

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

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

MARIA DO CARMO GOMES LUSTOSA

Estudo metabólico e atividades biológicas de extratos
produzidos pelos fungos endofíticos *Preussia* sp. e *Phyllosticta*
sp. isolados de *Platonia insignis* Mart.

Araraquara

2023

MARIA DO CARMO GOMES LUSTOSA

Estudo metabólico e atividades biológicas de extratos produzidos pelos fungos endofíticos *Preussia* sp. e *Phyllosticta* sp. isolados de *Platonia insignis* Mart.

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

Orientadora: Profa. Dra. Angela Regina Araújo

Araraquara

2023

L972e

Lustosa, Maria do Carmo Gomes

Estudo metabólico e atividades biológicas de extratos produzidos pelos fungos endofíticos *Preussia* sp. e *Phyllosticta* sp. isolados de *Platonia insignis* Mart. / Maria do Carmo Gomes Lustosa. -- Araraquara, 2023

112 p. : il., tabs.

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

Orientadora: Angela Regina Araújo

1. Produtos naturais. 2. Compostos orgânicos voláteis. 3. Metabolômica. 4. Metabólitos. 5. Espectrometria de massa. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A pesquisa apresenta considerável impacto, uma vez que os fungos estudados produziram substâncias com propriedades antiparasitárias. Essas substâncias exibiram atividades promissoras no combate a leishmaniose e a doença de Chagas. O estudo dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelos endófitos, possibilitou a avaliação do co-cultivo desses fungos, que na natureza coexistem nas folhas de *Platonia Insignis* Mart (bacuri). Os resultados obtidos reforçam a necessidade de estudos para o aprofundamento de pesquisas realizadas com micro-organismos, pois estes foram isolados de uma planta da biodiversidade brasileira, que apresenta o rico potencial químico e biológico.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The research presents considerable impact, as the studied fungi produced substances with antiparasitic properties. These substances exhibited promising activities in combating leishmaniasis and Chagas disease. The study of volatile organic compounds produced by the endophytes enabled the evaluation of their co-cultivation, as they naturally coexist on the leaves of *Platonia Insignis* Mart (bacuri). The obtained results reinforce the need for further investigation of research conducted with microorganisms, as these were isolated from a plant of the Brazilian biodiversity, which presents rich chemical and biological potential.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Estudo metabólico e atividades biológicas de extratos produzidos pelos fungos endofíticos *Preussia* sp. e *Phyllosticta* sp. isolados de *Platonia insignis* Mart"

AUTORA: MARIA DO CARMO GOMES LUSTOSA

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 (Participação Virtual) 
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. LOURDES CAMPANER DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. GILVANDA SILVA NUNES (Participação Virtual)
Departamento de Tecnologia Química / Centro de Ciências Exatas e Tecnologia - UFMA - São Luís

Profa. Dra. MARIA HELENA SARRAGIOTTO (Participação Virtual)
Departamento de Química / Universidade Estadual de Maringá - UEM - Maringá

Profa. Dra. MARY ANN FOGLIO (Participação Virtual)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNICAMP - Campinas

Araraquara, 10 de julho de 2023

Dados curriculares

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Maria do Carmo Gomes Lustosa

Filiação: Francisco de Assis Lustosa e Maria do Carmo Fontenele Gomes

Nome em citações bibliográficas:

Lustosa, M. C. G.;

Lustosa, MARIA, C. G.;

Lustosa, Maria C. G.;

LUSTOSA, M.C.G.

Endereço Profissional:

Universidade Federal do Piauí (UFPI),

CAF- Floriano, PI, Brasil

Curso de Lic. em Ed. do Campo/Ciências da Natureza

Endereço eletrônico: carminhalustosa@ufpi.edu.br:

carminhalustosas@hotmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2018–2023 **Doutorado em Química**

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, SP, Brasil

Título da tese: “Exploração metabólica dos fungos endofíticos *Preussia* sp e *Phyllosticta* sp isolados das folhas de *Platonia insignis* Mart. na produção de substâncias com atividade biológica.”

Orientador: Prof^a. Dr^a. Angela Regina Araújo

2009 – 2012 **Mestrado em Química**

Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI, Brasil

Título da dissertação: “Análise Palinológica, Investigação da Composição Química de mel, própolis e pólen de *Apis mellifera* da região de Bela Vista-Piauí.”

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Antonia Maria das Graças Lopes Citó

2002 – 2005 **Licenciatura em Química**

Universidade Estadual do Piauí (UESPI), PI, Brasil

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

05/2015 – atual

Atividade de docência

Universidade Federal do Piauí (UFPI), Floriano, PI, Brasil
Servidor Público, Enquadramento Funcional: Professor, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

02/2006 a 04/2015

Atividade de docência

Secretaria de Estado da Educação do Estado do Piauí, Teresina, PI.
Servidor Público, Enquadramento Funcional: Professor, Carga horária: 40h

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

1. CUNHA, C. L.; ANTONIO, P. V. G.; **LUSTOSA, M. C. G.**; CRUZ, A. B.; HOLZBACH, J. C.; PEREIRA, D. H.; NASCIMENTO, I. R. Warmingins A, B and C, Three New Furofuran Lignans from *Aristolochia warmingii* Mast. (Aristolochiaceae). **J. Braz. Chem. Soc**, v.00, n°. 00, 1-7, 2023.
2. LIMA, L. K. F.; **LUSTOSA, M. C. G.**; ALMEIDA, W. S.; ANDRADE, N. C.; RAI, M.; FEITOSA, C. M.; DE LIMA, S. G. Chemical composition and anticholinesterase evaluation of aerial parts of *Crotalaria retusa*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 23, p. 1-11, 2022.
3. BARRETO, H. M.; SILVA FILHO, E. C.; LIMA, E. O.; COUTINHO, H. D. M.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; TAVARES, C. C. A.; TINTINO, S. R.; REGO, J. V.; DE ABREU, A. P.L.; **LUSTOSA, M. C. G.**; OLIVEIRA, R. W. G.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D. Chemical composition and possible use as adjuvant of the antibiotic therapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Industrial Crops and Products**, v.59, p.290 - 294, 2014.

4. LOPES CITÓ, A. M. G.; ARAÚJO, B. Q.; MONÇÃO, N. B. N.; COSTA, L. M.; ARCANJO, D. D. R.; LUSTOSA, M. C. G.; RODRIGUES, K. A. F.; CARVALHO, F. A. A.; COSTA, A. P. Chemical constituents and toxicological studies of leaves from *Mimosa caesalpinifolia* Benth., a Brazilian honey plant. **Pharmacognosy Magazine**.^{JCR}, v.10, p.456 - 462, 2014.

5. SANTOS, F. J. B.; COSTA JÚNIOR, J. S.; ALMEIDA, A. A. C.; LUSTOSA, M. C. G.; OLIVEIRA, J. S.; FERREIRA, P. M. P.; FREITAS, R. M. Chemical compounds and some acute toxicological parameters of *Bauhinia platypetala*. **Vedic Research International Phytomedicine**, v.1, p.56 - 63, 2013.

Capítulos de livros

1) CITÓ, A.M.G.L.; RÊGO, I.V.; LIMA JUNIOR, P.S.; LUSTOSA, M.C.G.; LUZ, C.F.P. análise palinológica e composição química de pólen e própolis de *Apis mellifera*. DOI 10.22533/AT.ED.3682001107 IN: JOSÉ MAX BARBOSA OLIVEIRA-JUNIOR, LENIZE BATISTA CALVÃO. (ORG.) A INTERFACE DO CONHECIMENTO SOBRE ABELHAS 2. PONTA GROSSA, PR: ATENA, 2020. ISBN 978-65-5706-436-8.

2) LEAO, E.S.; COSTA, M.F.; SANTOS FILHO, F.C.; LUSTOSA, M.C.G. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE ACESSOS DE PIMENTAS (*Capsicum* ssp). In: Ágata Laisa Laremborg Alves Cavalcanti; Mônica Núbia Albuquerque Dias; Jussira Candeira Spíndola Linhares. (Org.). Diálogos em educação do campo: experiências teórico-práticas. 1ed. Parnaíba: Acadêmica Editorial, 2021, p. 49.

Apresentação de trabalho e/ou palestra

- **Apresentação de trabalho (pôster)**

1. Apresentação de poster: MOLECULAR NETWORKING FOR IDENTIFICATION OF CYTOCHALASINS FROM ENDOPHYTIC FUNGUS PREUSSIA SP. 8th Brazilian Conference on Natural Products (BCNP) and XXXIV Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (RESEM), November 09-12, 2021.

2. Composição química e teor de fenóis e flavonoides de pólen e própolis de Bela Vista-PI. 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Sociedade Brasileira de Química SBQ. São Paulo. 2013.

3. 51º Congresso Brasileiro de Química. Constituintes voláteis de pólen de *Apis Mellifera* da região de Bela Vista (Pi). 2011.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

1. 8th BCNP- Brazilian Conference on Natural Products: *Molecular Networking for Identification of Cytochalasins from Endophytic Fungus Preussia sp.* (trabalho apresentado em congresso), nov. 2021.

2. XXXII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, realizado nos dias 20, 21 e 22 de outubro e 24 e 25 de novembro de 2020, na qualidade de Avaliadora dos trabalhos apresentados.

3. 7th Conference on Mass Spectrometry and 4th Proteomics Meeting. Dezembro de 2018.

4. III Jornada Acadêmica, II Mostra de Iniciação Científica Júnior e I Semana de Extensão. 2017. (Congresso). Floriano/PI

5. 54º Congresso Brasileiro de Química, Natal-RN, Brasil, 03 a 07 de novembro de 2014. (Congresso).

- **Supervisões científicas**

1) Elane Leão Rocha Lima, graduanda Lic. em Ed. do Campo/Ciências da Natureza. Projeto: Composição química, determinação de acidez e teor de vitamina C em acessos de *Capsicum* spp. Iniciação Científica desde 2016 a 2017 ICV/UFPI.

2) Daiana Ferreira de Macêdo, graduanda em Licenciatura em Química, EAD/UFPI. Orientação de TCC: A cozinha como um espaço para a descoberta e aplicação da Química, Ano: 2016.

3) João Carlos Galeno Sousa, graduando em Licenciatura em Química, EAD/UFPI. Orientação de TCC: Jogos didáticos no computador aplicados nas aulas de Química do 1º ano do ensino médio. Ano: 2016.

Dedico este trabalho a todos os que me ajudaram e acreditaram em mim ao longo desta caminhada, em especial a minha família, amigos, meus alunos e a minha orientadora professora Angela.

Agradecimentos

À Universidade Federal do Piauí (UFPI) por conceder meu afastamento para capacitação profissional e ao Instituto de Química (UNESP-Araraquara) pela oportunidade de realizar o meu Doutorado.

Ao CNPq e a FAPESP pelos financiamentos de pesquisa no Brasil.

À minha orientadora Profa. Dra. Angela Regina Araujo, pela oportunidade, confiança e ensinamentos compartilhados. Muito obrigada por me inspirar e me apresentar as moléculas produzidas por fungos endofíticos!

À equipe do Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo do (LQMC-IFSC-USP) pela parceria nos ensaios biológicos realizados.

Ao Prof. Dr. Alberto Cavalheiro por todo o ensinamento, discussões e questionamentos feitos durante a realização deste trabalho.

Aos professores do Instituto de Química pelos ensinamentos compartilhados. Aos funcionários da biblioteca e da pós-graduação pela competência e por serem sempre prestativos.

Aos doutores Nivaldo Boralle, Juliana Rodrigues e João Bronzel pelo auxílio técnico nas análises realizadas nos laboratórios do NuBBE e pelos ensinamentos sobre as técnicas. Ao Marquinhos pelo sorriso largo e por todo auxílio nos laboratórios.

À Isabella Cristhina Costa por ter me ajudado no manuseio dos fungos e à Natália Vieira por toda a ajuda nas análises de espectrometria de massas;

Ao Adriano dos Santos pela amizade, apoio, parceria e pelas figuras!

À Fernanda pela troca de conhecimento sobre GNPS e quimiometria e principalmente por todo seu apoio, incentivo e amizade.

À Camila Cunha pela sua amizade, apoio e parceria nos ensaios biológicos.

À Ana Zanata pelos conhecimentos compartilhados, pelo apoio e amizade.

Aos amigos do IQ UNESP em especial ao Bruno, Aninha, João Carlos e Larissa.
Obrigada pelos risos e conversas!

Aos amigos e colegas do NuBBE pela amizade e convivência, em especial a Carol Rabal, Julia, Givaldo, Edelson, Lucas, Rafael Viera, Ana Letícia, Weslei, Tony, Tiago, Rafael, Marcus, Wellington, Helena, Isabel, Gleize pelo companheirismo e ajuda. Perdão se esqueci de alguém!

À minha família, em especial meus pais, irmãos, sobrinhas (Heloíse e Sophia) e minhas tias que sempre me apoiaram e incentivaram a prosseguir nos estudos.

“No coração da ciência existe um equilíbrio essencial entre duas atitudes aparentemente contraditórias: uma abertura para ideias novas, por mais bizarras ou contrárias à intuição que sejam, e o exame cético mais implacável de todas as ideias, antigas e novas. É assim que verdades profundas são separadas de disparates profundos.”

(Carl Sagan)

*“Recomece, se refaça,
relembre o que foi bom,
reconstrua cada sonho,
redescubra algum dom,
reaprenda quando errar,
rebole quando dançar,
e se um dia, lá na frente, a vida der uma ré,
recupere sua fé e RECOMECE novamente.”*

(Bráulio Bessa)

RESUMO

O estudo dos fungos endofíticos (FE) isolados das folhas de *Platonia insignis* Mart, popularmente conhecida como bacuri, o que resultou, entre outros, no isolamento dos FE *Phyllosticta* sp e *Preussia* sp. Estes foram cultivados em diferentes meios e os extratos obtidos, avaliados quanto ao perfil químico e biológico (ensaios antiglicante, antileishmania, tripanocida e citotóxico) a fim de direcionar o isolamento e a identificação de substâncias bioativas. No estudo realizado por GC-MS com os extratos do fungo *Preussia* sp. foram anotadas duas dicetopiperazinas. A desrepliação dos extratos de *Preussia* sp. foi realizada pelo uso da plataforma GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking), utilizando dados espectrais obtidos por UPLC-Q-TOF-MS/MS. Relatou-se a anotação putativa do cluster de citocalasinas: citocalasina J, citocalasina B e ascocalasina no extrato de Czapek. Os extratos e frações foram testados contra o protozoário *Leishmania infantum* sendo que os extratos de *Preussia* sp. de Czapek (76%) e frações F6 (91%) e F7 (70%) do extrato PDB apresentaram alta porcentagem de inibição comparáveis ao controle positivo miltefosina (98%). Os extratos e frações dos fungos estudados apresentaram substâncias com propriedades antiparasitárias, destacando as substâncias ferricrocina e ferricrisina isoladas do fungo *Phyllosticta* sp. que mostram potencial para atividade antileishmania, com IC_{50} entre 5,31 – 8,51, respectivamente. Realizou-se também, estudo de compostos orgânicos voláteis microbianos (mCOVs), visto que é uma área de pesquisa recente em desenvolvimento com impacto nas áreas: agrícola, médica e biotecnológica. Assim, estudamos os COVs produzidos pelos dois FE (*Phyllosticta* sp e *Preussia* sp.) e seu co-cultivo em duas condições de luminosidade (com e sem luminosidade) e tempo de cultivo (10 e 20 dias), que foram avaliados por microextração em fase sólida (HS-SPME-GC-MS). Os dados de GC-MS foram analisados por ferramentas estatísticas uni e multivariadas, como análise de componentes principais (PCA), análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e abordagem metabolômica para identificar os COVs produzidos pelos dois fungos em culturas axênicas e co-cultivo. O conjunto de dados obtido foi analisado combinando a rede molecular gerada a partir dos dados de GC-MS com uma análise multivariada não-alvo, a fim de identificar as variações metabólicas ocorridas no perfil dos COVs. Identificou-se 23 COVs, como: álcoois 26%, hidrocarbonetos alifáticos 26%, ésteres 21,8%, cetonas 17,5% e outras classes 8,7%. O 3-metilbutan-1-ol e o álcool 2-feniletílico foram emitidos em todas as culturas axênicas (*Phyllosticta* sp. e *Preussia* sp.) e co-cultivo dos fungos.

O éster 2-etil-hexanoato de metila foi identificado como composto majoritário do co-cultivo produzido por *Phyllosticta* sp. Uma análise multivariada dos dados foi realizada para visualizar tendências de agrupamento entre amostras e possíveis variáveis dispersas que pudessem distinguir entre culturas axênicas e co-cultivo. Deste modo, O gráfico de PCA indicou que não houve separação entre os COVs emitidos por F3 (*Phyllosticta* sp.) na cultura axênica e durante o co-cultivo, indicando semelhanças entre os COVs produzidos por esses grupos. Conforme os dados apresentados pelas variáveis VIP os voláteis que mais contribuíram para a descrição dos grupos foram as variáveis: 2-etil-hexanoato de etila, 3-metil-but-2-enoato de etila, nona-2-ona e undecan-2-ona. Os dados deste estudo contribuem para o conhecimento dos perfis metabólicos e biológicos de fungos endofíticos bem como suas interações com a planta hospedeira.

Palavras-chave: Fungos endofíticos. Citocalasinas. Sideróforos. Compostos Orgânicos Voláteis. GNPS.

ABSTRACT

The study of endophytic fungi (EF) isolated from the leaves of *Platonia insignis* Mart, commonly referred to as bacuri, which resulted, among others, in the isolation of EF *Phyllosticta* sp. and *Preussia* sp. These were cultivated in different media and the extracts obtained were evaluated for their chemical and biological profile (antiglycant, antileishmanial, trypanocidal and cytotoxic assays) in order to direct the isolation and identification of bioactive substances. In the study conducted using GC-MS with extracts of the fungus *Preussia* sp., two diketopiperazines were identified. The dereplication of *Preussia* sp. extracts was carried out using the GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) platform, employing spectral data obtained by UPLC-Q-TOF-MS/MS. Putative annotation of the cytochalasin cluster was reported: cytochalasin J, cytochalasin B and ascochalasin in the czapek extract. The extracts and fractions were tested against the protozoan *Leishmania infantum*, with *Preussia* sp. extracts from czapek (76%) and fractions F6 (91%) and F7 (70%) of the PDB extract showing high inhibition percentages comparable to the positive control miltefosine (98%). The extracts and fractions of the studied fungi presented substances with antiparasitic properties, with particular emphasis on the compounds ferricrocin and ferrichrysin isolated from the fungus *Phyllosticta* sp. These compounds demonstrated potential antileishmanial activity, with IC₅₀ values ranging from 5.31 - 8.51, respectively. In addition, a study of microbial volatile organic compounds (mVOCs) was conducted, as it represents a recent and developing research area with implications in agricultural, medical, and biotechnological fields. Therefore, we investigated the VOCs produced by the two endophytic fungi (*Phyllosticta* sp. and *Preussia* sp.) and their co-culture under two lighting conditions (with and without luminosity) and different cultivation times (10 and 20 days). The evaluation was performed using solid-phase microextraction (HS-SPME-GC-MS). The GC-MS data were analyzed using both univariate and multivariate statistical tools, such as Principal Component Analysis (PCA), Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA), and a metabolomics approach, to identify the VOCs produced by the two fungi in axenic cultures and co-culture conditions. The dataset obtained was analyzed by combining the molecular network generated from the GC-MS data with a non-targeted multivariate analysis to identify the metabolic variations occurring in the VOCs profile. A total of 23 VOCs were identified, including alcohols (26%), aliphatic hydrocarbons (26%), esters (21.8%), ketones (17.5%), and other classes (8.7%). The compounds 3-methylbutan-1-ol and 2-phenylethanol were emitted in all axenic cultures (*Phyllosticta* sp. and *Preussia* sp.) and

during the co-cultivation of the fungi. The 2-ethylhexanoate methyl ester was identified as the major compound in the co-culture produced by *Phyllosticta* sp. A multivariate analysis of the data was conducted to visualize clustering trends among samples and identify potential dispersed variables that could distinguish between axenic cultures and co-cultivation. Thus, the PCA plot indicated that there was no clear separation between the emitted VOCs by F3 (*Phyllosticta* sp.) in the axenic culture and during co-cultivation, suggesting similarities between the VOCs produced by these groups. According to the Variable Importance in Projection (VIP) analysis, the volatiles that most contributed to the grouping description were the variables: ethyl 2-ethylhexanoate, ethyl 3-methyl-2-butenate, nonan-2-one, and undecan-2-one. The data from this study contribute to the understanding of the metabolic and biological profiles of endophytic fungi, as well as their interactions with the host plant.

Key words: Endophytic fungi. Cytochalasins. Siderophores. Volatile Organic Compounds. GNPS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Exemplos de substâncias bioativas isoladas de fungos.....	27
Figura 2-Espécie vegetal hospedeira: <i>Platonia insignis</i> Mart. e o fruto bacuri	29
Figura 3- <i>Preussia</i> sp. cultivados em PDA, parte superior e inferior da placa, respectivamente	30
Figura 4-Exemplos de alguns metabólitos secundários encontrados no gênero <i>Preussia</i>	32
Figura 5- <i>Phyllosticta</i> sp. cultivados em PDA, parte superior e inferior da placa, respectivamente	33
Figura 6-Exemplos de alguns metabólitos secundários encontrados no gênero <i>Phyllosticta</i> ..	34
Figura 7-Co-cultivo dos endófitos <i>Preussia</i> sp. (fungo claro) e <i>Phyllosticta</i> sp. (fungo escuro) cultivados em PDA, parte superior e inferior da placa, respectivamente	38
Figura 8-Cultivo e obtenção dos extratos brutos em PDB e Czapek.....	46
Figura 9-Fracionamento do extrato bruto PDB de <i>Preussia</i> sp.....	47
Figura 10-Cultivo e fracionamento do extrato bruto do <i>Phyllosticta</i> sp.....	48
Figura 11-Isolamento das substâncias da fração XADF3, produzidas por <i>Phyllosticta</i> sp.....	48
Figura 12-Metodologia utilizada para aquisição e processamento dos dados.....	55
Figura 13-Alinhamento do DNA do fungo PI-F3 (<i>Phyllosticta</i> sp.)	58
Figura 14-Fita consenso para o fungo PI-F3 (<i>Phyllosticta</i> sp.).....	58
Figura 15-Alinhamento do DNA do fungo PI-F4 (<i>Preussia</i> sp.)	59
Figura 16-Fita de consenso para o fungo PI-F4 (<i>Preussia</i> sp.)	59
Figura 17-Cromatogramas do pico base (BPI) do extrato metanólico (A), do extrato PDB (B), do extrato czapek (C) e da fração acetoneitrila (D) do endófito <i>Preussia</i> sp., obtidos por UPLC-ESI-Q-TOF-MS no modo positivo	60
Figura 18-Cromatogramas do pico base (BPI) do extrato metanólico (A) e da fração XADF3 (B) do endófito <i>Phyllosticta</i> sp., obtidos por UPLC-ESI-Q-TOF-MS no modo positivo	61
Figura 19-Espectros de RMN de ¹ H dos extratos brutos de <i>Preussia</i> sp. nos diferentes meios de cultivo estudados, em DMSO-d ₆ e 600 MHz	62
Figura 20-Espectros de RMN de ¹ H da fração acetoneitrila e da fração XAD de <i>Phyllosticta</i> sp. em CD ₃ OD e 600 MHz	63
Figura 21-Cromatogramas de Íons Totais (TIC) para o extrato PDB do fungo <i>Preussia</i> sp ...	64
Figura 22-Cluster de Citocalasinas anotadas no extrato de Czapek de <i>Preussia</i> sp.	67
Figura 23-Percentual de inibição dos extratos de <i>Phyllosticta</i> sp. na formação de produtos finais da glicação (AGEs)	69

Figura 24- Porcentagem de inibição dos extratos de <i>Preussia</i> sp. na formação de produtos finais da glicação (AGEs).....	69
Figura 25- Porcentagem de inibição dos extratos e frações do endófito <i>Phyllosticta</i> sp. frente a <i>Leishmania infantum</i> ITMAP263	71
Figura 26- Porcentagem de inibição dos extratos e frações do endófito <i>Preussia</i> sp. frente a <i>Leishmania infantum</i> ITMAP263	72
Figura 27- Cromatogramas do extrato bruto de PDB de <i>Preussia</i> sp., $\lambda = 254$ nm	74
Figura 28- Cromatogramas da fração 5 (70% H ₂ O:MeOH) da coluna do ext. PDB de <i>Preussia</i> sp. a $\lambda = 254$ nm.....	74
Figura 29- Estrutura da substância 1 (Genisteína).....	75
Figura 30- Espectro de RMN de ¹ H da substância 1(CD ₃ OD, 600 MHz)	76
Figura 31- Mapa de contorno de COSY da substância 1(CD ₃ OD, 600 MHz).....	77
Figura 32- Espectro de massas para a substância 1	77
Figura 33- Espectros de massas para as substâncias XADF3-1(A) e XADF-3 (B).....	79
Figura 34- Espectros de massas MS/MS para as substâncias Ferricrocina (A) e Ferricrisina (B)	80
Figura 35- Gráficos de Pareto obtidos a partir do estudo das variáveis avaliadas durante o planejamento fatorial. A (tempo de extração), B (temperatura de dessorção) e C (tempo de dessorção)	81
Figura 36- Mapa das redes moleculares geradas pelo GNPS para os COVs emitidos pelas culturas axênicas e durante o co-cultivo. Na rede molecular, o tamanho do nodo é proporcional à abundância relativa de íons.	83
Figura 37- Diagrama de Venn mostrando os metabólitos anotados por GC-MS de cultura axênica ou co-cultivo de <i>Phyllosticta</i> sp e <i>Preussia</i> sp. Os números indicam os metabólitos descritos na Tabela 11	84
Figura 38- Gráfico da Análise de Componentes Principais (PCA)	86
Figura 39- Análise multivariada dos dados de GC-MS. (A) Gráfico de pontuação da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e (B) Gráfico de VIP escores	88
Figura 40- Gráfico do tipo boxplot (diagrama de caixa) referente aos COVs discriminantes analisados, utilizando o conjunto de dados de GC-MS.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Atividade biológica de alguns metabólitos isolados do gênero <i>Preussia</i>	31
Tabela 2-Atividade biológica de alguns metabólitos isolados do gênero <i>Phyllosticta</i>	34
Tabela 3-Meios de cultura utilizados para o cultivo dos endófitos <i>Phyllosticta</i> sp. e <i>Preussia</i> sp	41
Tabela 4-Parâmetros Experimentais aplicados ao planejamento fatorial para otimização das condições de análises dos COVs extraídos por HS-SPME-GC-MS.....	56
Tabela 5-Massas obtidas dos extratos nos meios de cultivos utilizados.....	60
Tabela 6-Metabólitos anotados por GC-MS para <i>Preussia</i> sp. em diferentes meios de cultivo	65
Tabela 7-Metabólitos identificados através da rede de interações moleculares (GNPS) para extratos de <i>Preussia</i> sp., analisados em modo positivo em diferentes meios de cultivo.....	66
Tabela 8-Percentual de inibição na triagem frente a <i>Trypanosoma cruzi</i>	70
Tabela 9-Atividade antileishmania de substâncias isoladas e citotoxicidade para (THP-1)....	73
Tabela 10-Dados de RMN de ¹ H, (CD ₃ OD, 600 MHz), δ em ppm e <i>J</i> em Hz.....	76
Tabela 11-COVs anotados em culturas axênicas e durante o co-cultivo de <i>Phyllosticta</i> sp e <i>Preussia</i> sp.	85

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AGEs	Acrônimo, em inglês para <i>Advanced Glycation End-Products</i>
COVs	Compostos Orgânicos Voláteis
C18	Sílica gel de fase reversa tipo Octadecil silano
CC	Cromatografia em Coluna
DDA	Data-dependent acquisition
d.i.	Diâmetro interno
GC-MS	Gas chromatography coupled mass spectrometry
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (Ionização por <i>electrospray</i>)
EtOH	Etanol
Grad.	Gradiente
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
HS-SPME-GC-MS	<i>Headspace Solid-Phase Microextraction/Gas Chromatography with Mass Spectrometry detection</i>
HPLC-PDA	<i>High Performance Liquid Chromatography - Photodiode Array Detector</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Fotodiodos)
m/z	Relação massa carga
MeOH	Metanol
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas)
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i>
PLS-DA	<i>Partial least squares-discriminant analysis</i>
Ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Rpm	Rotações por minuto
®	Marca registrada
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em fase sólida)
t_R	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1. 1 Fungos endofíticos	25
1. 2 Metabólitos bioativos	26
1. 3 Espécie vegetal hospedeira: <i>Platonia Insignis</i> Mart.....	28
1. 4 Gêneros: <i>Preussia</i> e <i>Phyllosticta</i>	29
1. 5 Compostos Orgânicos Voláteis: COVs	35
1. 6 Gêneros: Co-cultivo	37
1. 7 Desreplicação por LC-MS	38
2. Objetivos	40
3. Parte experimental	41
3. 1 Meios de cultivo.....	41
3. 2 Solventes e reagentes	41
3. 3 Equipamentos	42
3. 4 Metodologia.....	44
3.4.1 Obtenção da linhagem fúngica	44
3.4.2 Obtenção dos extratos brutos dos endófitos em PDB e Czapek	45
3.4.3 Fracionamento do extrato bruto de PDB do endófito <i>Preussia</i> sp.	46
3.4.4 Obtenção dos extratos brutos dos endófitos cultivados em meio sólido de milho.....	47
3.4.5 Derivatização de extratos fúngicos de <i>Preussia</i> sp. para análise em GC-MS	49
3.4.6 Análises por LC-MS.....	50
3.4.7 Processamento dos dados e construção das redes moleculares	51
3. 5 Ensaio biológico	52
3.5.1 Avaliação da atividade antiglicante	52

3.5.2 Avaliação in vitro da atividade anti-trypanosoma ¹	52
3.5.3 Avaliação in vitro da atividade antileishmania ¹	53
3.6 Determinação dos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por <i>Phyllosticta</i> sp. e <i>Preussia</i> sp	54
3.6.1 Condições da análise HS-SPME-GC-MS	55
3.6.2 Processamento de dados e construção das redes moleculares (molecular Networking GC-MS workflow).....	56
4. Resultados e discussões.....	58
4.1 Identificação genética dos fungos endofíticos.....	58
4.2 Produção dos extratos fúngicos	59
4.3 Perfil cromatográfico dos extratos brutos	60
4.4 Perfil químico (RMN de ¹ H) dos extratos brutos	61
4.5 Estudos dos metabólitos produzidos pelo endófito <i>Preussia</i> sp.....	63
4.6 Análises das Redes Moleculares-Molecular Networking (GNPS).....	65
4.7 Ensaio Biológicos.....	68
4.7.1 Avaliação da atividade antiglicante	68
4.7.2 Avaliação in vitro da atividade antitrypanosoma ¹	70
4.7.3 Avaliação in vitro da atividade antileishmania ¹	70
4.8 Identificação estrutural das substâncias produzidas pelos endófitos <i>Preussia</i> sp. e <i>Phyllosticta</i> sp.....	74
4.8.1 Identificação estrutural da substância produzida pelo endófito <i>Preussia</i> sp.	75
4.8.2 Identificação estrutural das substâncias produzidas pelo endófito <i>Phyllosticta</i> sp.	78
4.9 Estudo compostos orgânicos voláteis (COVs)	80
4.9.1 Triagem das variáveis.....	81
4.9.2 Identificação dos compostos orgânicos voláteis de <i>Phyllosticta</i> sp. e <i>Preussia</i> sp.	82

5. conclusões.....	92
REFERÊNCIAS	94

1. INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da humanidade tem-se usado produtos naturais como fonte de medicamentos para o tratamento de doenças. Plantas medicinais, micro-organismos, dentre outros organismos representam uma matriz prolífera de moléculas bioativas no processo de descoberta de fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2020; NEWMAN, 2022).

No Brasil, a pesquisa de produtos naturais concentra-se em explorar as plantas como fonte de biomoléculas, seguida pelo estudo de micro-organismos, principalmente fungos (BERLINCK *et al.*, 2017).

Metabólitos secundários são compostos de baixa massa molecular, com funções específicas, produzidos por plantas e/ou micro-organismos como uma forma de adaptação aos estresses biótico e abiótico. Esses metabólitos desempenham papel importante na sinalização, defesa, regulação da simbiose entre a planta e o micro-organismo (NISA *et al.*, 2015). Os produtos do metabolismo secundário exercem função significativa na complexa interação molecular entre plantas e micro-organismos, a qual abrange sinalização química positiva, neutra e negativa entre indivíduos da mesma espécie e de espécies diferentes. Alguns micro-organismos interagem positivamente com as plantas, como por exemplo, as micorrizas e os endófitos, entre outros. Essas interações fornecem benefícios a ambas as espécies como promoção do crescimento e disponibilidade de nutrientes para plantas, além de proteção e nutrientes para micróbios (CHAGAS *et al.*, 2018).

Os metabólitos secundários produzidos por fungos apresentam ampla diversidade estrutural química e de aplicações biológicas (XU *et al.*, 2023). Esses metabólitos pertencem a diversas classes químicas, tais como peptídeos, alcaloides, terpenos, esteroides, policetídeos, além de outras classes com uma variedade de atividades biológicas (hormonais, antibióticas, antitumorais, antifúngicas, citotóxicas, antivirais, imunossupressoras, antiparasitárias, etc) (KELLER, 2019; ZHENG *et al.*, 2021).

A descoberta da penicilina produzida pelo fungo *Penicillium crysogenum*, antibiótico que revolucionou o século XX, foi um marco na pesquisa de fungos. Baseada na estrutura molecular desse importante metabólito, a indústria farmacêutica desenvolveu novos antibióticos como ampicilina, amoxicilina e metecilina. Além da penicilina, outros metabólitos fúngicos como por exemplo, estatinas, ciclosporina e ácido micofenólico, têm sido usados desde o século passado para prolongar a vida humana (TAKAHASHI *et al.*, 2017; KELLER,

2019). Atualmente, estudos preliminares realizados com psilocibina demonstraram que este metabólito fúngico atua no combate a depressão (GUKASYAN *et al.*, 2022).

A necessidade de novos antibióticos, agentes quimioterápicos e agroquímicos para tratar infecções e doenças relacionadas a resistência de patógenos fomentou o interesse pela pesquisa sobre a química dos fungos endofíticos. Desse modo, a bioprospecção de fungos endofíticos tem atraído a atenção de pesquisadores, pois oferece a possibilidade de encontrar metabólitos secundários biologicamente ativos (MARTINEZ-KLIMOVA; RODRÍGUEZ-PEÑA, 2017; NEWMAN; CRAGG, 2020; NISA *et al.*, 2015).

Dessa maneira, realizar estudos químicos de fungos associados/isolados de plantas medicinais tem se tornando objeto de pesquisa e contribuído para o conhecimento da biodiversidade e do potencial biossintético de endofíticos como fonte de biomoléculas de interesse farmacêutico (MARTINEZ-KLIMOVA; RODRÍGUEZ-PEÑA, 2017).

1. 1 Fungos endofíticos

O termo endofíticos refere-se a micro-organismos, comumente fungos e bactérias, que vivem em órgãos, tecidos internos e espaços intercelulares sem causar sintomas de doenças em um período da vida do hospedeiro (MARTINEZ-KLIMOVA; RODRÍGUEZ-PEÑA, 2017; ZHANG; SONG; TAN, 2006; ZHENG *et al.*, 2021).

Os fungos endofíticos podem ser isolados de diferentes tecidos vegetais, como folhas, galhos, frutos e raízes presentes em todas as famílias de plantas e ecossistemas do planeta (MARTINEZ-KLIMOVA; RODRÍGUEZ-PEÑA, 2017; ZHENG *et al.*, 2021).

Endófitos apresentam relações mutualísticas com seus hospedeiros, como por exemplo, protegendo-os contra ataques de herbívoros, insetos ou outros patógenos invasores; em troca, a planta disponibiliza nutrientes. Fungos endofíticos interagem com outros micro-organismos colonizadores dos tecidos de plantas e exercem uma função importante mediando interações ecológicas (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012; ZHANG; SONG; TAN, 2006). Micro-organismos secretam moléculas que funcionam como sinalizadores químicos, realizando a comunicação entre espécies, fenômeno conhecido como *Quorum sensing* (QS), observado entre fungos, plantas e bactérias (CHAGAS *et al.*, 2018). Algumas leveduras secretam tirosol e farnesol como moléculas de sinalização QS, porém para os fungos filamentosos esse mecanismo ainda não está demonstrado quimicamente (CHAGAS *et al.*, 2018; MARTINEZ-KLIMOVA; RODRÍGUEZ-PEÑA, 2017).

MARTINEZ-KLIMOVA e colaboradores (2017) destacam a importância das pesquisas de propriedades antibióticas dos extratos orgânicos obtidos de diferentes fungos endofíticos como uma perspectiva de encontrar micro-organismos produtores de novos compostos bioativos, verificando uma variedade de extratos com valores de CIM (concentração inibitória mínima) adequados para justificar novos estudos.

1. 2 Metabólitos bioativos

A diversidade de espécies de fungos, bem como a diversificação dos *clusters* gênicos biossintético, ressaltam o potencial metabólico desses micro-organismos como fonte de moléculas bioativas (BILLS; GLOER, 2016). Os metabólitos secundários exercem um importante papel ecológico no desenvolvimento, na defesa e na guerra entre os micro-organismos (KELLER, 2019). Algumas moléculas, embora não sejam produzidas a partir de rotas do metabolismo secundário exercem função no metabolismo fúngico. Dentre essas moléculas, podemos citar o tirosol, produzido pelo micro-organismo *Candida albicans*, que atua como uma molécula de detecção de *quorum-sensing* estimulando a conversão da levedura em hifa (BILLS; GLOER, 2016).

O ácido kójico, um dos primeiros metabólitos fúngicos caracterizados, tem seu papel ainda desconhecido no ciclo de vida fúngico. Tal metabólito apresenta atividade antioxidante e inibidora da tirosinase, sendo usado na indústria de cosméticos para o tratamento de hiperpigmentação da pele (BILLS; GLOER, 2016).

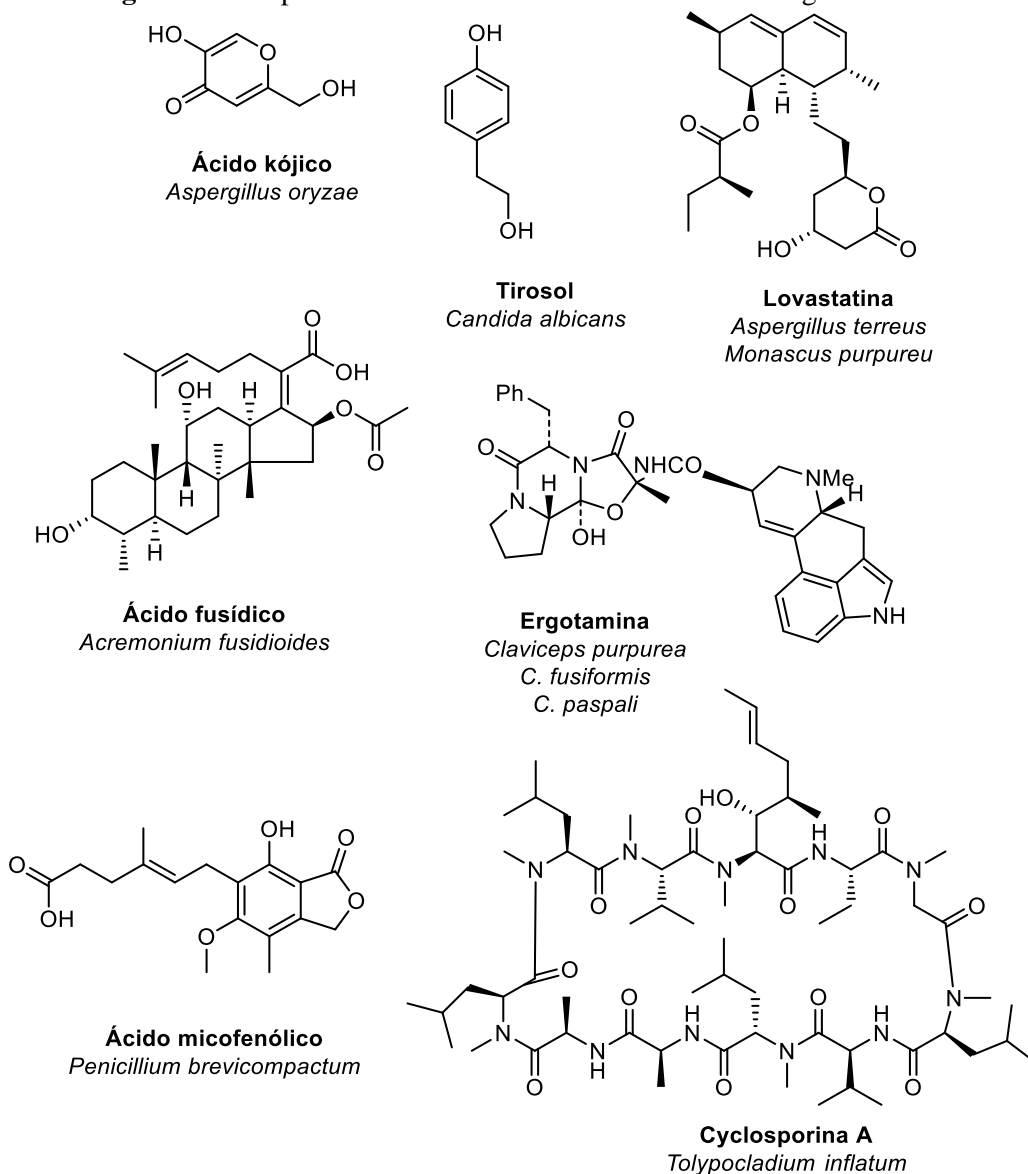
Algumas moléculas fúngicas, como por exemplo as micotoxinas, são conhecidas por contaminar alimentos e ambientes, enquanto outras possuem atividades biológicas que foram aplicadas na agricultura, na medicina e na indústria de alimentos (BILLS; GLOER, 2016; WANG *et al.*, 2017). Os fungos produzem um vasto número de metabólitos secundários que podem ser agrupados em diversas classes, incluindo alcaloides, policetídeos, terpenoides, esteroides, quinonas, fenilpropanoides, ésteres, entre outras (LI *et al.*, 2018; ZHANG; SONG; TAN, 2006).

Os policetídeos constituem a classe mais abrangente e diversificada de metabólitos secundários fúngicos. Esses metabólitos são biossintetizados a partir de um grande número de enzimas multifuncionais, conhecidas como policetídeo sintases (PKSs).

A Figura 1 ilustra importantes metabólitos produzidos por fungos. A lovastatina, usada no tratamento da hipercolesterolemia, é um exemplo de policetídeo, sendo comercializada

como Mevacor[®], Sinvastatin[®], dentre outras denominações. Um clássico exemplo de alcaloides produzidos por endófitos são os alcaloides do *ergot*, que estão associados às gramíneas e algumas espécies de *Convolvulaceae* conferindo às plantas resistência aos herbívoros. Esses alcaloides são micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Claviceps*, a partir da prenilação do triptofano. A ergotamina, vendida comercialmente como tartrato de ergotamina (Ergomar[®], Migril[®], etc.) tem sido usada como vasoconstritor no tratamento de enxaqueca (BILLS; GLOER, 2016; KELLER; TURNER; BENNETT, 2005).

Figura 1-Exemplos de substâncias bioativas isoladas de fungos



Fonte: ilustração elaborada pela autora.

* Todas as figuras foram elaboradas utilizando o *software* chemdraw versão 2020.

Fungos pertencentes aos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota* são prolíferos produtores de terpenoides. Ácido fusídico, produzido pelo fungo *Acremonium fusidioides*, apresenta esqueleto do tipo fusidano, tem sido usado como antibiótico no tratamento de infecções com bactérias Gram-positivas, sendo vendido com os nomes comerciais Usidin[®], Fucidin[®], entre outros (BILLS; GLOER, 2016). O ácido micofenólico, meroterpenoide sintetizado por alguns fungos do gênero *Penicillium*, tem sido empregado na produção de micofenolato de sódio (nome comercial: Myfortic[®]), e utilizado como medicamento para prevenir a rejeição após transplantes (BILLS; GLOER, 2016).

A ciclosporina A, um decapeptídeo sintetizado pelo fungo *Tolypocladium inflatum* via peptídeo sintetases não ribossomais (NRPS), é um importante fármaco usado no combate à rejeição de órgãos e tecidos, devido à sua atividade imunossupressora (BILLS; GLOER, 2016; KELLER, 2019).

1. 3 Espécie vegetal hospedeira: *Platonia Insignis* Mart

A espécie vegetal *Platonia insignis* Mart. é uma árvore frutífera e madeireira, originária da Amazônia Oriental Brasileira, encontrada em todos os estados da Região Norte do Brasil, além dos estados do Mato Grosso, Maranhão e Piauí. Pertence à família Clusiaceae, à subfamília Clusioideae e ao gênero *Platonia*. Também conhecida como bacuri, Figura 2, essa árvore tem o fruto bastante consumido no Nordeste brasileiro. Além do consumo do fruto, a sua utilização etnofarmacológica está associada ao uso de suas sementes no tratamento de doenças dermatológicas. A manteiga produzida a partir de sementes do fruto do bacuri é utilizada na produção de fitoterápicos e cosméticos (SOEIRO, VERGOTEN, BAILLY, 2022). Vários compostos fenólicos e xantonas têm sido isolados do fruto do bacuri, dos quais se destacam as garcinielliptonas FC. Essas substâncias foram isoladas tanto de sementes quanto dos frutos e apresentam uma variedade de atividades biológicas (SOEIRO, VERGOTEN, BAILLY, 2022). Diversos estudos foram realizados utilizando extratos (hexânico, etanólico e metanólico) do bacuri, nos quais foram identificadas várias atividades biológicas significativas. Entre essas atividades, destacam-se as propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, cicatrizantes, antileishmania e antiproliferativas (SANTOS *et al.*, 2013; YAMAGUCHI *et al.*, 2014; SOEIRO, VERGOTEN, BAILLY, 2022).

Figura 2-Espécie vegetal hospedeira: *Platonia insignis* Mart. e o fruto bacuri



Fonte: autora; Carolina-MA

1. 4 Gêneros: *Preussia* e *Phyllosticta*

Após uma revisão bibliográfica prévia, não foram encontrados estudos relacionados a endófitos de *Platonia insignis* Mart. Como resultado, a Dra. Isabella Cristhina G. Costa, membro do grupo de pesquisa Núcleo de Pesquisa sobre Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE), iniciou uma investigação para isolar e identificar fungos endofíticos provenientes de *Platonia insignis* Mart. Durante essa investigação, foram isoladas 18 linhagens puras de fungos endofíticos. Para o presente estudo, foram selecionados os fungos endofíticos pertencentes aos gêneros *Preussia* sp. e *Phyllosticta* sp., que foram isolados das folhas do bacurizeiro. Essa escolha foi baseada em resultados obtidos a partir da avaliação da atividade antibiofilme desses endófitos.

Os fungos pertencentes ao gênero *Preussia*, que são organismos filamentosos, foram isolados como fungos endofíticos em nosso grupo de pesquisa. Esses fungos foram encontrados associados à planta hospedeira *Casearia sylvestris* (SOMENSI, 2016). A Figura 3 ilustra o fungo *Preussia* sp. cultivado em PDA.

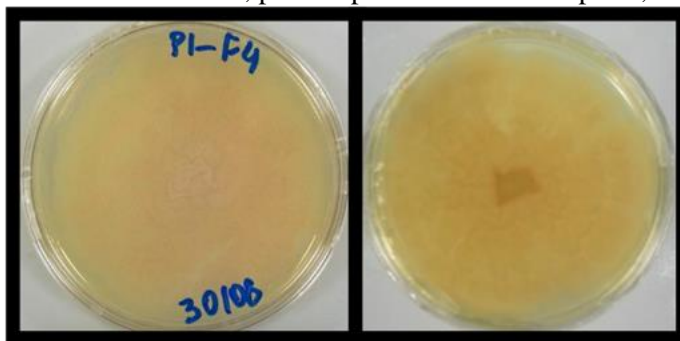
O gênero *Preussia*, descrito por Fuckel em 1866, pertence à família de fungos Sporormiaceae, amplamente distribuída e encontrada em esterco de animal, podendo ser isolados do solo, madeira, resto de plantas, sendo isolado ocasionalmente endófitos (GONZALEZ-MENENDEZ *et al.*, 2017; MAPPERSON *et al.*, 2014). A família Sporormiaceae compreende aproximadamente 100 espécies, divididas em dez gêneros, incluindo os gêneros

Forliomyces, *Sparticola*, *Chaetopreussia*, *Pleophragmia*, *Preussia*, *Pycnidiophora*, *Sporormia*, *Sporormiella*, *Spororminula* e *Westerdykella*, todos recentemente descritos. Os gêneros *Sporormiella* e *Preussia* são bastante ricos em espécies (GONZALEZ-MENENDEZ et al., 2017).

Os fungos do gênero *Preussia* têm sido relatados como endófitos de plantas coletadas em zonas áridas e desérticas. Mapperson e colaboradores (2014) identificaram várias espécies de *Preussia*, tais como *P. africana*, *P. australis*, *P. mínimos*, *P. cylindrica* e *P. funiculata*, tendo sido estas isoladas de folhas de plantas tropicais da Austrália (MAPPERSON et al., 2014). Um estudo realizado por González-Menéndez e colaboradores (2018), mediante isolamento de fungos encontrados em plantas de uma região árida da Espanha (Andalusia), resultou na identificação dos gêneros *Neocamarosporium* e *Preussia* como sendo os mais frequentes encontrados nas 63 espécies de plantas coletadas. Estudos realizados com amostras de caule e espinhos do cacto *Melocactus ernestii*, espécie nativa da Caatinga, resultou no isolamento dos fungos *Preussia* sp. e *Preussia minimoides* (FERREIRA-SILVA et al., 2021).

O gênero *Preussia* é conhecido por ser produtor de policetídeos bioativos, incluindo depsidonas. A espécie *Preussia similis* foi considerada uma rica fonte de compostos antifúngicos, como as similinas A e B e a preussomerina A (NOUMEUR et al., 2017).

Figura 3-*Preussia* sp. cultivados em PDA, parte superior e inferior da placa, respectivamente



Fonte: autora.

Os metabólitos secundários aurantinas, australifungina, ácido zaragózico B, terezinas e esporminarinas são conhecidos por serem produzidos exclusivamente por *Preussia* sp., enquanto que hialopirona, leptosina, cissetina, microsphaeropsona A podem ser produzidos por *Preussia* e por outros gêneros. Alguns compostos, como citocalasina, globosuxantona A e

brevianamida F, são produzidos somente pelas cepas *Australis*, *Intermedia* e *Minima* (GONZALEZ-MENENDEZ *et al.*, 2017).

Foram isolados da espécie *Preussia similis* novos policetídeos bicíclicos que apresentam atividade antiproliferativa, identificados como preussilidas A–F; da espécie *Preussia minimoides* foram identificados dois policetídeos, inibidores da enzima α -glicosidase, chamados de minimoidiones A e B, da espécie *Preussia sp.*, dois dibenzofuranos, possuindo atividades antiplasmodial e citotóxica, denominados preussiafuranos A e B; da espécie *Preussia africana*, o composto preussocromona A, com atividade citotóxica, e da *Preussia isomera*, seis biscetais aromáticos, conhecidos como preussomerinas A-F, que apresentam atividades antifúngica e antibacteriana (XU *et al.*, 2019).

A Figura 4 e a Tabela 1 apresentam um panorama do estudo químico e biológico realizado nos fungos do gênero *Preussia*.

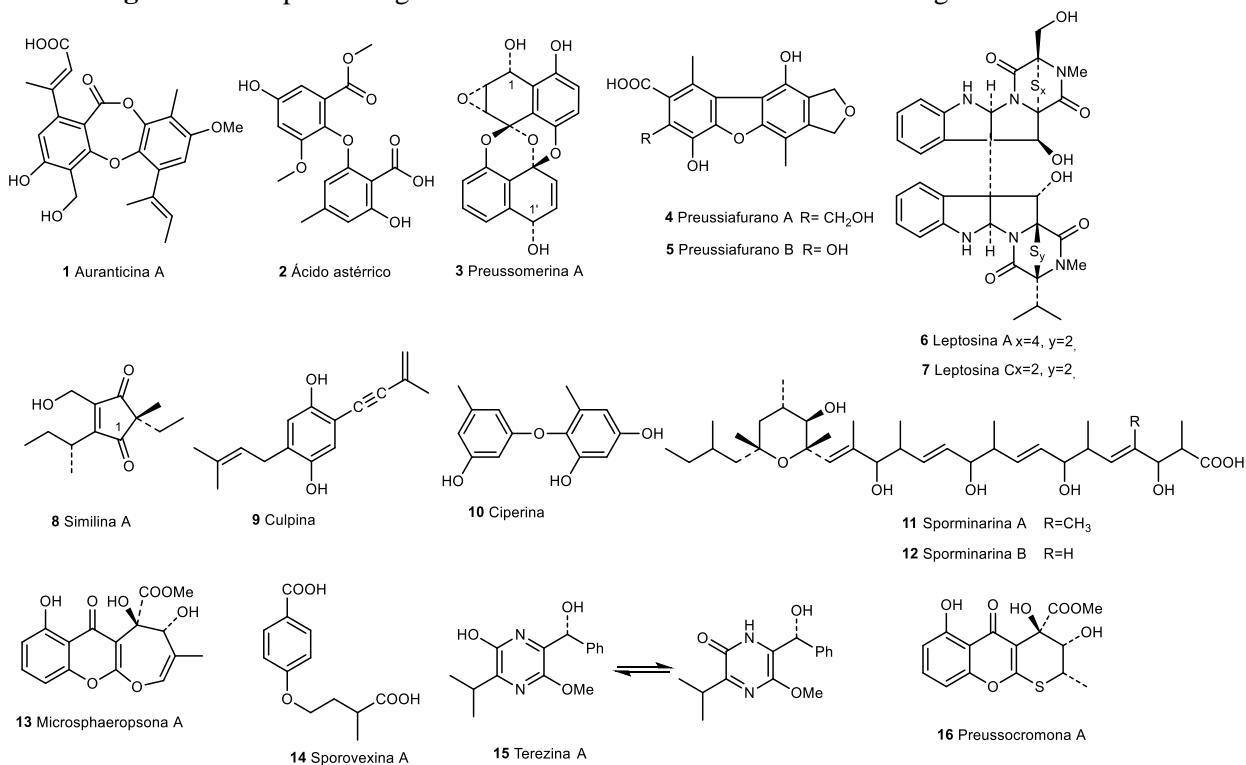
Tabela 1-Atividade biológica de alguns metabólitos isolados do gênero *Preussia*

Metabólitos	Espécie	Atividade biológica	Referências
1	<i>P. aurantiaca</i>	antifúngica e antibacteriana	GONZALEZ-MENENDEZ <i>et al.</i> , 2017
2	<i>Preussia sp.</i>	antiplasmodial	TALONTSI <i>et al.</i> , 2014
3	<i>P. isomera</i>	antifúngica e antibacteriana	GONZALEZ-MENENDEZ <i>et al.</i> , 2017
4,5	<i>Preussia sp.</i>	citotóxica	TALONTSI <i>et al.</i> , 2014
6,7	<i>P. typharum</i>	citotóxica	DU <i>et al.</i> , 2014
8	<i>P. similis</i>	antifúngica	GONZALEZ-MENENDEZ <i>et al.</i> , 2017
9	<i>Preussia sp.</i>	antifúngica e antibacteriana	GONZALEZ-MENENDEZ <i>et al.</i> , 2017
10	<i>P. fleischhakii</i>	fitotóxica	GONZALEZ-MENENDEZ <i>et al.</i> , 2017
11,12	<i>P. minimoides</i>	antifúngica	GONZALEZ-MENENDEZ <i>et al.</i> , 2017
13	<i>P. minima</i>	antifúngica	XIONG <i>et al.</i> , 2014
14	<i>P. vexans</i>	antifúngica e antibacteriana	SOMAN <i>et al.</i> , 1999
15	<i>P. teretispora</i>	antifúngica e antibacteriana	WANG <i>et al.</i> , 1995
16	<i>P. africana</i>	citotóxica	ZHANG <i>et al.</i> , 2012

Fonte: autora.

Em um estudo conduzido por Gonzalez-Menendez et al. (2017), foram identificados quatro metabólitos por meio da análise de bancos de dados de produtos naturais contendo compostos conhecidos. Esses resultados sugerem que o potencial do gênero *Preussia* para a descoberta de novos produtos naturais ainda não foi completamente explorado. Assim, destaca-se a grande diversidade e potencialidade de investigações químicas e biológica para este gênero.

Figura 4-Exemplos de alguns metabólitos secundários encontrados no gênero *Preussia*



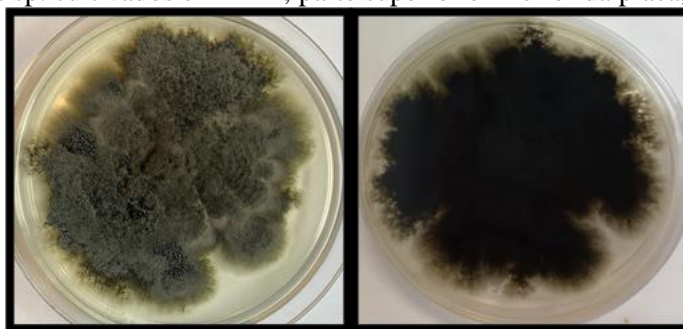
Fonte: ilustração elaborada pela autora.

Outro fungo estudado neste trabalho de doutorado pertence ao gênero *Phyllosticta*, forma sexuada *Guignardia*. Esse gênero pertence à família Phyllostictaceae e à ordem *Botryosphaeriales*, tendo sido introduzido por Persoon (1818). Algumas espécies de *Phyllosticta* têm sido reportadas como endófitos e sapróbios, enquanto que outras são patógenos associados às manchas foliares de várias espécies de plantas (WIKKEE et al., 2013; WULANDARI, 2013). Geralmente, algumas espécies de *Phyllosticta* são patógenos que se encontram associados a doenças de grande impacto econômico, como por exemplo, a *P. citricarpa*, que provoca a mancha preta em cítricos, *P. ampellicida*, causadora da podridão negra em videiras, e *P. musarum* que provoca a doença da sarda da banana (WIKKEE et al., 2013;

WANG *et al.*, 2020).

Algumas espécies de *Phyllosticta* têm sido descritas como endofíticas. Exemplos destas são: *P. bifrenariae*, *P. brazilianiae*, *P. capitalensis*, *P. ilicina*, *P. spinarum* e *Phyllosticta* sp., sendo isoladas de folhas, galhos e frutos de uma gama de espécies vegetais (WIKEE *et al.*, 2011). A espécie *P. capitalensis* tem sido isolada como endófito associado a *Citrus*; *P. bifrenariae*, de folhas e bulbos de plantas do gênero *Orchidaceae*, e a *P. brazilianiae*, de folhas e frutos de *Anacardiaceae* (WANG *et al.*, 2012; WIKEE *et al.*, 2011). A Figura 5 ilustra o fungo *Phyllosticta* sp., cultivado em PDA.

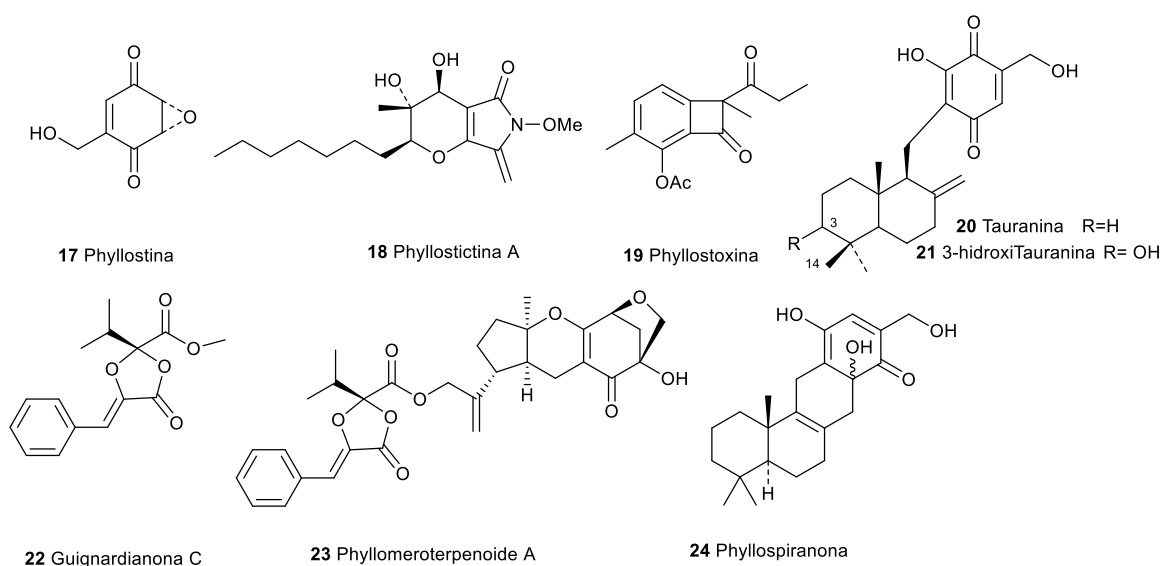
Figura 5-*Phyllosticta* sp. cultivados em PDA, parte superior e inferior da placa, respectivamente



Fonte: autora.

Investigações químicas realizadas para o gênero *Phyllosticta* indicam uma diversidade de classes de metabólitos secundários, tais como alcaloides, terpenos, meroterpenoides, policetídeos, benzofenonas, entre outros (MA *et al.*, 2019). Por exemplo, a produção de taxol por *P. dioscoreae* isolado de *Hibiscus rosa-sinensis* foi registrada por Wikee e colaboradores (2011). Um estudo realizado por Ma e colaboradores (2019) com o endófito *P. capitalensis* resultou na identificação de vinte meroterpenoides, tendo o guignardiona C apresentado atividade fitotóxica. Também foram isoladas moléculas com o esqueleto do tipo meroterpenoides, phyllomeroterpenoides A-C que apresentaram atividade antimicrobiana (YANG *et al.*, 2017).

Alguns metabólitos secundários produzidos pelo gênero *Phyllosticta* estão representados na Figura 6 e Tabela 2.

Figura 6-Exemplos de alguns metabólitos secundários encontrados no gênero *Phyllosticta*

Fonte: autora.

As espécies de *Phyllosticta* têm potencial para serem utilizadas como agentes de biocontrole de espécies invasoras. Como exemplo, tem-se o fungo *Phyllosticta cirsii*, que produz o grupo de moléculas das phyllostictina A-D que apresentam atividade herbicida contra a erva daninha *Cirsium arvense* (EVIDENTE *et al.*, 2008; WIKKEE *et al.*, 2011).

Tabela 2-Atividade biológica de alguns metabólitos isolados do gênero *Phyllosticta*

Metabólitos	Espécie	Atividade biológica	Referências
17	<i>P. cirsii</i>	antimicrobiana	EVIDENTE <i>et al.</i> , 2008; WIKKEE <i>et al.</i> , 2011; WANG <i>et al.</i> , 2020
18	<i>P. cirsii</i>	antimicrobiana, anticâncer, herbicida	EVIDENTE <i>et al.</i> , 2008; LE CALVÉ <i>et al.</i> , 2011
19	<i>P. cirsii</i>	herbicida	EVIDENTE <i>et al.</i> , 2008; WIKKEE <i>et al.</i> , 2011
20 e 21	<i>P. spinarum</i>	anticâncer	WIJERATNE <i>et al.</i> , 2008
22	<i>P. capitalensi</i>	fitotóxica	MA <i>et al.</i> , 2019
23	<i>Phyllosticta sp.</i>	antimicrobiana	YANG <i>et al.</i> , 2017
24	<i>P. spinarum</i>	inibição da proliferação celular	WIJERATNE <i>et al.</i> , 2008

Fonte: autora.

O potencial metabólico dos fungos endofíticos (*Preussia sp.* e *Phyllosticta sp.*) motivou o desenvolvimento de pesquisas envolvendo os compostos orgânicos voláteis emitidos pelas cepas, objetivando compreender a relação entre os endófitos, visto que ambos foram isolados da folha da espécie hospedeira.

1. 5 Compostos Orgânicos Voláteis: COVs

Micro-organismos (bactérias, arqueias, fungos e protistas) fabricam e excretam metabólitos com diferentes funções biológicas, além de liberarem também compostos orgânicos voláteis (COVs). Esses compostos podem se difundir nas fases gasosa e aquosa, sinalizando interações químicas rápidas. O estudo de compostos orgânicos voláteis microbianos (mCOVs) é uma linha de pesquisa recente em desenvolvimento, com impacto nas áreas agrícola, médica e biotecnológica. Os mCOVs são moléculas quimicamente diversas com papéis importantes e diversificados nas interações entre as comunidades microbianas e o ambiente. Apesar de estarem presentes em todos os habitats do planeta, existem poucas informações na literatura, sobre o papel biológico e ecológico dos mCOVs. Dos mCOVs identificados menos de 10% estão associados a alguma função biológica, ficando atrás em relação aos COVs de plantas e animais (LEMFACK *et al.*, 2018; WEISSKOPF; SCHULZ; GARBEVA, 2021).

Os aromas típicos de alguns tipos de queijos e de vinhos, o odor característico de cogumelos, bem como o cheiro de terra e lama, são produzidos e liberados por micro-organismos. Vários estudos têm estabelecido uma correlação entre os COVs identificados na respiração de pacientes com tuberculose e os COVs presentes nas culturas *in vitro* de *Mycobacterium tuberculosis*. Um exemplo é o nicotinato de metila, que é emitido tanto pela bactéria encontrada nos pulmões humanos quanto nas culturas em laboratório. Essa correlação tem implicações significativas para o desenvolvimento futuro de um método de diagnóstico não invasivo para a tuberculose (DU PREEZ; LUIES; LOOTS, 2019). Além disso, COVs emitidos por micro-organismos que crescem em ambientes fechados também são indicadores de contaminações que eventualmente podem causar danos à saúde humana (KORPI; JÄRNBERG; PASANEN, 2009). O COV 3-metilfurano, produzido por fungos, pode ser usado como um marcador de crescimento de micro-organismos em ambientes fechados e úmidos, já que tal composto contribui também para irritações nas vias respiratórias (WÄLINDER *et al.*, 2005).

Entre os COVs produzidos por fungos, o etanol ocupa posição de destaque, pois é produzido por leveduras durante a fermentação alcoólica. O COV produzido mais comumente produzido pelos fungos filamentosos é o oct-1-en-3-ol, gerado a partir da quebra do ácido linoleico (MARTINEZ; BENNETT, 2021).

Os voláteis microbianos são compostos de massa molecular menor que 300 Da, de baixa polaridade e de alta pressão de vapor, podendo ser liberados na atmosfera ou no solo. As

funções biológicas e ecológicas do mCOVs são diversas, e entre elas destacam-se a influência de processos fisiológicos em organismos alvo, a bioconversão, a produção de compostos de defesa, o papel no *quorum sensing* e também a atuação como sinais em comunicação química (PIECHULLA; LEMFACK, 2016).

Alguns COVs emitidos por fungos apresentam-se como semioquímicos que podem atrair ou afastar insetos e outros invertebrados. Além disso, na agricultura, COVs fúngicos têm sido usados no controle biológico, impedindo o crescimento de patógenos vegetais (MORATH; HUNG; BENNETT, 2012). Estudos realizados com os COVs investigaram o efeito desses metabólitos na promoção de crescimento de plantas (CAMARENA-POZOS *et al.*, 2021). Na indústria alimentícia, utiliza-se também uma mistura de COVs para impedir o crescimento de outros micro-organismos pós-colheita, processo chamado de micofumigação. Atualmente, os COVs de fungos são considerados como potencial fonte de biocombustíveis, conhecido como micodiesel (AQUINO MORAES; FERNANDES FERRAZ; MARA CHAPLA, 2020; MORATH; HUNG; BENNETT, 2012).

Os COVs fúngicos também podem ser aplicados na quimiotaxonomia. Como exemplo, tem-se o estudo de Larsen e Frisvald (1995), que comprovou que muitas substâncias voláteis podem ser utilizadas para promover a distinção entre membros do gênero *Penicillium* em nível de espécie (HUNG; LEE; BENNETT, 2015).

O oct-1-en-3-ol, conhecido como álcool de cogumelo, é um dos COVs emitidos por fungos mais relatados na literatura, e apresenta diferentes funções, como por exemplo o efeito fitotóxico em *Arabidopsis*, aumentando a resistência de plantas ao patógeno *Botrytis cineregand* (LEE *et al.*, 2015; PIECHULLA; LEMFACK, 2016).

Os fungos possuem um metabolismo muito versátil, o que permite sintetizar uma grande diversidade de classes de metabólitos, os quais são importantes não só para suas interações ecológicas como para sua sobrevivência (CALLA-QUISPE *et al.*, 2020). Os compostos orgânicos voláteis produzidos e liberados por fungos filamentosos são constituídos por uma mistura complexa de diferentes classes de metabólitos, tais como hidrocarbonetos simples, álcoois, aldeídos, cetonas, sesquiterpenos, lactonas, ésteres, terpenos, compostos aromáticos, tiois, dentre outros. Devido à natureza volátil, esses metabólitos atuam promovendo a auto-sinalização e na interação com outros organismos, como plantas e micróbios (AQUINO MORAES; FERNANDES FERRAZ; MARA CHAPLA, 2020; KLUGER *et al.*, 2013).

Os COVs microbianos podem ser formados durante os metabolismos primário e secundário, a partir da oxidação da glicose e de vários precursores, como acetato, aminoácidos,

ácidos graxos e cetoácidos. O metabolismo primário envolve uma série de reações químicas catalisadas por enzimas, que compreende a síntese de DNA, de aminoácidos e de ácidos graxos, enquanto que o metabolismo secundário baseia-se nas reações dos metabólitos primários. (KORPI; JÄRNBERG; PASANEN, 2009).

Mudanças no estado nutricional da cultura podem promover a expressão do metabolismo secundário ou desencadear a produção de compostos voláteis microbianos. Tem-se sugerido que a produção de alguns mCOVs fúngicos está associada à produção de micotoxina, como por exemplo, entre sesquiterpenos e aflatoxinas (KORPI; JÄRNBERG; PASANEN, 2009).

O estudo dos COVs fúngicos é importante para a compreensão das interações ecológicas. Com o objetivo de investigar a produção de COVs, Azzollini e colaboradores (2018b) desenvolveram uma estratégia para triagem de indução de COVs e metabólitos não voláteis em um co-cultivo fúngico empregando dois fungos causadores de doença em videiras (*Eutypa lata* e *Botryosphaeria obtusa*). Os autores empregaram a técnica de pré-concentração em *headspace*, seguida de análise por GC-MS para identificação dos COVs mediante a comparação de espectros de massas e dos índices obtidos com os dos padrões cromatográficos.

Lemfack e colaboradores (2018) disponibilizaram na *Web* um banco de dados chamado de mVOC 2.0, disponível no seguinte sítio: <https://bioinformatics.charite.de/mvoc/>. A base de dados mVOC 3.0, mais atualizada, contém cerca de 2.000 compostos de quase 1.000 espécies de micro-organismos. A coleção de compostos foi aumentada com dados sobre os efeitos mediados por mCOVs em plantas, fungos, bactérias e invertebrados. Tal banco de dados apresenta um localizador de espectros de massas, permitindo uma comparação rápida dos espectros obtidos a partir das culturas de micro-organismos, a fim de identificar os COVs. Essa ferramenta, além de agregar dados e refinar informações disponíveis, fornece uma plataforma abrangente e informativa sobre voláteis microbianos (LEMFACK *et al.*, 2018).

1. 6 Gêneros: Co-cultivo

O co-cultivo de micro-organismos é uma estratégia usada em metabolômica para induzir a produção de metabólitos fúngicos, podendo ser realizada em meios de cultivos sólidos ou líquidos (BERTRAND *et al.*, 2014). O co-cultivo é uma técnica baseada na fermentação mista

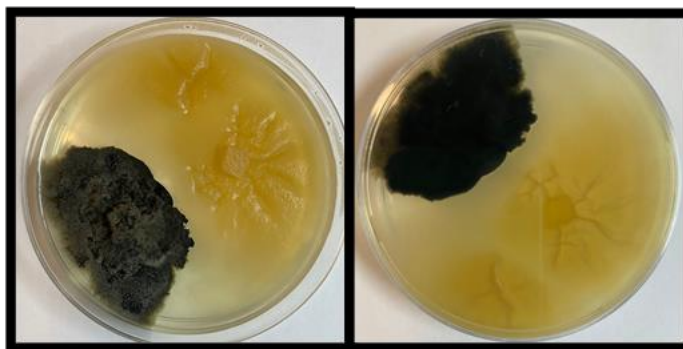
de duas ou mais cepas inoculadas juntas para imitar as interações entre os micro-organismos (CAUDAL; TAPISSIER-BONTEMPS; EDRADA-EBEL, 2022).

A Figura 7 apresenta fotos do co-cultivo dos endófitos *Preussia* sp e *Phyllosticta* sp. O co-cultivo com os endófitos foi realizado para acompanhar a emissão dos COVs produzidos pelos fungos, pois ambos foram isolados das folhas de *Platonia insignis* Mart., (COSTA, 2019).

Estudos realizados por Azzollini e colaboradores (2018) para investigar a emissão de compostos voláteis e não voláteis produzidos em co-cultivo fúngico de *Eutypa lata* e *Botryosphaeria obtusa* demonstraram que o COV nonan-2-ona possui atividade antifúngica.

A complexidade química dos extratos fúngicos requer métodos analíticos sofisticados e sensíveis, como por exemplo a espectrometria de massas, para a identificação de metabólitos em extratos (AZZOLLINI *et al.*, 2018; BERTRAND *et al.*, 2014).

Figura 7-Co-cultivo dos endófitos *Preussia* sp. (fungo claro) e *Phyllosticta* sp. (fungo escuro) cultivados em PDA, parte superior e inferior da placa, respectivamente



Fonte: autora.

1. 7 Desrepliação por LC-MS

A fim de observar a variação metabólica dos extratos, em função da variação dos meios de cultivo, foi realizada nesse trabalho a desrepliação por Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) das culturas dos fungos *Phyllosticta* sp e *Preussia* sp. Com o auxílio da base de dados criada para os fungos em questão,

a partir de compostos descritos na literatura e com espectros de massas obtidos pela técnica de LC-MS/MS foram verificados os perfis dos extratos fúngicos e identificados os COVs.

A partir da plataforma do GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*), disponível no sítio <http://gnps.ucsd.edu>) é possível gerar o *molecular networking*, uma abordagem de rede molecular, para obter informações químicas de um ou vários extratos. Essa plataforma associa os espectros MS/MS com base em perfil de fragmentação de massas similares baseada no conceito subjacente de que moléculas estruturalmente relacionadas se fragmentarão de maneiras semelhantes para dar padrões análogos (NAMAN *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2016a). Assim, a triagem de bioensaios combinado à rede molecular usando dados de LC-MS/MS constitui-se uma ferramenta de descoberta que agiliza o isolamento direcionado de um metabólito novo, pois associa com famílias estruturais específicas e com uma atividade biológica desejada (NAMAN *et al.*, 2017).

2. OBJETIVOS

Realizar estudos químicos e biológicos dos extratos brutos fornecidos pelos fungos *Phyllosticta* sp. e *Preussia* sp. isolados das folhas de *Platonia insignis* Mart.

- **Objetivos específicos:**

Cultivar em escala ampliada os fungos selecionados *Phyllosticta* sp. e *Preussia* sp., nos meios líquido PDB, Czapek e sólido (Milho), para obtenção dos respectivos extratos brutos;

Realizar a triagem química dos extratos brutos obtidos por RMN de ¹H, HPLC-PDA;

Realizar triagem biológica dos extratos brutos, pela avaliação das atividades anti-*Trypanosoma cruzi*, antileishmania, antiglicante e citotóxica;

Isolar, elucidar ou determinar a estrutura dos metabólitos secundários produzidos por *Phyllosticta* sp. e *Preussia* sp. utilizando técnicas cromatográficas e espectrométricas (RMN de ¹H e LC-MS);

Submeter as substâncias puras aos ensaios para avaliação das atividades antileishmania, antiglicante e citotóxica;

Identificar os compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos pelos fungos endófitos, em cultura simples e co-cultivo;

Fornecer subsídios para uma melhor compreensão da relação ecológica entre os fungos endofíticos e à espécie vegetal.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Meios de cultivo

A Tabela 3 apresenta os meios de cultivo utilizados para obtenção dos extratos produzidos pelos endófitos *Phyllosticta* sp. e *Preussia* sp.

Tabela 3-Meios de cultura utilizados para o cultivo dos endófitos *Phyllosticta* sp. e *Preussia* sp

Meios de cultura	Tipo	[] g.L ⁻¹	Composição	Fabricante
PDA	sólido	39	Fécula de batata (4g), dextrose (20g), ágar (15g)	Acumedia
Milho	sólido	1200	Milho de canjica branca	Yoki
PDB	líquido	24	Fécula de batata (4g), dextrose (20g) Sacarose (30g),	Acumedia
Czapek	líquido	35	NaNO ₃ (3g), Na ₂ (PO ₄) ₃ (1g), MgSO ₄ (0,5g), KCl (0,5g), FeSO ₄ (0,01g)	Kasvi

Fonte: autora.

3.2 Solventes e reagentes

Para a obtenção dos extratos brutos, realização das separações cromatográficas em coluna foram utilizados acetato de etila, metanol P.A, hexano e acetonitrila das marcas: J.T. Baker[®], Synth[®] e Qhemis[®]. Para as análises realizadas cromatográficas realizadas em HPLC e LC-MS os solventes utilizados foram metanol, acetonitrila e ácido fórmico (grau LC-MS) obtidos da Merck[®] (Darmstadt, Alemanha) e água ultrapurificada (Millipore[®], EUA) utilizados como componentes de fase móvel. Em análises de RMN1D e 2D utilizou-se os solventes deuterados: DMSO-d₆, CDCl₃ e CH₃OH-d₄(Aldrich, CIL e Deutero).

Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para as análises realizadas em CCDC foram utilizadas placas de sílica gel 60 G F254 analíticas (Macherey-Nagel: DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254).

Cromatografia em Coluna (CC)

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

3. 3 Equipamentos

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (HPLC-PDA)

As análises cromatográficas das amostras foram realizadas em um sistema analítico de cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC 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). Foi utilizada uma coluna analítica Phenomenex Luna com sílica tipo octadesil silano, C-18 (250 x 4,60 mm; 5 µm).

A purificação de frações utilizando HPLC-PDA em modo semipreparativo foi realizada em 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 semipreparativa (Phenomenex LUNA: 250 mm x 10,0 mm e 5 µm).

Sistemas cromatográficos acoplados a espectrometria de massas

a) HPLC-ESI-IT-MS Bruker Daltonics®

A análise do perfil químico cromatográfico dos extratos e frações foi realizada por espectrometria de massas utilizando o sistema LC Shimadzu®, com bomba LC-20AD e detector de Arranjo de Diodos SPD-M20A, com injetor automático SIL-20AHT e módulo de comunicação CBM-20A e degaseificador (DGU-20A3R) foi utilizado. Acoplado ao espectrômetro de massas ion-trap, amaZon-SL (Bruker Daltonics®), com ionização por electrospray (ESI), em modo positivo.

b) UHPLC-MS/MS

Para as análises de HPLC-MS 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 (PDA 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 o equipamento Xevo G2-XS QToF, com fonte de ionização Eletrospray (ESI); analisador Q-ToF (Quadrupole – Time of Flight) e software MassLinx. No processamento de dados, utilizou-se o software MassLinx da Waters®.

c) Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)

As análises de GC-MS foram realizadas em cromatógrafo a gás Shimadzu® (Modelo: QP2020; Ionização por Elétrons (EI); Autoinjeter: AOC-20i; Gás de arraste: hélio. Coluna: Shimadzu, Modelo: SH-Rtx-5MS (5 % difenil 95 % dimetilpolisiloxano). Dimensões: 30 m (comprimento) x 0,25 mm (diâmetro interno) x 0,25 μ m (espessura do filme).

Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN monodimensional: ^1H e bidimensional: COSY, foram realizadas em espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker® Avance III HD 600 (14,1 Tesla) com uma criosonda de 5 mm com detecção inversa (Triple Inverse TCI Cryo-probehead)

contendo pré-amplificadores resfriados para melhorar a sensibilidade; três canais dedicados, ^1H , ^{13}C e ^{15}N ; sistema de sintonia automática ATMA (*Automatic Tuning and Matching*); refrigeração BCU I (*Bruker Cool Unit*); bobina de gradiente em z (50 G cm^{-1}); e controle de temperatura (0 a $50 \text{ }^\circ\text{C}$) BSVT (*Bruker Smart Temperature Control*).

O preparo de amostra para os extratos brutos foi realizado a partir de 2 mg de cada extrato que foi solubilizado em 200 μL de CD_3OD ou DMSO-d_6 e centrifugado, e então o sobrenadante foi transferido para um tubo de RMN de 3 mm. Os experimentos 1D e 2D foram realizados para as substâncias isoladas, que foram solubilizadas em CD_3OD e centrifugadas, e então os sobrenadantes foram transferidos para tubos de RMN de 3 mm.

Outros equipamentos usados para o desenvolvimento do projeto

- 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);
- Autoclave vertical (Phoenix Luferto – AV-137);
- Câmara de fluxo laminar Pachane PA-310

3. 4 Metodologia

3.4.1 Obtenção da linhagem fúngica

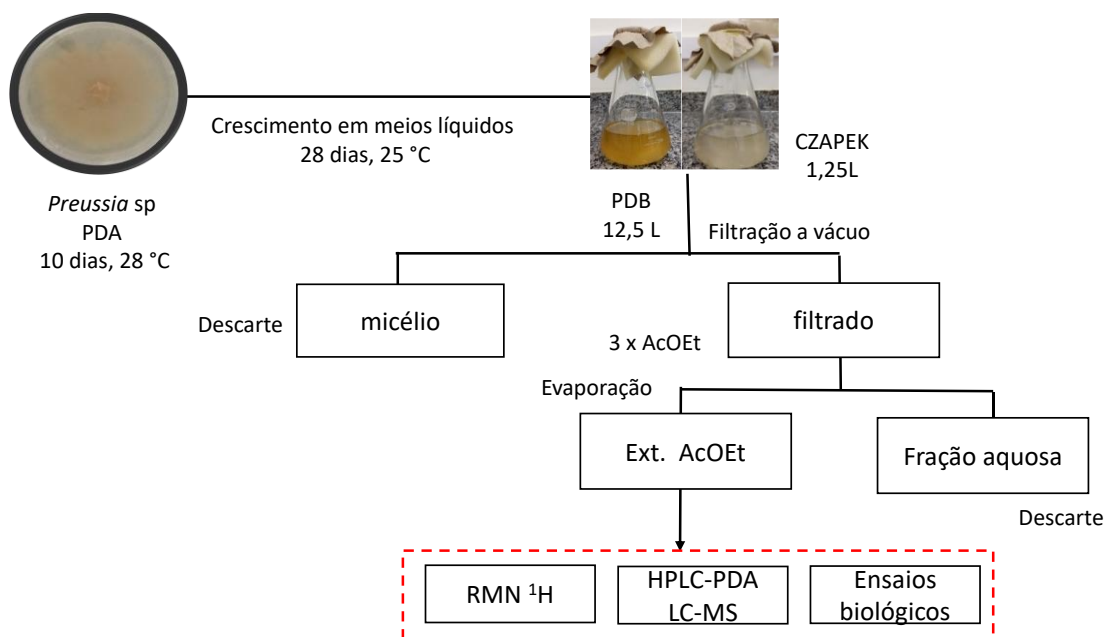
A coleta das folhas, galhos e frutos saudáveis de *Platonia insignis* Mart. foi realizada na cidade de Timom-MA (latitude: $4^\circ 50' 56,6''$ Sul e longitude: $42^\circ 05' 04,8''$ Oeste), procedimento realizado pela Dra Isabella Cristhina G. Costa. A exsicata da espécie vegetal encontra-se depositada no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí, com o código TEPB 20701 (Registro de acesso ao SisGen AA65371). O isolamento dos fungos

endofíticos foi conduzido pela Dra Isabella Cristhina G. Costa, seguindo a metodologia descrita por SILVA (2005). Neste processo, foram obtidos 18 fungos endofíticos a partir de *P. insignis* Mart. Inicialmente os extratos brutos PDB produzidos por *Preussia* sp. e *Phyllosticta* sp. foram avaliados quanto a capacidade de degradação de biofilme causado pela cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, analisada para as concentrações de extratos a 512 µg/mL apresentando 77,33% e 79,37% respectivamente. Observação, este ensaio foi realizado pela Dra. Isabella C. G. Costa na triagem de isolamento dos endófitos de *Platonia insignis* Mart.

Os fungos PI-F3 (*Phyllosticta* sp.) e PI-F4 (*Preussia* sp.) foram escolhidos para o estudo nesta tese devido às propriedades observadas nos seus extratos, as quais demonstraram potencial no combate e inibição de biofilmes.

3.4.2 Obtenção dos extratos brutos dos endófitos em PDB e Czapek

Os fungos endofíticos PI-F3 (*Phyllosticta* sp.) e PI-F4 (*Preussia* sp.), isolados das folhas da planta *P. insignis* Mart., foram inoculados em meio sólido (PDA), para obtenção de massa micelar satisfatória, objetivando a inoculação padronizada em meio líquido (Figura 8) e sólido, previamente autoclavados, em escala reduzida e ampliada, durante 28 dias e 21 dias, respectivamente, a 25° C, sob modo estático. Após o período de incubação em meio líquido, o caldo fermentado foi separado dos micélios por filtração à vácuo e o filtrado foi submetido à partição líquido/líquido com AcOEt. Os solventes orgânicos foram evaporados para obtenção dos extratos brutos. Foram realizados os brancos (meio de cultivo, sem a inoculação de fungos) dos diferentes meios de cultivo seguindo a mesma metodologia de extração para os extratos fúngicos.

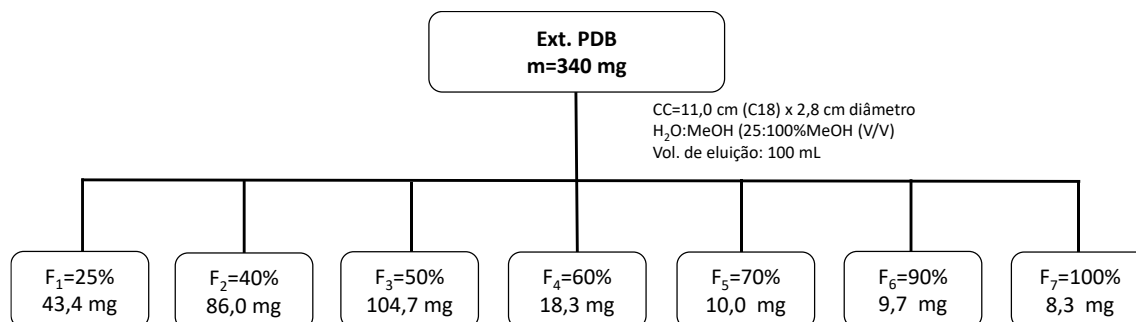
Figura 8-Cultivo e obtenção dos extratos brutos em PDB e Czapek

Fonte: autora

3.4.3 Fracionamento do extrato bruto de PDB do endófito *Preussia sp.*

O extrato PDB do endófito *Preussia sp.* foi submetido às análises de RMN de ^1H , ensaios biológicos e análise de HPLC-PDA. O extrato foi fracionado por cromatografia em coluna, de acordo com a Figura 9. Utilizou-se metanol P.A para ativação da fase estacionária. A separação foi feita à pressão reduzida, aplicando-se 340,0 mg do extrato. A Figura 9 apresenta a composição das fases móveis utilizadas, e as respectivas massas obtidas após o fracionamento. As frações foram submetidas aos ensaios de antileishmania e anti-trypanosoma e analisadas por HPLC-PDA (Cromatogramas das frações obtidas a partir do extrato PDB, $\lambda = 254 \text{ nm}$, estão disponíveis no Apêndice A).

Figura 9-Fracionamento do extrato bruto PDB de *Preussia* sp.



Fonte: autora.

* Ensaio realizado pela equipe do Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo, Laboratório de Química Medicinal e Computacional (LQMC-IFSC-USP).

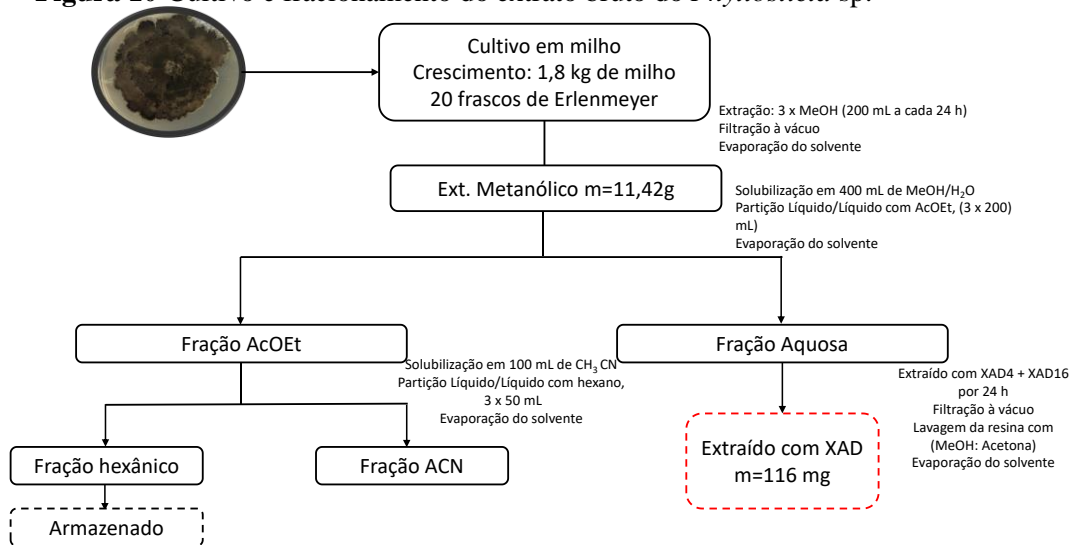
3.4.4 Obtenção dos extratos brutos dos endófitos cultivados em meio sólido de milho

Após o período de incubação de 21 dias, a cultura sólida de milho (Figura 10) foi triturada utilizando uma bagueta e iniciou-se uma extração direta com metanol P.A em intervalos de 12 h para cada extração, seguida de filtração sob pressão reduzida. Posteriormente, o solvente foi evaporado em evaporador rotativo, obtendo-se o extrato metanólico. O extrato metanólico foi dissolvido em água/MeOH, e com a solução resultante fez-se a partição líquido-líquido com AcOEt P.A. Em seguida, o solvente orgânico foi evaporado, originando a fração acetato de etila. A fração obtida foi dissolvida em acetonitrila P.A, e com a solução fez-se três partições líquido-líquido com hexano P.A. A fração acetonitrila foi obtida após a evaporação do solvente. A fração hexânica foi armazenada para estudos futuros. A fase aquosa foi extraída com uma mistura de resinas poliméricas XAD4 e XAD16 na proporção de 1:1, deixada em repouso por 24 h. A mistura de resinas foi separada por filtração à vácuo, seguida de uma lavagem para dessorção do material orgânico MeOH/Acetona. A fração XAD foi analisada por HPLC-PDA e submetida aos ensaios antileishmania e anti-trypanosoma.

Os extratos brutos obtidos foram submetidos aos ensaios biológicos e a análises de RMN de ¹H e a HPLC-PDA. Esses extratos foram submetidos a um “clean up” utilizando cartuchos de sílica C-18 acoplado em membrana 0,2 μm. Após este procedimento, os extratos (3,5 mg/mL) foram injetados em HPLC-PDA, utilizando uma coluna analítica Phenomenex Luna tipo octadesil silano (C-18), com injeção de 30,0 μL e eluição em gradiente exploratório

H₂O:CH₃OH (95:05v/v) à (0:100 v/v) por 50min., permanecendo nesta condição por mais 10 min., numa vazão de 1,0 mL/min e leitura de $\lambda= 220$ nm a 400 nm.

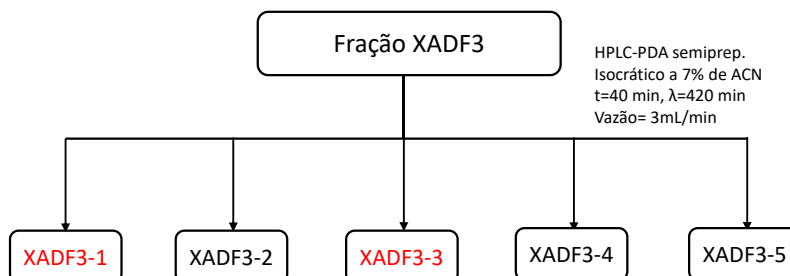
Figura 10-Cultivo e fracionamento do extrato bruto do *Phyllosticta* sp.



Fonte: autora.

A separação cromatográfica da Fração XADF3 foi otimizada em HPLC-PDA analítico utilizando uma coluna de C18 (Phenomenex Luna; 250 x 4,60 mm; 5 μ m) e como fase móvel o sistema de eluentes em modo isocrático (H₂O:CH₃CN). Após a otimização, a amostra foi fracionada em HPLC-PDA em escala semi-preparativa, no qual utilizou-se coluna C18 (Phenomenex Luna; 250 x 10; 5 μ m) e eluição em modo isocrático (H₂O:CH₃CN). Esta separação cromatográfica forneceu 5 subfrações, as quais foram submetidas a análise por LC-MS, resultando no isolamento e identificação de duas substâncias (Figura 11).

Figura 11-Isolamento das substâncias da fração XADF3, produzidas por *Phyllosticta* sp.



Fonte: autora.

Os solventes que foram utilizados durante o processo de extração (acetato de etila e metanol) foram recolhidos e submetidos a procedimentos de reutilização. Após a conclusão desta etapa, esses solventes foram descartados de maneira adequada, sendo acondicionados em recipientes previamente rotulados. Posteriormente, os resíduos foram encaminhados ao descarte de acordo com as diretrizes estabelecidas pelas Normas Gerais de Gerenciamento de Resíduos Químicos no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), conforme disponibilizado no endereço eletrônico: www.iq.unesp.br/APOIO-TECNICO/normas-residuos.pdf.

3.4.5 Derivatização de extratos fúngicos de *Preussia* sp. para análise em GC-MS

A metoximação foi realizada utilizando 5 mg dos extratos solubilizados em 80 μL de uma solução de cloridrato de metoxiamina em piridina (20 mg/mL), em seguida foram adicionados mais 100 μL de piridina e aqueceu-se em banho-maria a 30 °C por 90 min. Após o procedimento de metoximação da amostra, foi realizado a siliilação da mesma, na qual foram adicionados 200 μL de MSTFA [N-metil- N(trimetilsilil)trifluoroacetamida] e aqueceu-se a 37 °C por 30 min, em seguida sendo submetidas a outra etapa de incubação a 5 °C por 24 h. Posteriormente, as amostras foram filtradas usando microfiltro de 0,22 μm (tamanho de poro) e transferidas para *vial* com *insert* de 350 μL .

As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (Shimadzu QP-2020, Tóquio, Japão). As amostras foram injetadas com um amostrador automático AOC-20Si (temperatura do injetor foi 260 °C) em uma coluna capilar de sílica fundida Restek Rtx-5MS (5% difenil 95% dimetilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Temperatura do forno: 140 °C (3 min) 3 °C/min 320 °C (10 min) até 79,67 min. Modo de injeção: splitless/split. Início splitless, 0,75 min split (1/50), 2 min split 1/20 a um fluxo constante de 1,3 mL.min⁻¹, o volume de amostra injetado foi de 1 μL . Condições MS: temperatura da fonte de íons e interface de 250 °C, modo de ionização por elétrons a 70 eV, faixa de aquisição m/z 40-600 Daltons.

As substâncias detectadas foram analisadas pelo software Shimadzu GC-MS solution Ver. 2.61. Os índices de retenção (IR) foram calculados pela equação de Van den Dool e Kratz (Equação 1), utilizando um padrão de hidrocarbonetos (C8-C40, SUPELCO, Bellefonte USA)

analisados nas mesmas condições dos extratos e os valores desses índices de retenção foram comparados com a base de dados NIST (National Institute of Standards and Technology).

$$IR = 100. n + 100. (t_{R(x)} - t_{R(n)} / t_{R(n+1)} - t_{R(n)}) \quad \text{Equação 1}$$

n = número de carbonos do hidrocarboneto que eluiu antes ao analito;

tR(x) = tempo de retenção do analito;

tR(n) = tempo de retenção do hidrocarboneto anterior ao analito;

tR(n+1) = tempo de retenção do hidrocarboneto posterior ao analito.

3.4.6 Análises por LC-MS

Os extratos de cada fungo foram analisados por espectrometria de massas em um equipamento HPLC-ESI-IT-MS/MS (Bruker Daltonics®). As análises cromatográficas foram realizadas utilizando a coluna C18 (Phenomenex LUNA: 250 x 4,60 mm, 5 µm). O volume de injeção e a vazão aplicados foram 1 µL e 1,00 mL/min, respectivamente. Para a eluição das amostras, foi empregado um gradiente linear com fase móvel composta de água (solvente A) e metanol, (solvente B) ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico, de 5 a 100% (B) durante 40 min. Foi utilizado um espectrômetro de massas da Bruker (Amazon SL) com fonte de ionização Eletrospray (ESI); analisador Ion Trap e software MassControl. Os espectros de massas foram obtidos em modo positivo e negativo processados no software Data Analysis (versão 4.3, Bruker®).

Para realização de análises na plataforma GNPS os espectros de massas foram adquiridos no UPLC-MS modelo ACQUITY UPLC I - Class System acoplado ao Xevo G2-S QTOF (Waters Corporation). Parâmetros utilizados para UPLC: fase móvel A: água (0,1 % de ácido fórmico v/v), fase móvel B: acetonitrila (0,1 % de ácido fórmico v/v); o método foi realizado em gradiente linear: 5 % - 100 % de B em 8 minutos, de 8-13 minutos permaneceu em 100 % de B, de 13-19 minutos retornou à condição inicial de 5 % de B e de 19-23 minutos permaneceu em 5 % para o reequilíbrio da coluna; vazão: 0,4 mL.min⁻¹; volume de injeção: 0,1 µL; fase estacionária: coluna de fase reversa Acquity UPLC®HSS T3 coluna (1.8 µm; 2.1 mm x 100 mm) e temperatura de 35 °C. As condições de análise no modo DDA foram realizadas

em modo positivo (ESI⁺), com voltagem do capilar: 3 kV, cone de transferência: 40 V, temperatura da fonte de ionização: 100 °C, temperatura dessolvatação: 650 °C, gás de dessolvatação: 800 L.h⁻¹, faixa de aquisição: 50-1200 Da. Os experimentos de MS/MS foram realizados em duas condições de energia aplicadas à célula de colisão, sendo obtidos os espectros de massas baixas utilizando uma rampa de potencial de 20-40 eV e para obtenção dos espectros de massas altas, utilizou-se uma rampa de potencial de 60-80 eV. Concentração das amostras: 1 mg/mL (solubilizadas em metanol grau HPLC).

3.4.7 Processamento dos dados e construção das redes moleculares

As redes moleculares foram criadas usando o fluxo de trabalho on-line (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>) no site do *Global Natural Products Social* (GNPS) (<http://gnps.ucsd.edu>). Após aquisição de dados LC-MS/MS, esses foram convertidos para o formato mzML no software MSConvert (ProteoWizard) usando o filtro *Peak Picking* e então, foram carregados na plataforma GNPS. Os dados foram filtrados removendo todos os íons fragmentos MS/MS dentro de +/- 17 Da dos íons precursores *m/z*. Os espectros de MS/MS foram filtrados através da escolha apenas dos 6 íons fragmento superiores na janela +/- 50 Da em todo o espectro. A tolerância de massa do íon precursor foi ajustada para 2,0 Da e a tolerância dos íons fragmento MS/MS para 0,9 Da. Foi então criada uma rede onde os arcos foram filtrados para ter um escore de cosseno acima de 0,70 e mais de 6 picos combinados, com arcos entre dois nodos mantidos na rede se e somente se cada um dos nodos aparecesse nos 10 nodos superiores mais similares um do outro. O tamanho da família molecular foi fixado em 100, e os arcos com escore mais baixo foram removidas das famílias moleculares até que o tamanho da família molecular ficasse abaixo desse limite. Posteriormente, os espectros na rede foram então pesquisados em relação às bibliotecas espectrais do GNPS. Os espectros da biblioteca foram filtrados da mesma maneira que os dados de entrada. Todas as correspondências mantidas entre os espectros da rede e os espectros da biblioteca tiveram um escore acima de 0,7 e pelo menos 4 picos combinados (WANG *et al.*, 2016a). As redes moleculares foram visualizadas usando o *software* Cytoscape v. 3.8.0 (SHANNON, *et al.*, 2003) e as informações podem ser acessadas publicamente em: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=e2d7d1799995432a9fca0606536e8bed#> para os extratos de *Preussia* sp.

3. 5 Ensaios biológicos

3.5.1 Avaliação da atividade antiglicante

A atividade antiglicante foi realizada segundo a metodologia descrita por Fraige e colaboradores (2017) utilizando o ensaio de albumina sérica bovina (BSA) com metilglioxal (MGO). A partir de uma solução de tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4, foi preparada a solução de BSA (1 mg/mL). A solução de BSA, foi adicionado o reagente MGO (5 mmol/L) e os extratos (150 µg/mL), em seguida foram incubadas a 37 °C, sob agitação 150 rpm, por 72h. Uma solução de aminoguanidina (10 mmol/L) foi utilizada como controle positivo. Após a incubação, as amostras foram transferidas para placas de 96 poços e realizada a leitura de fluorescência no máximo de excitação de 370 nm e emissão máxima de 440 nm. O cálculo do percentual de inibição da formação de AGEs é realizado pela equação $[(FL_{CN}-FL_{bCN}) - (FL_S - FL_{bS})]/(FL_{CN}-FL_{bCN}) \times 100$, onde FL_{CN} e FL_{bCN} são as intensidades de fluorescência da mistura de controle negativo e seu branco, respectivamente, e FL_S e FL_{bS} são as intensidades de fluorescência do extrato e seu branco, respectivamente.

3.5.2 Avaliação *in vitro* da atividade anti-trypanosoma¹

O ensaio *in vitro* foi realizado conforme a metodologia descrita por (DE SOUZA *et al.*, 2020) utilizando a cepa de *Trypanosoma cruzi* Tulahuen, modificada geneticamente para expressar o gene lacZ. As formas epimastigotas foram cultivadas em meio de infusão hepática de triptona (LIT) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FCS), penicilina e estreptomicina. A metaciclogênese para tripomastigotas foi induzida pela semeadura de epimastigotas em meio de cultivo Grace Insect (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) suplementado com 10% de FCS. Após a diferenciação, as formas tripomastigotas metacíclicas foram colhidos e transferidos para placas de teste. Os ensaios de amastigotas intracelulares foram realizados em placas para cultura de tecidos de 96 poços. Fibroblastos humanos HFF-1 foram semeados em 2×10^3 células por poço em meio DMEM (80µL) sem vermelho de fenol e incubados durante a noite a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. No dia seguinte, as formas tripomastigotas foram adicionados a 1×10^4 células por poço. Após 24 h, o meio foi removido para eliminar os parasitas extracelulares e 100 µL de meio DMEM (Cultilab) fresco foram

adicionados a cada poço. Em seguida, 50 µL de inibidores de cruzaina foram adicionados em diluições seriadas para produzir concentrações finais de 0,1–100 µM. Os compostos foram testados em sete concentrações em diluições de 3 vezes, cada concentração sendo testada em duplicata em três experimentos independentes. As placas foram incubadas por 120 h a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Todas as placas incluíam poços múltiplos com fibroblastos infectados sem a adição de qualquer inibidor (controles negativos) e poços com Benzimidazole (BZ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) como controles positivos. Após a incubação, 50 µL de 1 mM de clorofenol red β-D-galactopiranosídeo (CPRG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e 0,1% de Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foram adicionados a cada poço e a absorbância foi medida a 570 nm. Os valores de foram determinados utilizando o programa SigmaPlot (VALLI *et al.*, 2022).

¹Ensaio realizado pela equipe do Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo, Laboratório de Química Medicinal e Computacional (LQMC-IFSC-USP).

3.5.3 Avaliação *in vitro* da atividade antileishmania¹

Neste ensaio, extratos e frações foram testados frente as formas promastigotas de *Leishmania infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263), cultivadas a 28 °C em meio M199 (pH 7,4), suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado. Posteriormente, foram preparadas soluções estoque dos extratos e frações a 10 mM em DMSO e testadas em diluições em série, em placas de 96 poços. Células de leucemia humana THP-1 foram semeadas a 2×10^4 /poço (RPMI-1640, 100 µL/poço), usando 20 ng/mL de acetato de tetradecanoilforbol (PMA). Após 72 h de incubação (5% CO₂, a 37 °C), as formas promastigotas de estágio avançado foram selecionadas e semeadas (2×10^5 /poço, 100 µL/poço). Em todas as placas foram incluídos poços de controle negativo (100% de crescimento do parasita) e controle positivo (miltefosina). As placas foram lidas com um fluorômetro de microplaca (comprimento de onda de excitação de 536 nm e comprimento de onda de emissão de 588 nm). A porcentagem de inibição do crescimento foi expressa como uma porcentagem da fluorescência do controle negativo (MENEGATTI *et al.*, 2020).

Os ensaios citotoxicidade foram realizados *in vitro* segundo a metodologia de Valli e colaboradores (2022), utilizando a linhagem de células THP-1, cultivadas no meio de cultura RPMI 1640 suplementado com (10% FCS, 1% penicilina/streptomicina). As culturas foram

mantidas a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Os compostos foram adicionados em diluições seriadas (64–0,12 µM), posteriormente as placas foram incubadas (37° C, 5% de CO₂). A concentração do composto foi avaliada em duplicata. Todas as placas incluíam como controle positivo (10–0,01 µM) a DOX (Sigma-Aldrich) e os poços não tratados como controle negativo (crescimento de 100%). A viabilidade das linhagens de células foi avaliada através do método colorimétrico utilizando a resazurina. Assim, após 72 h, 20 µL de resazurina (Sigma-Aldrich) foram adicionados e as placas foram incubadas por 4 h. A absorbância foi medida em 536 e 588 nm em um leitor automático de microplacas SpectraMax[®] Gemini, e os dados foram analisados usando GraphPad Prism versão 8.0. A porcentagem de células inviáveis foi determinada e comparado com os poços de controle negativo (crescimento de 100%).

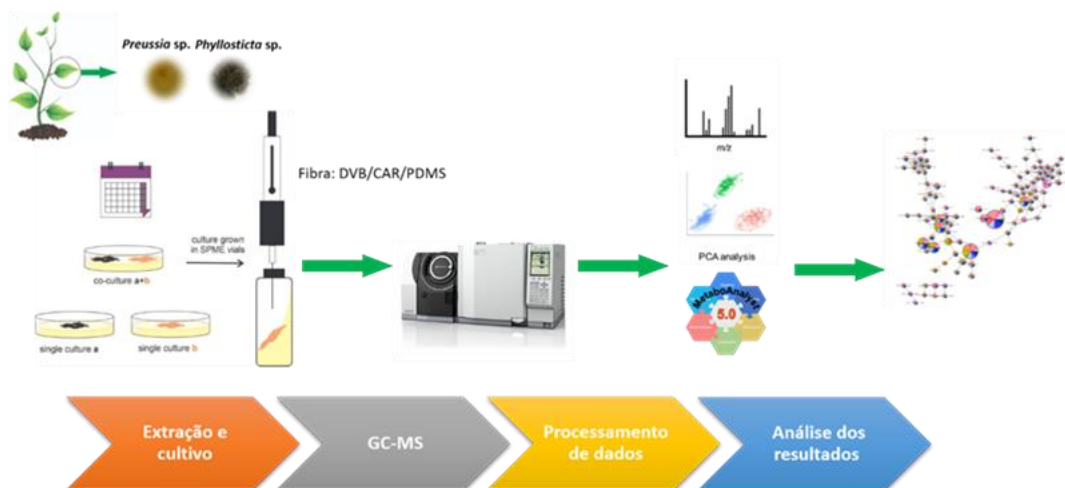
¹Ensaio realizado pela equipe do Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo, Laboratório de Química Medicinal e Computacional (LQMC-IFSC-USP).

3.6 Determinação dos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por *Phyllosticta* sp. e *Preussia* sp.

Os fungos *Phyllosticta* sp. e *Preussia* sp. foram inoculados em placas de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose e ágar) e incubadas durante 10 dias a 28 °C. Um disco (pellet) de 5 mm de diâmetro de cada cepa foi transferido para frascos do tipo vial (40 mL) contendo 20 mL de BDA, em seguida selado com septos de PTFE/silicone e tampas roscadas. O meio de cultura BDA foi obtido da Himedia[®] (Mumbai, Índia) e preparado de acordo com instruções do fabricante. Após o período de incubação durante 10 e 20 dias a 25 °C sob condições estáticas, os frascos foram colocados em banho de propilenoglicol a 45 °C, em seguida foram expostos a uma fibra extratora de revestimento triplo DVB/CAR/PMDS (divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano 50/30 µm, Supelco) durante 60 minutos. Após o tempo de extração a fibra foi removida e inserida no GC-MS a 250 °C durante 6 minutos para dessorção do COVs. Os dados de GC-MS foram analisados por ferramentas estatísticas uni e multivariadas, como análise de componentes principais (PCA), análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e abordagem metabolômica para identificar os COVs produzidos pelos dois fungos em culturas axênicas e co-cultivo. O conjunto de dados obtido foi analisado combinando a rede molecular gerada a partir dos dados de GC-MS com uma análise multivariada não-alvo, a fim de identificar as variações metabólicas ocorridas no perfil dos

COVs. A Figura 12 ilustra as etapas do procedimento experimental utilizado para coleta dos dados.

Figura 12-Metodologia utilizada para aquisição e processamento dos dados



Fonte: autora.

Os cromatogramas obtidos das análises por CG-EM foram integrados e os t_R (tempo de retenção) e áreas dos picos tabulados. O cálculo do índice de retenção linear foi calculado utilizando uma série homóloga de n-alcenos C8-C40 (Sigma-Aldrich). O índice de retenção do analito é obtido por interpolação, relacionando o tempo de retenção do analito com o tempo de retenção de dois padrões (séries homólogas de hidrocarbonetos), sendo estes eluidos antes e após o pico do composto de interesse (VAN DEN DOOL AND KRATZ, 1963).

3.6.1 Condições da análise HS-SPME-GC-MS

Para otimização e avaliação das condições de análise HS-SPME inicialmente foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central (triplicata no ponto central), que resultou em 11 experimentos, nos quais três variáveis foram investigadas como o tempo de extração e dessorção e a temperatura de dessorção dos COVs. Os experimentos foram realizados para os dois fungos (*Phyllosticta sp.* e *Preussia sp.*), assim foi realizado o número total de 22 experimentos. Os níveis avaliados e as faixas experimentais utilizadas para otimização das condições de análise por GC-MS são apresentados na Tabela 4. A análise estatística foi realizada utilizando o programa Minitab (versão 17.0). O número de metabólitos

identificados foi usado como resposta para obter as condições otimizadas de extração de COVs. As análises estatísticas foram realizadas usando o *software* MetaboAnalyst 5.0.

Tabela 4-Parâmetros Experimentais aplicados ao planejamento fatorial para otimização das condições de análises dos COVs extraídos por HS-SPME-GC-MS

Variáveis	Níveis		
	(-)	(0)	(+)
Tempo de extração (min)	30	45	60
Temperatura de dessorção (°C)	220	235	250
Tempo de dessorção (min)	3	4,5	6

Fonte: autora.

Após realizar a otimização das condições de extração de voláteis para os cultivos isolados, foi realizado um estudo para avaliar o perfil metabólico durante a variação de tempo (10 e 20) e luminosidade (claro e escuro) em cultivos individuais, co-cultivo, meio de cultivo e o frasco de vidro vazio, com três repetições cada.

3.6.2 *Processamento de dados e construção das redes moleculares (molecular Networking GC-MS workflow)*

Os dados de GC-MS foram obtidos no formato .cdf, adquiridos pelo *software* GCsolution (Simadzu-Tóquio, Japão) e processados usando o pacote MzMine 2. Além disso, os arquivos de dados GC-MS das análises HS-SPME-GC-MS foram processados pelo *software* Mzmine2 (versão 2.53) para alinhamento e deconvolução de espectros. A matriz resultante (amostras x área dos picos (RT/mz)) foi gerada para realizar as análises estatísticas multivariadas usando o *software* Metabonalyt 5.0 (CHONG; WISHART; XIA, 2019; PANG *et al.*, 2021; PLUSKAL *et al.*, 2010). Os parâmetros usados nas etapas de processamento foram os seguintes: *mass detection* (*scans*: 5.0-40 min, *centroid*, *noise level* 1.0×10^3); *ADAP chromatogram builder* (*min. group size in # of scans* 10, *group intensity threshold* 1.0×10^3 , *min highest intensity* 1.0×10^3 , *m/z tolerance* 0.01); *chrom. deconv.* (*Wavelets* (ADAP), *S/N threshold* 7, *S/N estimator: Intensity window SN*, *Min feature height* 1, *Coef./area threshold*

30, *Peak duration* 1.00, *RT wavelet range* 0.15); *Spec. Deconv.* (*Multivariate Curve Resolution, Deconvolution window width* (min) 0.15, *Retention time tolerance* (min) 0.05, *Minimum number of peaks* 1); *ADAP Aligner* (*Min confidence* 0.05, *Retention time tolerance* (min) 0.1, *m/z tolerance* 0.1, *Score threshold* 0.75, *Score weight* 0.1, *Retention time similarity: cross-correlation*); *Gap filling* (*Peak finder multithreaded, Intensity tolerance* 0.1%, *m/z tolerance* 0.2, *retention time tolerance* 0.1 min). Os procedimentos de normalização foram realizados usando as áreas de pico geradas a partir dos cromatogramas com os seguintes parâmetros: *Normalization to constant sum; Data transformation: Log10 Normalization; Date scaling: Pareto Scaling*. Para verificar diferenças e correlações no perfil metabólico de culturas axênicas e co-culturas para as variáveis tempo e luminosidade foram utilizadas a Análise Discriminante de Quadrados Mínimos Parciais (PLS-DA) fornecendo escores da Variável de Importância na Projeção (VIP). A análise de variância (ANOVA) unidirecional com testes *post-hoc* de diferença honestamente significativa (HSD) de Tukey foi usada para analisar os resultados de características significativas dentro dos grupos (PANG *et al.*, 2021). Três arquivos (arquivo mgf dos espectros EI deconvoluídos pelo Mzmine 2, uma tabela de quantificação com os picos gerados pelo Mzmine 2 e uma tabela de metadados com informações sobre as amostras) foram submetidos à plataforma GNPS e a rede molecular foi criada com o Library Search/Fluxo de trabalho de rede molecular GC no GNPS (<https://gnps.ucsd.edu>). As redes moleculares foram visualizadas usando o *software* Cytoscape v. 3.8.0 (SHANNON, *et al.*, 2003) e as informações podem ser acessadas publicamente em: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=6564a25a16c6400c87acc319321f881>. para os COVs de *Preussia* sp. e *Phyllosticta* sp.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Identificação genética dos fungos endofíticos

Os endófitos PI-F3 e PI-F4, foram identificados pela morfologia e pelo método de sequenciamento da região ITS do DNA do micro-organismo, procedimento realizado por uma empresa terceirizada (Genotyping, Botucatu-SP). A sequência de nucleotídeos do micro-organismo obtida foi comparada com as sequências de referência depositadas no *GenBank*. Para o endófito PI-F3 obteve-se 100.00% de identidade com o fungo do gênero *Phyllosticta* sp., com o número de acesso MK120854.1. Para o endófito PI-F4 obteve-se 98% de identidade com o fungo do gênero *Preussia* sp., com o número de acesso HQ607932.1. As Figuras 13 e 14 apresentam o alinhamento do DNA do fungo *Phyllosticta* sp. e a fita de consenso respectivamente.

Figura 13-Alinhamento do DNA do fungo PI-F3 (*Phyllosticta* sp.)

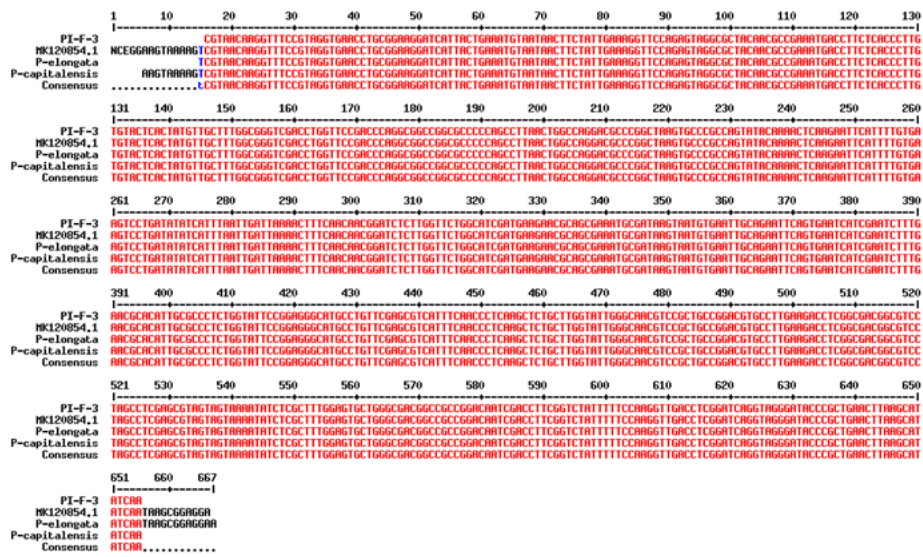


Figura 14-Fita consenso para o fungo PI-F3 (*Phyllosticta* sp.)

```

CGTAA CAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAAATGTAATACTTCTATTGAA
AGGTTCCAGAGTAGGGCGTACAAACGCCGAAATGACCTTCTCACCCTTGTGTACTCACTATGTTGCTTTGG
CGGGTTCGACCTGGTCCGACCCAGGGCGGGCGCCCGCCAGCCTTAACTGGCCAGGACGCCCGGCTAAG
TGCCCGCCAGTATACAAAACCTAAAGAAATCATTTTGTGAAAGTCTGATATATCATTTAATTGATTAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAAACGACGGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTC
AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAACGACATTCGCGCCCTCTGGTATTCGGGAGGGCATGCTGTTTC
GAGCGTCATTTCAAACCTCAAGCTCTGTTGGTATTTGGCAAACGTCGCGCTGCGGACGTCGCTTGAAGAC
CTCGGGCACTGGCGCTTACCTCGAGCGTGTAGTAAATATGTAATAATATCTGGCTTTGGAAGTGTGGCGGCGG
CCGGCAATCGACCTTCGCTTATTTTTCAAAGTTGACCTCGATCAGGTAAGGATACCCGCTGAACTTAA
AGCATATCAA
    
```

As Figuras 15 e 16 apresentam o alinhamento do DNA para o fungo PI-F4 e a fita de consenso, respectivamente.

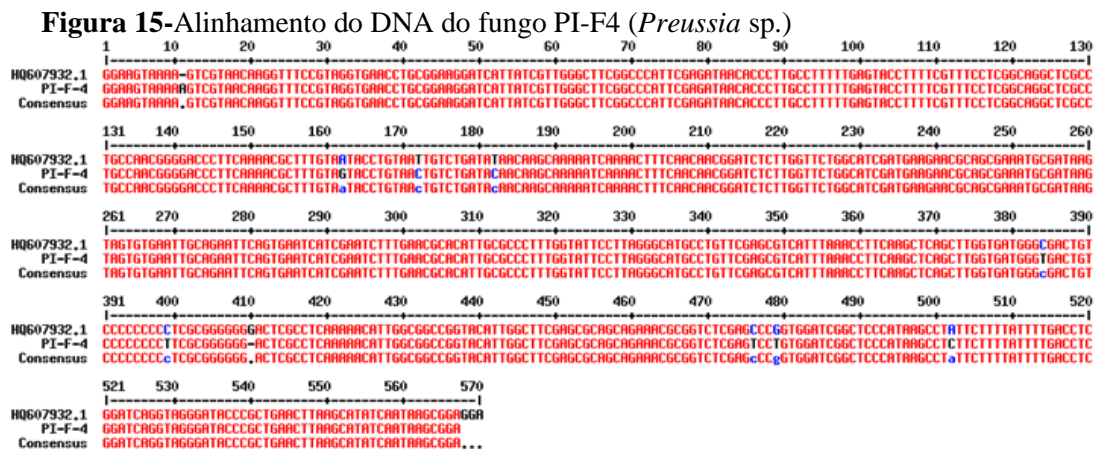


Figura 16- Fita de consenso para o fungo PI-F4 (*Preussia* sp.)

```

GGAAGTAAAAAGTCGTAA CAAGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGTTGGGCTTCGGC
CCATTGAGATAACACCCCTTGCCTTTTGAGTACCTTTTCGTTTCCCTCGGCAGGCTCGCCTGCCAACGGG
GACCCCTTCAAACGC TTTGAGTACCTGTAACGTCTGATACAACAAGCAAAAATCAAACTTTC AACAA
GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCA
GTGAATCATCGAATCTTTGAA CGCACATTGCGCCCTTTGGTATCCCTTAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCA
TTTAAACCTTCAAGCTCAGCTTGGTGATGGGTGACTGTCCC CCCCCCTTCGCGGGGGGACTCGCCTCAAAA
ACATTGGCGGCGCGGTACATTGGCTTCGAGCGCAGCAGAAA CGCGGTCTC GAGTCCTGTGGATCGGCTCC
CATAAGCCTCTCTTTTATTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATA CCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGC
GGA

```

Fonte: Figuras 13, 14, 15 e 16 fornecidas pela empresa Genotyping, 2018.

4.2 Produção dos extratos fúngicos

Nesse estudo investigou-se o perfil metabólico dos fungos *Phyllosticta* sp. e *Preussia* sp. por meio de cultivo em diferentes meios de cultura. A Tabela 5 apresenta os resultados do rendimento dos extratos fúngicos e dos brancos obtidos a partir dos diversos meios de cultivo utilizados. Esses dados foram analisados a fim de compreender como as condições de cultivo influenciam no metabolismo desses fungos.

Tabela 5-Massas obtidas dos extratos nos meios de cultivos utilizados

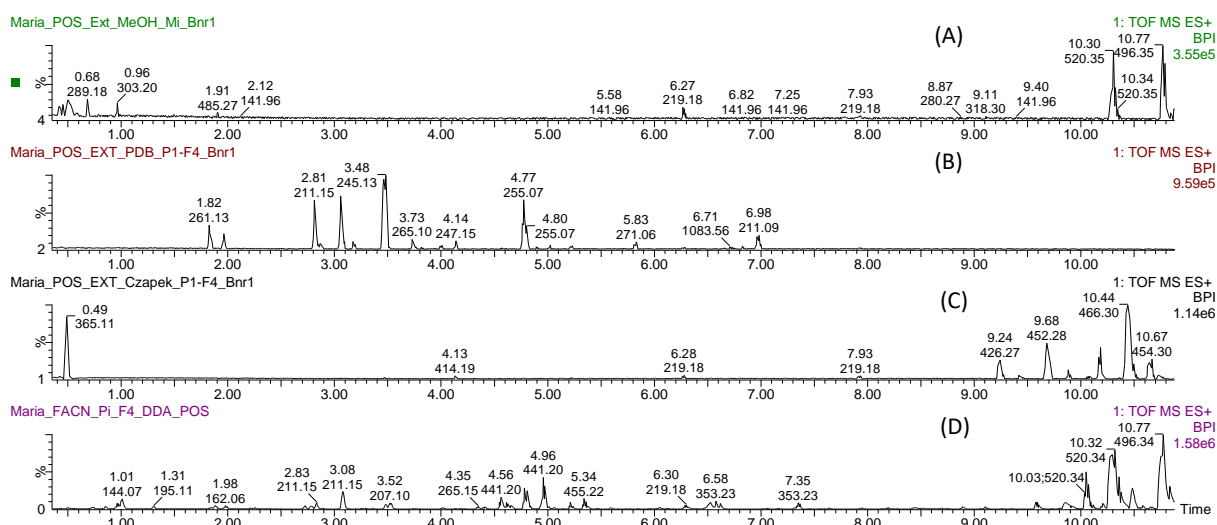
Extratos/massa	PDB	PDB	Czapek	Czapek	Milho	Milho
	fungo	branco	fungo	branco	fungo	branco
<i>Preussia sp.</i>	413 mg	15 mg	3 mg	1 mg	8,64 g	1,46 g
<i>Phyllosticta sp.</i>	35 mg	5 mg	5,9 mg	1 mg	11,97 g	1,46 g

Fonte: autora.

4.3 Perfil cromatográfico dos extratos brutos

Os cromatogramas dos extratos brutos PDB, Czapek e Milho para o fungo *Preussia sp.* (Figura 17) foram obtidos por UPLC-ESI-Q-TOF-MS e apresentaram vários picos com polaridade variada e boa resolução cromatográfica. Todos os cromatogramas obtidos foram comparados com o controle branco (meio de cultivo sem inoculação do fungo), verificando-se uma variação metabólica em função dos diferentes meios de cultivo.

Figura 17-Cromatogramas do pico base (BPI) do extrato metanólico (A), do extrato PDB (B), do extrato czapek (C) e da fração acetonitrila (D) do endófito *Preussia sp.*, obtidos por UPLC-ESI-Q-TOF-MS no modo positivo



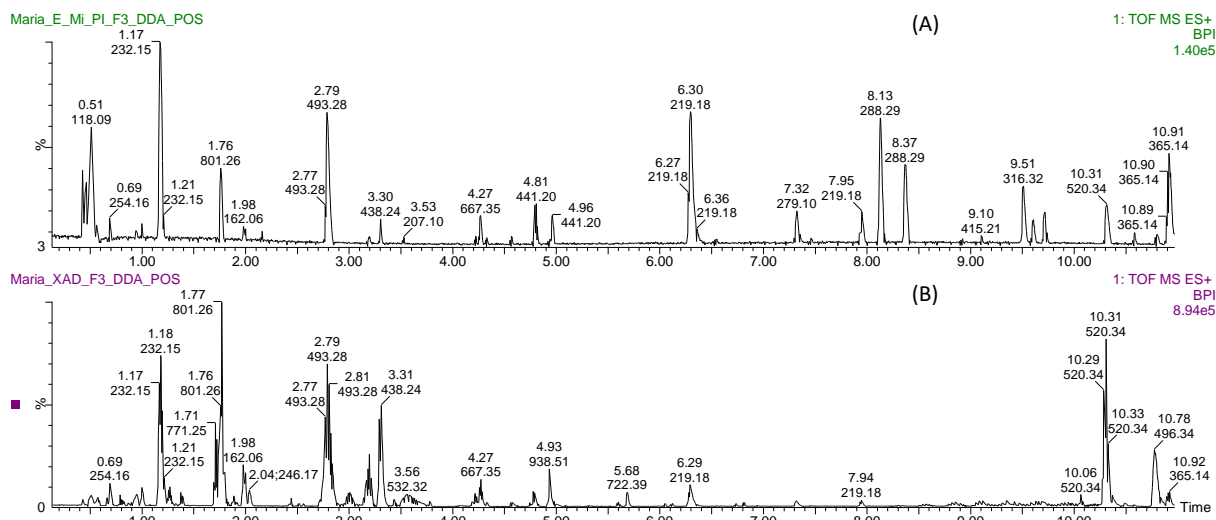
Gradiente 5-100% B em 14 minutos (A: água + 0,1% ácido fórmico (AF), B: ACN + 0,1% AF)

Fonte: autora

Os perfis obtidos por UPLC-ESI-Q-TOF-MS (Figura 18) para o extrato metanólico e a fração XAD-F3 obtidas do fungo *Phyllosticta sp.*, evidenciam a capacidade do endófito em produzir substâncias em uma ampla faixa de polaridade, conforme demonstrado pelas várias bandas no cromatograma. A fração XAD-F3, por outro lado, exibiu substâncias

predominantemente polares. Isso sugere que o fracionamento realizado para o extrato foi eficaz na separação das substâncias de acordo com sua polaridade.

Figura 18-Cromatogramas do pico base (BPI) do extrato metanólico (A) e da fração XADF3 (B) do endófito *Phyllosticta* sp., obtidos por UPLC-ESI-Q-TOF-MS no modo positivo



Gradiente 5-100% B em 14 minutos (A: água + 0,1% ácido fórmico (AF), B: ACN + 0,1% AF)

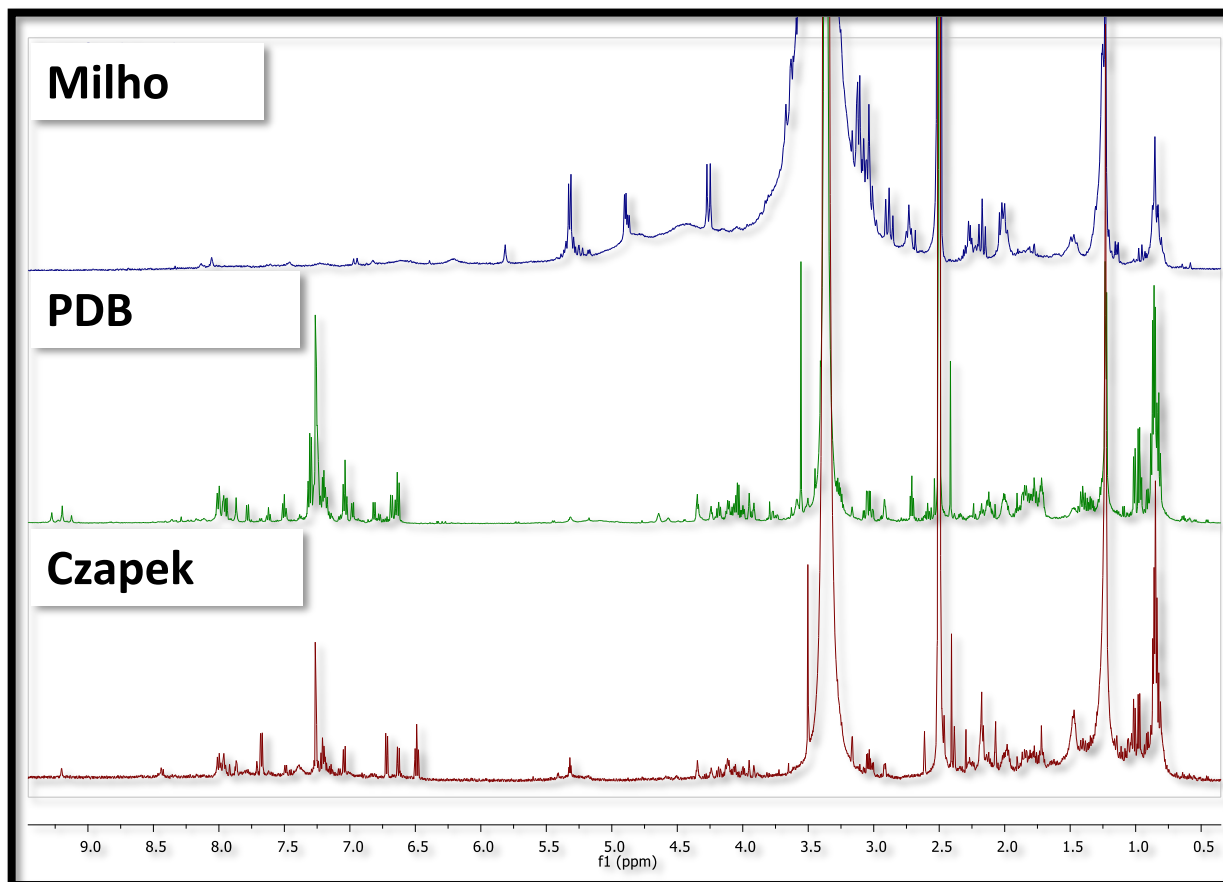
Fonte: autora

4.4 Perfil químico (RMN de ^1H) dos extratos brutos

Análises detalhadas dos experimentos de RMN de ^1H dos extratos brutos obtidos em Czapek, PDB (AcOEt) e milho em MeOH de *Preussia* sp. apresentaram espectros com muitos sinais distribuídos por toda faixa espectral, indicando inúmeras substâncias, evidenciando o endófito como um prolífico produtor de metabólitos secundários. Também foram realizados experimento de RMN de ^1H dos meios de cultivo na ausência do fungo (branco), visando comparar metabólitos extraídos do meio de cultivo e aqueles produzidos por *Preussia* sp.

Os espectros de RMN de ^1H (Figura 19) apresentaram sinais de hidrogênios na região dos carbinólicos (δ_{H} 3,0-4,0 ppm), sinais de hidrogênios aromáticos (δ_{H} 6,5-8,0 ppm), olefínicos (δ_{H} 4,5-6,0 ppm), hidrogênios metilênicos e metílicos (δ_{H} 0,8-3,0 ppm). Após análise dos espectros de RMN de ^1H , verificou-se uma diversidade na produção metabólica do fungo, em função do meio de cultivo, evidenciando a dependência dos nutrientes para a fabricação de metabólitos.

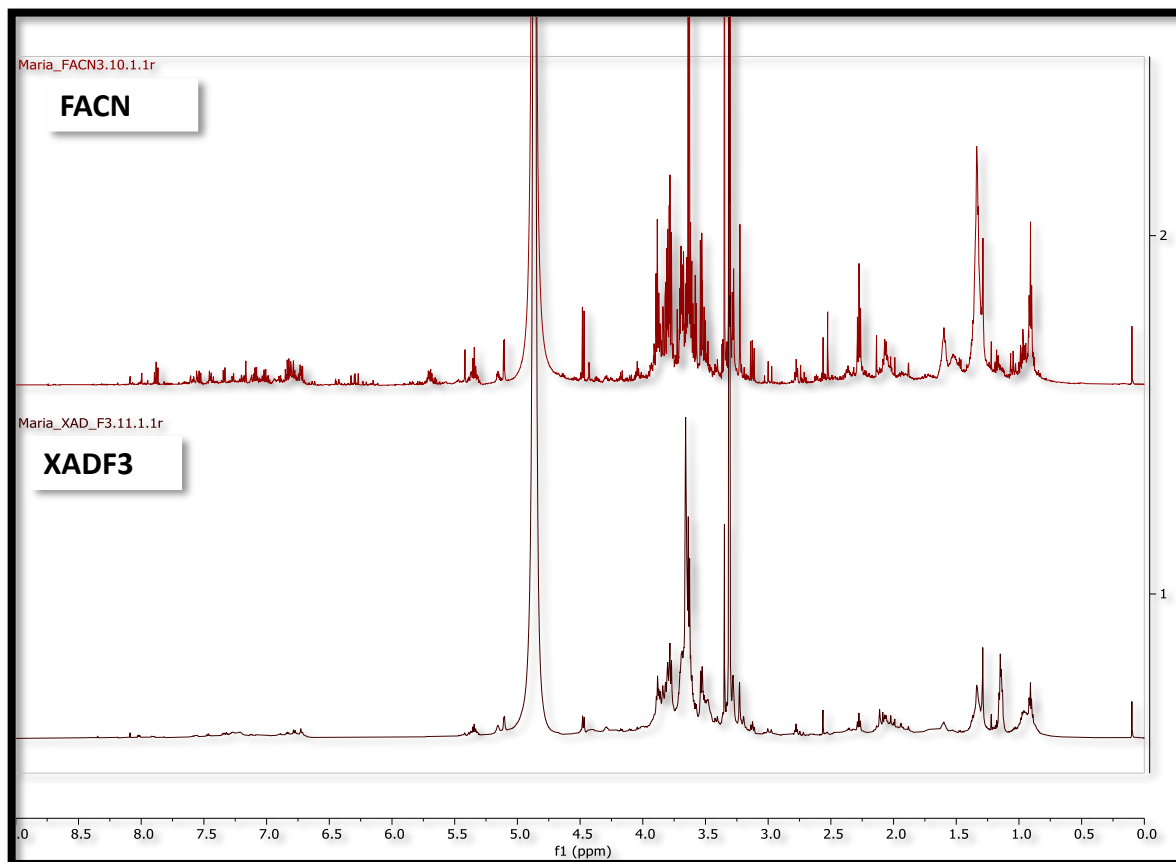
Figura 19-Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos de *Preussia* sp. nos diferentes meios de cultivo estudados, em DMSO- d_6 e 600 MHz



Fonte: autora.

Os espectros de RMN de ^1H (Figura 20) para as frações acetonitrila e XADF3 obtidas a partir do extrato metanólico do fungo *Phyllosticta* sp. apresentaram uma ampla distribuição de sinais ao longo de toda a faixa espectral, sugerindo uma diversidade de classes metabólicas presentes nas amostras analisadas. A detecção de múltiplos sinais em diferentes regiões do espectro de RMN de ^1H é indicativa da presença de diversos compostos e grupos funcionais na amostra. Essa diversidade de sinais pode ser atribuída a uma variedade de metabólitos presentes nas frações acetonitrila e XADF3.

Figura 20-Espectros de RMN de ^1H da fração acetonitrila e da fração XAD de *Phyllosticta* sp. em CD_3OD e 600 MHz



Fonte: autora.

4.5 Estudos dos metabólitos produzidos pelo endófito *Preussia* sp.

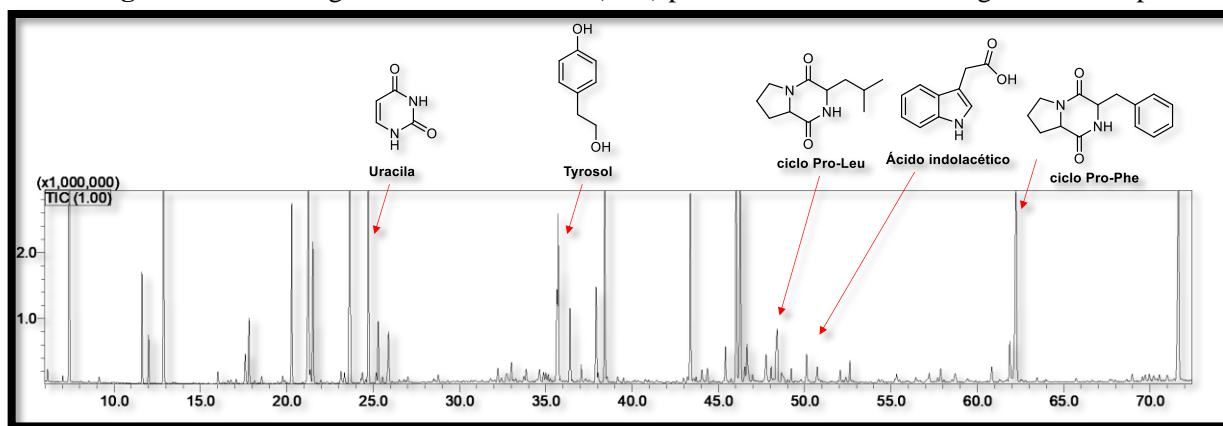
Os extratos produzidos a partir do cultivo do fungo *Preussia* sp. em PDB, Milho e os respectivos brancos dos meios, foram derivatizados e analisados por GC-MS. A derivatização é uma técnica utilizada com a finalidade de modificar as propriedades dos analitos, tornando as moléculas mais volatilizáveis e, conseqüentemente, aumentando a sensibilidade do método cromatográfico. Essa modificação facilita a separação e detecção dos compostos presentes nos extratos fúngicos durante a análise por GC-MS (MOLDOVEANU; DAVID, 2018). A Figura 21 ilustra o cromatograma de íons totais (TIC) para o extrato PDB do fungo *Preussia* sp.

Entre os vários tipos de derivatização que são mais frequentemente usados destacam-se a alquilação (por exemplo, metilação), sililação (por exemplo, formação de derivados de trimetilsilil), acilação (por exemplo, reações com cloretos de acila), entre outros tipos

(MOLDOVEANU; DAVID, 2018). Nesse trabalho foi realizada a derivatização do tipo silição, que é uma reação de substituição de átomos de hidrogênio reativo OH, COOH, SH, NH, CONH, POH, SOH, por um grupo siliil, geralmente o trimetilsilil (TMS) que tem por objetivo reduzir a polaridade do analito e melhorar sua volatilidade (MOLDOVEANU; DAVID, 2018; HARVEY; VOUIROS, 2020).

A derivatização também apresenta algumas desvantagens como a adição de mais etapas no preparo da amostra, além do envolvimento de uma reação química que pode não ser perfeitamente controlada, a geração de artefatos, os quais podem trazer erros significativos (MOLDOVEANU; DAVID, 2018).

Figura 21-Cromatogramas de Íons Totais (TIC) para o extrato PDB do fungo *Preussia* sp



Fonte: autora

A Tabela 6 apresenta os metabólitos identificados por derivatização dos extratos fúngicos através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), onde se encontram os valores de I_R (índice de retenção) calculado e também da literatura, o t_R (tempo de retenção da substância) e porcentagem de similaridade descrita pelo software *GC-solution*. Foram anotadas 18 substâncias, como ácidos orgânicos, álcoois, dicetopiperazinas, amidas. Os cromatogramas de íons totais podem ser encontrados no Apêndice A.

Metabólitos como (7) ácido benzoacético, (11) tirosol e (17) ácido 9-octadecenoico já foram relatados na literatura como sendo produzidos por fungos endofíticos isolados de *Zingiber officinale* (ANISHA; RADHAKRISHNAN, 2017). Apenas os ácidos (2) láctico e (17) 9-octadecenoico foram anotados para ambos os extratos. Cepas de *Preussia* sp. BSL10, isoladas como endófito de folhas de *Boswellia sacra*, produziram o (16) ácido indolacético e giberelinas sugerindo que esse fungo melhora o crescimento das plantas (AL-HOSNI *et al.*, 2018; KHAN

et al., 2016). A uracila, metabólito (**10**), e seus derivados além de ser componente do material genético, já foi isolada do endófito *Diaporthe* sp. (BIASETTO, 2016).

As dicetopiperazinas (**15**) e (**18**) já foram descritas na literatura para o endófito *Aspergillus fumigatus* e para o fungo *Chromocleista* sp., respectivamente. Essas substâncias são ciclodipeptídeos contendo prolina do tipo (Pro-Xaa), são também amplamente distribuídas em fungos (WANG *et al.*, 2017).

Tabela 6-Metabólitos anotados por GC-MS para *Preussia* sp. em diferentes meios de cultivo

No.	t_R (min)	IR_{calc}	IR_{lit}	Substância	Extrato	Similaridade (%)
1	7,03	-		Ácido 2-metilbutanoico	PDB	94
2	12,86	1048	1057	Ácido láctico	PDB, milho	96
3	17,80	1174	1164	Ácido isobutírico	PDB	91
4	20,28	1227	1223	Álcool feniletílico	PDB	95
5	21,25	1247	1242	Ácido 2-hidróxi-4-metilpentanoico	PDB	93
6	21,36	1250	1250	Ácido 2-hidróxi-3-metilvalérico	PDB	95
7	23,65	1298	1303	Ácido benzenoacético	PDB	97
8	24,72	1322	1318	Ácido butanodioico	PDB	96
9	25,30	1335	1328	Ácido metilsuccínico	PDB	96
10	25,90	1348	1346	Uracila	PDB	91
11	35,72	1533	-	Tirosol	PDB	95
12	36,40	1595	1600	Ácido fenil-láctico	PDB	97
13	37,91	1634	1637	Ácido 4-hidróxibenzenoico	PDB	96
14	38,41	1646	1648	Ácido 4-hidróxibenzoacético	PDB	94
15	48,66	2129	-	Ciclo-Pro-Leu-dicetopiperazina	PDB	88
16	50,10	2172	-	Ácido indolacético	PDB	97
17	57,86	2420	-	Ácido 9-octadecenoico	PDB, milho	90
18	62,226	2571	-	Ciclo- Pro-Phe-dicetopiperazina	PDB	90

Legenda: t_R : tempo de retenção da substância; IR_{calc} : índice de retenção calculado; IR_{lit} : índice de retenção da literatura; % da similaridade descrita pelo software GC-solution. Fonte: autora.

4.6 Análises das Redes Moleculares-Molecular Networking (GNPS)

A partir da plataforma GNPS (*Global Natural Products Molecular Networking*, disponível em <http://gnps.ucsd.edu>) foi possível gerar o *molecular networking*, usando uma

abordagem de rede molecular, para obter informações químicas de um ou vários extratos e frações. Essa plataforma associa os espectros MS/MS com base em perfil de fragmentação de massa similares baseada no conceito subjacente de que moléculas estruturalmente relacionadas se fragmentarão de maneiras semelhantes para dar padrões análogos (NAMAN *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2016b). Assim, metabólitos detectados nas análises dos extratos por UPLC-Q-TOF-MS/MS foram anotados, conforme a correspondência espectral de dados de MS/MS com a plataforma GNPS ou com dados disponíveis na literatura. Também foi criada uma base de dados *in house* com os dados espectrais disponíveis para o gênero dos fungos estudados. Os dados analisados na plataforma GNPS para os extratos e frações de *Preussia* sp. geraram uma rede molecular com 2394 nodos conectados, que foram agrupados em 1466 *clusters*.

A desreplicação dos extratos de *Preussia* sp. foi realizada pelo uso da plataforma GNPS, utilizando dados espectrais obtidos por UPLC-Q-TOF-MS/MS. Relatamos a anotação putativa do cluster (Figura 22) de citocalasinas: citocalasina J (C₂₈H₃₇NO₄), citocalasina B (C₂₉H₃₇NO₅) e ascocalasina (C₂₉H₃₉NO₄) no extrato de Czapek. A Tabela 7 fornece os íons anotados e suas informações espectrais. O íon precursor [M + H]⁺ em m/z 452 apresentou uma perda neutra de 18 Da, que forneceu o íon fragmento em m/z 434 [M - H₂O + H]⁺, sugerindo que o metabólito é a citocalasina J. O íon precursor [M + H]⁺ em m/z 480 é um nodo vizinho do íon [M + H]⁺ em m/z 452 mostrou uma perda neutra de 18 Da, fornecendo o íon m/z 462, sugerindo que o composto é a citocalasina B. O íon precursor [M + H]⁺ em m/z 466 mostrou uma perda neutra de 18 Da forneceu o íon fragmento em m/z 448 [M - H₂O + H]⁺, sugerindo que o metabólito é a ascocalasina.

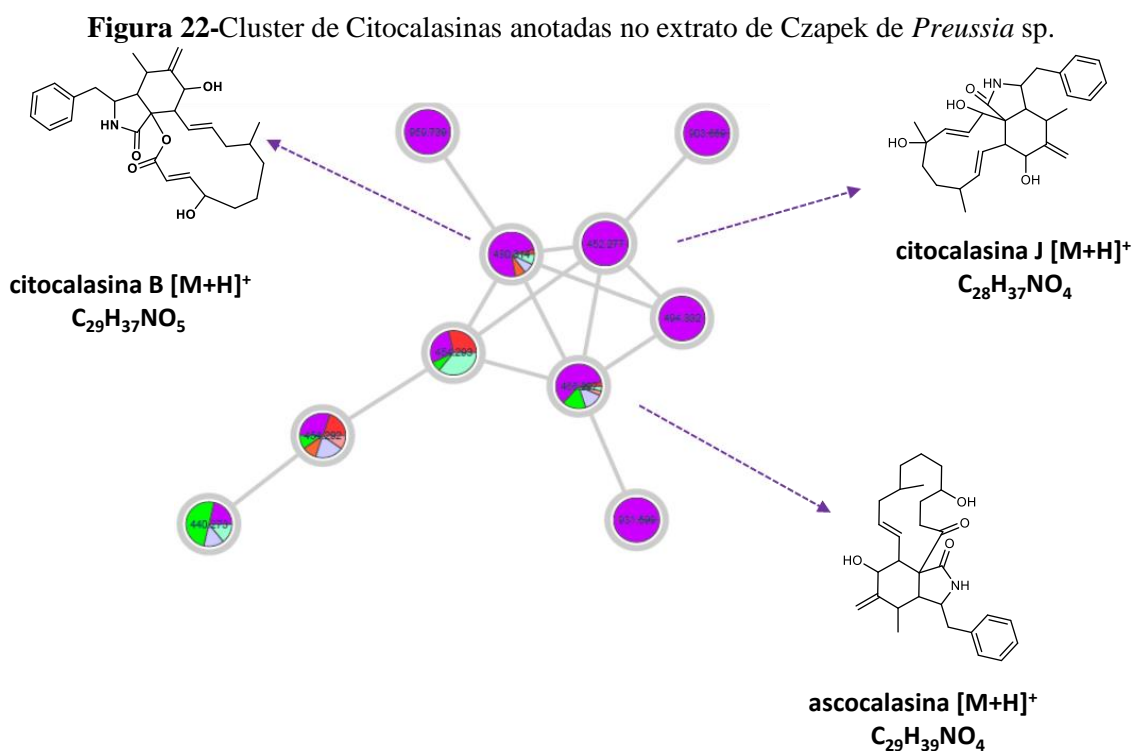
Tabela 7-Metabólitos identificados através da rede de interações moleculares (GNPS) para extratos de *Preussia* sp., analisados em modo positivo em diferentes meios de cultivo

No.	<i>t_R</i> (min)	Aduto (Observado) (<i>m/z</i>)	Fórmula Molecular	MS/MS	Metabólitos
1	9,70	452,2792	C ₂₈ H ₃₇ NO ₄	434 [M - H ₂ O + H] ⁺	citocalasina J
2	10,44	466,2997	C ₂₉ H ₃₉ NO ₄	448 [M - H ₂ O + H] ⁺	ascocalasina
3	11,2	480,3052	C ₂₉ H ₃₇ NO ₅	462 [M - H ₂ O + H] ⁺	citocalasina B

Fonte: autora

Os extratos foram testados contra o protozoário *Leishmania infantum*. O cromatograma do pico base (BPI) do extrato czapek para o endófito *Preussia* sp., obtidos por UPLC-ESI-Q-TOF-MS no modo positivo, encontra-se ilustrado no Apêndice A13. Os espectros de massas MS/MS obtidos por UPLC-ESI-Q-TOF-MS em modo positivo para as citocalasinas anotadas estão ilustrados nos Apêndices A14 a A18.

O extrato de Czapek (76%) apresentou um alto percentual de inibição comparável ao controle positivo miltefosina (98%). O estudo realizado por Valli e colaboradores (2022) relatam a atividade antileishmania para citocalasinas A-D. As citocalasinas apresentam diversas atividades biológicas, dentre as quais destacam-se a inibição do HIV-1, suas propriedades antitumorais, antibióticas e antifúngicas (HUANG *et al.*, 2019).



Fonte: autora

4.7 Ensaios Biológicos

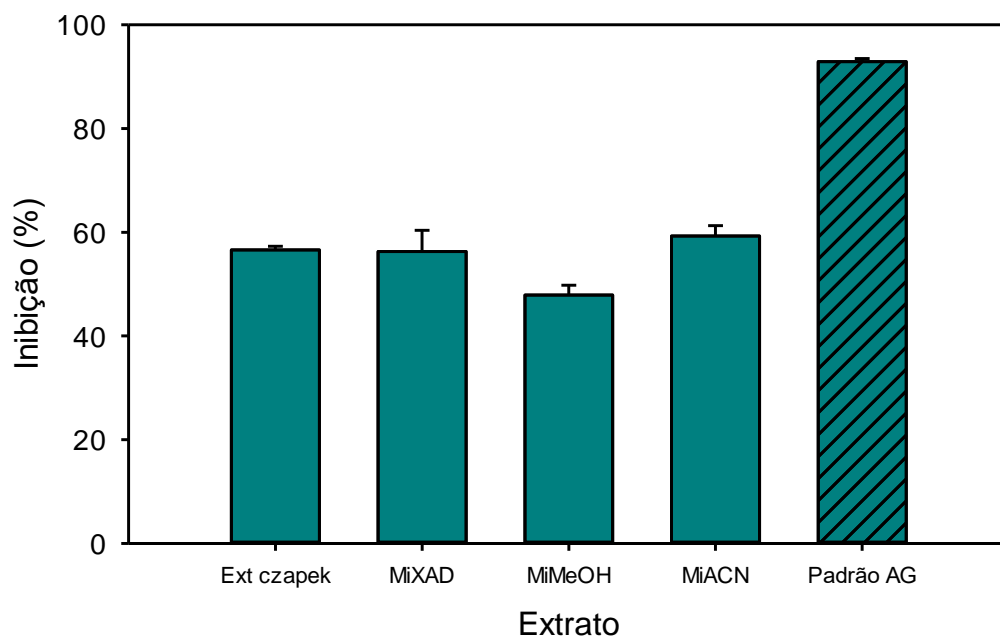
4.7.1 Avaliação da atividade antiglicante

A glicação é uma sequência de reações não enzimáticas, que ocorre em meio biológico. A reação ocorre quando um açúcar redutor reage com grupos nucleofílicos presentes em proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, formando espécies reativas que são os produtos da glicação avançada (FRAIGE *et al.*, 2018; TORRES *et al.*, 2018). A atividade antiglicante é descrita como a capacidade que uma molécula possui de inibir a formação de produtos da glicação avançada (AGEs). O acúmulo de AGEs está relacionado em complicações de algumas doenças como a artrite, a diabetes, aos processos de envelhecimento, a degradação do colágeno, dentre outras (TORRES *et al.*, 2018).

A química de produtos naturais tem investigado extratos de plantas e micro-organismos a procura de moléculas que apresentem atividade antiglicante. Diversos trabalhos relatam que compostos fenólicos, terpenoides e flavonoides apresentam a capacidade de inibir a formação de AGEs (FRAIGE *et al.*, 2018; TORRES *et al.*, 2018).

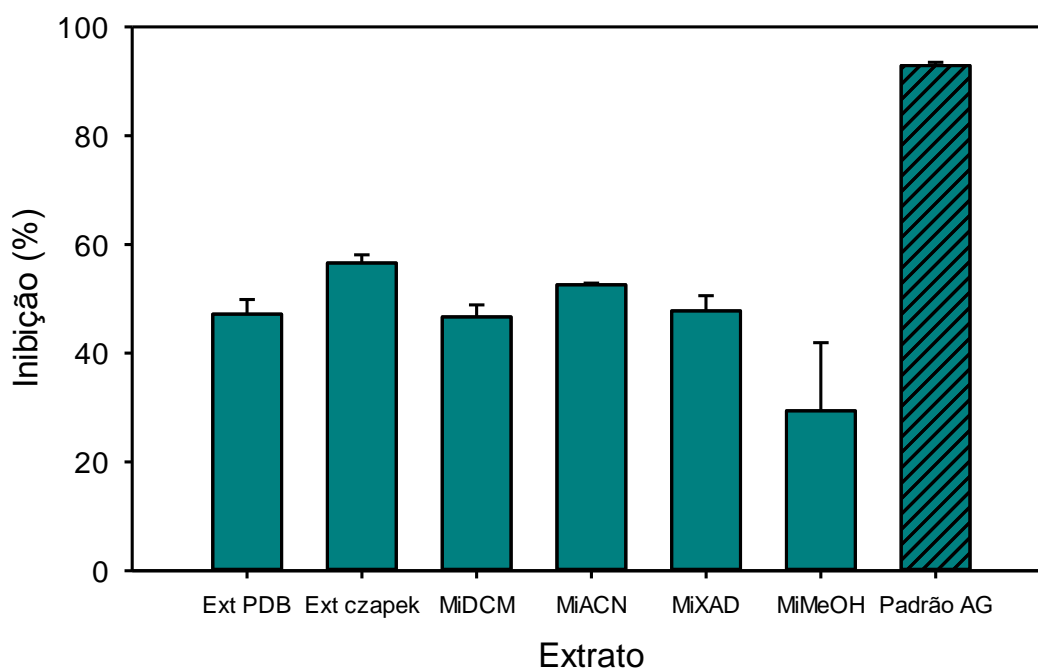
Os extratos de *Preussia* sp. e *Phyllosticta* sp. foram avaliados quanto a capacidade de inibir a formação de AGEs. Os extratos do endófito *Phyllosticta* sp. apresentaram um percentual de glicação variando de 44,6 - 59,3%, para o endófito *Preussia* sp., 29,4 - 56,6%. A aminoguanidina (AG) foi utilizada como controle positivo, com porcentagem de inibição de 92,9%. Todos os extratos que apresentaram valores a partir de 40% de inibição, mostram potencial atividade antiglicante (FRAIGE *et al.*, 2018). Para o fungo *Phyllosticta* sp. (Figura 23), todos os extratos e frações apresentaram potencial atividade antiglicante, sendo que a fração MiACN demonstrou maior potencial antiglicante com valor de 59,3%. Para o fungo *Preussia* sp. (Figura 24), o extrato de Czapek apresentou maior percentual de inibição da glicação, com valor de 56,6%.

Figura 23-Percentual de inibição dos extratos de *Phyllosticta* sp. na formação de produtos finais da glicação (AGEs).



Controle positivo: aminoguanidina (AG), **92,9%** de inibição. Fonte: autora.

Figura 24-Porcentagem de inibição dos extratos de *Preussia* sp. na formação de produtos finais da glicação (AGEs)



Controle positivo: aminoguanidina (AG), **92,9%** de inibição. Fonte: autora.

4.7.2 Avaliação *in vitro* da atividade antitrypanosoma¹

A busca por novos candidatos a fármacos para o tratamento da doença de Chagas, doença tropical negligenciada, ainda se faz necessária visto que, essa doença afeta aproximadamente 8 milhões de pessoas e os tratamentos quimioterápicos disponíveis comercialmente causam reações adversas (DE SOUZA *et al.*, 2020). Um estudo realizado por Valli e colaboradores (2022) com citocalasinas A-D produzidas por fungos endofíticos, isolados de plantas da biodiversidade brasileira, apresentaram valores de IC₅₀ de 3 a 20 µM. A Tabela 8 apresenta os percentuais de inibição dos extratos e frações na triagem frente o parasita *Trypanosoma cruzi* Tulahuen LacZ (amastigota). As frações **4**, **6** e **7** (produzidas a partir do extrato PDB) e o extrato de czapek apresentam capacidade de inibição de *Trypanosoma cruzi*.

Tabela 8-Percentual de inibição na triagem frente a *Trypanosoma cruzi*

Amostras	(%) de inibição de <i>T. cruzi</i>
F1- fração 1	n/a
F2- fração 2	n/a
F3- fração 3	n/a
F4- fração 4	44,3
F5- fração 5	n/a
F6- fração 6	36,2
F7- fração 7	39,1
Ext. czPhe	34,8
Ext. czapek	19,6
Benznidazole	2.1 µM

Legenda: n/a: não apresenta atividade. Concentração de extratos e frações 20 µg/mL. Droga de ref: Benznidazole (2.1 µM). Fonte: Laboratório de Química Medicinal e Computacional (LQMC-IFSC-USP).

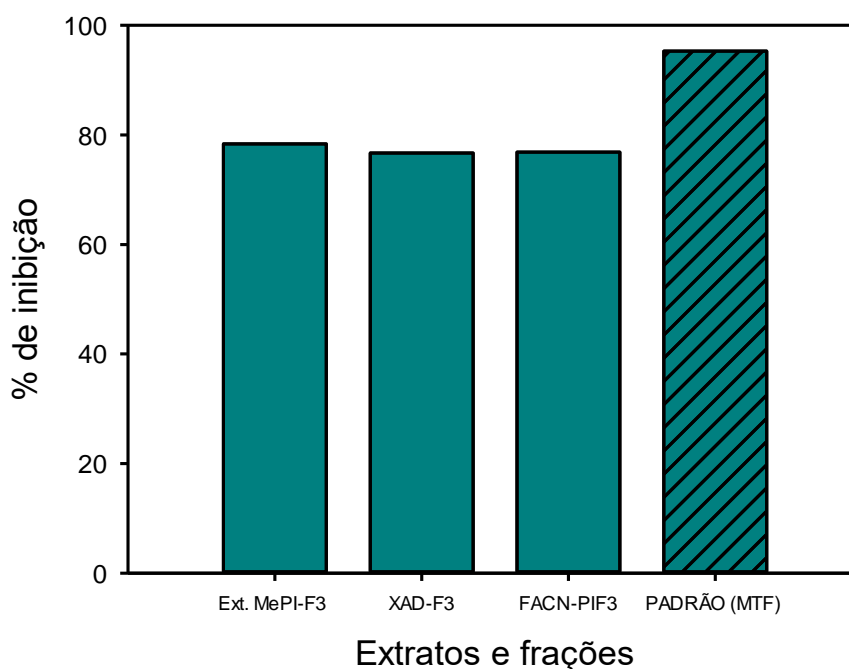
4.7.3 Avaliação *in vitro* da atividade antileishmania¹

As doenças tropicais negligenciadas, como a leishmaniose, a doença de Chagas, dentre outras, afetam mais de um bilhão de pessoas no mundo (FERREIRA; DE MORAES; ANDRICOPULO, 2022). Assim, faz se necessário a investigação dos produtos naturais a fim de identificar novos agentes terapêuticos para o tratamento dessas enfermidades (VALLI *et al.*,

2022). Por esse motivo, os extratos dos fungos *Phyllosticta* sp. e *Preussia* sp. foram utilizados para realizar uma triagem frente ao protozoário *Leishmania infantum* ITMAP263.

A Figura 25 apresenta a porcentagem de inibição dos extratos e frações do endófito *Phyllosticta* sp. frente a *L. infantum*. A triagem dos extratos e frações desse endófito apresentaram percentual de inibição superior a 70% comparado ao padrão Miltefosina (95,29%), sugerindo atividade leishmanicida. Com a fração XAD-F3, obtida a partir da fração aquosa do extrato metanólico de *Phyllosticta* sp. (ver item 3.4.4) foi realizado um novo fracionamento, que resultou no isolamento de duas substâncias, chamadas de XADF3-1 e XADF3-3. Os valores para atividade antileishmania de substâncias isoladas e citotoxicidade para (THP-1) estão apresentados na Tabela 9. As substâncias XADF3-1 e XADF3-3 obtiveram valores de IC_{50} de 8,51 e 5,31 μ M, respectivamente.

Figura 25-Porcentagem de inibição dos extratos e frações do endófito *Phyllosticta* sp. frente a *Leishmania infantum* ITMAP263



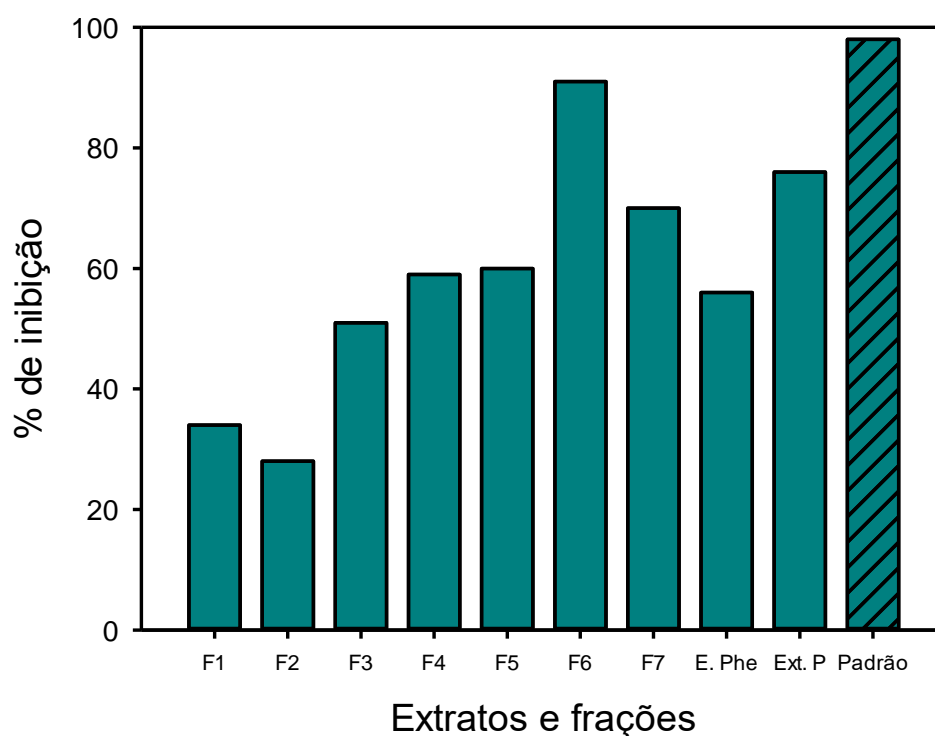
Concentração de extratos e frações 20 μ g/mL e padrão: Miltefosina (6 μ g/mL). Ext MePI: extrato metanólico;

XAD-F3: fração extraída com XAD a partir do extrato aquoso; FACN: fração acetoneitrila.

Fonte: Laboratório de Química Medicinal e Computacional (LQMC-IFSC-USP).

O extrato bruto de *Preussia* sp. e as frações da coluna PDB foram testados contra o protozoário *Leishmania infantum*, conforme o gráfico ilustrado na Figura 26, sendo que os extratos de *Preussia* sp. de Czapek (76%) e frações F5 (60%), F6 (91%) e F7 (70%) do extrato PDB apresentaram alta porcentagem de inibição comparáveis ao controle positivo miltefosina (98%). As frações (F5 e F6) que apresentaram atividade frente ao protozoário foram submetidas a um novo fracionamento e as substâncias isoladas F5-G1 e F5-18 foram investigadas quanto a atividade antileishmania (Tabela 9), mostrando valores de IC₅₀ de 49,21 e 42,83 μ M, respectivamente. A toxicidade foi verificada para células de macrófagos humanos (THP-1), apresentada na Tabela 9.

Figura 26-Porcentagem de inibição dos extratos e frações do endófito *Preussia* sp. frente a *Leishmania infantum* ITMAP263



Concentração de extratos e frações 20 μ g/mL e padrão: Miltefosina (6 μ g/mL)

Fonte: Laboratório de Química Medicinal e Computacional (LQMC-IFSC-USP).

Tabela 9-Atividade antileishmania de substâncias isoladas e citotoxicidade para (THP-1)

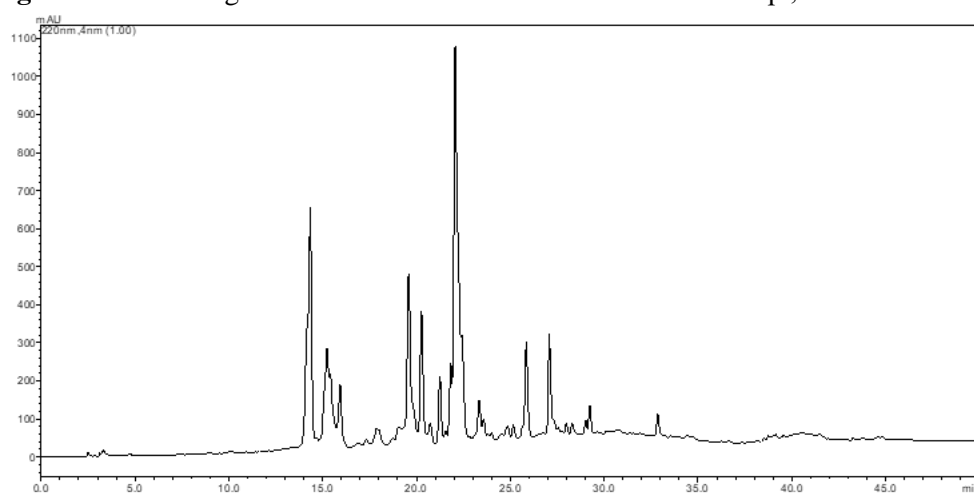
Amostras	<i>L. infantum</i> IC₅₀ (μM)	THP-1 IC₅₀ (μM)
F5-G1	49,21 ± 1,65	>64
F5-18	42,83 ± 0,36	>64
XADF3-1	8,51 ± 1,83	>64
XADF3-3	5,31 ± 1,05	>64
MTF	0,77 ± 0,29	-
DOXO	-	0,24 ± 0,03

Legenda: Concentração testadas: 0,12 - 64 μM; THP-1 (macrófagos humanos). Droga de ref: Doxorubicina (DOXO) e Miltefosina (MTF). Fonte: Laboratório de Química Medicinal e Computacional (LQMC-IFSC).

4.8 Identificação estrutural das substâncias produzidas pelos endófitos *Preussia* sp. e *Phyllostica* sp.

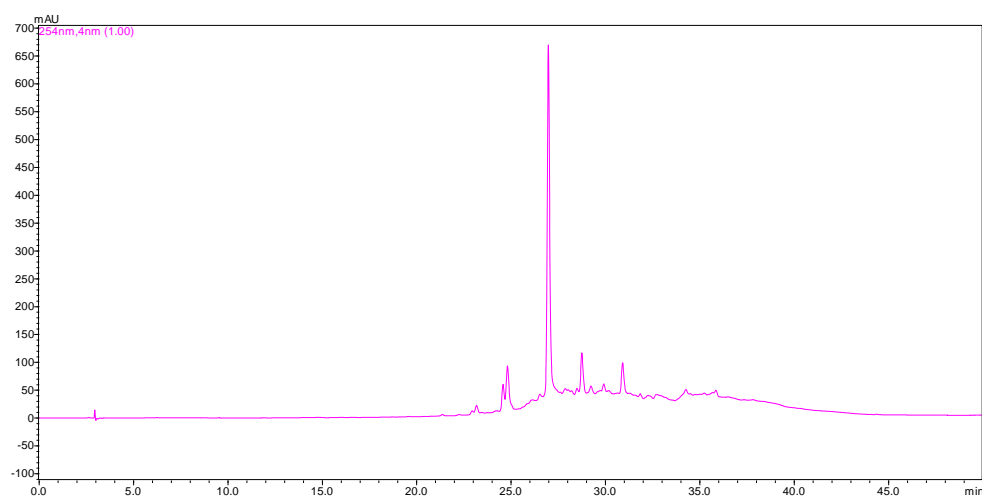
Após as análises qualitativa dos extratos (Figura 27) e verificando as frações (Figura 28) que obtiveram maior atividade nos resultados dos ensaios biológicos foi realizado o fracionamento do extrato PDB de *Preussia* sp. As substâncias que obtiveram massa suficiente ou apresentavam maior pureza foram submetidas a identificação estrutural.

Figura 27-Cromatogramas do extrato bruto de PDB de *Preussia* sp., $\lambda = 254$ nm



Fonte: autora.

Figura 28-Cromatogramas da fração 5 (70% H₂O:MeOH) da coluna do ext. PDB de *Preussia* sp. a $\lambda = 254$ nm

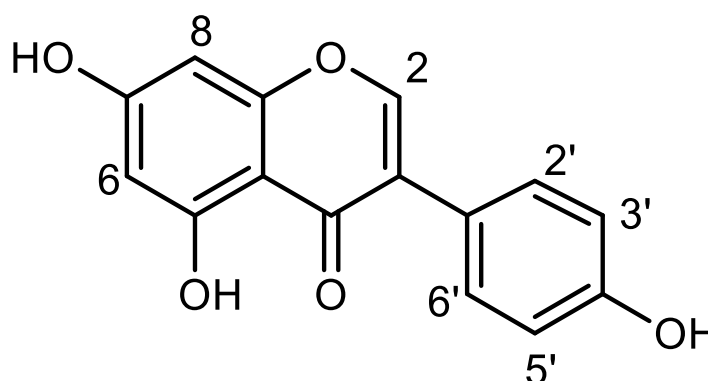


Fonte: autora.

4.8.1 Identificação estrutural da substância produzida pelo endófito *Preussia* sp.

A partir da fração 5 do extrato PDB (Figura 28) foi isolada a substância 1. No espectro de RMN de ^1H da substância **1** (Figura 30) foram observados sinais da região de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 8,06 (*s*, 1H) atribuído ao H-2. Um duplete foi observado em δ_{H} 7,37 para os H-2' e H-6' que acoplam em *orto* ($J = 8,4\text{Hz}$) com os H-3' e H-5', apresentando um deslocamento de δ_{H} 6,85 (*d*, $J = 8,5\text{Hz}$). Outro duplete foi observado em δ_{H} 6,23 ($J = 2,1\text{Hz}$) atribuído ao H-6 e um duplete em δ_{H} 6,35 ($J = 2,1\text{Hz}$). A partir dessas informações associadas às correlações observadas nos mapas de contorno COSY (Figura 31) foi possível identificar a substância como uma isoflavona genisteína (4',5,7-tri-hidroxi-isoflavona). As isoflavonas, representadas por compostos como a genisteína (Figura 29), constituem um grupo de substâncias naturalmente presentes na família Fabaceae, encontrando-se amplamente distribuídas em fontes vegetais, principalmente na soja. (JUNG *et al.*, 2020).

Figura 29-Estrutura da substância 1 (Genisteína).



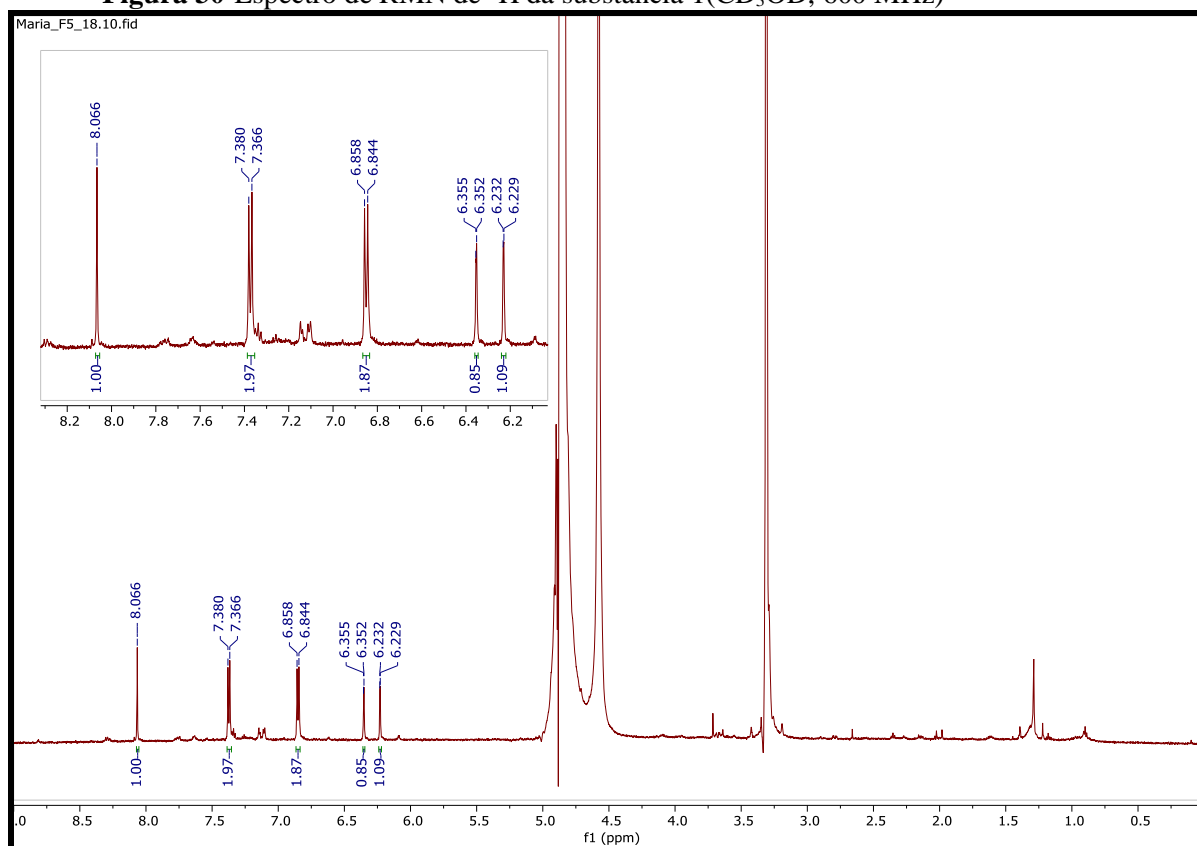
Os dados espectrais (Tabela 10), foram comparados com os dados fornecidos pela literatura (JUNG *et al.*, 2020; SORDON *et al.*, 2017). A partir dos dados obtidos ESI-MS (Figura 32), modo positivo, evidenciou a molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ com m/z 271,0606, cal. 271,0601, erro = 1,8 ppm e que associado aos dados de RMN permitiu propor a fórmula molecular de $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$.

Sordon e colaboradores (2017) investigaram a biotransformação realizada por fungos filamentosos com genisteína, daidzeína e biochanina que converteram essas biomoléculas em seus derivados glicosilados, respectivamente.

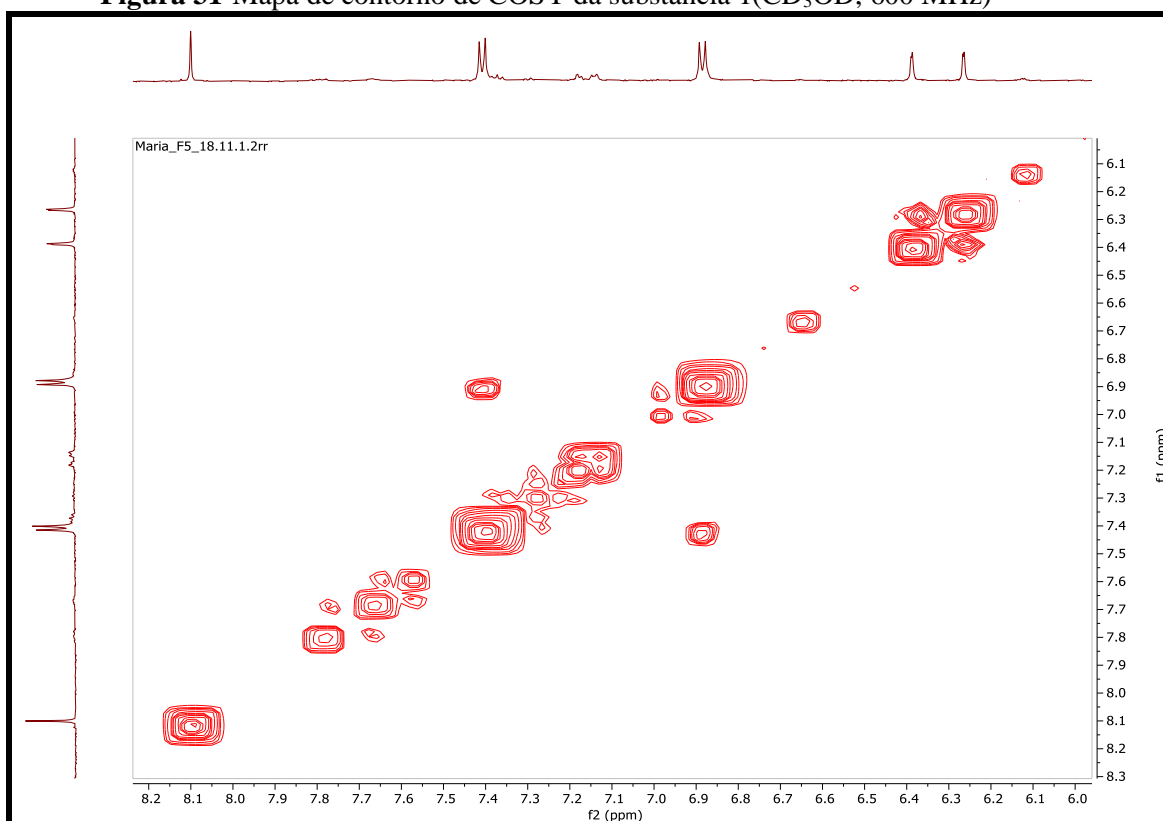
Tabela 10-Dados de RMN de ^1H , (CD_3OD , 600 MHz), δ em ppm e J em Hz.

Posição	δH	Literatura
2	8,06 s	8,32 s
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	6,23, d, $J = 2,1\text{Hz}$	6,26, d, $J = 2,1\text{Hz}$
7	-	-
8	6,35, d, $J = 2,1\text{Hz}$	6,42, d, $J = 2,1\text{Hz}$
9	-	-
10	-	-
1'	-	-
2' e 6'	7,37, d, $J = 8,4\text{Hz}$	7,37 d, $J = 8,4\text{Hz}$
3' e 5'	6,85, d, $J = 8,5\text{Hz}$	6,82 d, $J = 8,4\text{Hz}$
4'	-	-

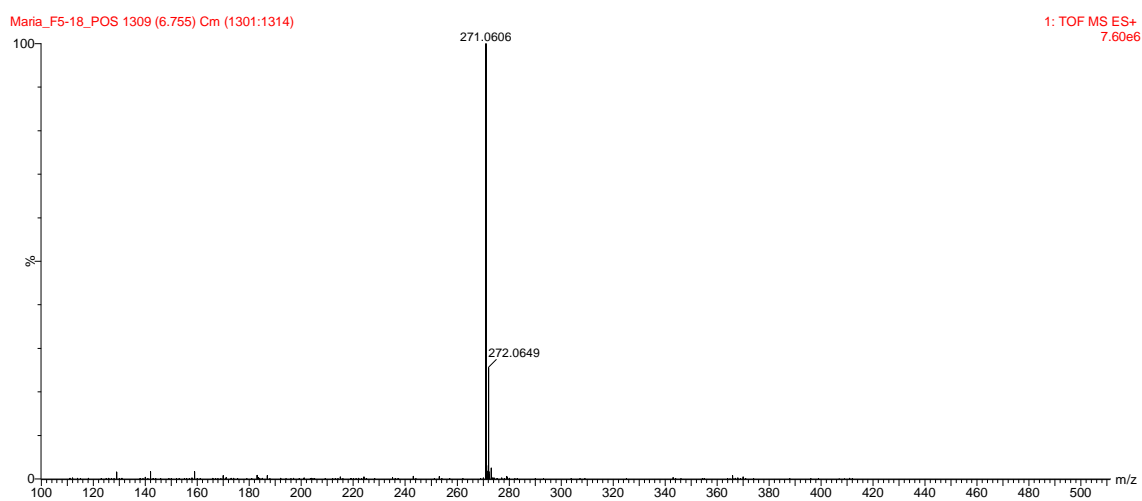
Dados comparados com a literatura, experimento realizado em DMSO-d_6 (SORDON et al., 2017).
Fonte: autora.

Figura 30-Espectro de RMN de ^1H da substância 1 (CD_3OD , 600 MHz)

Fonte: autora

Figura 31-Mapa de contorno de COSY da substância 1(CD₃OD, 600 MHz)

Fonte: autora

Figura 32-Espectro de massas para a substância 1

Fonte: autora

4.8.2 Identificação estrutural das substâncias produzidas pelo endófito *Phyllosticta* sp.

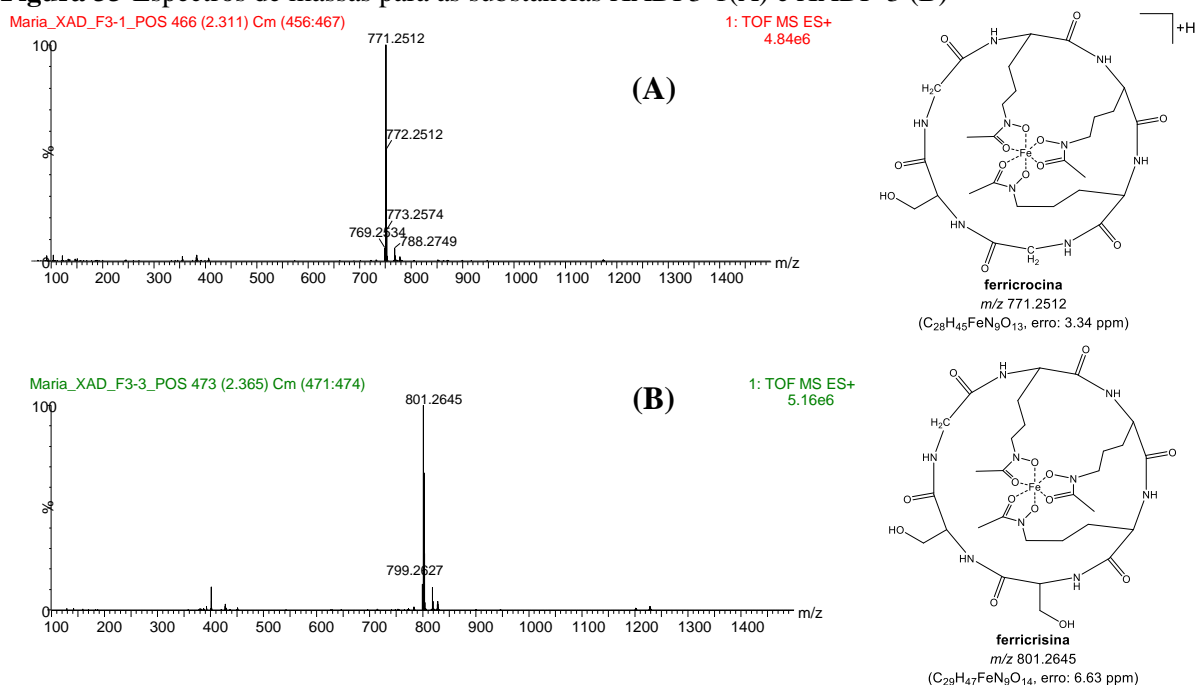
A inspeção dos íons detectados no extrato metanólico e na fração XADF3 (Figura 18, item 4.3) revelou a presença de duas bandas cromatográficas com valores de tempos de retenção baixos, $t_R=1,76$ e $t_R=1,77$, e com massas moleculares superiores a 700 Da, m/z 771,2512 e 801,2645, respectivamente. Essas substâncias não apresentaram registros nas bases de dados construída para o fungo *Phyllosticta* sp., sugerindo a possibilidade de serem substâncias novas para o gênero. A análise dos espectros de massas MS/MS do íon precursor $[M+H]^+$ em m/z 771 revelou uma perda de 18 Da, resultando no íon produto em m/z 753, atribuída à perda de uma molécula de água. A fragmentação do íon precursor em m/z 771 produziu sinais em m/z 370, 398, 455, 542 e 599. O íon $[M+H]^+$ foi detectado em m/z 801, e sua fragmentação resultou em sinais em m/z 370, 398, 455, 542 e 629. Os íons precursores em m/z 771 e 801 mostraram uma perda neutra de 172 Da, que resultou na formação dos fragmentos em m/z 599 $[M+H-172]^+$ e m/z 629 $[M+H-172]^+$, respectivamente. A fragmentação desses compostos ocorre via clivagem peptídica, apresentando a perda característica de 172 Da, correspondendo à unidade L-AHO (N^δ -acetil- N^δ -hidroxi-L-ornitina) (ESSÉN *et al.*, 2006; JENNER *et al.*, 2023). Íon em m/z 599 produziu o íon em m/z 542, correspondendo a uma perda de 57 Da (unidade de glicina). A fragmentação a partir do íon em m/z 542 evidenciou a clivagem da ligação amídica, resultando em uma perda neutra de 87 Da correspondente à unidade de serina (Figura 34) que resultou na formação do fragmento em m/z 455 $[gli-orn-orn-Fe]^+$, identificado nos espectros de MS/MS de ambos os sideróforos. O fragmento em m/z 398 $[orn-orn-Fe]^+$ apresentou uma perda de 18 Da, resultando no íon em m/z 370 (ESSÉN *et al.*, 2006). O estudo realizado por Essén e colaboradores (2006) sugeriu a perda neutra de 172 Da e o fragmento em m/z 398 como fragmentos usados para verificar a presença do esqueleto ferricromo (ESSÉN *et al.*, 2006).

Com base no padrão de fragmentação apresentado, que está em consonância com os dados reportados na literatura, é possível sugerir a presença dos sideróforos ferricrocina, observado em m/z 771 (Figura 33 A), e ferricrisina, identificado em m/z 801 (Figura 33 B). Além disso, os espectros ESI-HRMS no modo positivo para essas substâncias mostraram os íons $[M+H]^+$ em m/z 771,2512 e 801,2645, sugerindo as fórmulas moleculares $C_{28}H_{45}FeN_9O_{13}$ (calc. para $C_{28}H_{45}FeN_9O_{13}$, 771,2486; erro de 3,34 ppm) e $C_{29}H_{47}FeN_9O_{14}$ (calc. para $C_{29}H_{47}FeN_9O_{14}$, 801,2591; erro de 6,63 ppm), respectivamente, que são consistentes com as estruturas propostas.

Essas substâncias são classificadas como ferricromos, que são sideróforos produzidos por fungos. Os sideróforos constituem uma classe de compostos que têm sido isolados em

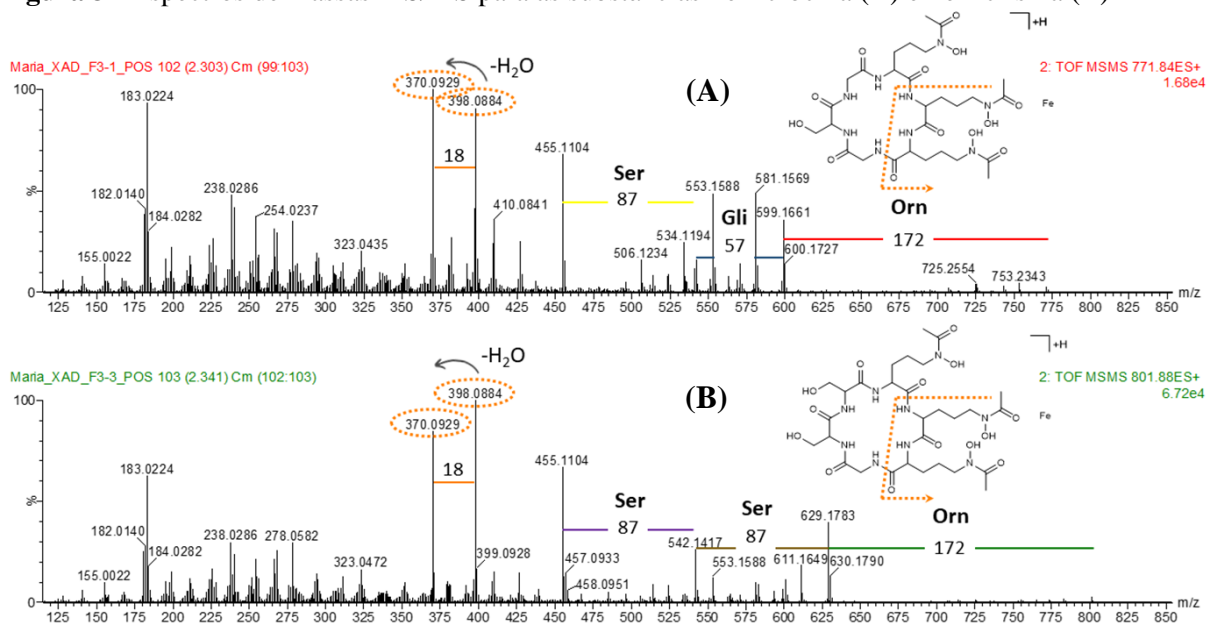
diversos gêneros de fungos, como *Neurospora*, *Rhodotorula*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium* (HIDER; KONG, *et al.*, 2010). As enzimas ferricromos NRPSs são amplamente encontrados na maioria dos ascomicetos, sendo responsáveis por fornecer o maquinário biossintético necessário para a produção de sideróforos. A diversidade estrutural dos ferricromos é resultado das variações na sequência e organização dos domínios NRPS, que influenciam diretamente a síntese dos compostos ferricrocina e ferricrisina (JENNER, *et al.*, 2023). Esses sideróforos (ferricrocina e ferricrisina) são relatados pela primeira vez para o gênero *Phylloscticta*.

Figura 33-Espectros de massas para as substâncias XADF3-1(A) e XADF-3 (B)



Fonte: autora

O esqueleto estrutural dos ferricromos (Figura 33) é caracterizado como um hexapeptídeo, com a exceção do tetraglicilferricromo, que apresenta uma estrutura de heptapeptídeo. Esses sideróforos desempenham um papel crucial no transporte e na aquisição de íons ferro, o que é de grande importância para inúmeras atividades biológicas e processos químicos associados aos micro-organismos (BENITE, *et al.*, 2002; HIDER; KONG, *et al.*, 2010). A extração dos sideróforos foi realizada utilizando uma mistura de resinas de amberlite do tipo XAD4 e XAD16. Essas resinas têm a capacidade de seletivamente capturar e concentrar os sideróforos presentes nas amostras em estudo, possibilitando sua posterior identificação e análise (PLUHACEK, *et al.*, 2016; JENNER, *et al.*, 2023).

Figura 34-Espectros de massas MS/MS para as substâncias Ferricrocina (A) e Ferricrisina (B)

Fonte: autora

A ferricrocina está associada ao armazenamento e transporte intracelular de ferro realizado pelos fungos. Para o fungo *Aspergillus nidulans*, a ferricrocina também está relacionada com o controle da germinação e desenvolvimento sexual (HIDER; KONG, *et al.*, 2010). Para os sideróforos produzidos por fungos tem se atribuído propriedades como moléculas sinalizadoras, reguladoras do estresse oxidativo e propriedades antibacterianas (KALANSURIYA, *et al.*, 2017). De acordo com Benite e colaboradores (2002), os sideróforos demonstraram um potencial de aplicação como agentes farmacológicos e agroquímicos, particularmente no contexto da incorporação ou sequestro de íons metálicos. Os sideróforos ferricrocina e ferricrisina apresentaram atividade antileishmania, obtendo valores de IC₅₀ de 8,51 e 5,31 μ M, respectivamente. Assim, o isolamento de metabólitos a partir de fungos endofíticos escolhidos com base na atividade biológica oferece um direcionamento sustentável para a busca de novas moléculas bioativas.

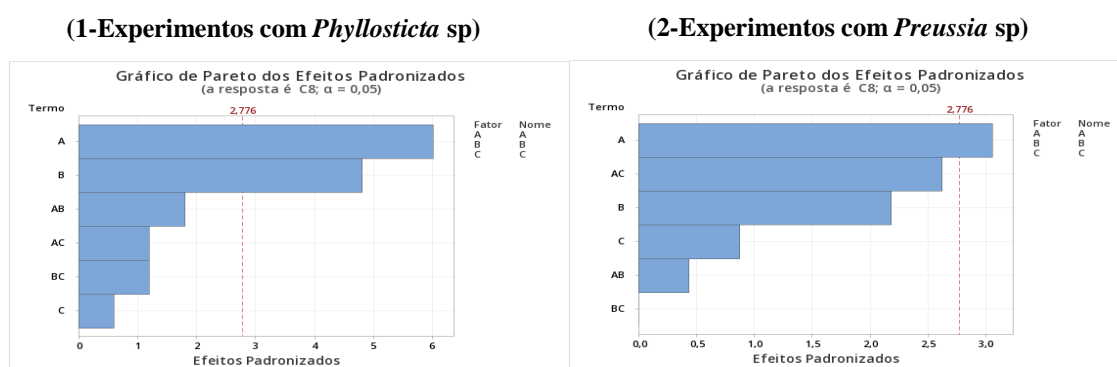
4.9 Estudo compostos orgânicos voláteis (COVs)

Para investigar o perfil de COVs dos endófitos foram realizadas análises de *Headspace* GC-MS de fungos e do co-cultivo visto que, existem poucos dados na literatura sobre voláteis fúngicos.

4.9.1 Triagem das variáveis

A avaliação das variáveis empregadas no estudo dos COVs produzidos por *Phyllosticta* sp. e *Preussia* sp. foi otimizada por meio de planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central (triplicata no ponto central), que resultou em 11 experimentos realizados para cada fungo estudado, representado pelos gráficos de Pareto (Figura 35). A etapa de triagem permitiu identificar o tempo de extração (fator A) e a temperatura de dessorção (fator B) como as variáveis mais significativas ($p < 0,05$) que influenciaram na distribuição do número de sinais cromatográficos por experimento. O fator C (tempo de dessorção) não apresentou valor significativo. A interação entre os fatores avaliados também não apresentou significância estatística.

Figura 35-Gráficos de Pareto obtidos a partir do estudo das variáveis avaliadas durante o planejamento fatorial. A (tempo de extração), B (temperatura de dessorção) e C (tempo de dessorção)



Fonte: autora.

Conforme o Gráfico de Pareto 1 (experimento realizado com o fungo *Phyllosticta* sp), o tempo de extração (A) e a temperatura de dessorção (B) foram as variáveis que apresentaram valor significativo, enquanto que o Gráfico de Pareto 2 (experimento realizado com o fungo *Preussia* sp) identificou apenas o tempo de extração como variável estatisticamente significativa. Uma revisão da literatura indica que o tempo de extração e a temperatura são as variáveis que mais afetam as condições de extração, alterando a cinética de transferência de massa de COVs entre as diferentes fases do sistema (BENEVIDES *et al.*, 2014; PROSEN; ZUPANČIČ-KRALJ, 1999). Após otimizar as condições de extração de COVs (tempo de extração: 60 min, tempo de dessorção: 6 min e temperatura de dessorção: 250 °C), os experimentos foram realizados com as culturas axênicas dos fungos e com co-cultivo.

4.9.2 Identificação dos compostos orgânicos voláteis de *Phyllosticta sp.* e *Preussia sp.*

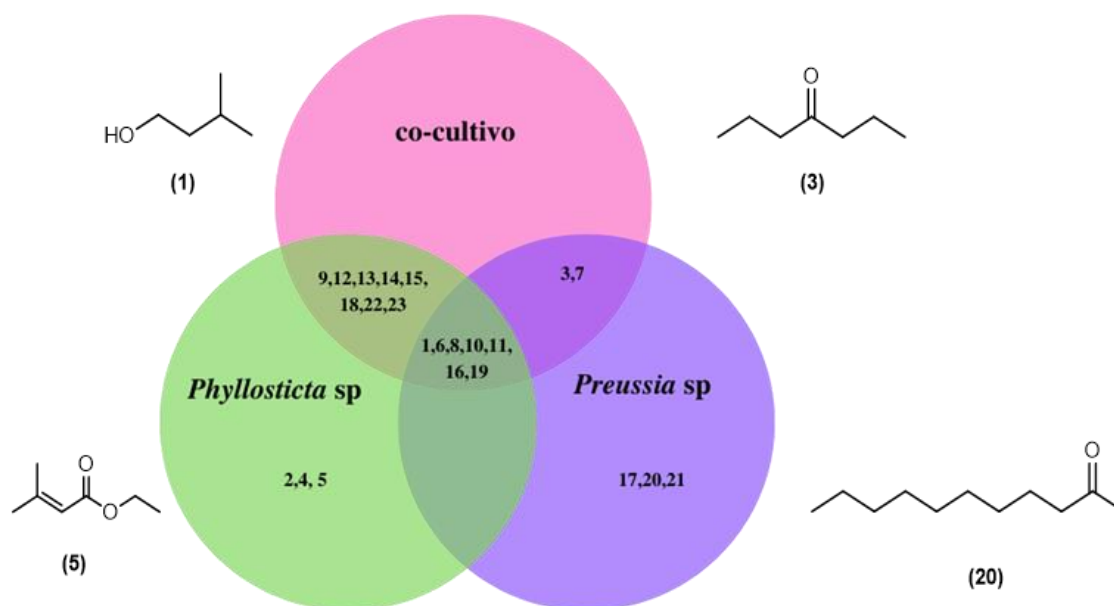
Os dados adquiridos de análises HS-SPME-GC-MS do perfil metabólico de COVs foram avaliados e interpretados usando abordagens quimiométrica e computacional. Ferramentas de rede molecular disponíveis na plataforma GNPS foram aplicadas para processar e analisar os espectros de massas adquiridos (AKSENOV *et al.*, 2021; FRANCISCO *et al.*, 2020). Esses compostos voláteis foram anotados usando a ferramenta de rede molecular (GNPS). Em seguida, foi calculado o índice de retenção para os COVs a partir da equação de Van den Dool e Kratz, utilizando os valores de tempo de retenção dos padrões de hidrocarbonetos (C9-C40) adquiridos nas mesmas condições cromatográficas. Além disso, os espectros de massas que não foram anotados pela plataforma GNPS foram pesquisados em bancos de dados públicos de produtos naturais (NIST; mVOC 3.0 database) e comparados com os dados existentes da literatura para voláteis fúngicos (AKSENOV *et al.*, 2020; LEMFACK *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2016a).

Os dados analisados da plataforma GNPS para os COVs formaram uma rede molecular (Figura 36) com 108 nodos, conectados por 251 arestas. A busca da biblioteca MS realizada no GNPS resultou em 4,67% de anotações com correspondência de dados MS (Tabela 11), (AKSENOV *et al.*, 2020). Essas correspondências de anotações foram avaliadas manualmente e comparadas com a literatura, resultando em anotações de nível 3 com base nos critérios estabelecidos pelo MSI (*Metabolomics Standard Initiative*) (PILON *et al.*, 2020; SUMNER *et al.*, 2007).

Essas abordagens revelaram famílias moleculares estruturalmente relacionadas em culturas axênicas e co-cultivo, possibilitando a visualização da distribuição dos diferentes compostos no perfil de voláteis dos fungos aqui estudados. As redes moleculares evidenciaram o perfil metabólico dos fungos é composto por vários compostos orgânicos, incluindo álcoois (26%), hidrocarbonetos alifáticos (26%), ésteres (21,8%), cetonas (17,5%) e outros (8,7%). As anotações dos COVs detectados durante os cultivos axênicos de *Phyllosticta sp.*, *Preussia sp.* e durante co-cultivo estão representadas na Tabela 11.

heptan-2-ona e o (5) 3-metil-but-2-enoato de etila, enquanto que os COVs específicos para o fungo *Preussia* sp foram (17) 2-fenil-acetonitrila, (20) undecan-2-ona e (21) undecan-2-ol.

Figura 37-Diagrama de Venn mostrando os metabólitos anotados por GC-MS de cultura axênica ou co-cultivo de *Phyllosticta* sp e *Preussia* sp. Os números indicam os metabólitos descritos na Tabela 11



Fonte: autora.

O COV anotado como (9) 2-etil-hexanoato de metila ($t_R = 15,7$ min, valor de cosseno 0,94) foi identificado como o metabólito mais abundante emitido pelo fungo *Phyllosticta* sp. (F3) no cultivo axênico e também durante co-cultivo com o fungo *Preussia* sp. (F4). Nódulos para os metabólitos (20) undecan-2-ona ($t_R: 23,1$ min, valor de cosseno: 0,86) e (21) undecan-2-ol ($t_R: 23,3$ min, valor de cosseno: 0,92) foram observados apenas em COVs produzidos por *Preussia* sp. e durante o co-cultivo (cc).

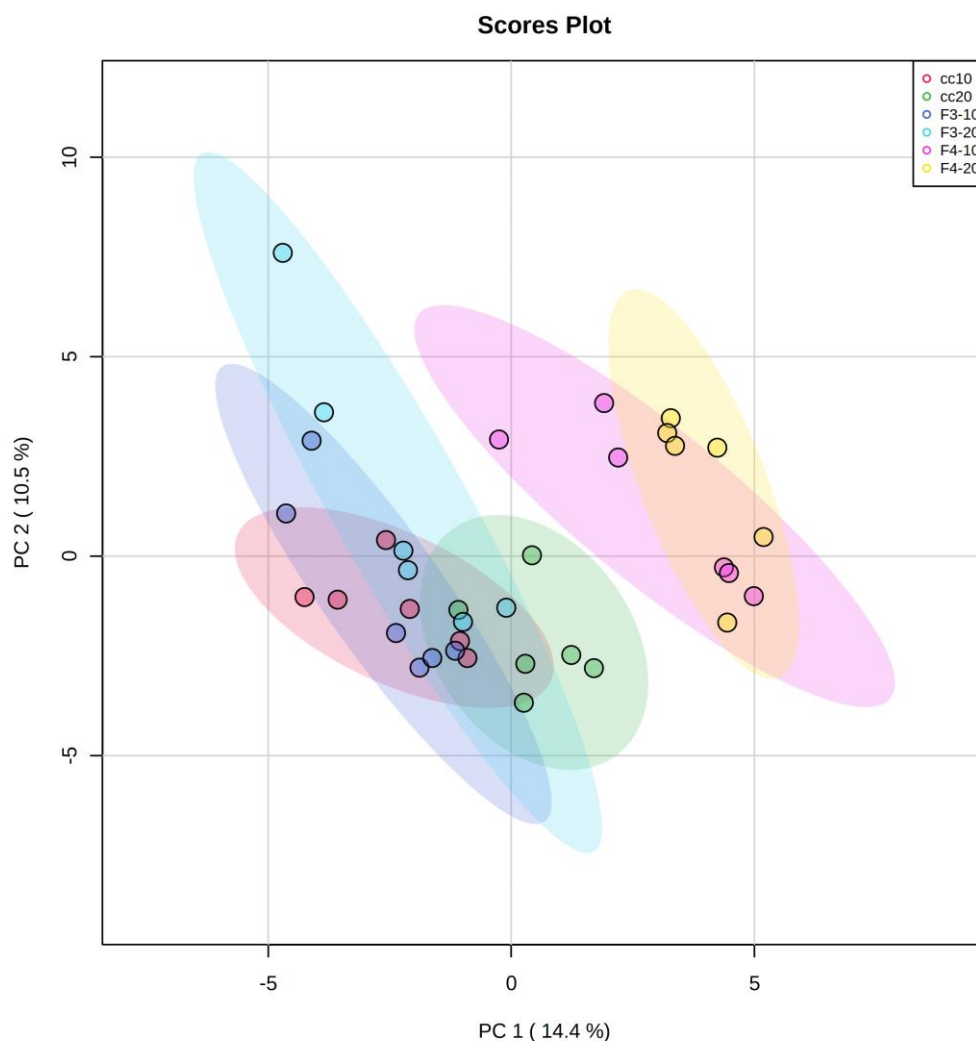
Tabela 11-COVs anotados em culturas axênicas e durante o co-cultivo de *Phyllosticta* sp e *Preussia* sp.

No.	Compostos	t _R (min)	^a LRI _E	F3		F3		cc		cc		F4		F4	
				claro	escuro	claro	escuro	claro	escuro	claro	escuro	claro	escuro		
				10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20
1	3-metilbutan-1-ol	5.52		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	butanoato de etila	7.61	804	+		+									
3	heptan-4-ona	9.98	874					+	+		+		+	+	
4	heptan-2-ona	10.61	893	+	+	+	+								
5	3-metil-but-2-enoato de etila	11.75	927		+		+								
6	2,5-dimetil-heptano	13.89	991	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	2-pentil-furano	14.00	994					+			+				+
8	5-metil-5-propil-nonano	15.35	1035		+		+	+	+		+		+	+	+
9	2-etil-hexanoato de metila	15.69	1046	+	+	+	+	+	+	+	+				
10	3,5-dimetil-octano	16.28	1064		+			+	+	+	+		+		
11	3-etil-2,5-dimetil-pirazina	16.87	1083	+				+	+	+	+	+	+	+	+
12	acetato de hex-4-enila	16.96	1085	+	+	+	+		+	+	+				
13	nonan-2-ona	17.25	1095	+	+	+	+	+	+	+	+				
14	nonan-2-ol	17.50	1103	+	+	+	+	+	+	+	+				
15	2-etil-hexanoato de etila	17.79	1112	+	+	+	+	+	+	+	+				
16	2-fenil-etanol	17.95	1117	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	2-fenil-acetonitrila	18.73	1143									+	+	+	+
18	tridec-1-eno	22.58	1276	+	+	+	+	+	+	+	+				
19	2-hexil-decan-1-ol ou hexadecanol	22.98	1289	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	undecan-2-ona	23.189	1297									+	+	+	+
21	undecan-2-ol	23.347	1303									+	+	+	+
22	1,3,5-tricloro-2-metoxi-benzeno	24.255	1337	+	+	+	+	+	+	+	+				
23	hexadecanoato de etila	39.118	1897	+	+	+	+	+	+	+	+				

^aLRI_E: Índice de retenção calculado. F3: *Phyllosticta* sp.; F4: *Preussia* sp.; cc: co-culture; t_R: tempo de retenção.

Fonte: autora.

Após a análise qualitativa dos COVs, métodos estatísticos foram aplicados para avaliar a semelhanças ou diferenças no perfil metabólico de voláteis das culturas axênicas ou co-cultivo de *Phyllosticta* sp e *Preussia* sp. Posteriormente a aquisição dos dados, que foram pré-processados utilizando o software MZmine, e organizados em uma matriz de dados. O gráfico de Análise de Componentes Principais (PCA) (Figura 38) proporciona uma visão geral dos perfis químicos, agrupando as amostras com base em seus perfis de COVs. Através da representação no gráfico de PCA, observou-se que não houve uma separação clara entre os COVs emitidos por F3 (*Phyllosticta* sp.) na cultura axênica e durante o co-cultivo, o que indica a presença de semelhanças entre os COVs produzidos por esses dois grupos.

Figura 38-Gráfico da Análise de Componentes Principais (PCA)

Legenda: (F3: *Phyllosticta* sp.; F4: *Preussia* sp.) and cc: co-cultura.

Fonte: autora.

A análise de dados discriminantes por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foi realizada utilizando a plataforma *MetaboAnalyst* para avaliar as diferenças ou semelhanças entre as amostras, permitindo obter informações complementares sobre a variação química por duas origens taxonômicas diferentes (BELINATO *et al.*, 2019).

O método PLS-DA é um método classificatório que tem sido aplicado para discriminação e identificação de compostos na categorização de micro-organismos (BELINATO *et al.*, 2019). Esse método fornece várias estatísticas como por exemplo, VIP score (*Variable Importance in the Projection*), utilizado para identificar as variáveis mais importantes dentro dos diferentes grupos amostrais (CHONG; WISHART; XIA, 2019). Alguns parâmetros são utilizados para avaliar o modelo PLS-DA como o parâmetro R^2 , usado para

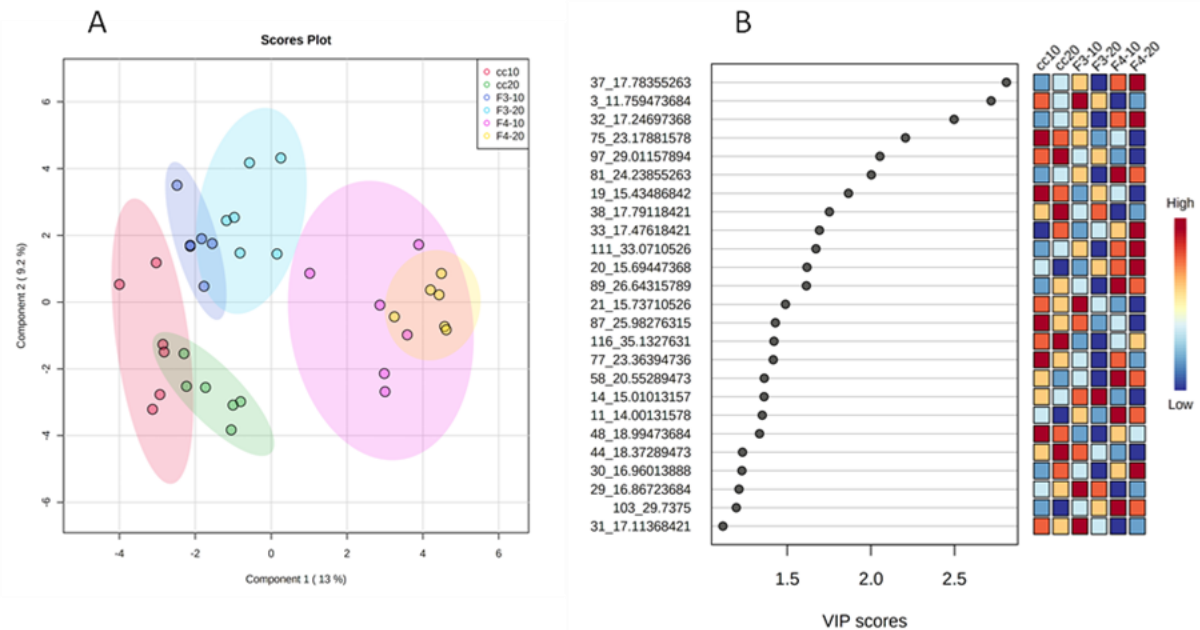
verificar a adequação do modelo ao conjunto de dados da amostra e o parâmetro Q^2 , usado para avaliar a capacidade de previsão do modelo (PILON *et al.*, 2020).

O modelo PLS-DA gerado a partir do conjunto de dados dos COVs, foi validado, apresentando valor Q^2 ($Q^2 = 0,73$) e valor R^2 ($R^2 = 0,94$), com ($p < 0,05$). Conforme ilustra a Figura 38 (A), o gráfico de escores PC1 *versus* PC2 descrevendo 13% e 9,2% de variação no perfil químico. Nesse gráfico de pontuação, foi possível observar agrupamentos distintos das amostras, indicando diferenças significativas no perfil de COVs produzidos pelos grupos de co-cultivo (cc), *Phyllosticta* sp. (F3) e *Preussia* sp. (F4). Esses resultados evidenciam que os três grupos de cultivo possuem características metabólicas distintas em relação à liberação de compostos voláteis. A análise PLS-DA revela-se uma ferramenta valiosa para a discriminação dos padrões de COVs entre as diferentes culturas, contribuindo para uma melhor compreensão das interações e respostas metabólicas desses fungos quando cultivados em conjunto ou de forma isolada.

O gráfico ilustrado na Figura 39 (A), mostra a diferença no perfil de COVs emitidos por culturas axênicas e co-cultivo de fungos, com base na variável tempo de cultura (10 ou 20 dias). Os metabólitos voláteis mais significativos selecionados através do modelo PLS-DA com ($VIP > 1$) estão ilustrados Figura 39 (B). De acordo com esse gráfico, os COVs de (37) 2-etil-hexanoato de etila, (3) 3-metil-but-2-enoato de etila, (32) nonan-2-ona, (75) undecan-2-ona são os metabólitos que contribuíram de forma significativa para a formação de grupos, apresentando valores de escores $VIP \geq 2$.

Na Figura 39 são apresentados os COVs 2-etil-hexanoato de etila (**Feature 37**), 3-metil-but-2-enoato de etila (**Feature 3**), nona-2-ona (**Feature 32**) e undecan-2-ona (**Feature 75**), que foram significativamente diferentes entre os grupos. Esses metabólitos característicos indicaram a diferença entre as culturas axênicas e o co-cultivo. Na Figura 40 são mostrados esses COVs através de gráficos *boxplots*. A nonan-2-ona, foi produzida pelo fungo *Phyllosticta* sp na cultura axênica e durante o co-cultivo, enquanto a undecan-2-ona, foi produzida apenas pelo fungo *Preussia* sp. em cultura axênica. Estudos apontam que essas cetonas produzidas por cepas de *Serratia* estão envolvidas na inibição do crescimento fúngico (SCHULZ; DICKSCHAT, 2007).

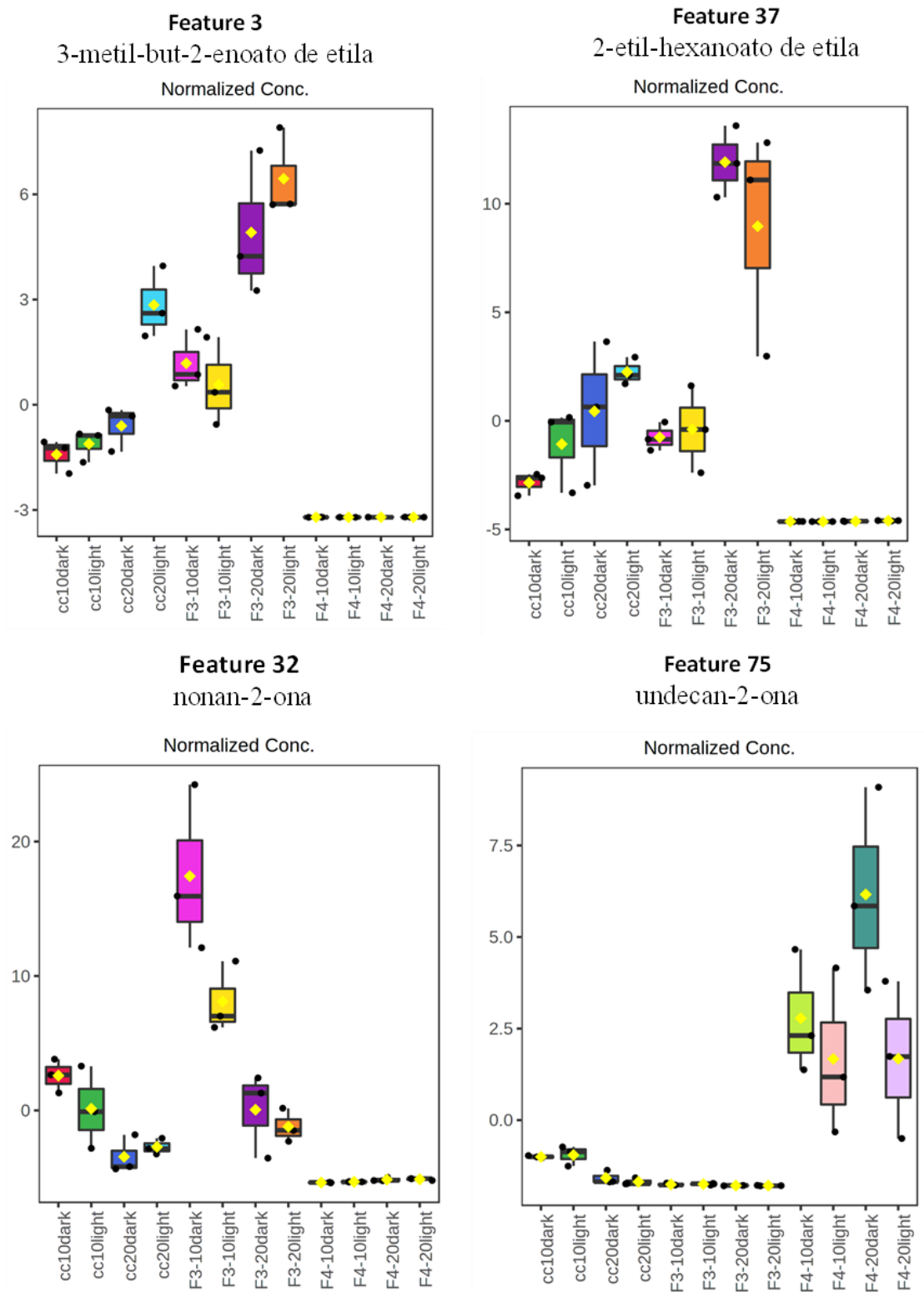
Figura 39-Análise multivariada dos dados de GC-MS. (A) Gráfico de pontuação da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e (B) Gráfico de VIP scores



Legenda: F3: *Phyllosticta* sp.; F4: *Preussia* sp. e cc: co-cultivo. Os principais COVs conforme a análise de pontuação VIP: (37) 2-etil-hexanoato de etila; (3) 3-metil-but-2-enoato de etila; (32) nonan-2-ona; (75) undecan-2-ona. Fonte: própria autora.

O perfil químico dos COVs depende de como esses compostos são coletados, tipo de substrato, umidade, temperatura, tempo de crescimento do fungo e interação com outros organismos (INAMDAR; MORATH; BENNETT, 2020). Assim, este trabalho fornece uma das primeiras investigações sobre como os fatores tempo e luminosidade influenciaram na emissão de COVs em culturas axênicas e durante o co-cultivo de fungos endofíticos (*Phyllosticta* sp. e *Preussia* sp.). A análise multivariada permitiu verificar a variação na produção de COVs influenciada pelo tempo de cultivo. Além disso, analisando o perfil de COVs das amostras, observamos semelhanças entre o perfil da co-cultivo e o perfil do endófito *Phyllosticta* sp.

Figura 40–Gráfico do tipo boxplot (diagrama de caixa) referente aos COVs discriminantes analisados, utilizando o conjunto de dados de GC-MS



Legenda: cc10dark (co-cultivo, 10 dias, escuro); cc10claro (co-cultivo, 10 dias, claro), cc20 dark (co-cultivo, 20 dias, escuro); cc20light (co-cultivo, 20 dias, claro); F3-10dark (*Phyllosticta* sp, 10 dias, escuro); F3-10light (*Phyllosticta* sp, 10 dias, claro); F3-20dark (*Phyllosticta* sp, 20 dias, escuro); F3-20light (*Phyllosticta* sp, 20 dias, claro); F4-10dark (*Preussia* sp, 10 dias, escuro); F4-10light (*Preussia* sp, 10 dias, claro); F4-20dark (*Preussia* sp, 20 dias, escuro); F4-20light (*Preussia* sp, 20 dias, claro). Fonte: autora

Os voláteis fúngicos são produtos do metabolismo primário e secundário. A Tabela 11 apresenta os metabólitos voláteis anotados nas culturas axênicas e co-cultivo. Esses metabólitos apresentam várias funções orgânicas como álcoois, benzenóides, aldeídos, alcenos, ácidos, ésteres, cetonas, dentre outras (POVEDA, 2021). O COV 3-metilbutan-1-ol é o produto final da degradação da leucina. Esse metabólito é produzido por alguns fungos filamentosos como por exemplo, *Fusarium oxysporum* apresentando atividade antifúngica contra *V. dahliae* e *V. longisporum*. O álcool 2-fenil-etanol é produto do catabolismo da fenilalanina; exibe atividade fungicida contra *Pythium* sp. e *Phytophthora* sp. (EBERT; HALBFELD; BLANK, 2016; POVEDA, 2021). Um estudo realizado por Camarena-Pozos e colaboradores (2021) relata que **(1)** 3-metilbutan-1-ol e **(16)** álcool 2-fenil-etanol estimulam o crescimento das plantas. Esses álcoois são produzidos por bactérias e fungos (POVEDA, 2021), foram emitidos por todos culturas axênicas (*Phyllosticta* sp. e *Preussia* sp.) e durante o co-cultivo dos fungos. O COV 2-fenil-etanol já foi detectado em culturas de *Hypoxylon anthochroum*, isolado como endófito da árvore *Bursera lancifolia*. Esse composto volátil apresentou atividade como inibidor da germinação de sementes em ervas daninhas e atividade antifúngica moderada contra fungos fitopatogênicos, sugerindo que o endófito pode colaborar para adaptação da planta em seu *habitat* (DICKSCHAT, 2017).

Alguns COVs como **(2)** butanoato de etila, **(5)** 3-metil-but-2-enoato de etila, **(9)** 2-etil-hexanoato de metila, **(15)** 2-etil-hexanoato de etila e **(23)** hexadecanoato de etila foram produzidos exclusivamente por *Phyllosticta* sp. O papel fisiológico dos ésteres ainda não foi elucidado. Uma das hipóteses é que a formação de ésteres serve para reciclar acetil CoA, enquanto a outra hipótese seria que a produção de ésteres voláteis tem a vantagem de evitar o acúmulo de ácidos tóxicos para o crescimento do micro-organismo (EBERT; HALBFELD; BLANK, 2016). O COV 3-metil-but-2-enoato de etila já foi identificado na cepa de *Penicillium chrysogenum* (MATYSIK; HERBARTH; MUELLER, 2008), enquanto 2-etil-hexanoato de metila foi identificado nas culturas dos fungos *Alternaria alternata* e *Lasiodiplodia theobromae* (TERRA *et al.*, 2020). O COV 2-etil-hexanoato de metila foi anotado como o composto majoritário do co-cultivo, produzido pelo fungo *Phyllosticta* sp. Este COV já foi relatado na literatura como um metabólito produzido por fungos associados a agaves e cactos (CAMARENA-POZOS *et al.*, 2021). Finalmente, hexadecanoato de etila ou palmitato de etila, éster de cadeia longa, relatado na literatura em cepas de *Aspergillus ochraceus* (DICKSCHAT, 2017).

Os COVs (17) 2-fenil-acetonitrila, (20) undecan-2-ona e (21) undecan-2-ol foram anotados nas culturas de *Preussia* sp. O volátil 2-fenil-acetonitrila foi reportado por Kickuchi e colaboradores (1983) em cultura de *Botrytis cinerea*. Undecan-2-ona foi observada em estágios iniciais de crescimento em cultura dos fungos *A. fumigatus*, *F. solani* e *P. paneum* (TAKEUCHI *et al.*, 2012), apresentando atividade atinfúngica contra *Phoma herbarum* (POVEDA, 2021). O COV undecan-2-ol foi relatado em cepas de *Stigmatella aurantiaca* (DICKSCHAT *et al.*, 2005).

A pesquisa sobre COVs produzidos por micro-organismos tem crescido nos últimos anos, mas apenas começou-se a entender os papéis fisiológicos, que voláteis desempenham nas culturas microbianas (DICKSCHAT, 2017). Assim, este trabalho contribui para o conhecimento dos COVs produzidos por fungos endofíticos, visto que o conhecimento das interações que esses metabólitos causam no seu habitat ainda não está elucidado.

5. CONCLUSÕES

A exploração dos perfis metabólitos produzidos pelo endofíticos *Phyllosticta* sp. e *Preussia* sp. destacam a importância de estudos desenvolvidos na prospecção química de moléculas bioativas, visto vez que existem poucos trabalhos na literatura para os gêneros estudados.

A análise dos extratos derivatizados por GC-MS e a abordagem de redes moleculares (molecular networking) possibilitou a anotação de metabólitos secundários presentes nos extratos por comparação com dados da literatura e da biblioteca GNPS baseados na similaridade e no padrão de fragmentação dos espectros. A ferramenta GNPS é útil para analisar o perfil metabólico de extratos complexos. No estudo realizado por GC-MS para os extratos do fungo *Preussia* sp. foram anotadas duas dicetopiperazinas. O estudo das redes moleculares permitiu anotar *cluster* de citocalasinas que em conjunto com resultados obtidos dos ensaios antiparasitários sugerem esse micro-organismo como uma fonte prolífera de substâncias bioativas e apontam para a continuidade de estudos químicos para esse gênero de endófito.

O isolamento de metabólitos a partir de fungos endofíticos escolhidos com base na atividade biológica oferece um direcionamento sustentável para a busca de novas moléculas bioativas. Neste trabalho foram realizados ensaios de triagem para doenças negligenciadas, a leishmaniose e a doença de Chagas, justificando a contribuição científica e correlacionado com décimo terceiro objetivo do desenvolvimento sustentável (ODS) propostos pela ONU

. Os dois fungos estudados apresentaram substâncias com propriedades antiparasitárias, destacando as substâncias isoladas do fungo *Phyllosticta* sp. (ferricrocina e ferricrisina) que mostram potencial, com IC₅₀ entre 5,31 – 8,51, respectivamente.

O estudo dos COVs produzidos pelos endófitos estudados, a partir de um planejamento fatorial permitiu avaliar o co-cultivo desses fungos que na natureza coexistem nas folhas de *Platonia Insignis* Mart. e procurou entender o papel ecológico de moléculas voláteis. Deste modo, este trabalho contribui para o conhecimento dos COVs produzidos por fungos endofíticos, visto que o conhecimento das interações que esses metabólitos causam no seu habitat ainda não está elucidado e existem poucos relatos na literatura para os gêneros estudados. O perfil de COVs foi bastante diverso e associado as redes moleculares a biblioteca NIST, permitiu anotar as principais moléculas produzidas, com destaque a produção de ésteres, que ainda não tem o papel ecológico esclarecido.

Os resultados obtidos neste trabalho, reforçam a necessidade de estudos para o aprofundamento de pesquisas realizadas com micro-organismos, pois foram isolados de uma

planta da biodiversidade brasileira, que apresenta o rico potencial químico e biológico. Adicionalmente, esta pesquisa fornece subsídios para uma melhor compreensão das interações dos endófitos com a espécie hospedeira e contribui para o desenvolvimento da pesquisa na área de produtos naturais e fungos endófitos.

REFERÊNCIAS

- TAKAHASHI, A. J.; DA S. LIMA, G.; F. DOS SANTOS, G.; H. LYRA, F.; F. DA SILVA-HUGHES, A.; A. G. GONÇALVES, F. Filamentous Fungi and Chemistry: Old Friends, New Allies. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 6, p. 2351–2382, 2017.
- AKSENOV, A. A. *et al.* Auto-deconvolution and molecular networking of gas chromatography–mass spectrometry data. **Nature Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 169–173, 2021.
- AKSENOV, A.; LAPONOGOV, I.; ZHANG, Z.; DORAN, S.; BELLUOMO, I.; VESELKOV, D.; BITTREMIEUX, W.; NOTHIAS, L. F.; NOTHIAS-ESPOSITO, M.; MALONEY, K. N. Algorithmic Learning for Auto-deconvolution of GC-MS Data to Enable Molecular Networking within GNPS. **bioRxiv**, 2020.
- AL-HOSNI, K.; SHAHZAD, R.; LATIF KHAN, A.; IMRAN, Q. M.; AL HARRASI, A.; AL RAWAHI, A.; ASAF, S.; KANG, S.-M.; YUN, B.-W.; LEE, I.-J. *Preussia* sp. BSL-10 producing nitric oxide, gibberellins, and indole acetic acid and improving rice plant growth. 2018. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tjpi20>>. Acesso em: 8 out. 2018.
- ANISHA, C.; RADHAKRISHNAN, E. K. Metabolite analysis of endophytic fungi from cultivars of *Zingiber officinale* Rosc. identifies myriad of bioactive compounds including tyrosol. **3 Biotech**, v. 7, n. 2, 1 jun. 2017.
- AQUINO MORAES, G. K.; FERNANDES FERRAZ, L.; MARA CHAPLA, V. Volatile Organic Compounds of Endophytic Fungi and Biotechnological Applications. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 6, 2020.
- AZZOLLINI, A.; BOGGIA, L.; BOCCARD, J.; SGORBINI, B.; LECOULTRE, N.; ALLARD, P. M.; RUBIOLO, P.; RUDAZ, S.; GINDRO, K.; BICCHI, C.; WOLFENDER, J. L. Dynamics of metabolite induction in fungal co-cultures by metabolomics at both volatile and non-volatile levels. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. FEB, p. 1–12, 2018.
- BELINATO, J. R.; BAZIOLI, J. M.; SUSSULINI, A.; AUGUSTO, F.; FILLA, T. P. Microbial metabolomics: Innovations and applications. **Química Nova**. Sociedade Brasileira de Química, 2019. Acesso em: 30 abr. 2020.
- BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. de P.; MACHADO, B. da C. Sideróforos: uma resposta dos microorganismos. **Química Nova**, v. 25, n. 6b, p. 1155–1164, 2002.
- BERLINCK, R. G. S.; DE BORGES, W. S.; SCOTTI, M. T.; VIEIRA, P. C. A Química de Produtos Naturais do Brasil do Século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706–710, 1 jul. 2017. Acesso em: 24 fev. 2020.
- BERTRAND, S.; AZZOLLINI, A.; SCHUMPP, O.; BOHNI, N.; SCHRENZEL, J.; MONOD, M.; GINDRO, K.; WOLFENDER, J. L. Multi-well fungal co-culture for de novo

metabolite-induction in time-series studies based on untargeted metabolomics. **Molecular BioSystems**, v. 10, n. 9, p. 2289–2298, 2014.

BIASETTO, C. R. Fungos endofíticos em *Eugenia brasiliensis*: prospecção química, biológica, enzimática e avaliação do co-cultivo e epigenética em *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp. **Tese (doutorado)** – Universidade Estadual Paulista, Araraquara: [s.n.], 2016, 225 f.

BILLS, G. F.; GLOER, J. B. Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 6, 2016. Disponível em: <<http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.FUNK-0009-2016>>.

CALLA-QUISPE, E.; FUENTES-RIVERA, H. L.; RAMÍREZ, P.; MARTEL, C.; IBAÑEZ, A. J. Mass spectrometry: A rosetta stone to learn how fungi interact and talk. **Life**, v. 10, n. 6, p. 1–22, 2020.

CAMARENA-POZOS, D. A.; FLORES-NÚÑEZ, V. M.; LÓPEZ, M. G.; PARTIDA-MARTÍNEZ, L. P. Fungal volatiles emitted by members of the microbiome of desert plants are diverse and capable of promoting plant growth. **Environmental Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 2215–2229, 2021.

CAUDAL, F.; TAPISSIER-BONTEMPS, N.; EDRADA-EBEL, R. A. Impact of Co-Culture on the Metabolism of Marine. **Microorganisms Marine Drugs**. MDPI, 1 fev. 2022.

CHAGAS, F. O.; PESSOTTI, R. de C.; CARABALLO-RODRÍGUEZ, A. M.; PUPO, M. T. Chemical signaling involved in plant–microbe interactions. **Chemical Society Reviews**, 2018. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C7CS00343A>>.

CHONG, J.; WISHART, D. S.; XIA, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 68, n. 1, p. 1–128, 2019.

COSTA, I. C. G. Fungos endofíticos associados à *Platonia insignis* Mart.: estudo dos metabólitos voláteis e não voláteis de *Diaporthe hongkongensis* e *Phyllosticta elongate*. **Tese (doutorado)** – Universidade Estadual Paulista, Araraquara: [s.n.], 2019, 251 f.

DE JESUS BENEVIDES, C. M.; DE ALMEIDA BEZERRA, M.; PEREIRA, P. A. P.; DE ANDRADE, J. B. HS-SPME/GC-MS Analysis of VOC and Multivariate Techniques Applied to the Discrimination of Brazilian Varieties of Mango. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 05, n. 03, p. 157–164, 2014.

SOEIRO, M.N.C.; VERGOTEN, G.; BAILLY, C. Pharmacological Profile of Garcinielliptone FC from *Platonia insignis*. [s.d.] Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s43450-022-00248-8>>.

DE SOUZA, M. L.; DE OLIVEIRA REZENDE JUNIOR, C.; FERREIRA, R. S.; ESPINOZA CHÁVEZ, R. M.; FERREIRA, L. L. G.; SLAFER, B. W.; MAGALHÃES, L. G.; KROGH, R.; OLIVA, G.; CRUZ, F. C.; DIAS, L. C.; ANDRICOPULO, A. D. Discovery of Potent, Reversible, and Competitive Cruzain Inhibitors with Trypanocidal Activity: A Structure-

Based Drug Design Approach. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 2, p. 1028–1041, 2020.

DICKSCHAT, J. S. **Fungal volatiles-a survey from edible mushrooms to moulds** **Natural Product Reports** Royal Society of Chemistry, 1 mar. 2017.

DU PREEZ, I.; LUIES, L.; LOOTS, D. T. The application of metabolomics toward pulmonary tuberculosis research. **Tuberculosis**, v. 115, n. February, p. 126–139, 2019.

EBERT, E. B.; HALBFELD, C.; M. BLANK, L. Exploration and Exploitation of the Yeast Volatilome. **Current Metabolomics**, v. 5, n. 2, 31 ago. 2016.

ESSÉN, S. A.; BYLUND, D.; HOLMSTRÖM, S. J. M.; MOBERG, M.; LUNDSTRÖM, U. S. Quantification of hydroxamate siderophores in soil solutions of podzolic soil profiles in Sweden. **BioMetals**, v. 19, n. 3, p. 269–282, jun. 2006.

EVIDENTE, A.; CIMMINO, A.; ANDOLFI, A.; VURRO, M.; ZONNO, M. C.; MOTTA, A. Phyllostoxin and phyllostin, bioactive metabolites produced by *phyllosticta cirsii*, a potential mycoherbicide for *cirsium arvense* biocontrol. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3., 2008, [...]. 2008. v. 56, p. 884–888.

FERREIRA, L. L. G.; DE MORAES, J.; ANDRICOPULO, A. D. Approaches to advance drug discovery for neglected tropical diseases. **Drug Discovery Today**, v. 27, n. 8, p. 2278–2287, 1 ago. 2022.

FERREIRA-SILVA, A.; MENDES HUGHES, F.; ROSA, C. A.; LUIZ, & ROSA, H. Higher turnover of endophytic fungal assemblages in the tissues of globose cactus *Melocactus ernestii* from Brazilian semi-arid biome. [s.d.] Disponível em: <www.mycobank.org>.

FRAIGE, K.; DAMETTO, A. C.; ZERAIK, M. L.; DE FREITAS, L.; SARAIVA, A. C.; MEDEIROS, A. I.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; LOPES, N. P.; BOLZANI, V. S. Dereplication by HPLC-DAD-ESI-MS/MS and Screening for Biological Activities of *Byrsonima* Species (Malpighiaceae). **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 2, p. 196–204, 2018.

FRANCISCO, V.; ALMEIDA, L.; BOGUSZ JUNIOR, S.; OIANO NETO, J.; NASSU, R. OPTIMIZATION OF EXTRACTION CONDITIONS OF VOLATILE COMPOUNDS OF ROASTED BEEF BY SOLID-PHASE MICROEXTRACTION. **Química Nova**, v. 43, n. 4, p. 435–441, 2020. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=8061&nomeArquivo=AR20190430.pdf>.

GONZALEZ-MENENDEZ, V.; MARTIN, J.; SILES, J. A.; GONZALEZ-TEJERO, M. R.; REYES, F.; PLATAS, G.; TORMO, J. R.; GENILLOU, O. Biodiversity and chemotaxonomy of *Preussia* isolates from the Iberian Peninsula. **Mycological Progress**, v. 16, n. 7, p. 713–728, 18 jul. 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11557-017-1305-1>>. Acesso em: 5 nov. 2018.

GUKASYAN, N.; DAVIS, A. K.; BARRETT, F. S.; COSIMANO, M. P.; SEPEDA, N. D.; JOHNSON, M. W.; GRIFFITHS, R. R. Efficacy and safety of psilocybin-assisted treatment

for major depressive disorder: Prospective 12-month follow-up. **Journal of Psychopharmacology**, v. 36, n. 2, p. 151–158, 1 fev. 2022.

HARVEY, D. J.; VOUIROS, P. Mass spectrometric fragmentation of trimethylsilyl and related alkylsilyl derivatives. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 39, n. 1–2, p. 105–211, 1 mar. 2020.

HIDER, R. C.; KONG, X. Chemistry and biology of siderophores. **Natural Product Reports**. 2010, 27, 637-657.

HUANG, X.; ZHOU, D.; LIANG, Y.; LIU, X.; CAO, F.; QIN, Y.; MO, T.; XU, Z.; LI, J.; YANG, R. Cytochalasins from endophytic Diaporthe sp. GDG-118. **Natural Product Research**, v. 0, n. 0, p. 1–8, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1700504>>.

HUNG, R.; LEE, S.; BENNETT, J. W. Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 8, p. 3395–3405, 2015.

INAMDAR, A. A.; MORATH, S.; BENNETT, J. W. **Annual Review of Microbiology**. Fungal Volatile Organic Compounds: More Than Just a Funky Smell? 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-012420->>.

JENNER, M.; HAI, Y.; NGUYEN, H. H.; PASSMORE, M.; SKYRUD, W.; KIM, J.; GARG, N. K.; ZHANG, W.; OGORZALEK LOO, R. R.; TANG, Y. Elucidating the molecular programming of a nonlinear non-ribosomal peptide synthetase responsible for fungal siderophore biosynthesis. **Nature communications**, v. 14, n. 1, p. 2832, 1 dez. 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.17632/c3ymyp3yx4.1>>. Acesso em: 22 jun. 2023.

KALANSURIYA, P.; QUEZADA, M.; ESPÓSITO, B. P.; CAPON, R. J. Talarazines A-E: Noncytotoxic Iron (III) Chelators from an Australian Mud Dauber Wasp-Associated Fungus, *Talaromyces* sp. (CMB-W045). **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 3, p. 609–615, 2017.

KELLER, N. P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery Nature. **Reviews Microbiology**. Nature Publishing Group, 1 mar. 2019.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism - From biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiolog**, 2005.

KHAN, A. L.; AL-HARRASI, A.; AL-RAWAHI, A.; AL-FARSI, Z.; AL-MAMARI, A.; WAQAS, M.; ASAF, S.; ELYASSI, A.; MABOOD, F.; SHIN, J. H.; LEE, I. J. Endophytic fungi from frankincense tree improves host growth and produces extracellular enzymes and indole acetic acid. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, 1 jun. 2016. Acesso em: 17 out. 2019.

KLUGER, B.; ZEILINGER, S.; WIESENBERGER, G.; SCHÖFBECK, D. Laboratory Protocols in Fungal Biology. **Laboratory Protocols in Fungal Biology**, p. 455–465, 2013.

KORPI, A.; JÄRNBERG, J.; PASANEN, A. L. Microbial volatile organic compounds. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 39, n. 2, p. 139–193, 2009.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 7, p. 792–798, 27 jul. 2012. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074552112001998>>. Acesso em: 12 jun. 2018.

LEE, S.; HUNG, R.; YAP, M.; BENNETT, J. W. Age matters: the effects of volatile organic compounds emitted by *Trichoderma atroviride* on plant growth. **Archives of Microbiology**, v. 197, n. 5, p. 723–727, 2015.

LEMFACK, M. C.; GOHLKE, B. O.; TOGUEM, S. M. T.; PREISSNER, S.; PIECHULLA, B.; PREISSNER, R. MVOC 2.0: A database of microbial volatiles. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D1261–D1265, 2018.

LI, S.-J.; ZHANG, X.; WANG, X.-H.; ZHAO, C.-Q. Novel natural compounds from endophytic fungi with anticancer activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 156, p. 316–343, 5 ago. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523418305713?via%3Dihub#fig3>>. Acesso em: 9 out. 2018.

MA, K. L.; WEI, W. J.; LI, H. Y.; SONG, Q. Y.; DONG, S. H.; GAO, K. Meroterpenoids with diverse ring systems and dioxolanone-type secondary metabolites from *Phyllosticta capitalensis* and their phytotoxic activity. **Tetrahedron**, v. 75, n. 33, p. 4611–4619, 16 ago. 2019. Acesso em: 26 abr. 2020.

MAPPERSON, R. R.; KOTIW, M.; DAVIS, R. A.; DEARNALEY, J. D. W. The Diversity and Antimicrobial Activity of *Preussia* sp. **Endophytes Isolated from Australian Dry Rainforests**. [s.d.] Disponível em: <<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs00284-013-0415-5.pdf>>. Acesso em: 8 out. 2018.

MARTINEZ, A.; BENNETT, J. W. Fungal volatile organic compounds. **Encyclopedia of Mycology**, v. 1, p. 239–245, 2021.

MARTINEZ-KLIMOVA, E.; RODRÍGUEZ-PEÑA, K. Endophytes as sources of antibiotics. **Biochemical Pharmacology**, v. 134, p. 1–17, 15 jun. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295216303793>>. Acesso em: 1 maio. 2018.

MATYSIK, S.; HERBARTH, O.; MUELLER, A. Determination of volatile metabolites originating from mould growth on wall paper and synthetic media. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, n. 2, p. 182–187, out. 2008.

MENEGATTI, C.; LOURENZON, V. B.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, D.; DA PAIXÃO MELO, W. G.; FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, A. D.; DO NASCIMENTO, F. S.; PUPO, M. T. Meliponamycins: Antimicrobials from Stingless Bee-Associated *Streptomyces* sp. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 610–616, 2020.

MOLDOVEANU, C. S.; DAVID, V. Derivatization Methods in GC and GC/MS. *In: Gas Chromatography - Derivatization, Sample Preparation, Application* [s.l.] IntechOpen, 2018.

MORATH, S. U.; HUNG, R.; BENNETT, J. W. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal Biology Reviews**, v. 26, n. 2–3, p. 73–83, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2012.07.001>>.

NAMAN, C. B.; RATTAN, R.; NIKOULINA, S. E.; LEE, J.; MILLER, B. W.; MOSS, N. A.; ARMSTRONG, L.; BOUDREAU, P. D.; DEBONSI, H. M.; VALERIOTE, F. A.; DORRESTEIN, P. C.; GERWICK, W. H. Integrating Molecular Networking and Biological Assays To Target the Isolation of a Cytotoxic Cyclic Octapeptide, Samoamide A, from an American Samoan Marine Cyanobacterium. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 3, p. 625–633, 24 mar. 2017.

NEWMAN, D. J. Natural products and drug discovery. **National Science Review**, v. 9, n. 11, 1 nov. 2022.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

NISA, H.; KAMILI, A. N.; NAWCHOO, I. A.; SHAFI, S.; SHAMEEM, N.; BANDH, S. A. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 82, p. 50–59, 1 maio 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401015000601?via%3Dihub>>. Acesso em: 7 maio. 2018.

NOUMEUR, S. R.; HELALY, S. E.; JANSEN, R.; GEREKE, M.; STRADAL, T. E. B.; HARZALLAH, D.; STADLER, M. Preussilides A–F, Bicyclic Polyketides from the Endophytic Fungus *Preussia similis* with Antiproliferative Activity. v. 80, p. 53, 2017. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>. Acesso em: 8 out. 2018.

PANG, Z.; CHONG, J.; ZHOU, G.; DE LIMA MORAIS, D. A.; CHANG, L.; BARRETTE, M.; GAUTHIER, C.; JACQUES, P. É.; LI, S.; XIA, J. MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W388–W396, 2021.

PIECHULLA, B.; LEMFACK, M. C. Microbial volatiles and their biotechnological applications. **Plant Specialized Metabolism**, p. 239–256, 2016.

PILON, A. C.; SELEGATO, D. M.; FERNANDES, R. P.; BUENO, P. C. P.; PINHO, D. R.; NETO, F. C.; FREIRE, R. T.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI B E, V. S.; LOPES, N. P. METABOLÔMICA DE PLANTAS: MÉTODOS E DESAFIOS. **Quim. Nova**, v. 43, n. 3, p. 329–354, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170499>>. Acesso em: 17 abr. 2020.

PLUHÁČEK, T.; LEMR, K.; GHOSH, D.; MILDE, D.; NOVÁK, J.; HAVLÍČEK, V. Characterization of microbial siderophores by mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 35, n. 1, p. 35–47, 1 jan. 2016.

PLUSKAL, T.; CASTILLO, S.; VILLAR-BRIONES, A.; OREŠIČ, M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, 2010.

POVEDA, J. **Beneficial effects of microbial volatile organic compounds (MVOCs) in plants** *Applied Soil Ecology*. Elsevier B.V., 1 dez. 2021.

PROSEN, H.; ZUPANČIČ-KRALJ, L. Solid-phase microextraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 4, p. 272–282, 1999.

RÉGIA PEREIRA DOS SANTOS, P.; BRUNO FONSECA DE CARVALHO, R.; SOARES DA COSTA JÚNIOR, J.; MENDES DE FREITAS, R.; MENDES FEITOSA, C. Levantamento das propriedades físico-químicas e farmacológicas de extratos e compostos isolados de *Platonia insignis* Mart. uma perspectiva para o desenvolvimento de fitomedicamentos Survey of physicochemical and pharmacological properties of extracts and c. **Rev. Bras. Farm**, v. 94, n. 2, p. 161–168, 2013. Disponível em: <<http://rbfarma.org.br/files/rbf-94-2-12-2013.pdf>>. Acesso em: 22 abr. 2018.

SCHULZ, S.; DICKSCHAT, J. S. Bacterial volatiles: The smell of small organisms. **Natural Product Reports** 2007.

SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N. S.; WANG, J. T.; RAMAGE, D.; AMIN, N.; SCHWIKOWSKI, B.; IDEKER, T. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, 1 nov. 2003. Disponível em: <<https://genome.cshlp.org/content/13/11/2498.full>>. Acesso em: 18 jun. 2023.

SOMENSI, A. Bioprospecção dos fungos endofíticos associados as variedades morfoanatômicas de *Casearia sylvestris* e estudo químico de *Preussia* sp. por abordagens OSMAC. **Tese (doutorado)** – Universidade Estadual Paulista, Araraquara : [s.n.], 2016 190 f.

SUMNER, L. W.; AMBERG, A.; BARRETT, D.; BEALE, M. H.; BEGER, R.; DAYKIN, C. A.; FAN, T. W. M.; FIEHN, O.; GOODACRE, R.; GRIFFIN, J. L.; HANKEMEIER, T.; HARDY, N.; HARNLY, J.; HIGASHI, R.; KOPKA, J.; LANE, A. N.; LINDON, J. C.; MARRIOTT, P.; NICHOLLS, A. W.; REILY, M. D.; THADEN, J. J.; VIANT, M. R. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). **Metabolomics**, v. 3, n. 3, p. 211–221, set. 2007.

TAKEUCHI, T.; KIMURA, T.; TANAKA, H.; KANEKO, S.; ICHII, S.; KIUCHI, M.; SUZUKI, T. Analysis of volatile metabolites emitted by soil-derived fungi using head space solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry: I. *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Fusarium solani* and *Penicillium paneum*. In: **Surface and Interface Analysis**, 6., 2012, [...]. 2012. v. 44, p. 694–698.

TORRES, N. M. P. D. O.; XAVIER, J. D. A.; GOULART, M. O. F.; ALVES, R. B.; DE FREITAS, R. P. The chemistry of advanced glycation end-products. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 2, p. 375–392, 2018.

VALLI, M.; SOUZA, J. M.; CHELUCCI, R. C.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R.; DA SILVA BOLZANI, V.; ANDRICOPULO, A. D. Identification of natural cytochalasins as leads for neglected tropical diseases drug discovery. **PLoS ONE**, v. 17, n. 10 October, 1 out. 2022.

WÅLINDER, R.; ERNSTGÅRD, L.; JOHANSON, G.; NORBÄCK, D.; VENGE, P.; WIESLANDER, G. Acute effects of a fungal volatile compound. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 12, p. 1775–1778, 2005.

WANG, M. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828–837, 2016b.

WANG, X.; LI, Y.; ZHANG, X.; LAI, D.; ZHOU, L. Structural diversity and biological activities of the cyclodipeptides from Fungi. **Molecules**, v. 22, n. 12, 2017.

WEISSKOPF, L.; SCHULZ, S.; GARBEVA, P. Microbial volatile organic compounds in intra-kingdom and inter-kingdom interactions. **Nature Reviews Microbiology**. Nature Research, 1 jun. 2021.

WIKKEE, S.; LOMBARD, L.; NAKASHIMA, C.; MOTOHASHI, K.; CHUKEATIROTE, E.; CHEEWANGKOON, R.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D.; CROUS, P. W. A phylogenetic re-evaluation of Phyllosticta (botryosphaerales). **Studies in Mycology**, v. 76, p. 1–29, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3114/sim0019>>.

WIKKEE, S.; UDAYANGA, D.; CROUS, P. W.; CHUKEATIROTE, E.; MCKENZIE, E. H. C.; BAHKALI, A. H.; DAI, D.; HYDE, K. D. Phyllosticta—an overview of current status of species recognition. **Fungal Diversity**, v. 51, n. 1, p. 43–61, 2011.

XU, S.; LI, M.; HU, Z.; SHAO, Y.; YING, J.; ZHANG, H. The Potential Use of Fungal Co-Culture Strategy for Discovery of New Secondary Metabolites. **Microorganisms**, v. 11, n. 2, p. 464, 12 fev. 2023. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/11/2/464>>.

XU, Z.; XIONG, B.; XU, J. Chemical Investigation of Secondary Metabolites Produced by Mangrove Endophytic Fungus Phyllosticta Capitalensis. **Natural Product Research**, v. 0, n. 0, p. 1–5, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1656624>>.

YAMAGUCHI, K. K. L.; VICTOR, C.; PEREIRA, L.; LIMA, E. S.; FLORÊNCIO, V.; JUNIOR, D. V. QUÍMICA E FARMACOLOGIA DO BACURI (*Platonia insignis*). **Scientia Amazonia**, n. 32, p. 39–46, 2014. Disponível em: <<http://scientia-amazonia.org/wp-content/uploads/2016/06/v3-n2-39-46-2014.pdf>>. Acesso em: 22 abr. 2018.

YANG, B. J.; CHEN, G. D.; LI, Y. J.; HU, D.; GUO, L. D.; XIONG, P.; GAO, H. A new xanthone glycoside from the endolichenic fungus *Sporormiella irregularis*. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 9–16, 2016.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 5, p. 753, 2006. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=b609472b>>.

ZHENG, R.; LI, S.; ZHANG, X.; ZHAO, C. Biological activities of some new secondary metabolites isolated from endophytic fungi: A review study International. **Journal of Molecular Sciences**. MDPI AG, 2 jan. 2021.

APÊNDICE

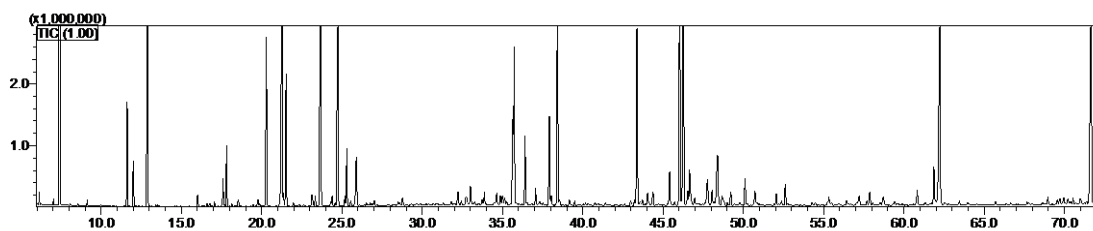
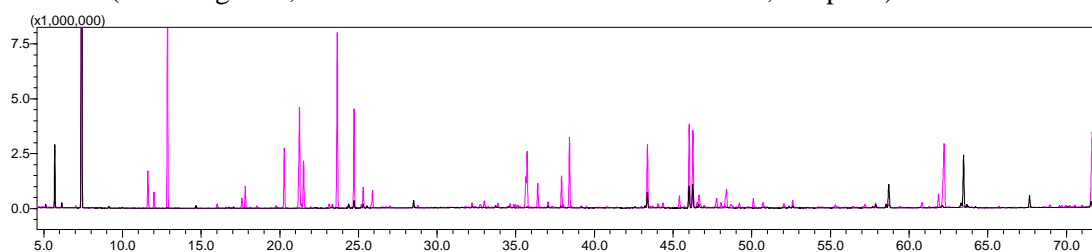
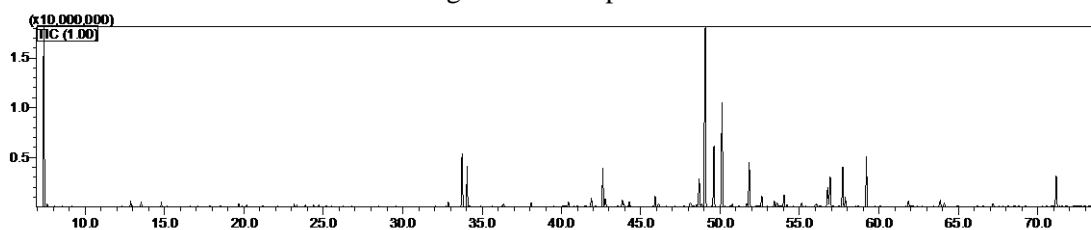
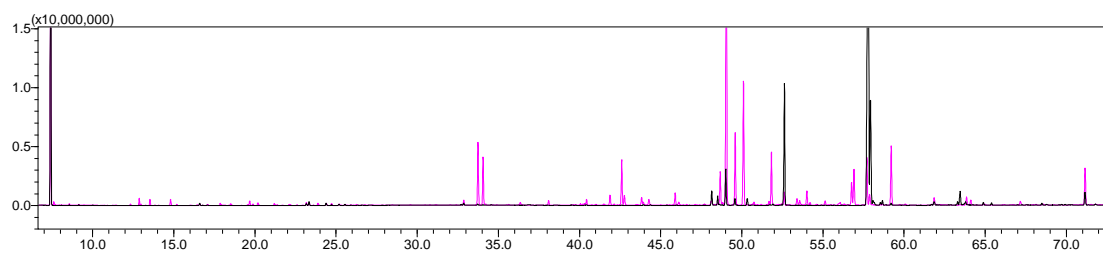
Figura A1 - Cromatogramas de Íons Totais (TIC) ext PDB do fungo *Preussia* sp.**Figura A2** - Cromatogramas de Íons Totais (TIC) ext PDB do fungo *Preussia* sp. (cromatograma, cor de rosa e branco do meio de cultivo, cor preta)**Figura A3** - Cromatogramas de Íons Totais (TIC) ext obtido a partir do cultivo em milho do fungo *Preussia* sp.**Figura A4** - Cromatogramas de Íons Totais (TIC) ext obtido a partir do cultivo em milho do fungo *Preussia* sp. (cromatograma, cor de rosa e branco do meio de cultivo, cor preta)

Figura A4a - Cromatogramas de Íons Totais (TIC) ext obtido a partir do cultivo em milho do fungo *Preussia* sp. (cor de rosa ext MEOH do fungo, azul: branco da reação; preto: branco do meio de cultivo, cor preta)

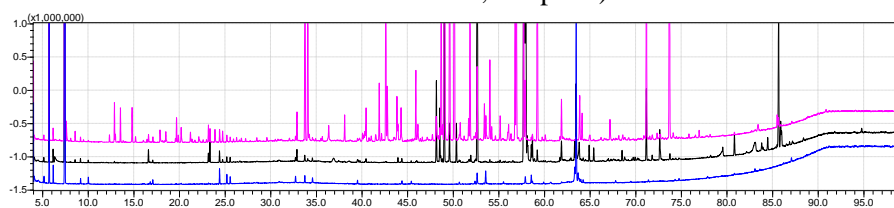
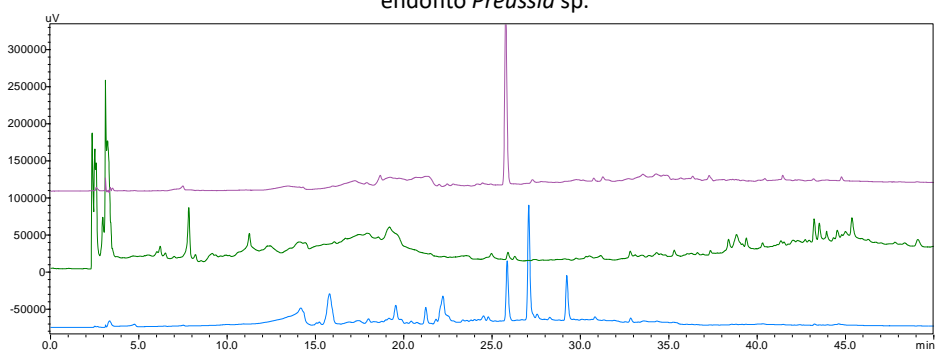


Figura A5 – Cromatograma referente aos extratos brutos de *Preussia* sp. gradiente de 5 a 100%.

Cromatogramas dos extratos brutos obtidos em Milho, PDB e Czapek ($\lambda = 254$ nm) do endófito *Preussia* sp.



CLAE-DAD_{anal.}, Coluna C-18 (Phenomenex-Luna; 250 x 4,60 mm; 5 μ m); Injeção de 30,0 μ L; Gradiente exploratório H₂O:CH₃OH (95:05 v/v) à (0:100 v/v), 50 min; Vazão de 1,0 mL/min.

Figura A6 Cromatograma referente a F1 da coluna realizada com ext PDB de *Preussia* sp.

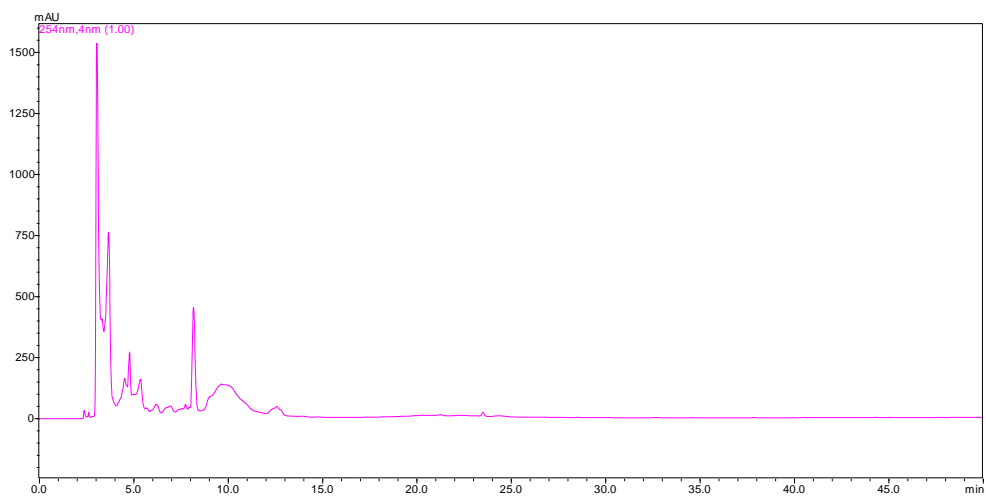


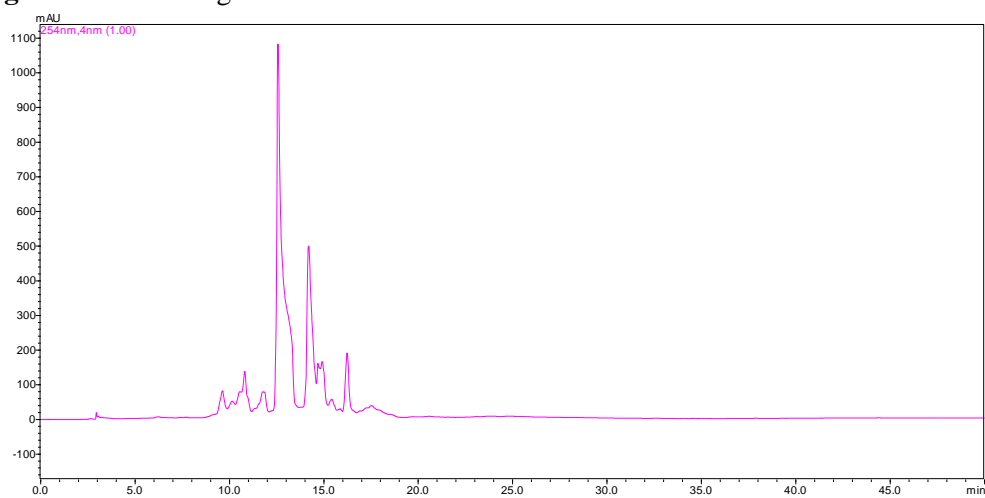
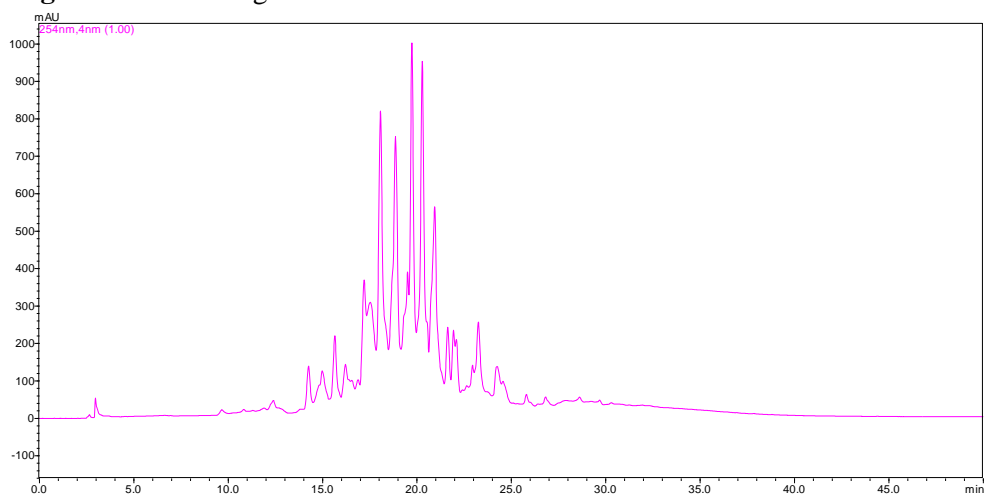
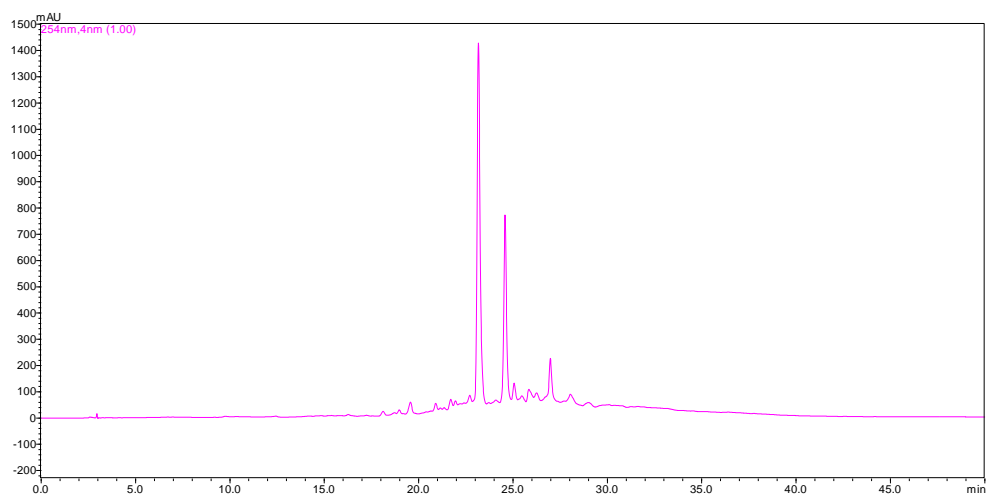
Figura A7 Cromatograma referente a F2 da coluna realizada com ext PDB de *Preussia* sp.**Figura A8** Cromatograma referente a F3 da coluna realizada com ext PDB de *Preussia* sp.**Figura A9** Cromatograma referente a F4 da coluna realizada com ext PDB de *Preussia* sp.

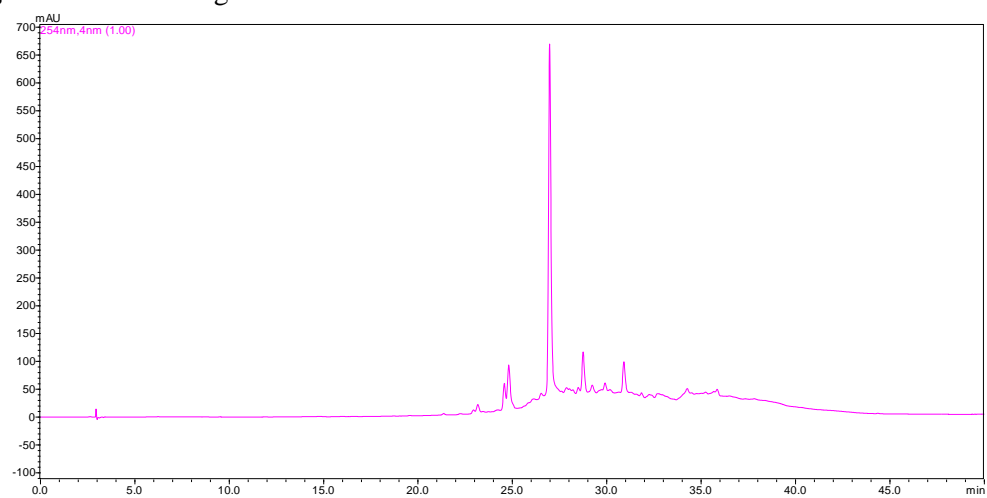
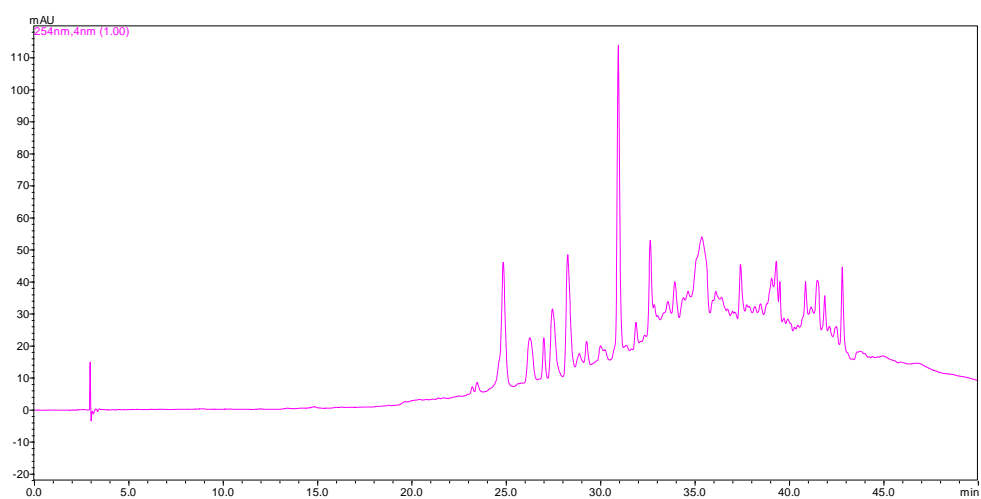
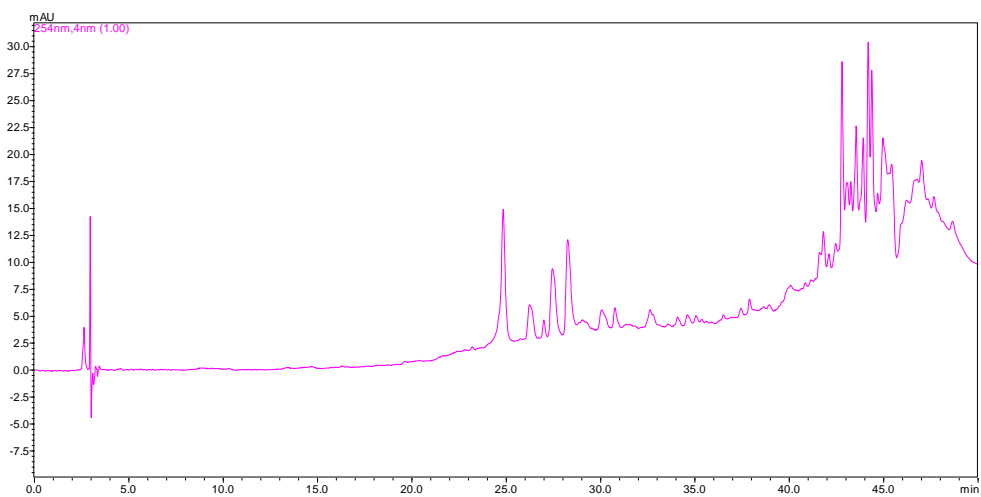
Figura A10 Cromatograma referente a F5 da coluna realizada com ext PDB de *Preussia* sp.**Figura A11** Cromatograma referente a F6 da coluna realizada com ext PDB de *Preussia* sp.**Figura A12** Cromatograma referente a F7 da coluna realizada com ext PDB de *Preussia* sp.

Figura A13 – Cromatogramas do pico base (BPI) do extrato czapek e do branco do endófito *Preussia* sp., obtidos por UPLC-ESI-Q-TOF-MS no modo positivo

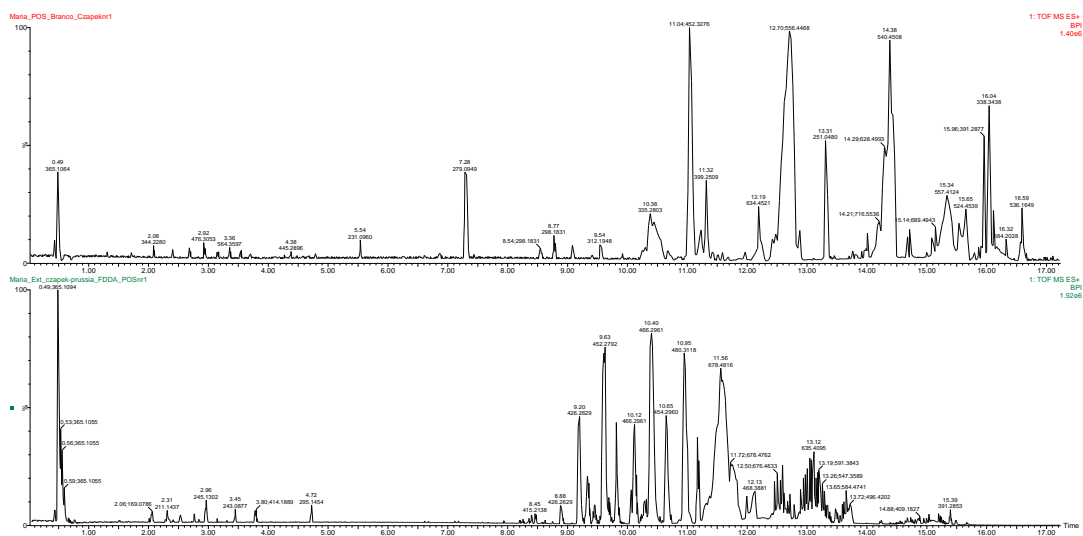


Figura A14- Espectros de massas MS da substância citocalasina J

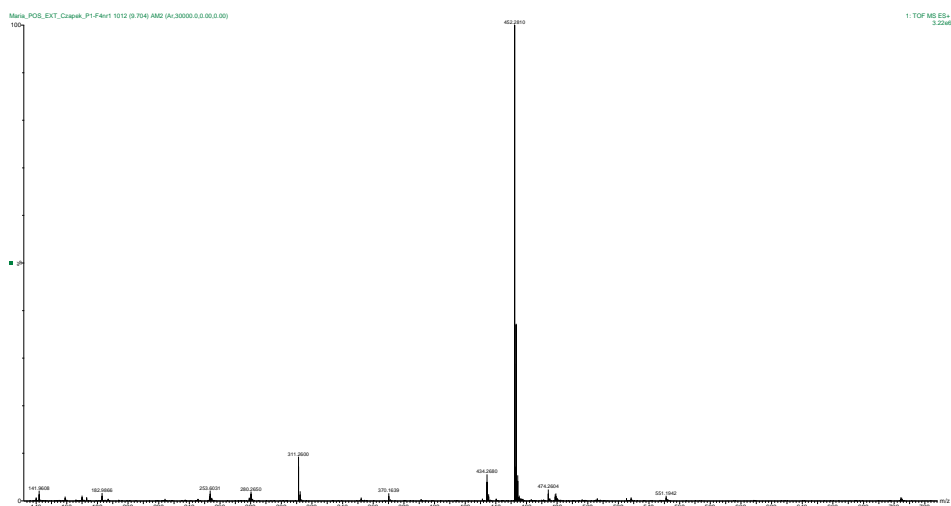


Figura A15- Espectros de massas MS/MS da substância citocalasina J



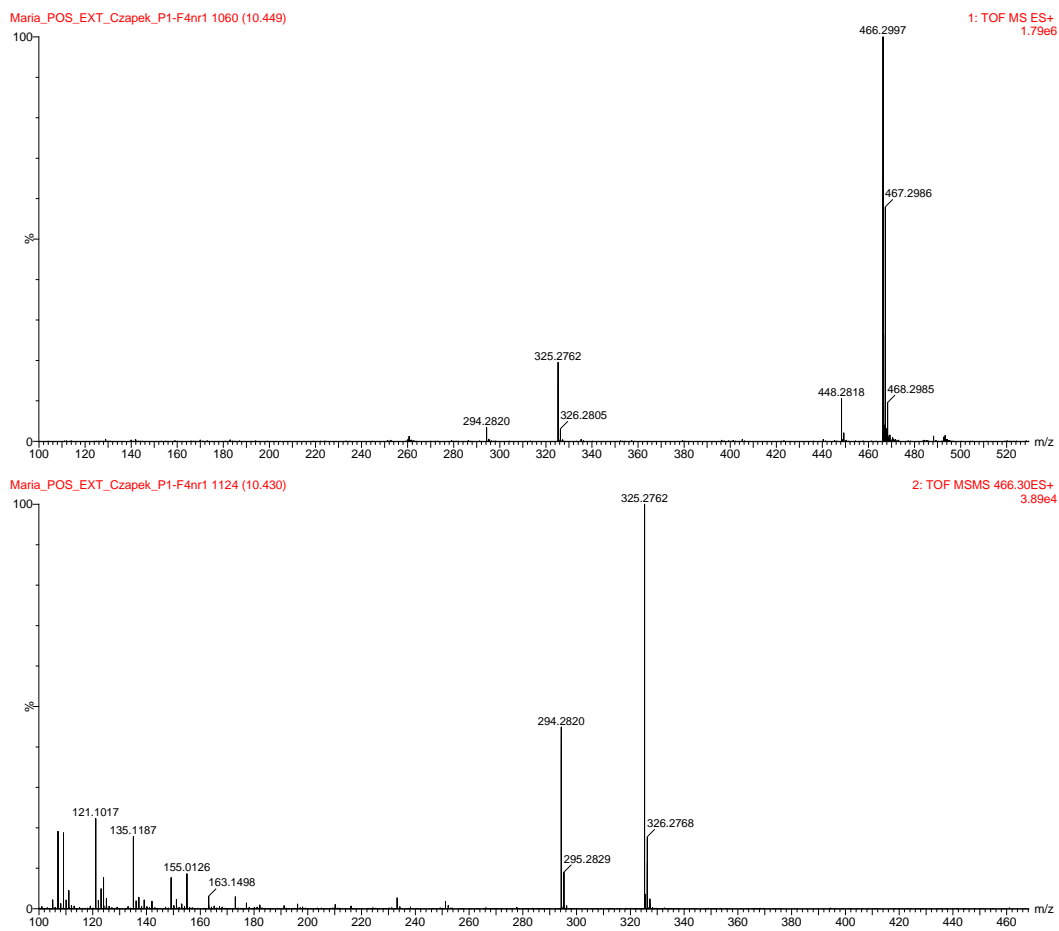
Figura A16- Espectros de massas MS da substância ascocalasina

Figura A17- Espectros de massas MS da substância citocalasina J

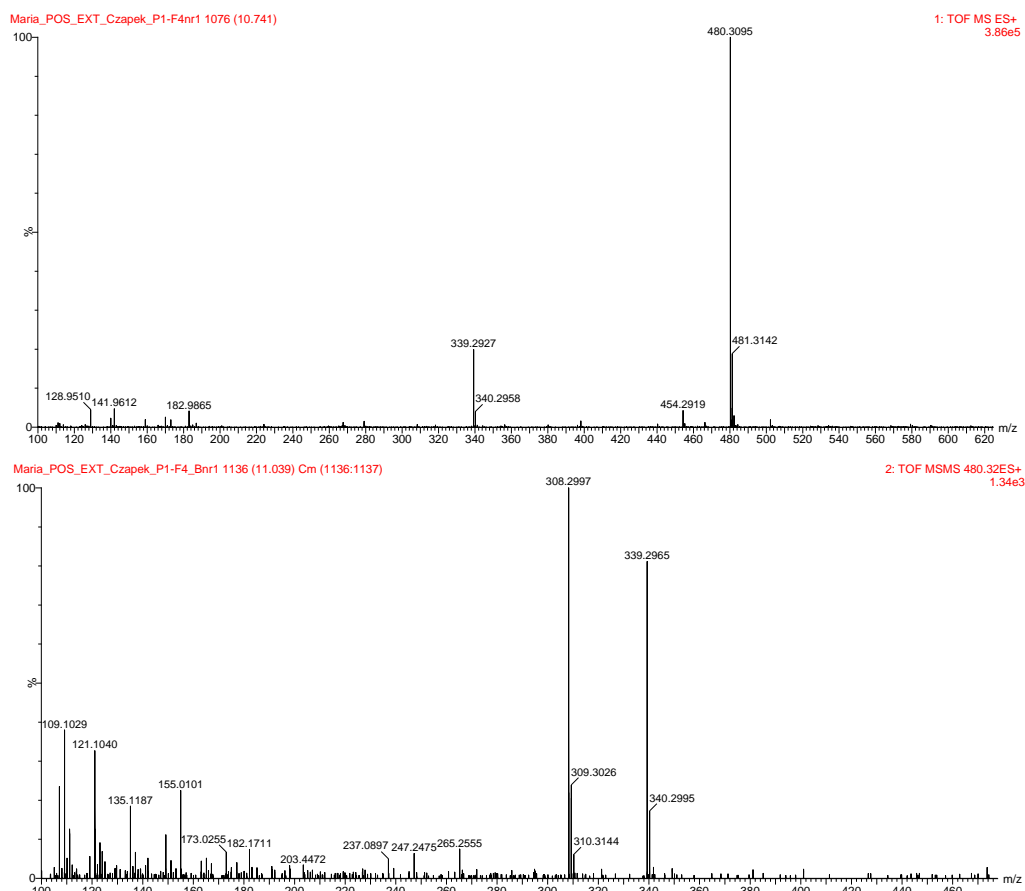


Figura A18- Cromatogramas do pico base (BPI) do extrato PDB e das frações do endófito *Preussia* sp., obtidos por UPLC-ESI-Q-TOF-MS no modo positivo

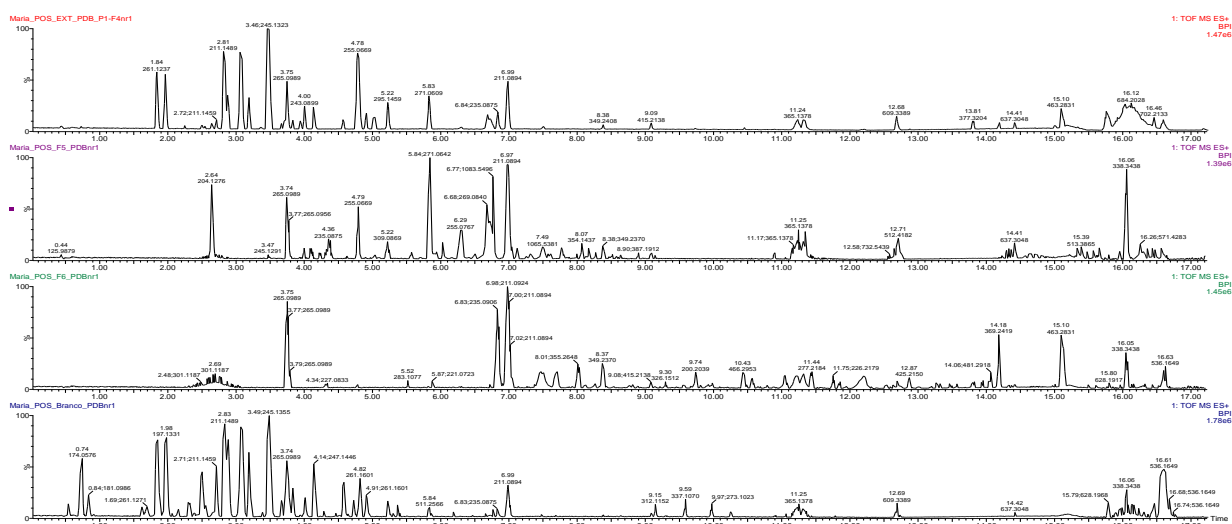


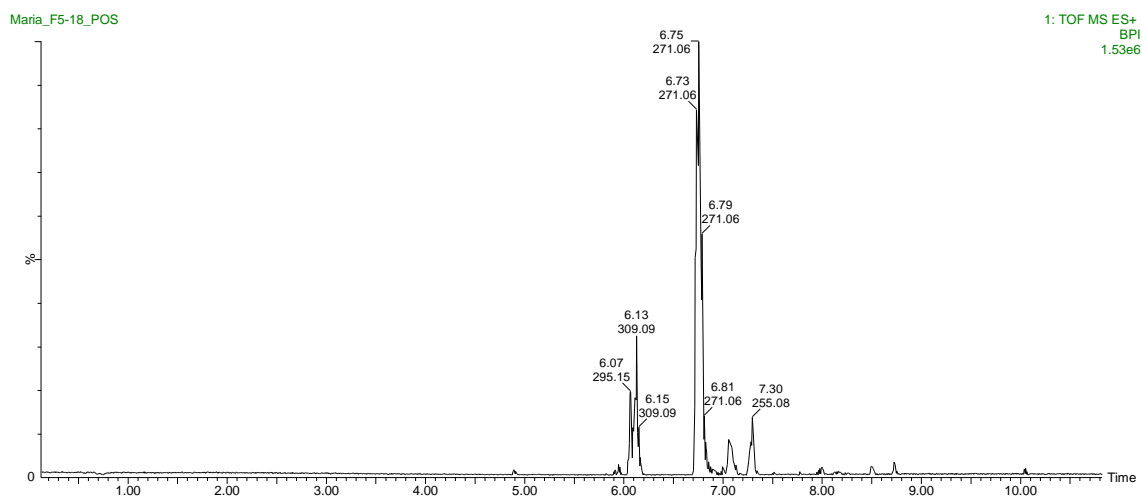
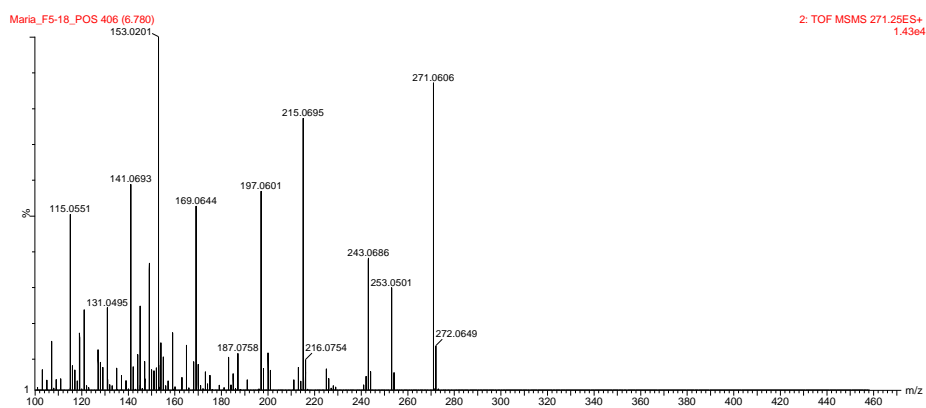
Figura A19- Cromatograma referente a subt 1 (Genisteína) isolada da fração 5**Figura A20** Espectro de MS/MS referente a subt 1 (Genisteína) isolada da fração 5

Figura A21 Mapa da rede molecular dos COVs

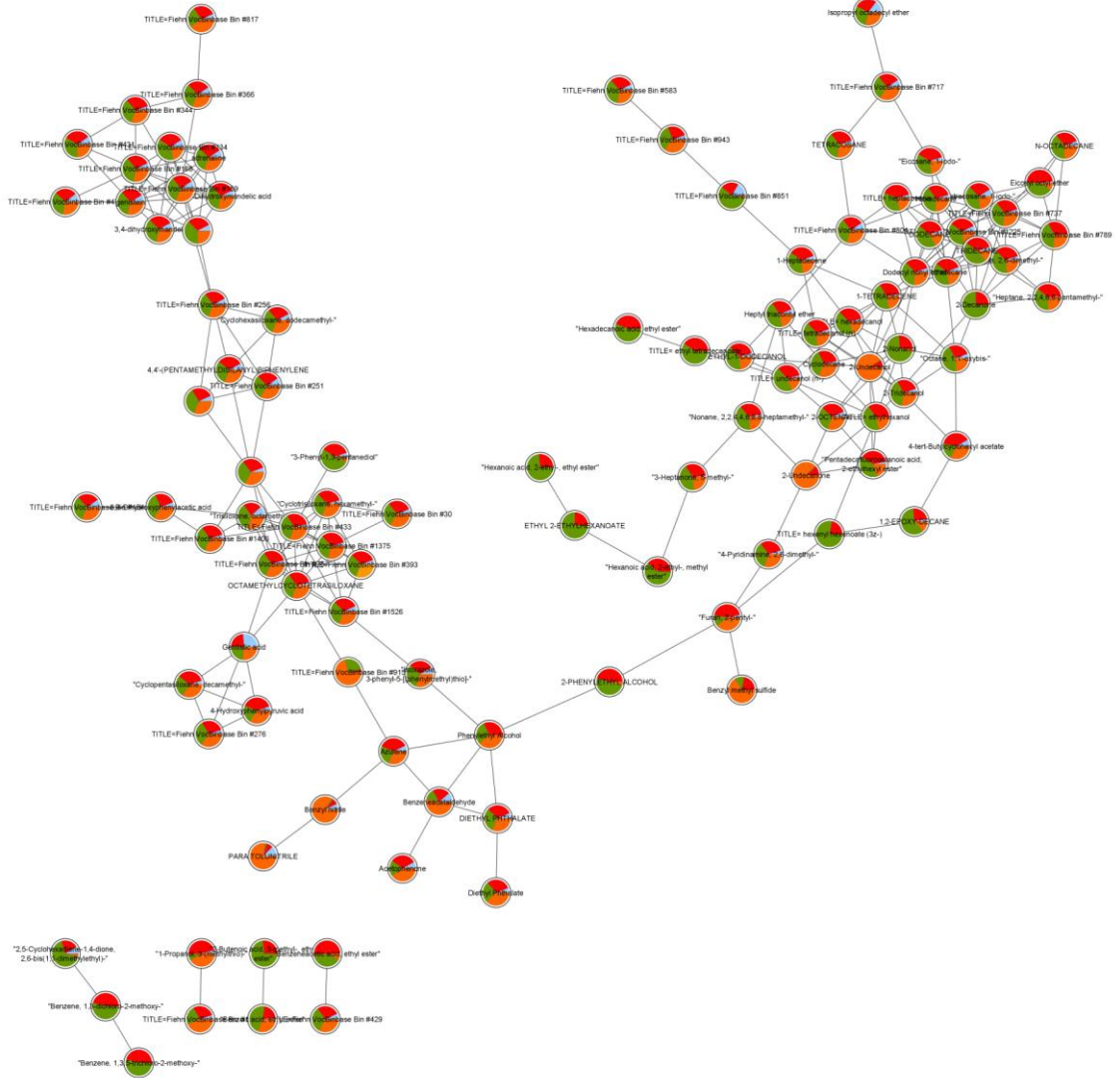


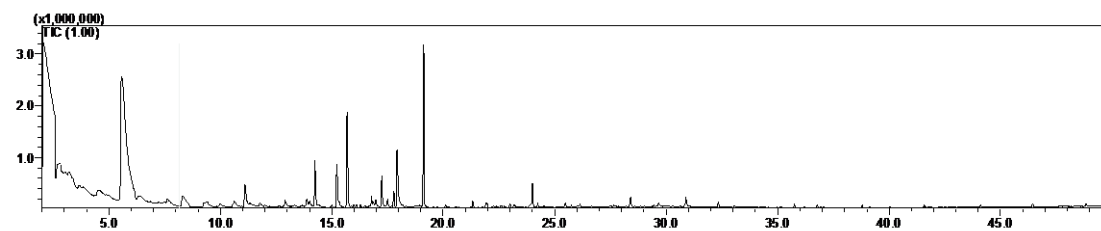
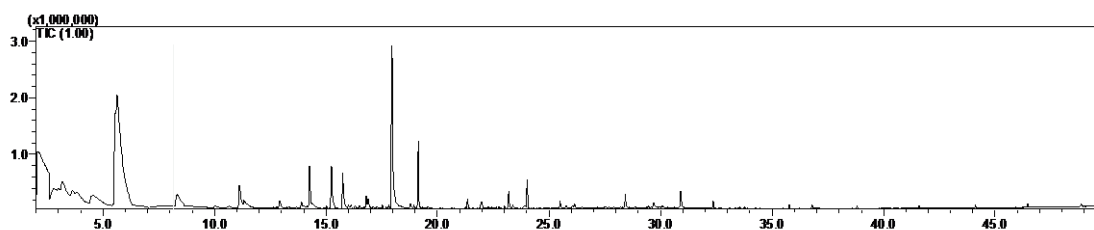
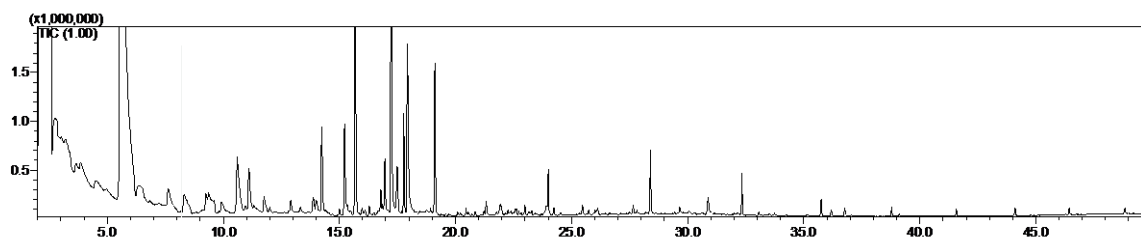
Figura A22 Cromatograma TIC dos COVs: co-cultivo**Figura A23** Cromatograma TIC dos COVs: *Preussia* sp.**Figura A24** Cromatograma TIC dos COVs: *Phyllosticta* sp.

Figura A25 Fluxograma de trabalho

