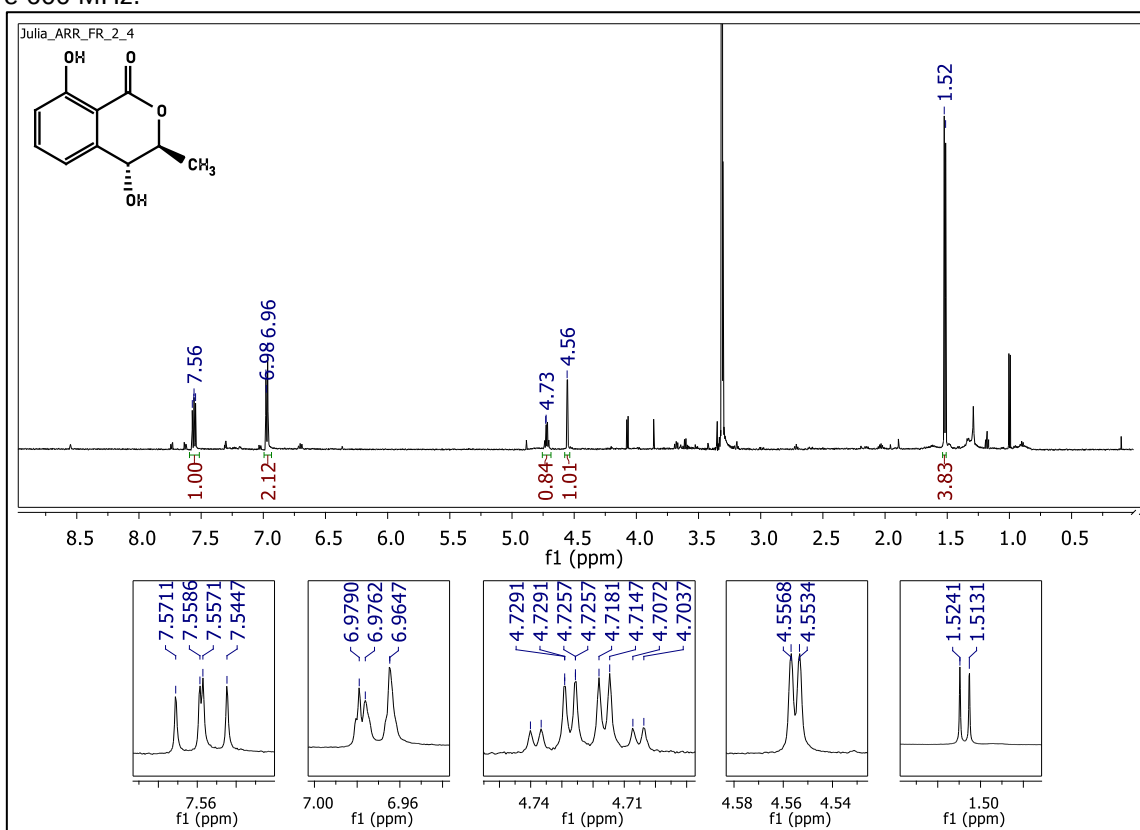
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 91 – Espectro de NOESY 1D da substância **08**, em CD₃OD e 600MHz.



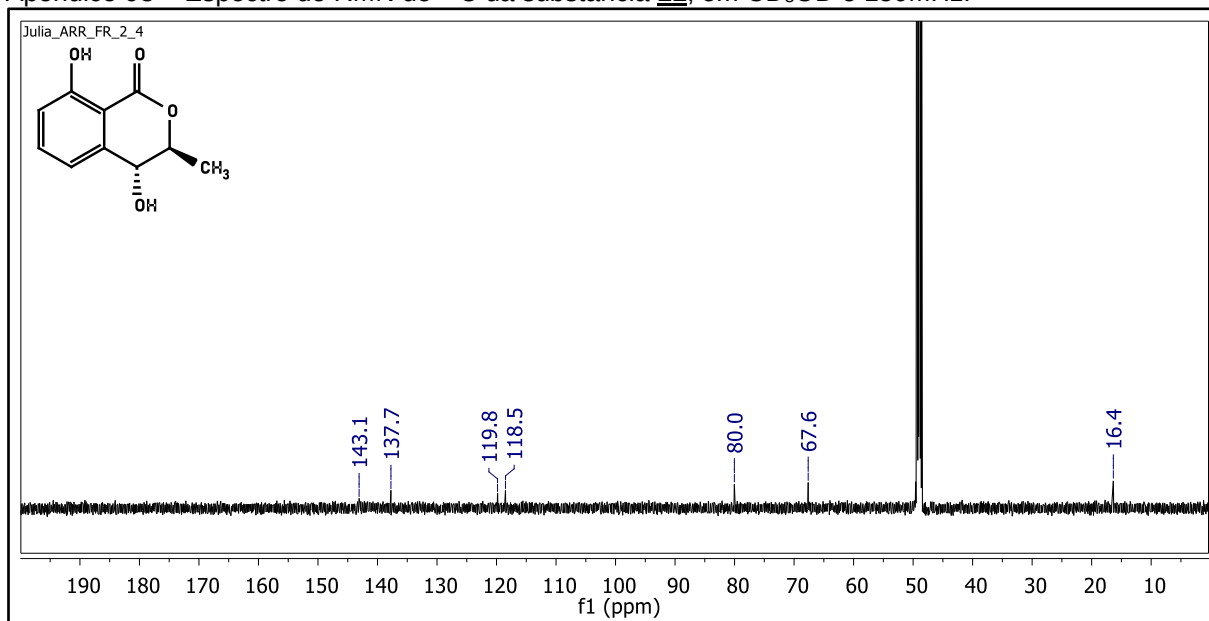
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 92 – Espectro de RMN de ¹H, com supressão do sinal da água, da substância **11**, em CD₃OD e 600 MHz.



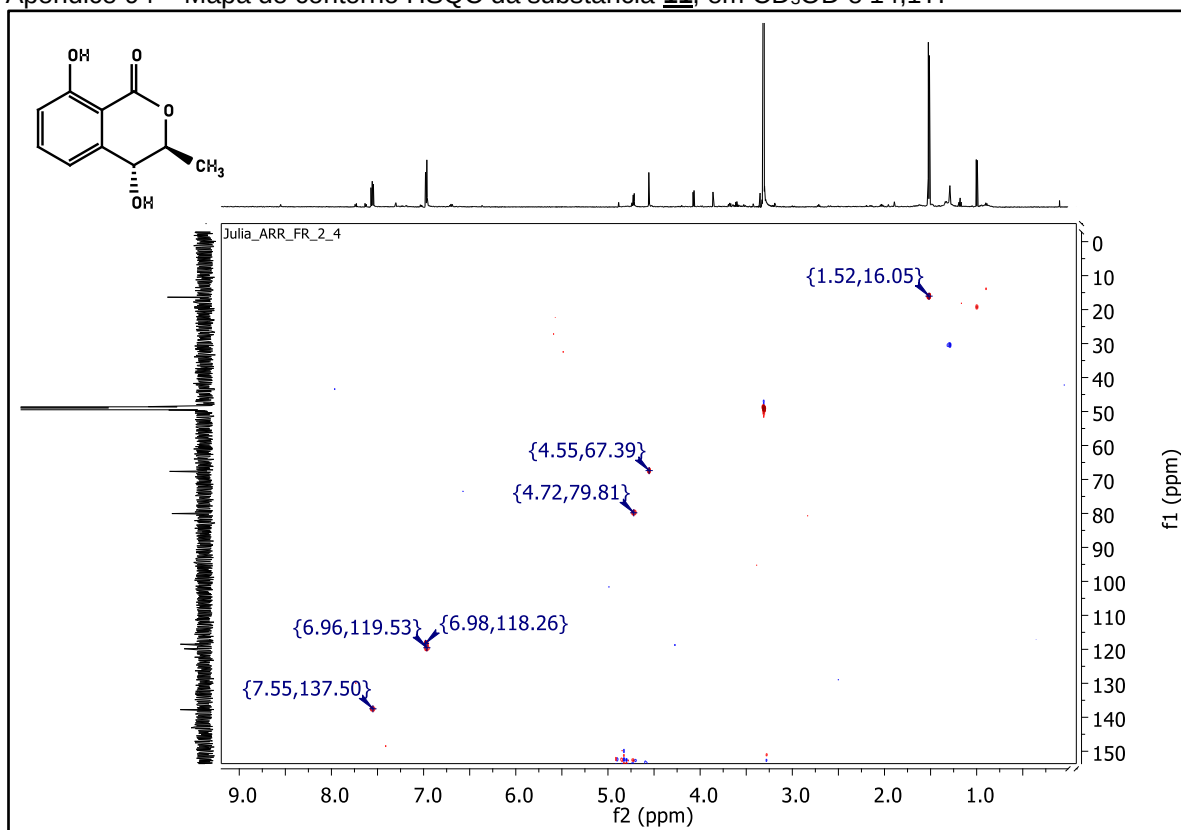
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 93 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **11**, em CD_3OD e 150MHz.



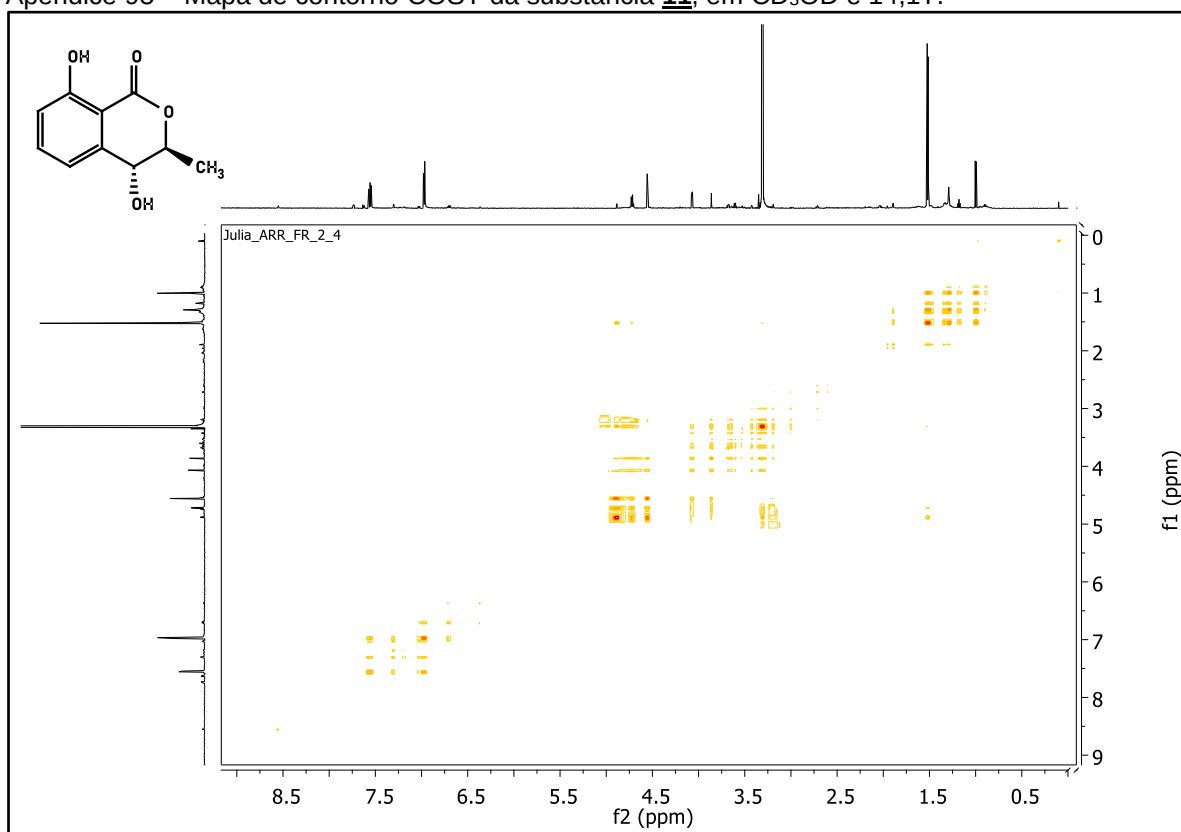
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 94 – Mapa de contorno HSQC da substância **11**, em CD_3OD e 14,1T.



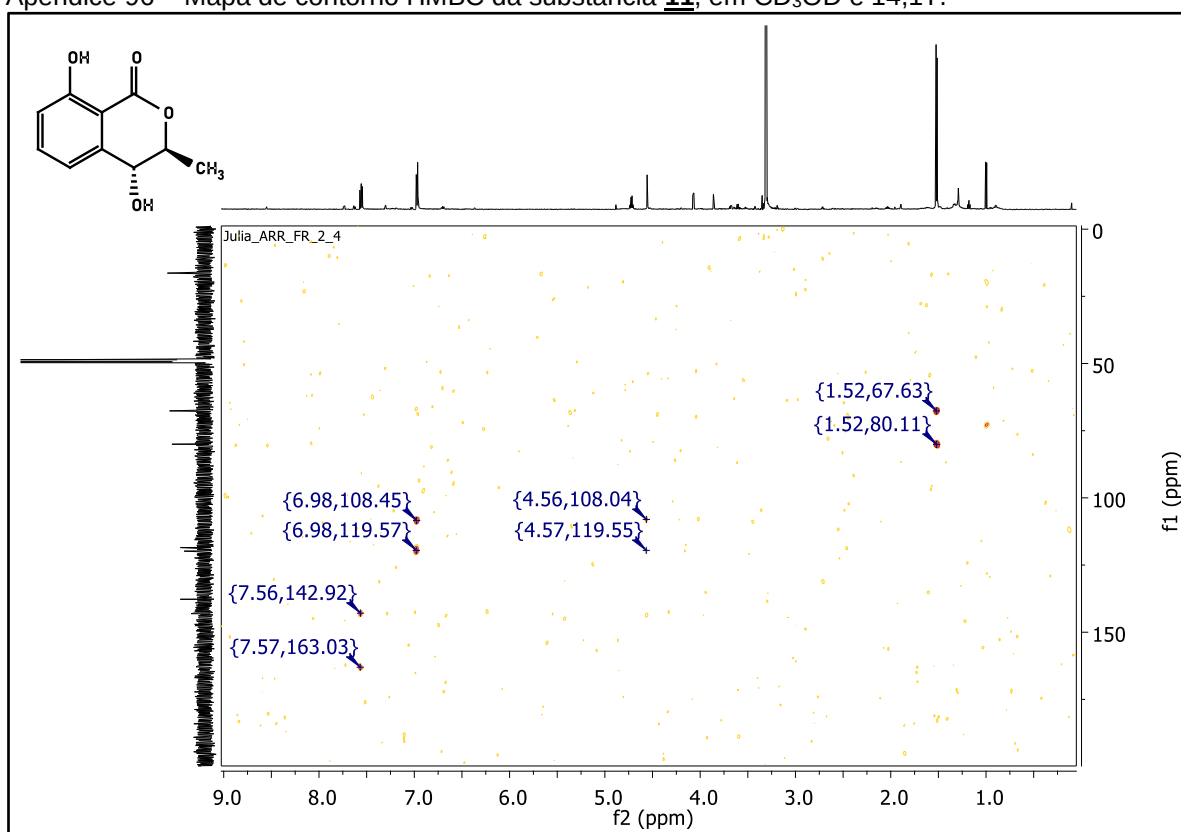
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 95 – Mapa de contorno COSY da substância **11**, em CD₃OD e 14,1T.



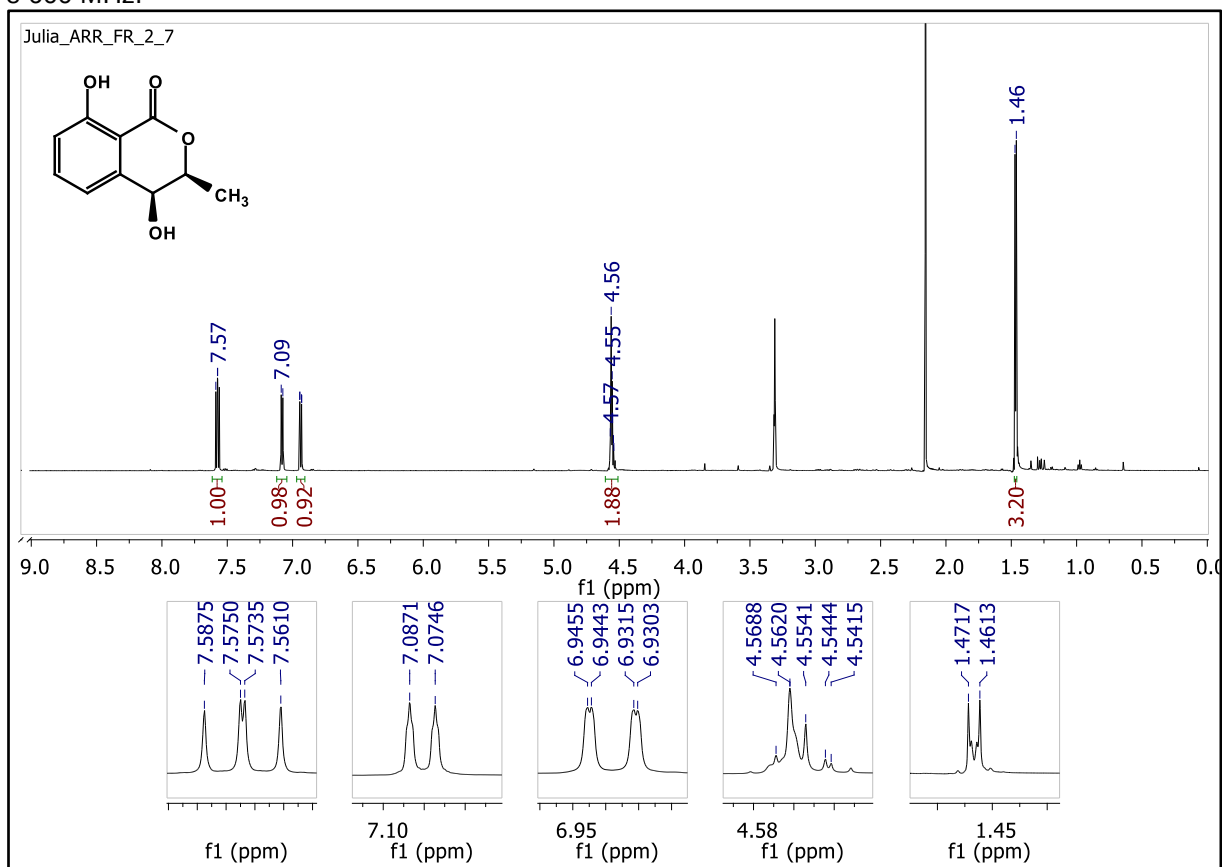
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 96 – Mapa de contorno HMBC da substância **11**, em CD₃OD e 14,1T.



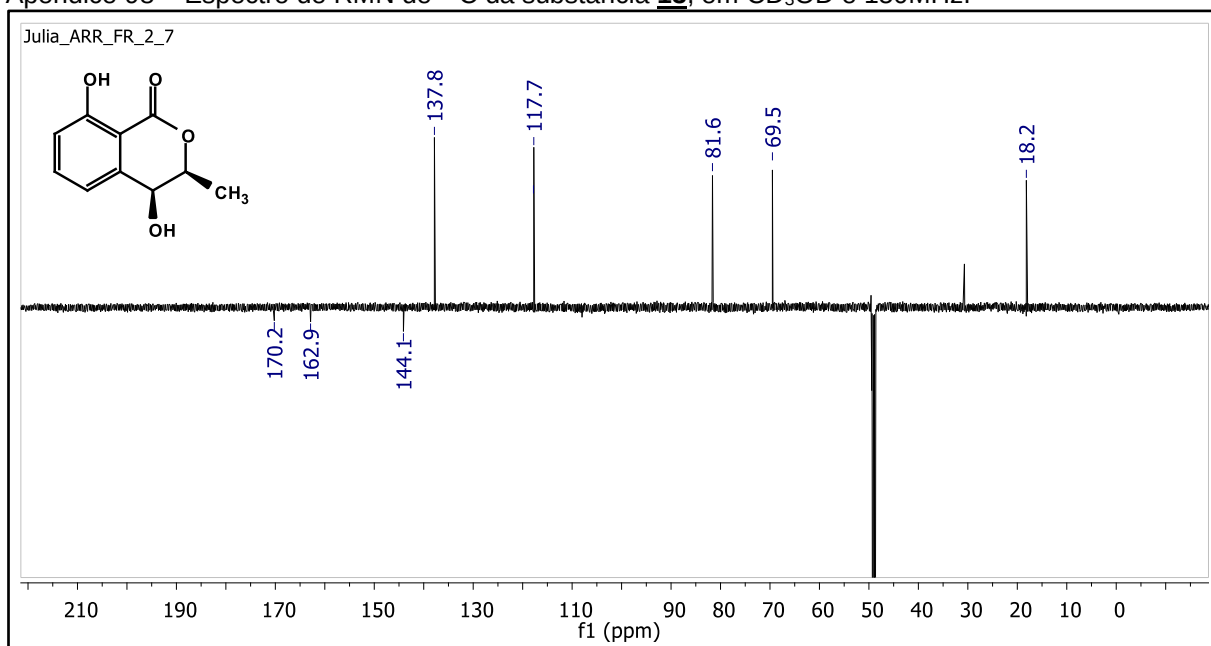
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 97 – Espectro de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, da substância **13**, em CD_3OD e 600 MHz.

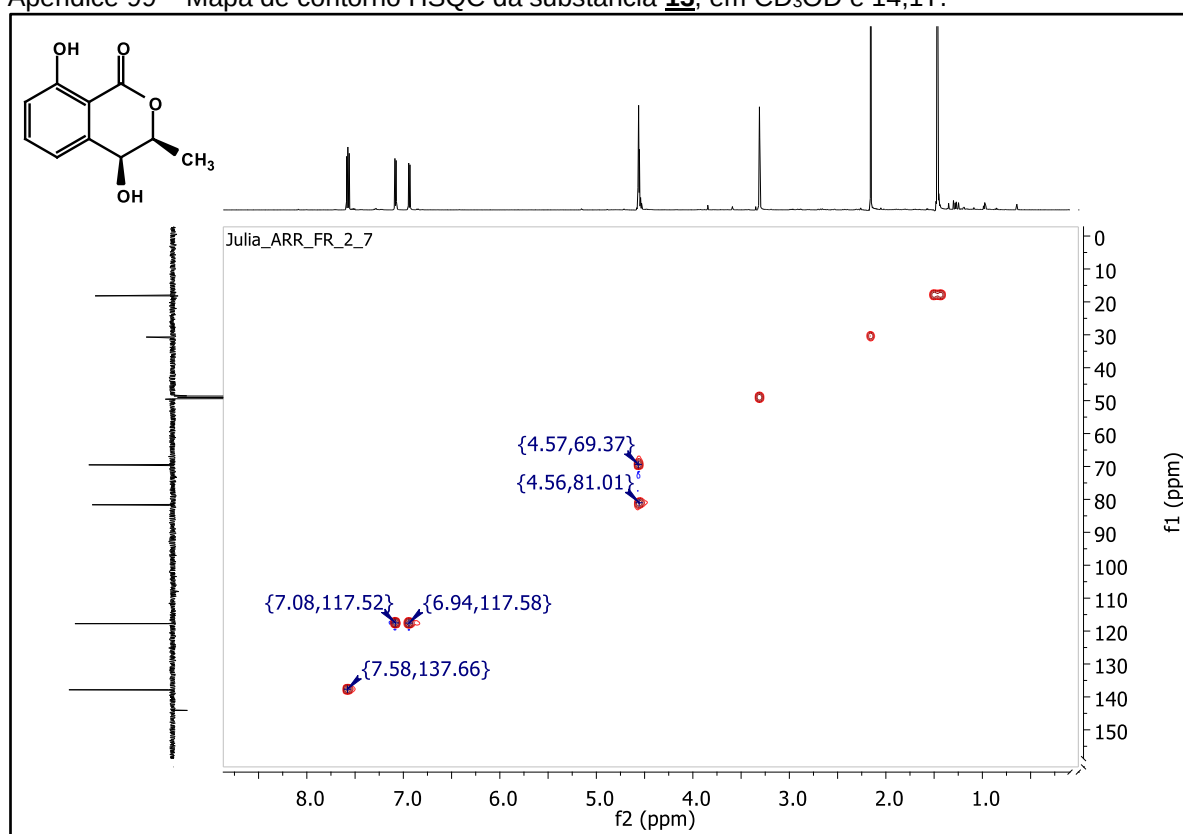


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

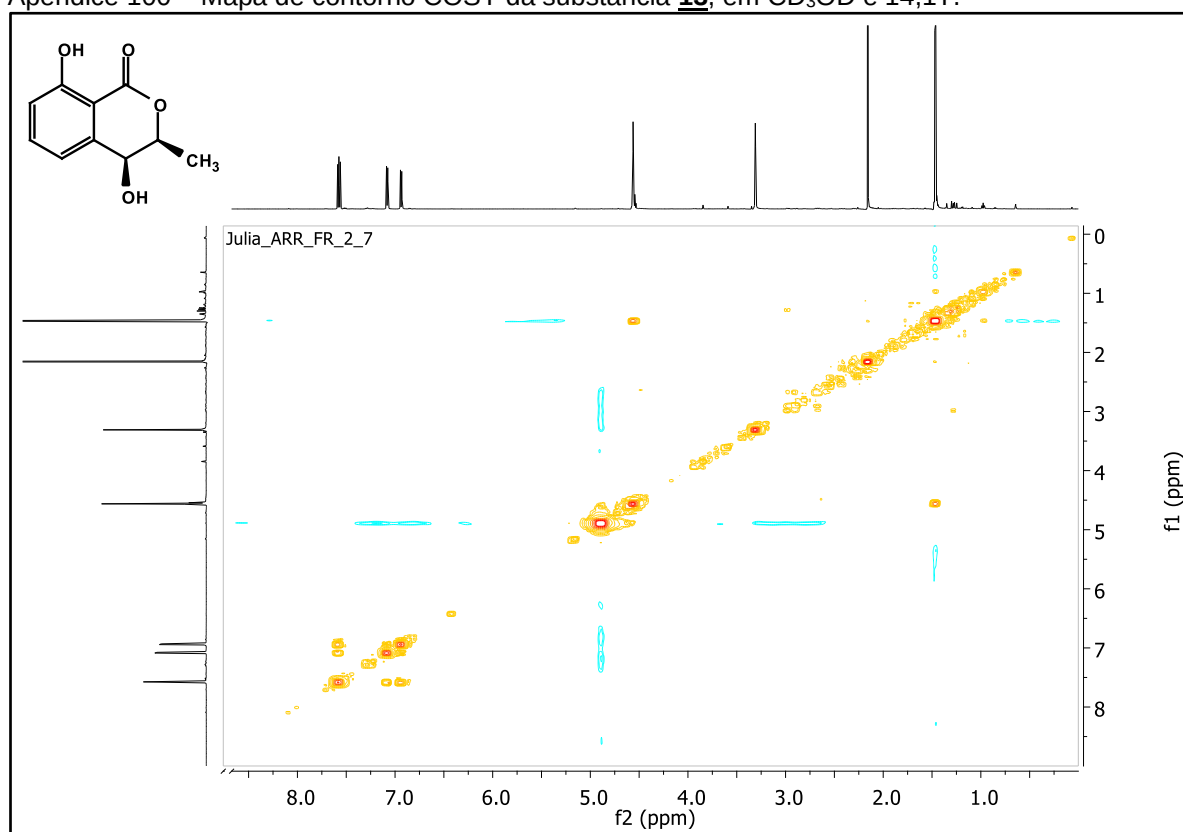
Apêndice 98 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **13**, em CD_3OD e 150MHz.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

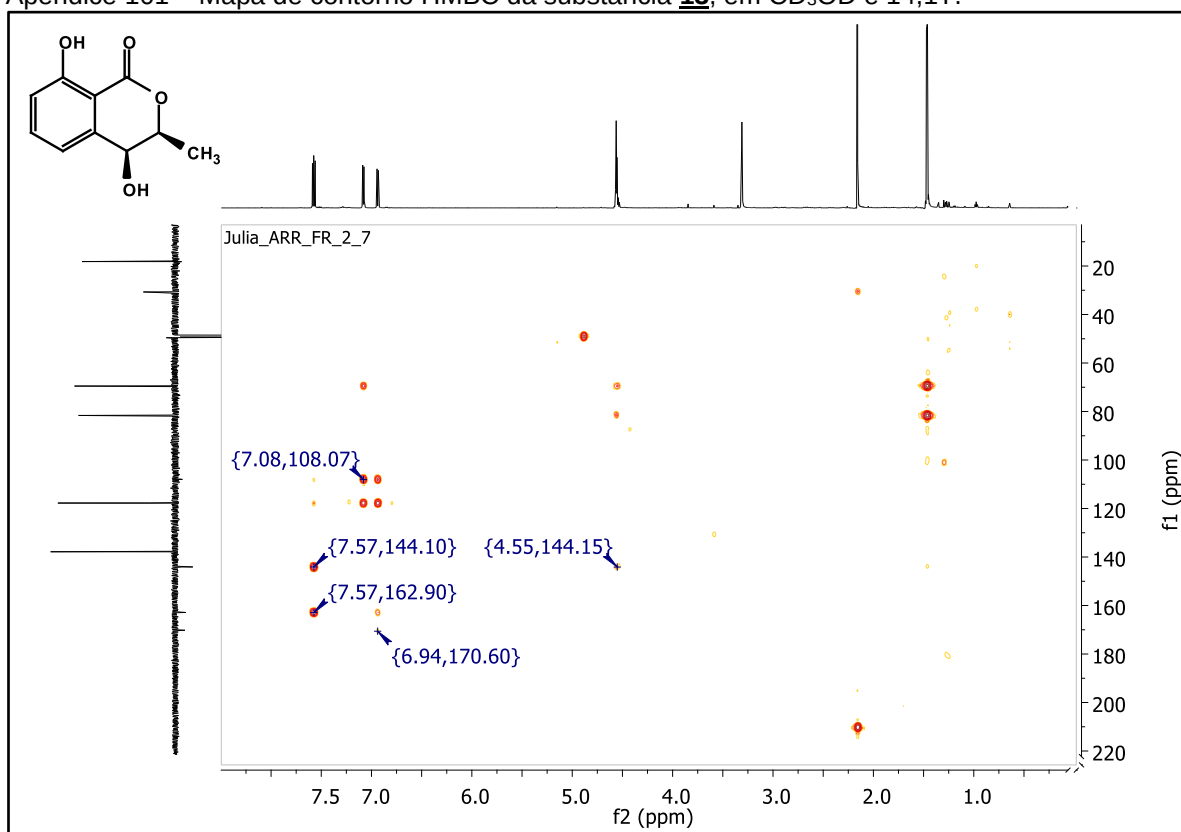
Apêndice 99 – Mapa de contorno HSQC da substância **13**, em CD₃OD e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 100 – Mapa de contorno COSY da substância **13**, em CD₃OD e 14,1T.

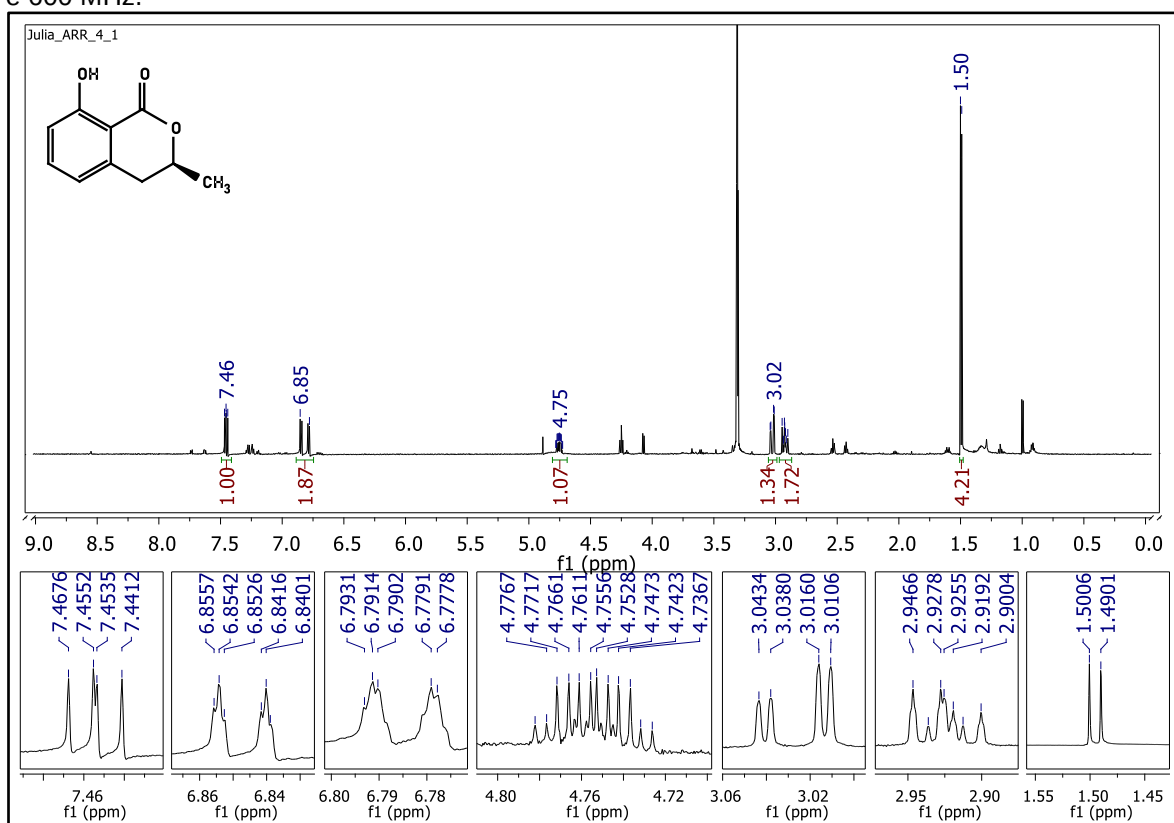
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 101 – Mapa de contorno HMBC da substância **13**, em CD₃OD e 14,1T.

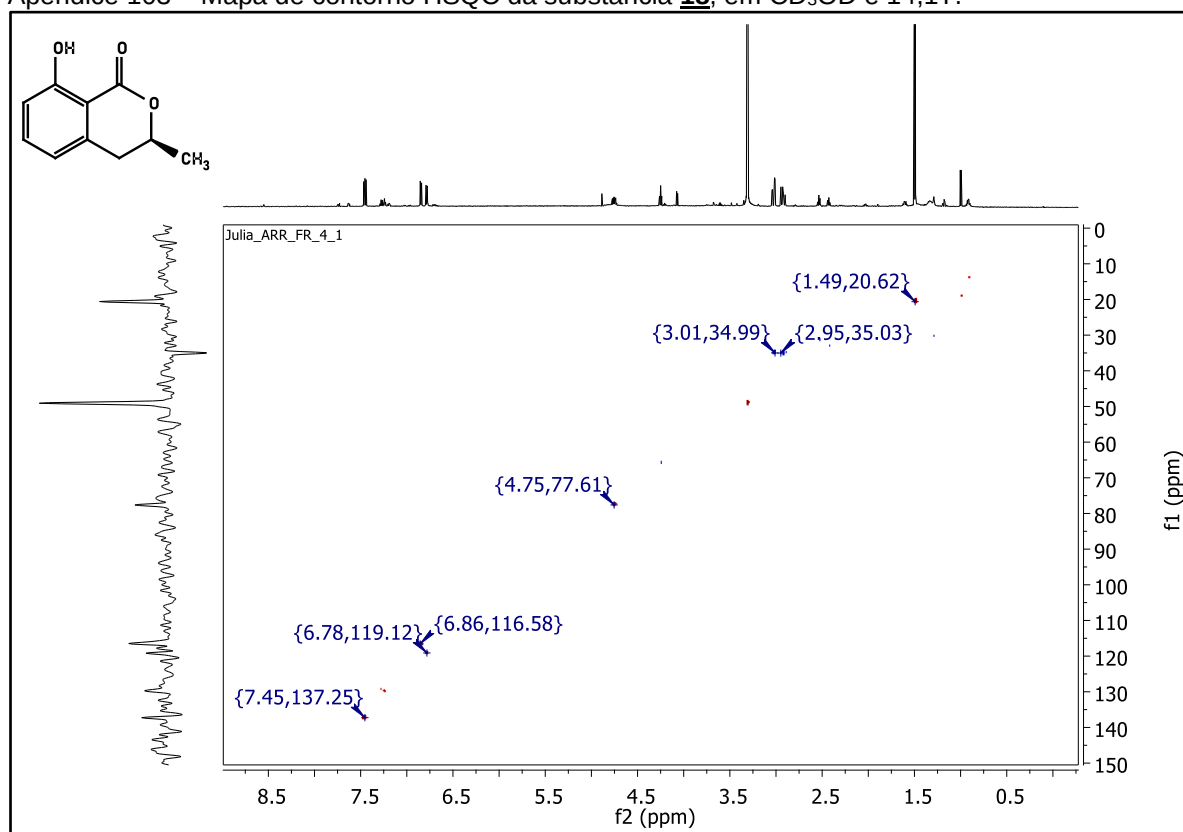


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

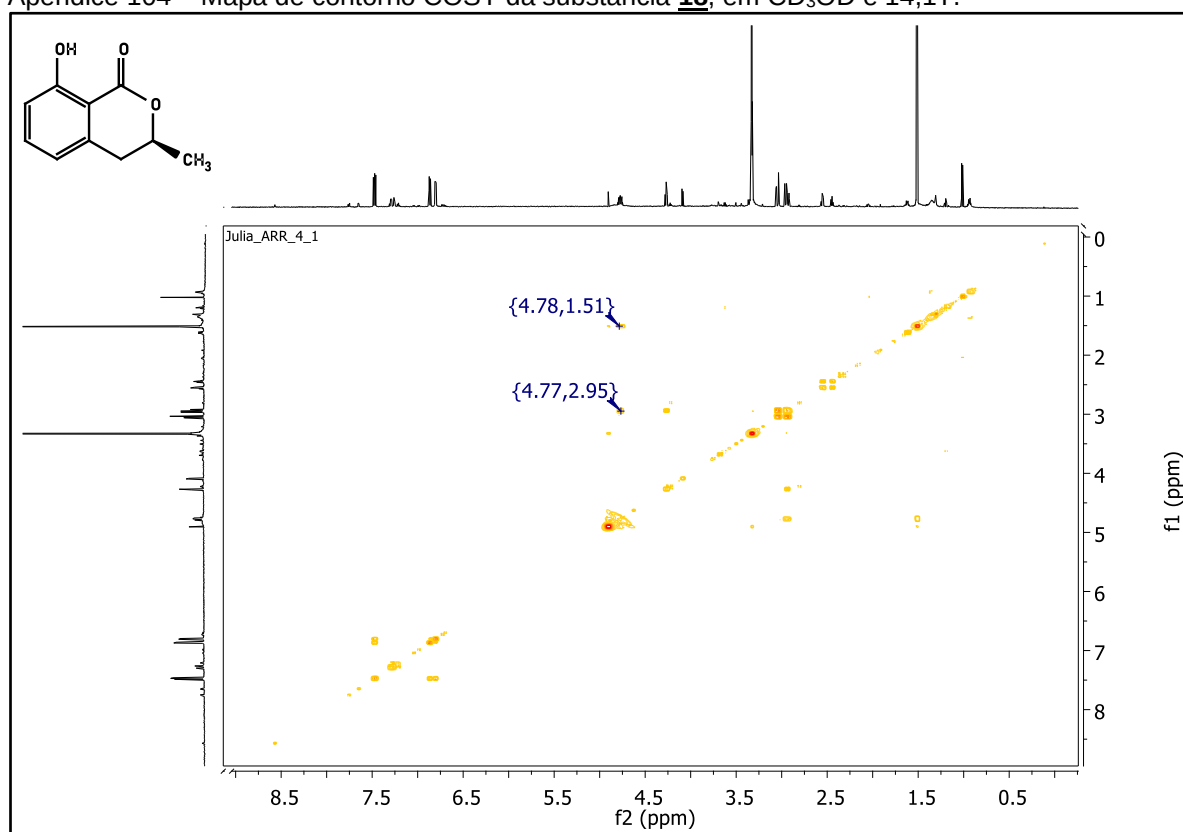
Apêndice 102 – Espectro de RMN de ¹H, com supressão do sinal da água, da substância **18**, em CD₃OD e 600 MHz.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

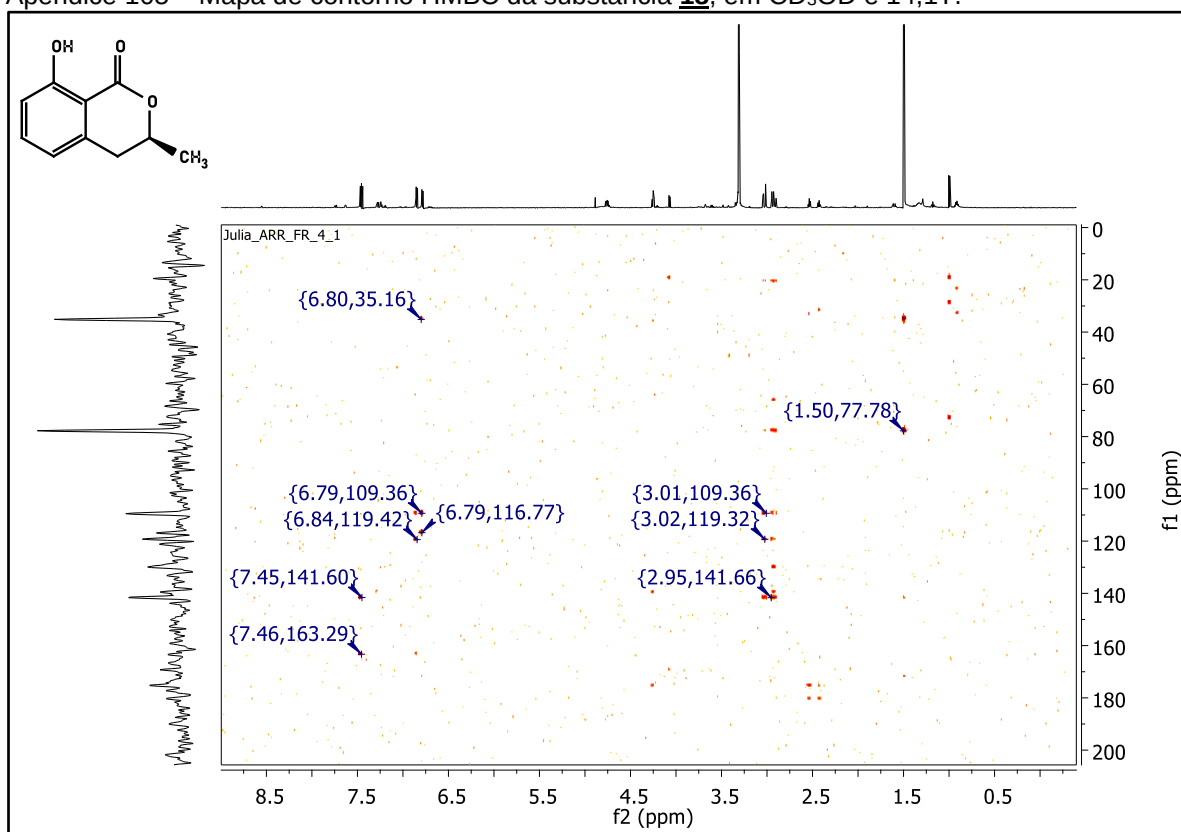
Apêndice 103 – Mapa de contorno HSQC da substância **18**, em CD₃OD e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 104 – Mapa de contorno COSY da substância **18**, em CD₃OD e 14,1T.

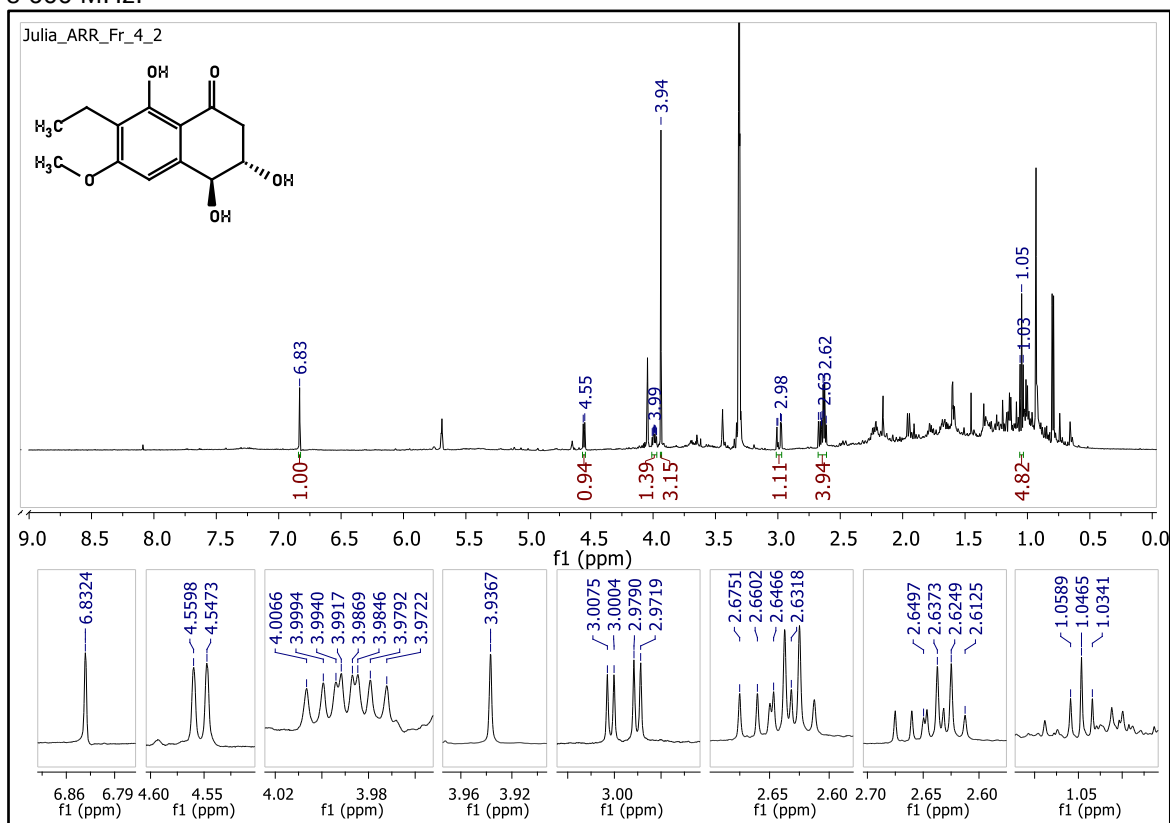
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 105 – Mapa de contorno HMBC da substância **18**, em CD₃OD e 14,1T.



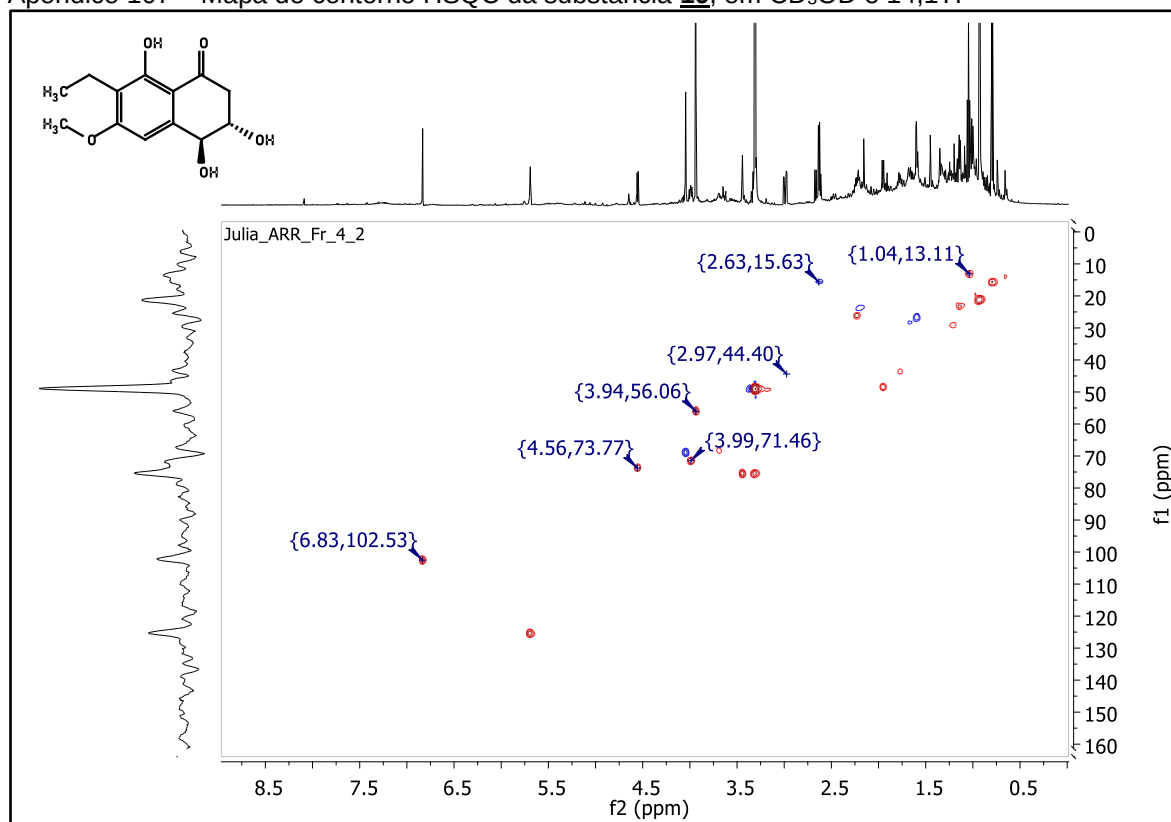
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 106 – Espectro de RMN de ¹H, com supressão do sinal da água, da substância **19**, em CD₃OD e 600 MHz.



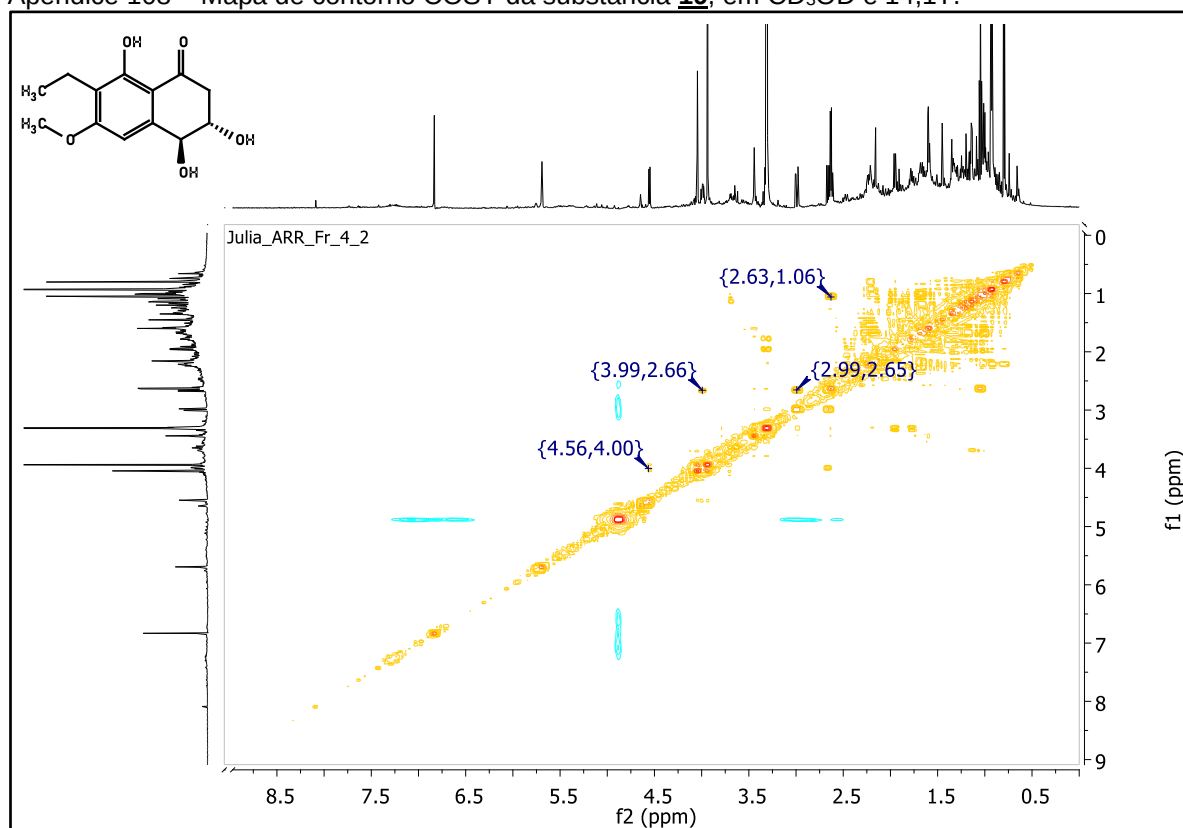
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 107 – Mapa de contorno HSQC da substância **19**, em CD₃OD e 14,1T.



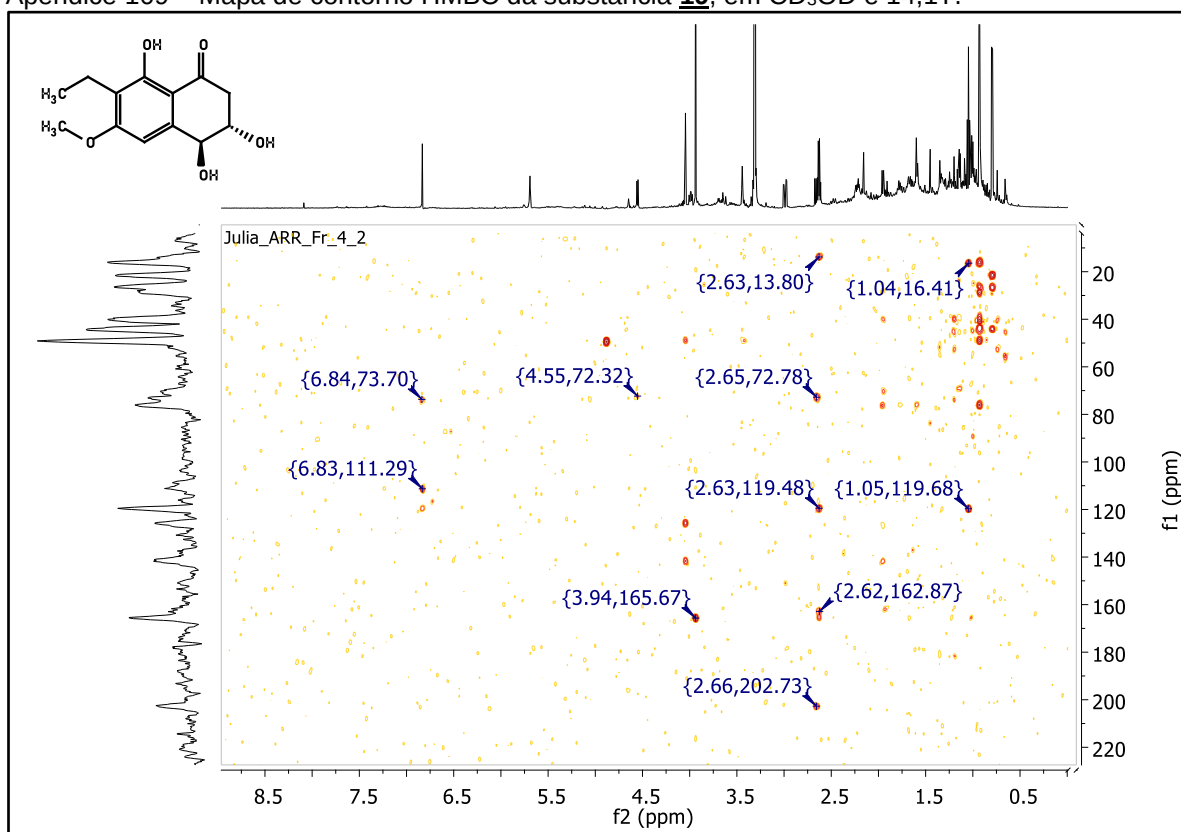
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 108 – Mapa de contorno COSY da substância **19**, em CD₃OD e 14,1T.



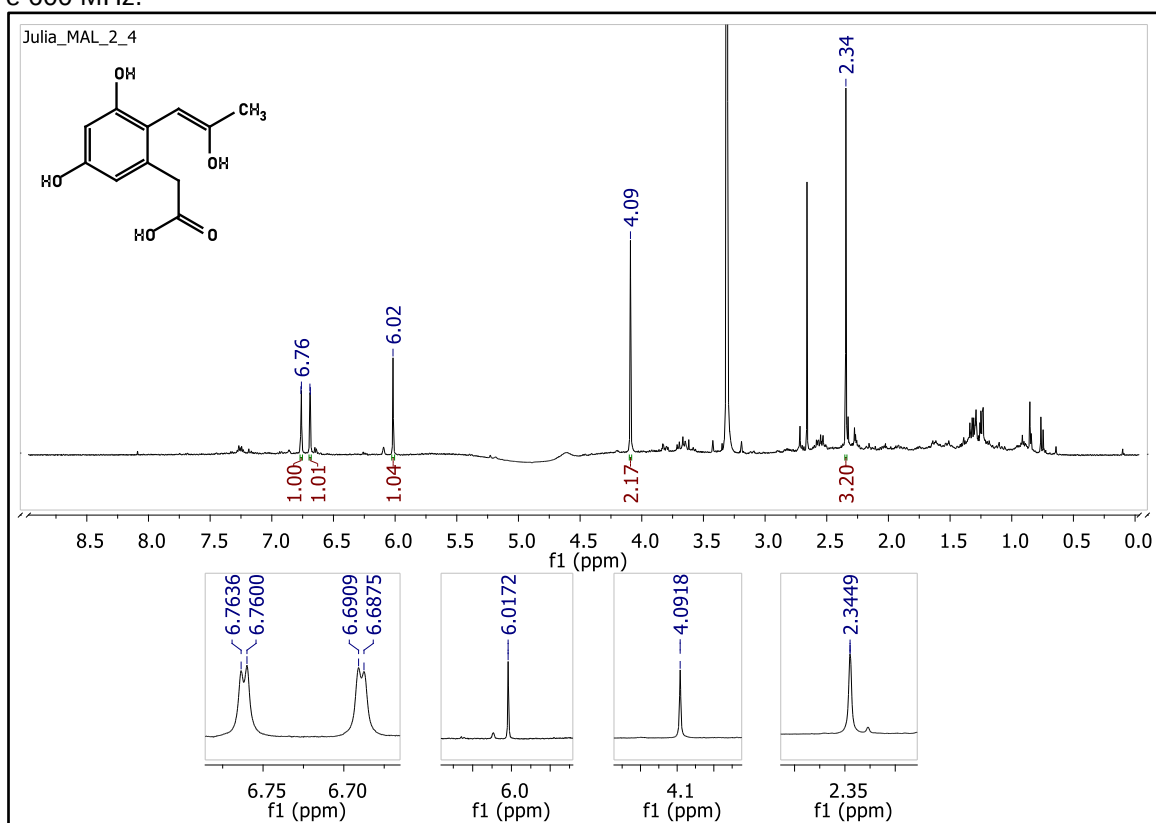
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 109 – Mapa de contorno HMBC da substância **19**, em CD₃OD e 14,1T.

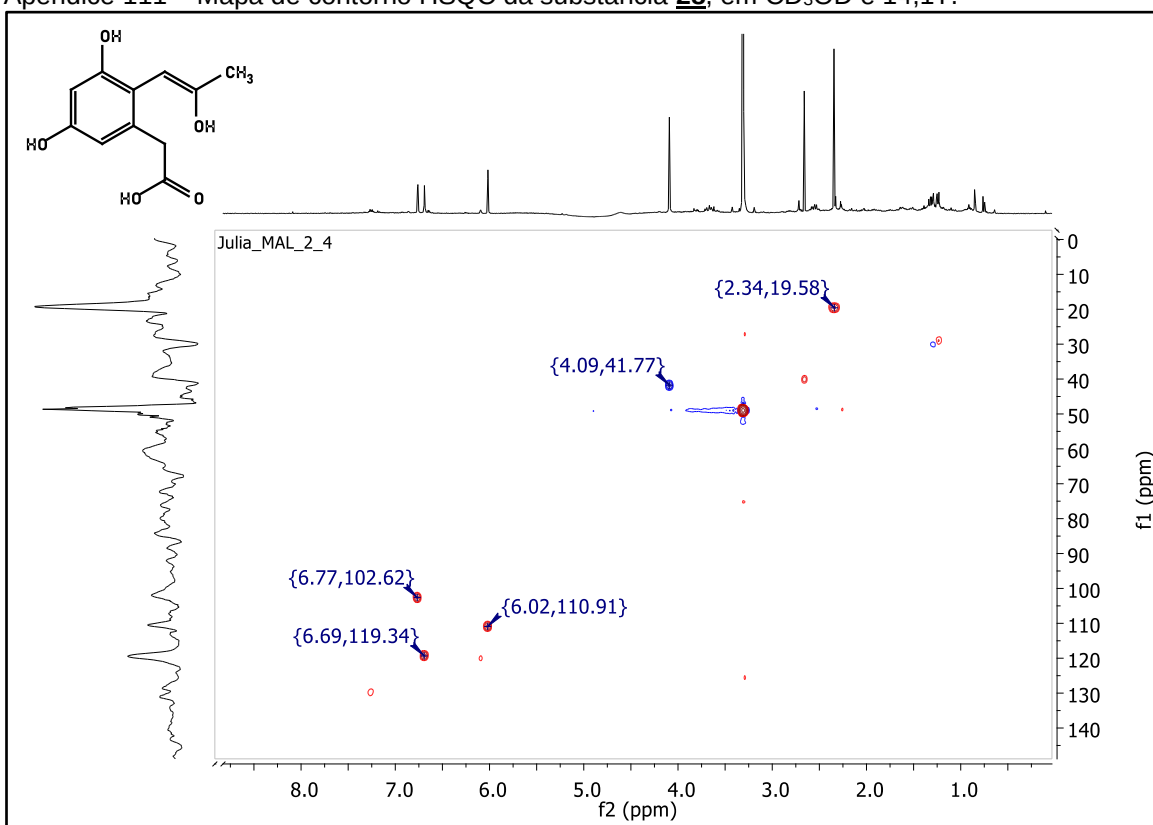


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

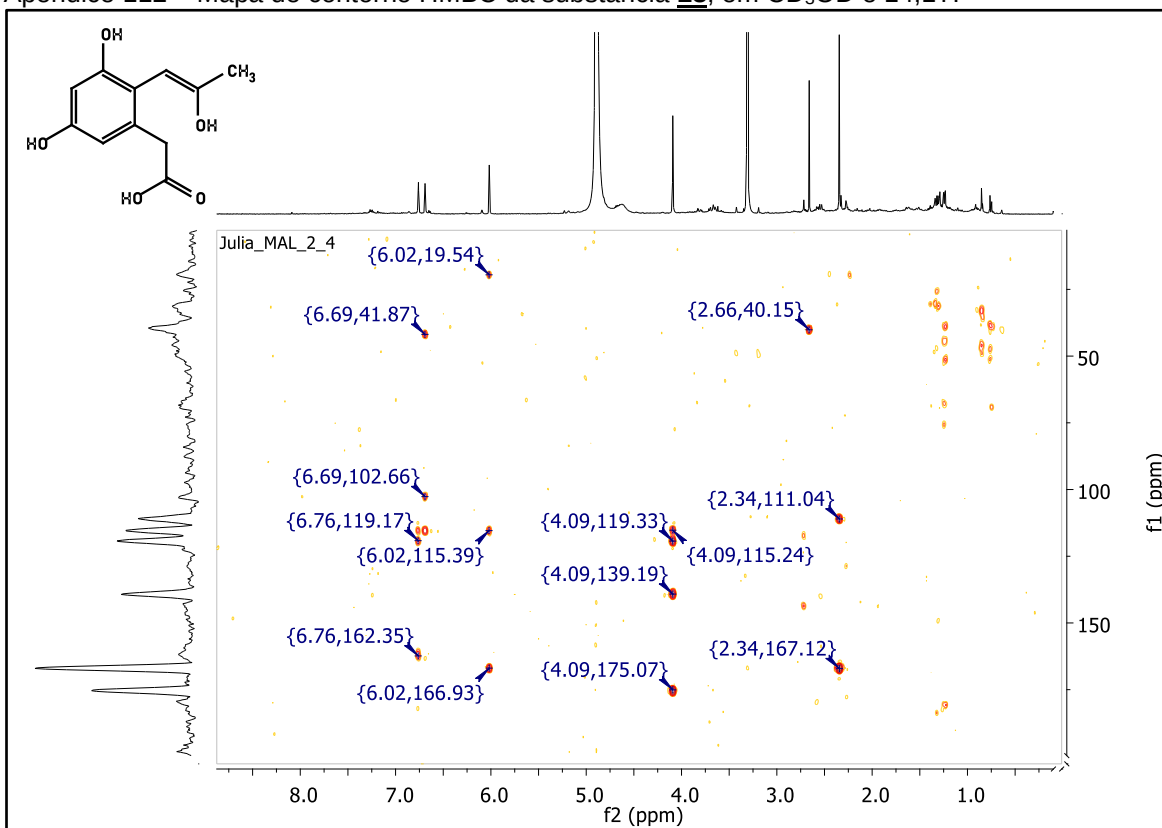
Apêndice 110 – Espectro de RMN de ¹H, com supressão do sinal da água, da substância **28**, em CD₃OD e 600 MHz.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

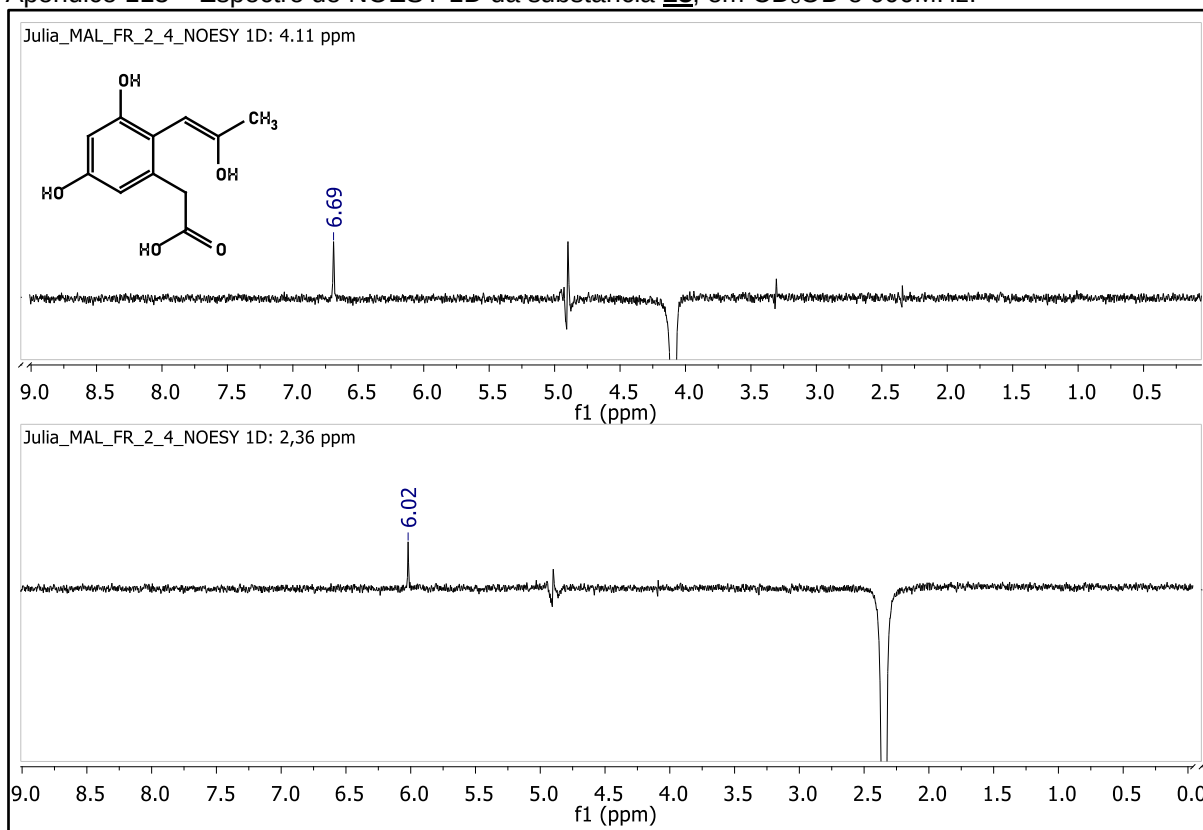
Apêndice 111 – Mapa de contorno HSQC da substância **28**, em CD₃OD e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 112 – Mapa de contorno HMBC da substância **28**, em CD₃OD e 14,1T.

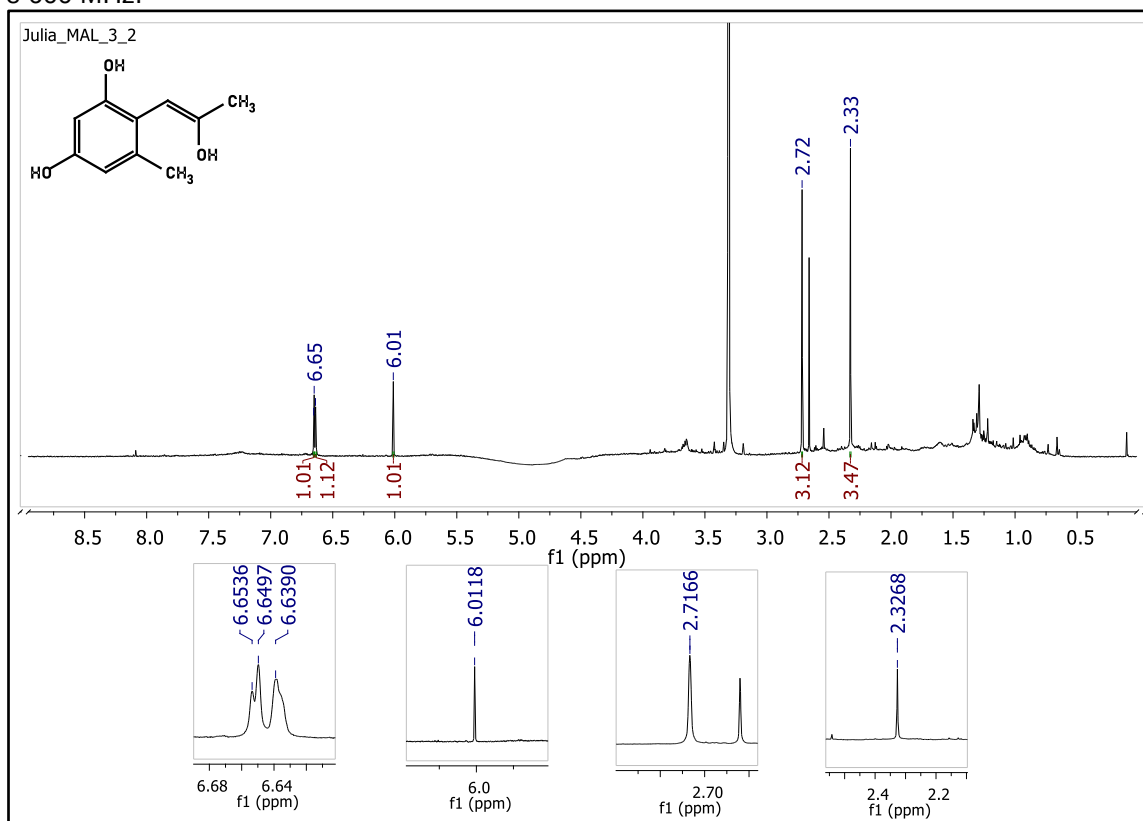
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 113 – Espectro de NOESY 1D da substância **28**, em CD₃OD e 600MHz.

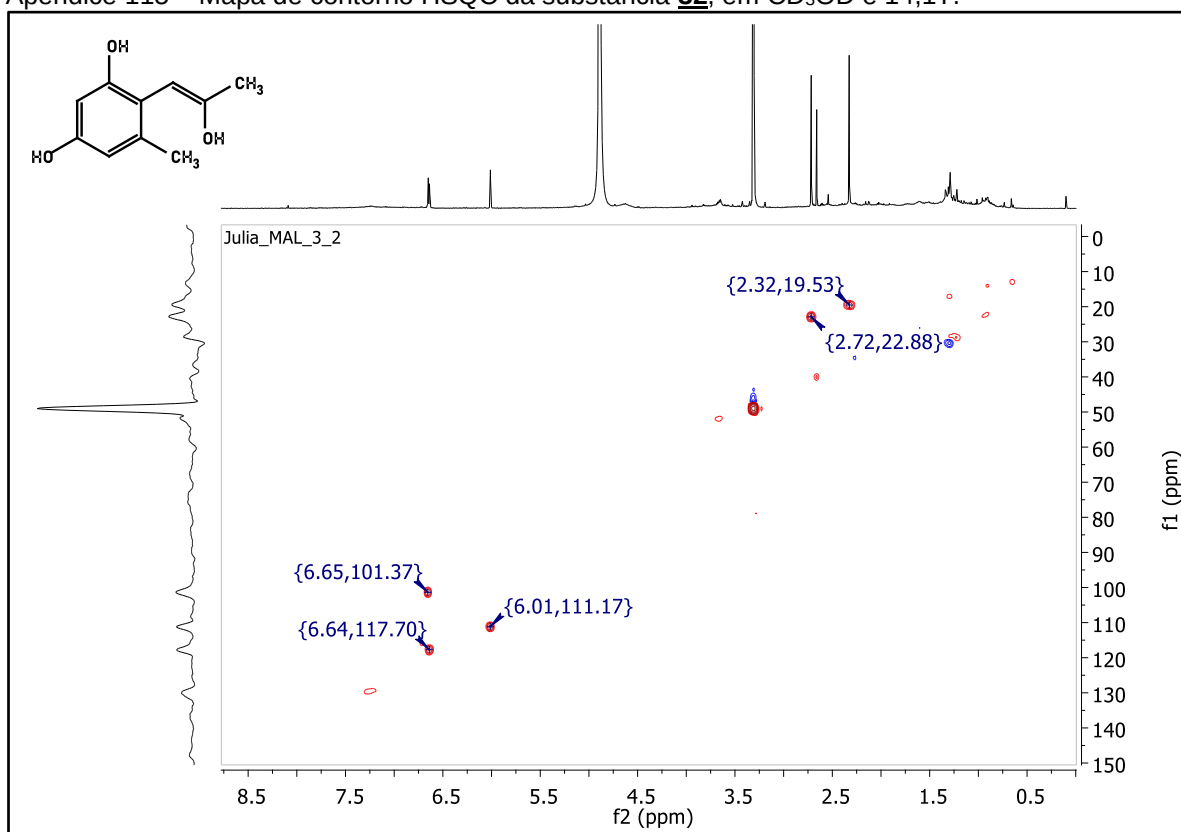


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

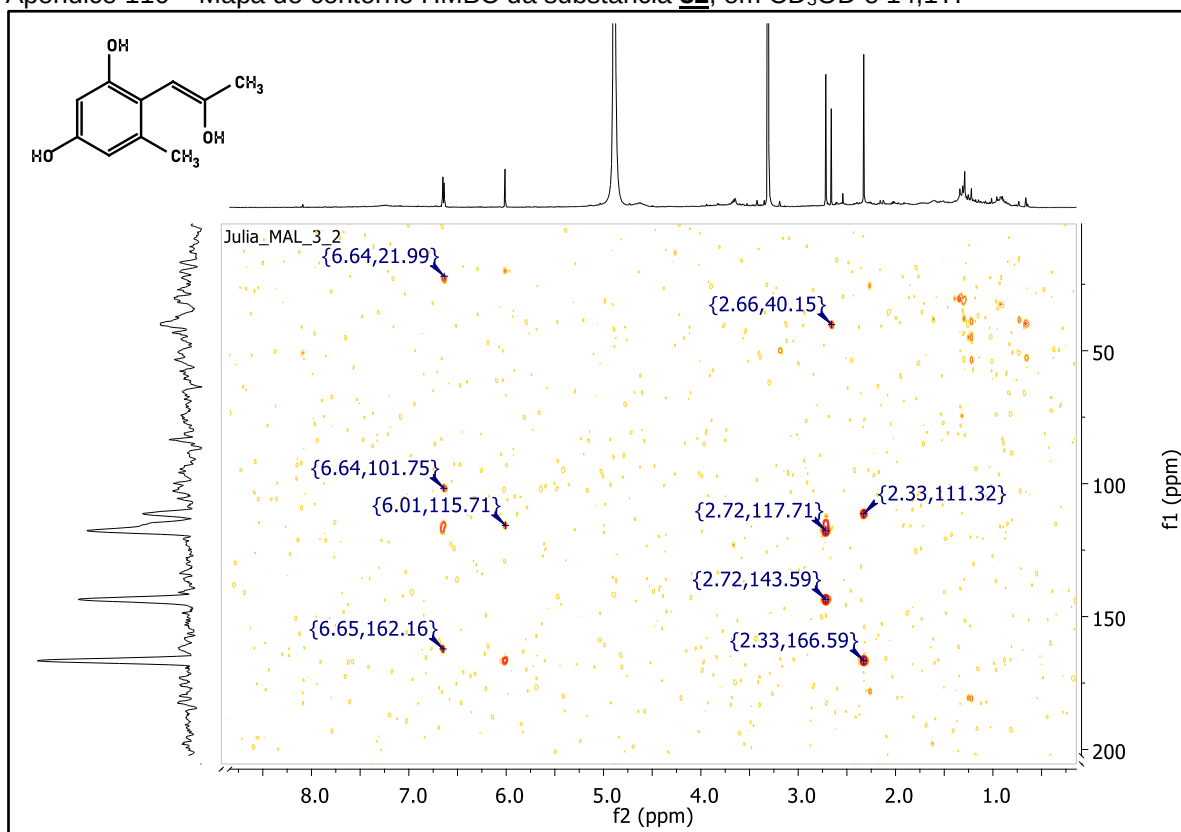
Apêndice 114 – Espectro de RMN de ¹H, com supressão do sinal da água, da substância **32**, em CD₃OD e 600 MHz.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

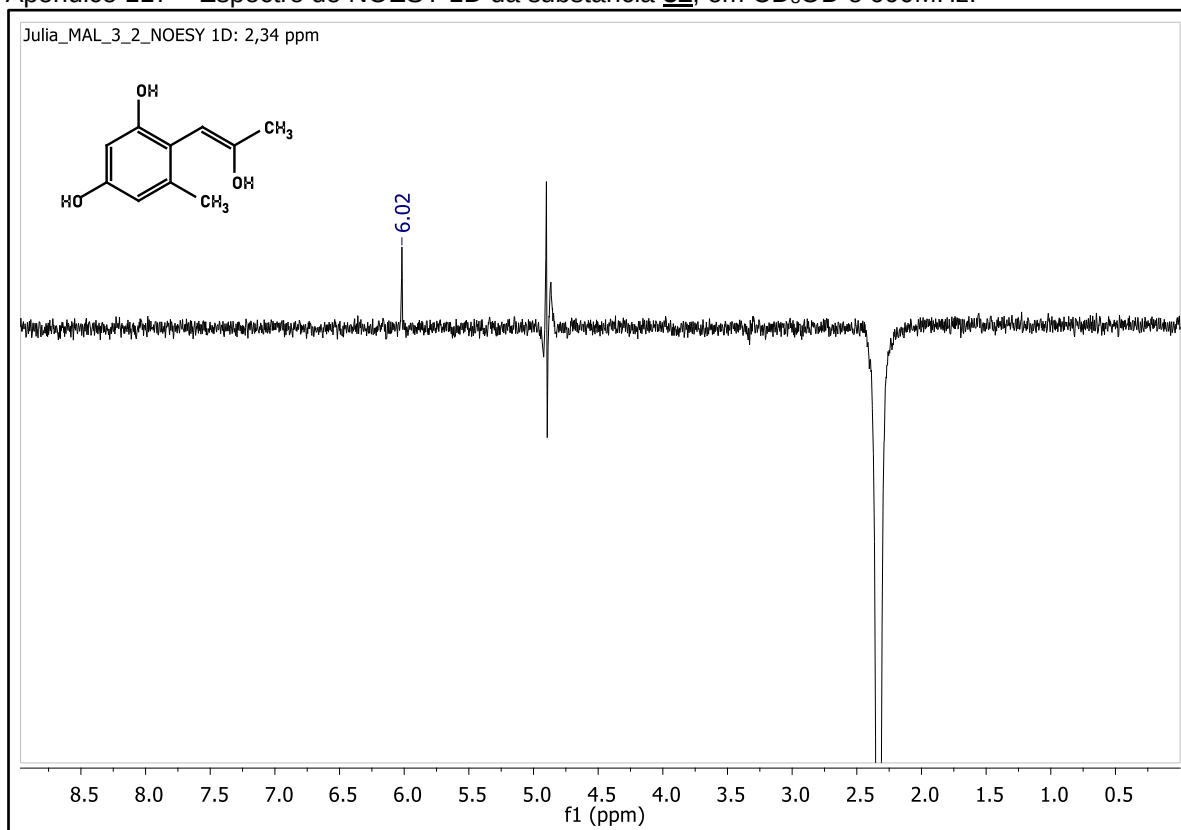
Apêndice 115 – Mapa de contorno HSQC da substância **32**, em CD₃OD e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 116 – Mapa de contorno HMBC da substância **32**, em CD₃OD e 14,1T.

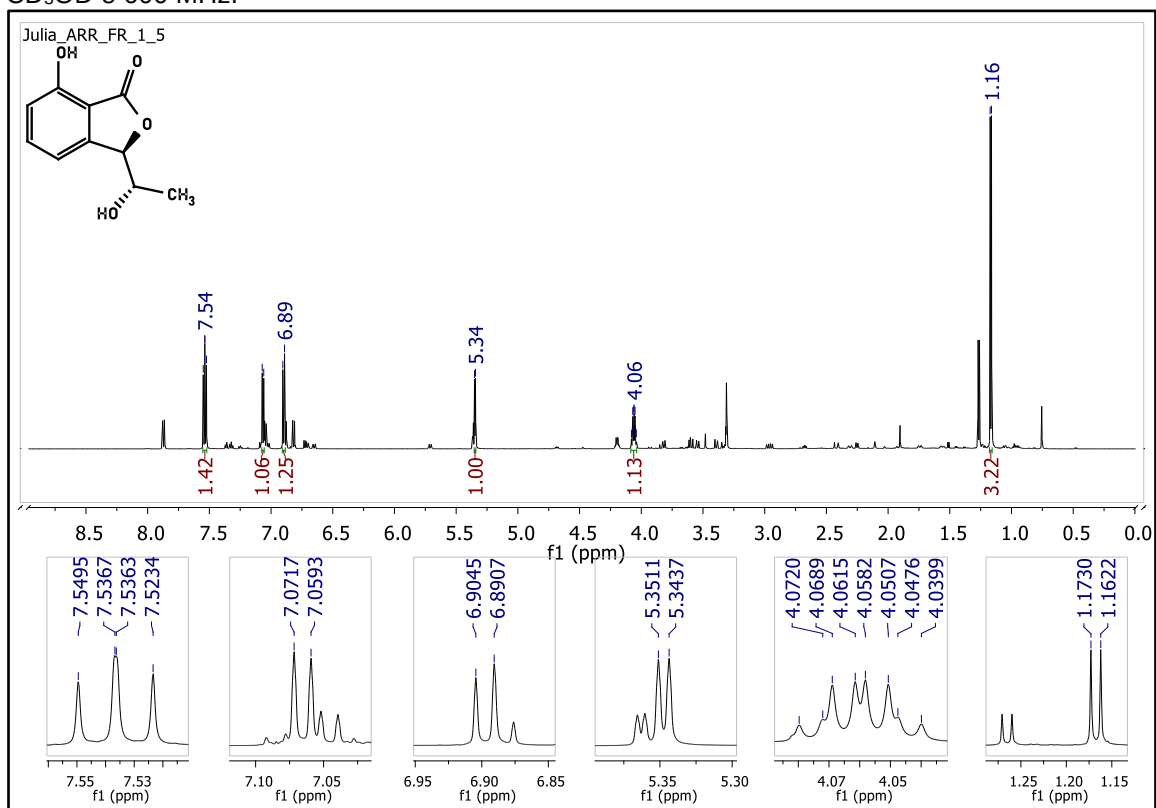
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 117 – Espectro de NOESY 1D da substância **32**, em CD₃OD e 600MHz.



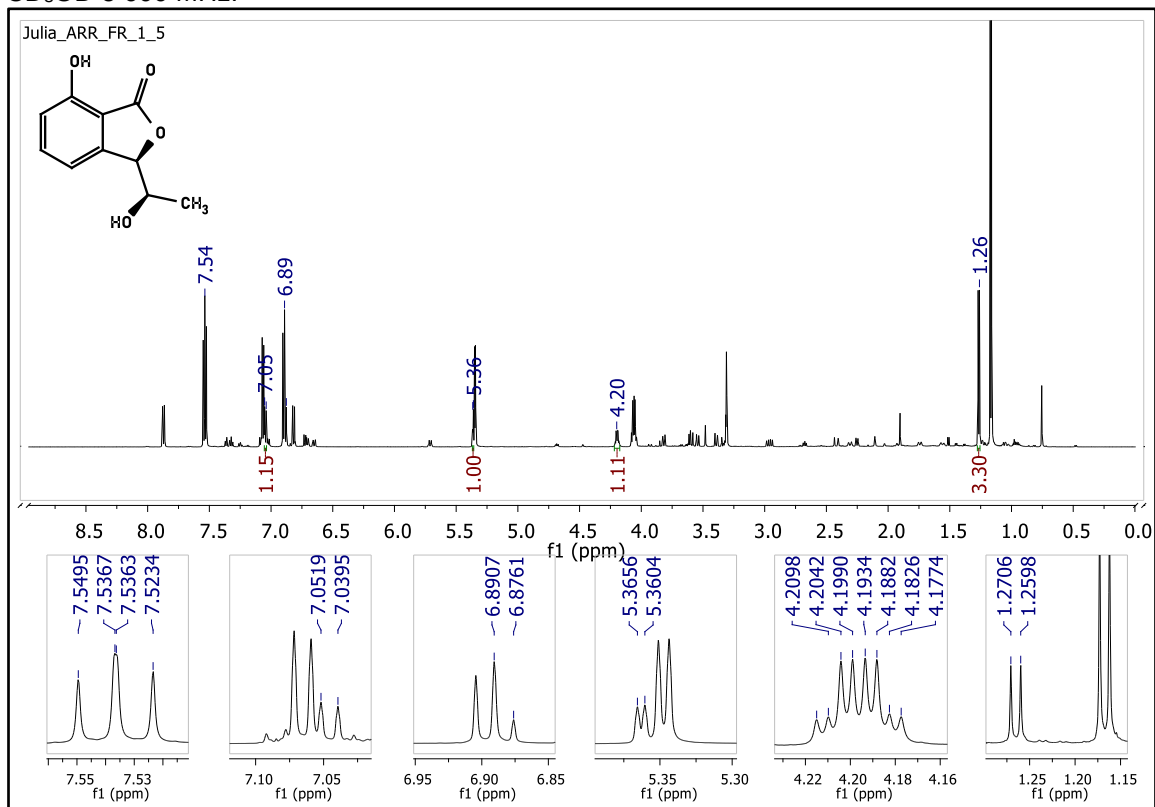
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 118 – Espectro de RMN de ¹H, com supressão do sinal da água, da substância **03a**, em CD₃OD e 600 MHz.



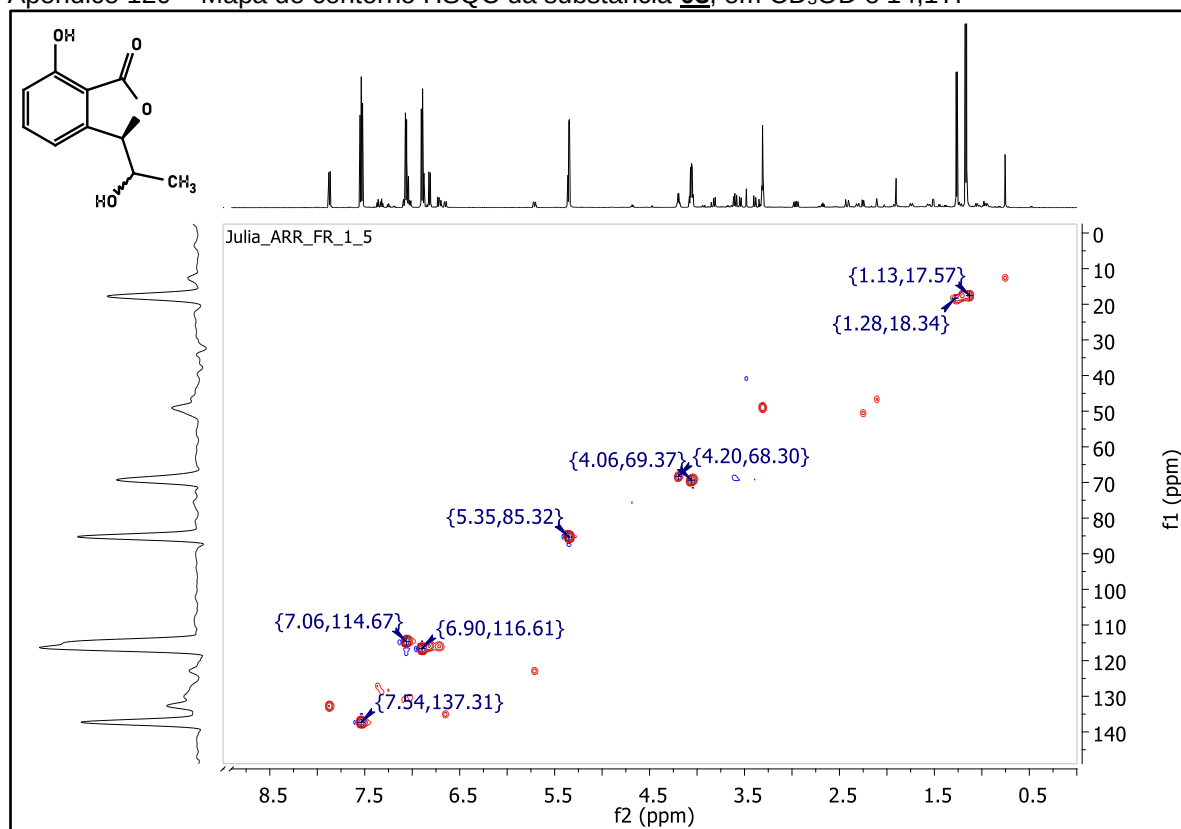
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 119 – Espectro de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, da substância **03b**, em CD_3OD e 600 MHz.

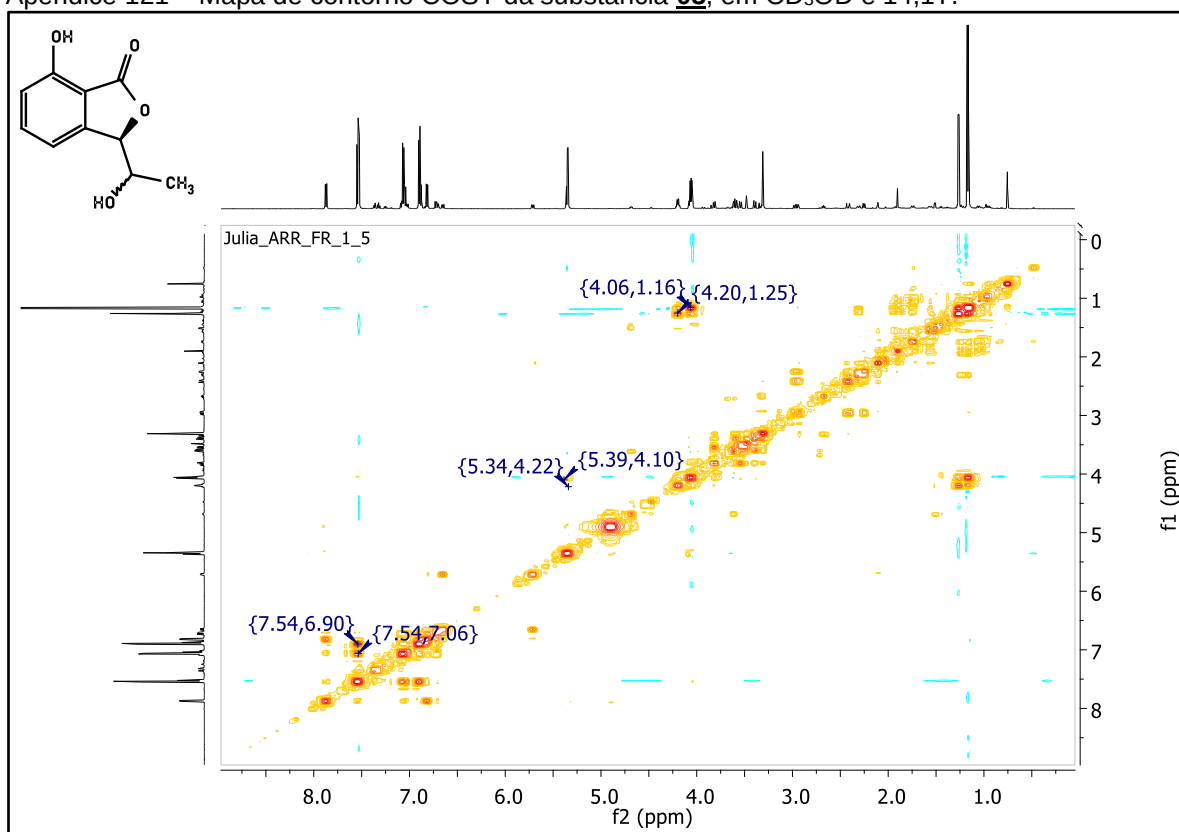


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

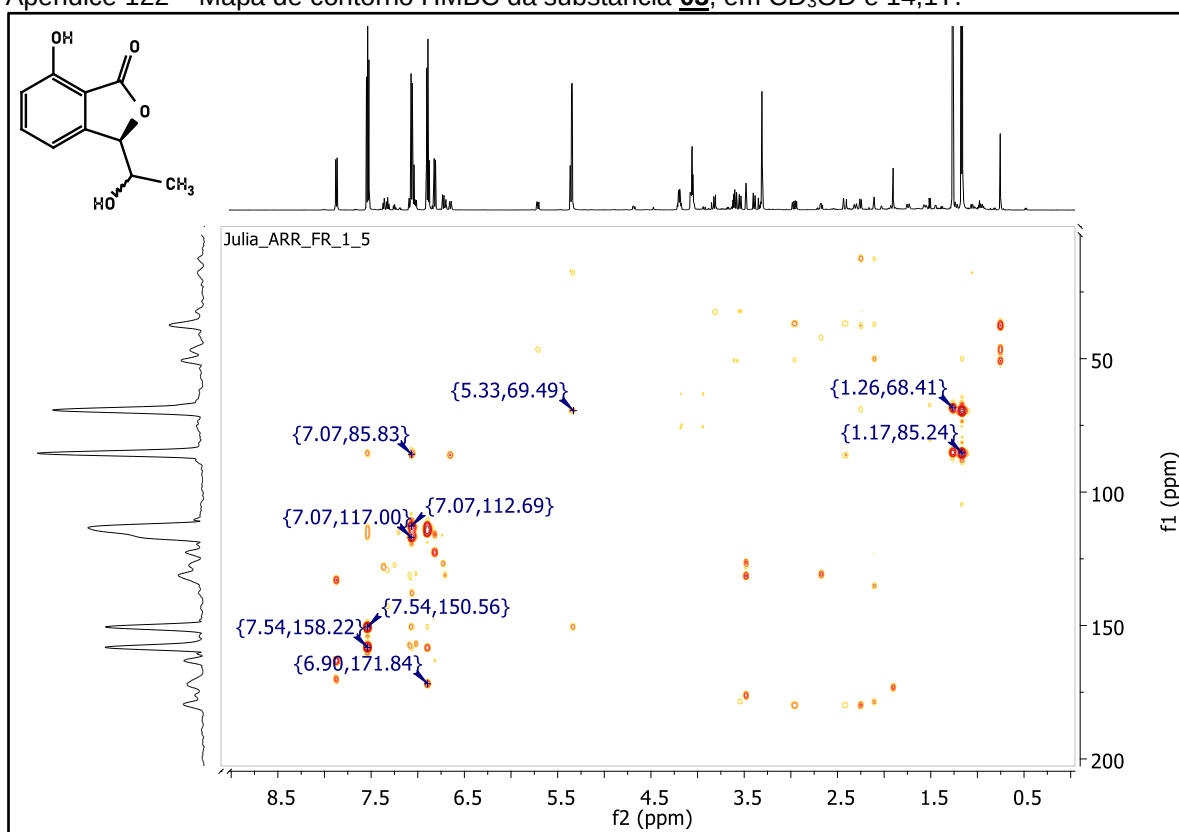
Apêndice 120 – Mapa de contorno HSQC da substância **03**, em CD_3OD e 14,1T.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

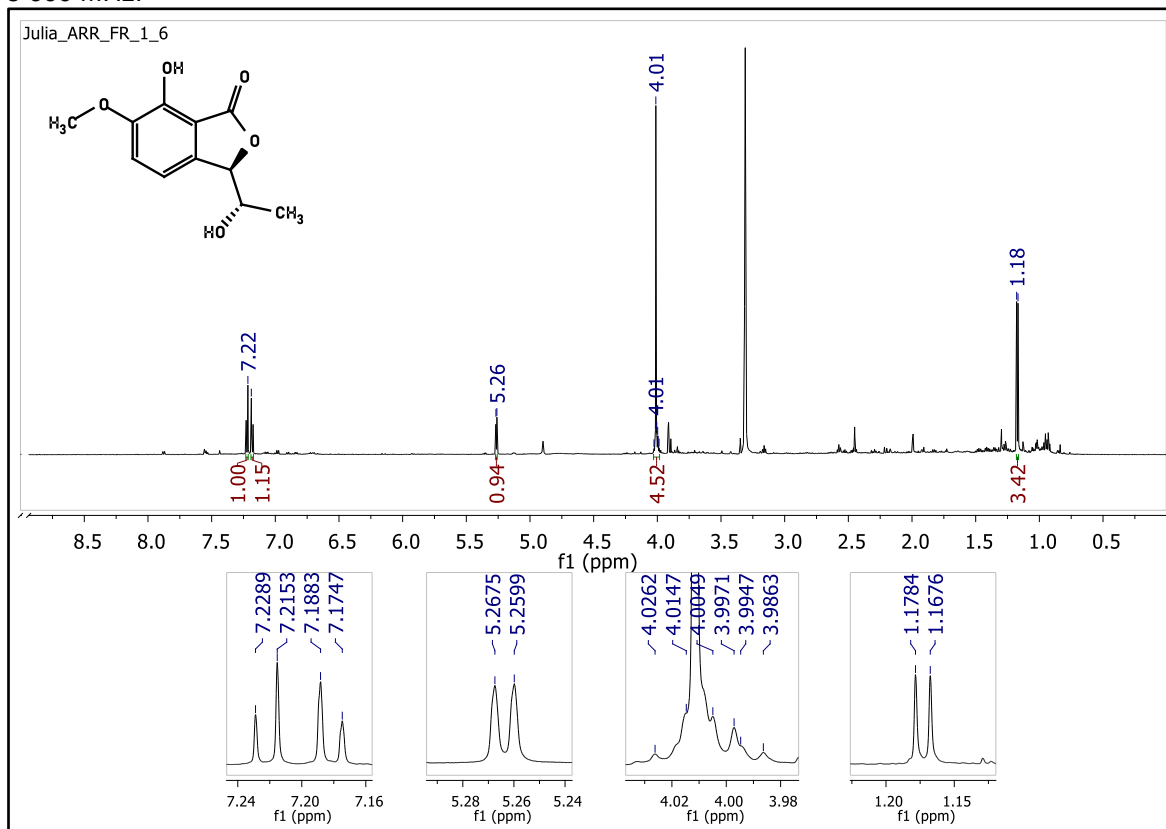
Apêndice 121 – Mapa de contorno COSY da substância **03**, em CD₃OD e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 122 – Mapa de contorno HMBC da substância **03**, em CD₃OD e 14,1T.

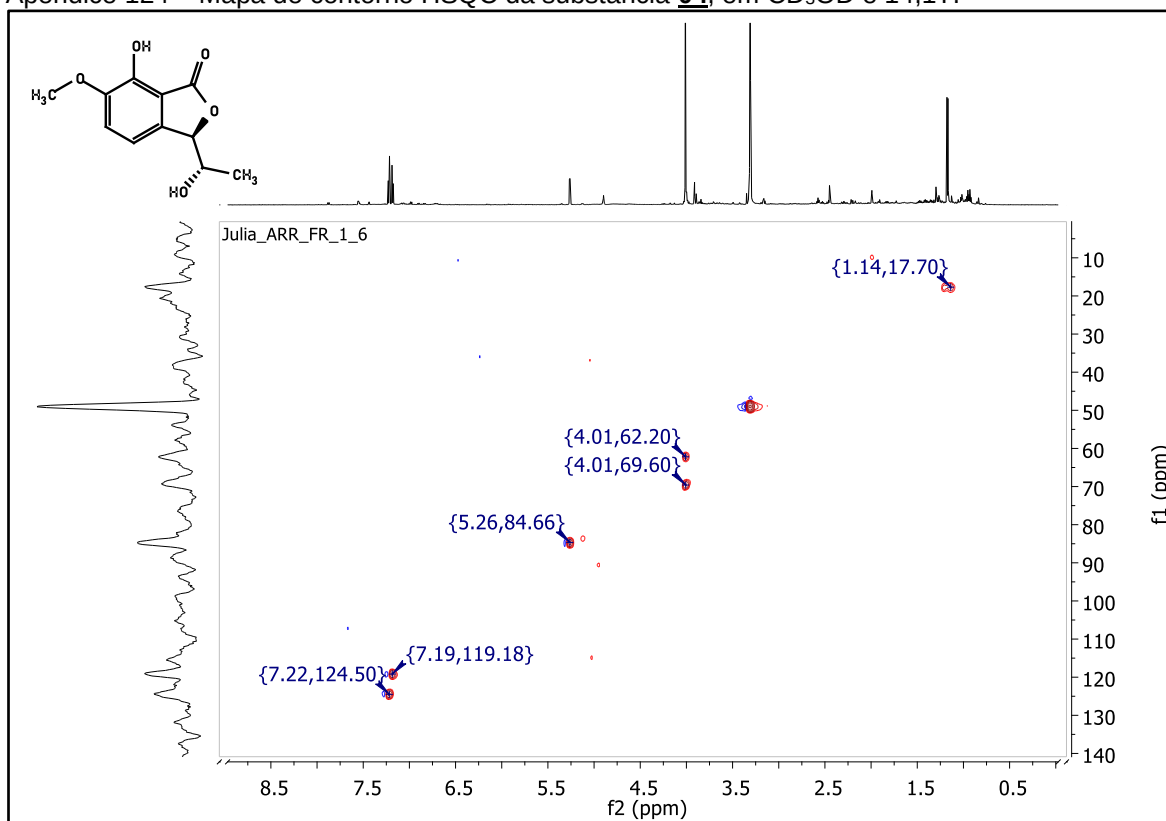
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 123 – Espectro de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, da substância **04**, em CD_3OD e 600 MHz.

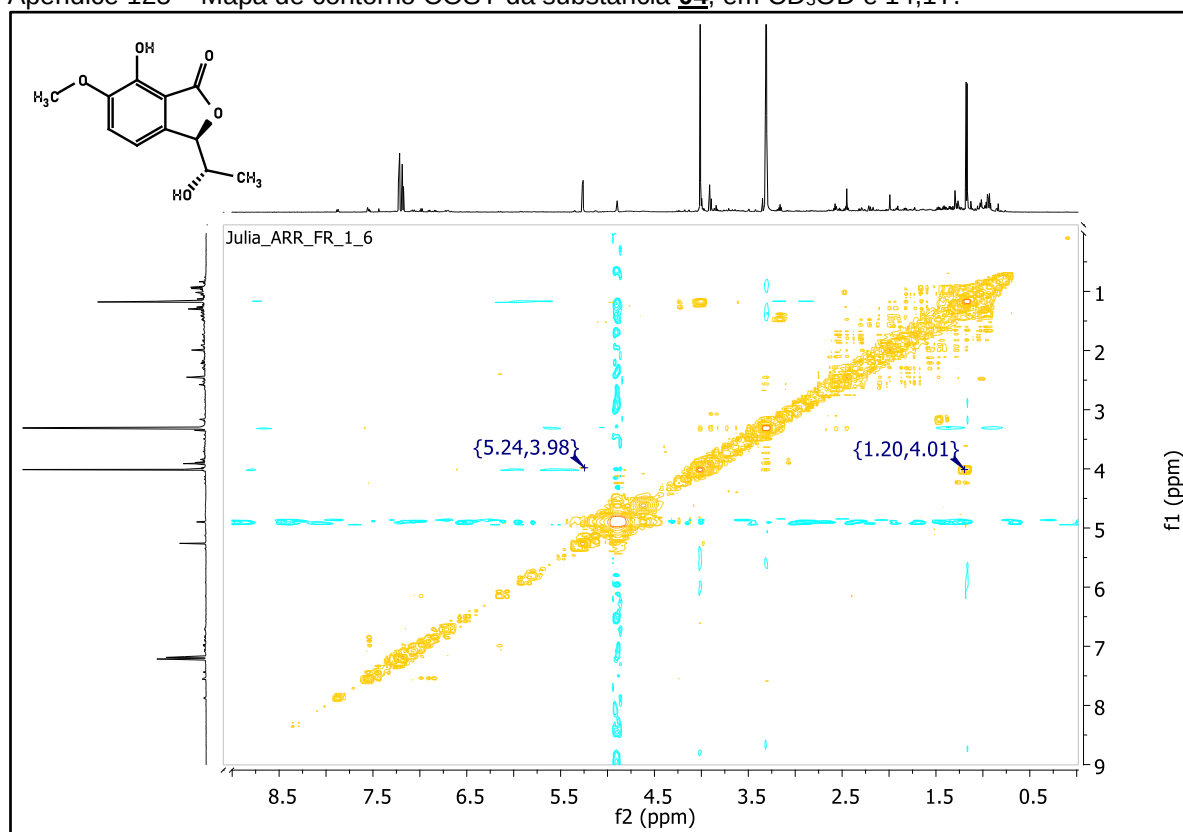


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

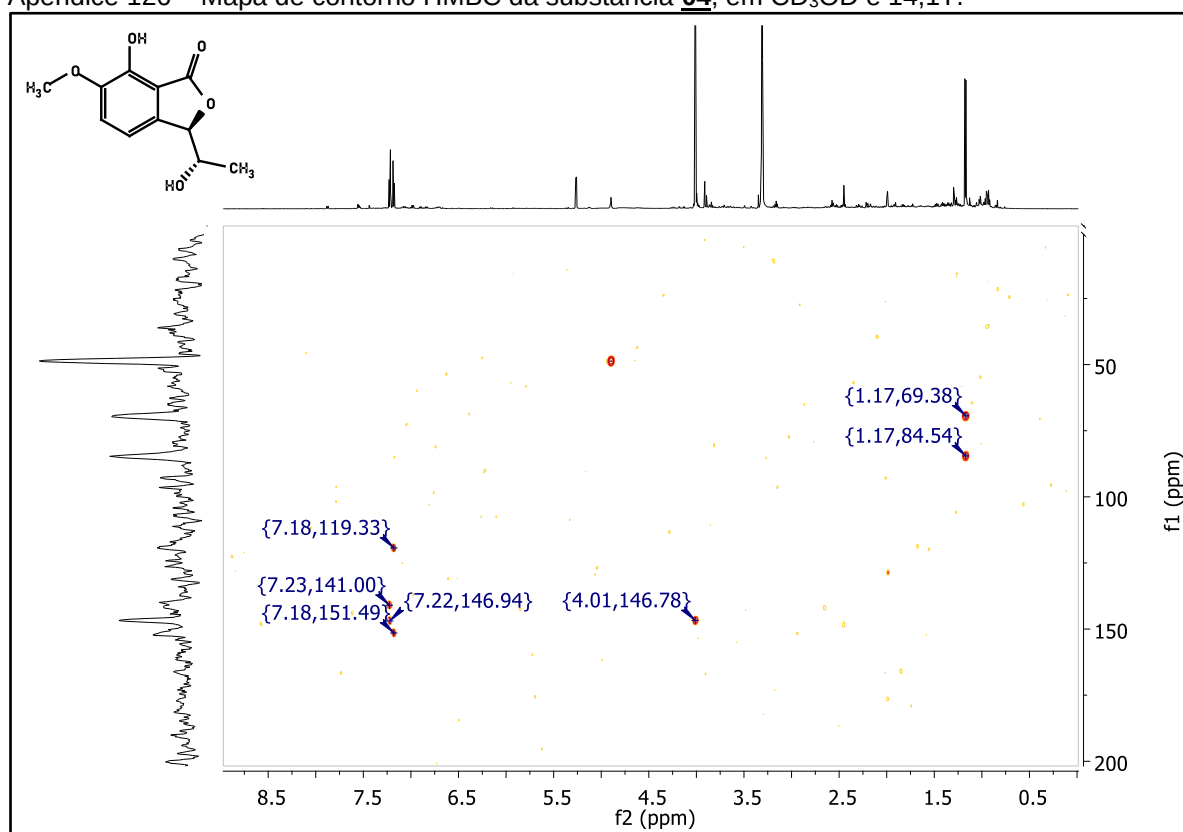
Apêndice 124 – Mapa de contorno HSQC da substância **04**, em CD_3OD e 14,1T.



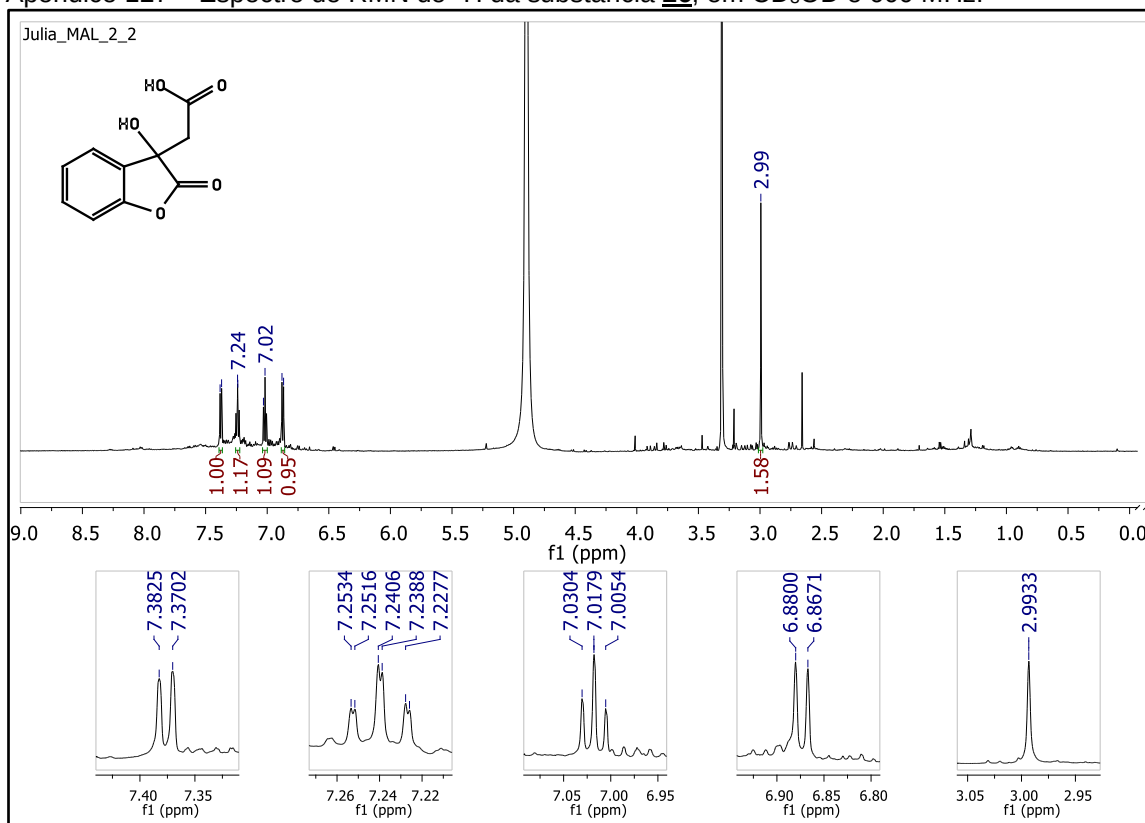
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 125 – Mapa de contorno COSY da substância **04**, em CD₃OD e 14,1T.

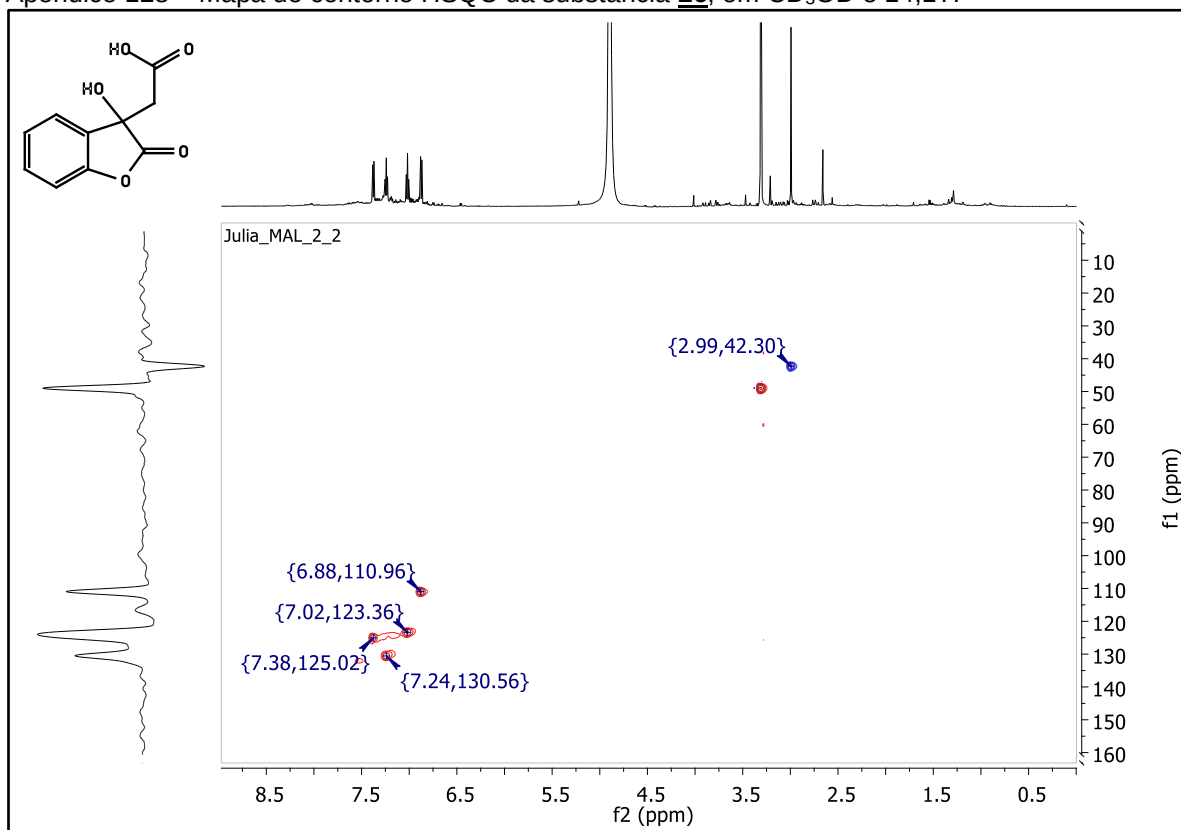
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 126 – Mapa de contorno HMBC da substância **04**, em CD₃OD e 14,1T.

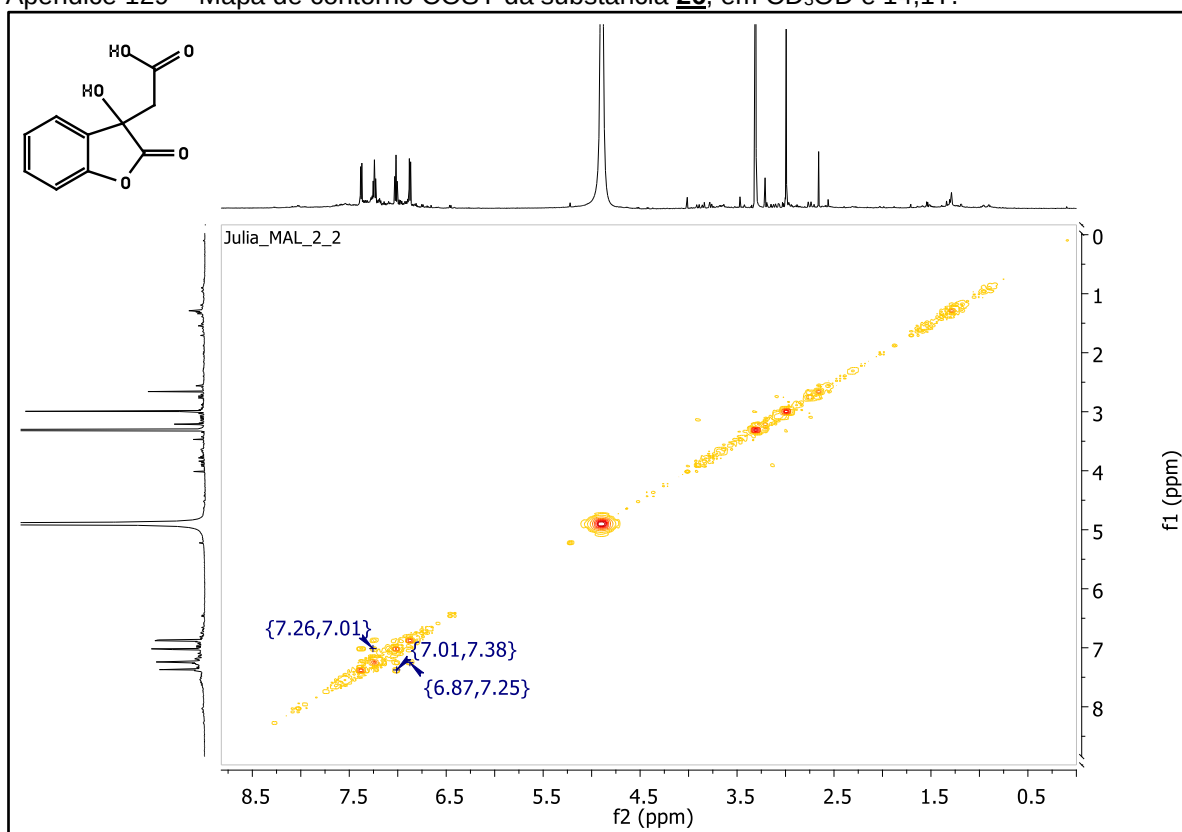
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 127 – Espectro de RMN de ^1H da substância **26**, em CD_3OD e 600 MHz.

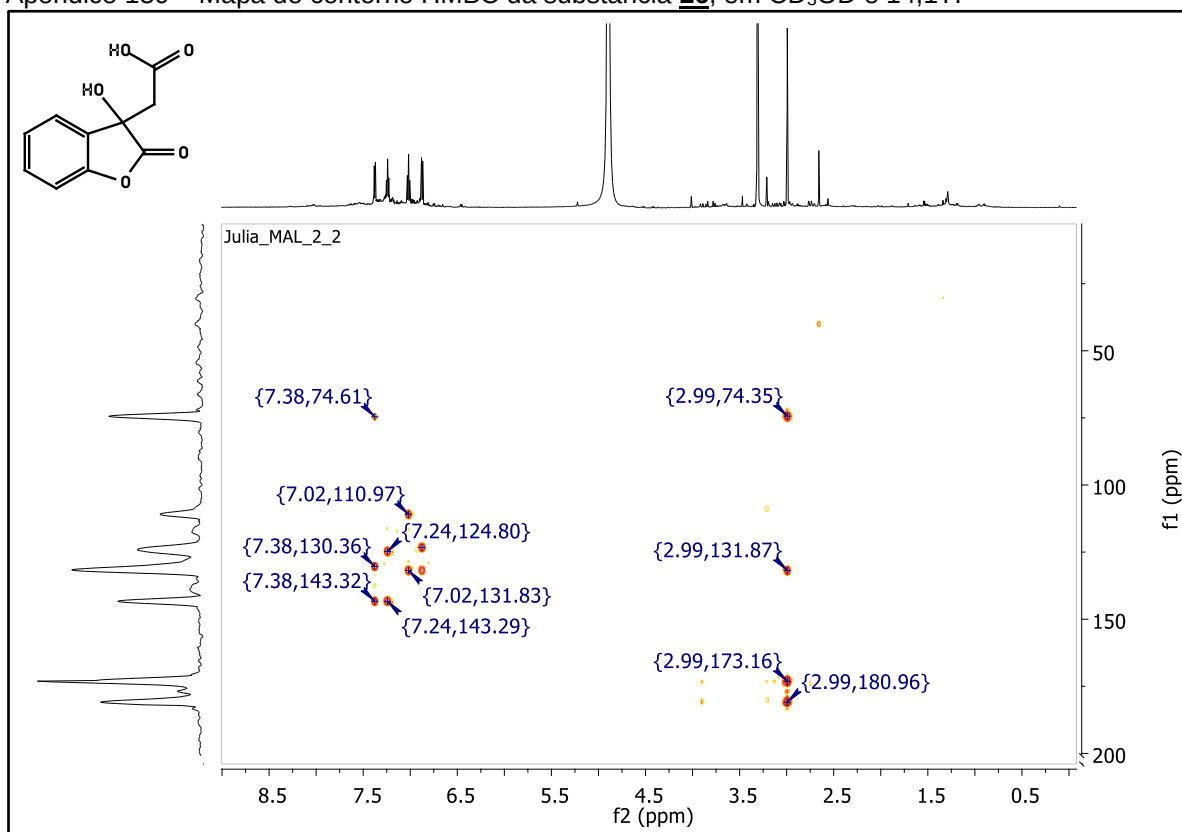
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 128 – Mapa de contorno HSQC da substância **26**, em CD_3OD e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

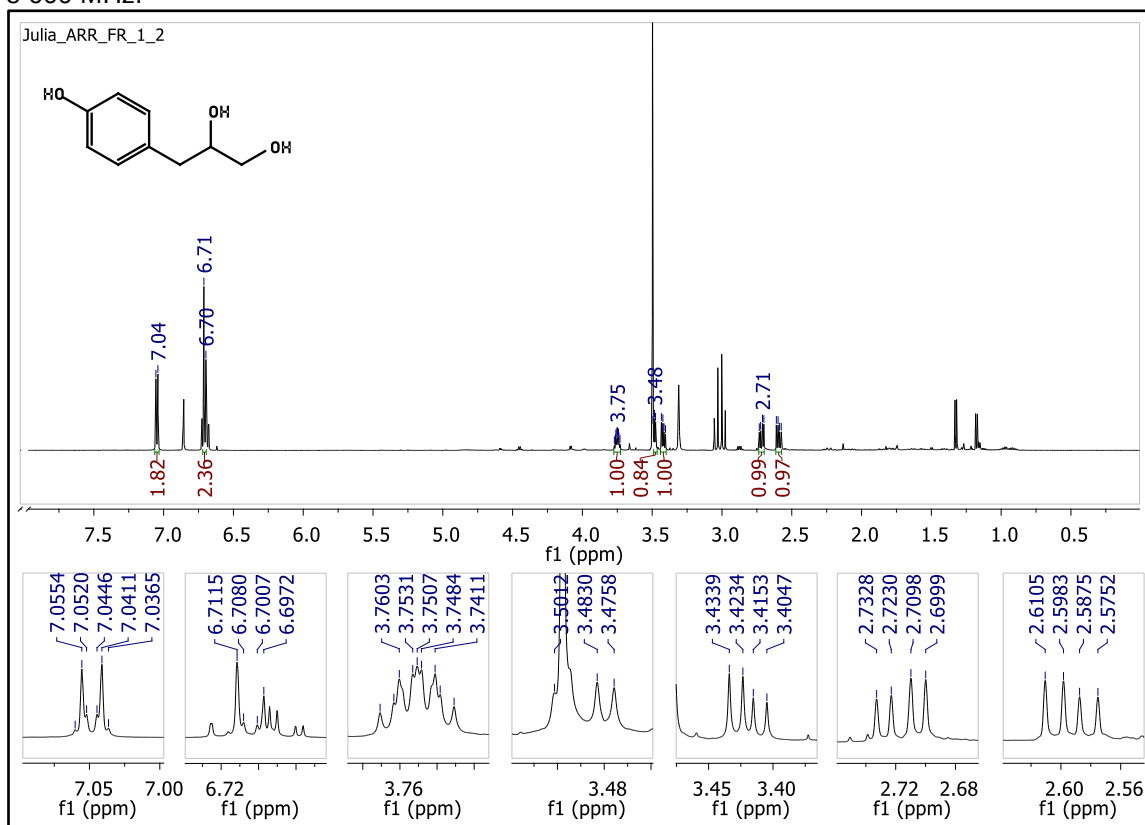
Apêndice 129 – Mapa de contorno COSY da substância **26**, em CD₃OD e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 130 – Mapa de contorno HMBC da substância **26**, em CD₃OD e 14,1T.

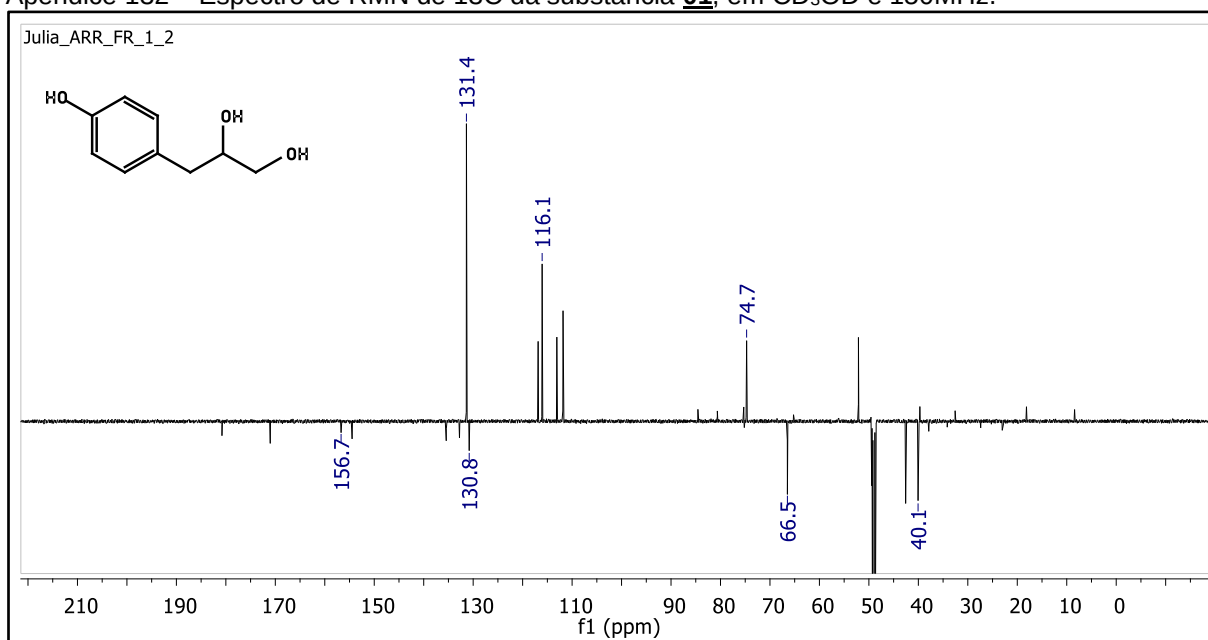
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 131 – Espectro de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, da substância **01**, em CD_3OD e 600 MHz.



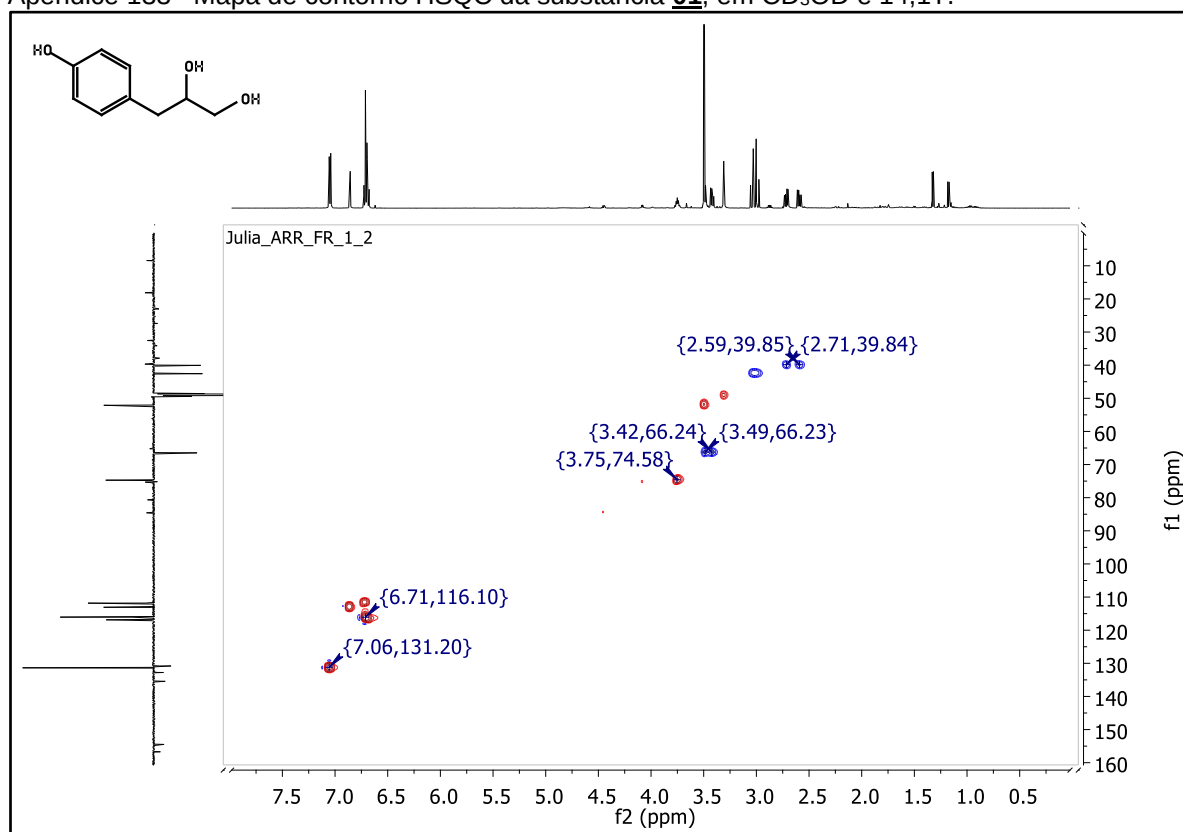
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 132 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **01**, em CD_3OD e 150MHz.



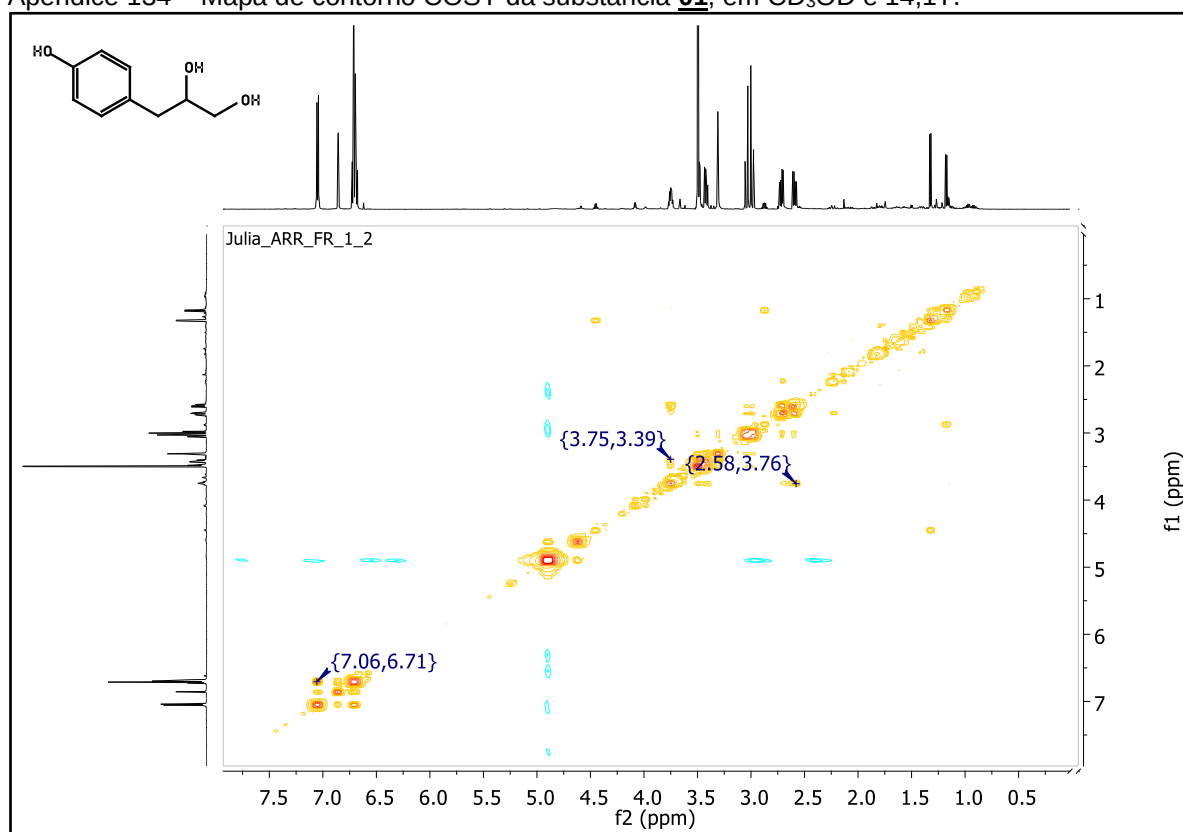
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 133– Mapa de contorno HSQC da substância **01**, em CD₃OD e 14,1T.



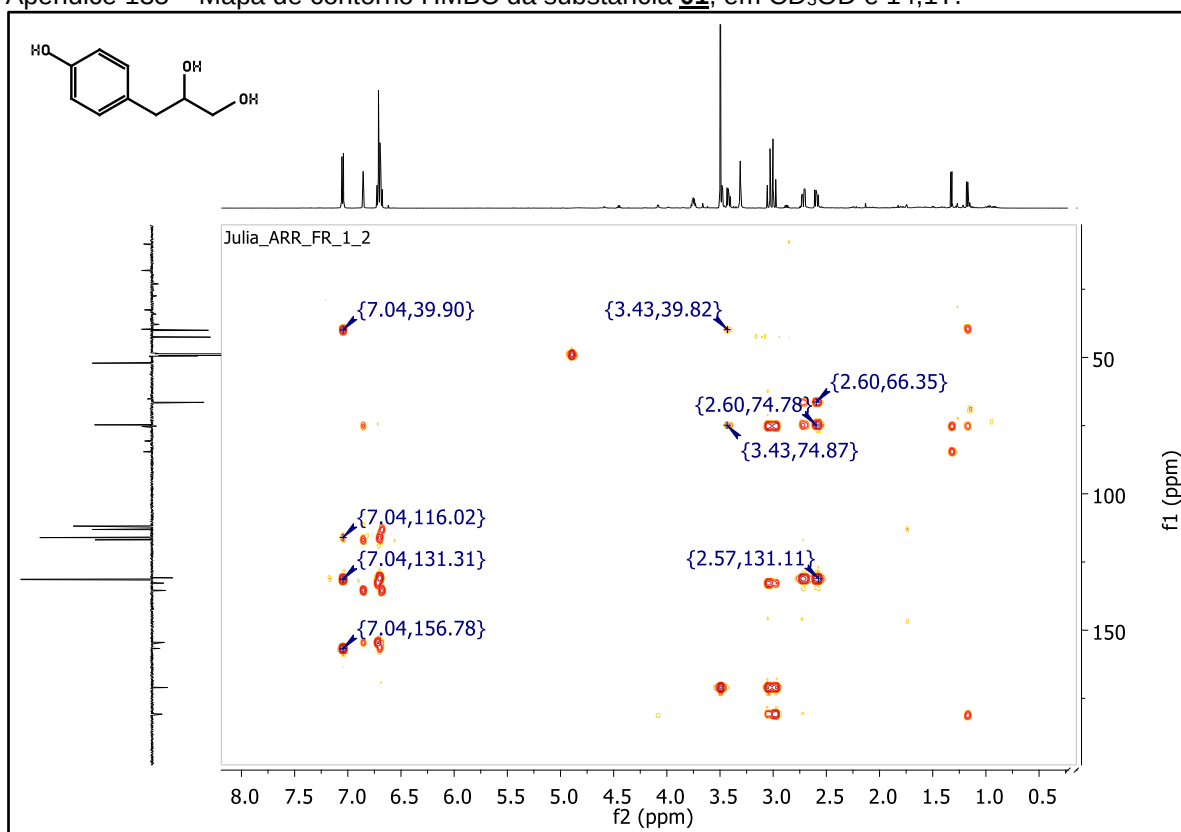
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 134 – Mapa de contorno COSY da substância **01**, em CD₃OD e 14,1T.



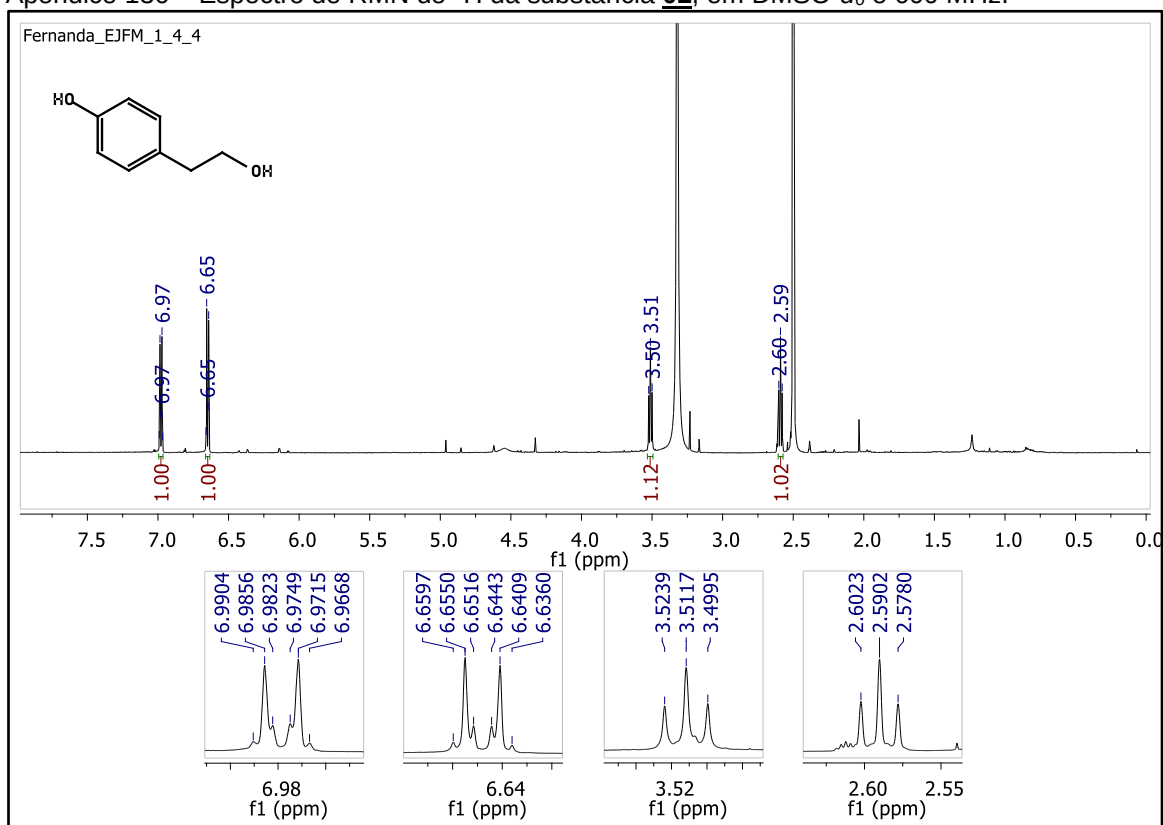
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 135 – Mapa de contorno HMBC da substância **01**, em CD₃OD e 14,1T.

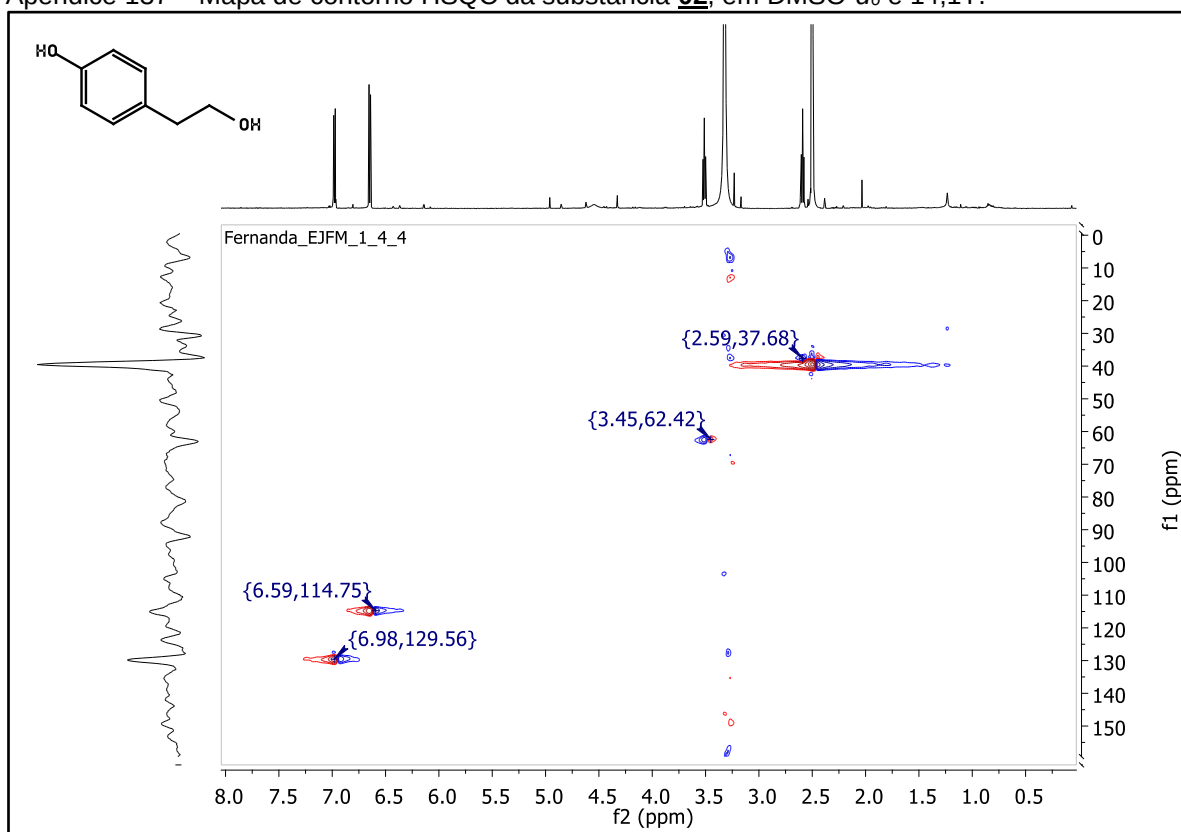


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

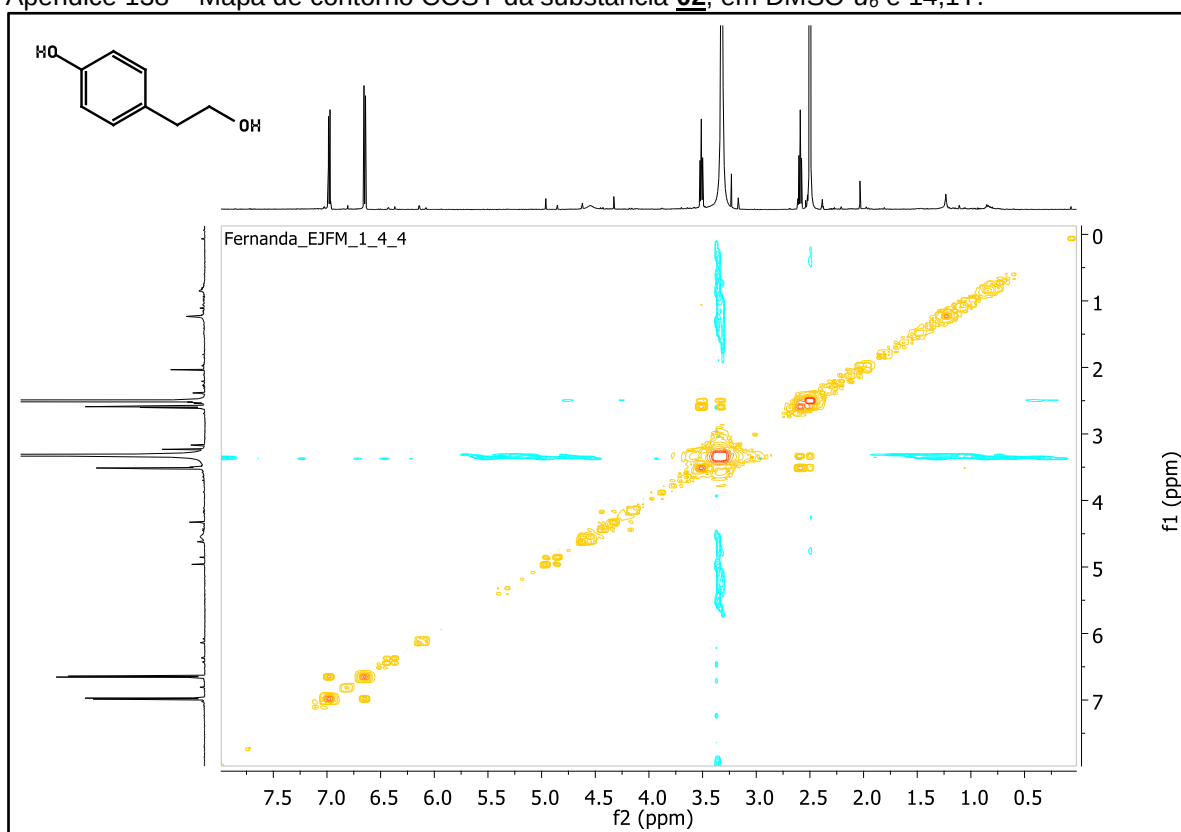
Apêndice 136 – Espectro de RMN de ¹H da substância **02**, em DMSO-*d*₆ e 600 MHz.



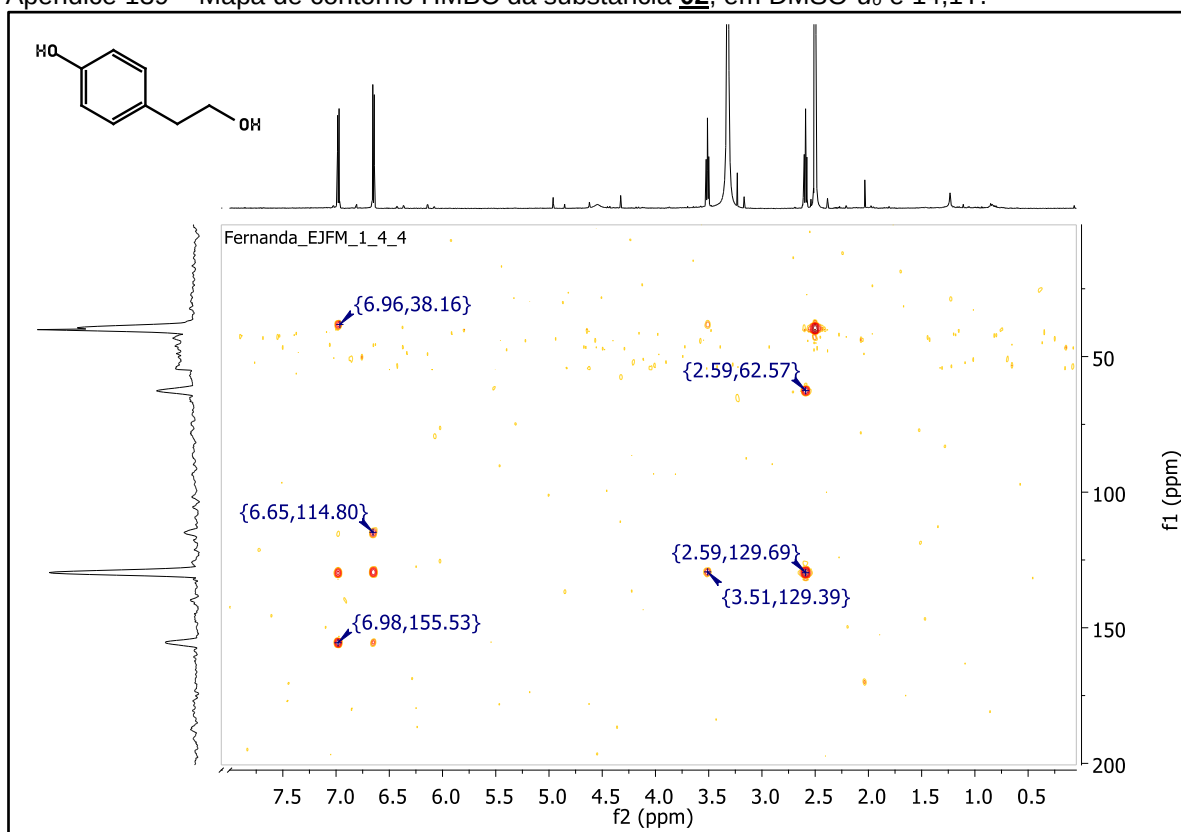
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 137 – Mapa de contorno HSQC da substância **02**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

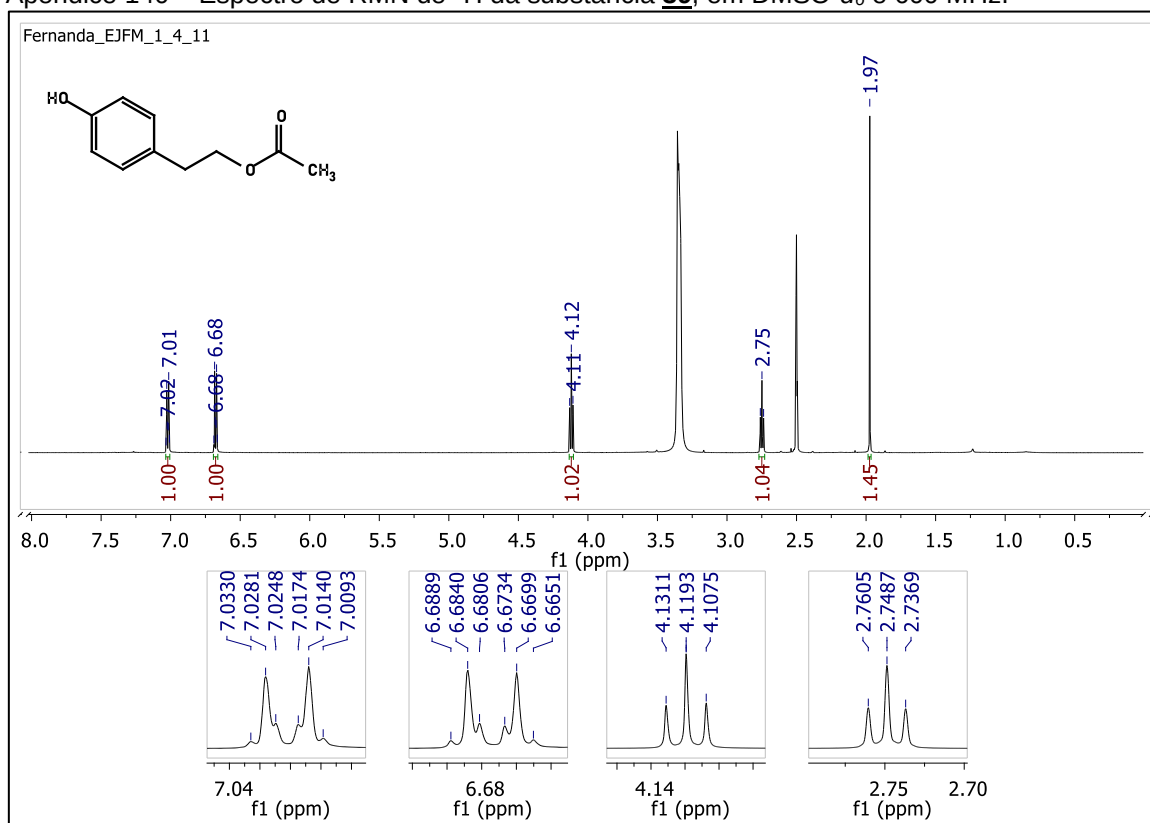
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 138 – Mapa de contorno COSY da substância **02**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

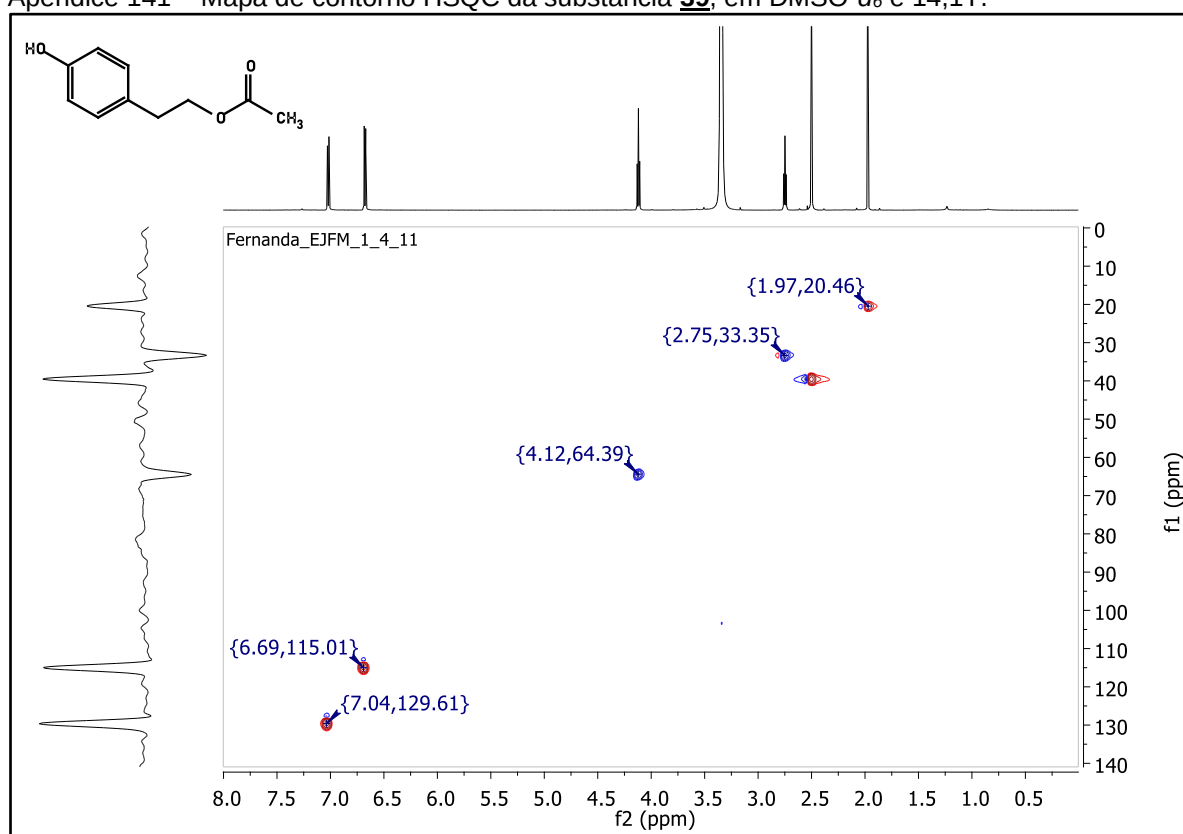
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 139 – Mapa de contorno HMBC da substância **02**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

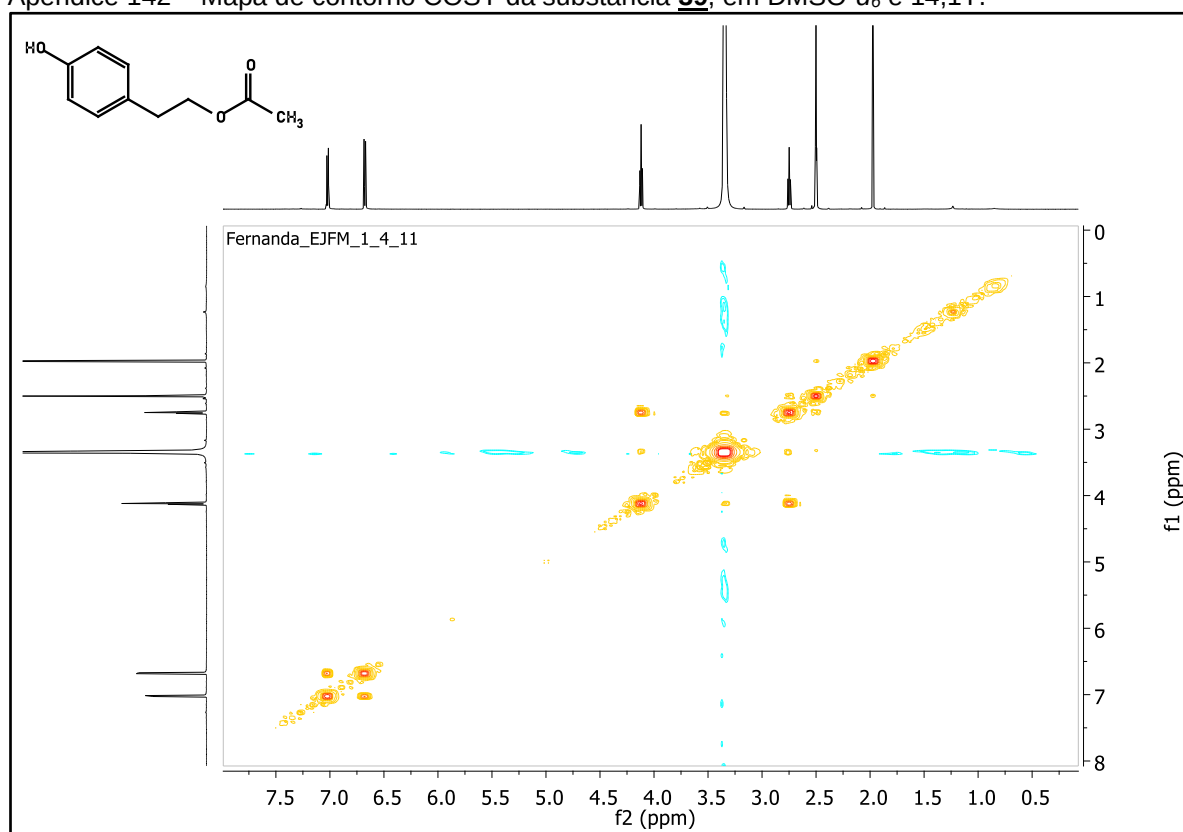
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 140 – Espectro de RMN de ^1H da substância **39**, em DMSO- d_6 e 600 MHz.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

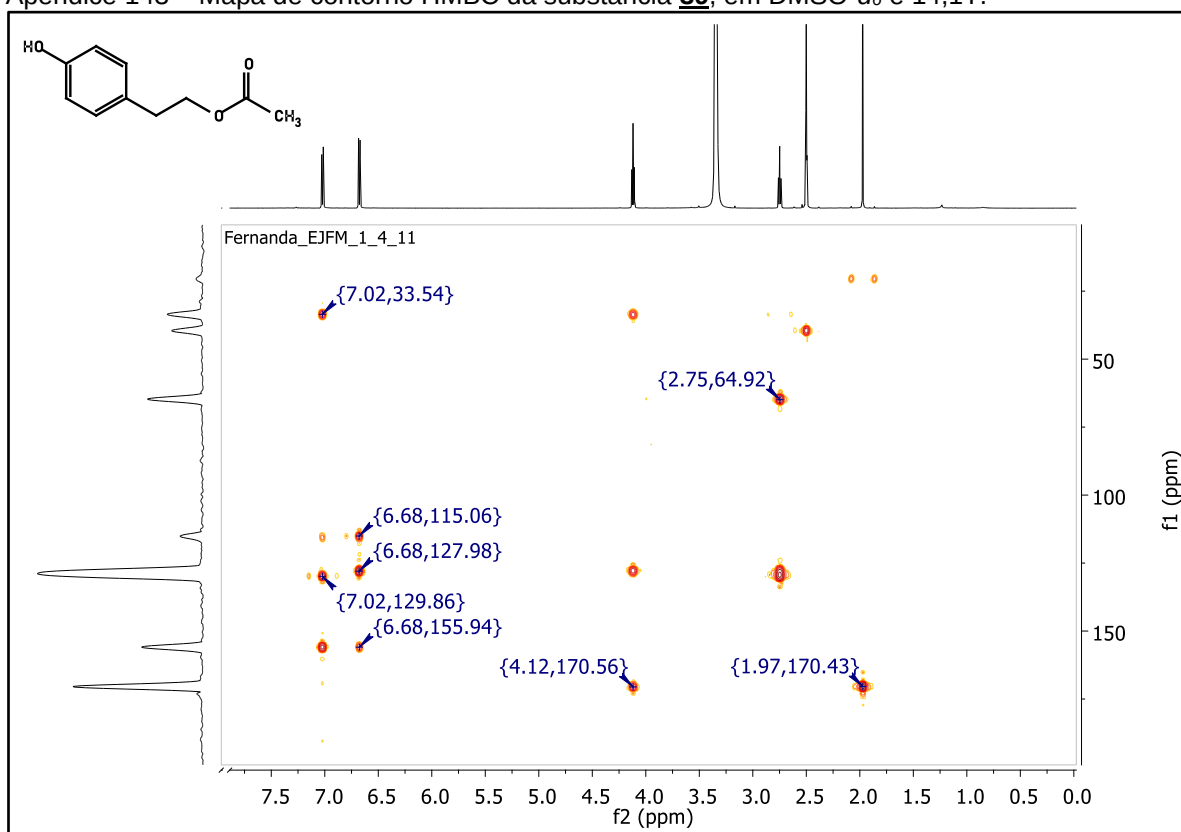
Apêndice 141 – Mapa de contorno HSQC da substância **39**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 142 – Mapa de contorno COSY da substância **39**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

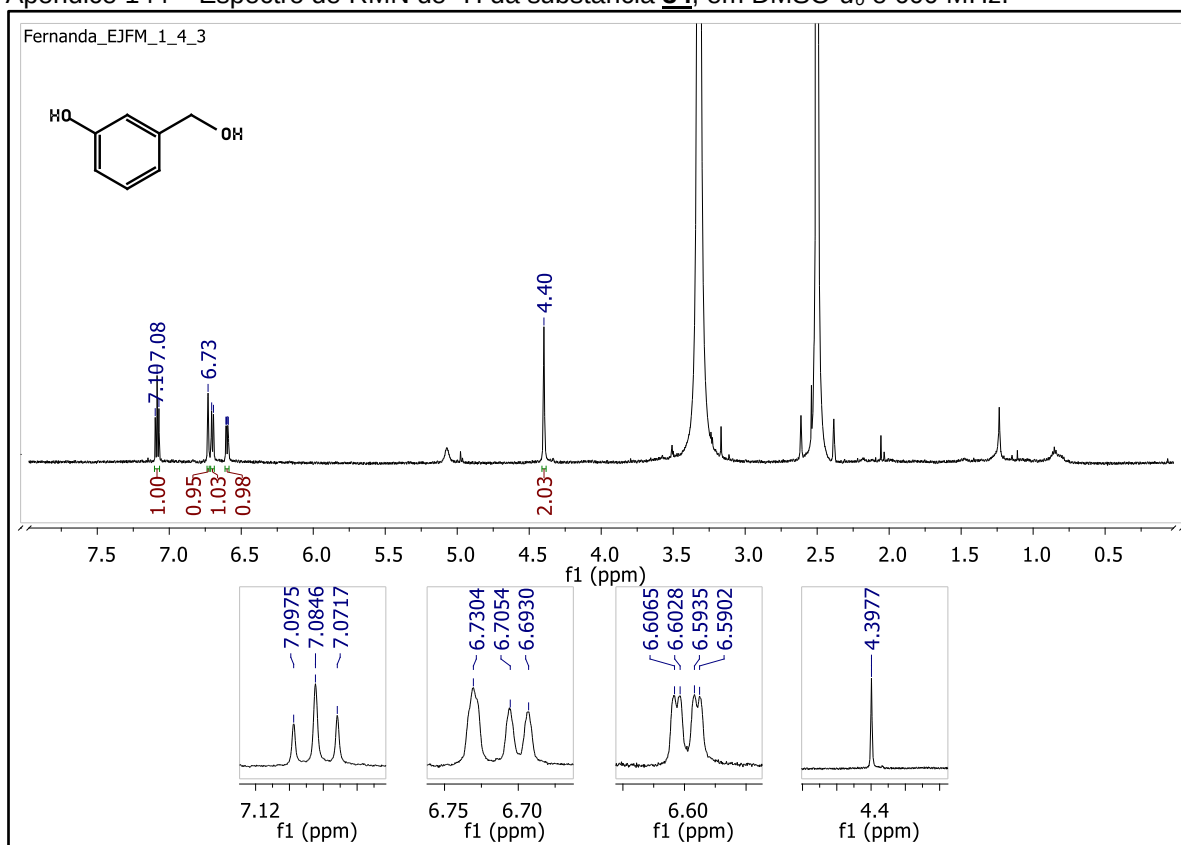
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 143 – Mapa de contorno HMBC da substância **39**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

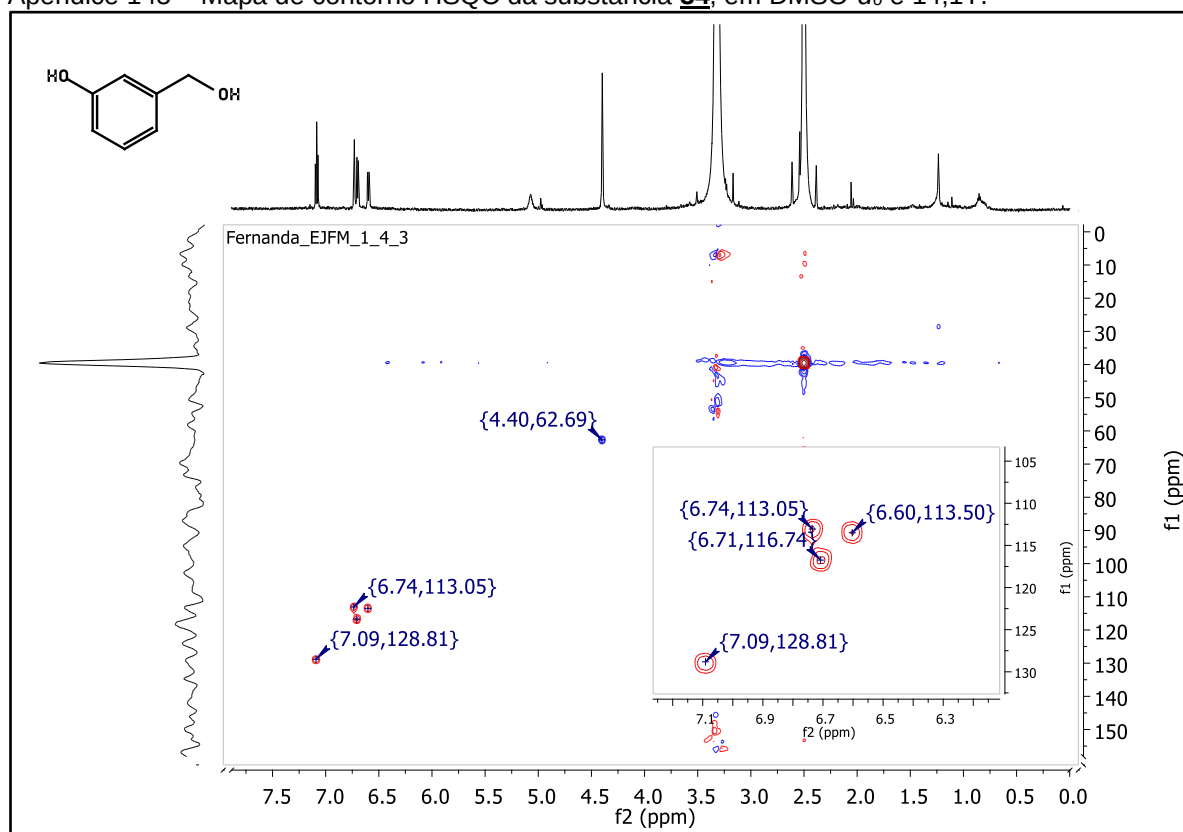


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

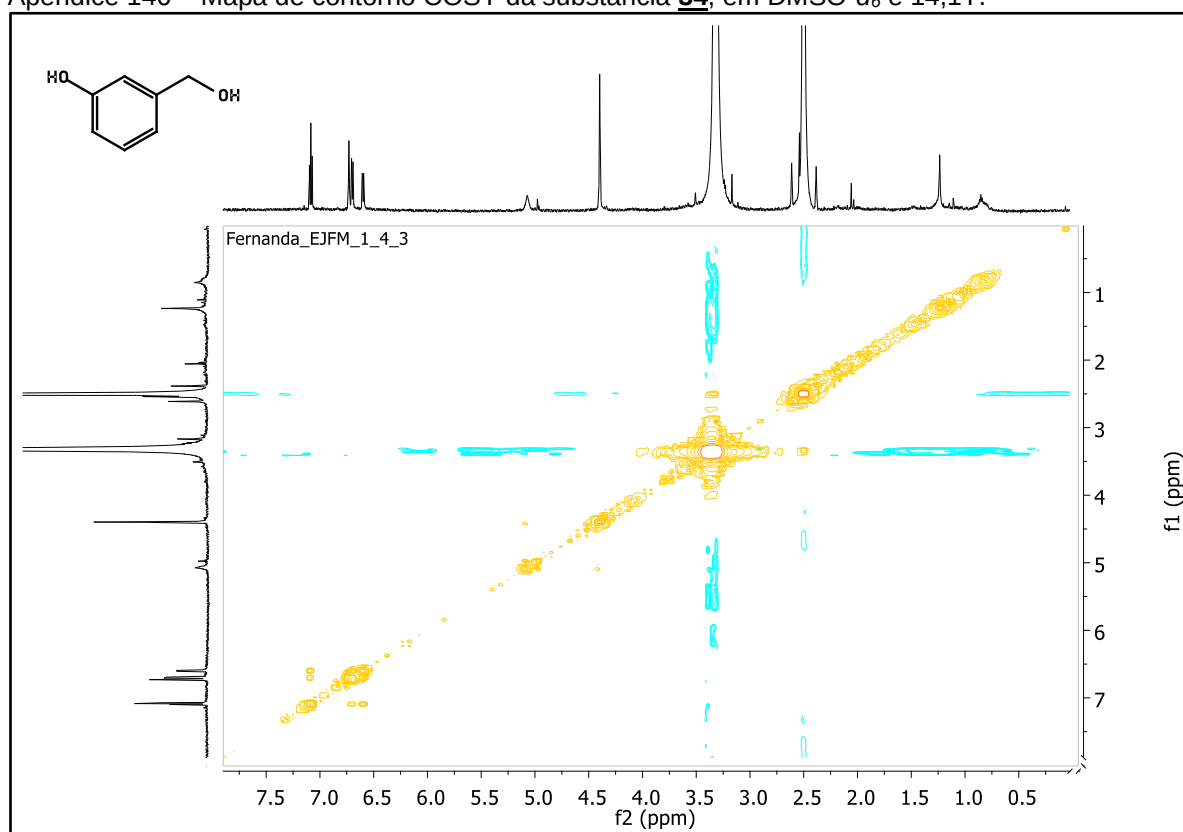
Apêndice 144 – Espectro de RMN de ^1H da substância **34**, em DMSO- d_6 e 600 MHz.



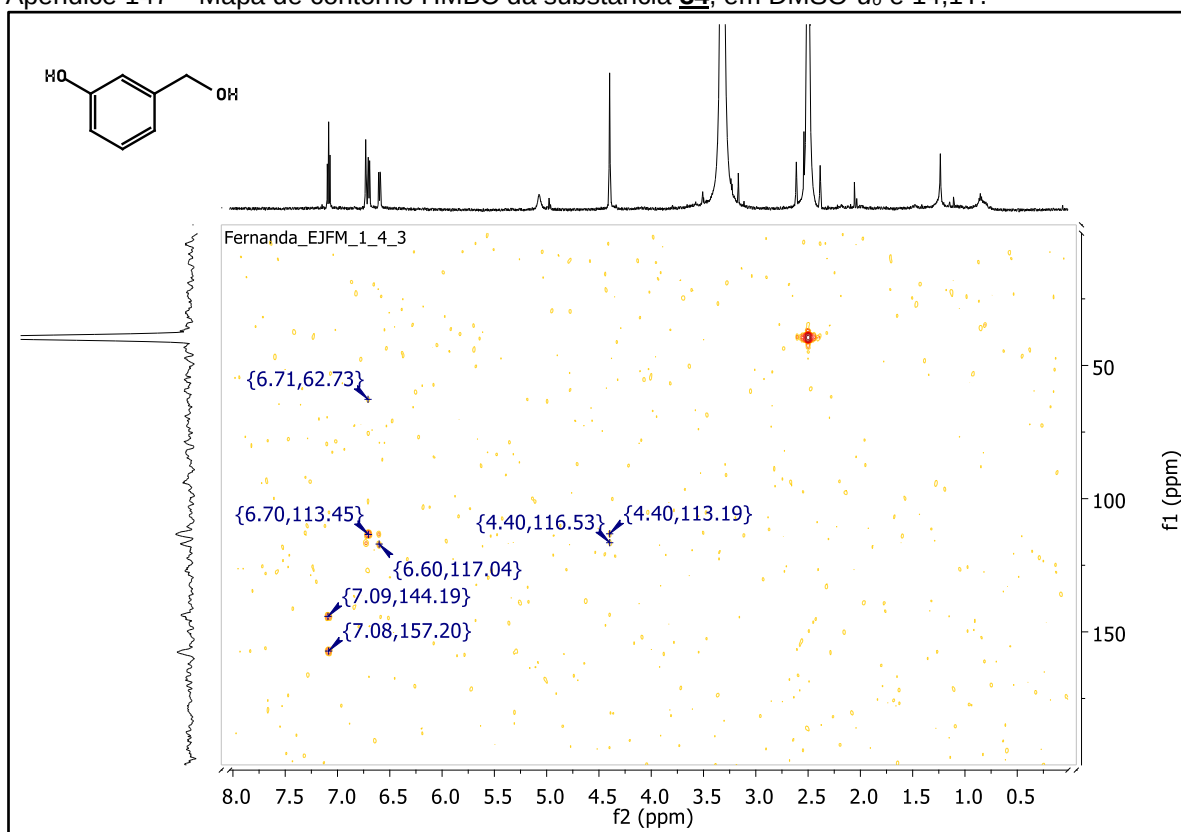
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 145 – Mapa de contorno HSQC da substância **34**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

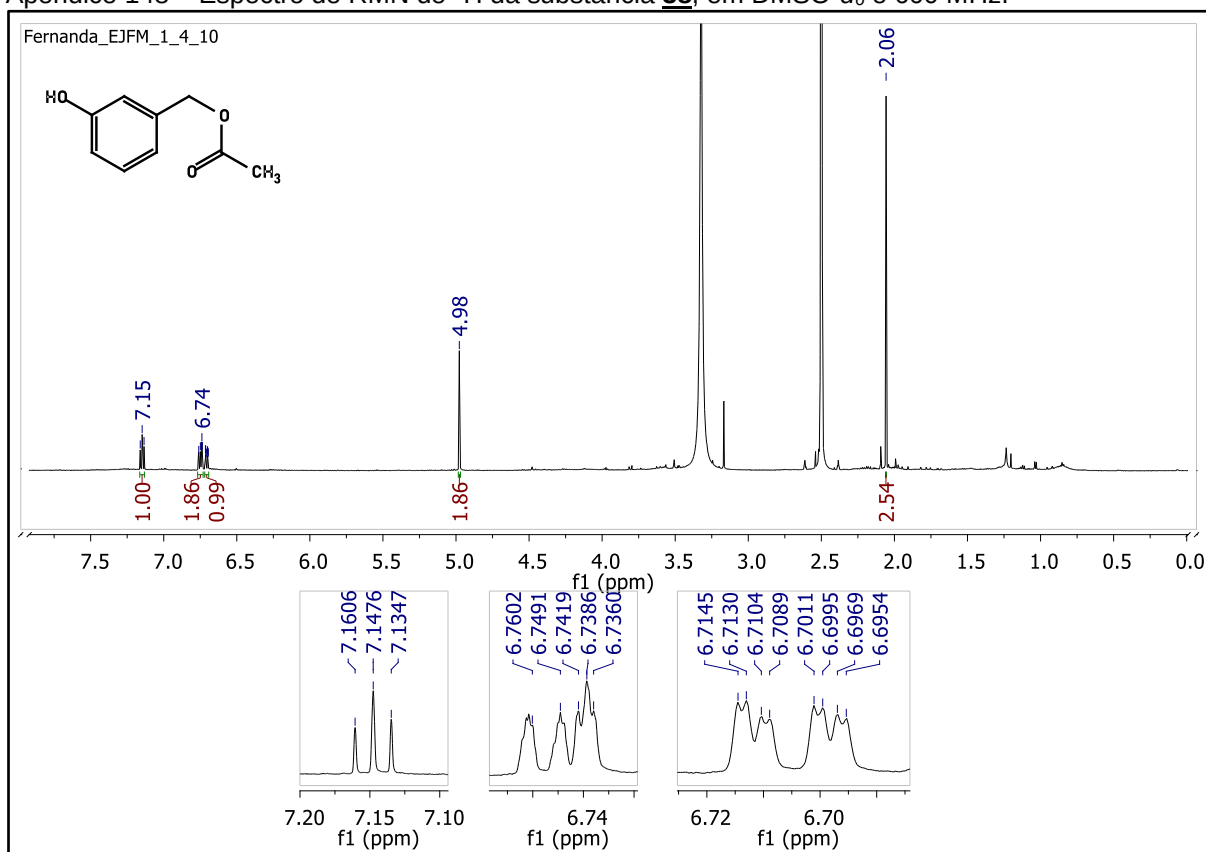
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 146 – Mapa de contorno COSY da substância **34**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

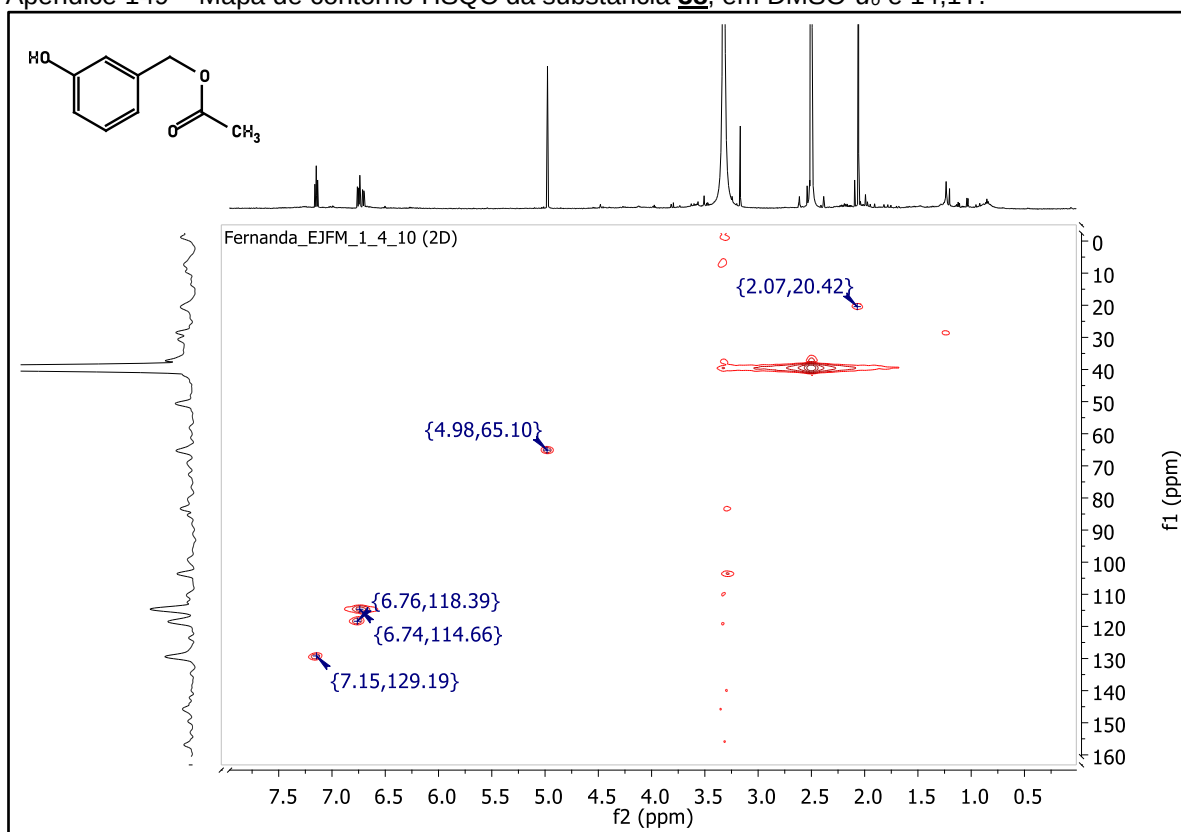
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 147 – Mapa de contorno HMBC da substância **34**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

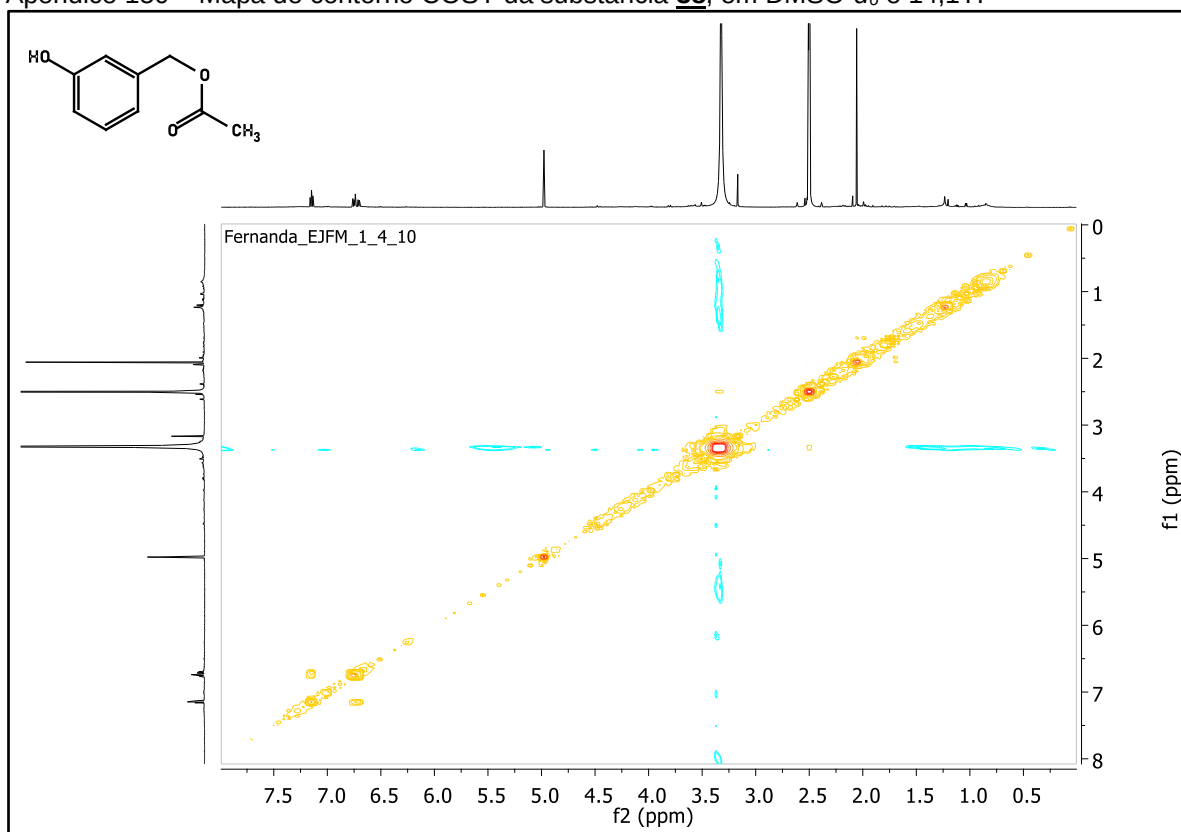
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 148 – Espectro de RMN de ^1H da substância **38**, em DMSO- d_6 e 600 MHz.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

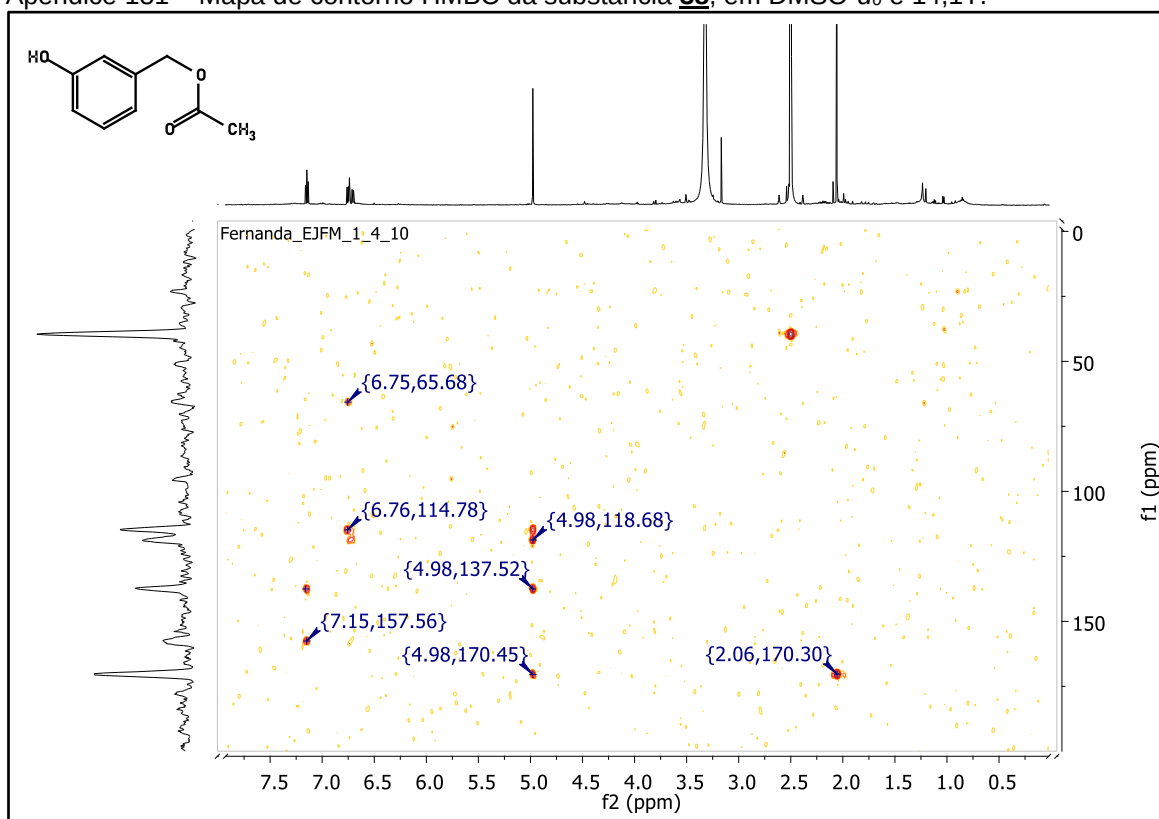
Apêndice 149 – Mapa de contorno HSQC da substância **38**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 150 – Mapa de contorno COSY da substância **38**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

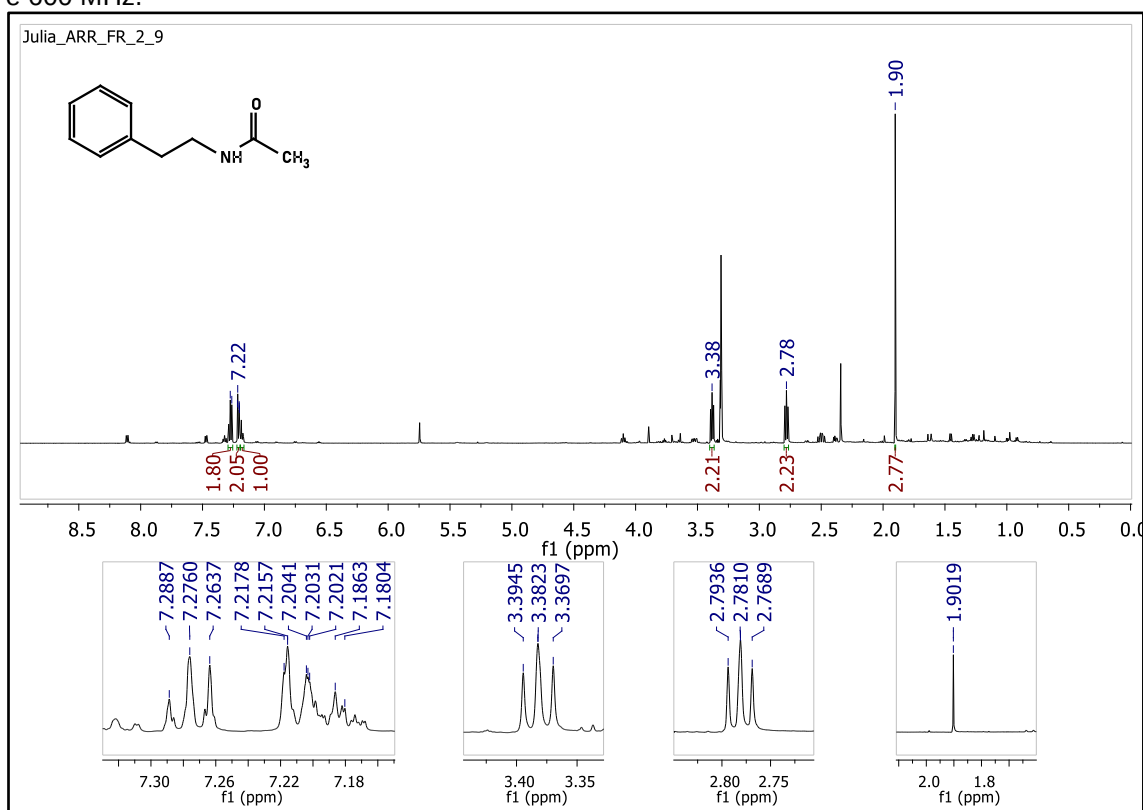
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 151 – Mapa de contorno HMBC da substância **38**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

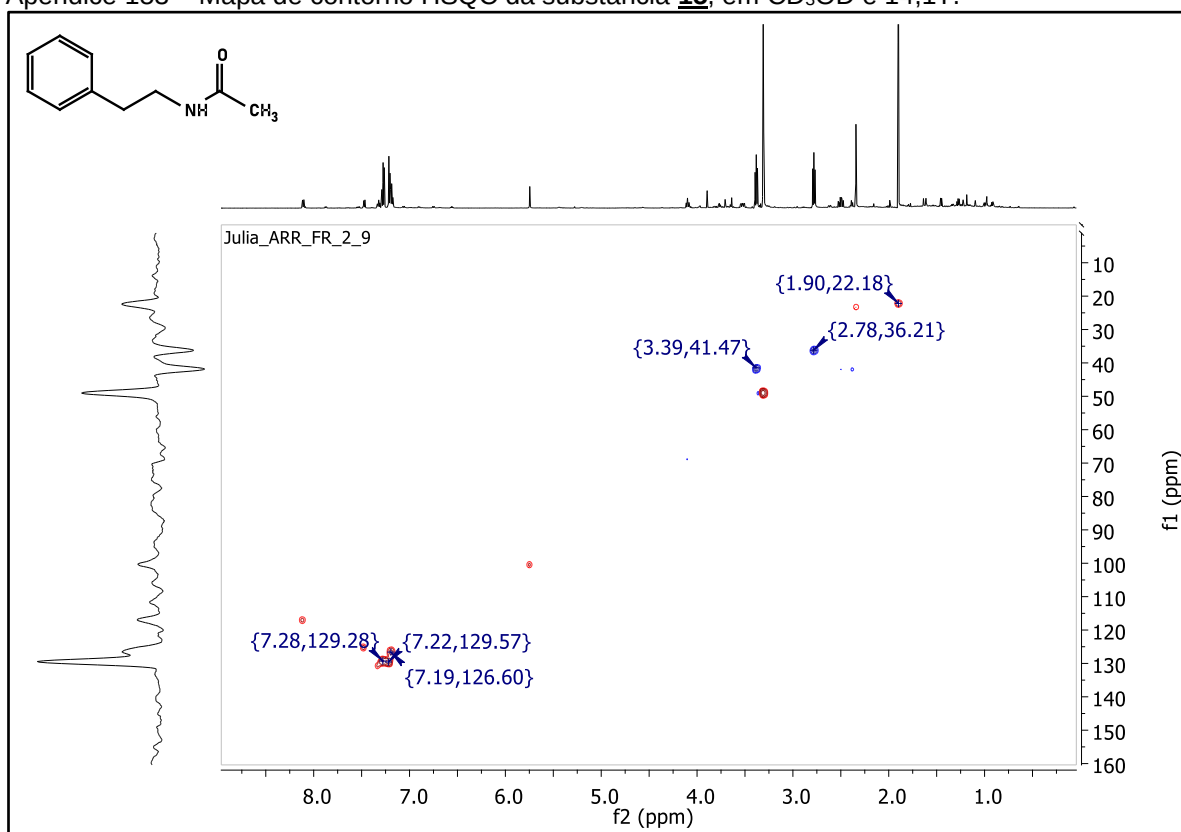


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

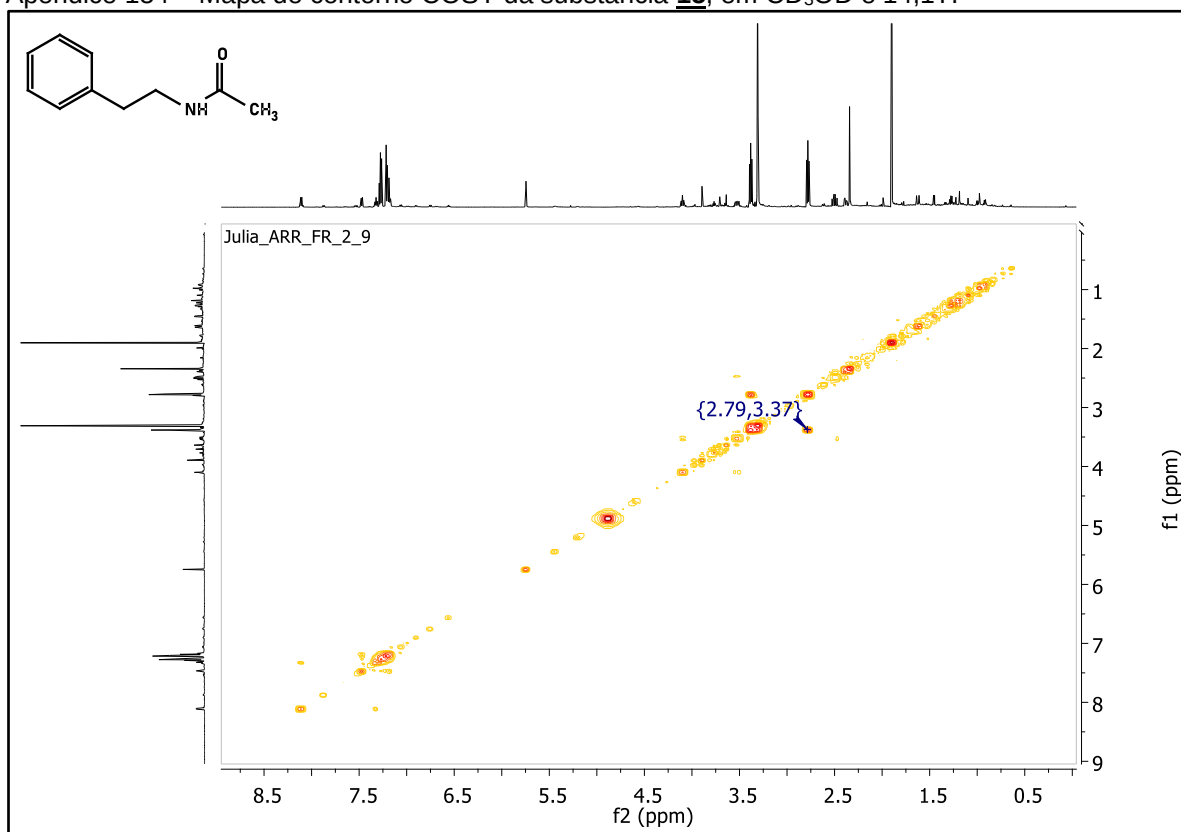
Apêndice 152 – Espectro de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, da substância **15**, em CD_3OD e 600 MHz.



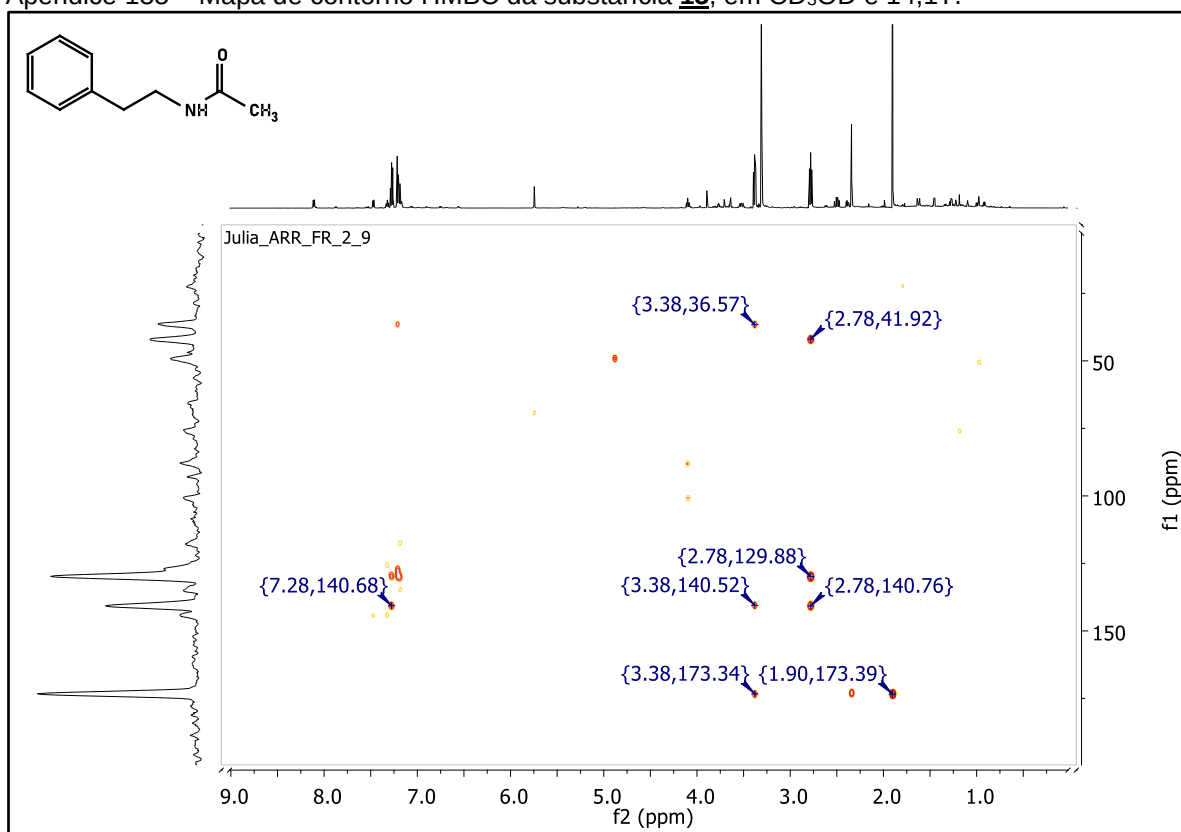
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 153 – Mapa de contorno HSQC da substância **15**, em CD₃OD e 14,1T.

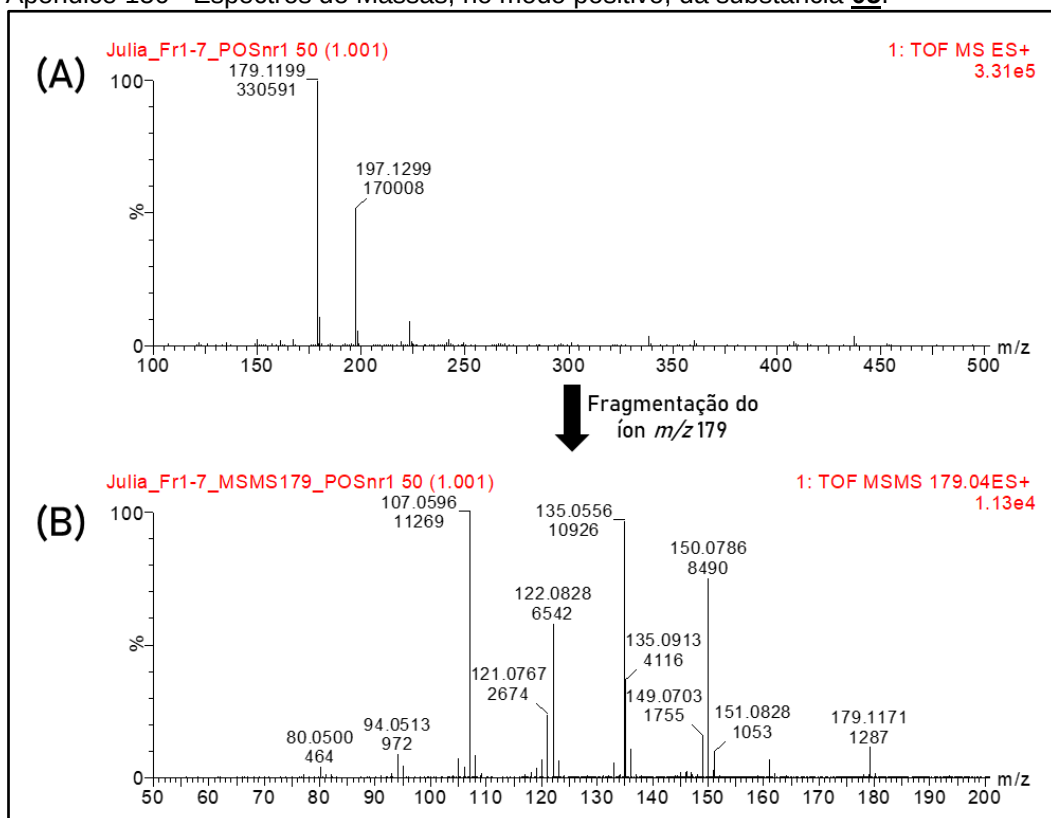
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 154 – Mapa de contorno COSY da substância **15**, em CD₃OD e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

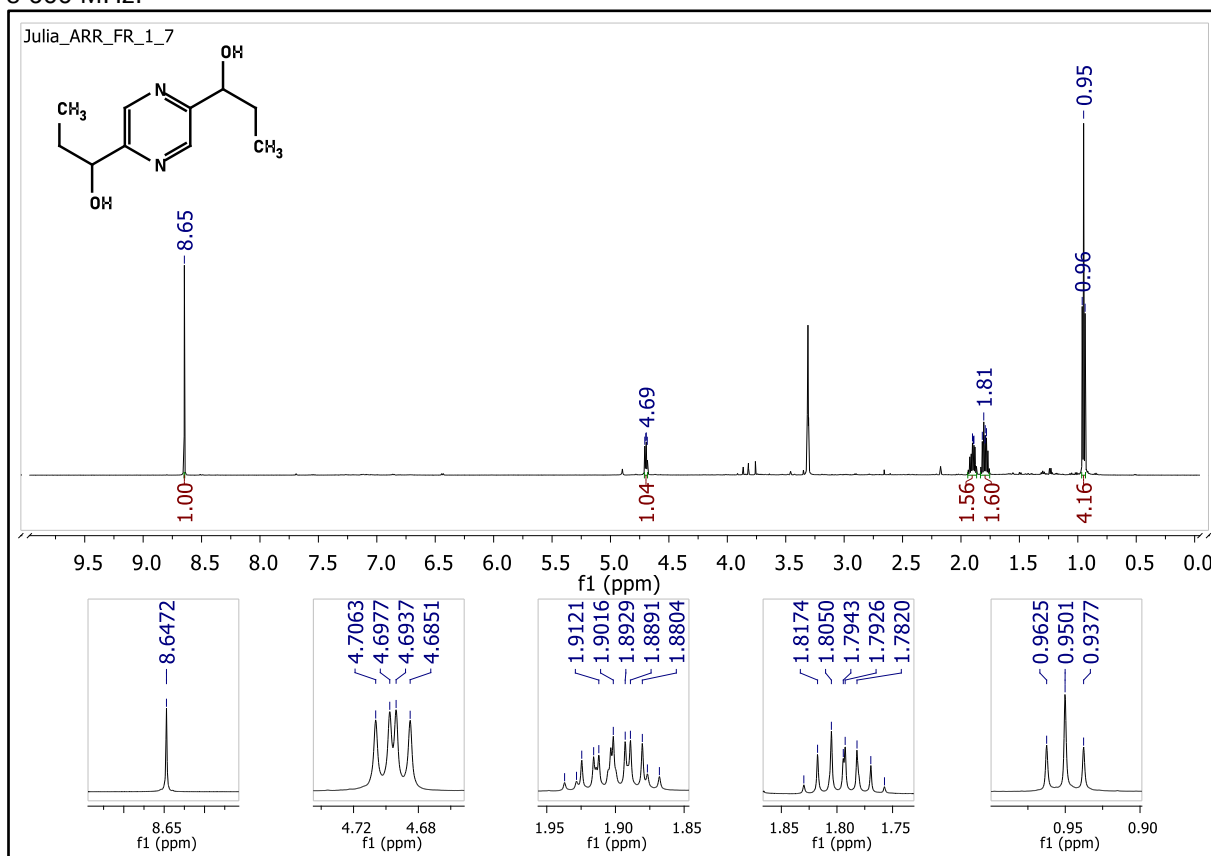
Apêndice 155 – Mapa de contorno HMBC da substância **15**, em CD₃OD e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 156 - Espectros de Massas, no modo positivo, da substância **05**.

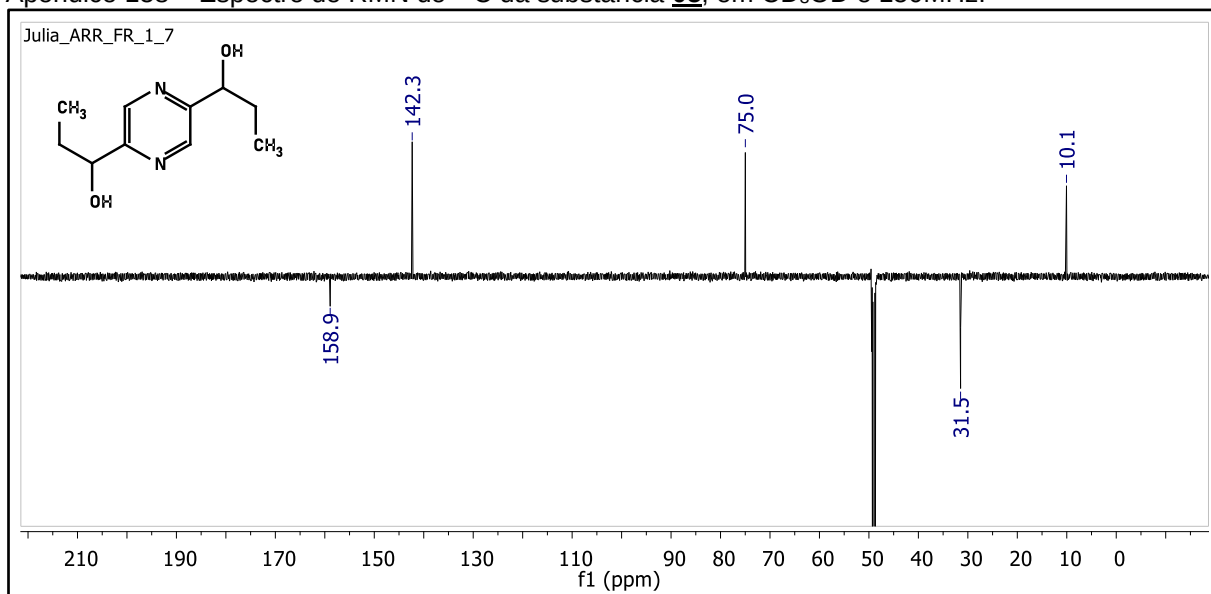
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 157 – Espectro de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, da substância **05**, em CD_3OD e 600 MHz.

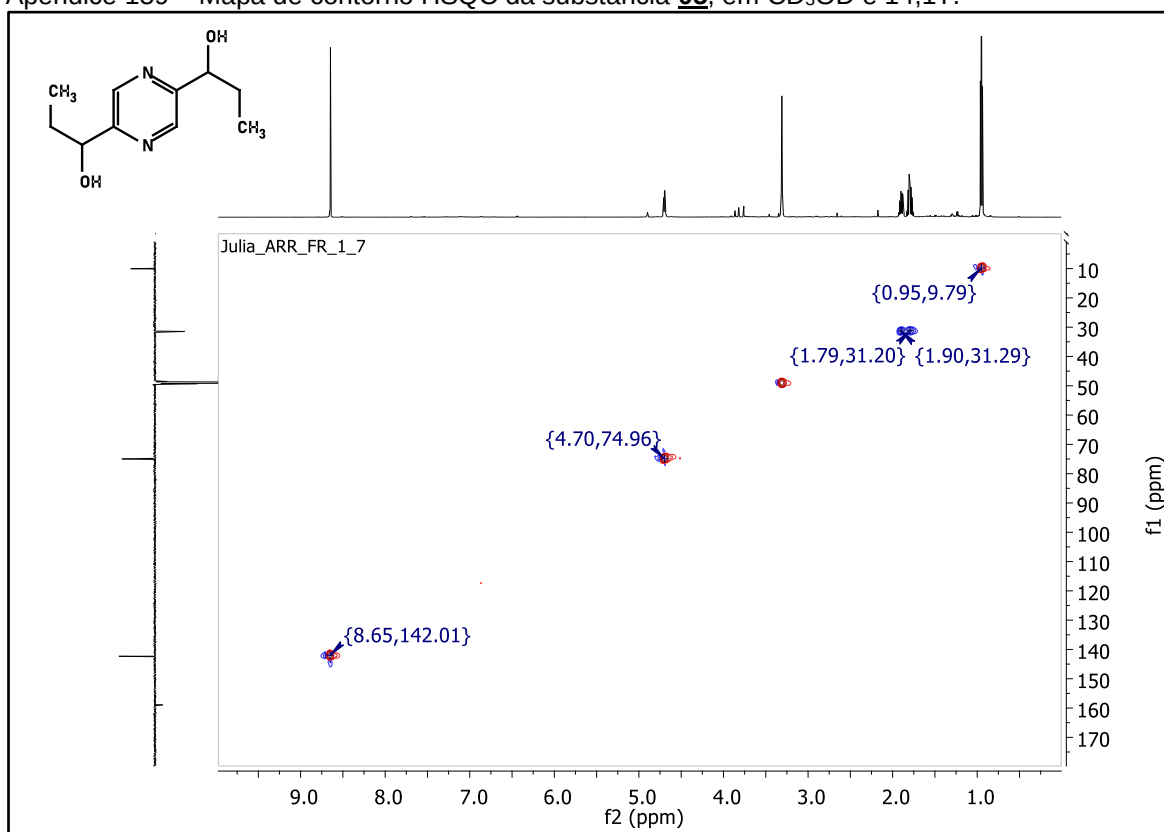


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

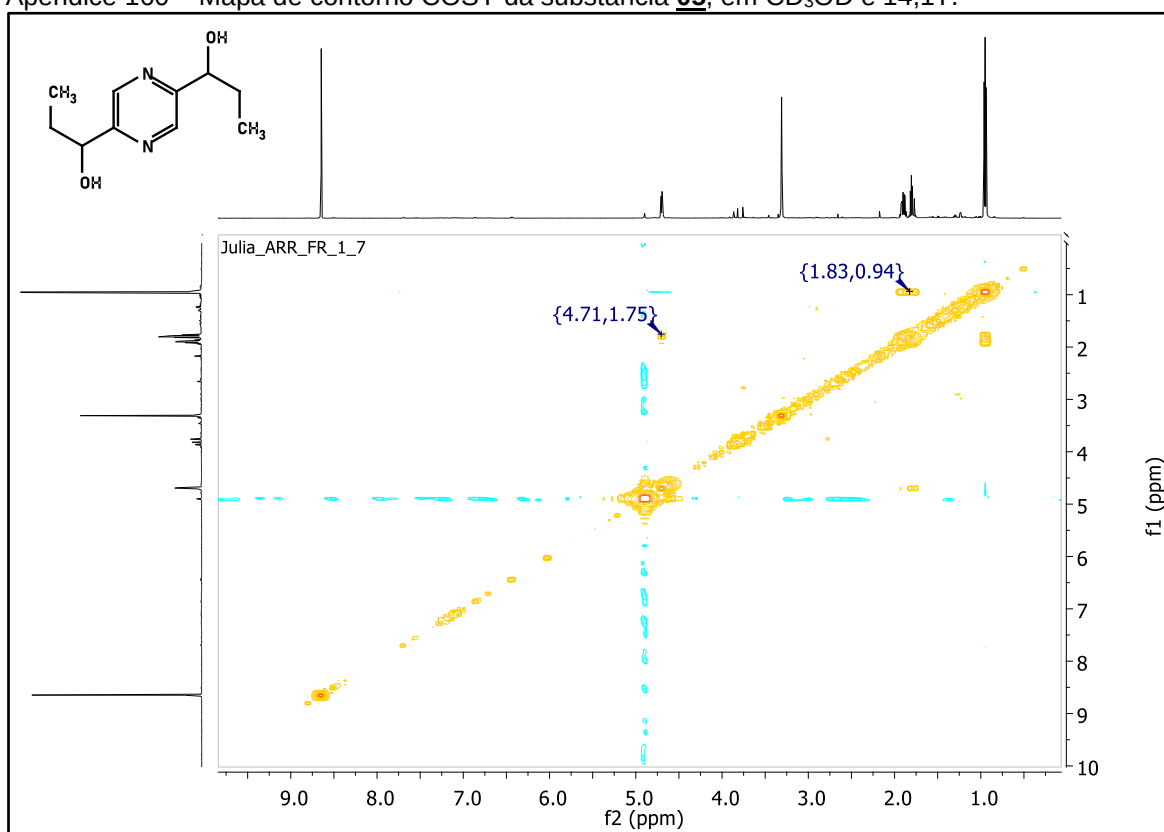
Apêndice 158 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **05**, em CD_3OD e 150MHz.



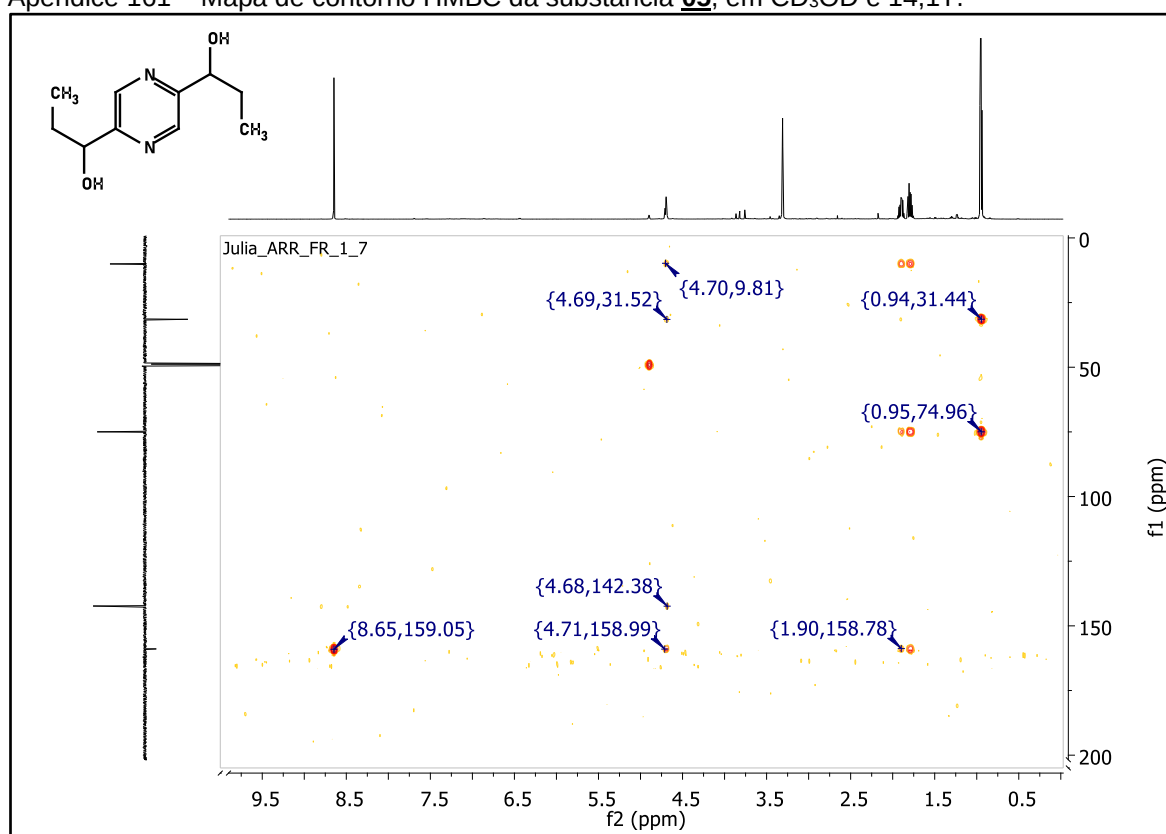
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 159 – Mapa de contorno HSQC da substância **05**, em CD₃OD e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

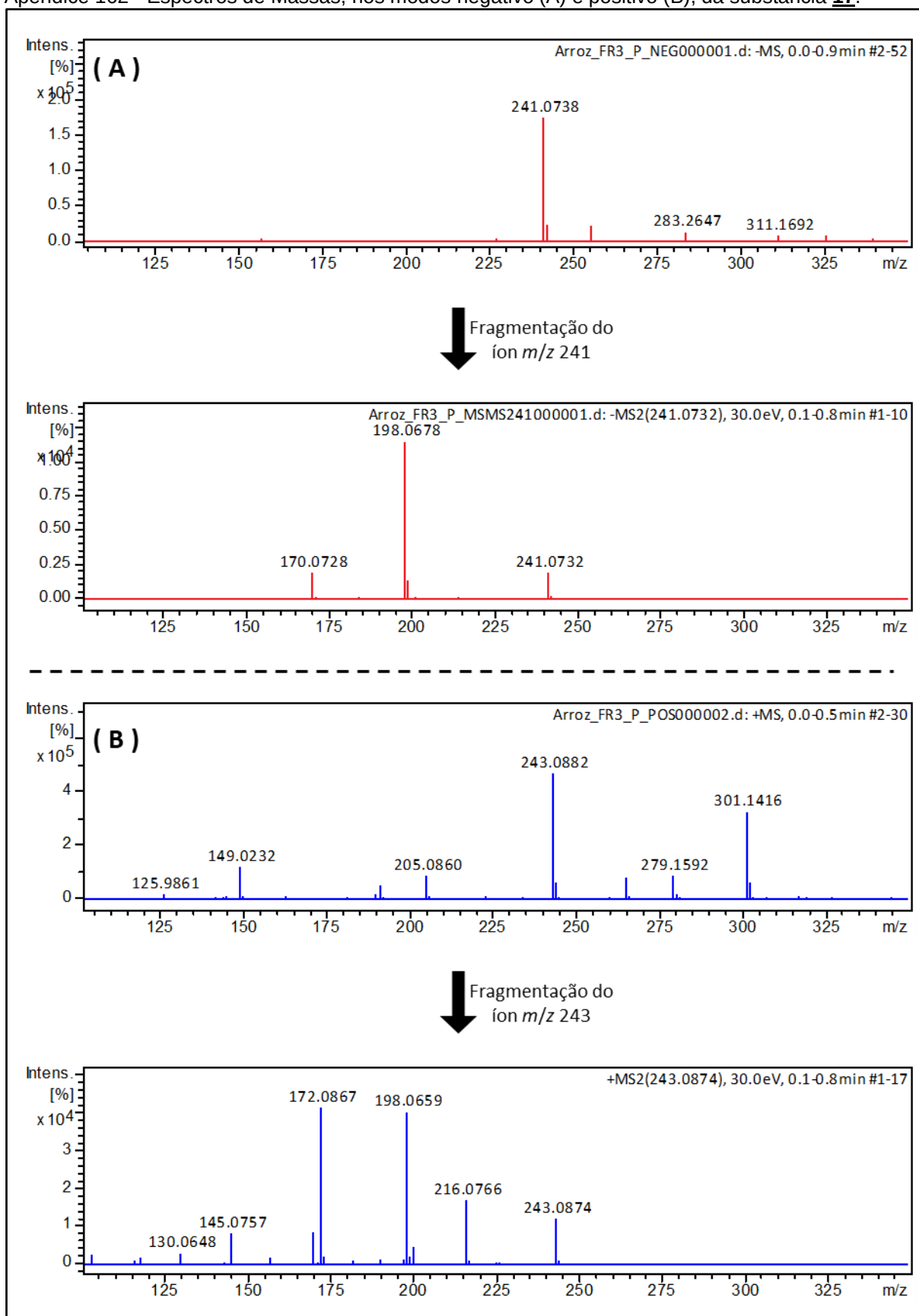
Apêndice 160 – Mapa de contorno COSY da substância **05**, em CD₃OD e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

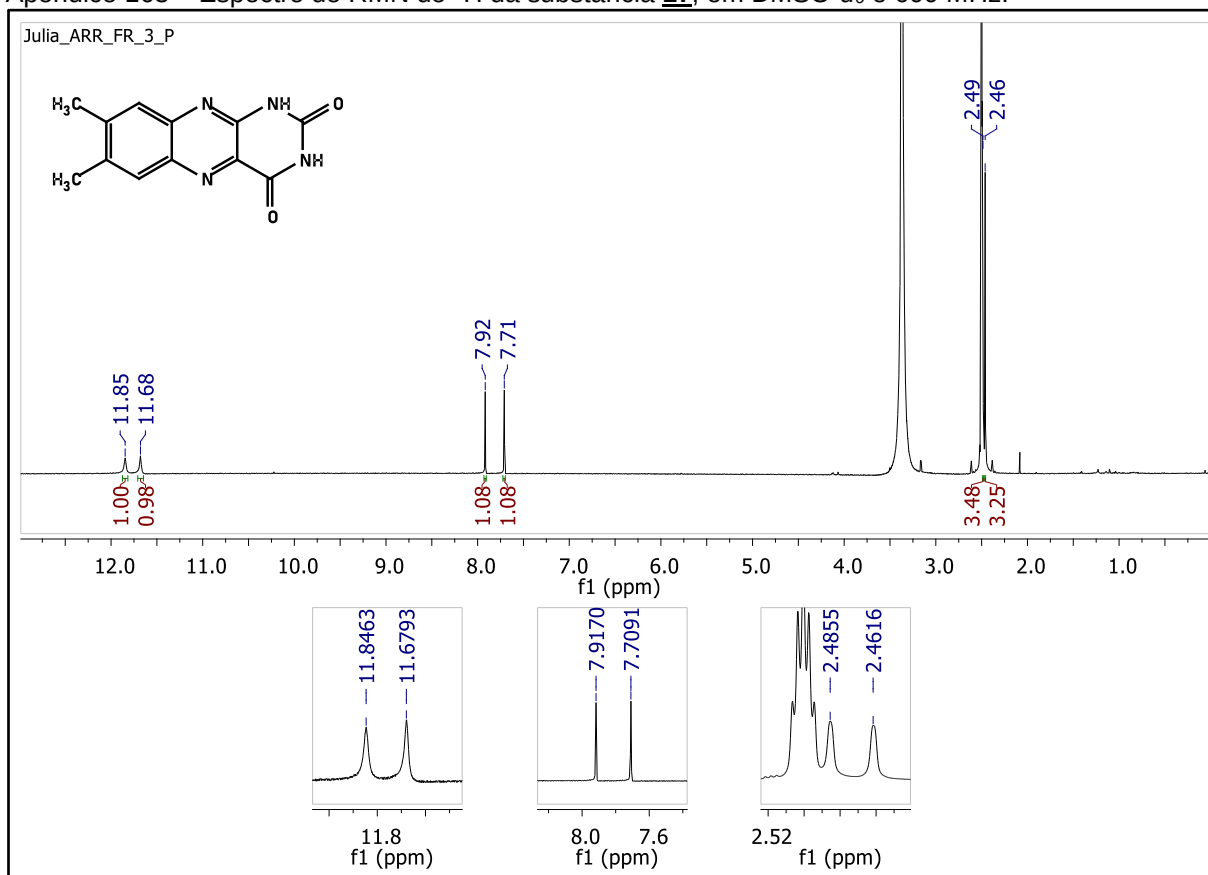
Apêndice 161 – Mapa de contorno HMBC da substância **05**, em CD₃OD e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

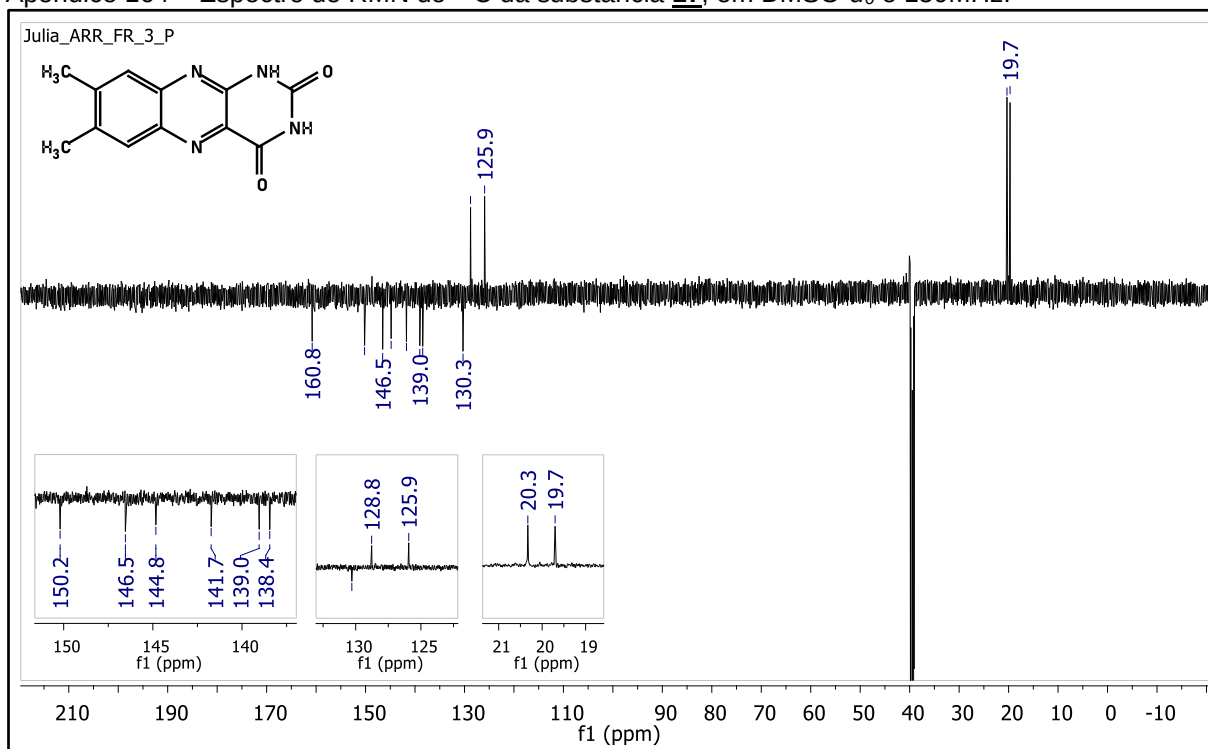
Apêndice 162 - Espectros de Massas, nos modos negativo (A) e positivo (B), da substância **17**.



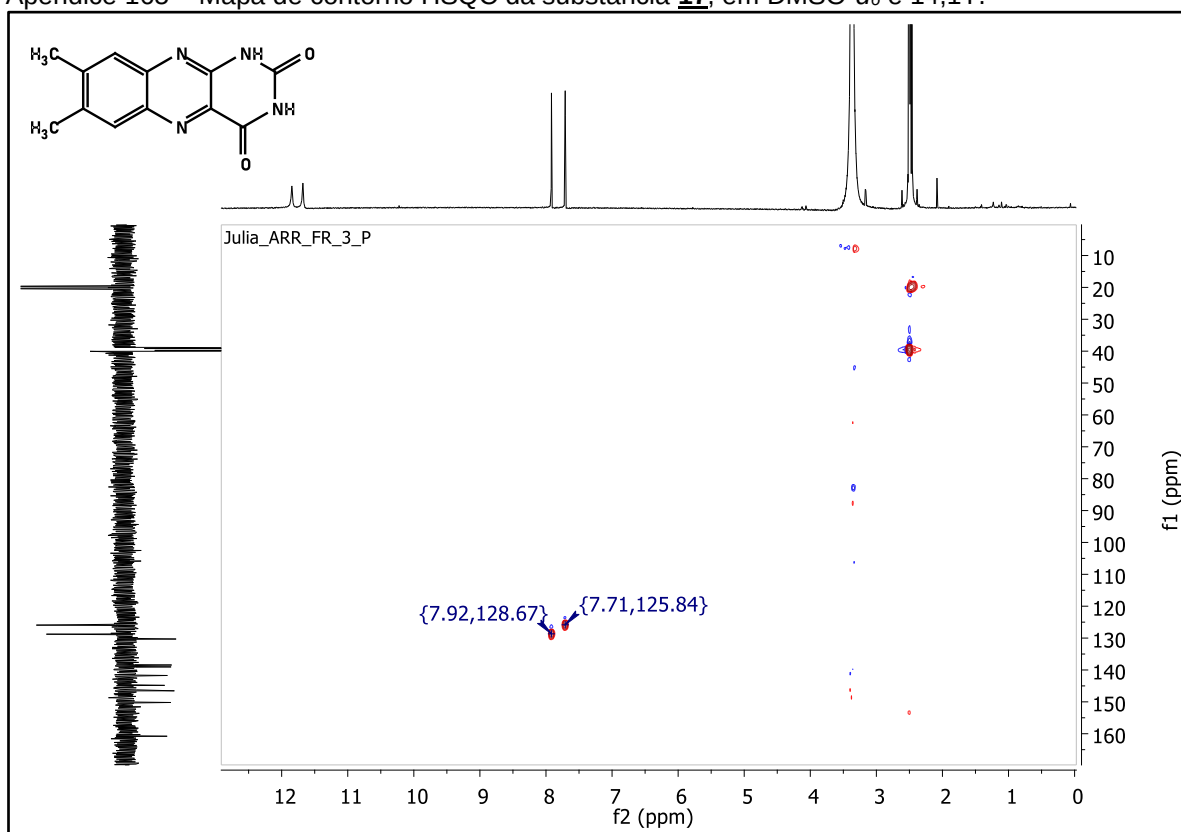
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 163 – Espectro de RMN de ^1H da substância **17**, em $\text{DMSO-}d_6$ e 600 MHz.

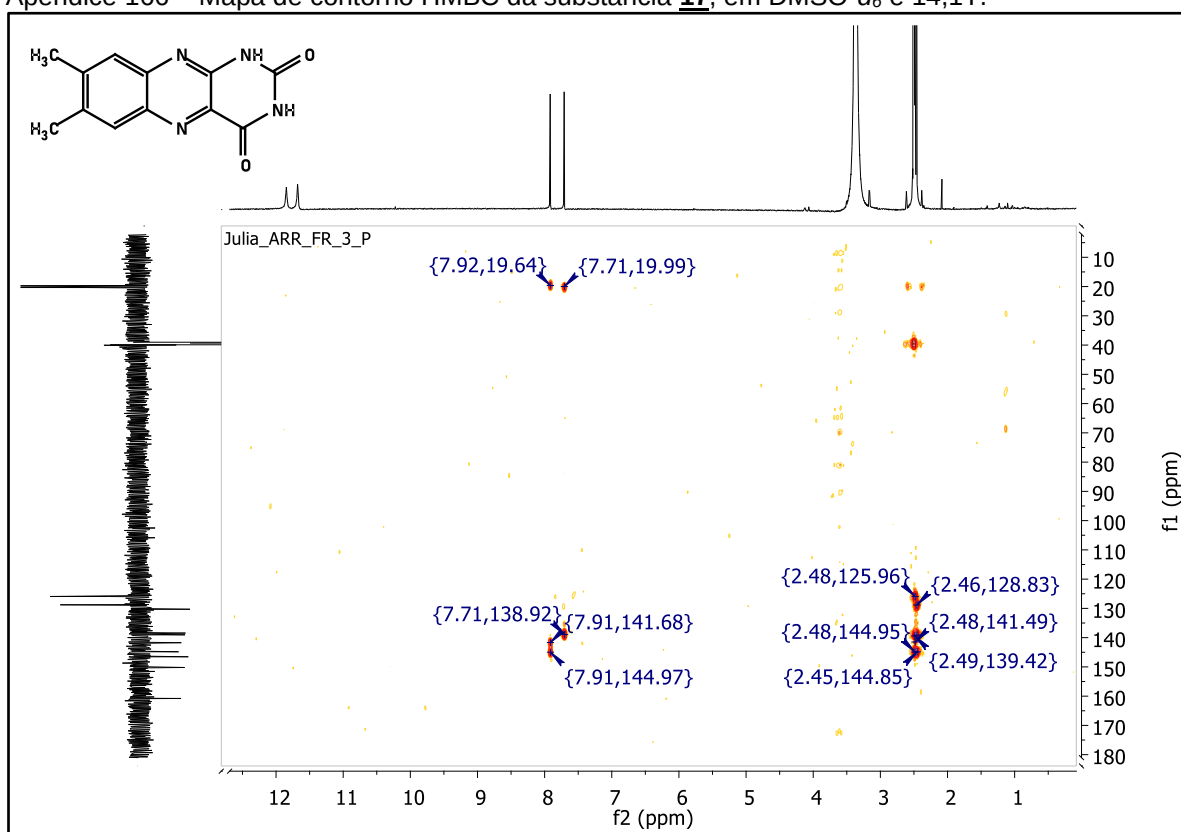
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 164 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **17**, em $\text{DMSO-}d_6$ e 150MHz.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

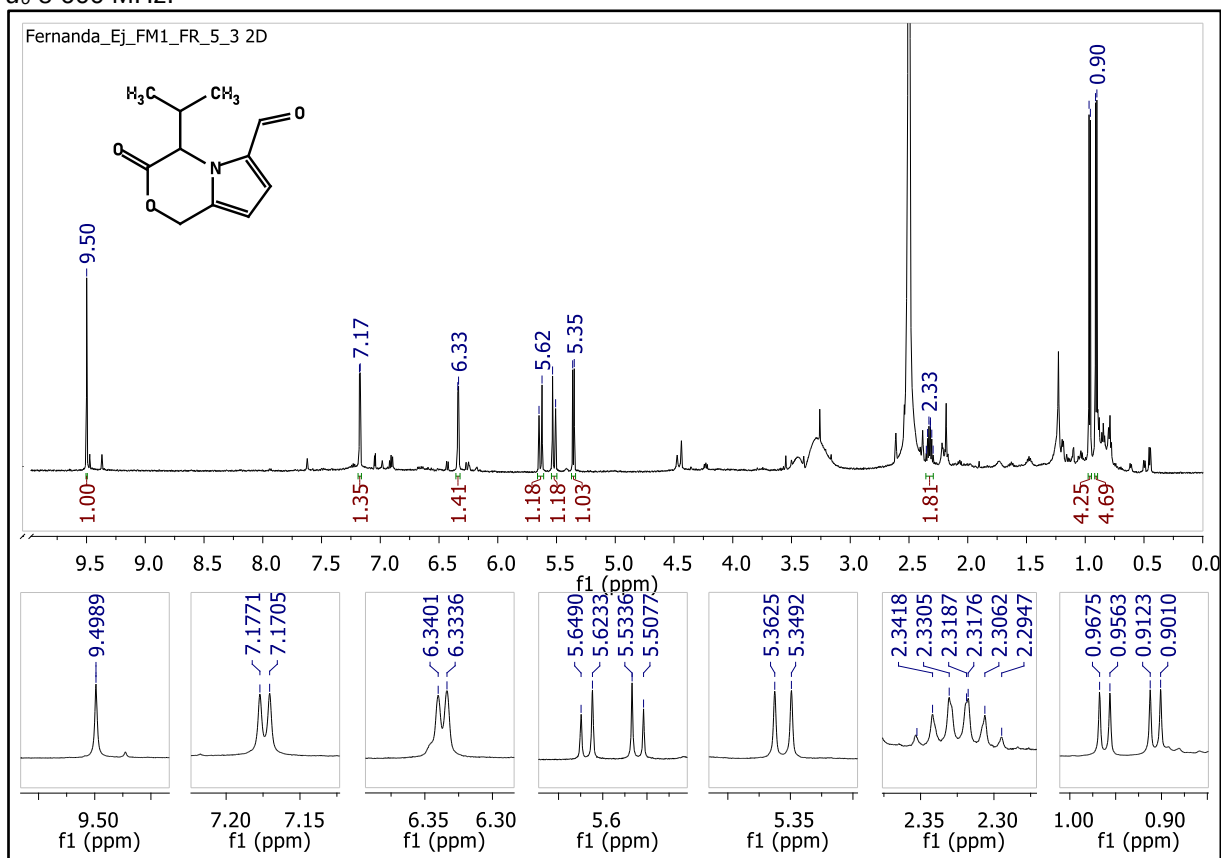
Apêndice 165 – Mapa de contorno HSQC da substância **17**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 166 – Mapa de contorno HMBC da substância **17**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

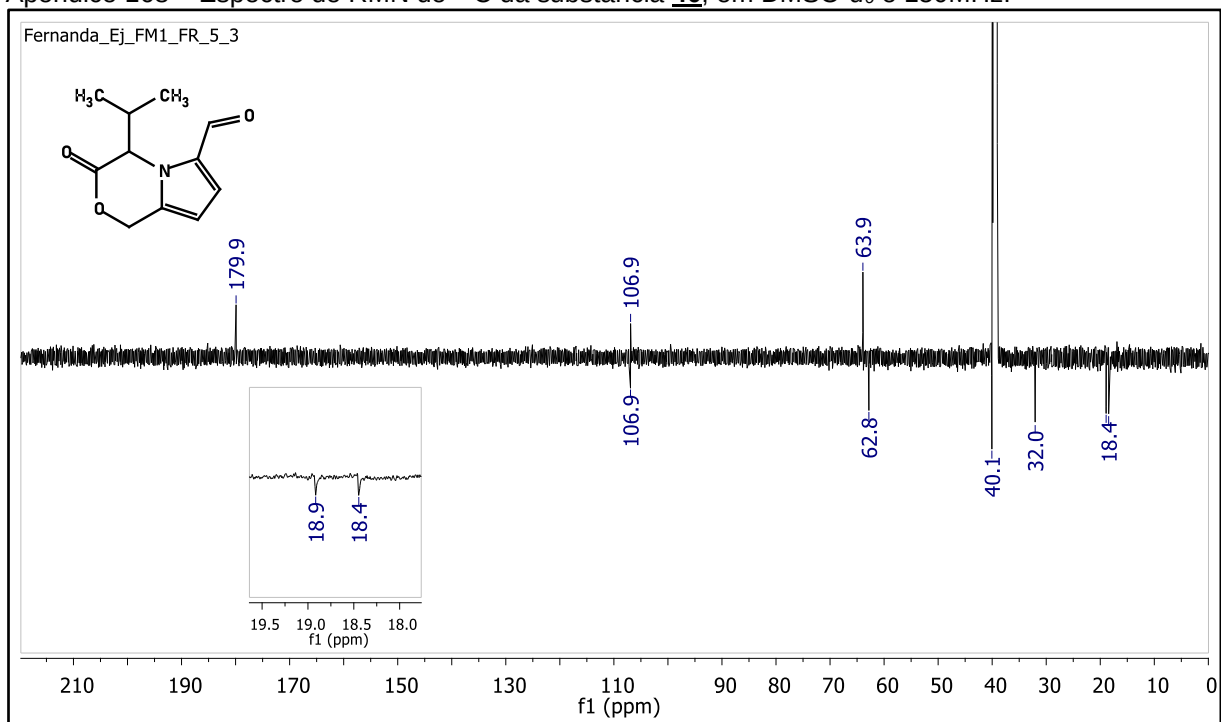
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 167 – Espectro de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, da substância **40**, em $\text{DMSO-}d_6$ e 600 MHz.

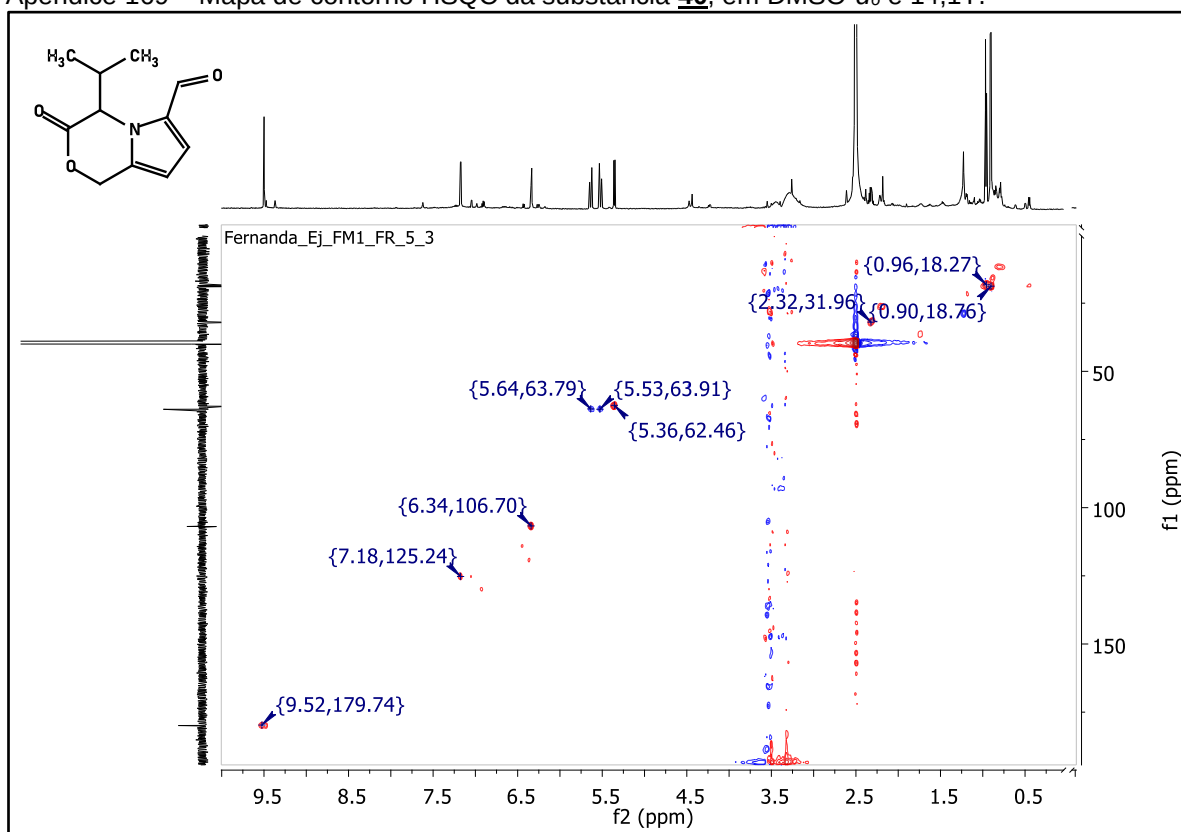


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

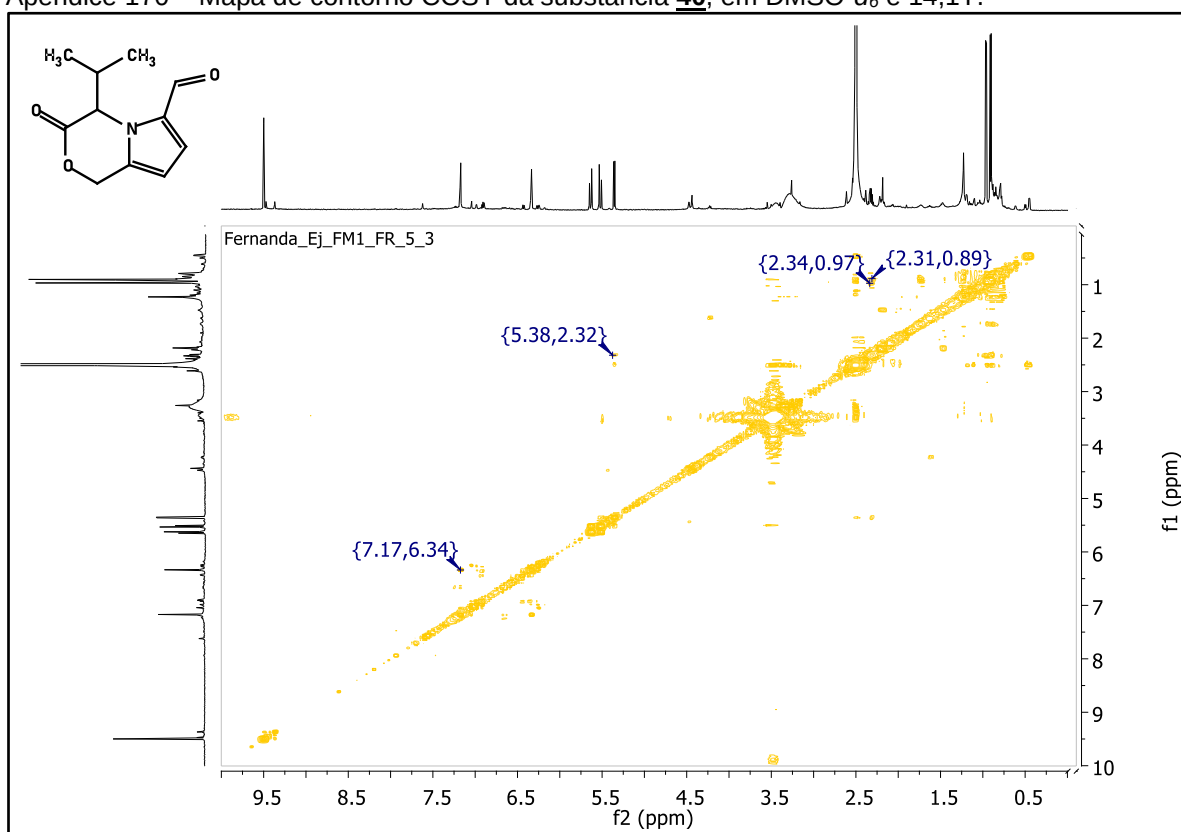
Apêndice 168 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **40**, em $\text{DMSO-}d_6$ e 150MHz.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

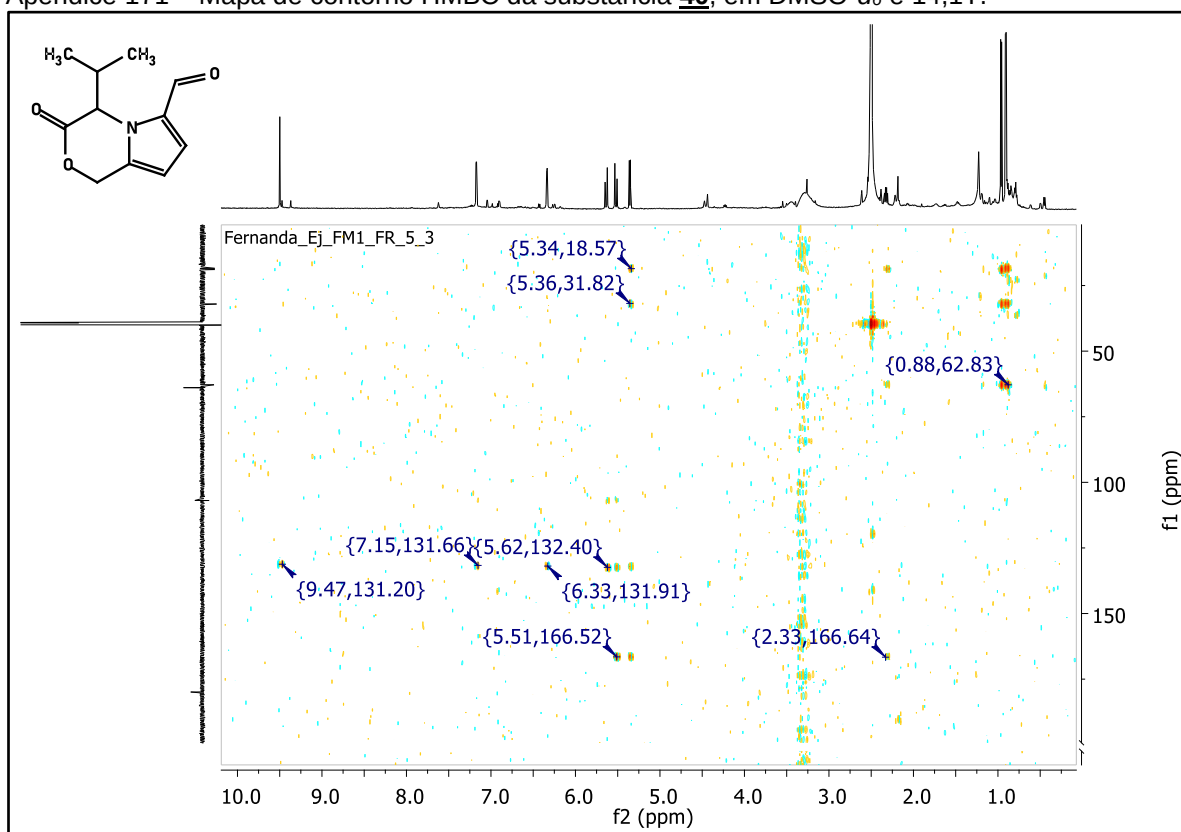
Apêndice 169 – Mapa de contorno HSQC da substância **40**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 170 – Mapa de contorno COSY da substância **40**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

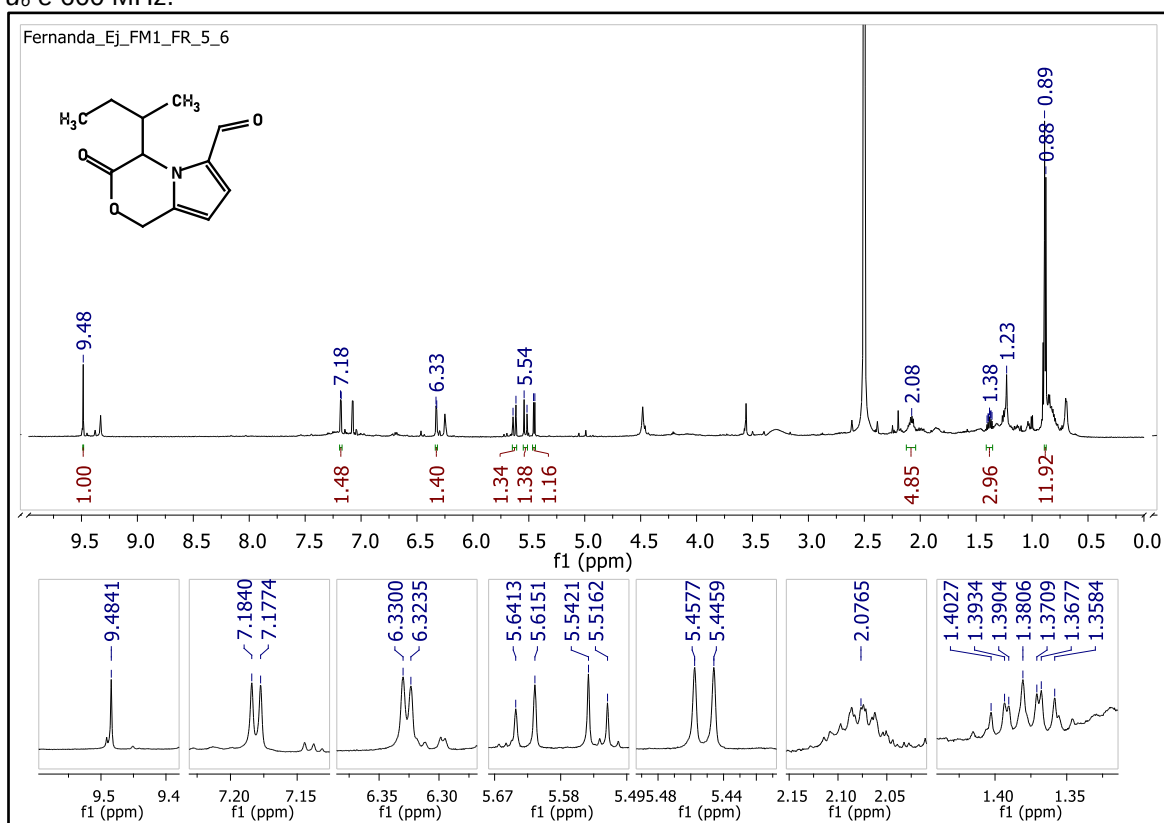
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 171 – Mapa de contorno HMBC da substância **40**, em DMSO- d_6 e 14,1T.



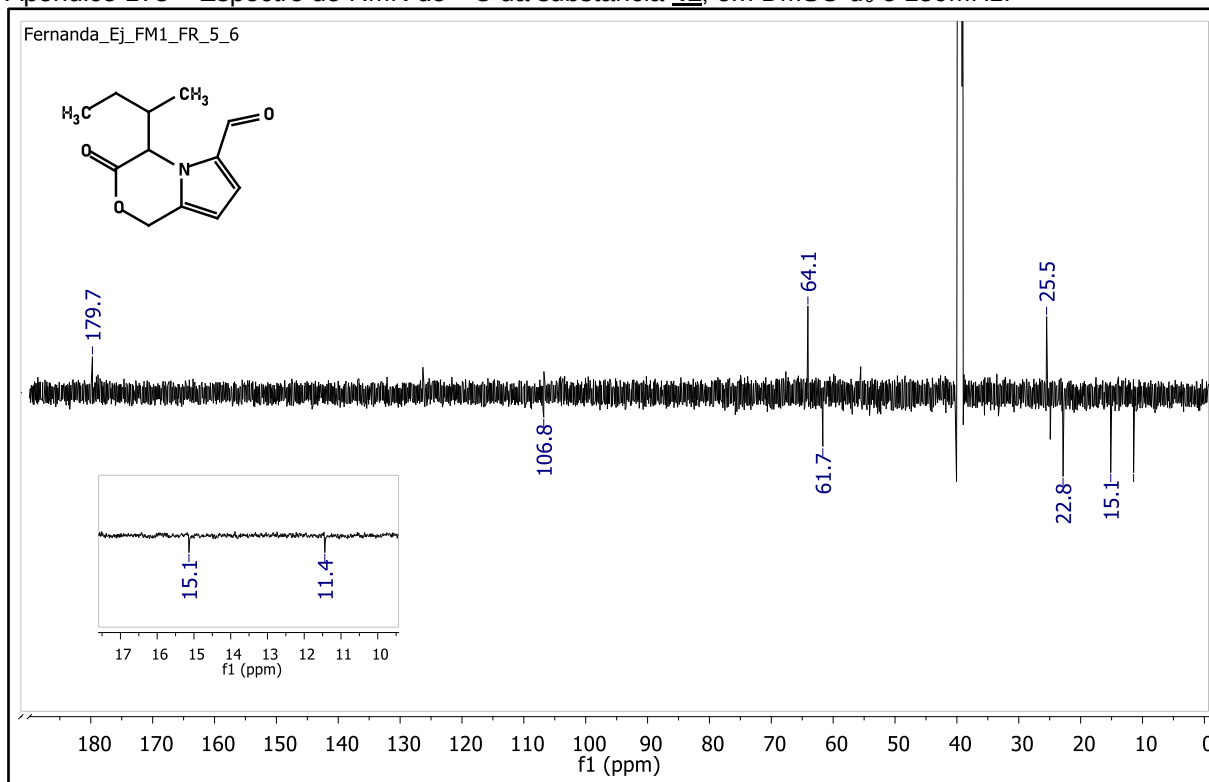
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 172 – Espectro de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, da substância **41**, em DMSO- d_6 e 600 MHz.



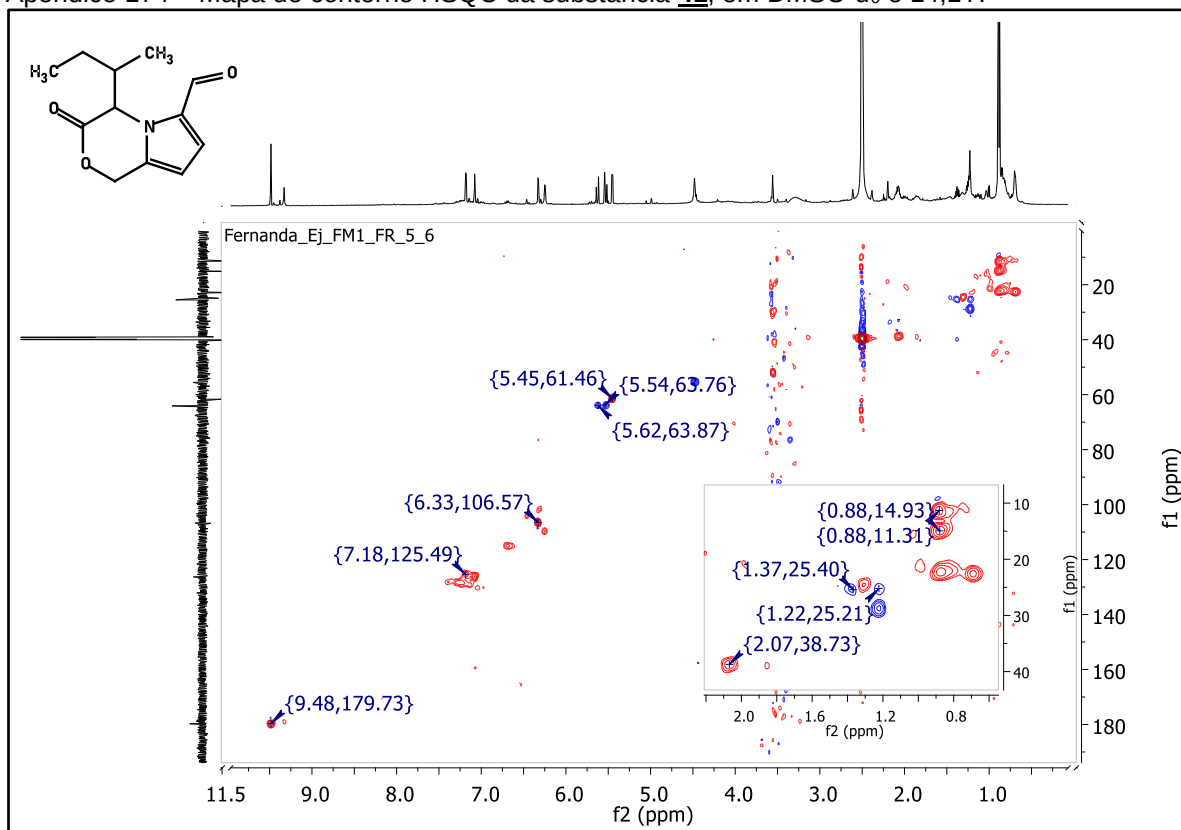
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 173 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **41**, em $\text{DMSO}-d_6$ e 150MHz.



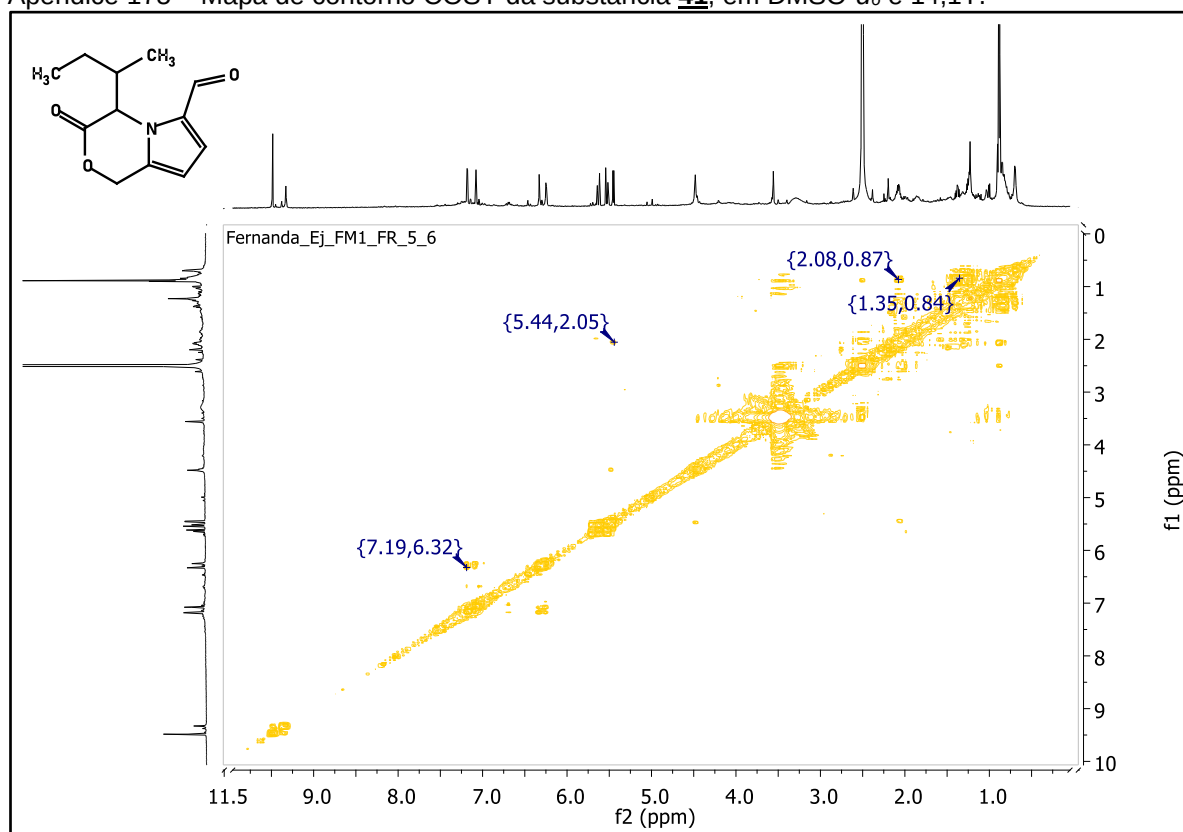
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 174 – Mapa de contorno HSQC da substância **41**, em $\text{DMSO}-d_6$ e 14,1T.



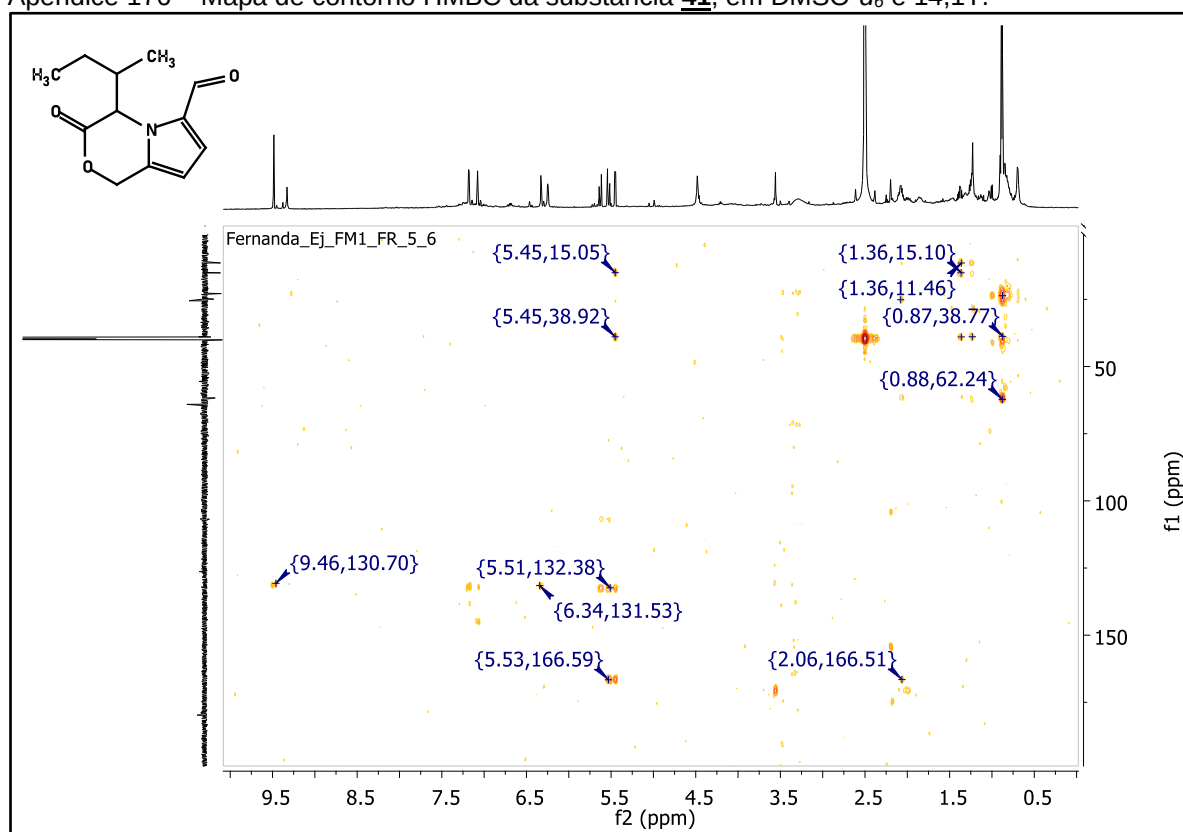
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 175 – Mapa de contorno COSY da substância **41**, em DMSO- d_6 e 14,1T.



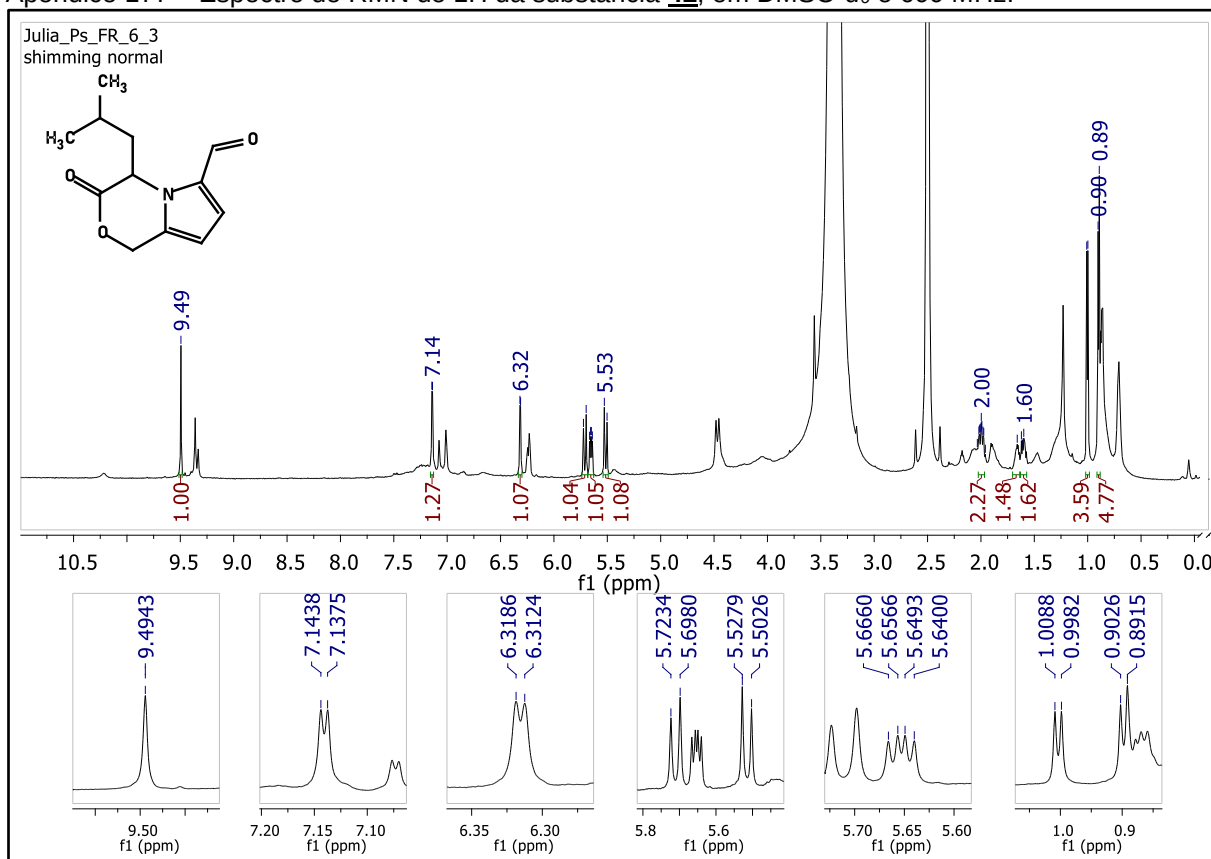
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 176 – Mapa de contorno HMBC da substância **41**, em DMSO- d_6 e 14,1T.



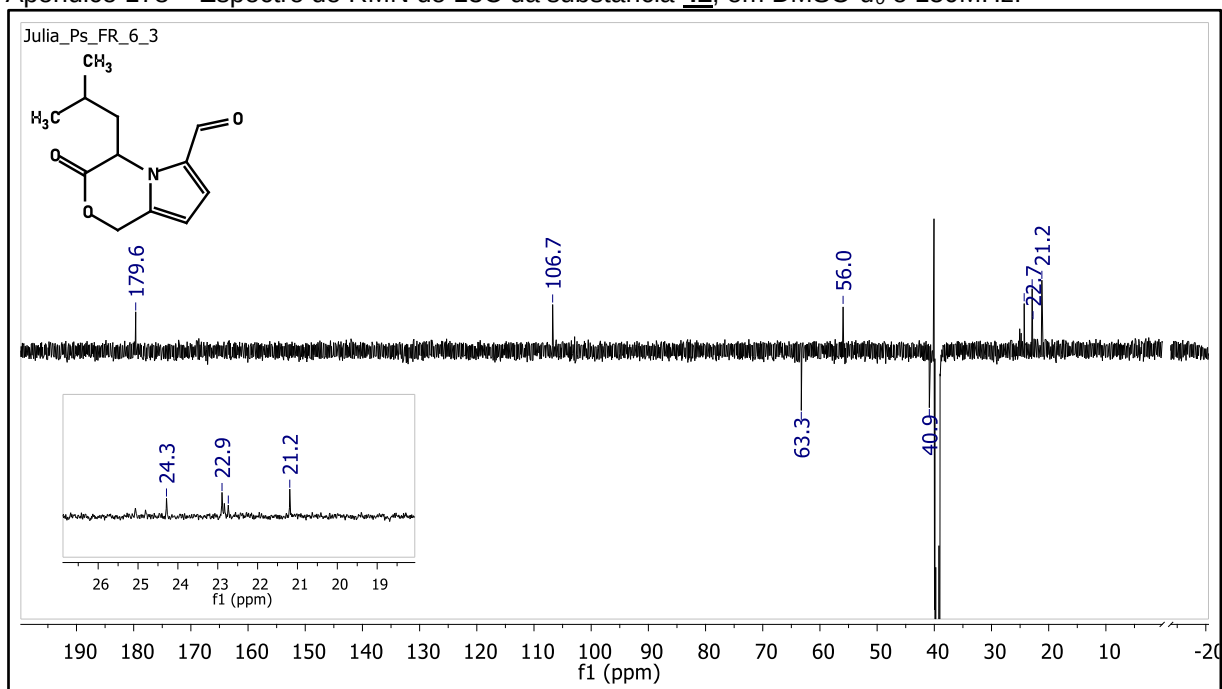
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 177 – Espectro de RMN de ^1H da substância **42**, em $\text{DMSO-}d_6$ e 600 MHz.

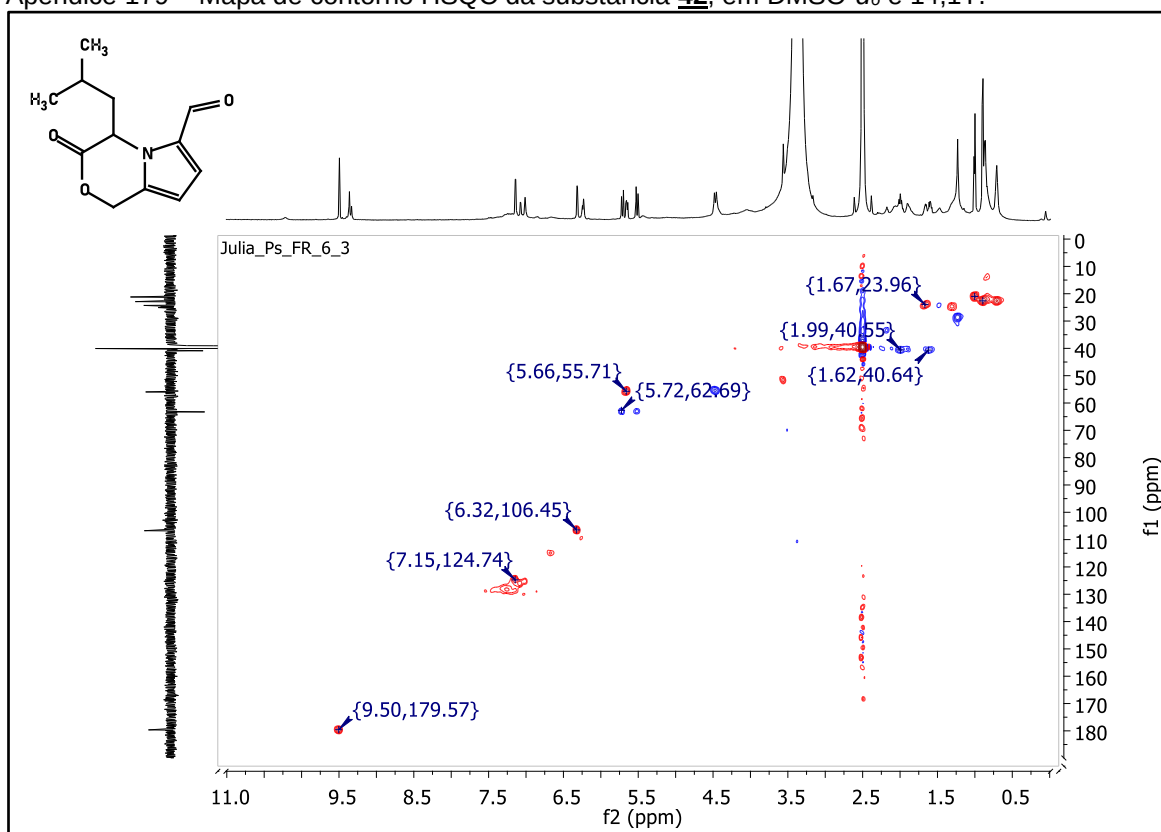


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

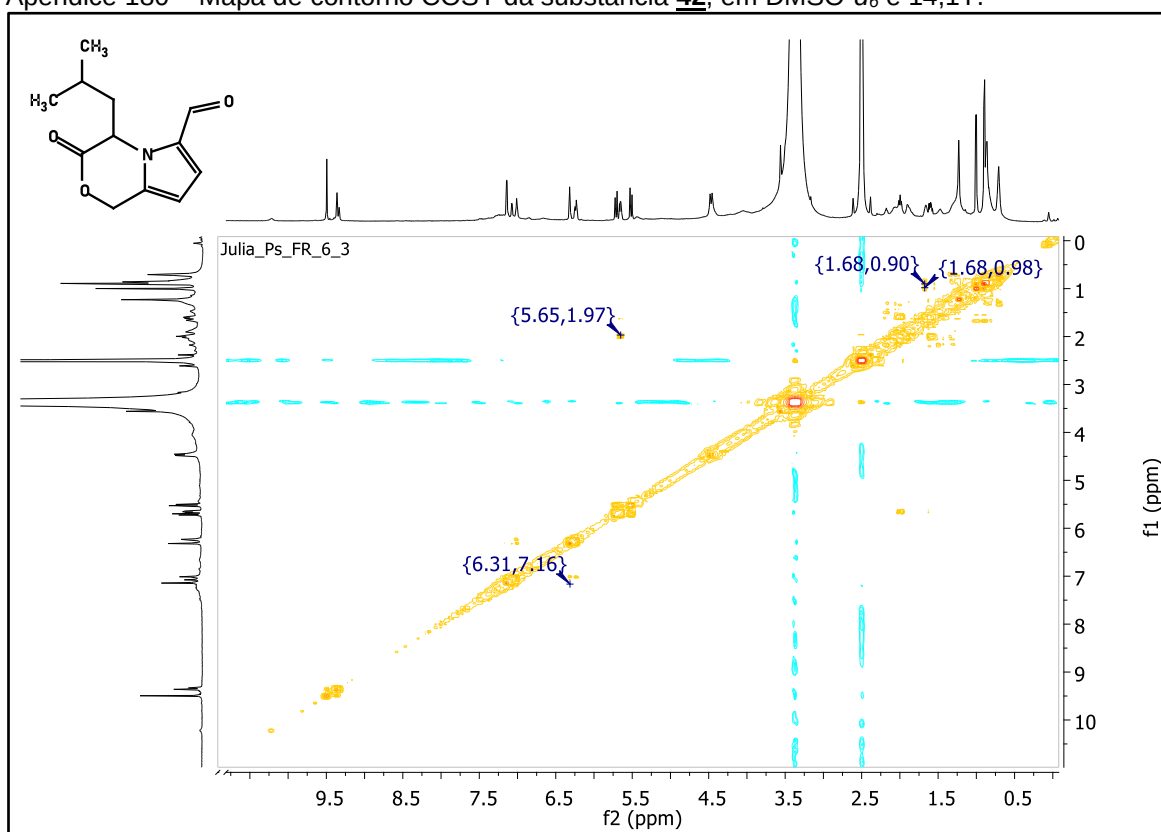
Apêndice 178 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **42**, em $\text{DMSO-}d_6$ e 150MHz.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

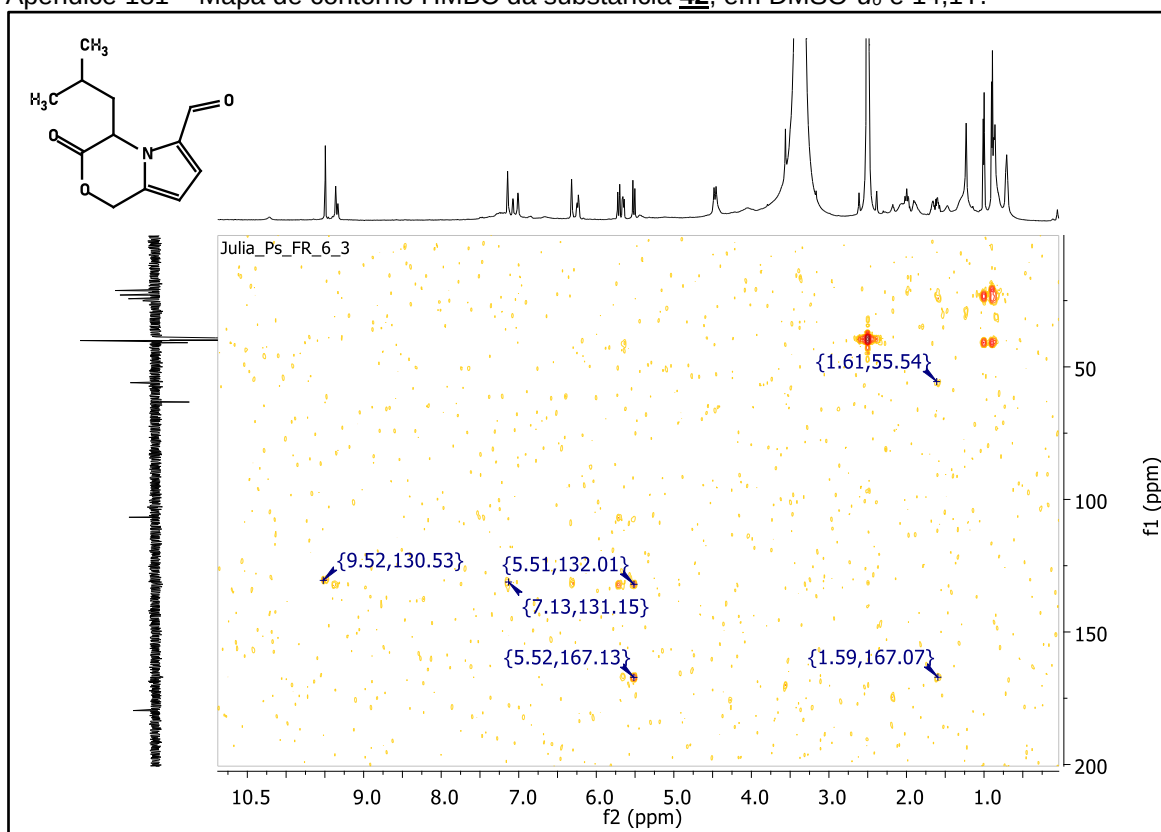
Apêndice 179 – Mapa de contorno HSQC da substância **42**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 180 – Mapa de contorno COSY da substância **42**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

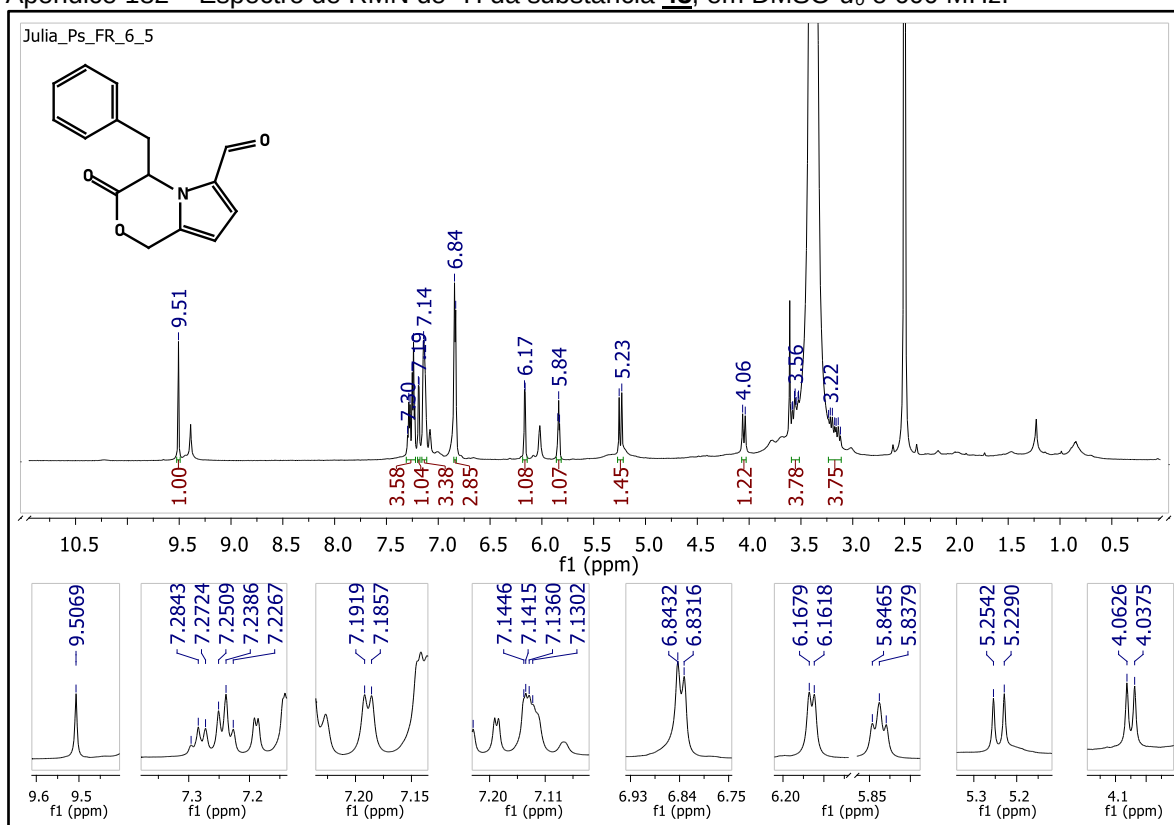
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 181 – Mapa de contorno HMBC da substância **42**, em DMSO- d_6 e 14,1T.



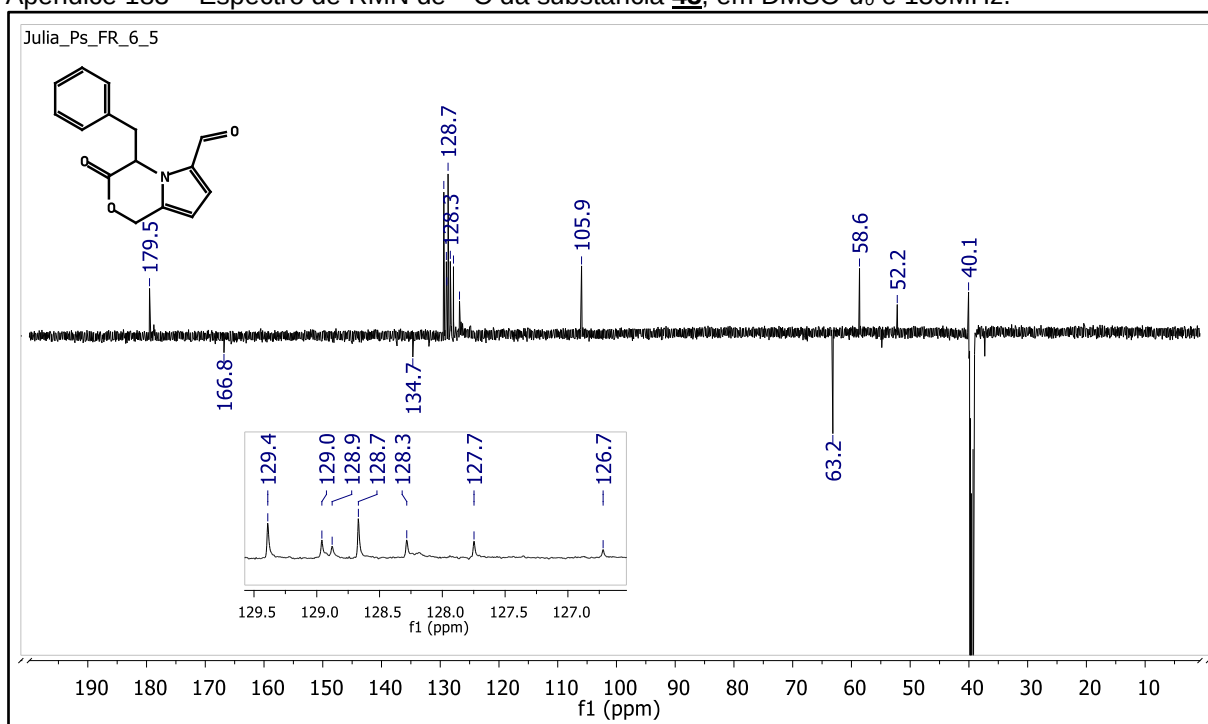
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 182 – Espectro de RMN de ^1H da substância **43**, em DMSO- d_6 e 600 MHz.



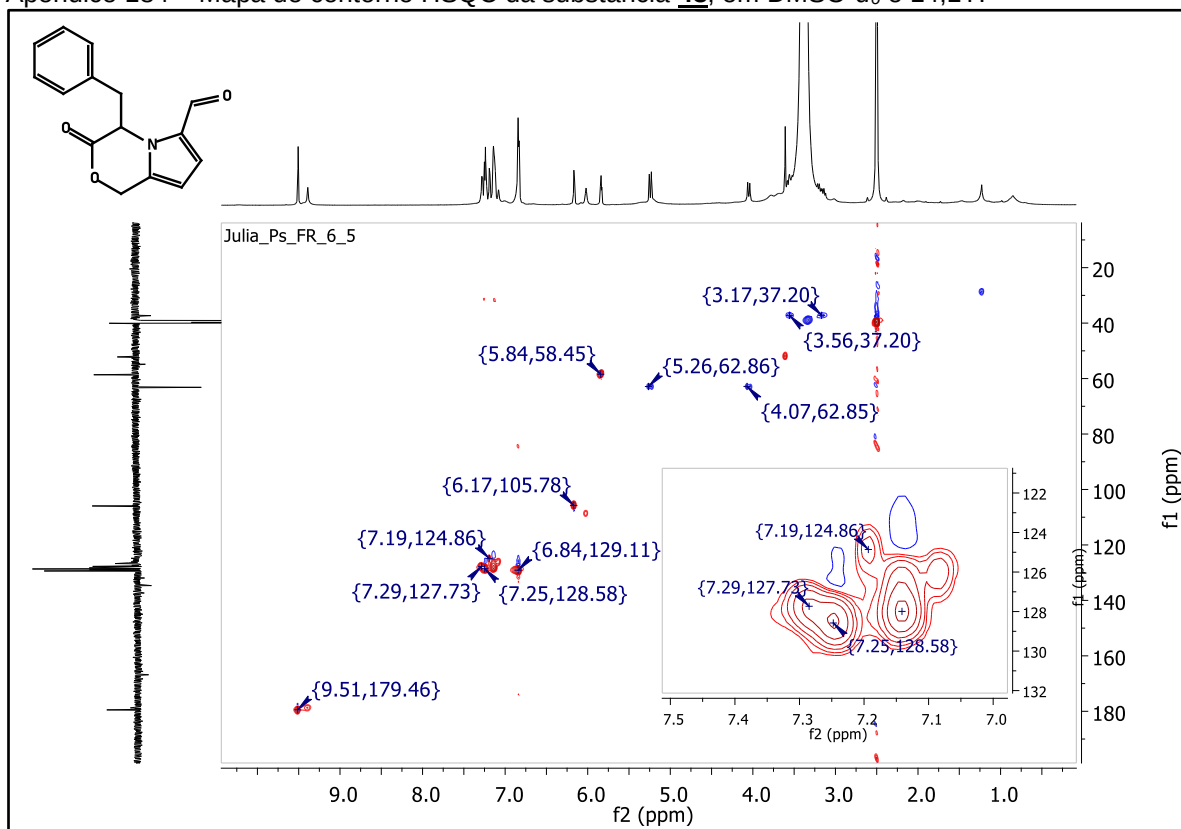
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 183 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **43**, em $\text{DMSO}-d_6$ e 150MHz.

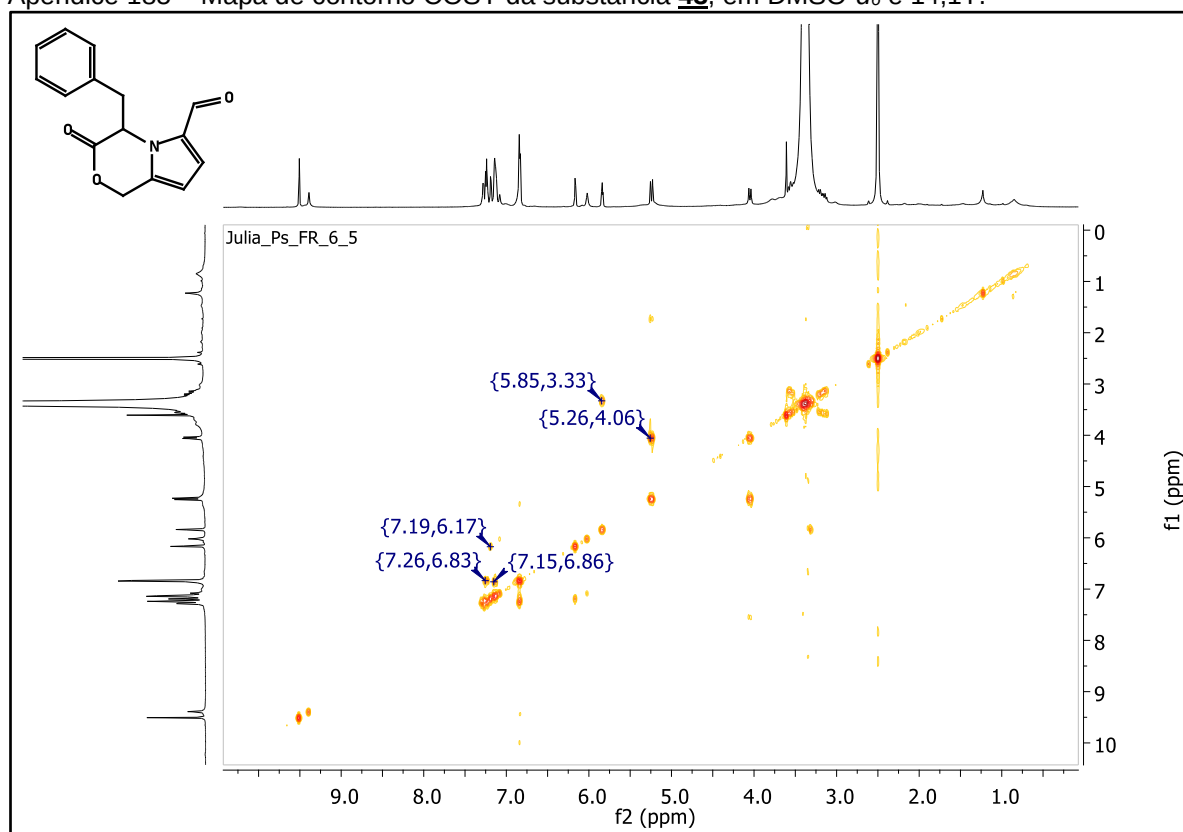


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

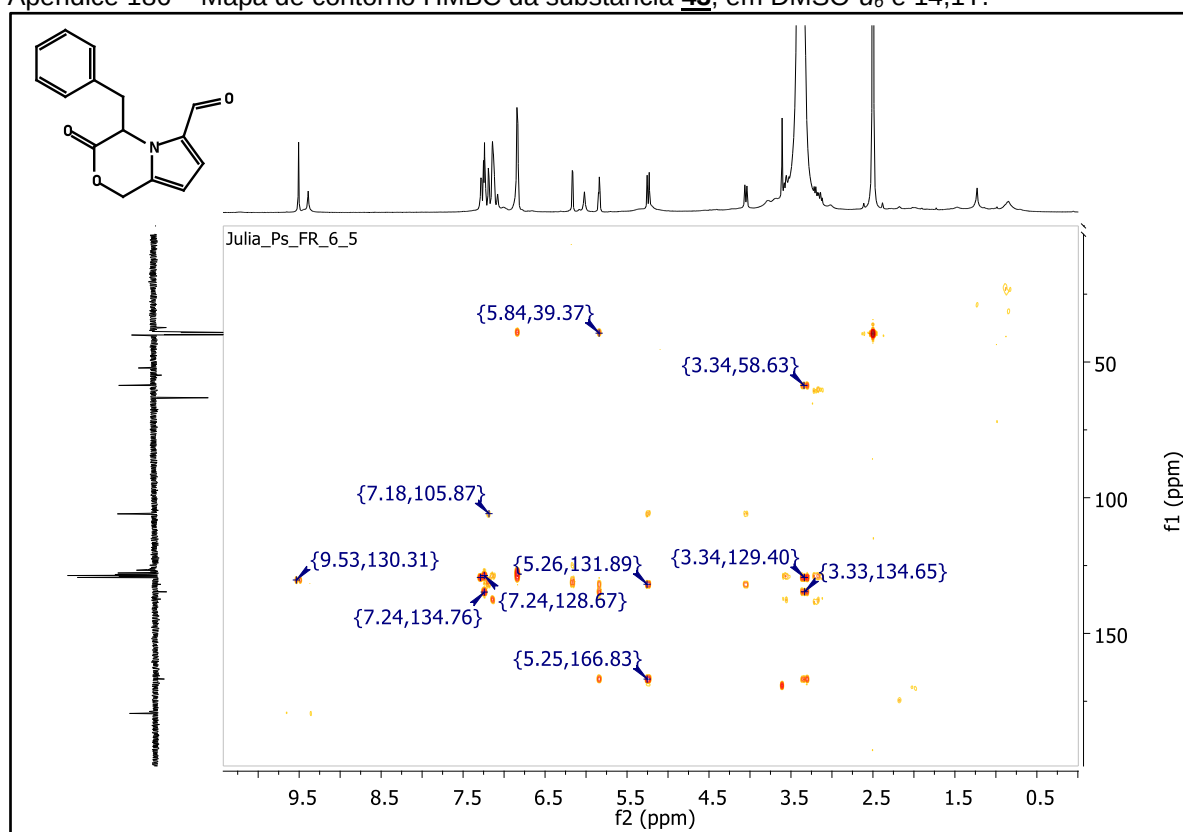
Apêndice 184 – Mapa de contorno HSQC da substância **43**, em $\text{DMSO}-d_6$ e 14,1T.



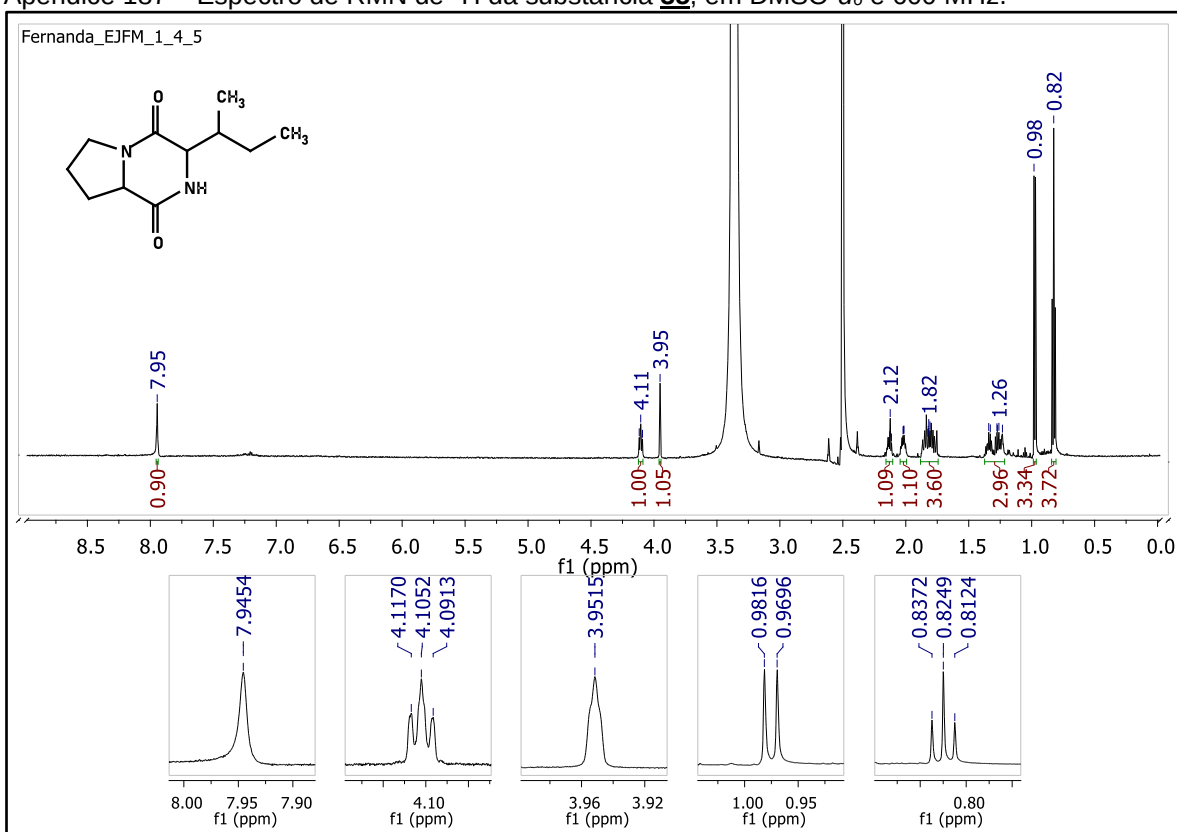
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 185 – Mapa de contorno COSY da substância **43**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

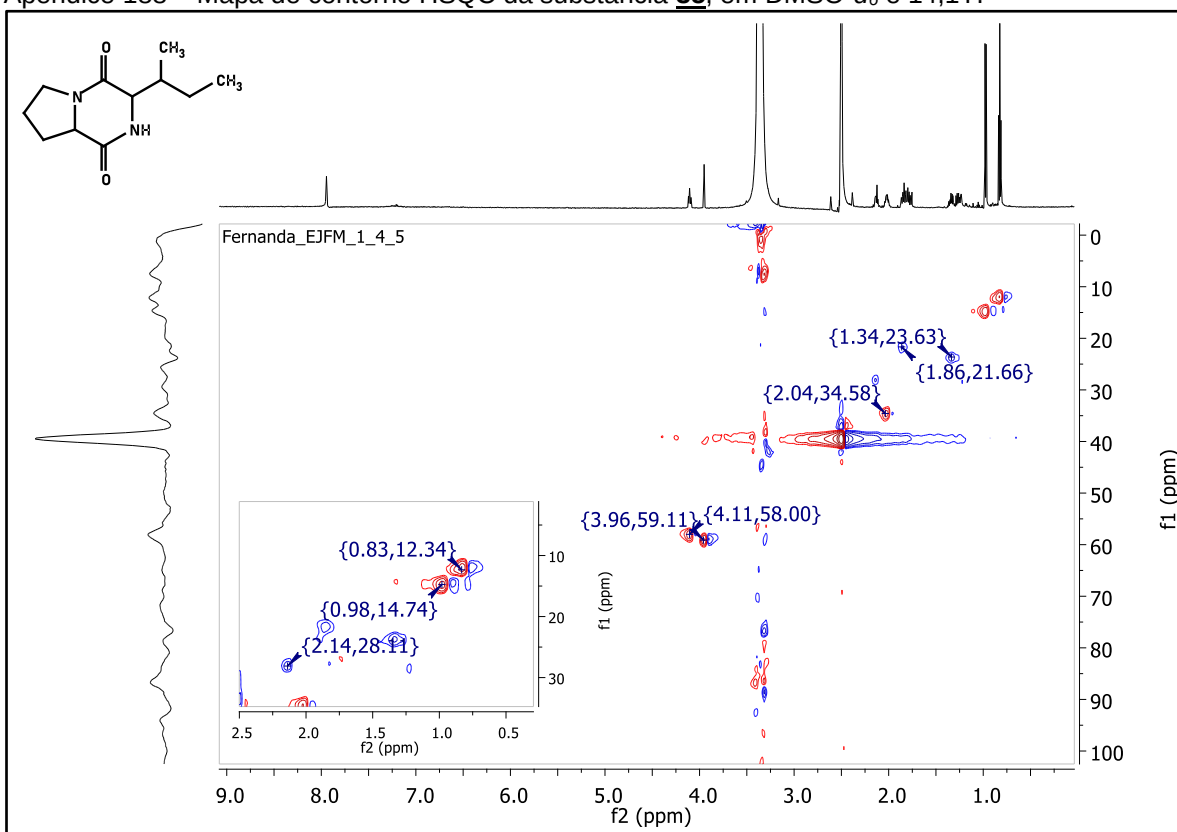
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 186 – Mapa de contorno HMBC da substância **43**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

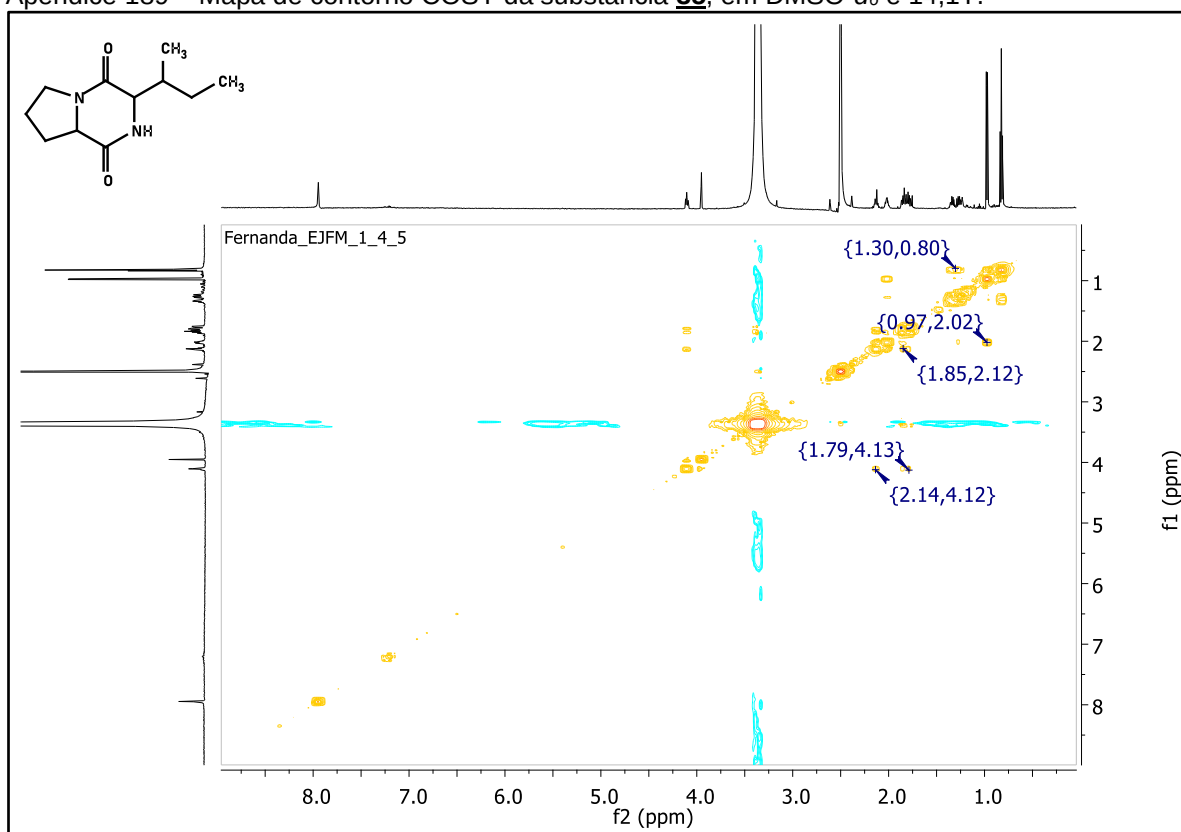
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 187 – Espectro de RMN de ^1H da substância **35**, em $\text{DMSO-}d_6$ e 600 MHz.

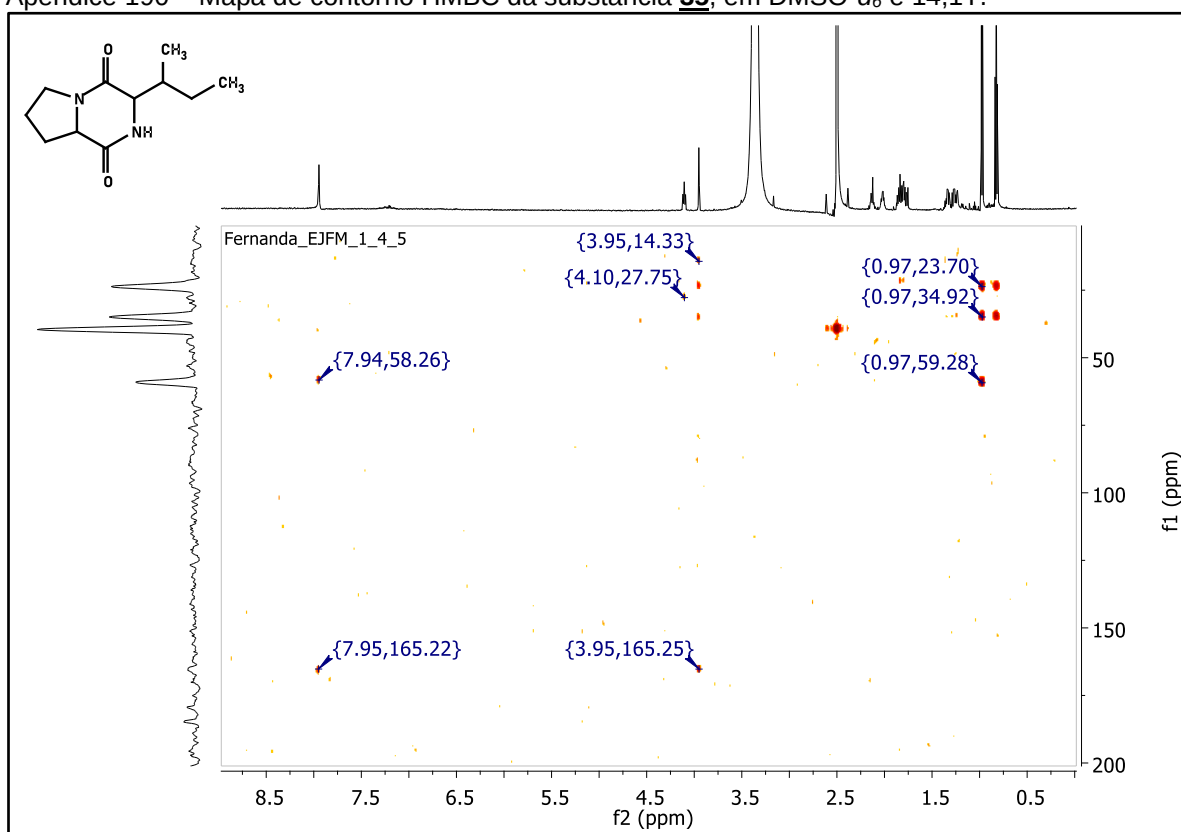
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 188 – Mapa de contorno HSQC da substância **35**, em $\text{DMSO-}d_6$ e 14,1T.

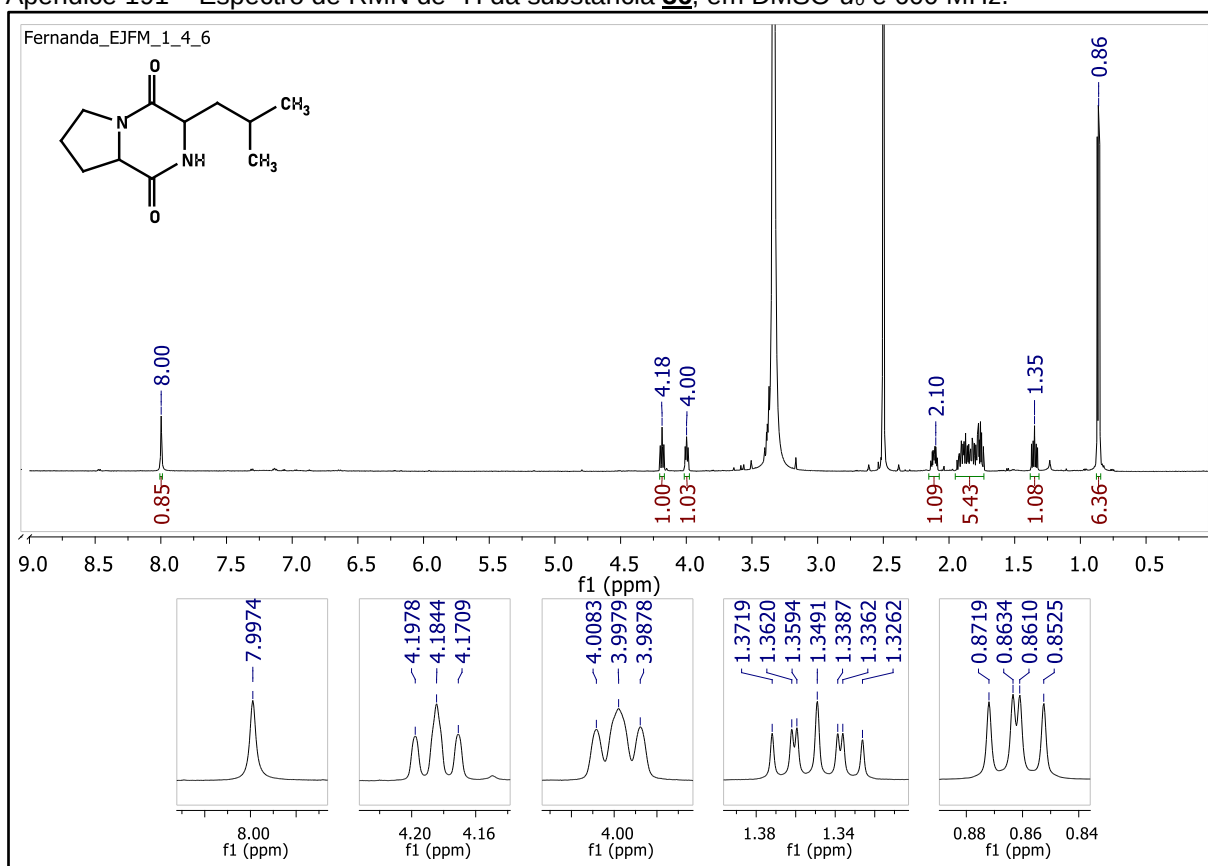
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 189 – Mapa de contorno COSY da substância **35**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

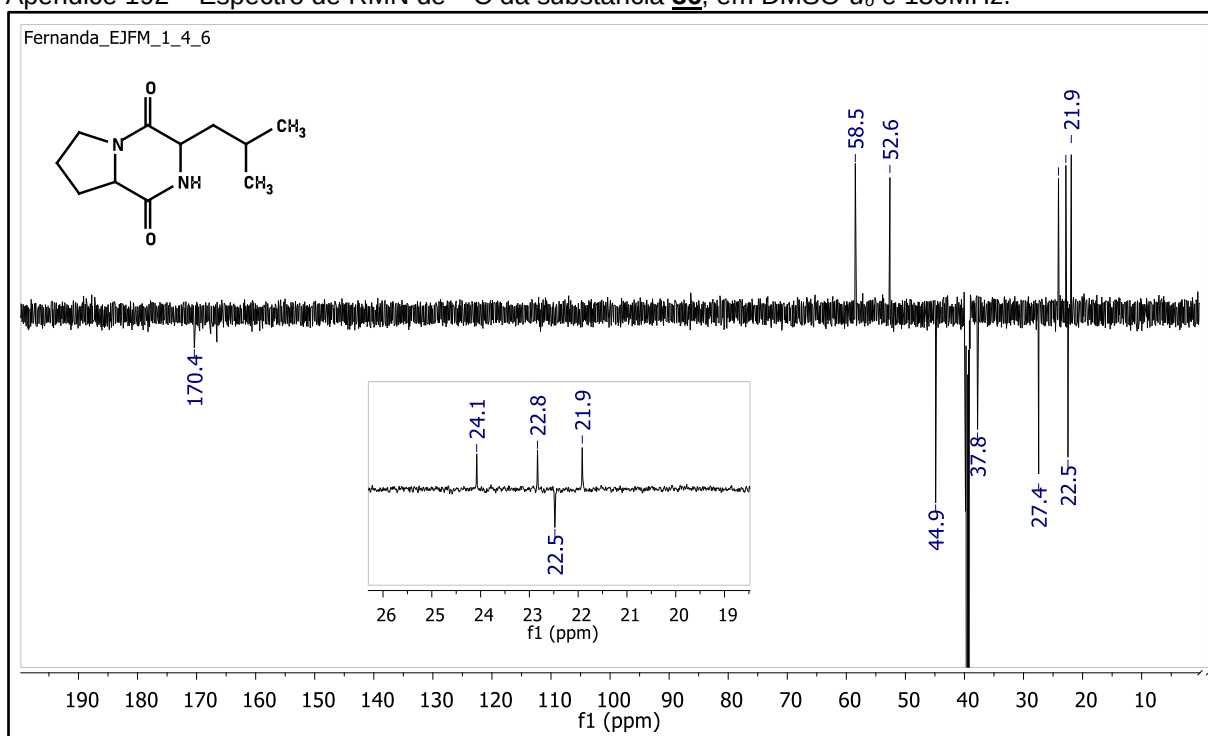
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 190 – Mapa de contorno HMBC da substância **35**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

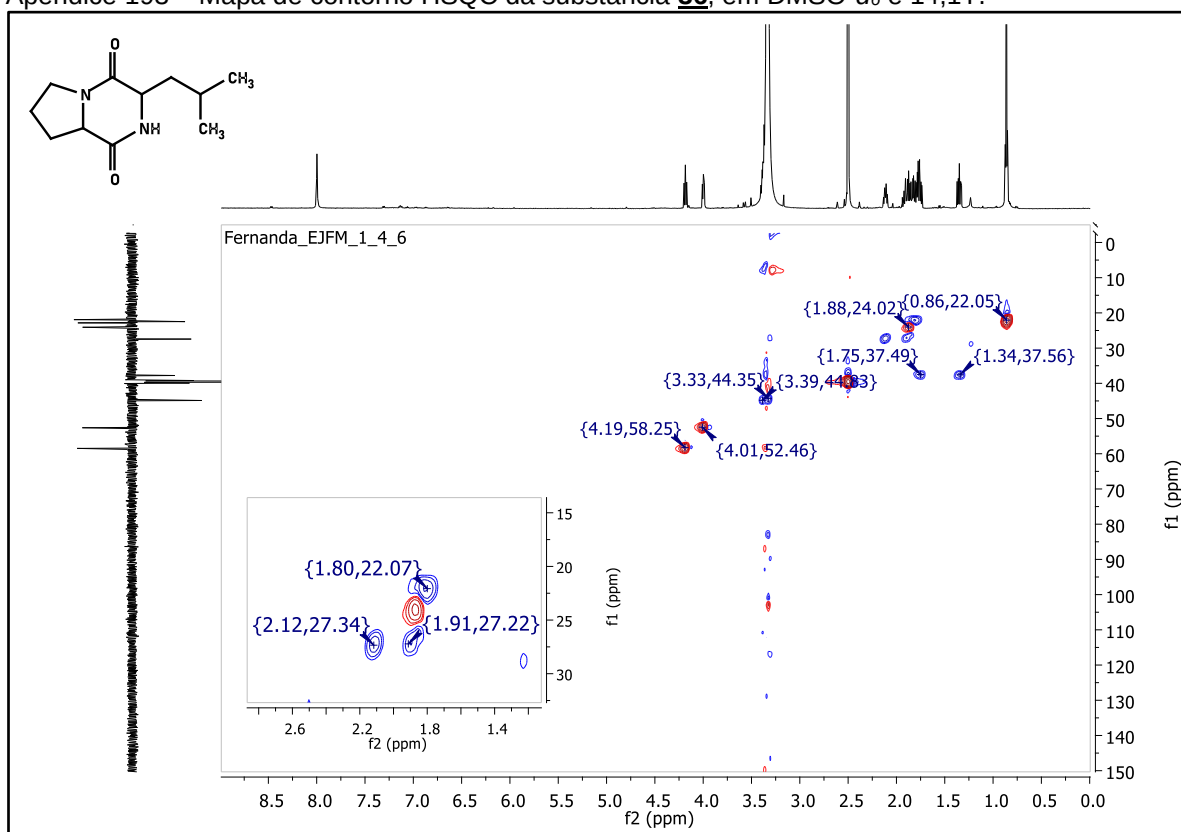
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 191 – Espectro de RMN de ^1H da substância **36**, em $\text{DMSO}-d_6$ e 600 MHz.

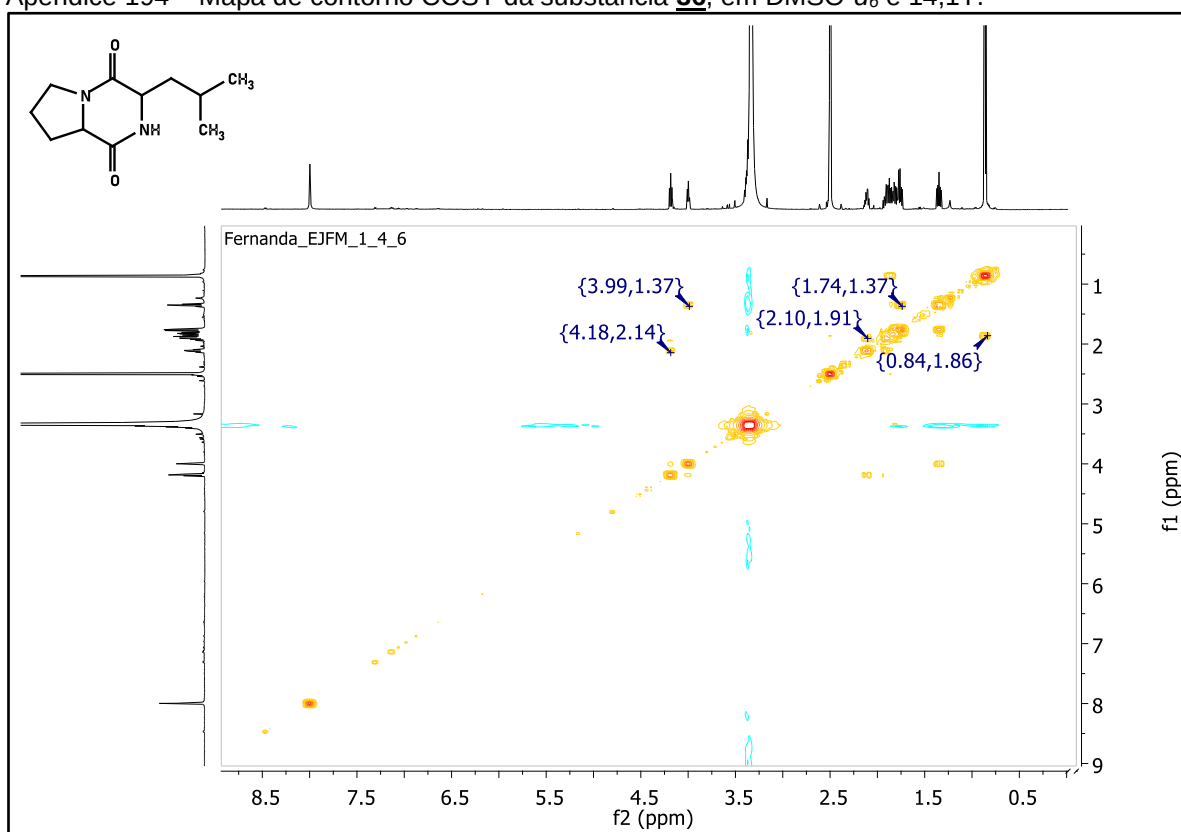
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 192 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **36**, em $\text{DMSO}-d_6$ e 150MHz.

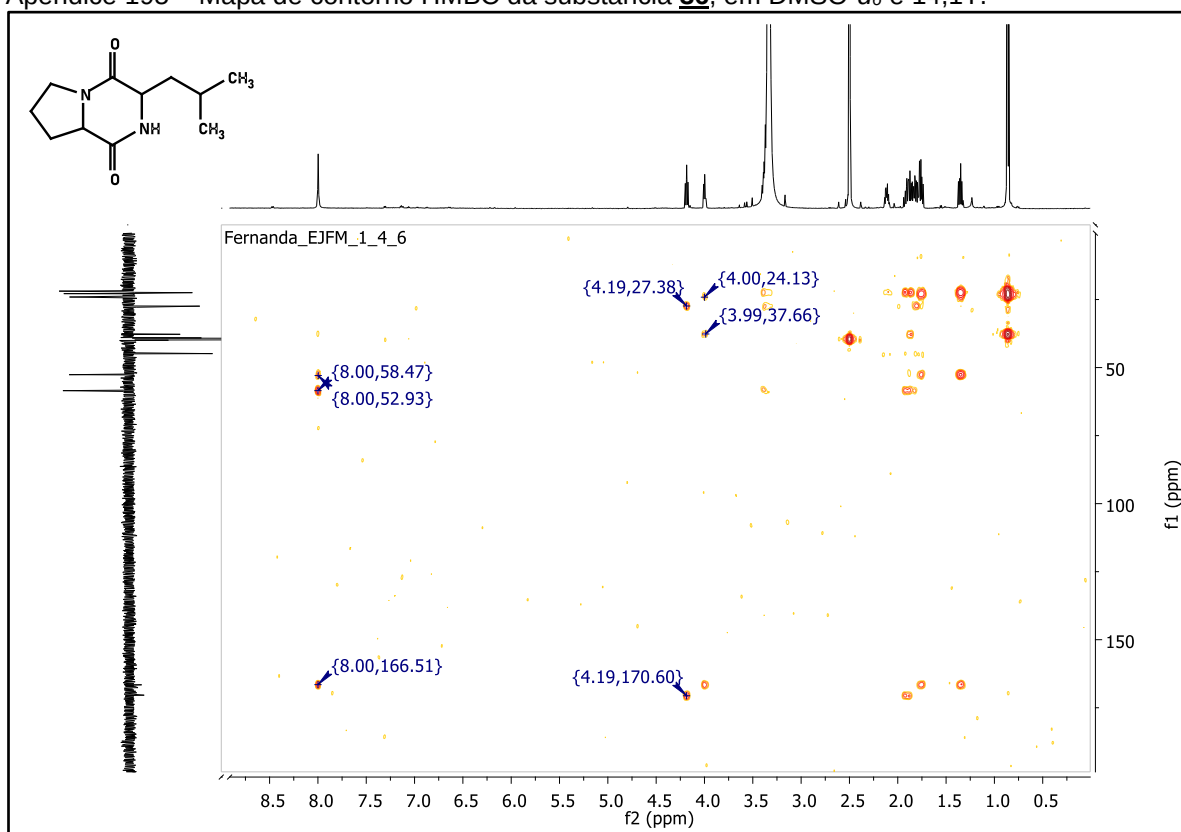
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 193 – Mapa de contorno HSQC da substância **36**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

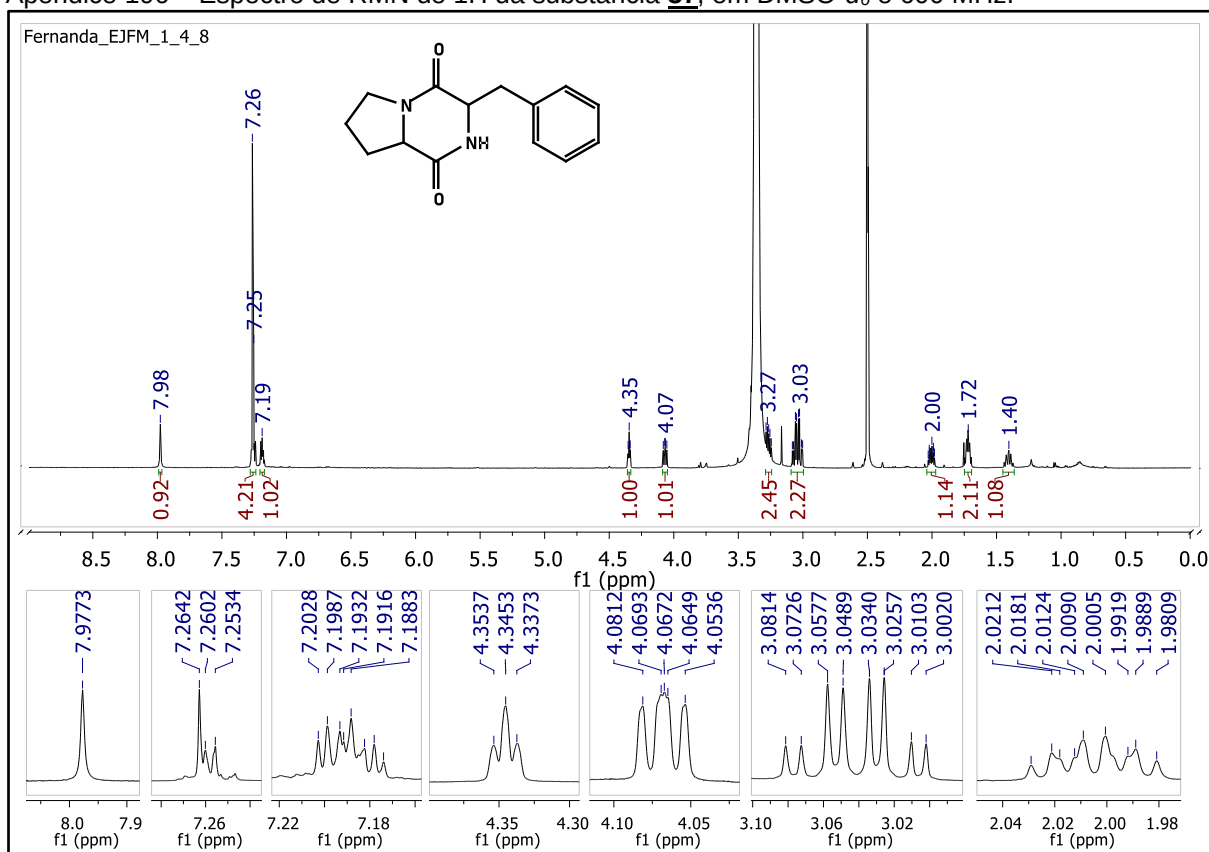
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 194 – Mapa de contorno COSY da substância **36**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

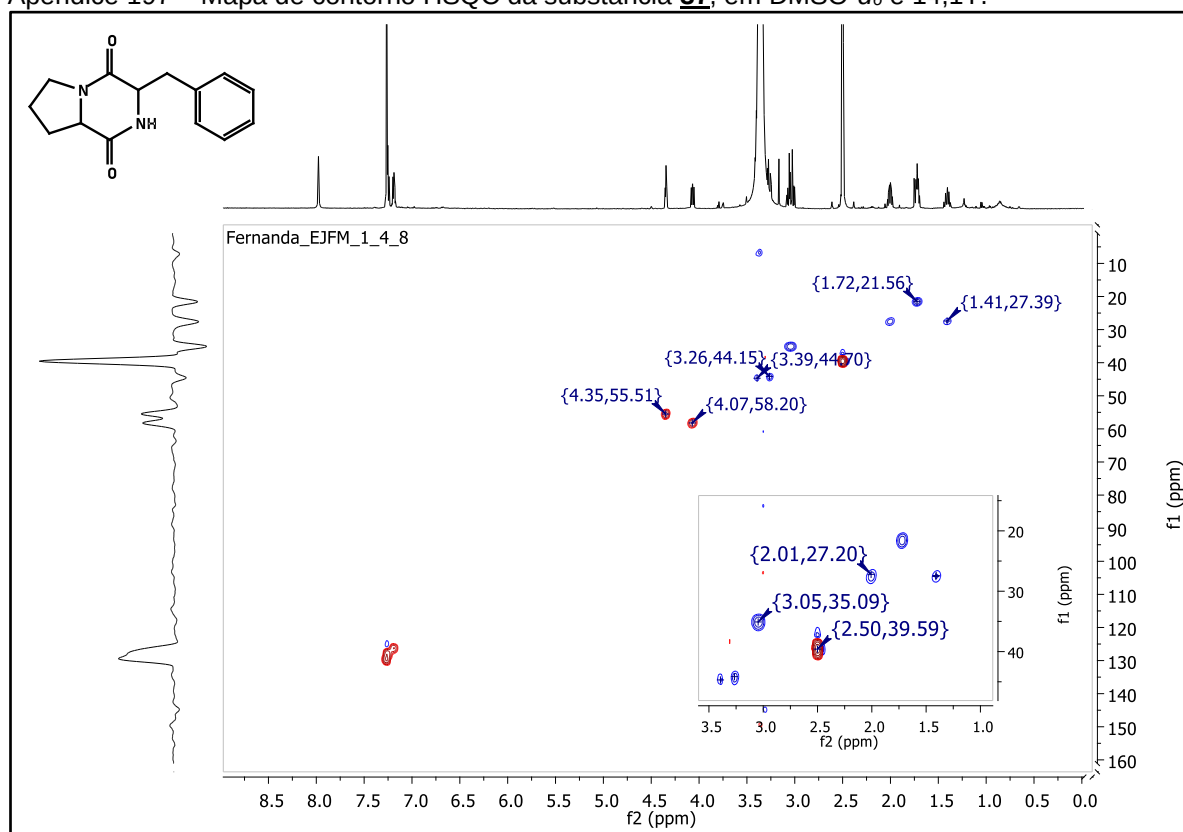
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 195 – Mapa de contorno HMBC da substância **36**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

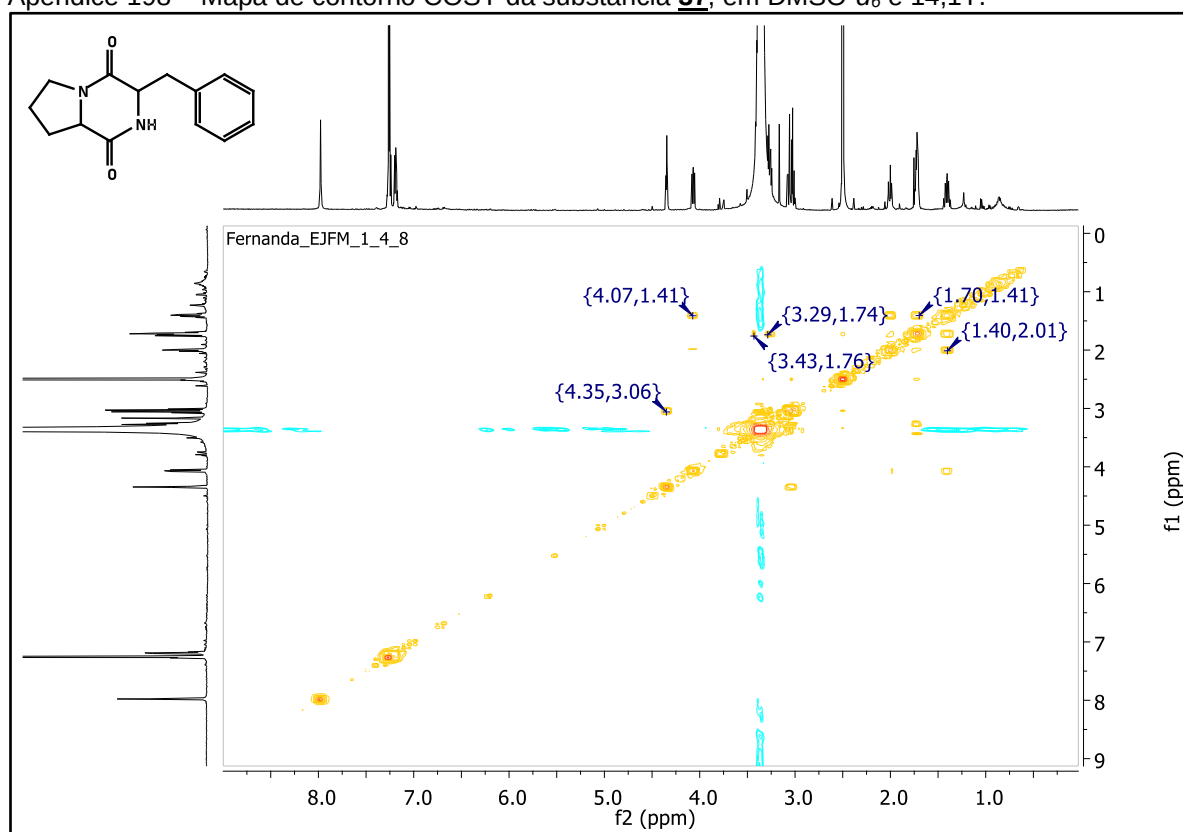
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 196 – Espectro de RMN de ^1H da substância **37**, em DMSO- d_6 e 600 MHz.

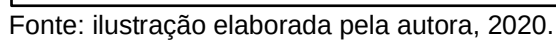
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 197 – Mapa de contorno HSQC da substância **37**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 198 – Mapa de contorno COSY da substância **37**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

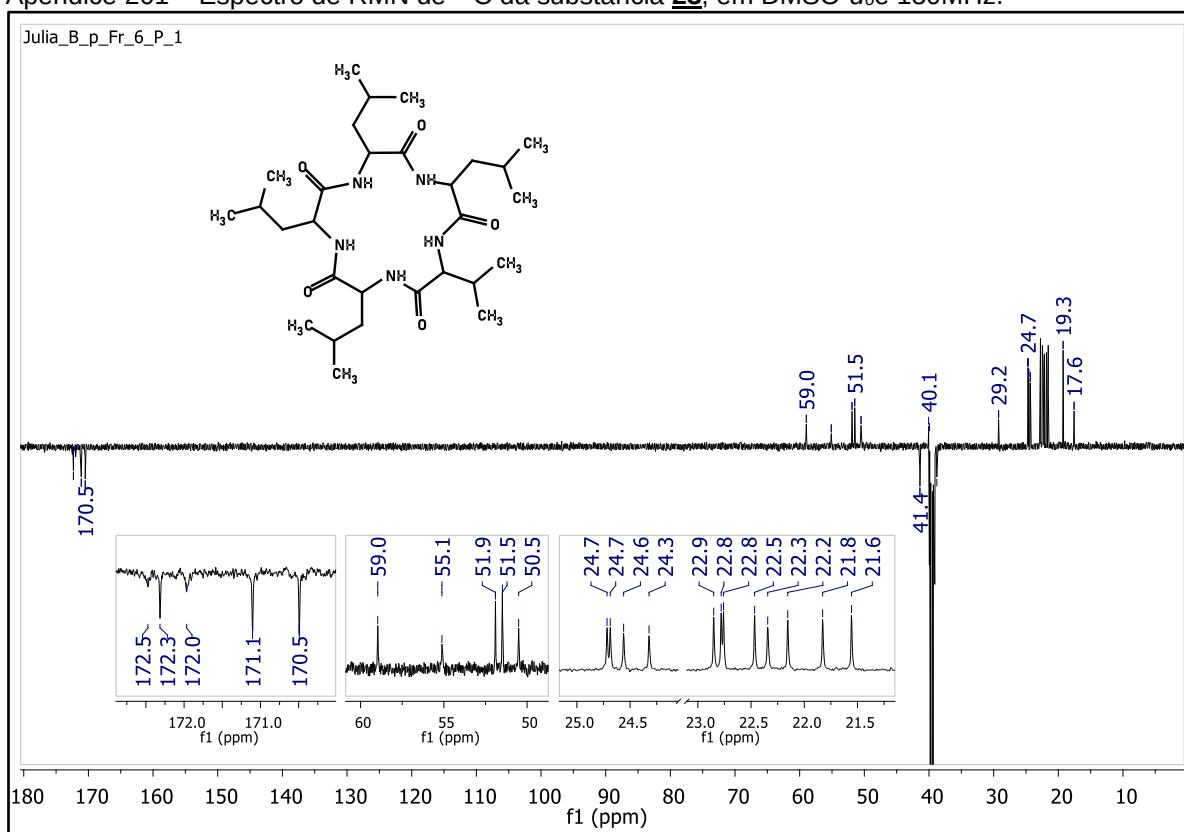


Julia_B_p_Fr_6_P_1

Chemical structure of compound 6p is shown above the spectrum. The spectrum displays peaks from 0.86 to 8.66 ppm. Integration values are provided below the peaks: 0.99, 0.84, 0.96, 0.81, 0.90, 1.98, 1.02, 1.00, 0.88, 0.93, 0.93, 1.00, 1.63, 1.37, 1.50, and 31.29. The x-axis is labeled f1 (ppm) and ranges from 0.0 to 9.5.

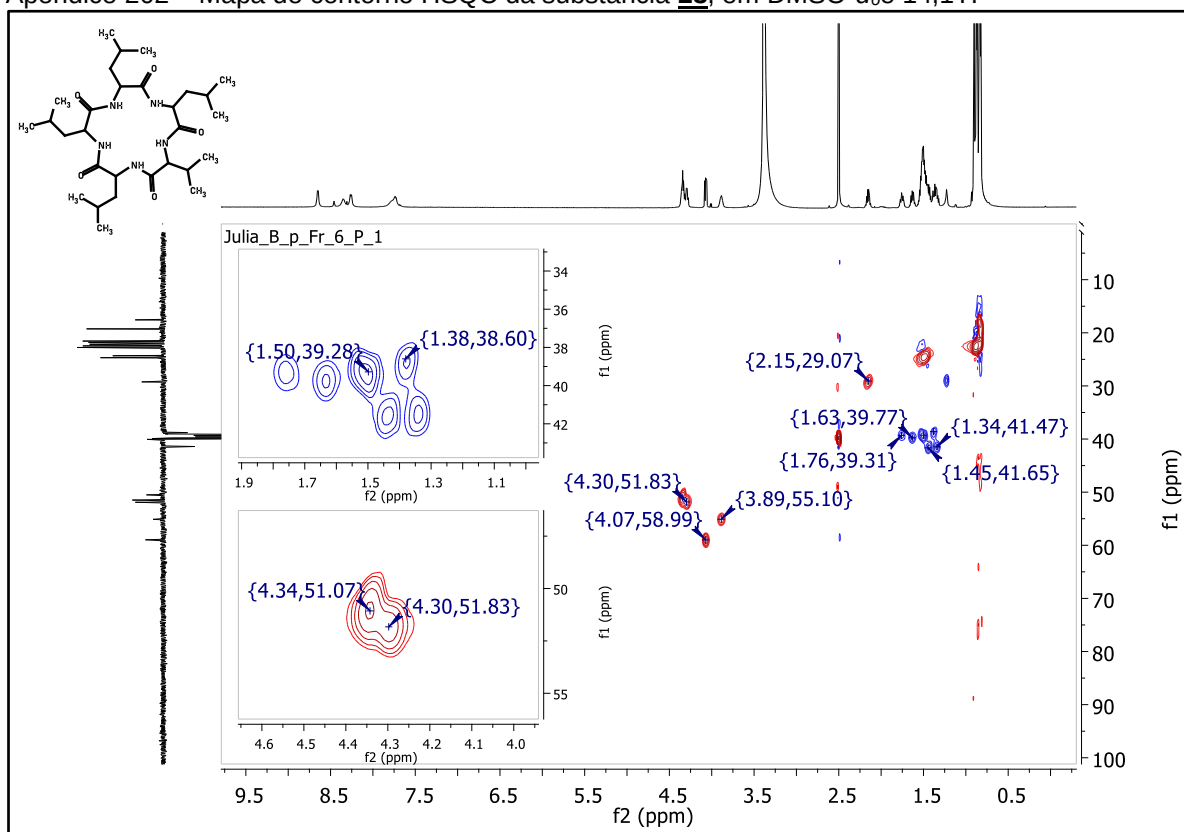
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 201 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **23**, em $\text{DMSO}-d_6$ 150MHz.



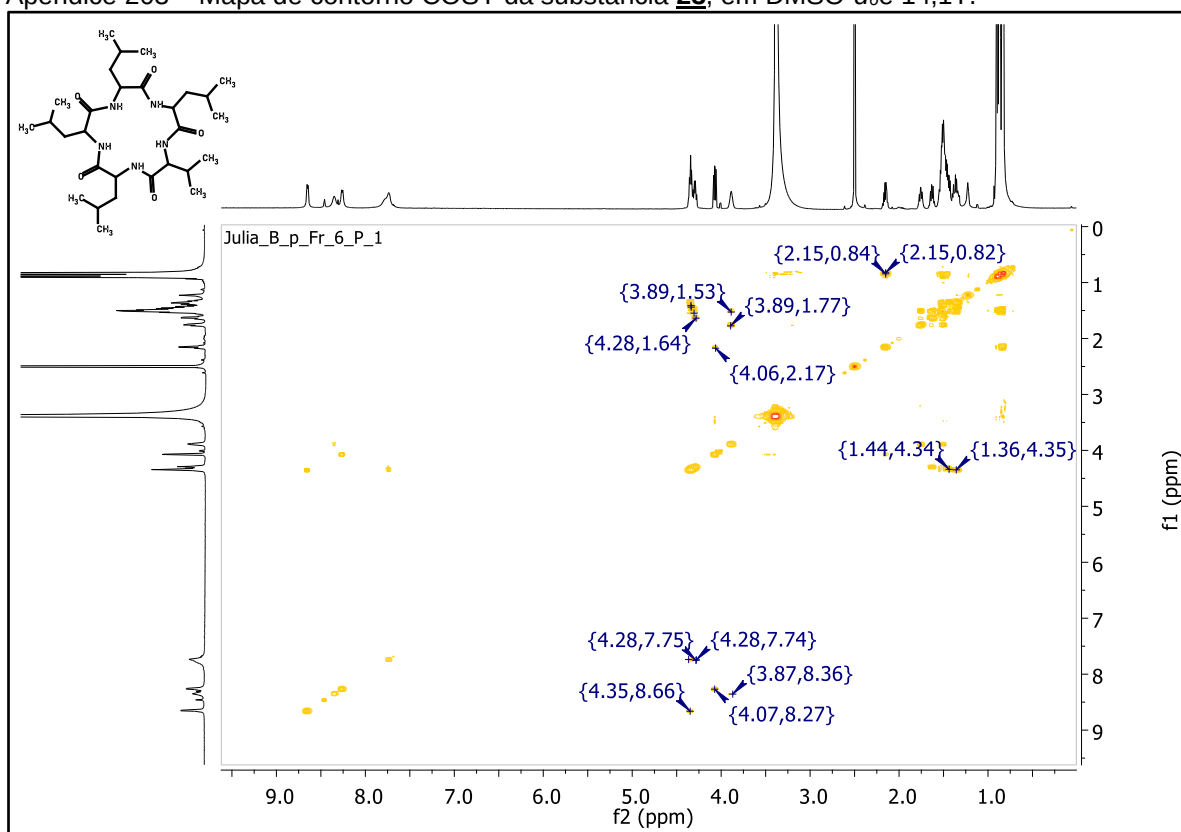
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 202 – Mapa de contorno HSQC da substância **23**, em $\text{DMSO}-d_6$ 14,1T.



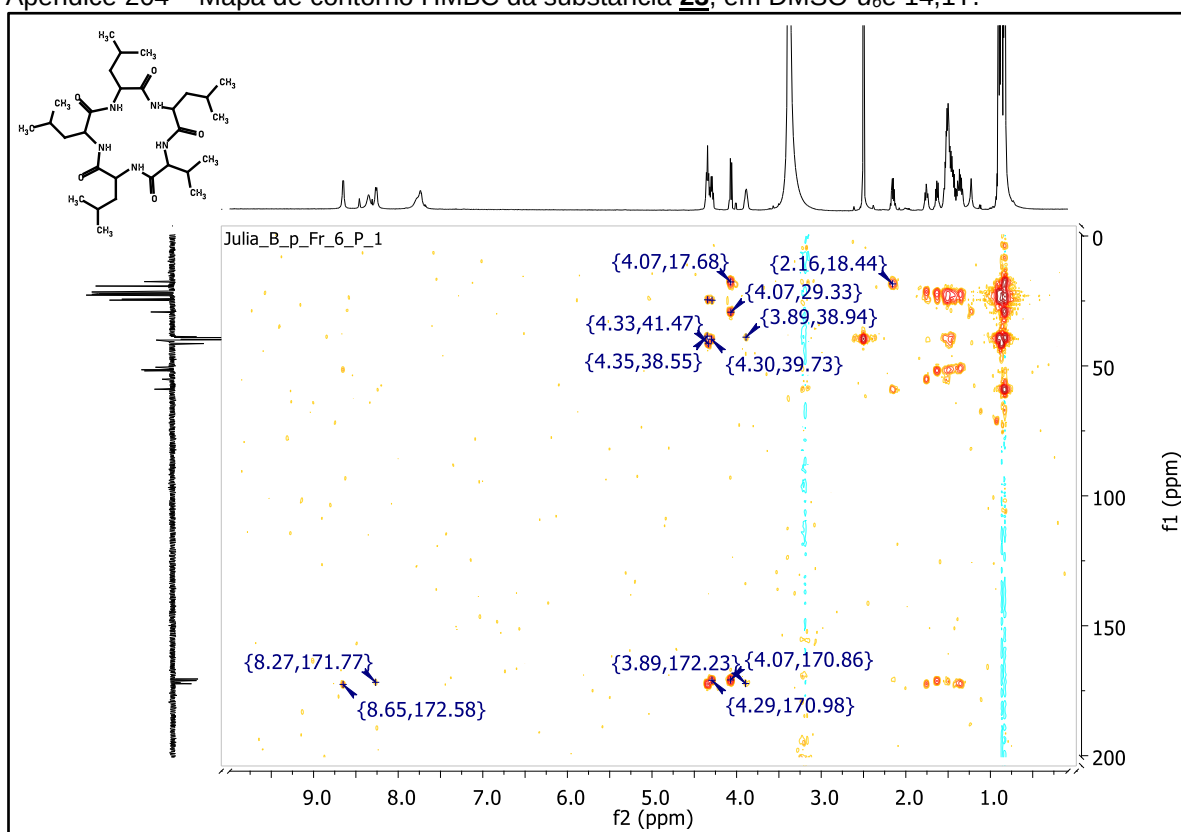
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 203 – Mapa de contorno COSY da substância **23**, em DMSO- d_6 e 14,1T.

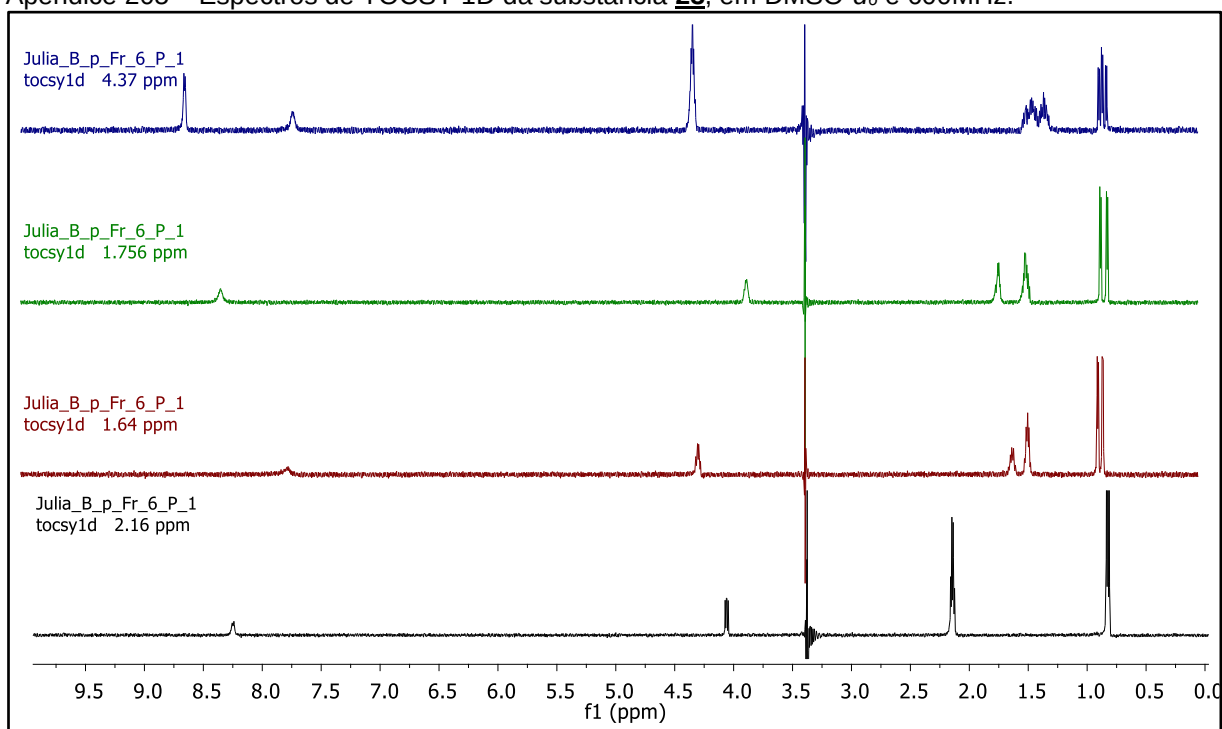


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

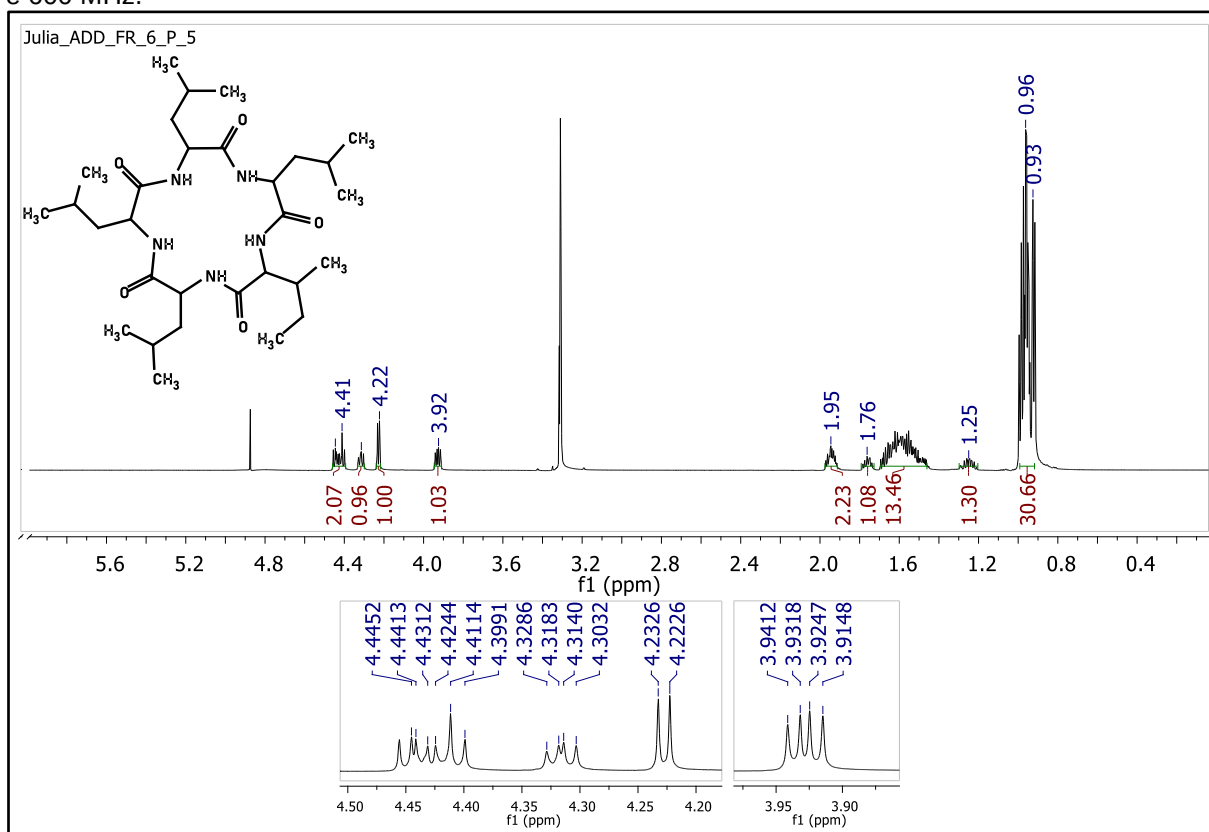
Apêndice 204 – Mapa de contorno HMBC da substância **23**, em DMSO- d_6 e 14,1T.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

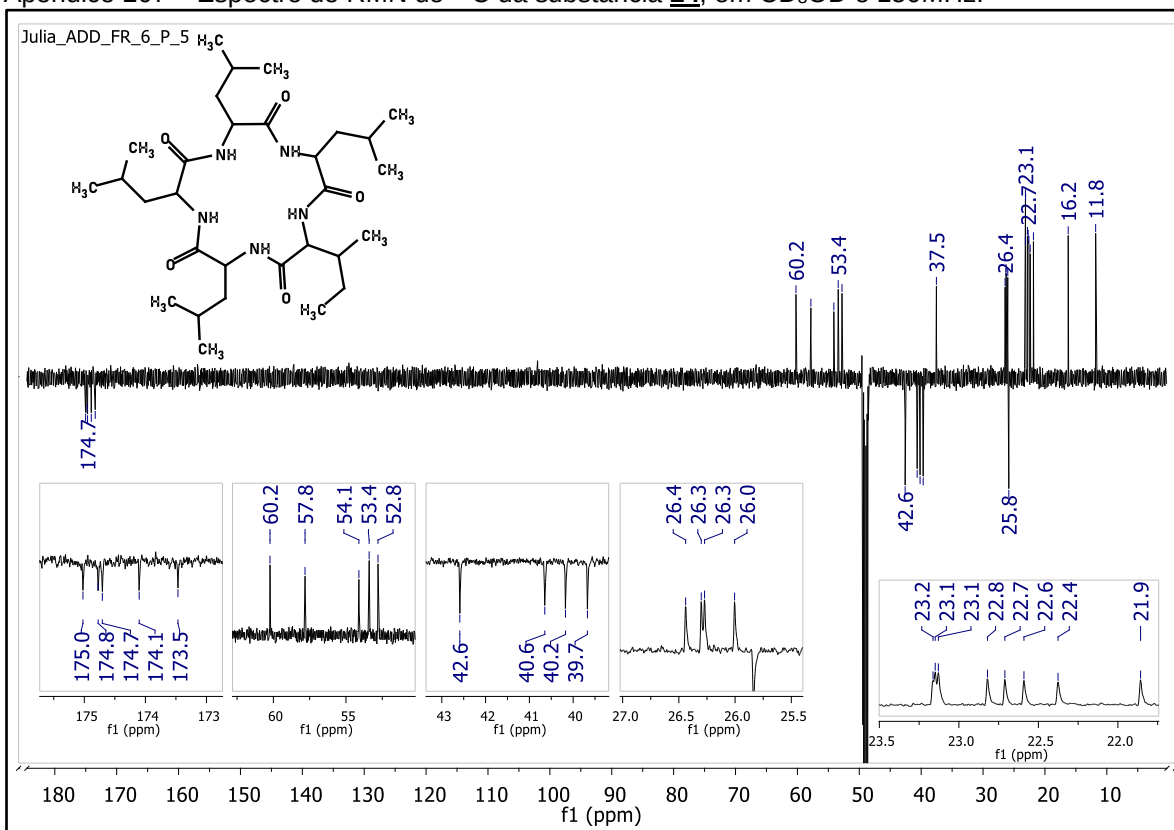
Apêndice 205 – Espectros de TOCSY 1D da substância **23**, em DMSO- d_6 e 600MHz.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 206 – Espectro de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, da substância **24**, em CD_3OD e 600 MHz.

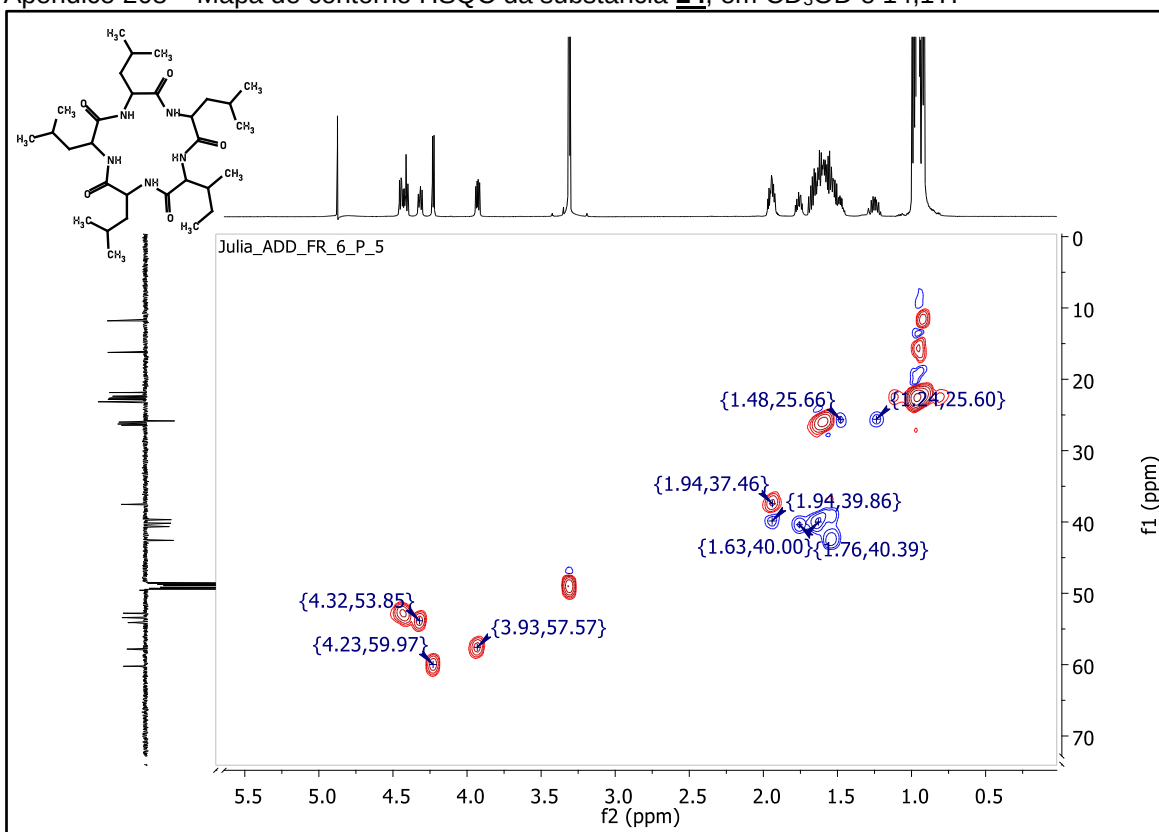
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 207 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **24**, em CD_3OD e 150MHz.



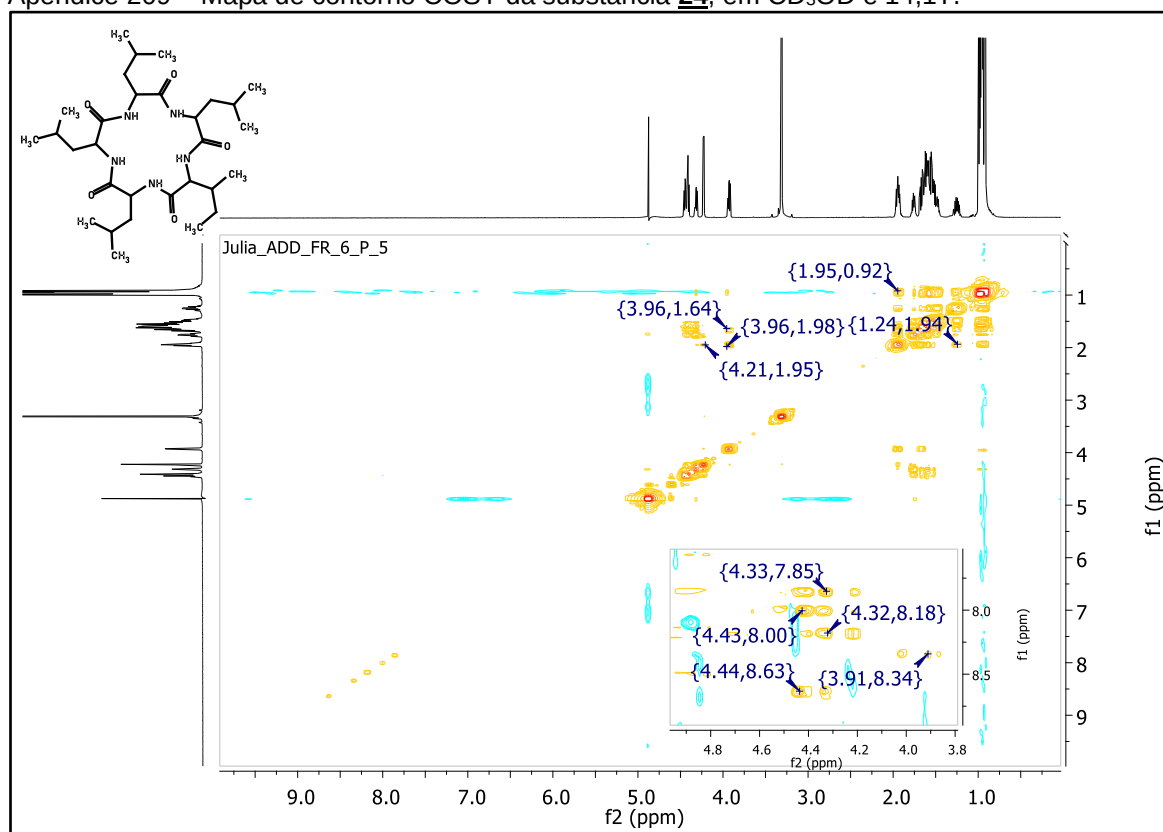
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 208 – Mapa de contorno HSQC da substância **24**, em CD_3OD e 14,1T.



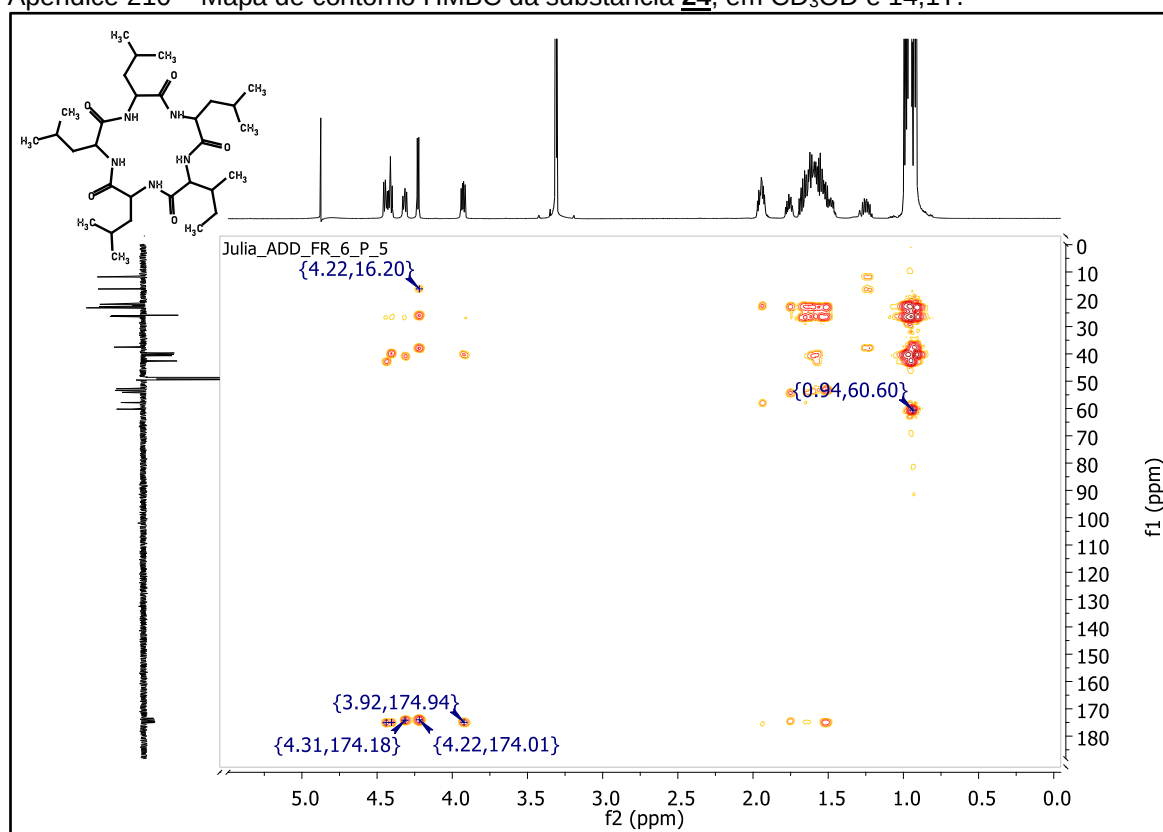
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 209 – Mapa de contorno COSY da substância **24**, em CD₃OD e 14,1T.

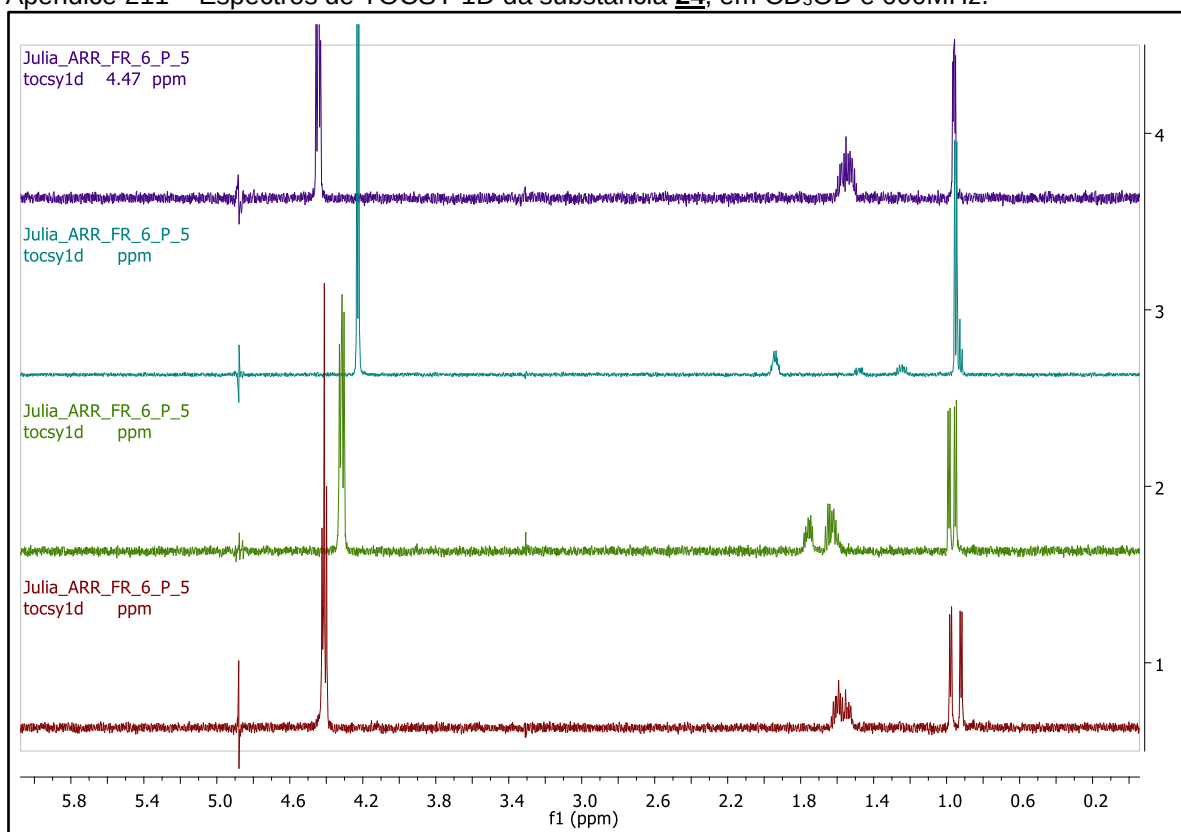


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

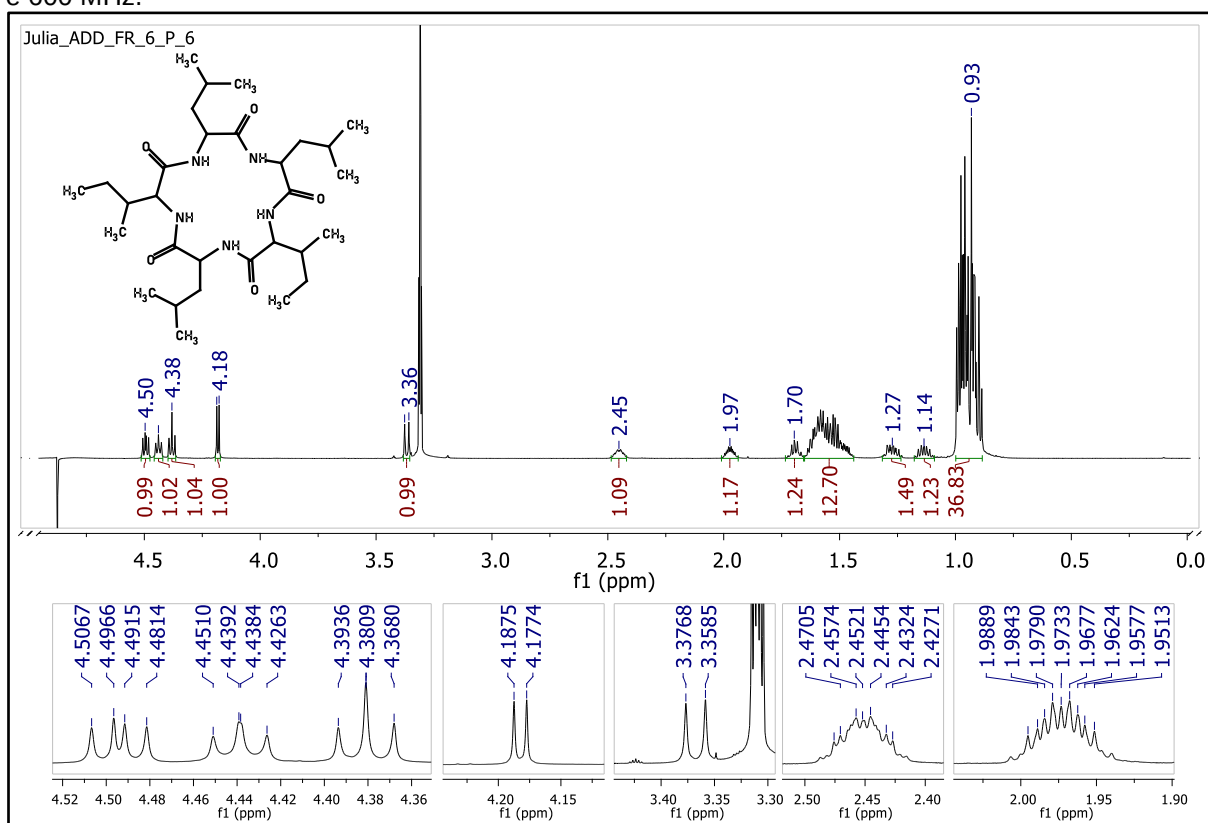
Apêndice 210 – Mapa de contorno HMBC da substância **24**, em CD₃OD e 14,1T.



Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

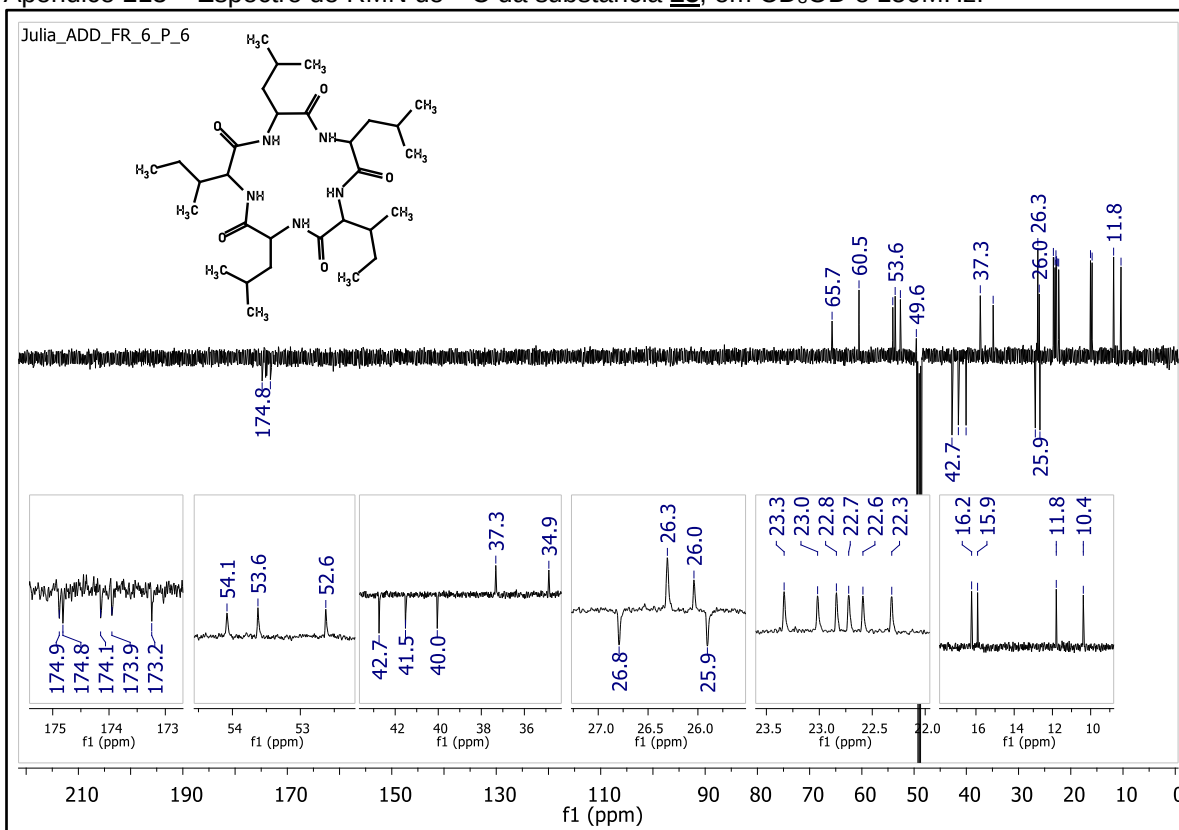
Apêndice 211 – Espectros de TOCSY 1D da substância **24**, em CD₃OD e 600MHz.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 212 – Espectro de RMN de ¹H, com supressão do sinal da água, da substância **25**, em CD₃OD e 600 MHz.

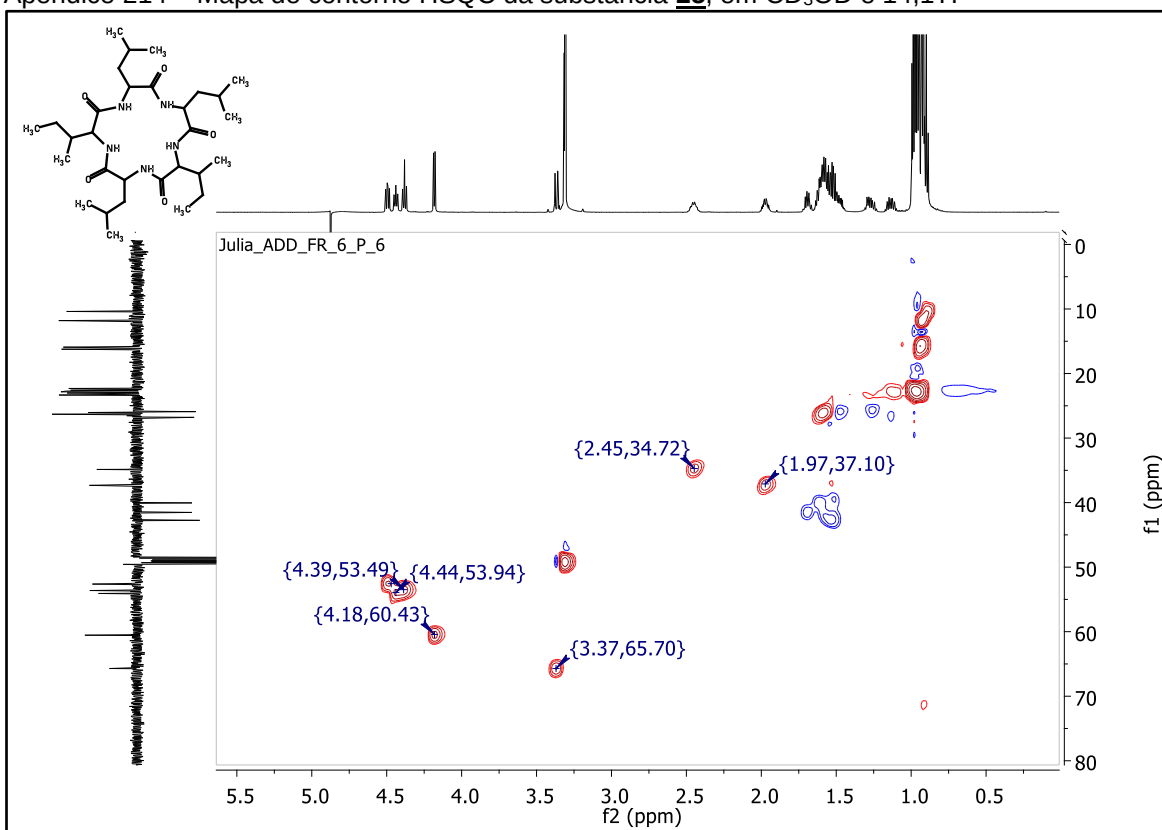
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 213 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **25**, em CD_3OD e 150MHz.

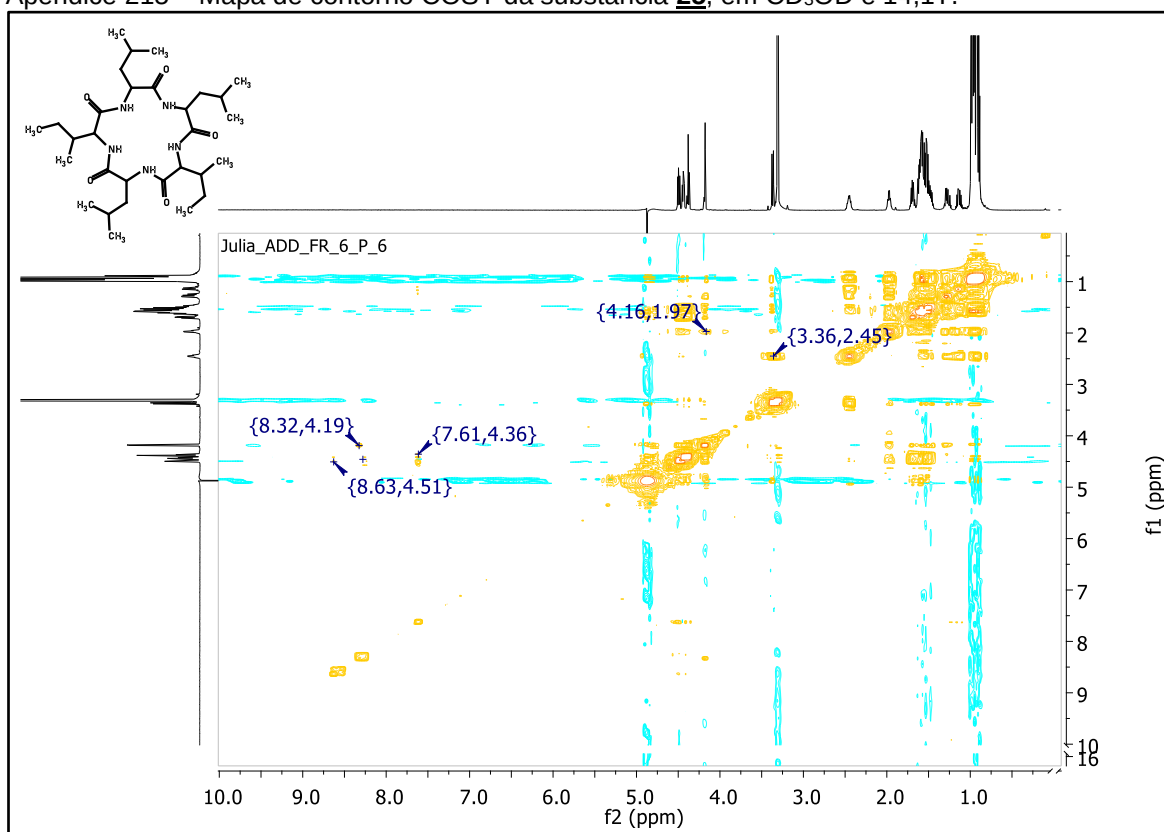


Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

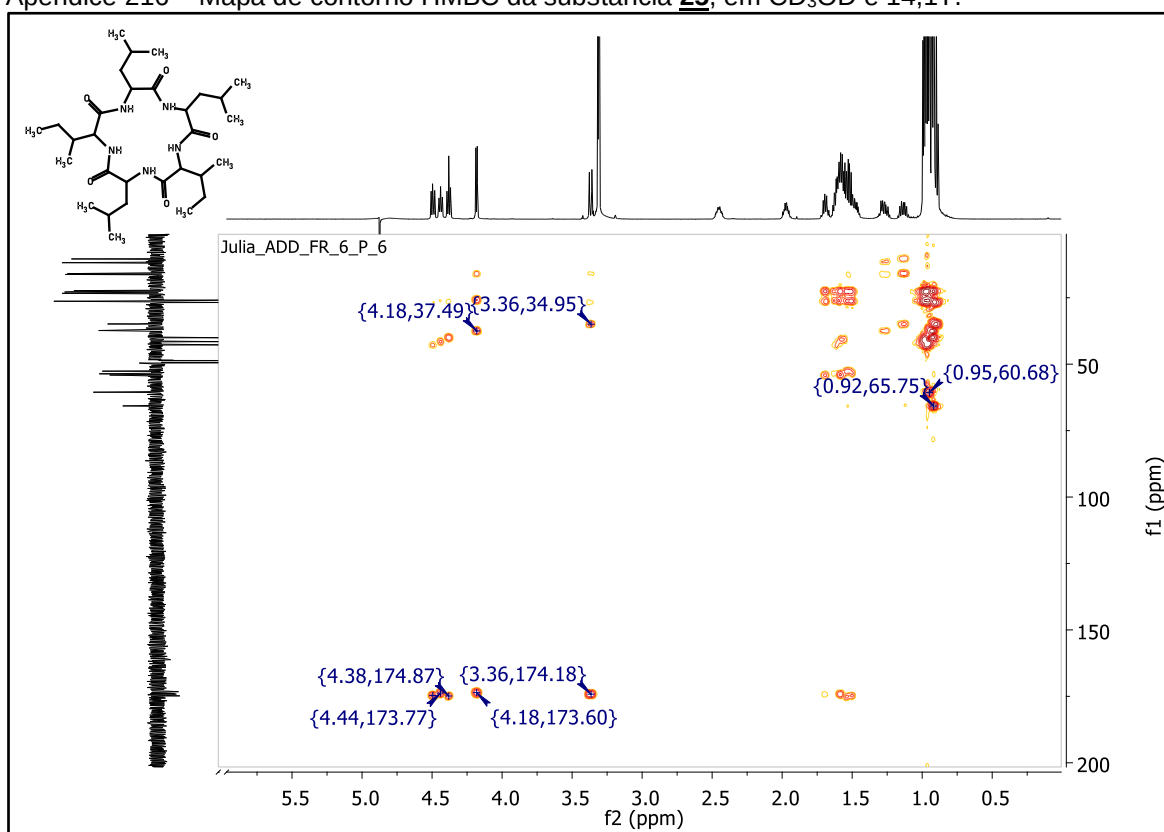
Apêndice 214 – Mapa de contorno HSQC da substância **25**, em CD_3OD e 14,1T.



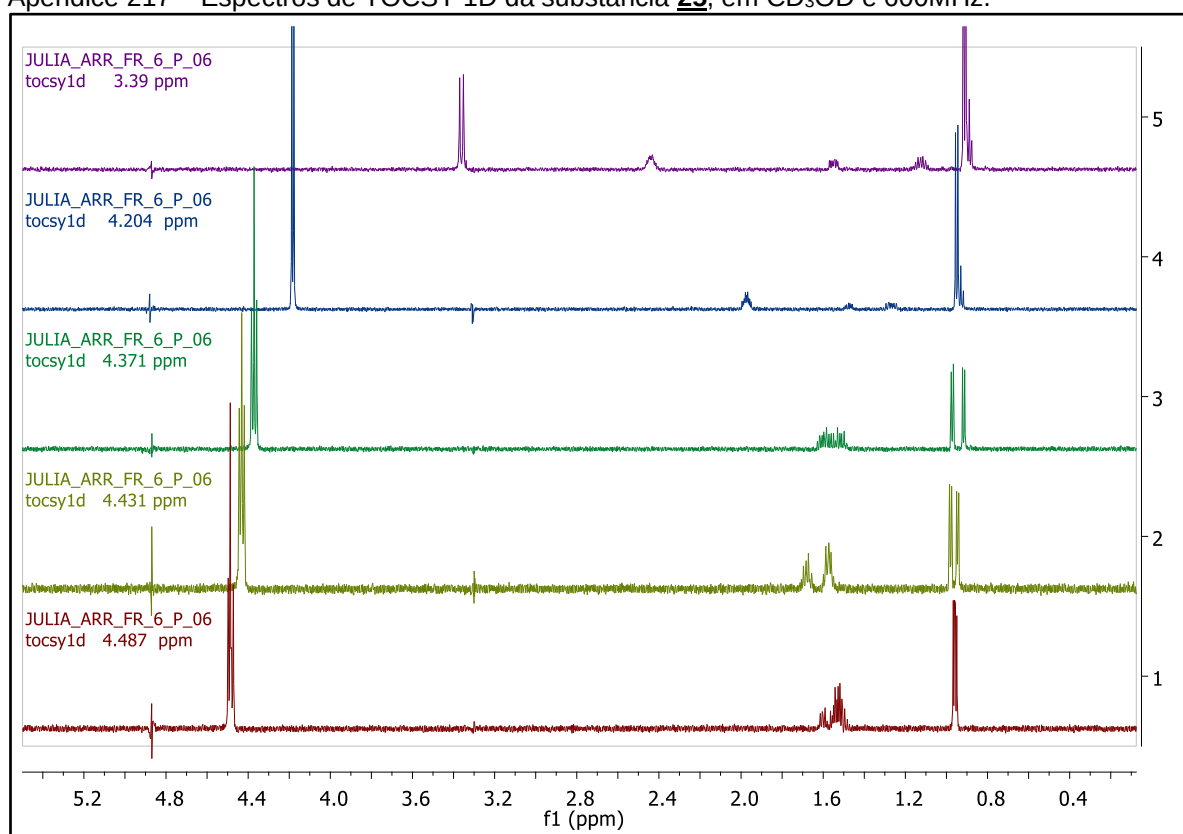
Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 215 – Mapa de contorno COSY da substância **25**, em CD₃OD e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 216 – Mapa de contorno HMBC da substância **25**, em CD₃OD e 14,1T.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.

Apêndice 217 – Espectros de TOCSY 1D da substância **25**, em CD₃OD e 600MHz.

Fonte: ilustração elaborada pela autora, 2020.