

MARCELO RODRIGUES DE AMORIM

Bioprospecção de fungos endofíticos *Paraphaeosphaeria sporulosa* e *Cochliobolus eragrostidis* isolados de *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae) e estudo epigenético de *Aspergillus terreus*

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos

Araraquara
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

A524b Amorim, Marcelo Rodrigues de
Bioprospecção de fungos endofíticos *Paraphaeosphaeria sporulosa* e *Cochliobolus eragrostidis* isolados de *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae) e estudo epigenético de *Aspergillus terreus* / Marcelo Rodrigues de Amorim. –
Araraquara : [s.n.], 2019
157 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Lourdes Campaner dos Santos

1. Fungos endofíticos. 2. Metabólitos. 3. Epigenética. 4. Serra do Cipó. 5. Eriocaulaceae. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Bioprospecção de fungos endofíticos *Paraphaeosphaeria sporulosa* e *Cochliobolus eragrostidis* isolados de *Paepalanthus planifolius* (Euriocaulaceae) e estudo epigenético de *Aspergillus terreus*"

AUTOR: MARCELO RODRIGUES DE AMORIM

ORIENTADORA: LOURDES CAMPANER DOS SANTOS

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

Prof.^a Dr.^a LOURDES CAMPANER DOS SANTOS
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof.^a Dr.^a CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. IAN CASTRO GAMBOA
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

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

Prof. Dr. JOÃO MARCOS BATISTA JUNIOR
Instituto de Ciência e Tecnologia / Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - São José dos Campos

Araraquara, 17 de dezembro de 2019

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS:

Nome: Marcelo Rodrigues de Amorim

Naturalidade: Sertãozinho – SP

Nacionalidade: Brasileiro

E-mail: marceloamorim.unesp@gmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA:

Bacharelado em Química Tecnológica

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP,

Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Campus Araraquara

Local: Araraquara - SP

Período: 2009-2013

Mestrado em Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP,

Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Campus Araraquara

Local: Araraquara - SP

Período: 2013-2015

Doutorado em Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP,

Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Campus Araraquara

Local: Araraquara - SP

Período: 2015-2019

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos

Com período sanduíche (2018-2019) na Universidade do Arizona, Tucson/AZ, Estados Unidos da América, sob supervisão do Prof. Dr. Leslie A. A. Gunatilaka.

BOLSAS CONCENDIDAS:

Bolsista de Iniciação Científica – FAPESP (2010-2012)

Título do Projeto: Estudo químico de *Tonina fluviatilis* Aubl. (Eriocaulaceae).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos

Bolsista de Mestrado – CAPES (2013-2015)

Título do Projeto: Prospecção química dos metabolitos produzidos pelos fungos endofíticos associados aos capítulos de *Paepalanthus planifolius* e estudo fitoquímico de *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos

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

Bolsista de Doutorado – FAPESP (2015-2019)

Título do Projeto: Prospecção química e biológica dos fungos endofíticos associados à *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos

Bolsista de Estágio de Pesquisa no Exterior – FAPESP (2018-2019)

Título do Projeto: Epigenetic modifiers: extending the metabolic diversity of endophytic fungi.

Supervisor: Prof. Dr. Leslie A. A. Gunatilaka

PUBLICAÇÕES:

Artigos científicos publicados:

BOTERO, W. B.; **AMORIM, M. R.**; PLACERES, M. C. P.; CARLOS, I. Z.; SANTOS, L. C. Aromatic poliketides and macrolides from *Microsphaeropsis arundinis*. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 31, n. 2, p. 364-369, 2020.

AMORIM, M. R.; HILÁRIO, F.; SANTOS, F.; BATISTA, J.; BAUAB, T.; ARAÚJO, A. R.; CARLOS, I. Z.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. New benzaldehyde and benzopyran compounds from the endophytic fungus *Paraphaeosphaeria* sp. F03 and their antimicrobial and cytotoxic activities. Planta Medica, v. 85, p. 957-964, 2019.

AMORIM, M. R.; HILÁRIO, F.; SANO, P.; BAUAB, T.; SANTOS, L. C. Antimicrobial Activity of *Paepalanthus planifolius* and its major components against selected human pathogens. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 29, p. 766-774, 2018.

AMORIM, M. R.; SOMENSI, A.; ARAUJO, A. R.; BONIFÁCIO, B. V.; BAUAB, T. M.; SANTOS, L. C. Compounds of *Anthostomella brabeji*, an endophytic fungus isolated from *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae). Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 27, p. 1048-1054, 2016.

AMORIM, M. R.; AMARAL, F. P.; VILEGAS, W.; MAGENTA, M. A. G.; VIEIRA JR., G. M.; SANTOS, L. C. HPLC-DAD based method for the quantification of flavonoids in the hydroethanolic extract of *tonina fluviatilis* aubl. (Eriocaulaceae) and their radical scavenging activity. Química Nova, v. 37, p. 1122-1127, 2014.

Livros publicados/organizados:

SANTOS, L. C.; FURLAN, M.; **AMORIM, M. R.** Produtos Naturais Bioativos. 1. ed. São Paulo: Cultura Acadêmica Editora, 2016. 480p.

ORIENTAÇÃO E SUPERVISÃO:

Iniciação científica: Carla Porto Dourado, bolsista CNPq/PIBIC, pelo projeto intitulado: “Estudo químico de metabólitos secundários produzidos por fungos associados à *Paepalanthus planifolius*” no período de fevereiro de 2016 a julho de 2017.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS:

AMORIM, M. R.; WIJERATNE, K.; BATISTA, J. M.; SANTOS, L. C.; GUNATILAKA, LESLIE. An epigenetic modifier induces the production of new metabolites by *Aspergillus terreus* AST0006. In: 67th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. 2019. Innsbruck - Austria.

POLINARIO, G.; HILARIO, F.; **AMORIM, M. R.**; BOTERO, W. B.; BAUAB, T. M.; SANTOS, L. C. Chemical and biological study of the endophytic fungus *Anthostomella brabeji* (Xylariaceae), cultivated in the presence of metallic elicitors. In: 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2019. Joinville - Brasil.

AMORIM, M. R.; FERNANDES, R. P.; SANTOS, L. C. Análise quimiométrica dos extratos do endófito *Cochliobolus eragrostidis*. In: IX Workshop de Quimiometria. 2018. Natal - Brasil.

BOTERO, W. B.; **AMORIM, M. R.**; PLACERES, M. C. P.; CARLOS, I. Z.; SANTOS, L. C. Cytotoxic activity and isolation of metabolites from *Microsphaeropsis arundinis*, an endophytic fungus from *Paepalanthus planifolius*. In: 46th World Chemistry Congress, 40ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química and IUPAC 49th General Assembly. 2017. São Paulo – Brasil.

AMORIM, M. R.; DOURADO, C. P.; BOTERO, W. B.; PEIXOTO, T.; HILÁRIO, F.; BAUAB, T. M.; SANTOS, L. C. Evaluation of the antimicrobial activities of extracts and the isolation of metabolites from *Paraphaeosphaeria sporulosa*. In: 46th World Chemistry Congress, 40ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química and IUPAC 49th General Assembly 2017. São Paulo – Brasil.

DOURADO, C. P.; **AMORIM, M. R.**; SANTOS, L. C. Derreplicação de metabólitos secundários do extrato do fungo endofítico *Paraphaeosphaeria sporulosa* por LC-HRMS. In: XXVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp. 2017. Araraquara – Brasil.

AMORIM, M. R.; SANTOS, L. C. Elucidação de isocromanos do extrato do fungo endofítico *Paraphaeosphaeria sporulosa*. In: XIII Jornada Paulista de Plantas Medicinais “Professor Dr. Francisco José de Abreu Matos”. 2017. Araraquara – Brasil.

AMORIM, M. R.; BOTERO, W. B.; SILVA, A. C. S.; ARAÚJO, A. R.; CARLOS, I. Z.; SANTOS, L. C. Cytotoxic activities of endophytic fungi extracts from

Paepalanthus planifolius: A Brazilian evergreen. In 9th Joint Natural Products Conference Copenhagen. 2016. Copenhagen – Dinamarca.

DOURADO, C. P.; **AMORIM, M. R.**; BOTERO, W. B.; PEIXOTO, T.; SANTOS, L. C. Avaliação do perfil químico do fungo endofítico *Paraphaeosphaeria sporulosa* isolado das folhas de *Paepalanthus planifolius* (Bong) Körn (Eriocaulaceae). In: VI Congresso Científico da Unesp e II Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. 2016. Araraquara – Brasil.

PEIXOTO, T.; **AMORIM, M. R.**; BOTERO, W. B.; SANTOS, L. C. Preparação de extratos produzidos por fungos endofíticos associados às partes aéreas de *Paepalanthus planifolius*. In: XXVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp. 2016. Araraquara – Brasil.

DOURADO, C. P.; **AMORIM, M. R.**; BOTERO, W. B.; HILÁRIO, F.; SANTOS, L. C. *Paraphaeosphaeria sporulosa* isolado das folhas de *Paepalanthus planifolius* (Bong) Körn: triagem química e biológica. In: XXVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp. 2016. Araraquara – Brasil.

AMORIM, M. R.; SOMENSI, A.; ARAUJO, A. R.; BONIFACIO, B. V.; BAUAB, T. M.; SANTOS, L. C. Evaluation of antimicrobial activity from the extract and isolated substances of *Anthistomella brabeji*. In: 5th Brazilian Conference on Natural Products - BCNP" and "XXXI Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology – RESEM. 2015. Atibaia – Brasil.

IGNACIO, F. G.; **AMORIM, M. R.**; SANO, P. T.; SANTOS, L. C. Isolation and identification of substances from *Paepalanthus acantophyllus* capitula. In: 5th Brazilian Conference on Natural Products - BCNP" and "XXXI Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology – RESEM. 2015. Atibaia – Brasil.

BOTERO, W. B.; **AMORIM, M. R.**; SANO, P. T.; SANTOS, L. C. Evaluation of radical scavenging activity from the extracts and isolated substances of *Paepalanthus geniculatus* scapes. In: 5th Brazilian Conference on Natural

Products - BCNP" and "XXXI Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology – RESEM. 2015. Atibaia – Brasil.

BOTERO, W. B.; **AMORIM, M. R.**; SANTOS, L. C. Avaliação da atividade antirradicalar dos extratos e substâncias isoladas de *Paepalanthus geniculatus* (Eriocaulaceae). In: XXVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp. 2015. Araraquara – Brasil.

BOTERO, W. B.; **AMORIM, M. R.**; SANO, P. T.; SANTOS, L. C. Estudo químico dos escapos de *Paepalanthus geniculatus* Kunth. In: XXVI Congresso de Iniciação Científica da Unesp. 2014. Araraquara - SP.

AMORIM, M. R.; RINALDO, D.; AMARAL, F. P.; MAGENTA, M. A. G.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. HPLC-DAD method for quantification of the flavonoids with antiradicalar activity in the hydroethanolic extract from *Tonina fluviatilis* Aubl. (Eriocaulaceae). In: 24º Congresso de Iniciação Científica da UNESP. 2013. Araraquara – SP.

AMORIM, M. R.; AMARAL, F. P.; SANTOS, L. C. Isolamento e identificação de naftopiranonas e flavonas de *Tonina fluviatilis* AUBL. (Eriocaulaceae). In: 24º Congresso de Iniciação Científica da UNESP. 2012. Araraquara – SP.

AMORIM, M. R.; VIEIRA Jr.; G. M.; AMARAL, F. P.; ROCHA, C. Q., MAGENTA, M. A. G., VILEGAS, W., SANTOS, L. C. Identificação de flavonóis glicosilados de *Tonina fluviatilis* (Eriocaulaceae). In: 23º Congresso de Iniciação Científica da UNESP. 2011. Araraquara – SP.

AMORIM, M. R.; VIEIRA Jr., G. M.; AMARAL, F. P.; ROCHA, C. Q., VILEGAS, W., SANTOS, L. C. Flavonol dimetoxilado e atividade antiradicalar de *Tonina fluviatilis* (Eriocaulaceae). In: 34ª Reunião Anual da Semana Brasileira da Química. 2011. Florianópolis – SC.

VIEIRA Jr., G. M.; **AMORIM, M. R.**; ROCHA, C. Q.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Atividade antiradicalar de extratos de *Solanum paniculatum* (Solanaceae). In:

34ª Reunião Anual da Semana Brasileira da Química. 2011. Florianópolis – SC.

AMORIM, M. R.; AMARAL, F. P.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Estudo químico de *Tonina fluviatilis* Aubl. (Eriocaulaceae). In: 40ª Semana da Química. 2010. Araraquara – SP.

ORGANIZAÇÃO DE EVENTO:

Participou como colaborador do minicurso “Plantas Medicinais: uma abordagem prática de preparação e estudo do perfil químico de extratos vegetais” durante a 1ª Escola de Verão em Química realizada no Instituto de Química – UNESP, Araraquara, 2018.

ATIVIDADES EXTRACURRICULARES:

Estágio docência na disciplina de Química Orgânica I para os alunos do 3º ano do curso de Licenciatura em Química, no primeiro semestre de 2014.

Banca examinadora no XXIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, realizado na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2017.

“ Dedico este trabalho aos meus pais e à
minha irmã, aos familiares e aos amigos
que sempre estiveram ao meu lado. ”

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Química de Araraquara - UNESP, por ter sido a minha segunda casa desde a minha graduação e pela possibilidade de realizar esse trabalho.

À Universidade do Arizona pela oportunidade de realizar o meu estágio de pesquisa no exterior.

À Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos pela orientação, compreensão, sabedoria e confiança por todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Leslie Gunatilaka pela orientação e valiosos ensinamentos.

Aos professores Dr. Ian Castro Gamboa e Dr^a. Angela Regina Araujo pela contribuição na avaliação do meu trabalho durante o exame geral de qualificação.

Aos professores da banca por terem aceitado estar presentes na defesa e contribuírem para a finalização desse trabalho.

Ao Dr. Nivaldo Borallo pela amizade, sinceridade, e por toda a ajuda com os experimentos de RMN, compartilhando aprendizado e bons momentos durante as tardes de café.

Aos meus colegas do laboratório e do Instituto de Química: Weslei Botero, Felipe Hilário, Talita Peixoto, Tais Pezza, Ana Zanatta, Carla Porto Dourado, Luciano Silva, Juliana Gubiani, Isabella Costa, João Bronzel e Juliana Rodrigues.

À Taisa Pansani por todo o companheirismo e incentivo durante esses anos ao meu lado, ajudando a superar as dificuldades para finalizar mais esta etapa da minha vida.

Em especial a toda a minha família. Aos meus pais Delcio e Vera, à minha irmã Thais, aos tios e primos, cuja influência me fizeram a pessoa que eu sou e o carinho e dedicação me ajudaram a conquistar esse objetivo.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processos nº 2015/11058-5 e 2018/05905-5) por viabilizar o desenvolvimento dessa pesquisa, através de auxílios de Bolsa de Doutorado – DR e Bolsa de Estágio Pesquisa no Exterior – BEPE.

Adicionalmente, à CAPES e CNPq pelo apoio financeiro ao grupo de pesquisa.

“ Não faças do amanhã o sinônimo de nunca, nem o ontem te seja o mesmo que nunca mais. Teus passos ficaram. Olhes para trás...mas vá em frente pois há muitos que precisam que chegues para poderem seguir-te. ”

Charles Chaplin

RESUMO

Os microrganismos são considerados uma fonte promissora de substâncias com potencial biológico e de alta capacidade biossintética para produção de novas substâncias com aplicação em diversas áreas tais como agricultura, medicina e alimentos. Os fungos endofíticos colonizam o interior das plantas e tem demonstrado grande importância na produção de metabólitos secundários bioativos. Dessa forma, este trabalho foi idealizado objetivando a bioprospecção dos extratos produzidos por fungos endofíticos associados à *Paepalanthus planifolius*, espécie vegetal do Cerrado, e a avaliação epigenética em *Aspergillus terreus*, isolado de espécie vegetal do Deserto de Sonora, na obtenção de novas substâncias. Os fungos endofíticos isolados de *P. planifolius* (15 linhagens) foram cultivados em escala reduzida em meio líquido de batata e dextrose (PDB), a 25 °C, sob modo estático para obtenção dos respectivos extratos brutos em AcOEt. A avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica foram realizadas, sendo que a bioprospecção inicial conduziu a seleção de dois fungos endofíticos identificados como *Paraphaeosphaeria sporulosa* e *Cochliobolus eragrostidis*. Estes, foram cultivados em diferentes meios líquidos e sólidos (escala reduzida) para novamente avaliar a atividade biológica dos extratos e selecionar os mais promissores para isolamento e determinação/elucidação estrutural dos metabólitos secundários em escala ampliada. Do cultivo de *P. sporulosa* no meio sólido de arroz foram isoladas seis substâncias inéditas, esporulosaldeínas A-F (**1-6**) com boa atividade antifúngica (CIM <100 µg/mL) contra linhagens de *Candida* spp. Do extrato obtido do meio líquido de PDB de *P. sporulosa*, foram isoladas quatro substâncias, sendo três inéditas 7-(hidroximetil)-8-metoxi-3-metilisoquinolina-6-ol (**7**), 8-metoxi-3,7-dimetilisoquinolina-6-ol (**8**) e N-(6-hidroxi-8-metoxi-3-metilisoquinolina-7-il) metil acetamida (**9**), e a conhecida chaetoquadrina F (**10**). Do cultivo de *C. eragrostidis* em meio líquido PDB foram identificadas sete substâncias, fomalactona (**11**), musacina D (**12**), musacina E (**13**), sapinofuranona A (**14**), ciclo(L-valina-L-triptofano) (**15**), indol-3-ácido carboxílico (**16**) e indol-3-ácido acético (**17**). O metabólito **11** apresentou promissora atividade citotóxica para células tumorais (CI₅₀ = 5,3 - 8,8 µg/mL) sendo a responsável pela atividade biológica apresentada pelo extrato, enquanto as outras substâncias (**12-17**) não apresentaram 50% de inibição na maior concentração avaliada (> 30 µg/mL). O cultivo de *A. terreus*, em meio líquido de PDB, com o modificador epigenético SAHA induziu a produção de metabólitos secundários observado por HPLC. Este endófito foi cultivado em escala ampliada na presença e ausência de SAHA resultando no isolamento de dois novos metabólitos de 3-pirona-cumarinas, **18** e **19**, e uma nova isocumarina, 3,4-diidro-3-metil-6,7,8-triidroxi-1*H*-2-benzopiran-1-ona (**20**), juntamente com os compostos conhecidos terreína (**21**), 6-hidroximeleina (**22**), ortosporina (**23**), 6,7-dimetoximeleina (**24**), 6-metoximeleina (**25**), farnesol (**26**), 3,4-diidro-3-metil-5,6,8-triidroxi-1*H*-2-benzopiran-1-ona (**27**) e 3-metilorselinato de etila (**28**). Adicionalmente, os compostos **18** e **19** foram submetidos às reações de acetilação e metilação fornecendo os derivados semi-sintéticos **18a**, **18b** e **19a** que auxiliaram na elucidação estrutural de **18** e **19**. A configuração absoluta das substâncias **5**, **6**, **18**, **19** e **20** foi determinada por Dicroísmo Circular Eletrônico.

Palavras Chaves: Fungos endofíticos, Epigenética, Eriocaulaceae, Bioprospecção, Metabólitos.

ABSTRACT

Microorganisms are considered a promising source of substances with biological potential and high biosynthetic capacity to produce new substances with application in various areas such as agriculture, medicine and food. Endophytic fungi colonize the interior of plants and have shown great importance in the production of bioactive secondary metabolites. Thus, this work was conceived aiming the bioprospection of extracts produced from endophytic fungi associated with *Paepalanthus planifolius*, a Cerrado plant species, and the epigenetic evaluation in *Aspergillus terreus*, isolated from Sonora Desert plant species, to obtain new substances. The isolated endophytic fungi of *P. planifolius* (15 strains) were cultivated in small scale in potato and dextrose liquid medium (PDB) at 25 °C, under static mode to obtain the respective EtOAc crude extracts. Antimicrobial and cytotoxic activities were evaluated and the initial bioprospection led to the selection of two endophytic fungi identified as *Paraphaeosphaeria sporulosa* and *Cochliobolus eragrostidis*. These were cultivated in different liquid and solid media (reduced scale) to again evaluate the biological activity of the extracts and select the most promising ones for isolation and structural determination/elucidation of the secondary metabolites on larger scale. From the cultivation of *P. sporulosa* in the solid medium of rice, six new substances, sporulosaldeins A-F (**1-6**) were isolated, with good antifungal activity (MIC <100 µg/mL) against *Candida* spp. From the extract obtained from the *P. sporulosa* PDB liquid medium, four substances were isolated, three unpublished 7-(hydroxymethyl)-8-methoxy-3-methylisoquinoline-6-ol (**7**), 8-methoxy-3,7-dimethylisoquinoline-6-ol (**8**) and *N*-(6-hydroxy-8-methoxy-3-methylisoquinoline-7-yl) methyl acetamide (**9**), and the known chaetoquadrin F (**10**). From the cultivation of *C. eragrostidis* in PDB liquid medium, seven substances were identified: phomalactone (**11**), musacin D (**12**), musacin E (**13**), sapinofuranone A (**14**), cycle (L-valyl-L-tryptophan) (**15**), indole-3-carboxylic acid (**16**) and indole-3-acetic acid (**17**). Metabolite **11** showed promising cytotoxic activity for tumor cells (IC₅₀ = 5.3 - 8.8 µg/mL) and was responsible for the biological activity presented by the extract, while the other substances (**12-17**) did not show 50% inhibition at the highest concentration evaluated (> 30 µg/mL). The *A. terreus* cultivation in PDB liquid medium with SAHA epigenetic modifier induced the production of secondary metabolites observed by HPLC. This endophyte was grown on a larger scale in the presence and absence of SAHA resulting in the isolation of two new 3-pyrone-coumarin metabolites, **18** and **19**, and a new isocoumarin, 3,4-dihydro-3-methyl-6,7,8-trihydroxy-1*H*-2-benzopyran-1-one (**20**), together with known compounds such as terrein (**21**), 6-hydroxymellein (**22**), orthosporin (**23**), 6,7-dimethoxymellein (**24**), 6-methoxymellein (**25**), farnesol (**26**), 3,4-dihydro-3-methyl-5,6,8-trihydroxy-1*H*-2-benzopyran-1-one (**27**) and ethyl 3-methylorsellinate (**28**). Additionally, compounds **18** and **19** were subjected to acetylation and methylation reactions providing the semi-synthetic derivatives **18a**, **18b** and **19a** that helped in the structural elucidation of **18** and **19**. The absolute configuration of substances **5**, **6**, **18**, **19** and **20** was determined by Electronic Circular Dichroism.

Keywords: Endophytic fungi, Epigenetic, Eriocaulaceae, Bioprospection, Metabolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número de publicações envolvendo metabólitos secundários de fungos endofíticos entre 1993 a 2018.	30
Figura 2. Diversidade estrutural dos metabólitos isolados de fungos endofíticos.	31
Figura 3. Estruturas de diferentes compostos bioativos isolados de fungos endofíticos com atividades biológicas.	31
Figura 4. (A) Porcentagem de metabólitos secundários isolados de bactérias, líquens e fungos no Brasil. (B) O número total de compostos por fonte microbiana. (C) Fontes das quais as cepas microbianas que produziram os 280 compostos foram isoladas no Brasil.	32
Figura 5. Espécie vegetal <i>Paepalanthus planifolius</i>	34
Figura 6. Colônia de <i>Paraphaeosphaeria sporulosa</i> F03 em placas de PDA (esquerda), também mostrando o lado reverso (direita).	35
Figura 7. Metabólitos bioativos identificados no gênero <i>Paraphaeosphaeria</i> . .	35
Figura 8. Metabólitos secundários identificados na espécie <i>P. sporulosa</i>	36
Figura 9. Metabólitos bioativos identificados no gênero <i>Cochliobolus</i>	37
Figura 10. Colônia de <i>Cochliobolus eragrostidis</i> E02 em placas de PDA (esquerda), também mostrando o lado reverso (direita).	37
Figura 11. Metabólitos secundários identificados na espécie <i>C. eragrostidis</i> . .	38
Figura 12. Compostos isolados do cultivo de fungos com modificadores epigenéticos.	40
Figura 13. (A) O complexo nucleossômico. (B) Modificações de cromatina que geralmente ocorrem nas caudas das histonas. (C) Acetilação reversível dos resíduos de lisina das histonas.	41
Figura 14. (A) Metilação da citosina do DNA. (B) Proposta de mecanismo catalítico para metilação da citosina por DNMTs.	42
Figura 15. Sequenciamento da região ITS de <i>Paraphaeosphaeria sporulosa</i> . .	65
Figura 16. Sequenciamento da região ITS <i>Cochliobolus eragrostidis</i>	65
Figura 17. Cromatogramas dos extratos brutos obtidos em PDB e Arroz do endófito <i>P. sporulosa</i> (Coluna Thermo® Hypersil GOLD aQ RP18 com 250 x 4,6 mm d.i.; 5 µm), λ = 254-330 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: MeOH + TFA 0,1% (B) e H ₂ O + TFA 0,1% (A). O gradiente foi de 5-100% B (60 min), volume 10 µL.	69
Figura 18. Análise por CCD das 5 frações finais codificadas de T1-T5 [gel de sílica, AcOEt/CHCl ₃ (1:1, v/v), a) luz UV λ = 254 nm e b) luz UV λ = 330 nm]. .	71
Figura 19. Cromatograma HPLC-DAD analítico do extrato ACN de <i>P. sporulosa</i> . Coluna Knauer RP18 com 250 x 4,6 mm d.i.; 5 µm), λ = 254-330 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: MeOH + TFA 0,1% (B) e H ₂ O + TFA 0,1% (A). O gradiente foi de 20-100% B (60 min), volume 10 µL.	72
Figura 20. Espectros de absorção na região do UV das substâncias 1 a 6 no extrato Arroz de <i>P. sporulosa</i>	72
Figura 21. Substâncias 1-6 e suas principais correlações observadas nos experimentos de HMBC (→), NOESY (↔) e COSY (↔).	74
Figura 22. Comparação dos espectros de UV e ECD de (+)- 5 em metanol (linha preta) com os espectros calculados para (S)- 5 (linha vermelha).	77
Figura 23. Cromatograma mostrando a separação da mistura racêmica do composto 6 , monitorada a 330 nm usando a coluna Chiralcel OD-RH. A fase	

móvel consistiu em metanol/água (8:2, v/v) em eluição isocrática. A vazão foi de 0,5 mL/min e injeção de amostra de 10 µL.....	78
Figura 24. Cromatograma mostrando a separação da mistura racêmica de 6 monitorada com detector de CD a 254 nm e seus espectros de CD em metanol/água (8:2, v/v) na coluna Chiralcel OD-RH com vazão de 0,5 mL/min.	78
Figura 25. Proposta de via biosintética para as substâncias 1-6	79
Figura 26. Cromatogramas do extrato do endófito <i>P. sporulosa</i> cultivado em PDB: A) BPC no modo positivo; B) BPC no modo negativo; C) UV em 270nm.	82
Figura 27. Análise por CCD das 8 frações finais codificadas de J1-J8 [gel de sílica, AcOEt/CHCl ₃ (1:1, v/v), A) anisaldeído/H ₂ SO ₄ e B) luz UV λ = 254 nm]	84
Figura 28. Cromatograma HPLC-DAD analítico da fração J2 de <i>P. sporulosa</i> . Coluna Luna RP18 com 250 x 4,6 mm d.i.; 5 µm), λ = 254-330 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: MeOH + TFA 0,05% (B) e H ₂ O + TFA 0,05% (A). O gradiente foi de 20-100% B (50 min), volume 10 µL.	85
Figura 29. Espectros de absorção na região do UV das substâncias 7-10 , na fração J2 de <i>P. sporulosa</i>	86
Figura 30. Substâncias 7-9 e suas principais correlações observadas no experimento de HMBC (→) e as interações em NOESY (↔).	86
Figura 31. Espectro de RMN de ¹ H da substância 7 (600 MHz, CD ₃ OD).	87
Figura 32. Espectro de RMN de ¹³ C da substância 7 (150 MHz, CD ₃ OD).	88
Figura 33. Mapa de contornos HSQC da substância 7 (600 e 150 MHz, CD ₃ OD).	89
Figura 34. Mapa de contornos HMBC da substância 7 (600 e 150 MHz, CD ₃ OD).	89
Figura 35. Experimento NOESY 1D, espectro de RMN de ¹ H (A), irradiando em δ 7,83 (B) e irradiando em δ 4,15 (C) da substância 7 (600 MHz, CD ₃ OD).	90
Figura 36. Ampliação do experimento NOESY 1D, espectro de RMN de ¹ H (A), irradiando em δ 7,83 (B) e irradiando em δ 4,15 (C) da substância 7 (600 MHz, CD ₃ OD).	90
Figura 37. Espectro de massas de primeira-ordem de 7 obtido em modo negativo.	90
Figura 38. Espectro de massas de primeira-ordem de 8 obtido em modo negativo.	92
Figura 39. Espectro de RMN de ¹ H da substância 8 (600 MHz, CD ₃ OD).	92
Figura 40. Espectro de RMN de ¹³ C da substância 8 (150 MHz, CD ₃ OD).	93
Figura 41. Mapa de contornos HSQC da substância 8 (600 e 150 MHz, CD ₃ OD).	93
Figura 42. Mapa de contornos HMBC da substância 8 (600 e 150 MHz, CD ₃ OD).	93
Figura 43. Espectro de massas de primeira-ordem de 9 obtido em modo negativo.	94
Figura 44. Espectro de RMN de ¹ H da substância 9 (600 MHz, CD ₃ OD).	94
Figura 45. Espectro de RMN de ¹³ C da substância 9 (150 MHz, CD ₃ OD).	94
Figura 46. Mapa de contornos HSQC da substância 9 (600 e 150 MHz, CD ₃ OD).	95
Figura 47. Mapa de contornos HMBC da substância 9 (600 e 150 MHz, CD ₃ OD).	95

Figura 48. Substância 10 e suas principais correlações observadas no experimento de HMBC ($\rightarrow$) e as interações em COSY ($\leftrightarrow$).	96
Figura 49. Espectro de RMN de ^1H da substância 10 (600 MHz, CD_3OD).	96
Figura 50. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 10 (150 MHz, CD_3OD).	97
Figura 51. Mapa de contornos HSQC da substância 10 (600 e 150 MHz, CD_3OD).....	97
Figura 52. Mapa de contornos HMBC da substância 10 (600 e 150 MHz, CD_3OD).....	97
Figura 53. Mapa de contornos COSY da substância 10 (600 MHz, CD_3OD)... ..	98
Figura 54. Espectro de massas de primeira-ordem de 10 obtido em modo positivo.....	98
Figura 55. Cromatogramas dos extratos brutos obtidos em PDB e Arroz do endófito <i>C. eragrostidis</i> (Coluna Thermo® Hypersil GOLD aQ RP18 com 250 x 4,6 mm d.i.; 5 μm), λ = 219-330 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: MeOH + TFA 0,1% (B) e H_2O + TFA 0,1% (A). O gradiente foi de 5-100% B (60 min), volume 10 μL	101
Figura 56. Estruturas dos compostos 11-17 isolados de <i>C. eragrostidis</i>	103
Figura 57. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do composto 11 . ..	104
Figura 58. Espectro de RMN de DEPTQ (150 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do composto 11	104
Figura 59. Espectro de ECD do composto 11 ($\text{ACN}:\text{H}_2\text{O}$)	105
Figura 60. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do composto 12 . ..	106
Figura 61. Espectro de RMN de DEPTQ (150 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do composto 12	107
Figura 62. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3Cl) do composto 13	107
Figura 63. Espectro de RMN de DEPTQ (150 MHz, CD_3Cl) do composto 13 . ..	107
Figura 64. Espectro de RMN de ^1H da substância 14 (600 MHz, CD_3OD).	111
Figura 65. Espectro de RMN de DEPTQ da substância 14 (600 MHz, CD_3OD).	111
Figura 66. Espectro de HRMS do composto 11 em modo positivo de ionização.....	111
Figura 67. Espectro de HRMS do composto 12 em modo positivo de ionização.....	112
Figura 68. Espectro de HRMS do composto 13 em modo positivo de ionização.....	112
Figura 69. Espectro de HRMS do composto 14 em modo positivo de ionização.....	112
Figura 70. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) do composto 15	113
Figura 71. Espectro de HRMS do composto 15 em modo positivo de ionização.....	113
Figura 72. Espectro de RMN de HMBC (600 e 150 MHz, CD_3OD) do composto 15	113
Figura 73. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) do composto 16	114
Figura 74. Espectro de HRMS do composto 16 em modo positivo de ionização.....	114
Figura 75. Espectro de HRMS de segunda ordem do composto 16 em modo positivo de ionização.....	115
Figura 76. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) do composto 17	115
Figura 77. Espectro de RMN de HMBC (600 e 150 MHz, CD_3OD) do composto 17	115

Figura 78. (A) Perfil químico por HPLC-DAD dos extratos AcOEt de <i>A. terreus</i> cultivado em PDB e (B) PDB contendo 250 μ M SAHA detectados por absorção na região do UV em 254 e 391 nm.....	118
Figura 79. Estruturas dos compostos 18-31 e os derivados semi-sintéticos 18a-18b e 19a	118
Figura 80. Correlações de HMBC, COSY e NOESY envolvendo o metabólito 18 e seus derivados triacetato (18a) e dimetoxi (18b).....	121
Figura 81. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 18	123
Figura 82. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do composto 18	123
Figura 83. Mapa de contornos HSQC do composto 18 (400 e 100 MHz, DMSO- d_6).....	123
Figura 84. Mapa de contornos HMBC do composto 18 (400 e 100 MHz, DMSO- d_6).....	124
Figura 85. Experimento COSY do composto 18 (400 MHz, DMSO- d_6).....	124
Figura 86. Espectro no IV do composto 18	124
Figura 87. Espectro de HRMS do composto 18	125
Figura 88. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 18a	125
Figura 89. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 18a	125
Figura 90. Mapa de contornos HSQC do composto 18a (400 e 100 MHz, CDCl_3).....	126
Figura 91. Mapa de contornos HMBC do composto 18a (400 e 100 MHz, CDCl_3).....	126
Figura 92. Espectro de NOESY 2D do composto 18a (400 MHz, CDCl_3).....	126
Figura 93. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 18b	127
Figura 94. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do composto 18b	127
Figura 95. Mapa de contornos HMBC do composto 18b (400 e 100 MHz, DMSO- d_6).....	127
Figura 96. Expansão do mapa de contornos HMBC do composto 18b (400 e 100 MHz, DMSO- d_6).....	128
Figura 97. (Esquerda) Comparação dos espectros de UV e ECD observados de (+)- 18 em metanol (traço preto) com os espectros de UV e ECD [CAM-B3LYP/PCM (MeOH)/TZVP] calculados da média de Boltzmann dos seis mais baixos conformêros de energia identificados para (R)- 18 (traço vermelho). (Direita) Estruturas otimizadas, energias relativas livres de Gibbs e população de Boltzmann (%) dos conformêros de menor energia de (R)- 18 no nível B3LYP/PCM (MeOH)/6-31G (d).....	129
Figura 98. Correlações de HMBC para 19 e 20	130
Figura 99. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 19	131
Figura 100. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do composto 19	131
Figura 101. Mapa de contornos HSQC do composto 19 (400 e 100 MHz, DMSO- d_6).....	131
Figura 102. Mapa de contornos HMBC do composto 19 (400 e 100 MHz, DMSO- d_6).....	132
Figura 103. Expansão do mapa de contornos HMBC do composto 19 (400 e 100 MHz, DMSO- d_6).....	132
Figura 104. Espectro de IV do composto 19	132
Figura 105. Espectro de HRMS do composto 19	133

Figura 106. Comparação dos espectros de UV e ECD observados de (+)- 19 em metanol (traço preto) com os espectros de UV e ECD [CAM-B3LYP/PCM (MeOH)/TZVP] calculados da média de Boltzmann dos seis conformeros de menor energia identificado para (<i>R</i>)- 19 (traço vermelho).	134
Figura 107. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 19a	134
Figura 108. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 19a	135
Figura 109. Mapa de contornos HSQC do composto 19a (400 e 100 MHz, CDCl_3).	135
Figura 110. Mapa de contornos HMBC do composto 19a (400 e 100 MHz, CDCl_3).	135
Figura 111. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) do composto 20	136
Figura 112. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) do composto 20	136
Figura 113. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) do composto 20	136
Figura 114. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) do composto 20	137
Figura 115. Mapa de contornos HSQC do composto 20 (400 e 100 MHz, CD_3OD).	137
Figura 116. Mapa de contornos HMBC do composto 20 (400 e 100 MHz, CD_3OD).	137
Figura 117. Espectro de IV de 20	138
Figura 118. Espectro de HRMS do composto 20	138
Figura 119. (Esquerda) Espectro de ECD e UV do composto 20 em MeOH. (Direita) Espectro de ECD e UV do composto 24 em MeOH.	139
Figura 120. Via biossintética proposta para as substâncias 18 e 19	139
Figura 121. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) do composto 21	140
Figura 122. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) do composto 21	141
Figura 123. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 22	141
Figura 124. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 22	141
Figura 125. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do composto 23	142
Figura 126. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 24	142
Figura 127. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 24	142
Figura 128. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 25	143
Figura 129. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 25	143
Figura 130. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 26	143
Figura 131. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 27	144
Figura 132. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 28	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de CI_{50} dos extratos AcOEt dos fungos endofíticos isolados de <i>P. planifolius</i> avaliados frente às linhagens de células tumorais.....	63
Tabela 2. Valores de CIM dos extratos AcOEt dos fungos endofíticos isolados de <i>P. planifolius</i> avaliados frente às linhagens de bactérias e leveduras.	64
Tabela 3. Massas dos extratos brutos obtidas em diferentes meios de cultivo de <i>P. sporulosa</i> fermentados em 900 mL de meio de cultivo líquidos e 270 g de meio de cultivo sólidos.	66
Tabela 4. Meios de cultivo utilizados no crescimento dos endófitos.	67
Tabela 5. Valores de CI_{50} dos extratos em diferentes meios de cultivos de <i>P. sporulosa</i> avaliados frente às linhagens de células tumorais.	68
Tabela 6. Valores de CIM dos extratos em diferentes meios de cultivos de <i>P. sporulosa</i> avaliados frente às linhagens de bactérias e leveduras.	68
Tabela 7. Distribuição das massas das frações após separação por permeação em gel e agrupamentos por CCD.....	71
Tabela 8. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) para 1-3	76
Tabela 9. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) para 4-6	76
Tabela 10. Avaliação da atividade antimicrobiana para as substâncias 1-6	81
Tabela 11. Valores de CI_{50} (μM) para as substâncias 1-6 contra linhagens de célula tumoral.....	81
Tabela 12. Esporulosaldeinas identificadas por LC-MS no extrato do endófito <i>P. sporulosa</i> cultivado em PDB.	83
Tabela 13. Distribuição das massas das frações após separação por permeação em gel e agrupamentos por CCD.	85
Tabela 14. Dados de RMN de ^1H (600 MHz), ^{13}C (150 MHz), HMBC e NOESY para a substância 7 (CD_3OD).....	88
Tabela 15. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) para 7-9	92
Tabela 16. Comparação dos dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) para o composto 10 com o descrito por Fujimoto <i>et al.</i> , 2003 (CD_3OD)	96
Tabela 17. Massas dos extratos brutos obtidos em diferentes meios de cultivo de <i>Cochliobolus eragrostidis</i>	99
Tabela 18. Valores de CI_{50} dos extratos em diferentes meios de cultivos de <i>C. eragrostidis</i> avaliados frente às linhagens de células tumorais.	99
Tabela 19. Valores de CIM dos extratos em diferentes meios de cultivos de <i>C. eragrostidis</i> avaliados frente às linhagens de bactérias e leveduras.	100
Tabela 20. Distribuição das massas das frações após fracionamento por CC do extrato PDB de <i>C. eragrostidis</i>	102
Tabela 21. Comparação dos dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) para os compostos 11-14 com o reportado na literatura	109
Tabela 22. Comparação dos dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) para os compostos 15-17 com reportados na literatura.....	110
Tabela 23. Valores de CI_{50} ($\mu g/mL$) para as substâncias 11-17 contra linhagens de célula tumoral.....	116
Tabela 24. Área dos picos cromatográficos dos metabólitos 18 e 20 nos extratos AcOEt com e sem modificador SAHA por HPLC-DAD.....	119
Tabela 25. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) para as substâncias 18-20	121
Tabela 26. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) para os derivados semi-sintéticos de 18 e 19	122

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
5-AZA	5-azacitidina
BPC	<i>Base peak chromatogram</i>
CBM	Concentração bactericida mínima
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CFM	Concentração fungicida mínima
Cl ₅₀	Concentração inibitório de metade do máximo
CID	<i>Collision-induced dissociation</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CMH	Caldo Müller-Hinton
CoA	Coenzima A
CPG	Cromatografia de permeação em gel
COSY	<i>Correlate spectroscopy</i>
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
dl	Dupleto largo
dt	Duplo tripleto
ddd	Duplo duplo dupleto
ddq	Duplo duplo quadrupeto
dddq	Duplo duplo duplo quadrupeto
DCM	Diclorometano
DEPTQ	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer including the detection of quaternary nuclei</i>
d.i.	Diâmetro interno
DMEM	<i>Dubellco Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMTs	DNA metiltransferases
DP	Desvio padrão
ECD	<i>Electronic circular dichroism</i>
EtOH	Etanol
EUA	Estados Unidos da América
FCFAr	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
FM	Fase móvel
HATs	Histona acetiltransferases
HDACs	Histona desacetilases
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlations</i>

HSQC	<i>Heteronuclear through singlet quantum coherence</i>
HPLC-DAD	<i>High performance liquid chromatography-diode array detector</i>
HRMS	<i>High resolution mass spectrometry</i>
IQAr	Instituto de Química de Araraquara
IT	<i>Ion-trap</i>
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
LC-MS	<i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i>
LC-ESI-TOF-MS	<i>Liquid chromatography-electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry</i>
LC-DAD-MS	<i>Liquid chromatography-diode array detector-mass spectrometry</i>
m	Multiplete
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MEM	<i>Minimum essential medium</i>
MeOH	Metanol
MHA	<i>Müller-Hinton Agar</i>
MOPS	Ácido 3-[N-morfino] propanossulfônico
MTT	Sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2- <i>H</i> -brometo de tetrazolium
NCI	<i>American National Cancer Institute</i>
NOESY	<i>Nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
PKs	<i>Polyketide synthases</i>
PBS	Tampão fosfato de sódio
PDA	<i>Potato dextrose agar</i>
PDB	<i>Potato dextrose broth</i>
PTFE	<i>Polytetrafluoroethylene</i>
q	Quadruplete
R _f	Fator de retenção
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RP18	<i>Reverse phase octadecylsilan</i>
SAHA	Ácido hidroxâmico suberoilânida
SAM	<i>S-adenosyl methionine</i>
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético
s	Simpleto
sl	Simpleto largo
SDA	Agar sabouraud dextrose
SDC	Caldo sabouraud dextrose
SPE	<i>Solid phase extraction</i>
TFA	Ácido trifluoracético

TLC	<i>Thin layer chromatography</i>
TTC	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
t	Tripleto
tl	Tripleto largo
t _r	Tempo de retenção
UFC	Unidade formadora de colônia
UFLC	<i>Ultra fast liquid chromatography</i>
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
v/v	Razão volume/volume
YM	<i>Yeast médium</i>
δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
[M + H] ⁺	Molécula protonada
[M - H] ⁻	Molécula desprotonada
[M + Na] ⁺	Molécula cationizada
[α] _D	Rotação óptica
1D	Monodimensional
2D	Bidimensional

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	27
1.1. Fungos Endofíticos	27
1.2. Crescente prospecção de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos	29
1.3. Espécie vegetal hospedeira: <i>Paepalanthus planifolius</i> (Eriocaulaceae).....	33
1.4. Fungo endofítico <i>Paraphaeosphaeria sporulosa</i>	34
1.5. Fungo endofítico <i>Cochliobolus eragrostidis</i>	36
1.6. Fungo endofítico <i>Aspergillus terreus</i>	38
1.7. Epigenética	38
2. OBJETIVOS.....	43
2.1. Objetivos Gerais.....	43
2.2. Objetivos Específicos	43
3. PARTE EXPERIMENTAL	44
3.1. Materiais, equipamentos, solventes e técnicas utilizadas.....	44
3.1.1. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC)	44
3.1.2. Cromatografia de permeação em gel (CPG).....	44
3.1.3. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	44
3.1.4. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	45
3.1.5. Espectrometria de Massas em Alta Resolução (EM)	45
3.1.6. Espectroscopia quiróptica.....	45
3.1.7. Solventes.....	46
3.1.8. Reagentes	46
3.1.9. Espectroscopia de absorção vibracional na região do infravermelho (IV)	46
3.1.10. Outros equipamentos	46
3.1.11. Procedimento geral de <i>clean-up</i>	47
3.1.12. Esterilização dos materiais e manipulação dos microrganismos .	47
3.2. Coleta e identificação das espécies vegetais	47
3.3. Isolamento das cepas fúngicas	48
3.4. Identificação dos fungos endofíticos	48
3.5. Procedimentos gerais para obtenção dos extratos brutos dos endófitos.....	48
3.5.1. Meios de cultivo líquidos (PDB, Czapek®, YM, Malte e Nutrient®)	48
3.5.2. Meios de cultivo sólidos (Milho e Arroz).....	49
3.6. Fracionamento dos extratos brutos de <i>P. sporulosa</i> em coluna de permeação em gel.....	50

3.7. Fracionamento dos extratos brutos de <i>C. eragrostidis</i> em coluna de fase reversa.....	51
3.8. Análise por HPLC-DAD dos extratos brutos obtidos de <i>Aspergillus terreus</i> com SAHA e sem modificador epigenético	51
3.9. Fracionamento dos extratos brutos de <i>A. terreus</i> em coluna de permeação em gel.....	51
3.10. Isolamento das substâncias 18-31 de <i>Aspergillus terreus</i>	52
3.11. Determinação da configuração absoluta para as substâncias 5, 18 e 19	53
3.11.1. Teoria e detalhes de cálculo.....	53
3.12. Preparação de derivados semi-sintéticos.....	54
3.12.1. Acetilação do metabolito 18	54
3.12.2. Metilação do metabólito 18	55
3.12.3. Acetilação do metabolito 19	55
3.13. Análises por LC-MS do extrato AcOEt quando <i>P. sporulosa</i> foi cultivado em PDB	55
3.14. Avaliação da atividade antimicrobiana	56
3.14.1. Avaliação da atividade antibacteriana	57
3.14.2. Avaliação da atividade antifúngica.....	58
3.15. Avaliação da atividade citotóxica para células tumorais.....	59
3.15.1. Ensaio de viabilidade celular de células tumorais LM3, LP07 e MCF-7	60
3.15.2. Ensaio de viabilidade celular de células tumorais T98G, U87MG e SKBR3	61
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1. Atividade citotóxica dos extratos AcOEt provenientes do meio de cultivo em PDB dos fungos endofíticos isolados de <i>P. planifolius</i>	62
4.2. Atividade antimicrobiana dos extratos dos fungos endofíticos isolados de <i>P. planifolius</i>	63
4.3. Identificação dos fungos endofíticos selecionados	65
4.4. Cultivo de <i>P. sporulosa</i> em diferentes meios de cultivo líquidos e sólidos, e avaliação da atividade biológica dos extratos	66
4.5. Registro dos <i>fingerprints</i> por HPLC-DAD dos extratos de <i>P. sporulosa</i> cultivado em PDB e Arroz.....	69
4.6. Fracionamento do extrato ACN proveniente do cultivo em Arroz de <i>P. sporulosa</i> e isolamento das substâncias	70
4.7. Elucidação estrutural das substâncias 1 a 6 (AMORIM <i>et al.</i> , 2019) ..	73
4.8. Avaliação da atividade biológica das substâncias 1-6	79
4.9. Análise por LC-MS do extrato AcOEt quando o endófito <i>P. sporulosa</i> foi cultivado em PDB e direcionamento para isolamento de compostos nitrogenados.....	82

4.10.	Fracionamento do extrato AcOEt proveniente do meio de cultivo em PDB e isolamento das substâncias	84
4.11.	Elucidação estrutural das substâncias 7-9	86
4.12.	Identificação da substância 10	95
4.13.	Cultivo de <i>Cochliobolus eragrostidis</i> em diferentes meios de cultivo líquidos e sólidos, e avaliação da atividade biológica dos extratos	98
4.14.	Registro dos <i>fingerprints</i> por HPLC-DAD dos extratos PDB e Malte do endófito <i>C. eragrostidis</i>	100
4.15.	Fracionamento do extrato proveniente do meio de cultivo em PDB de <i>C. eragrostidis</i> e isolamento das substâncias	102
4.16.	Identificação estrutural das substâncias 11-17	102
4.17.	Avaliação da atividade citotóxica das substâncias 11-17	116
4.19.	Elucidação estrutural das substâncias 18-20	120
4.20.	Identificação das substâncias 21-28	140
5.	CONCLUSÕES	145
6.	REFERÊNCIAS	147

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fungos Endofíticos

Os microrganismos como bactérias, fungos e vírus têm fascinado pesquisadores por séculos devido às correlações destes microrganismos com a saúde humana, animal e vegetal, não apenas prejudicialmente, mas também relacionado à produção de diversos compostos bioquímicos importantes como corantes, vitaminas e antibióticos (IOCA; ALLARD; BERLINCK, 2014). Os microrganismos têm fornecido compostos que curaram ou reduziram o efeito de doenças humanas por mais de 70 anos. Os produtos microbianos incluem antibióticos contra bactérias e fungos, drogas antitumorais, imunossuppressores, inibidores de enzimas, incluindo hipocolesterolêmicos, agentes antiparasitários, bioherbicidas, reguladores de crescimento de plantas, biopesticidas e bioinseticidas. Outras atividades que utilizam produtos naturais em uso ou em estudo incluem tratamentos para doenças virais, acne, malária, diabetes, obesidade, úlceras gástricas, doença por sobrecarga de ferro (hemocromatose) e sobrecarga de alumina em pacientes em diálise renal (DEMAIN, 2014).

Dentre os microrganismos, os fungos apresentam uma grande relevância na produção de substâncias ativas com aproximadamente 42% dos compostos produzidos por eles, sendo que cerca de 20% dos antibióticos são produzidos por fungos filamentosos (DEMAIN, 2014). Muitos dos produtos ativos podem ser semi-sintéticos provenientes de derivatizações dos produtos naturais através de reações químicas ou bioconversões (DEMAIN, 2014).

Os fungos endofíticos pertencem a um grupo diversificado de fungos ascomicetos definidos por sua ocorrência assintomática dentro dos tecidos das plantas; ocorrem em todas as grandes linhagens de plantas terrestres, nas comunidades naturais e antrópicas que vão desde o ártico aos trópicos (ARNOLD, 2007). Os endófitos colonizam os tecidos internos de plantas, os espaços intercelulares assim como as células do xilema e floema, sem causar efeitos patogênicos aparentes à planta hospedeira (HALLMANN *et al.*, 1997; REKHA; BALA; ARYA, 2013).

A primeira definição do termo “endófitos” foi introduzida em 1866 por Anton De Bary e durante os últimos 30 anos os termos “endófito” e “fungos endofíticos” têm sido citados frequentemente para descrever a microbiota interna

de plantas. Kusari em 2012 definiu fungos endofíticos como um grupo polifilético de microrganismos que podem prosperar assintomaticamente nos tecidos de plantas acima do solo, assim como abaixo do solo, incluindo caules, folhas e/ou raízes. (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012; NISA *et al.*, 2015; SAIKKONEN *et al.*, 2004; STROBEL, 2014).

Embora a primeira descoberta de um endófito tenha sido realizada em 1904, esse grupo de microrganismos não recebeu muita atenção até a recente realização de sua relevância ecológica e o potencial de produzir metabólitos secundários com diversas novas estruturas e interessantes funções biológicas (GUNATILAKA, 2006). Isto mudou dramaticamente após a detecção do composto paclitaxel produzido por *Taxomyces andreanae*, fungo endofítico isolado da planta *Taxus brevifolia*, esta última sendo a fonte original desta importante droga anticâncer (NISA *et al.*, 2015).

Estima-se que mais de um milhão de espécies de fungos endofíticos existam na natureza pois tem-se o conhecimento em torno de 300 mil espécies de plantas superiores, e considera-se que no mínimo um ou mais fungos endofíticos esteja presente para cada planta hospedeira (JIA *et al.*, 2016; STROBEL, 2014). Em 2012, estimativas de 3 milhões de espécies fungicas apontam para um nível muito impressionante da biodiversidade de fungos, entretanto, aproximadamente 80000 – 100000 espécies fungicas estão descritas apenas, ou seja, existe uma diversidade inimaginável de linhagens de fungos a serem descobertas, descritas e bioprospectadas (IOCA; ALLARD; BERLINCK, 2014).

De acordo com Schulz e Boyle os fungos endofíticos foram classificados em três grupos ecológicos principais: (a) micorrizal; (b) fungos endofíticos de pastagem; e (c) fungos endofíticos de não pastagem (JIA *et al.*, 2016; SCHULZ; BOYLE, 2005).

Uma vez dentro dos tecidos de uma planta hospedeira, existem três diferentes relações estabelecidas entre os fungos endofíticos e a planta hospedeira reconhecidas como: (i) mutualismo, (ii) antagonismo e (iii) neutralismo. Os fungos podem atingir um estado de repouso latente durante toda a vida útil da planta hospedeira (neutralismo), ou por um longo período de tempo (mutualismo ou antagonismo) até que as condições ambientais sejam favoráveis ao fungo endofítico ou o estado ontogenético do hospedeiro mude para a

vantagem dos fungos. Na associação de mutualismo, ambos são beneficiados, sendo que o endófito produz metabólitos secundários bioativos auxiliando na defesa da planta contra patógenos, seja por inibição de enzimas ou por compostos de sinalização, enquanto que a planta hospedeira fornece nutrientes ao endófito; já nas relações antagonistas ocorre um equilíbrio entre a virulência do fungo endofítico e as respostas de defesa da planta (BAE *et al.*, 2009; KUSARI *et al.*, 2015; SIEBER, 2007).

A distribuição e a estrutura populacional dos endófitos podem ser consideravelmente afetadas por fatores como históricos genéticos, idade e condições ambientais de seus hospedeiros (JIA *et al.*, 2016). Por outro lado, os fungos endofíticos também podem conferir impactos profundos nas plantas hospedeiras, melhorando seu crescimento, fortalecendo suas tolerâncias a estresses abióticos e bióticos, e promovendo o acúmulo de metabólitos secundários (JIA *et al.*, 2016). Todas as mudanças são muito importantes para a produção de compostos bioativos em seus hospedeiros. Portanto, a interação mútua entre os fungos endofíticos e suas plantas hospedeiras impõem certos efeitos na formulação de alguns tipos de compostos bioativos que podem ser utilizados pelo ser humano (JIA *et al.*, 2016).

1.2. Crescente prospecção de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos

Os fungos endofíticos são considerados uma rica fonte de metabólitos secundários que atuam como agentes ativos em plantas superiores sendo que os metabólitos podem atuar como inibidores de crescimento de patógenos da planta (SUDHA *et al.*, 2016). Adicionalmente, os endófitos têm despertado muito interesse devido à aplicação de compostos produzidos por estes em diversas áreas importantes da sociedade, como na agricultura (crescimento da planta ou inseticida), indústria farmacêutica (antibióticos), indústria alimentícia (vitaminas), bem como utilizados em fitorremediação, processos fermentativos e biotransformação (IOCA; ALLARD; BERLINCK, 2014; SUDHA *et al.*, 2016).

Um levantamento realizado utilizando o banco de dados do SciFinder mostra o crescimento nas publicações envolvendo estudos de metabólitos secundários produzidos por endófitos nos últimos 18 anos (Figura 1) (www.scifinder.cas.org; acessado em 17 de setembro de 2019).

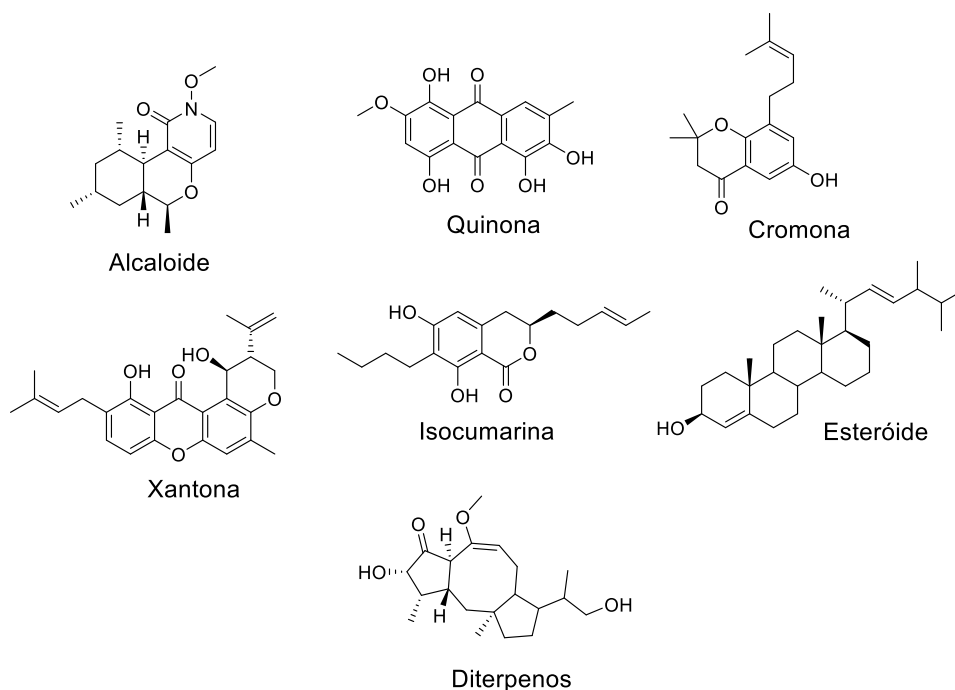
Figura 1. Número de publicações envolvendo metabólitos secundários de fungos endofíticos entre 1993 a 2018.



Fonte: Banco de dados SciFinder, utilizando como busca a exigência dos conceitos “secondary metabolites” e “endophytic fungi” simultaneamente.

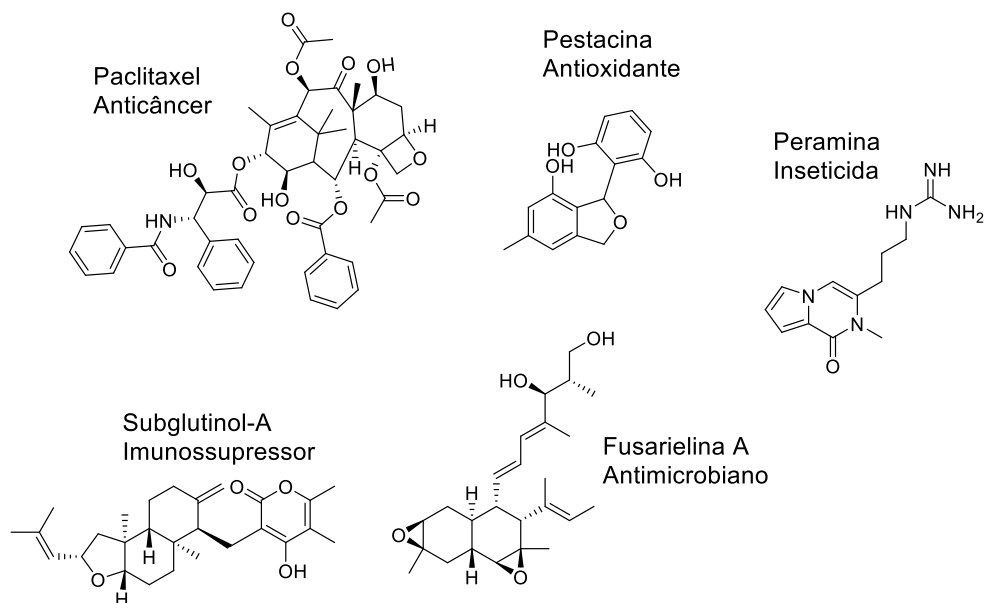
O aumento de publicações direcionadas a esse tema pode ser atribuído à alta capacidade na produção de metabólitos bioativos pelos endófitos. Estes compostos podem ser agrupados em várias classes, incluindo alcaloides, esteróides, cromonas, diterpenos, isocumarinas, quinonas, lignanas, citocalasinas, dicetopiperazinas, xantonas, entre outros (Figura 2). A diversidade de estruturas produzidas pelos endófitos pode levar a compostos com propriedades anticâncer, antioxidante, imunossupressor, inseticida, antimicrobiana, entre outras (Figura 3). Essa imensa diversidade química estrutural e biológica tornam os fungos endofíticos o alvo nas pesquisas pela busca de substâncias com potencial para a utilização na indústria farmacêutica e agrícola (KAMEL *et al.*, 2019; KAUL *et al.*, 2012; KHARWAR *et al.*, 2011; QIAO *et al.*, 2019; ZHANG; SONG; TAN, 2006).

Figura 2. Diversidade estrutural dos metabólitos isolados de fungos endofíticos.



Fonte: Adaptado de ZHANG *et al.*, 2006; KHARWAR *et al.*, 2011; QIAO *et al.*, 2019; KAMEL *et al.*, 2019.

Figura 3. Estruturas de diferentes compostos bioativos isolados de fungos endofíticos com atividades biológicas.

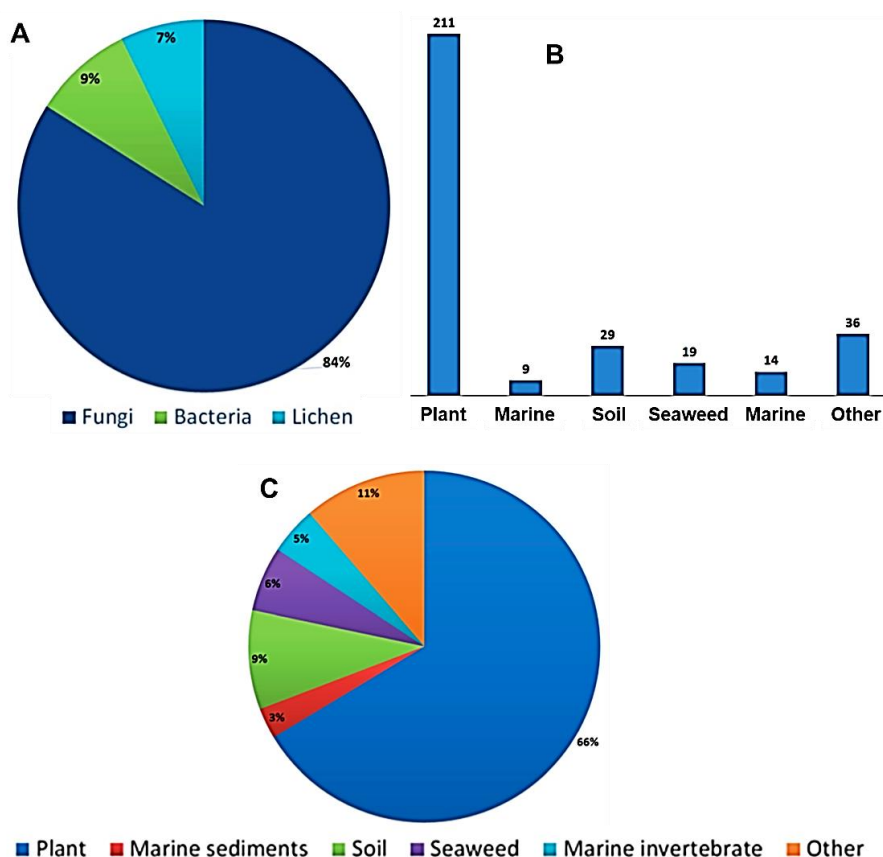


Fonte: Adaptado de KAUL *et al.*, 2012.

O Brasil é considerado um dos países com uma das maiores biodiversidades do mundo, e mesmo assim, somente em 1985 é que houve a primeira descrição importante das espécies de fungos no Brasil (IOCA; ALLARD; BERLINCK, 2014).

Em 2000, a jovem ciência brasileira descreveu o primeiro produto natural microbiano, denominado como *N*-acetil- γ -hidroxivalina lactona, de um estreptomiceto obtido a partir de sedimentos marinhos coletados no litoral norte do Estado de São Paulo (HERNANDEZ *et al.*, 2000). Um levantamento realizado por IOCA *et al.* (2014) mostra que dos 280 metabólitos secundários microbianos isolados de fontes naturais brasileiras 84% são isolados de fungos, havendo a predominância na obtenção de metabólitos a partir de microrganismos associados às plantas (Figura 4).

Figura 4. (A) Porcentagem de metabólitos secundários isolados de bactérias, líquens e fungos no Brasil. (B) O número total de compostos por fonte microbiana. (C) Fontes das quais as cepas microbianas que produziram os 280 compostos foram isoladas no Brasil.



Fonte: Adaptado de IOCA *et al.*, 2014.

Considerando a imensa flora e biodiversidade brasileira de microrganismos, e o crescente interesse em investigar metabólitos secundários microbianos, existe um grande interesse para a descoberta de metabólitos secundários bioativos a partir de fungos endofíticos associados às espécies vegetais do Brasil.

1.3. Espécie vegetal hospedeira: *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae)

Eriocaulaceae possui 1200 espécies divididas em 10 gêneros. Esta família é dividida em duas subfamílias, Eriocauloidae Ruhland e Paepalanthoideae Ruhland, sendo que a subfamília Eriocauloidae possui os gêneros *Eriocaulon* e *Mesanthemum*, enquanto que a subfamília Paepalanthoideae apresenta os gêneros *Blastocaulon*, *Comanthera*, *Actinocephalus*, *Lachnocaulon*, *Leiothrix*, *Paepalanthus*, *Philodice*, *Rondonanthus*, *Syngonanthus* e *Tonina* (ANDRADE *et al.*, 2011; GIULIETTI *et al.*, 2012; RUHLAND, 1903).

As Eriocaulaceae são citadas nas listas vermelhas de espécies em extinção. As espécies desta família de plantas são conhecidas popularmente como “sempre-vivas”, pois permanecem com aparência de vivas durante muitos anos, mesmo depois de retiradas do solo.

As Eriocaulaceae ocorrem em sua maioria em regiões pantropicais e se destacam como uma das famílias mais representativas dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço (Minas Gerais, Goiás e Bahia), não só pela grande riqueza específica, mas também pelo elevado número de táxons endêmicos desta formação geológica (COSTA; TROVO; SANO, 2008).

O gênero *Paepalanthus* pertence à Eriocaulaceae, sendo um dos maiores e mais importantes da família com aproximadamente 357 espécies. A maior diversidade do gênero encontra-se na Cadeia do Espinhaço, sendo que aproximadamente 95% são endêmicas do Brasil (FORZZA *et al.*, 2010).

Da espécie vegetal *Paepalanthus planifolius* (Figura 5) várias substâncias já foram isoladas como naftopiranonas e flavonóides (AMORIM *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2001). As naftopiranonas são substâncias com comprovadas atividades biológicas como antimicrobiana, antioxidante e mutagênica (AMARAL *et al.*, 2012; AMORIM *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2007; ZANUTTO *et al.*, 2013).

Figura 5. Espécie vegetal *Paepalanthus planifolius*.



Fonte: Foto fornecida pelo Prof. Dr. Marcelo Trovó (AMORIM *et al.*, 2016)

Estudos de fungos endofíticos associados à *P. planifolius* permitiram a identificação de substâncias pertencentes à classe dos fenólicos acetilênicos que apresentam boa atividade antimicrobiana, assim como a identificação de novos compostos derivados de cromanonas e alcalóides (AMORIM *et al.*, 2016; HILARIO *et al.*, 2017). Estes resultados impulsionam a continuidade dos estudos de fungos endofíticos associados à *P. planifolius* em busca de novos compostos bioativos.

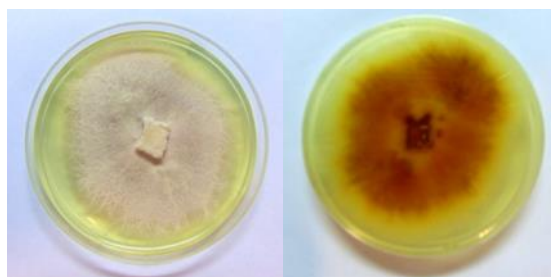
1.4. Fungo endofítico *Paraphaeosphaeria sporulosa*

O fungo endofítico *Paraphaeosphaeria sporulosa* (Figura 6) foi descrito na literatura pela primeira vez em 1969 com o nome de *Coniothyrium fuckelii* var. *sporulosum*. Em 1977 e 2004 foi reclassificado como, respectivamente, *Coniothyrium sporulosum* e *Paraconiothyrium sporulosum* (VERKLEY *et al.*, 2014). Este fungo pertence à família Montagnulaceae, que é constituída por 40 espécies listadas em *Index Fungorum* (www.indexfungorum.org; acessado em 21 de outubro de 2019).

Na literatura existem poucos trabalhos referentes a metabólitos secundários para o gênero *Paraphaeosphaeria* e suas atividades biológicas. Em trabalhos recentes, Shao e colaboradores identificaram o ácido lunatóico C (Figura 7) com atividades antifúngica, antibacteriana e fitotóxica (SHAO *et al.*, 2016). Podemos destacar também outros metabólitos descritos desse gênero como a substância paraphaeosphaeride C com citotoxicidade para A2780 (carcinoma de ovário) e potencial inibição da atividade de STAT3 em células

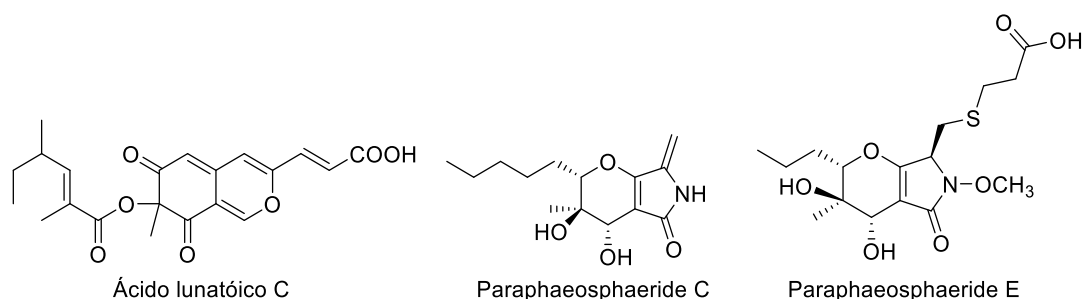
tumorais. Adicionalmente, a substância paraphaeosphaeride E com atividade inibitória de NF- κ B, um complexo proteico relacionado à expressão de genes pró-inflamatórios (Figura 7) (LI *et al.*, 2017, 2015).

Figura 6. Colônia de *Paraphaeosphaeria sporulosa* F03 em placas de PDA (esquerda), também mostrando o lado reverso (direita).



Fonte: Autor.

Figura 7. Metabólitos bioativos identificados no gênero *Paraphaeosphaeria*.

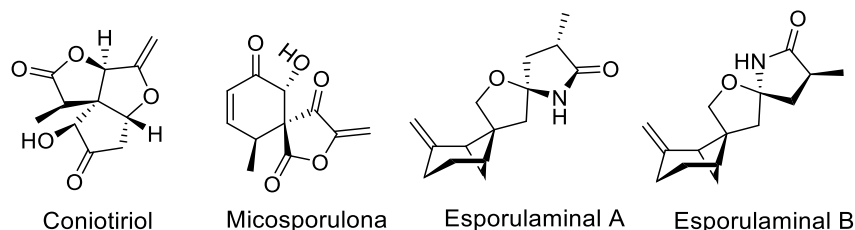


Fonte: Adaptado de SHAO *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2017.

O estudo químico para *P. sporulosa* apresenta poucos dados na literatura, sendo o primeiro relato de metabólitos secundários produzidos pela espécie estudada foi em 1993 com o isolamento da coniotiriol (Figura 8) (GUSMÃO; KAOUADJI; STEIMAN, 1993a). Neste mesmo ano, o composto micosporulona (Figura 8) foi descoberto e apresentou atividade contra uma ampla diversidade de microrganismos patógenos, e citotoxicidade para linhagens de células tumorais humanas de mama e pulmão, MDA-MB 231 e PC₃, abaixo de 4 μ g/mL (GUIRAUD *et al.*, 1999; GUSMÃO; STEIMAN; SEIGLE-MURANDI, 1993b). Estudos recentes conduziram à descoberta de uma nova classe de derivados de espiroamina originado a partir do sesquiterpenóide bergamotano nomeados

esporulaminal A e esporulaminal B, um par de epímeros ilustrados na Figura 8 (ZHANG *et al.*, 2016b).

Figura 8. Metabólitos secundários identificados na espécie *P. sporulosa*.



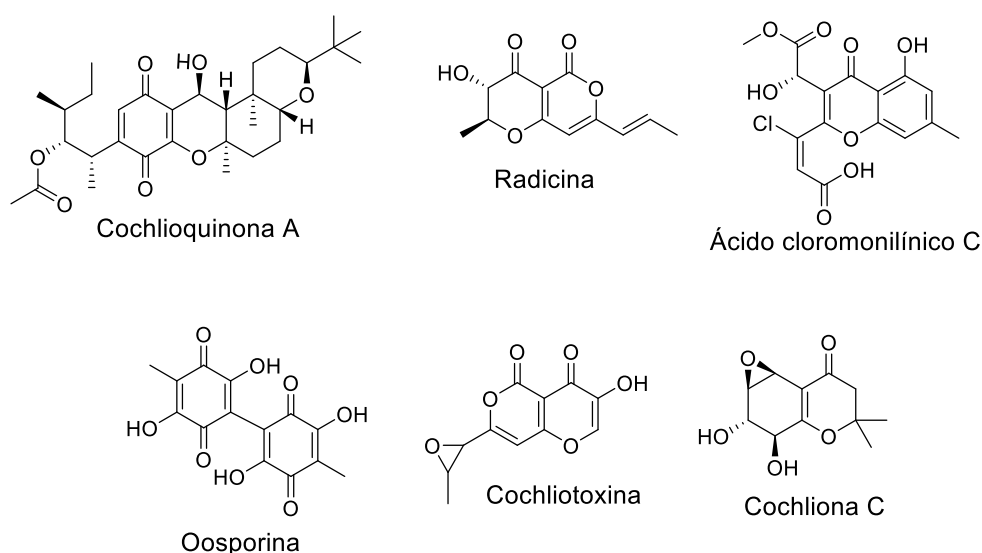
Fonte: Adaptado de GUSMÃO *et al.*, 1993a; GUSMÃO *et al.*, 1993b; ZHANG *et al.*, 2016.

1.5. Fungo endofítico *Cochliobolus eragrostidis*

O gênero *Cochliobolus* Drechsler (1934) pertence à família Pleosporaceae constituído por 53 espécies listadas em *Index Fungorum* (www.indexfungorum.org; acessado em 21 de outubro de 2019). Este gênero apresenta anamorfismo com os gêneros *Bipolaris* Shoemaker (1959) e *Curvularia* Boedijn (1933), o que muitas vezes causa confusões com as mudanças de nome e o refinamento da taxonomia. As espécies de *Cochliobolus* são reportadas como patógenas para plantas de diversas famílias como Alliaceae, Anacardiaceae, Araceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, Rutaceae, Zingiberaceae e Poaceae (MANAMGODA *et al.*, 2011).

O gênero *Cochliobolus* é uma rica fonte na produção de metabólitos secundários bioativos com destaque para a identificação de quinonas (Figura 9) com potencial contra leishmaniose (CAMPOS *et al.*, 2008). Outros trabalhos observaram a produção da fitotoxinas como radicina, ácido cloromonilínico C, cochliotoxina, e derivados, que poderiam potencialmente ser usados como herbicidas numa estratégia integrada no controle de pragas, bem como o metabólito oosporeina com atividade antioxidante e antimicrobiana, e cochliona C com atividade citotóxica para células K562 (ALDRICH *et al.*, 2015; ALURAPPA *et al.*, 2014; MASI *et al.*, 2019, 2017a, 2017b; WANG *et al.*, 2010).

Figura 9. Metabólitos bioativos identificados no gênero *Cochliobolus*.



Fonte: Adaptado de CAMPOS *et al.*, 2008; ALDRICH *et al.*, 2015; MASI *et al.*, 2017a; MASI *et al.*, 2017b; MASI *et al.*, 2019; ALURAPPA *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2010.

A espécie *Cochliobolus eragrostidis* (Figura 10) está distribuída no mundo todo, sendo encontrada em uma ampla diversidade de famílias de plantas (MANAMGODA *et al.*, 2011). A espécie é caracterizada por apresentar seu ciclo de reprodução tanto teleomórfico (sexuada) e anamórfico (assexuada), sendo que no estado assexuado, esta apresenta-se como sinônimo anamórfico de *Curvularia eragrostidis* (MANAMGODA *et al.*, 2011). Em Eriocaulaceae esta espécie está sendo descrita pela primeira vez na literatura.

Figura 10. Colônia de *Cochliobolus eragrostidis* E02 em placas de PDA (esquerda), também mostrando o lado reverso (direita).

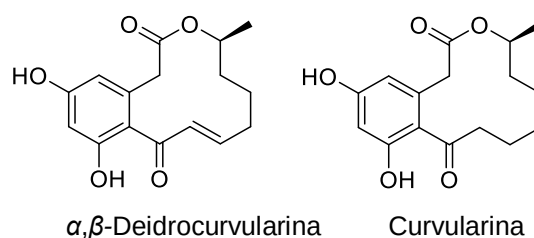


Fonte: Autor.

A partir do fungo endofítico *C. eragrostidis* houve o isolamento e a identificação do composto α,β -deidrocurvularina e seu análogo curvularina

(Figura 11), sendo que o primeiro é excretado das células e reduzido por enzimas extracelulares à curvularina. (HYEON; OZAKI, 1976; LIU; LI; VEDERAS, 1998). O composto α,β -deidrocurvularina apresenta atividade antimicrobiana e também forte fitotoxicidade para *Digitaria sanguinalis* sendo um potencial candidato para o controle de ervas daninhas desta espécie (BICALHO *et al.*, 2003; JIANG *et al.*, 2008).

Figura 11. Metabólitos secundários identificados na espécie *C. eragrostidis*.



Fonte: Adaptado de MUNRO *et al.*, 1967; HYEON *et al.*, 1976.

1.6. Fungo endofítico *Aspergillus terreus*

O gênero *Aspergillus* pertence à família Aspergillaceae constituído por 776 espécies listadas em *Index Fungorum* (www.indexfungorum.org; acessado em 21 de outubro de 2019). *Aspergillus terreus* é um fungo filamentoso pertencente à classe dos Ascomicetos e é comumente conhecido e utilizado na indústria farmacêutica desde a década de 1960 devido a produção de lovastatina, que é um inibidor ativo da síntese do colesterol (COSTA *et al.*, 2019). Além disso, este fungo é capaz de produzir metabólitos secundários bioativos promissores no campo da medicina e farmácia como terreína, devido a sua habilidade de inibir a biossíntese da melanina, reduzir inflamação, atividade antitumoral, dentre outras atividades (XIAO *et al.*, 2013). Outros estudos mostram que *A. terreus* quando cultivado com modificadores epigenéticos produzem novos metabólitos com potencial inibição de α -glucosidase (SUN *et al.*, 2019).

1.7. Epigenética

Fungos endofíticos são comumente cultivados em laboratórios utilizando técnicas tradicionais de fermentação com meios de cultivos definidos artificialmente. Assim, não se mimetiza o habitat nativo desses microrganismos

e eles frequentemente expressam apenas um subconjunto de genes biossintéticos relacionados a produção de metabólitos secundários, ou seja, outros clusters de genes podem permanecer silenciados (HERTWECK, 2009). Dentre as estratégias que são utilizadas para ativar os agrupamentos silenciosos de genes biossintéticos em fungos, destaca-se a incorporação de pequenas moléculas denominadas como modificadores epigenéticos em meios de cultura fúngicos para ativar as vias biossintéticas silenciosas ou alterar vias biossintéticas já ativas (CICHEWICZ, 2010; WILLIAMS *et al.*, 2008).

O termo epigenética foi definido em 1999 por Alan Wolffe como “mudanças hereditárias na expressão gênica que ocorrem sem mudanças no sequenciamento do DNA” (SUZUKI; MIYATA, 2006).

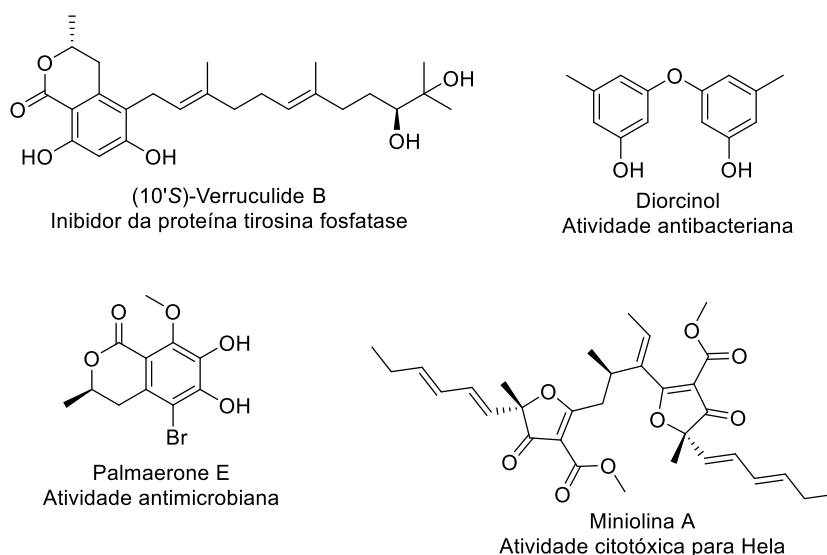
Moléculas pequenas tais como 5-azacitidina (5-AZA), ácido hidroxâmico suberoilânilida (SAHA) e curcumina são descritas como agentes modificadores epigenéticos devido à capacidade de mudar entre estruturas de cromatina ativa e silenciosa através de mecanismos diferentes, incluindo a inibição das enzimas histona desacetilase (HDAC), DNA metiltransferase (DNMT), além do controle de microRNA, sem alteração na sequência de bases nucleotídeas do DNA (MAFEZOLI *et al.*, 2018; REUTER *et al.*, 2011; XIAO *et al.*, 2013). A incorporação destes modificadores epigenéticos nos meios de cultura fúngicos tem demonstrado ser uma importante estratégia para a produção de metabólitos secundários novos e/ou bioativos (Figura 12) (GUBIANI *et al.*, 2017; GUO *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2019; SHARMA *et al.*, 2017; TANG *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2018). Gubiani e colaboradores (2017) observaram que na presença de modificador epigenético SAHA houve uma indução na produção de um inibidor da proteína tirosina fosfatase por *Phoma* sp. TANG *et al.* (2015) cultivaram *Penicillium minioluteum* na presença de 5-AZA resultando no isolamento de novas furanonas com moderada citotoxicidade contra Hela. Outros trabalhos interessantes foram o cultivo dos fungos *Przewalskia tangutica* e *Aspergillus versicolor* na presença de SAHA, resultando na produção de novas diidroisocumarinas halogenadas, e derivados de dicetopiperazina e difenileter, respectivamente, que apresentaram atividades antimicrobianas (LIU *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2018).

Existem três mecanismos principais de regulação epigenética: DNA metiltransferase, modificação de histonas e ação de RNAs não-codificantes. Os

padrões de metilação do DNA são os mais estudados e melhor compreendidos entre esses mecanismos, embora modificações histônicas também sejam amplamente discutidas (FISCH *et al.*, 2009).

As modificações de cromatina mais comuns das histonas são as acetilação, metilação e fosforilação, que ocorrem nos resíduos *N*-terminais dos aminoácidos presentes nas histonas (CICHEWICZ, 2010; FISCH *et al.*, 2009).

Figura 12. Compostos isolados do cultivo de fungos com modificadores epigenéticos



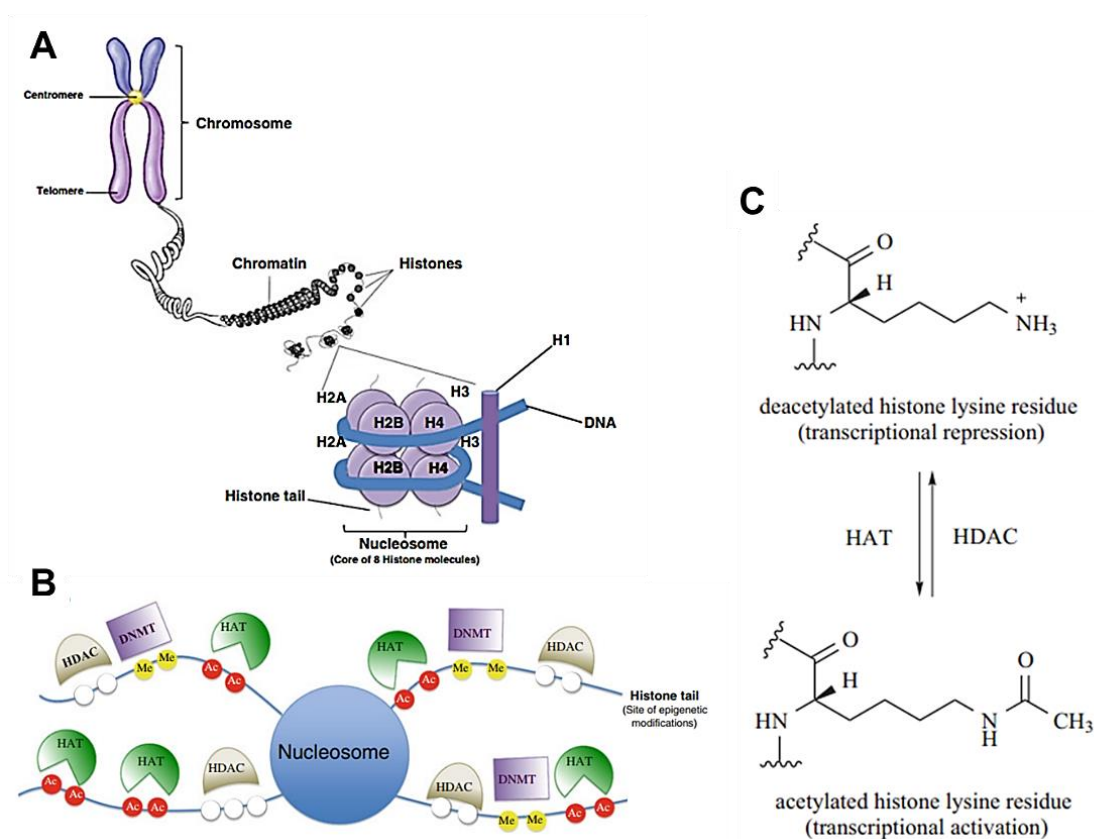
Fonte: Adaptado de GUBIANI *et al.*, 2017; TANG *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2019.

A unidade de repetição fundamental da cromatina é o nucleossomo. Um único núcleo nucleossômico é composto por um fragmento de DNA envolvido em torno de um octâmero de histona, formado por um tetrâmero H3-H4 e dois dímeros H2A-H2B. Cada núcleo nucleossômico sucessivo é separado por um ligante de DNA associado à uma única molécula de histona H1 (Figura 13a). Modificações de cromatina geralmente ocorrem nas caudas dos aminoácidos *N*-terminais das histonas (Figura 13b). Essas caudas de histonas são o local para uma ampla gama de modificações pós-traducionais, incluindo acetilação controlada por histona acetiltransferases (HATs), desacetilação controlada por histona desacetilases (HDACs) e metilação controlada por DNA metiltransferases (DNMTs) (REUTER *et al.*, 2011). A acetilação do resíduo de

lisina diminui a sua afinidade de ligação ao DNA, favorecendo a expressão gênica e a desacetilação favorece ao silenciamento de genes em fungos (CICHEWICZ, 2010).

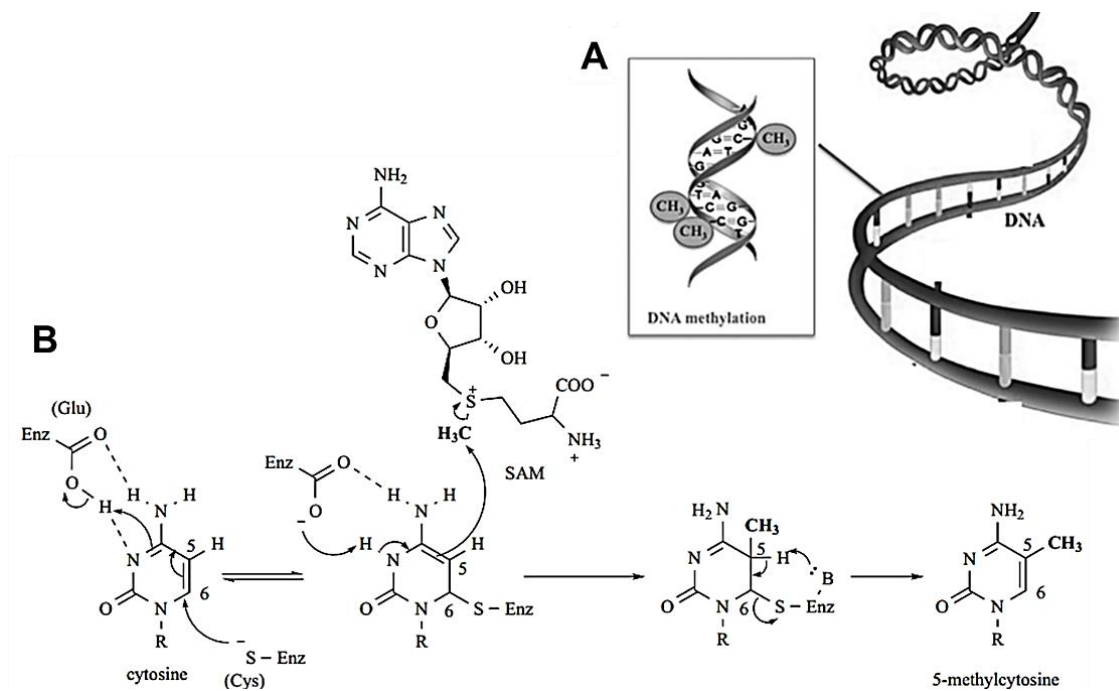
A metilação do DNA é uma modificação covalente do DNA que está claramente implicada em muitos mecanismos fisiológicos. A hiper ou hipometilação do DNA está associada ao silenciamento gênico transcricional e à ativação gênica, respectivamente. A metilação do DNA ocorre principalmente nas posições 5 do anel pirimidina dos resíduos de citosina através da adição do grupo metil para formar 5-metilcitosinas (Figura 14). Essa reação é catalisada por uma família de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs) (TEITEN; DICATO; DIEDERICH, 2013).

Figura 13. (A) O complexo nucleossômico. (B) Modificações de cromatina que geralmente ocorrem nas caudas das histonas. (C) Acetilação reversível dos resíduos de lisina das histonas.



Fonte: REUTER *et al.*, 2011; SUSUKI *et al.*, 2006.

Figura 14. (A) Metilação da citosina do DNA. (B) Proposta de mecanismo catalítico para metilação da citosina por DNMTs.



Fonte: Adaptado de TEITEN *et al.*, 2013; SUSUKI *et al.*, 2006.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Os objetivos deste trabalho foram o estudo químico bioguiado dos extratos brutos, que apresentaram potencial biológico, produzidos a partir dos fungos endofíticos *Paraphaeosphaeria sporulosa* e *Cochliobolus eragrostidis*, isolados de *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae), em meios de cultura líquidos e sólidos, além de avaliar a diversidade metabólica do fungo endofítico *Aspergillus terreus*, isolado de *Astragalus lentiginosus*, sob influência de moduladores epigenéticos.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Realizar a triagem antimicrobiana e antitumoral dos extratos obtidos em escala reduzida em meio líquido PDB dos fungos endofíticos isolados das partes aéreas de *P. planifolius* durante o Mestrado;
- ✓ Selecionar e identificar os fungos endofíticos com melhores atividades antimicrobiana e antitumoral;
- ✓ Realizar o cultivo em escala reduzida dos endófitos selecionados em diferentes meios de cultivo líquidos (PDB, Czapek®, YM, Malte e Nutrient®) e sólidos (arroz e milho);
- ✓ Realizar os ensaios antimicrobiano e antitumoral dos extratos produzidos em meios de cultivo sólidos e líquidos em escala reduzida dos endófitos selecionados;
- ✓ Selecionar os extratos de cada endófito que apresentaram melhores atividades para crescimento em escala ampliada;
- ✓ Realizar o *fingerprint* por HPLC-DAD dos extratos selecionados para fracionamento e isolamento dos metabólitos secundários;
- ✓ Elucidar e/ou identificar as estruturas das substâncias isoladas por técnicas espectrométricas e espectroscópicas;
- ✓ Avaliar a atividade biológica das substâncias isoladas;
- ✓ Avaliar a influência de moduladores epigenéticos na produção de metabólitos secundários do fungo endofítico *Aspergillus terreus*;
- ✓ Realizar o isolamento e determinação estrutural dos metabólitos secundários produzidos por *Aspergillus terreus*.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiais, equipamentos, solventes e técnicas utilizadas

3.1.1. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Para análises do perfil químico, otimização e isolamento por HPLC-DAD foram utilizados os equipamentos:

- Jasco PU-2089 acoplado a um detector de arranjo de foto diodos, modelo MD-2018 (Jasco®), contendo um injetor automático modelo AS-2055 (Jasco®) usando uma coluna de fase reversa RP18, modelo Luna (Phenomenex®) ou modelo Hypersil GOLD aQ (Thermo®), ambas de 250 × 4,6 mm d.i, com partículas de tamanho médio de 5 µm e com coluna de guarda de fase reversa RP18 (Phenomenex®) de 4 × 3 mm.

- Hitachi (bomba L-6200A, detector de matriz de diodos L-4500, interface P-6000 e amostrador automático AS-4000) usando uma coluna de fase reversa (Supelco, Kromasil®, 150 mm × 4,6 mm, 5 µm) com coluna de guarda de fase reversa RP18 (Phenomenex®) de 4 × 3 mm.

- Jasco PU-2086 acoplado a um detector de arranjo de foto diodos, modelo MD-2010 (Jasco®), usando uma coluna RP18 (Luna, Phenomenex®, 250,0 mm × 10,0 mm, 5 µm), contendo um injetor com loop de 500 µL.

- Waters Delta Prep 4000 acoplado a um sistema detector DAD 996 e usando uma coluna RP18 (Supelco, Kromasil®, 250,0 mm × 10,0 mm, 5 µm), contendo um injetor com loop de 500 µL.

3.1.2. Cromatografia de permeação em gel (CPG)

Para o fracionamento dos extratos utilizou-se colunas de vidros (85 x 2,5 cm d.i.) contendo Sephadex® LH-20 (Pharmacia e Amersham Biosciences). Para inserir o solvente na coluna contendo a fase estacionária, utilizou-se uma bomba peristáltica modelo P1 18-1110-91 (Pharmacia). As frações foram recolhidas em um coletor automático Redifrac (Pharmacia).

3.1.3. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Foram utilizadas placas de camada delgada de gel de sílica em suporte de alumínio (Whatman®, Silica gel 60 F₂₅₄). As revelações foram obtidas por

irradiação de luz UV ($\lambda = 254$ e 366 nm, Chromato-Vue®) e nebulização com solução de anisaldeído/H₂SO₄ seguido de aquecimento.

3.1.4. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN unidimensional: ¹H, ¹³C, DEPTQ e NOESY-1D, e bidimensional: ¹H-¹H-COSY, HSQC, HMBC e NOESY-2D, foram realizadas em espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker Avance III™ HD 600 (14,1 Tesla) com sonda criogênica de 5 mm, com detecção inversa de três canais (¹H, ¹³C e ¹⁵N) e Bruker Avance III™ 400 (9,4 Tesla).

Os solventes utilizados na dissolução das amostras para obtenção dos espectros foram CDCl₃, CD₃OD, (CD₃)₂CO ou DMSO-*d*₆ (Cambridge Isotope Laboratories) com pureza $\geq 99,9\%$, usando como referência o sinal do resíduo do solvente não-deuterado. O software Top Spin versão 3.5 foi utilizado na aquisição dos deslocamentos químicos e interpretação de cada espectro.

3.1.5. Espectrometria de Massas em Alta Resolução (EM)

Os espectros de massas foram obtidos em:

- Espectrômetro de massas Bruker Q-TOF MaXis Impact;
- Espectrômetro de massas Agilent G6224A TOF;
- Espectrômetro de massas Waters Xevo TQ-S;

As substâncias isoladas foram solubilizadas em MeOH:H₂O (1:1, v/v) na concentração de 3 ppm e analisadas por inserção direta no modo de ionização positivo ou negativo por electrospray (ESI).

3.1.6. Espectroscopia quiróptica

As análises de rotação óptica das substâncias isoladas foram realizadas em um Polarímetro PerkinElmer modelo 341-LC e também em um Polarímetro Jasco® modelo Dip-370, ambos com lâmpada de sódio operando a 589 nm e cela de 1,0 dm de comprimento.

As análises de dicroísmo circular eletrônico foram realizadas em dois espectropolarímetros, Jasco® J-815 e Jasco® J-810, ambos usando uma cela de quartzo com comprimento do caminho óptico de 1,0 mm. Adicionalmente, foi utilizado também um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Jasco®) com bomba de quatro canais (modelo PU-2089) e injetor automático (modelo AS-2055),

acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (modelo MD-2010), e a um detector de dicroísmo circular (modelo CD-2095), sendo utilizado a coluna analítica (Diacel®), de sílica encapada com celulose ligada a 3,5-dimetilfenilcarbamato (250 x 4,6 mm, 5 µm) e pré-coluna (10 x 4,6 mm, 5 µm), modelo Chiralcel OD-RH (fase reversa).

3.1.7. Solventes

Como fase móvel em HPLC-DAD, assim como na preparação das amostras, foram utilizados ACN, MeOH e TFA (Tedia Company, Inc.), todos de grau HPLC, e água Milli-Q (Millipore®). Os demais solventes utilizados são todos de grau PA.

3.1.8. Reagentes

Os modificadores epigenéticos como SAHA, 5-AZA e curcumina foram adquiridos da Cayman Chemical, Alfa Aesar e Santa Cruz Biotechnology, respectivamente.

3.1.9. Espectroscopia de absorção vibracional na região do infravermelho (IV)

Os espectros no IV foram obtidos no espectrômetro Shimadzu FTIR sob as seguintes condições: porcentagem de transmitância (%T), com resolução de 1 cm⁻¹, na faixa de absorção de 4000-400 cm⁻¹, utilizando pastilhas de KBr.

3.1.10. Outros equipamentos

- Evaporadores rotativos (Heidolph e Buchi);
- Balanças analíticas (Sartorius e Shimadzu);
- Vortex (VWR Scientific Products);
- Linha de vácuo (VWR Scientific Products);
- Incubadora rotatória (*Shaker*) (New Brunswick Scientific);
- Espectrofotômetro (Shimadzu).

3.1.11. Procedimento geral de clean-up

Os extratos e frações foram submetidos a *clean-up* em cartucho de SPE-C18 (Agilent®) na proporção de 1:10 m/m de extrato em relação à fase estacionária antes das análises por HPLC-DAD. O cartucho foi previamente ativado com MeOH (4 mL) e depois ambientado na mesma condição na qual a amostra foi solubilizada, e o material foi eluído.

3.1.12. Esterilização dos materiais e manipulação dos microrganismos

A esterilização dos materiais utilizados na manipulação dos microrganismos e os meios de culturas preparados foi realizada em autoclaves dos fabricantes Quimis® e Market Forge Industries Inc, sendo mantidos a temperatura de 121 °C por 20 minutos. Quando aplicável, os materiais foram flambados ou submetidos à radiação UV.

A manipulação dos microrganismos foi realizada em capela de fluxo laminar Pachame® PA 310-Série 172-99 e SterilGARD® Advance.

3.1.13. Meios de cultivo

Para cultivo dos microrganismos foram utilizados os meios PDA (Acumedia®), PDB (Acumedia®), Malte (Acumedia®), Nutrient® (Acumedia®), YM (Acumedia®), Czapek®-Dox Broth (Kasir®), Arroz parboilizado (Tio João®) e Milho tipo canjica (Yoki®).

3.2. Coleta e identificação das espécies vegetais

A espécie vegetal *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae) foi coletada na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil (19°13'21.64" S, 43°30'04.06" W), em outubro de 2013 e identificada pelo Prof. Dr. Paulo Takeo Sano. O *voucher* (Sano 4979) foi depositado no Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo-SP, Brasil. O cadastro desta espécie no SISGEN é A358964.

A espécie vegetal *Astragalus lentiginosus* foi coletada de um indivíduo adulto localizado nas rodovias ao redor de Tucson, Arizona, EUA.

3.3. Isolamento das cepas fúngicas

Durante o Mestrado, as linhagens fúngicas isoladas de *Paepalanthus planifolius* (*P. sporulosa* e *C. eragrostidis*) foram realizadas por Marcelo R. Amorim e pela Dr^a. Andressa Somensi, e estão depositadas na micoteca do NuBBE no Departamento de Química Orgânica, IQAr. Os endófitos *P. sporulosa* e *C. eragrostidis* foram codificados como Pp-F-03 e Pp-E-02, respectivamente.

A linhagem de *A. terreus* foi isolada pela Prof^a. Dr^a. A. Elizabeth Arnold da Universidade do Arizona e está depositada no Herbário Micológico Robert L. Gilbertson da Universidade do Arizona (EUA) codificada como AST0006.

3.4. Identificação dos fungos endofíticos

A identificação das cepas fúngicas isoladas de *Paepalanthus planifolius* selecionadas foi realizada pela empresa BPI (Biotecnologia Pesquisa e Inovação), Genotyping Biotecnologia, localizada em Botucatu-SP, Brasil. O procedimento foi realizado a partir do sequenciamento automático por eletroforese capilar no equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®) e alinhamento das sequências de nucleotídeos produzidas com as sequências de referência depositadas no GenBankSanger (MicroID™).

O endófito isolado de *Astragalus lentiginosus* e codificado como AST0006 foi classificado pela Prof^a. Dr^a. A. Elizabeth Arnold da Universidade do Arizona, Tucson, EUA, como *Aspergillus terreus*.

3.5. Procedimentos gerais para obtenção dos extratos brutos dos endófitos

3.5.1. Meios de cultivo líquidos (PDB, Czapek, YM, Malte e Nutrient®)

Os endófitos isolados das partes aéreas de *P. planifolius*, anteriormente isolados e preservados em *slants* durante o meu Mestrado, foram reativados em placas de Petri contendo PDA e incubados por 10 dias a 25 °C para crescimento na placa.

Antes da inoculação dos endófitos nos meios de cultivo líquidos, estes são autoclavados um dia antes a 121 °C por 20 minutos. Em seguida, aproximadamente um terço do micélio de cada cultura isolada na placa foi inoculada em Erlenmeyers de 500 mL com a presença de 300,0 mL de seus

respectivos meios de cultivo líquidos (PDB, Czapek®, YM, Malte e Nutrient®) durante 28 dias a 25 °C em modo estático. Após esse período, o meio líquido aquoso foi separado dos micélios por filtração à vácuo e submetido à partição líquido/líquido com AcOEt. Em seguida a fase orgânica AcOEt foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo a uma temperatura de 34 °C obtendo-se os extratos brutos AcOEt, sendo estes extratos transferidos para um vidro tarado e deixados na capela até completa eliminação do solvente.

O endófito *Aspergillus terreus*, isolado de *Astragalus lentiginosus*, foi cultivado em PDA por 2 semanas a 23 °C. Os micélios foram raspados, misturados com água estéril, filtrados através de um filtro de células de 100 µm para separar os esporos dos micélios e a solução de esporos foi colocada em tubos Falcon. A absorvância da solução de esporos foi medida a 600 nm e ajustada a 1,0 com água estéril. Esta solução de esporos foi usada para inocular meio de crescimento líquido (10,0 mL de solução de esporos em frascos de Erlenmeyer de 2 L, cada um contendo 1,0 L do meio) consistindo em PDB, PDB + 500 µM SAHA, PDB + 500 µM 5-AZA e PDB + 500 µM curcumina, e incubados a 160 rpm e 28 °C. O nível de glicose no meio foi monitorado usando tiras de glicose (Uriscan) e no dia 8 a tira tornou-se azul para o teste de glicose, indicando a ausência de glicose no meio. No final do período de incubação, as culturas foram filtradas e o filtrado foi particionado com acetato de etila (4 × 1,0 L). As frações de acetato de etila foram lavadas com água (300 mL) e secas usando um evaporador rotativo obtendo os extratos brutos.

3.5.2. Meios de cultivo sólidos (Milho e Arroz)

Os endófitos foram retirados dos *slants* e repicados em placas de Petri contendo PDA e incubados por 10 dias a 25 °C para crescimento na placa. Os meios de cultivo sólidos (milho e arroz) foram autoclavados a 121 °C por 20 minutos por 3 dias consecutivos antes da inoculação dos endófitos. Em seguida, aproximadamente um terço do micélio de cada cultura isolada na placa foi inoculada em Erlenmeyers de 500 mL com a presença de 90,0 g de meio sólido (arroz ou milho) com 75,0 mL de água Milli-Q durante 21 dias a 25 °C em modo estático. Após esse período, foi realizada uma extração por maceração com AcOEt a cada 12 horas durante cinco dias, com posterior filtração e concentração da fração em evaporador rotativo a uma temperatura de 34 °C. Posteriormente,

esta fração foi submetida à partição líquido-líquido com água para remoção de compostos muito polares como açúcares, e a fração AcOEt resultante foi totalmente seca e solubilizada em ACN, a qual foi submetida à partição líquido-líquido com hexano afim de remover compostos muito apolares como graxas oriundas do milho ou arroz. A fase hexânica foi guardada e a fase ACN teve o solvente eliminado, fornecendo o extrato bruto ACN para estudo químico.

3.6. Fracionamento dos extratos brutos de *P. sporulosa* em coluna de permeação em gel

O extrato proveniente do meio de cultivo PDB do endófito *P. sporulosa* (1,05 g) foi solubilizado em MeOH (15,0 mL) utilizando-se banho ultra-som por 5 minutos, em seguida centrifugado por 10 minutos, e o precipitado separado (23 mg). A amostra foi cromatografada em coluna de permeação em gel (85 × 2,5 cm d.i.) contendo Sephadex® LH-20 como fase estacionária e eluída com MeOH.

As frações com aproximadamente 10 mL foram coletadas em coletor automático obtendo-se 196 frações. Estas frações foram reunidas por CCD de fase normal utilizando AcOEt:CHCl₃, (1:1, v/v) como fase móvel e reveladas com luz UV, e por borrifamento com solução de anisaldeído/H₂SO₄ levando a placa posteriormente a uma estufa a 130 °C. De acordo com a coloração e o R_f dos constituintes resultou em 8 frações finais codificadas de J1-J8.

Para o extrato proveniente do meio de cultivo Arroz do endófito *P. sporulosa* (2,0 g) seguiu-se o mesmo procedimento acima e foi solubilizado em MeOH (20,0 mL) utilizando-se banho ultrassom por 5 minutos, em seguida centrifugado por 10 minutos, e o precipitado separado (127,4 mg). O sobrenadante foi cromatografado em coluna de permeação em gel (85 × 2,5 cm d.i.) contendo Sephadex® LH-20 como fase estacionária e eluída com MeOH.

As frações com aproximadamente 10 mL foram coletadas em coletor automático obtendo-se 107 frações. Estas frações foram reunidas por CCD de fase normal utilizando AcOEt:CHCl₃, (1:1, v/v) como fase móvel e reveladas com luz UV, e por borrifamento com solução de anisaldeído/H₂SO₄ levando a placa posteriormente a uma estufa a 130 °C. De acordo com a coloração e o R_f dos constituintes resultou em 5 frações finais codificadas de T1-T5.

3.7. Fracionamento dos extratos brutos de *C. eragrostidis* em coluna de fase reversa

Os extratos AcOEt provenientes do meio de cultivo em PDB e Malte de *C. eragrostidis* foram submetidos à cromatografia em coluna aberta utilizando colunas de vidro (60 × 2,5 cm d.i.) contendo 60 g de sílica gel C-18 (tamanho da partícula: 40-63 µm; Merck®) sob pressão.

Os extratos foram eluidos em gradiente escalonado de H₂O:MeOH (90:10, v/v), H₂O:MeOH (75:25, v/v), H₂O:MeOH (50:50, v/v), H₂O:MeOH (25:75, v/v), H₂O:MeOH (0:100, v/v) e 100 % AcOEt, sendo utilizado 300 mL de cada composição, resultando em 6 frações finais codificadas de M1-M6.

3.8. Análise por HPLC-DAD dos extratos brutos obtidos de *Aspergillus terreus* com SAHA e sem modificador epigenético

Uma pequena porção (5,0 mg) de cada extrato bruto foi dissolvida em MeOH (1,0 mL), centrifugada a 13200 rpm por 2 minutos e o sobrenadante resultante foi usado para análise por HPLC-DAD. A análise foi realizada por HPLC-DAD usando uma coluna RP18, MeOH: H₂O como fase móvel (MeOH: H₂O, eluição gradiente de 20:80 a 100: 0 em 60 min) a uma vazão de 1,0 mL/min e detecção por absorbância na região do UV a 254 nm. O volume de injeção dos extratos foi de 20 µL. Em pequena escala, os extratos de AcOEt de PDB + 250 µM de SAHA e PDB + 500 µM de SAHA exibiram perfis semelhantes de HPLC e foram agrupados.

3.9. Fracionamento dos extratos brutos de *A. terreus* em coluna de permeação em gel

Os extratos AcOEt obtidos de *A. terreus* cultivados em PDB + SAHA em pequena escala foram agrupados (1,04 g) e submetido à partição entre hexano e MeOH aquoso a 80%. A fração de MeOH aquoso a 80% foi diluída em MeOH aquoso a 50% por adição de água e depois extraída com CHCl₃. A evaporação da camada de CHCl₃ sob pressão reduzida produziu uma fração de CHCl₃ (393,6 mg) e esta fração foi cromatografada em uma coluna contendo Sephadex LH-20 (13,0 g) preparada em DCM:hexano (4:1) e eluída com DCM:hexano (4:1, 200 mL), DCM:acetona (3:2, 200 mL), DCM:acetona (1:4, 200 mL), DCM:MeOH (1:1, 200 mL) e finalmente com MeOH (200 mL). Um total de 78 frações foram

coletadas e combinadas com base em seus padrões por CCD resultando em 12 frações codificadas de A1-1 a A-12.

Em larga escala, o mesmo procedimento descrito acima foi realizado para obter 13 frações finais (A2-1 a A2-13) provenientes do fracionamento da fração CHCl_3 (1,82 g).

3.10. Isolamento das substâncias 18-31 de *Aspergillus terreus*

Os extratos AcOEt obtidos a partir de *A. terreus* cultivados em PDB + 250 μM de SAHA e PDB + 500 μM de SAHA em pequena escala foram agrupados (1,04 g) e particionados entre hexano e MeOH aquoso a 80%. A fração de MeOH aquoso a 80% foi diluída em MeOH aquoso a 50% por adição de água e depois extraída com CHCl_3 . A evaporação da camada de CHCl_3 sob pressão reduzida produziu uma fração de CHCl_3 (393,6 mg) e esta fração foi cromatografada em uma coluna Sephadex® LH-20 (13,0 g) preparada em DCM/hexano (4:1) e eluída com DCM:hexano (4:1, 200 mL), DCM: acetona (3:2, 200 mL), DCM:acetona (1:4, 200 mL), DCM:MeOH (1:1, 200 mL) e finalmente com MeOH (200 mL). Um total de 78 frações foram coletadas e combinadas com base em seus padrões de TLC para produzir 12 frações [A1-1 (14,0 mg), A1-2 (6,8 mg), A1-3 (8,8 mg), A1-4 (67,9 mg), A1-5 (26,6 mg), A1-6 (71,9 mg), A1-7 (24,7 mg), A1-8 (27,0 mg), A1-9 (27,5 mg), A1-10 (65,2 mg), A1-11 (9,6 mg) e A1-12 (6,2 mg)]. A fração A1-12 forneceu o composto **18**. As frações A1-7 e A1-11 foram purificadas por HPLC-DAD para obter mais quantidade de **18** (2,0 mg). As frações A1-1 e A1-2 foram purificadas por HPLC-DAD para obter **24** (2,7 mg), **25** (0,7 mg) e éster metílico do ácido suberanílico (**29**, 1,1 mg). A fração A1-4 foi purificada por HPLC-DAD resultando em **22** (3,8 mg), **28** (0,7 mg), anilina (**30**, 3,7 mg) e **29** (2,9 mg).

Em escala ampliada, o mesmo procedimento descrito acima foi realizado para obter 13 subfrações provenientes da fração CHCl_3 (1,82 g) cromatografadas em uma coluna Sephadex® LH-20 [A2-1 (95,9 mg), A2-2 (167,7 mg), A2-3 (74,0 mg), A2-4 (44,2 mg), A2-5 (389,7 mg), A2-6 (506,7 mg), A2-7 (58,6 mg), A2-8 (64,0 mg), A2-9 (161,7 mg), A2-10 (95,6 mg), A2-11 (128,9 mg), A2-12 (18,3 mg) e A2-13 (4,3 mg)]. A fração A2-7 originou os compostos **19** (2,8 mg), **20** (2,1 mg), **21** (4,2 mg), **23** (2,5 mg) e **27** (1,7 mg) purificados por HPLC-DAD. As frações A2-9 a A2-12 deram **18** (16,2 mg), **19** (1,3 mg) e **26** (1,0 mg) purificadas por

HPLC-DAD. As frações A2-1 e A2-2 deram **24** e **25**, respectivamente. Uma porção da fração A2-5 (100 mg) foi cromatografada em uma coluna de sílica gel (15 g) preparada em CHCl₃/isopropanol (98:2) e eluída com CHCl₃/isopropanol (98:2, 50 mL), CHCl₃/isopropanol (96:4, 50 mL), CHCl₃/isopropanol (84:16, 50 mL), CHCl₃/isopropanol (68:32, 50 mL), CHCl₃/isopropanol (36:64, 50 mL), Isopropanol (50 mL) e finalmente com MeOH (50 mL) e, com base no seu padrão de TLC, foram obtidas 3 frações [A (56,4 mg), B (17,9 mg) e C (11,3 mg)]. A fração A rendeu a substância **22** (56,4 mg) e a fração B forneceu o modificador epigenético SAHA incluído no meio de cultivo (**31**, 17,9 mg).

Uma porção do extrato bruto AcOEt quando *A. terreus* foi cultivado sem SAHA (55,0 mg) foi fracionada por HPLC [Kromasil RP18, 250,0 mm × 10,0 mm, MeOH: H₂O, 20:80 a 100: 0 em 60 minutos, 3,2 mL/min, detecção de UV a 270 nm] e metabólitos **20** (0,7 mg), **21** (6,5 mg), **22** (3,0 mg), **23** (0,4 mg), **24** (0,8 mg), **25** (0,6 mg) e **26** (1,0 mg). As identidades destes metabólitos (**20-26**) foram obtidas por comparação (dados de HPLC e RMN de ¹H) com as obtidas acima a partir do extrato AcOEt derivado da cultura PDB + SAHA.

3.11. Determinação da configuração absoluta para as substâncias 5, 18 e 19

Os cálculos computacionais para obtenção das curvas de ECD foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. João Marcos Batista Junior, docente da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São José dos Campos – SP, Brasil.

3.11.1. Teoria e detalhes de cálculo

Para a obtenção dos espectros teóricos de ECD, foram escolhidas arbitrariamente as configuração (S)-**5**, (R)-**18** e (R)-**19**. Todos os cálculos de DFT e TDDFT foram realizados a 298 K em solução de metanol, usando o modelo do contínuo polarizável (PCM) em sua versão de formalismo de equação integral (IEFPCM) incorporada no software Gaussian 09 [Frisch *et al.*, 2009]. As buscas conformacionais foram realizadas no nível da teoria de mecânica molecular com o algoritmo de Monte Carlo, empregando o campo de força MM+ incorporado no pacote de software HyperChem 8.0.10. Os confôrmeros com energia relativa (E

rel) dentro de 10 kcal/mol dos confôrmeros de menor energia foram selecionados e otimizados geometricamente no nível de teoria B3LYP/PCM (MeOH)/6-31G(d).

Para a substância **5**, os 2 confôrmeros com $E_{rel} < 1,0$ kcal/mol, que corresponderam a mais de 98% da distribuição total de Boltzmann, foram selecionados para cálculos espectrais de UV e ECD. Para a substância **18**, os 6 confôrmeros com $E_{rel} < 1,0$ kcal/mol, que corresponderam a 95% da distribuição total de Boltzmann, foram selecionados para cálculos espectrais. Já para a substância **19**, os confôrmeros de menor energia identificados para **18** tiveram a hidroxila em C-9 substituída por um átomo de hidrogênio, seguido de etapas de otimização geométrica no nível B3LYP/PCM(MeOH)/6-31G(d). Os 2 confôrmeros com $E_{rel} < 1,0$ kcal/mol, que corresponderam a mais de 95% da distribuição total de Boltzmann, foram selecionados para cálculos espectrais de UV e ECD. Análises vibracionais no nível B3LYP/PCM(MeOH)/6-31G(d) não resultaram em nenhuma frequência imaginária, confirmando os confôrmeros identificados acima como mínimos verdadeiros.

A TDDFT foi utilizada para calcular a energia de excitação (em nm) e as forças rotacionais R , na forma de velocidade dipolar (R_{vel} em unidades cgs: 10^{-40} esu² cm²), no nível B3LYP com PCM MeOH, combinado com o conjunto de bases TZVP. As forças rotacionais calculadas para as 30 primeiras transições eletrônicas singleto → singleto foram simuladas em uma curva de ECD usando função Gaussiana com uma largura de banda σ 0,3 eV. Os comprimentos de onda previstos para as transições eletrônicas foram multiplicados com um fator de escalonamento de 0,99 para **5** e 1,1 para **18** e **19**, determinados pela melhor concordância entre os espectros de UV experimentais e calculados. Os espectros finais foram gerados de acordo com a ponderação de Boltzmann dos confôrmeros de menor energia identificados e plotados usando o software Origin 8.

3.12. Preparação de derivados semi-sintéticos

3.12.1. Acetilação do metabolito 18

A uma solução de **18** (2,0 mg) em piridina (0,3 mL) foi adicionado anidrido acético (0,2 mL), e a mistura foi agitada a 25 °C. Após 5 h (controle por CCD), o solvente da mistura de reação foi evaporado sob pressão reduzida para produzir

o produto bruto que foi purificado por HPLC [Kromasil RP18, 250,0 mm × 10,0 mm, MeOH:H₂O, 45:55 a 100:0 em 60 min, 3,2 mL/min] para dar **18a** (2,1 mg) como um sólido amorfo vermelho.

3.12.2. Metilação do metabólito 18

A uma solução de **18** (2,0 mg) em acetona (0,5 mL) foram adicionados K₂CO₃ (5,0 mg) e CH₃I (0,5 mL), e a mistura foi agitada a 25 °C. Após 7 h (controle por CCD), o solvente da mistura de reação foi filtrado e evaporado sob pressão reduzida para produzir o produto bruto que foi purificado por HPLC [Kromasil RP18, 250,0 mm × 10,0 mm, MeOH: H₂O, 45:55 a 100:0 em 60 min, 3,2 mL/min] para dar **18b** (1,6 mg) como um sólido amorfo amarelo.

3.12.3. Acetilação do metabolito 19

A uma solução de **19** (0,9 mg) em piridina (0,3 mL) foi adicionado anidrido acético (0,2 mL), e a mistura foi agitada a 25 °C. Após 5 h (controle por CCD), o solvente da mistura de reação foi evaporado sob pressão reduzida para produzir o produto bruto que foi purificado por HPLC [Kromasil RP-18, 250,0 mm × 10,0 mm, MeOH:H₂O, 45:55 a 100:0 em 60 min, 3,2 mL/min] para dar **19a** (0,8 mg) como um sólido amorfo amarelo.

3.13. Análises por LC-MS do extrato AcOEt quando *P. sporulosa* foi cultivado em PDB

As análises por LC-MS foram realizadas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto –SP, Brasil, coordenado pelo Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes.

Os extratos foram preparados na concentração de 1,0 mg/mL, solubilizados na proporção de MeOH:H₂O de acordo com a fase móvel inicial de seus respectivos métodos utilizados. Para as análises, a solução foi filtrada através de uma membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,22 µm e alíquotas de 10 µL foram injetadas ao sistema LC-MS.

Os experimentos por LC-ESI-TOF-MS foram realizados utilizando um UFLC (Shimadzu®, Japão) contendo duas bombas de solvente LC20AD, injetor automático SIL20AHT, forno de coluna CTO20A, controlador de sistema CBM20A e um detector de matriz de díodos (SPD-M20AV) acoplado com um

espectrômetro de massa microTOF (Bruker® Daltonics, EUA). As análises foram realizadas nas seguintes condições: tensão capilar, + 3,5 kV (modo positivo) e – 3,5 kV (modo negativo); temperatura capilar, 220 °C; tensão de offset da placa de extremidade, 490 V; pressão do gás nebulizador, 5,5 bar; gás secante (N₂), 10 L/min. Os espectros de massa foram medidos na região de m/z 50-1300 no modo positivo e negativo de ionização.

Para os experimentos de massas sequenciais, LC-ESI-IT-MS/MS, as análises foram realizadas utilizando um UFLC (Shimadzu®), acoplado com um espectrômetro de massas *Ion Trap* modelo AmaZon SL (Bruker®). Os parâmetros de aquisição do *Ion Trap* foram os seguintes: tensão capilar, + 3,5 kV (modo positivo) e – 3,5 kV (modo negativo); offset da placa de extremidade 500 V; pressão do gás nebulizador, 60 psi; gás secante (N₂), 10 L/min; temperatura do gás seco, 320 °C. A fragmentação CID foi obtida no modo auto-MS/MS.

As análises foram realizadas com vazão de 1,0 mL/min, coluna RP18 (Knauer, Eurospher II 250,0 × 4,6 mm, 5 µm) juntamente com a coluna de proteção (Phenomenex, 4 × 3 mm) e o forno de coluna foi ajustado a 30 °C. O software Bruker Compass DataAnalysis 4.2 foi utilizado para controlar o sistema, para coleta de dados e processamento. O espectrômetro de massas foi calibrado utilizando uma solução de ácido trifluoroacético de sódio como padrão interno.

O extrato AcOEt de *P. sporulosa* cultivado em PDB foi eluído em modo gradiente, sendo utilizado um gradiente de água:metanol (20-90% de metanol em 50 min) contendo 0,1% de ácido fórmico.

3.14. Avaliação da atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada no laboratório de Fisiologia de Microrganismos da FCFAr – UNESP, Araraquara – SP, Brasil, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Taís Maria Bauab. As linhagens utilizadas foram de bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella setubal* (ATCC 19196) e as leveduras *Candida albicans* (ATCC 10231), *C. tropicalis* (ATCC 750), *C. krusei* (ATCC 6258), *C. glabrata* (ATCC 2001) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019).

3.14.1. Avaliação da atividade antibacteriana

3.14.1.1. Padronização da suspensão bacteriana

Foram preparados cultivos das bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *S. setubal* em caldo MH, e incubados a 37 °C por 24 horas. Após o tempo de incubação foi feita a padronização das cepas bacterianas. Cada um dos cultivos foi transferido para solução tampão fosfato com pH 7,2 e ajustada a turbidez até a escala 0,5 de McFarland ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida realizou-se a leitura espectrofotométrica a 620 nm até obtenção de absorbância de 0,10 a 0,15. Posteriormente, a suspensão foi diluída na proporção 1:10 em caldo MH para atingir a concentração de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, mantida em banho de gelo até o momento de ser utilizada nos ensaios.

3.14.1.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A avaliação da atividade antibacteriana e a determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos extratos produzidos por fungos endofíticos isolados de *P. planifolius* (Eriocaulaceae) e substâncias isoladas foram realizados segundo a técnica de microdiluição em caldo em conformidade com a norma M7-A9 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2012).

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (colunas A-H, linhas 1-12) e cada orifício foi preenchido com 80 µL de caldo MH, seguido de 100 µL de cada um dos extratos, diluídos em DMSO 20% na concentração inicial de 2000 µg/mL. Após a homogeneização, uma alíquota de 100 µL da mistura foi retirada e transferida para o próximo poço, realizando diluições seriadas na razão 1:1 sucessivamente da coluna A até a coluna H. Um volume de 20 µL da suspensão bacteriana padronizada foi adicionado em cada poço completando um volume final de 100 µL, a concentração final no poço A foi de 1000 µg/mL e no poço H de 7,8 µg/mL.

Como controle positivo foi utilizada solução de ampicilina a 50 µg/mL para *E. coli* e *S. setubal* e 5 µg/mL para *S. aureus*. Também foi realizado o controle de esterilidade do meio, controle do crescimento do inóculo, controles de turbidez dos extratos e controle negativo (DMSO 20%).

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

3.14.2. Avaliação da atividade antifúngica

3.14.2.1. Padronização da suspensão fúngica

Foram preparados cultivos de leveduras *Candida* ssp. em caldo SD e incubado a 37 °C por 48 horas. Após o tempo de incubação, foi feita a padronização da levedura. O cultivo foi transferido para tampão fosfato com pH 7,2 e ajustada a turbidez até a escala 0,5 de McFarland (5×10^6 UFC/mL). Em seguida realizou-se a leitura espectrofotométrica a 530 nm até obtenção de absorbância de 0,12 a 0,15. Após isso, a suspensão foi diluída na proporção 1:100, em tampão fosfato seguido de diluição 1:20 em meio RPMI para atingir a concentração de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, mantida em banho de gelo até o momento de ser utilizada nos ensaios.

3.14.2.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A avaliação da atividade antifúngica e a determinação das CIMs dos extratos produzidos por fungos endofíticos isolados de *P. planifolius* (Eriocaulaceae) foram realizadas segundo a técnica de microdiluição em caldo em conformidade com a norma M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2008) e (DUARTE *et al.*, 2005), com modificações.

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (colunas A-H, linhas 1-12) e cada orifício foi preenchido com 100 µL de RPMI 1640, ajustado a pH 7,0 com tampão MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanossulfônico) e esterilizado por membrana filtrante seguido de 100 µL de cada um dos extratos, diluídos em DMSO (20 %) na concentração inicial de 2000 µg/mL. Após a homogeneização,

uma alíquota de 100 µL da mistura foi retirada e transferida para o próximo poço, realizando diluições seriadas na razão 1:1 sucessivamente da coluna A até H. Um volume de 100 µL da suspensão de levedura padronizada foi adicionado em cada poço completando um volume final de 200 µL, a concentração final no poço A foi de 1000 µg/mL e no poço H foi de 7,8 µg/mL.

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

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

3.15. Avaliação da atividade citotóxica para células tumorais

O ensaio foi desenvolvido no laboratório do Departamento de Análises Clínicas da FCFAr - UNESP, Araraquara - SP, Brasil, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Iracilda Z. Carlos. As linhagens tumorais de murinos LM3 (adenocarcinoma mamário) e LP07 (adenocarcinoma pulmonar) foram cedidas pelo Instituto de Oncologia Angel H. Roffo, Buenos Aires, Argentina. A linhagem tumoral MCF-7 (adenocarcinoma de mama de humano) foi cedida pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), Rio de Janeiro – RJ, Brasil.

Adicionalmente, também foi realizado no laboratório coordenado pela Prof^a. Dr^a. Valéria Valente utilizando as linhagens de GBM U87MG (HTB-14™) e T98G (CRL-1690™) obtidas da coleção da ATCC. A linhagem tumoral de mama SKBR3 (HTB30™) também foi obtida da coleção ATCC.

3.15.1. Ensaio de viabilidade celular de células tumorais LM3, LP07 e MCF-7

As células foram mantidas em meio MEM (*Minimum Essential Medium*), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2mM L-glutamina e 80 µg/mL de gentamicina, em frascos plásticos (Corning®) em estufa a 37 °C, com atmosfera úmida e tensão constante de 5% de CO₂. Foram realizados repiques três vezes por semana. O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco®), utilizando corante Azul de Tripan, a 0,04% em PBS, e ajustado a uma concentração de 5×10^4 células/mL.

As soluções-estoque das amostras avaliadas foram preparadas em concentração máxima de DMSO de 5% v/v, conforme os métodos convencionais. Os extratos foram diluídos em MEM por diluição sucessiva nas concentrações de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,2, 15,7 e 7,8 µg/mL momentos antes da aplicação das amostras nos ensaios. Para as substâncias **1-6** foram avaliadas nas concentrações de 100-0,78 µg/mL.

A determinação da citotoxicidade das amostras sobre as células tumorais foi realizada pelo método baseado na capacidade das células viáveis de reduzirem o MTT pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa das células viáveis formando cristais de formazan (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2012). Amostras (200 µL) de LM3, LP07 e MCF-7 (5×10^4 células/mL) foram adicionadas em placas de 96 poços e então pré-incubadas na ausência das amostras investigadas por 24 h para que as células se adaptem antes da adição dos agentes de teste. Após 24 h de incubação, formado o tapete celular, os sobrenadantes foram removidos e os extratos e substâncias isoladas foram adicionados (200 µL). Os efeitos das amostras sobre as células foram determinados após 24 h de incubação, então os sobrenadantes foram removidos, e a solução de MTT (100 µL; 1 mg/mL) foi adicionada a cada poço contendo as amostras.

O ensaio de MTT foi realizado e as placas foram incubadas durante 3 h, o conteúdo da placa foi novamente vertido e 100 µL de álcool isopropílico foram adicionados a cada orifício para solubilizar os cristais formados (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2008). Somente células e meio de cultura foram utilizados como controle negativo, equivalendo a 100% de viabilidade celular. A leitura da absorbância foi realizada no Fotocolorímetro

multicanal UV-Vis Multiscan Ascent (Labsystems®), em comprimento de onda de 540 nm e filtro de referência 620 nm.

Os valores correspondentes à concentração que reduz em 50% a viabilidade celular (CI_{50}) dos extratos foram quantificados através de curvas dose-resposta, Concentração da Amostra $\times$ Viabilidade Celular, utilizando o software Origin® 5.0. Os ensaios foram realizados em triplicata e utilizado a cisplatina e doxorubicina como controles positivos.

3.15.2. Ensaio de viabilidade celular de células tumorais T98G, U87MG e SKBR3

As células foram cultivadas em meio específico DMEM High Glicose suplementado com 10% de soro fetal, e para a linhagem SKBR3 foi utilizado o meio DMEM suplementado com F10 e 10% de soro fetal, mantidas em incubadoras a 5% de CO_2 a 37 °C, até atingirem a confluência de aproximadamente 80%. Quando atingida a confluência adequada, as células foram descoladas da garrafa de cultura através do uso de tripsina e transferidas para microplacas de 96 poços.

A fim de mensurar os efeitos citotóxicos das drogas indutoras de estresse replicativos nas linhagens celulares *in vitro*, utilizou-se o método de MTT descrito anteriormente e os resultados expressos em CI_{50} .

Foram plaqueadas 1×10^4 células por poços. As células foram então incubadas por 24 horas e então submetidas ao tratamento com as substâncias **11-17**.

Foram testadas então as concentrações de 30-0,93 $\mu\text{g/mL}$. Todas as substâncias foram solubilizadas em DMSO 1,2%, sendo assim a mesma concentração de DMSO utilizado no controle de veículo. O quimioterápico doxorubicina foi utilizado como controle positivo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividade citotóxica dos extratos AcOEt provenientes do meio de cultivo em PDB dos fungos endofíticos isolados de *P. planifolius*

Um dos ensaios colorimétricos para a avaliação de viabilidade celular ou citotoxicidade mais comumente utilizados na atualidade é o ensaio de MTT descrito por Mosmann (1983). O princípio do método é a redução do sal de MTT (sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-*H*-brometo de tetrazolium) por enzimas mitocondriais resultando em cristais de formazan. Desta forma, esta reação ocorre somente em células vivas e que estejam com suas mitocôndrias ativas, configurando-se um ensaio versátil e quantitativo através da leitura da absorbância por um espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm (MOSMANN, 1983).

O ensaio de citotoxicidade dos extratos AcOEt provenientes do meio de cultivo em PDB dos 15 fungos endofíticos isolados de *P. planifolius* foi avaliado pelo método MTT. Para isso foram utilizadas linhagens de células tumorais de murinos LM3 (adenocarcinoma mamário), LP07 (adenocarcinoma de pulmão) e células tumorais humanas MCF-7 (adenocarcinoma da mama). As doses citotóxicas para inibir a viabilidade celular em 50% (CI₅₀) foram definidas utilizando o método estatístico de curva dose-resposta sigmoidal, as quais estão apresentadas na Tabela 1.

Segundo o *American National Cancer Institute* (NCI) foram estabelecidos que extratos brutos que apresentam valores de citotoxicidade para 50% de inibição de viabilidade celular igual ou inferior a 30 µg/mL são classificados como extratos promissores para obtenção de substâncias bioativas (BOIK, 2001). Portanto, a triagem citotóxica dos extratos AcOEt provenientes do cultivo em PDB dos 15 endófitos isolados de *P. planifolius* mostraram bons resultados para os endófitos codificados como Pp-E-02, que apresentou citotoxicidade em concentrações próximas à faixa promissora exigida para as três linhagens de células tumorais avaliadas, e Pp-F-03, que apresentou citotoxicidade próxima da concentração limite exigida como promissora para a linhagem de célula tumoral MCF-7. Para as outras duas linhagens tumorais LP07 e LM3 o endófito Pp-F-03 apresentou-se como o segundo melhor extrato (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de CI_{50} dos extratos AcOEt dos fungos endofíticos isolados de *P. planifolius* avaliados frente às linhagens de células tumorais.

Extratos Avaliados	$CI_{50} \pm (DP) [\mu g/mL]$		
	LM3	LP07	MCF-7
Pp-C-01	754,93 $\pm$ 2,62	802,25 $\pm$ 8,34	97,39 $\pm$ 3,51
Pp-C-02	325,28 $\pm$ 2,34	409,85 $\pm$ 5,61	212,06 $\pm$ 4,82
Pp-C-03	932,30 $\pm$ 6,07	>1000	337,75 $\pm$ 6,31
Pp-C-05	929,58 $\pm$ 5,19	>1000	330,17 $\pm$ 9,91
Pp-C-06	192,92 $\pm$ 6,67	244,61 $\pm$ 9,59	128,43 $\pm$ 10,18
Pp-C-07	142,63 $\pm$ 1,70	129,67 $\pm$ 13,85	143,73 $\pm$ 7,22
Pp-C-08	251,07 $\pm$ 1,16	292,82 $\pm$ 2,13	131,08 $\pm$ 11,52
Pp-F-01	650,01 $\pm$ 5,37	713,57 $\pm$ 11,88	312,20 $\pm$ 13,84
Pp-F-02	>1000	>1000	666,26 $\pm$ 2,06
Pp-F-03	68,25 $\pm$ 1,02	110,17 $\pm$ 4,90	31,68 $\pm$ 0,46
Pp-F-04	657,76 $\pm$ 13,02	628,91 $\pm$ 9,50	245,05 $\pm$ 1,86
Pp-E-01	>1000	>1000	102,95 $\pm$ 6,32
Pp-E-02	37,93 $\pm$ 4,95	38,26 $\pm$ 0,25	28,82 $\pm$ 5,85
Pp-E-04	158,18 $\pm$ 6,00	199,09 $\pm$ 4,84	179,96 $\pm$ 7,05
Pp-E-05	715,14 $\pm$ 11,00	617,74 $\pm$ 7,05	272,48 $\pm$ 4,48
Cisplatina	9,09 $\pm$ 1,11	1,3 $\pm$ 0,12	5,88 $\pm$ 1,38

Dessa forma, frente ao ensaio de citotoxicidade e antimicrobiano os fungos endofíticos codificados como Pp-F-03 e Pp-E-02 foram selecionados para identificação de suas espécies e realizar o cultivo em escala reduzida em outros meios de cultivo líquidos (YM, Czapek®, Nutrient® e Malte) e sólidos (Milho e Arroz).

4.2. Atividade antimicrobiana dos extratos dos fungos endofíticos isolados de *P. planifolius*

A importância na triagem biológica para a descoberta de novos compostos que apresentem atividade antimicrobiana contra uma variedade de linhagens de fungos e bactérias é relevante, pois a resistência antimicrobiana é um fator de preocupação na sociedade (CRAGG; NEWMAN, 2013). Neste sentido, para escolha dos extratos dos fungos endofíticos a serem estudados quimicamente, também foi realizada uma triagem antimicrobiana dos 15 fungos isolados de *P. planifolius*, paralelamente com a triagem antitumoral. A tabela 2 mostra os resultados obtidos com as bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e leveduras.

A literatura relata que valores de CIMs igual ou inferior a 500 $\mu g/mL$ são classificados como inibidores potentes; CIMs entre 600 e 1500 $\mu g/mL$ como

inibidores moderados e acima de 1600 $\mu\text{g/mL}$ como inibidores fracos (ALIGIANNIS *et al.*, 2001).

Tabela 2. Valores de CIM dos extratos AcOEt dos fungos endofíticos isolados de *P. planifolius* avaliados frente às linhagens de bactérias e leveduras.

Extratos Avaliados	CIM [$\mu\text{g mL}^{-1}$]				
	<i>Bactérias</i> <i>Gram-negativa</i>		<i>Bactéria</i> <i>Gram-positiva</i>	<i>Leveduras</i>	
	<i>E. coli</i>	<i>S. setubal</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
	(ATCC25922)	(ATCC25923)	(ATCC19196)	(ATCC18804)	(ATCC10231)
Pp-C-01	1000	1000	1000	1000	1000
Pp-C-02	1000	1000	>1000	>1000	>1000
Pp-C-04	1000	1000	>1000	>1000	>1000
Pp-C-05	1000	>1000	1000	>1000	>1000
Pp-C-06	1000	1000	>1000	>1000	>1000
Pp-C-07	1000	1000	1000	>1000	>1000
Pp-C-08	1000	1000	>1000	>1000	>1000
Pp-F-01	1000	>1000	500	>1000	>1000
Pp-F-02	1000	>1000	1000	>1000	>1000
Pp-F-03	1000	1000	500	125	125
Pp-F-04	1000	1000	>1000	1000	>1000
Pp-E-01	1000	1000	>1000	>1000	>1000
Pp-E-02	500	500	>1000	>1000	>1000
Pp-E-04	1000	1000	1000	>1000	>1000
Pp-E-05	1000	1000	>1000	>1000	>1000
Ampicilina	6,25	12,6	0,15	NA	NA
Anfotericina B	NA	NA	NA	10,0	10,0
Fluconazol	NA	NA	NA	NA	R

NA: Não aplicável; R: Resistente.

Portanto, foi possível observar a partir da triagem antimicrobiana que os extratos dos endófitos codificados como Pp-F-03 e Pp-E-02 mais uma vez apresentaram os melhores resultados com concentrações de inibição que variam de 500 e 125 $\mu\text{g/mL}$ corroborando com os resultados obtidos da triagem citotóxica para que estas 2 cepas fossem selecionadas para continuidade dos estudos variando os meios de cultivo líquidos e sólidos. Adicionalmente, estes resultados possibilitam a busca de compostos bioativos que abrangem todas as linhagens avaliadas, uma vez que para as bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *S.*

setuba) o endófito Pp-E-02 apresentou melhores resultados, enquanto que para a bactéria Gram-positiva (*S. aureus*) e as leveduras foi o endófito Pp-F-03.

4.3. Identificação dos fungos endofíticos selecionados

A identificação dos endófitos Pp-F-03 e Pp-E-02 foi realizada pela empresa BPI (Biotecnologia Pesquisa e Inovação), Genotyping Biotecnologia, localizada em Botucatu-SP, Brasil.

A cepa codificada como Pp-F-03 apresentou 96% de identidade com o fungo da espécie *Paraphaeosphaeria sporulosa* (nº acesso JX496114.1) (Figura 15) e a cepa codificada como Pp-E-02 apresentou 99 % de identidade com o fungo *Cochliobolus eragrostidis* (nº acesso JN941523.1) (Figura 16). O cadastro destas espécies no SISGEN é AFE19D8.

Figura 15. Sequenciamento da região ITS de *Paraphaeosphaeria sporulosa*.

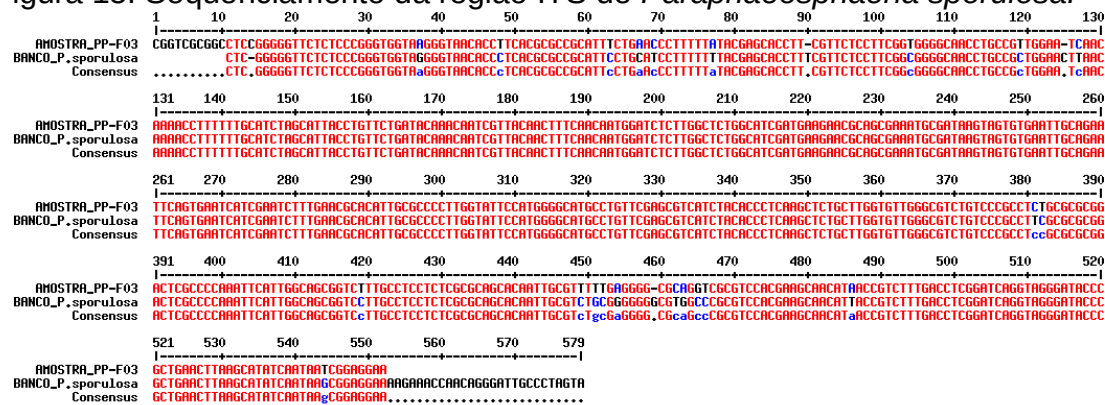
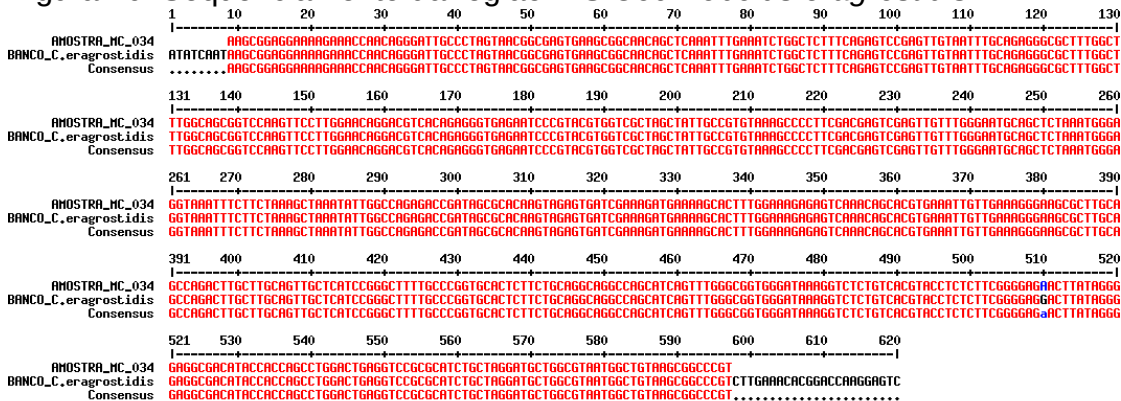


Figura 16. Sequenciamento da região ITS *Cochliobolus eragrostidis*.



4.4. Cultivo de *P. sporulosa* em diferentes meios de cultivo líquidos e sólidos, e avaliação da atividade biológica dos extratos

Muitas vezes observam-se estudos de fungos endofíticos baseados em apenas um único meio de cultivo sem ressaltar o estudo do endófito em diferentes meios de cultivo líquidos e sólidos em busca de uma maior variedade metabólica.

A produção metabólica dos compostos é dependente das condições fornecidas ao endófito durante o cultivo, dentre estas, os nutrientes disponíveis do meio de cultivo utilizado. Assim, foi realizado o cultivo de *P. sporulosa* em diferentes meios de cultivo líquidos e sólidos em escala reduzida e suas massas de extratos brutos obtidas (Tabela 3).

Tabela 3. Massas dos extratos brutos obtidas em diferentes meios de cultivo de *P. sporulosa* fermentados em 900 mL de meio de cultivo líquidos e 270 g de meio de cultivo sólidos.

	Meios de cultivo						
	PDB	YM	Malte	Czapek®	Nutrient®	Arroz	Milho
Massa (mg)	202,1	67,5	515,2	172,1	72,4	1535,7	890,3

Para a obtenção destes extratos, foram utilizados cinco meios de cultivo líquidos e dois meios de cultivo sólidos. O meio de cultivo Czapek® devido a sua composição de sais inorgânicos é classificado como quimicamente definido, os demais meios de cultivo, PDB, YM, Malte, Nutrient®, Arroz e Milho, são classificados como complexos por apresentarem em suas composições uma variedade de compostos orgânicos providos de carboidratos, peptona ou extrato de carne (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996). A composição dos meios de cultivo utilizados neste trabalho, assim como outras características, está ilustrada na tabela 4.

A partir da obtenção dos extratos, estes foram submetidos à triagem biológica frente aos ensaios antimicrobiano e antitumoral no sentido de selecionar os extratos mais bioativos para continuidade do estudo químico em escala ampliada, fracionamento, isolamento e identificação estrutural dos metabólitos secundários.

Tabela 4. Meios de cultivo utilizados no crescimento dos endófitos.

Meios de cultivo	Tipo	C (g/L)	Composição	Fabricante
PDB	Líquido	24	Batata (4g), Dextrose (20g)	Acumedia
YM	Líquido	21	Extrato de levedura (3g), Extrato de Malte (3g), Peptona (5g), Dextrose (10g)	Acumedia
Malte	Líquido	20	Extrato de Malte (20g)	Acumedia
Nutrient [®]	Líquido	8	Extrato de carne (3g), Digestão enzimática de gelatina (5g)	Acumedia
Czapek [®]	Líquido	34	Nitrato de sódio (2g), Sulfato de Magnésio (0,5g), Cloreto de Potássio (0,5g), Sulfato Ferroso (0,01g), Difosfato de Potássio (1g), Sacarose (30g)	Kasir
Arroz parboilizado	Sólido	90g/75mL	Carboidratos, Proteínas, Vitaminas	Tio João
Milho canjica	Sólido	90g/75mL	Carboidratos, Proteínas	Yoki

O ensaio antitumoral pelo método MTT apresentou os melhores resultados para os extratos do endófito *P. sporulosa* cultivados em meio líquido PDB e cultivado em meio sólido Arroz para as três linhagens de células tumorais avaliadas, sendo que para as linhagens LM3 e MCF-7 foi possível obter CI_{50} dentro da faixa de concentração de extratos promissores de acordo com o *American National Cancer Institute* (Tabela 5).

No ensaio antimicrobiano os mesmos extratos apresentaram-se como mais promissores com CIMs que variam de 125 e 250 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem de levedura *C. albicans*. Adicionalmente, o endófito *P. sporulosa* quando cultivado em Arroz ainda apresentou CIM de 500 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem de bactéria *E. coli* e quando cultivado em PDB com CIM de 500 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus* (Tabela 6). Desta forma, os extratos provenientes do cultivo em Arroz e PDB foram selecionados para inoculação deste endófito em escala ampliada para obtenção dos extratos e posteriormente fracionamento, isolamento e identificação dos metabólitos secundários.

Tabela 5. Valores de CI_{50} dos extratos em diferentes meios de cultivos de *P. sporulosa* avaliados frente às linhagens de células tumorais.

Extratos Avaliados	$CI_{50} \pm (DP) [\mu g/mL]$		
	LM3	LP07	MCF-7
Arroz	16,06 $\pm$ 0,80	37,46 $\pm$ 1,02	23,91 $\pm$ 2,44
Milho	18,05 $\pm$ 4,01	54,63 $\pm$ 2,18	27,19 $\pm$ 2,85
PDB	22,36 $\pm$ 0,88	50,73 $\pm$ 6,12	23,03 $\pm$ 1,22
YM	74,29 $\pm$ 4,34	250,02 $\pm$ 12,10	76,64 $\pm$ 10,97
Malte	27,38 $\pm$ 0,84	100,84 $\pm$ 5,78	29,28 $\pm$ 1,46
Nutrient [®]	238,16 $\pm$ 11,36	>1000	329,85 $\pm$ 13,70
Czapek [®]	111,81 $\pm$ 3,58	394,82 $\pm$ 10,02	102,49 $\pm$ 4,75
Doxorubicina	0,012 $\pm$ 0,001	0,036 $\pm$ 0,003	0,025 $\pm$ 0,003

n=3; 95% intervalo de confiança.

Tabela 6. Valores de CIM dos extratos em diferentes meios de cultivos de *P. sporulosa* avaliados frente às linhagens de bactérias e leveduras.

Extratos Avaliados	CIM [$\mu g/mL$]			
	Bactérias Gram-negativa		Bactéria Gram-positiva	Leveduras
	<i>E. coli</i>	<i>S. setubal</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
	(ATCC25922)	(ATCC25923)	(ATCC19196)	(ATCC10231)
Arroz	500	1000	>1000	250
Milho	1000	1000	1000	250
PDB	1000	1000	500	125
YM	1000	1000	>1000	500
Malte	>1000	1000	>1000	>500
Nutrient [®]	>1000	1000	500	>500
Czapek [®]	500	500	500	500
Ampicilina	12,5	25	0,30	NA
Anfotericina B	NA	NA	NA	4,0
Fluconazol	NA	NA	NA	R

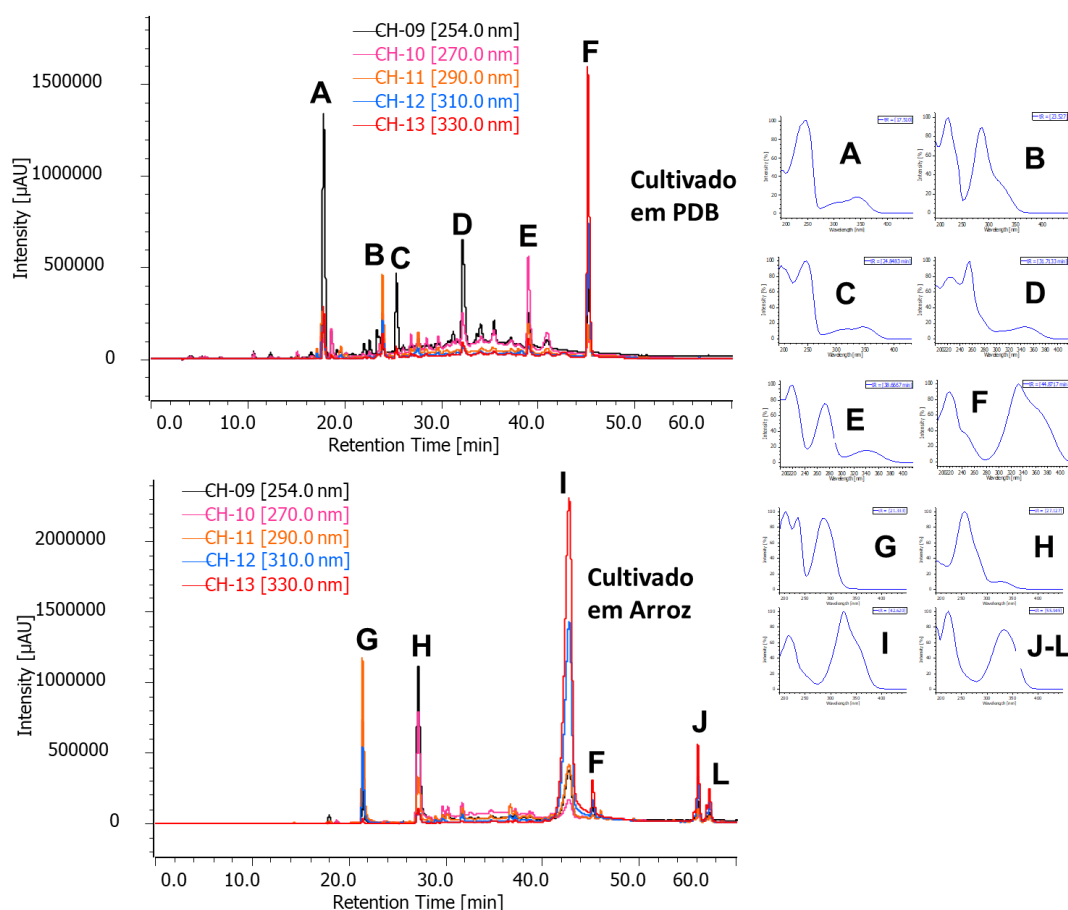
NA: Não aplicável; R: Resistente.

Para a obtenção do extrato AcOEt proveniente do cultivo em PDB de *P. sporulosa* em escala ampliada, o endófito foi inoculado em 30 erlenmeyers obtendo 1,8 g de extrato. Quando cultivado em Arroz, foi inoculado em 5 erlenmeyers obtendo 2,7 g de extrato.

4.5. Registro dos *fingerprints* por HPLC-DAD dos extratos de *P. sporulosa* cultivado em PDB e Arroz

Os *fingerprints* dos extratos brutos AcOEt quando *P. sporulosa* foi cultivado em PDB e o extrato ACN quando o mesmo endófito foi cultivado em arroz foram registrados por HPLC-DAD utilizando eluição gradiente de 5-100% MeOH em 60 minutos, fase estacionária RP18, vazão de 1 mL/min, temperatura da coluna mantida a 25 °C e monitorado em diversos comprimentos de onda na região espectral de absorção no UV para análise cuidadosa dos metabólitos secundários de cada matriz (Figura 17).

Figura 17. Cromatogramas dos extratos brutos obtidos em PDB e Arroz do endófito *P. sporulosa* (Coluna Thermo® Hypersil GOLD aQ RP18 com 250 x 4,6 mm d.i.; 5 µm), λ = 254-330 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: MeOH + TFA 0,1% (B) e H₂O + TFA 0,1% (A). O gradiente foi de 5-100% B (60 min), volume 10 µL.



Comparando-se os *fingerprints* dos extratos por HPLC-DAD (Figura 17) observou-se a variação metabólica a partir dos diferentes tempos de retenção dos picos cromatográficos, evidenciando que a produção dos metabólitos

secundários está relacionada com a composição do meio de cultivo utilizado. Dessa forma, propiciando uma maior variedade de substâncias para isolamento e caracterização em busca de novos compostos bioativos.

Observou-se uma maior produção metabólica quando o endófito *P. sporulosa* foi cultivado em PDB, evidenciado no cromatograma pelo maior número de picos que absorvem na região do UV (Figura 17).

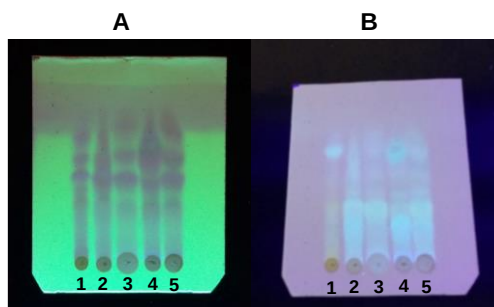
Pela análise das bandas espectrais, podemos mencionar que **A** (λ_{max} = 245 e 345 nm), **C** (λ_{max} = 248 e 350 nm), **D** (λ_{max} = 255 e 350 nm), **E** (λ_{max} = 267 e 342 nm) e **H** (λ_{max} = 260 e 340 nm) apresentavam similaridade em seus espectros de absorção no UV podendo ser substâncias derivadas da mesma classe de metabólitos. O mesmo ocorrendo entre **F** (λ_{max} = 337 e 370 nm) e **I** (λ_{max} = 325 e 365 nm), e entre **B** (λ_{max} = 278 e 342 nm) e **G** (λ_{max} = 274 nm).

4.6. Fracionamento do extrato ACN proveniente do cultivo em Arroz de *P. sporulosa* e isolamento das substâncias

Após cromatografia de permeação em gel (Sephadex LH-20) do extrato ACN proveniente do meio de cultivo em Arroz de *P. sporulosa* (1,8 g), as frações foram reagrupadas de acordo com as suas semelhanças de coloração e R_f por análise de CCD resultando em 5 frações finais codificadas de T1-T5 (Figura 18).

Depois de reagrupadas, as frações foram secas e suas massas determinadas. A tabela 7 mostra a distribuição das massas das frações obtidas após o procedimento de separação por CPG do extrato. O rendimento do processo de fracionamento utilizando esta técnica cromatográfica foi de 79,1 %, pois foi aplicado na coluna 1,8 g de extrato e o total das massas obtidas das frações foi de 1424,6 mg, havendo uma perda de 375,4 mg de extrato.

Figura 18. Análise por CCD das 5 frações finais codificadas de T1-T5 [gel de sílica, AcOEt/CHCl₃ (1:1, v/v), a) luz UV λ = 254 nm e b) luz UV λ = 330 nm]



A alta similaridade entre as frações finais demonstra que o fracionamento por CPG utilizando Sephadex LH-20 não foi eficiente para o extrato ACN proveniente do cultivo em Arroz de *P. sporulosa*.

Tabela 7. Distribuição das massas das frações após separação por permeação em gel e agrupamentos por CCD.

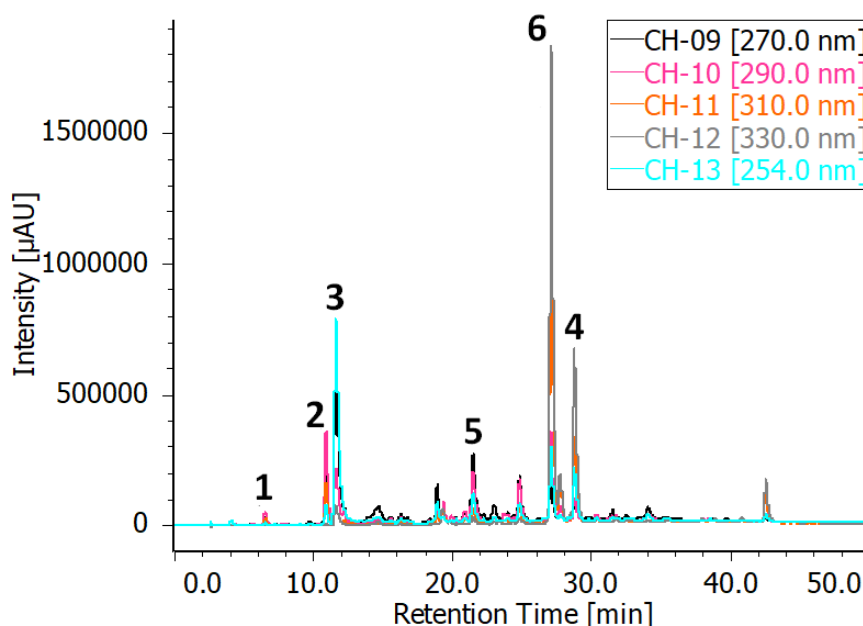
Frações	Agrupamento	Massa (mg)
T1	01-21	39,6
T2	22-35	149,0
T3	36-49	215,4
T4	50-73	478,7
T5	74-107	541,9

As frações T1, T2, T3 e T4 foram purificadas em HPLC-DAD utilizando eluição gradiente de 35-100% de MeOH em 50 minutos. A partir da fração T1 foi obtido a substância **6** (2,0 mg). A fração T2 forneceu as substâncias **1** (1,4 mg), **2** (0,2 mg), **3** (1,1 mg) e **6** (3,1 mg). A fração T3 (uma porção de 100 mg) forneceu a substância **1** (1,1 mg), **2** (0,3 mg) e **3** (1,8 mg). E por fim, a partir de 100 mg da fração T4 foi possível obter as substâncias **1** (0,9 mg), **4** (4,3 mg), **5** (1,2 mg) e **6** (7,1 mg). As substâncias equivalentes foram agrupadas.

Os picos cromatográficos relacionados às substâncias isoladas **1-6** no extrato ACN de *P. sporulosa* quando cultivado em Arroz estão representados no cromatograma da figura 19 e seus respectivos espectros de absorção na região do UV representados na figura 20. Dessa forma, as substâncias isoladas **1** (t_r = 6,5 min, λ_{max} = 235, 290 nm, 3,4 mg), **2** (t_r = 21,4 min, λ_{max} = 235, 290 nm, 0,5

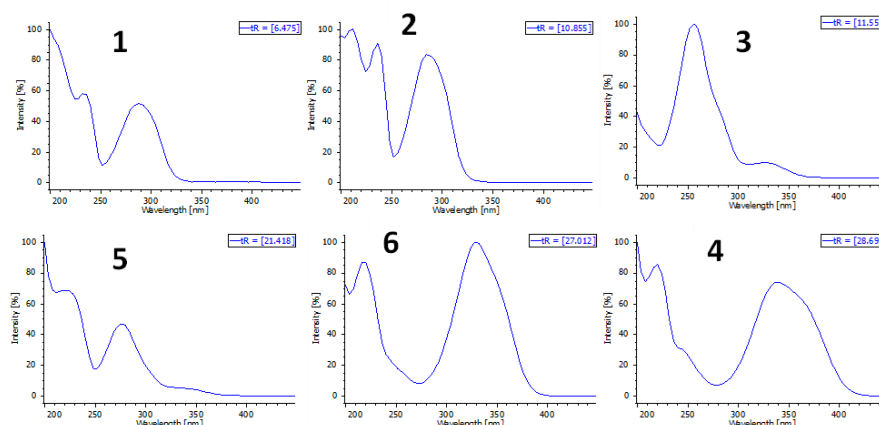
mg), **3** ($t_r = 11,6$ min, $\lambda_{\max} = 257, 284$ sh, 330 nm, 2,9 mg), **4** ($t_r = 28,7$ min, $\lambda_{\max} = 333, 360$ sh nm, 4,3 mg), **5** ($t_r = 21,4$ min, $\lambda_{\max} = 275, 350$ nm, 1,2 mg) e **6** ($t_r = 27,0$ min, $\lambda_{\max} = 330, 350$ sh nm, 12,2 mg) foram encaminhadas para elucidação estrutural por técnicas espectroscópicas e espectrométricas (RMN e EM).

Figura 19. Cromatograma HPLC-DAD analítico do extrato ACN de *P. sporulosa*. Coluna Knauer RP18 com 250 x 4,6 mm d.i.; 5 μ m), $\lambda = 254$ -330 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: MeOH + TFA 0,1% (B) e H₂O + TFA 0,1% (A). O gradiente foi de 20-100% B (60 min), volume 10 μ L.



Fonte: AMORIM *et al.*, 2019.

Figura 20. Espectros de absorção na região do UV das substâncias **1** a **6** no extrato Arroz de *P. sporulosa*.



Fonte: AMORIM *et al.*, 2019.

4.7. Elucidação estrutural das substâncias 1 a 6 (AMORIM *et al.*, 2019)

As substâncias **1-6** (Figura 21) foram elucidadas por métodos espectroscópicos e espectrométricos (RMN e EM). Estas substâncias foram publicadas no periódico *Planta Medica* (AMORIM *et al.*, 2019).

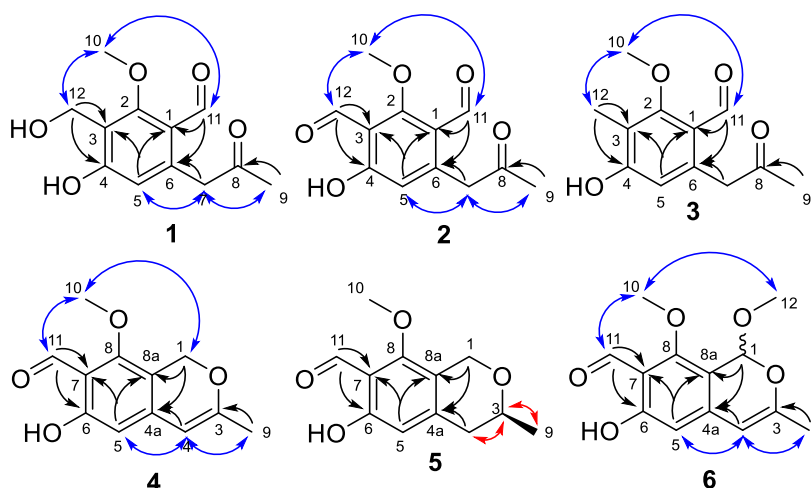
A substância **1** foi isolada como um sólido branco amorfo. A análise espectrométrica de massa de alta resolução (HRMS) deste composto exibiu um íon $[M - H]^-$ em m/z 237,0770 (calculado m/z 237,0768). Os dados obtidos indicaram uma fórmula molecular de $C_{12}H_{14}O_5$ e implicaram a presença de um índice de deficiência de hidrogênio de 6. Os espectros de RMN de ^1H e HSQC do composto **1** exibiram metino aromático em δ_H 6,40, um grupo aldeído em δ_H 10,18, bem como um oximetileno a δ_H 4,90 e um metileno a δ_H 3,97; esses espectros também apresentaram outros sinais em δ_H 3,80 e δ_H 2,37, que foram atribuídos aos grupos metoxila e metila, respectivamente (Tabela 8). Os dados de ^{13}C NMR obtidos para o composto **1** revelaram 12 ressonâncias que foram atribuídas a seis átomos de carbono aromáticos (δ_C 119,6, 164,2, 117,5, 162,7, 117,6 e 138,5), dois grupos carbonílicos (δ_C 206,9 e 190,0), um oximetileno (δ_C 57,7), um metileno (δ_C 49,2), um metil (δ_C 30,2) e um carbono de metoxila (δ_C 64,8) (Tabela 8). As correlações HMBC e NOESY foram essencialmente importantes, pois ajudaram no posicionamento dos grupos substituintes (Figura 21). No que diz respeito ao espectro de NOESY, a irradiação do H-10 resultou em interações com H₂-12 e H-11; isso permitiu o posicionamento do grupo metoxila entre os grupos aldeído e oximetileno. Da mesma forma, a irradiação de H₂-7 levou a interações com H-5 e H-9, o que permitiu o posicionamento do grupo metileno entre os grupos metino aromático e metila. As correlações HMBC do oximetileno (H₂-12) com o carbono aromático hidroxilado em δ_C 164,5 (C-4) permitiram o posicionamento do grupo oximetileno na C-3. Finalmente, as correlações HMBC de metileno (H-7) com C-1, C-6 e C-8, juntamente com as correlações da metila (H-9) com o carbono metileno (C-7) e a carbonila (C-8) contribuiu para a elucidação do composto **1** (esporulosaldeína A).

A substância **2** foi isolada como um sólido amorfo amarelo, onde sua fórmula molecular, determinada pela análise HRMS ($[M - H]^-$ m/z 235,0605, calculado m/z 235,0612), foi considerada $C_{12}H_{12}O_5$, exibindo a presença de dois átomos de hidrogênio a menos que a esporulosaldeína A (**1**), implicando a

presença de 7 índices de deficiência de hidrogênio. Os dados espectrais de RMN do composto **2** exibiram características quase idênticas às do composto **1** (Tabela 8). Essa similaridade indicou que o composto **2** era análogo à esporulosaldeína A (**1**), sendo a principal diferença a substituição do grupo oximetileno de um álcool primário por um grupo aldeído em δ_H 10,26, bem como a presença de um hidrogênio quelado em δ_H 12,18 no espectro de RMN de ^1H do composto **2** (esporulosaldeína B).

A substância **3** (esporulosaldeína C) foi isolada como um sólido branco amorfo, onde sua fórmula molecular, determinada pela análise de HRMS ($[M - H]^-$ m/z 221,0814, calculado m/z 221,0819), foi encontrada como $C_{12}H_{14}O_4$, sugerindo a presença de 6 índices de deficiência de hidrogênio. Os dados espectrais de RMN do composto **3** indicaram que este composto também era semelhante à esporulosaldeína A (**1**), com a diferença sendo a presença do grupo metila em δ_H 2,12 no espectro de RMN de ^1H do composto **3** ligado a C-3 do anel aromático (Tabela 8).

Figura 21. Substâncias **1-6** e suas principais correlações observadas nos experimentos de HMBC ($\rightarrow$), NOESY ($\leftrightarrow$) e COSY ($\leftrightarrow$).



Fonte: Adaptado de AMORIM *et al.*, 2019.

A substância **4** foi isolada como um sólido amorfo amarelo, onde sua fórmula molecular, que foi determinada pela análise HRMS ($[M + H]^+$ m/z 221,0807, calculado m/z 221,0808), foi encontrada como $C_{12}H_{12}O_4$. Os espectros de RMN do composto **4** exibiram ressonâncias na fração aromática semelhantes

às do composto **2**. Contudo, verificou-se que o composto **4** exibiu uma característica distinta, refletida pela presença de um anel de 1*H*-isocromeno substituído por metila (Tabela 9). A análise dos espectros de RMN de ^1H e HSQC do composto **4** revelou os sinais correspondentes anel pirano, um oximetileno a δ_{H} 5,10 (H-1), um metino a δ_{H} 5,61 (H-4) e uma metila a δ_{H} 1,97 (H-9). Do mesmo modo para os compostos anteriores, as correlações HMBC e NOESY foram essencialmente importantes para o posicionamento dos grupos substituintes (Figura 21) e contribuíram para a elucidação do composto **4**. As correlações de HMBC de H-1 a C-4a (δ_{C} 143,0) e C-8a (δ_{C} 109,9); H-4 a C-8a revelaram que C-1 (δ_{C} 63,2) e C-4 (δ_{C} 101,5) estavam em ponte através da ligação dupla 4a,8a. Além disso, o grupo metila foi posicionado no carbono quaternário em δ_{C} 160,9 (C-3) por correlações HMBC de H-9 a C-3 e C-4 para elucidação da esporulosaldeína D (**4**).

A substância **5** (esporulosaldeína E) foi isolada como um sólido amorfo amarelo, onde sua fórmula molecular, determinada pela análise HRMS ($[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z 223,0955, calculado m/z 223,0965), foi encontrada como $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$, indicando dois átomos de hidrogênio adicionais em comparação com a esporulosaldeína D (**4**). Em relação ao composto **5**, seus espectros de RMN indicaram a presença de uma fração isocromano em vez de um anel 1*H*-isocromeno, como em **4** correspondente aos hidrogênios diastereotópicos em δ_{H} 2,66 e 2,72 (H₂-4) e um hidrogênio metino em δ_{H} 3,77 (H-3, 1H, m) (Tabela 9); originando um centro estereogênico em C-3.

A substância **6** (esporulosaldeína F) foi isolada como um sólido amorfo amarelo, e seus espectros de RMN exibiram muitas semelhanças com os espectros obtidos para o composto **4**. Com o auxílio da análise HRMS ($[\text{M} + \text{Na}]^+$ m/z 273,0729, calculado m/z 273,0733 e $[\text{M} - \text{CH}_3\text{OH} + \text{H}]^+$ m/z 219,0649, calculado m/z 219,0652), a fórmula molecular do composto **6** foi determinada como $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_5$. Nota-se que, embora exijam os mesmos 7 índices de deficiência de hidrogênios, a estrutura deste composto difere da estrutura do composto **4** em virtude da adição de um grupo metoxil em C-1 (δ_{C} 96,4). Os espectros de RMN de **6** permitiram identificar uma oxidação em C-1 em relação à esporulosaldeína D (**4**), permitindo a introdução de um centro estereogênico em C-1 no composto **6** (Tabela 9).

Tabela 8. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) para **1-3**.

1 ^a		2 ^a		3 ^b		
Posição	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , tipo	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , tipo	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , tipo ^c
1		119,6, C		119,4, C		118,2, C
2		164,2, C		170,3, C		166,0, C
3		117,5, C		113,2, C		117,2, C
4		162,7, C		166,9, C		165,2, C
5	6,40 s	117,6, CH	6,56 s	118,6, CH	6,40 s	116,0, CH
6		138,5, C		147,6, C		137,0, C
7	3,97 s	49,2, CH ₂	4,05 s	49,7, CH ₂	3,94 s	48,8, CH ₂
8		206,9, C		203,9, C		207,5, C
9	2,37 s	30,2, CH ₃	2,36 s	30,2, CH ₃	2,25 s	28,6, CH ₃
10	3,80 s	64,8, CH ₃	4,07 s	67,8, CH ₃	3,82 s	62,3, CH ₃
11	10,18 s	190,0, CH	10,25 s	188,4, CH	10,12 s	190,6, CH
12	4,90 s	57,7, CH ₂	10,26 s	193,4, CH	2,12 s	7,37, CH ₃
OH			12,18 s			

^a Adquirido em CDCl₃; ^b Adquirido em CD₃OD; ^c Sinais foram assimilados com base nos dados de HSQC e HMBC.

Fonte: Adaptado de AMORIM *et al.*, 2019.

Tabela 9. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) para **4-6**.

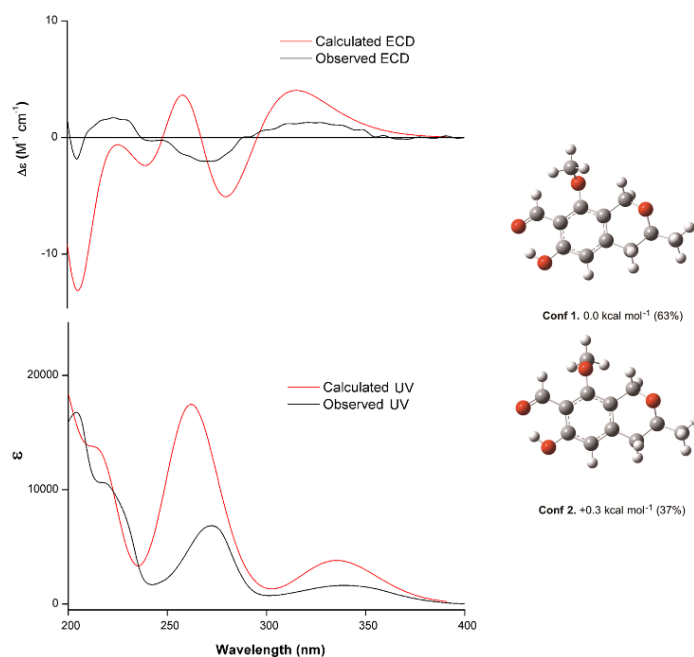
4^a			5^a		6^b	
Posição	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}, tipo	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}, tipo	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}, tipo
1	5,10 s	63,2, CH ₂	4,95 d (14,8) 4,65 ddd (14,8; 1,4; 1,0)	63,8, CH ₂	6,16 s	96,4, CH
3		160,9, C	3,77 (m)	70,5, CH		157,7, C
4	5,61 s	101,5, CH	2,66 dd (17,3; 10,3) 2,72 ddd (17,3; 3,5; 1,0)	36,7, CH ₂	5,85 q (0,90)	102,0, CH
4a		143,0, C		146,8, C		142,5, C
5	6,26 s	106,3, CH	6,50 s	113,1, CH	6,35 s	107,4, CH
6		163,8, C		161,3, C		164,9, C
7		112,2, C		112,9, C		113,7, C
8		158,1, C		159,4, C		162,5, C
8a		109,9, C		119,0, C		112,8, C
9	1,97 s	20,0, CH ₃	1,35 d (6,10)	21,6, CH ₃	2,05 d (0,90)	20,1, CH ₃
10	3,85 s	64,2, CH ₃	3,85 s	63,8, CH ₃	3,98 s	66,0, CH ₃
11	10,07 s	192,5, CH	10,18 s	194,0, CH	10,13 s	194,2, CH
12					3,54 s	55,3, CH ₃
OH	11,88 s		11,45 s			

^a Adquirido em CDCl₃; ^b adquirido em CD₃OD.

Fonte: Adaptado de AMORIM *et al.*, 2019.

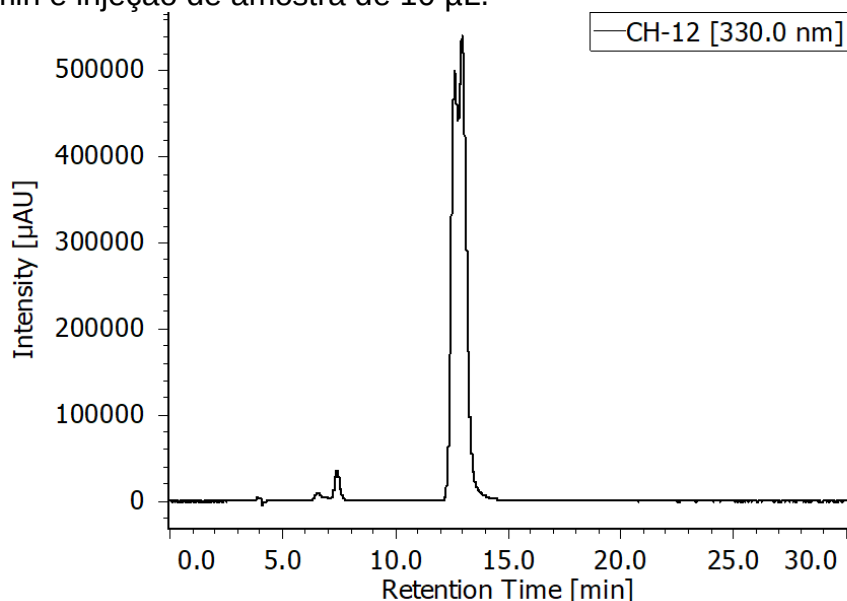
Depois que as estruturas dos compostos quirais **5** e **6** foram estabelecidas, a espectroscopia quiróptica foi usada para determinar suas configurações absolutas. O composto **5** ($[\alpha]_D^{20} + 88$ (c 0,1, CHCl₃)) teve sua configuração absoluta determinada pela comparação entre os dados experimentais de dicroísmo circular eletrônico (ECD) e os dados calculados usando a teoria do funcional de densidade dependente do tempo (TDDFT). A Figura 22 apresenta a comparação dos espectros experimentais de UV e ECD de (+)-**5** em metanol com os dados simulados para a média de Boltzmann dos dois conformeros de menor energia identificados para (S)-**5** no nível B3LYP/PCM (MeOH)/TZVP. A concordância muito boa observada aqui, juntamente com os espectros simulados por TDDFT, permitiu atribuir a configuração absoluta de (+)-**5** como S. No que diz respeito ao composto **6**, a rotação específica nula observada indicou a presença de uma mistura racêmica. Esta conclusão foi ainda apoiada pela análise quiral por HPLC, que mostrou dois picos com uma razão enantiomérica de aproximadamente 50:50 em seu cromatograma (Figuras 23 e 24).

Figura 22. Comparação dos espectros de UV e ECD de (+)-**5** em metanol (linha preta) com os espectros calculados para (S)-**5** (linha vermelha).



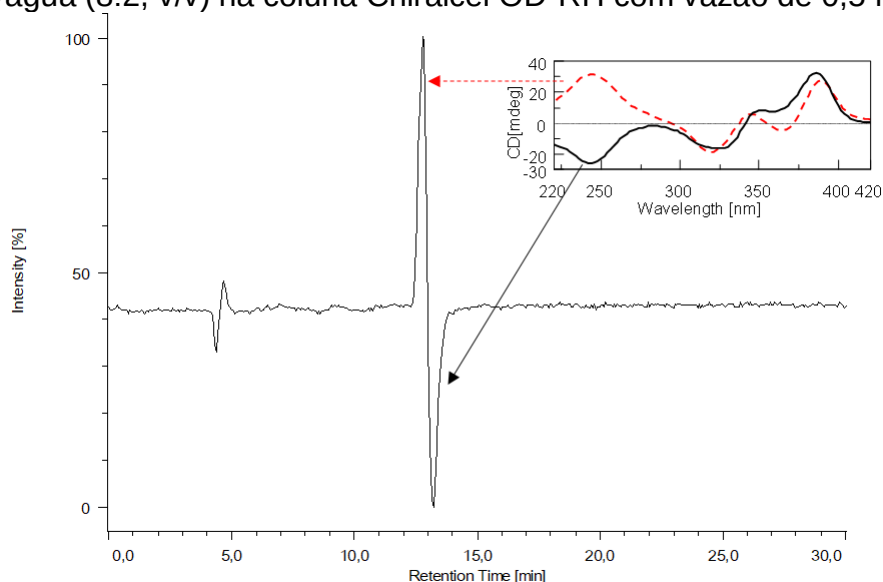
Fonte: AMORIM *et al.*, 2019.

Figura 23. Cromatograma mostrando a separação da mistura racêmica do composto **6**, monitorada a 330 nm usando a coluna Chiralcel OD-RH. A fase móvel consistiu em metanol/água (8:2, v/v) em eluição isocrática. A vazão foi de 0,5 mL/min e injeção de amostra de 10 μ L.



Fonte: AMORIM *et al.*, 2019.

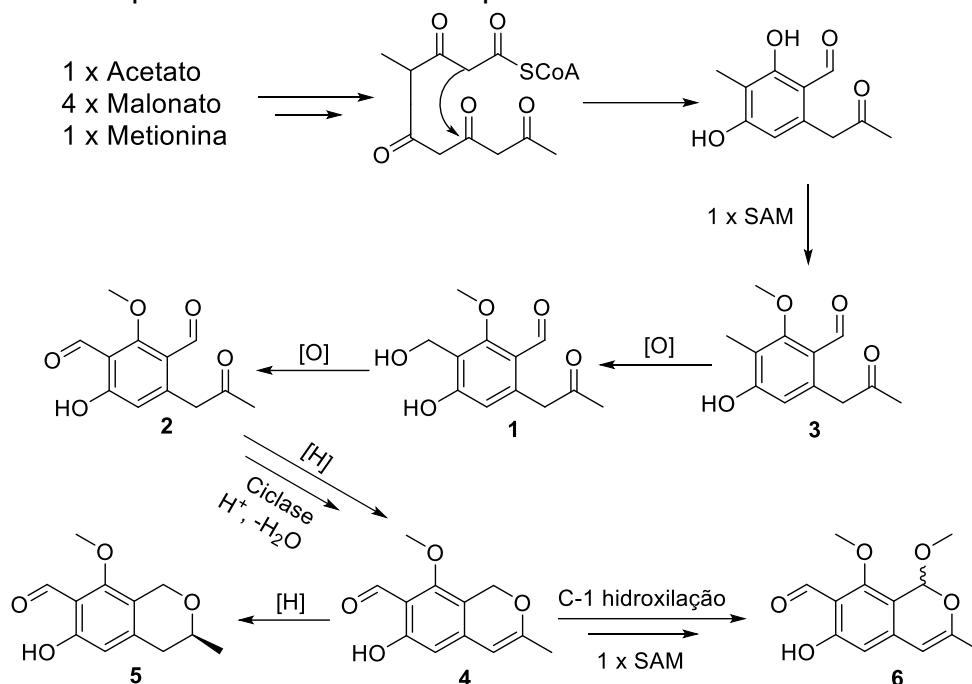
Figura 24. Cromatograma mostrando a separação da mistura racêmica de **6** monitorada com detector de CD a 254 nm e seus espectros de CD em metanol/água (8:2, v/v) na coluna Chiralcel OD-RH com vazão de 0,5 mL/min.



Fonte: AMORIM *et al.*, 2019.

Uma provável via biossintética em direção à formação das substâncias **1-6** a partir da via policetídic seguída por processos de ciclização, oxidação, redução e metilação é mostrada na figura 25 (HASHIMOTO *et al.*, 2015).

Figura 25. Proposta de via biosintética para as substâncias **1-6**.



Fonte: Adaptado de AMORIM *et al.*, 2019.

4.8. Avaliação da atividade biológica das substâncias 1-6

As atividades biológicas das esporulosaldeínas A-F (**1-6**) foram avaliadas contra microrganismos patogênicos humanos (Tabela 10) e contra linhagens de células tumorais, LM3 (adenocarcinoma mamário murino), LP07 (adenocarcinoma pulmonar murino) e MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano) (Tabela 11) após 24 h usando o ensaio MTT. Apesar de todos os compostos investigados aqui serem inativos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas na concentração mais alta testada (250 µg/mL), eles mostraram atividade inibidora contra várias linhagens de *Candida* spp. apresentando valores de CIM variando de 7,8-250 µg/mL (Tabela 10). Curiosamente, o composto **5** exibiu a melhor atividade antifúngica (CIM = 7,8 µg/mL) contra *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. O composto **4** exibiu a melhor atividade antifúngica contra *C. parapsilosis* (CIM = 15,6 µg/mL) e *C. albicans* resistente a fluconazol; no caso deste último, este composto apresentou comportamento fungicida no mesmo valor que o da CIM (62,5 µg/mL). Vale ressaltar que evidências de atividades antibacterianas e antifúngicas moderadas para derivados de isocromano foram relatadas na literatura (LI *et al.*, 2014). Além disso, todos os compostos isolados foram submetidos a um ensaio de

citotoxicidade e a concentração inibidora de viabilidade celular em 50% (CI₅₀) dos compostos **1–6** está resumida na Tabela 11. Todos os compostos isolados não exibiram efeitos inibitórios contra LP07 (> 100 µM). Para as células tumorais MCF-7 e LM3, o composto **6** mostrou um nível fraco de citotoxicidade com valores de CI₅₀ de 34,4 µM (8,6 µg/mL) e 39,2 µM (9,8 µg/mL), respectivamente, enquanto os outros compostos estavam inativos (> 100 µM). Embora os compostos avaliados não apresentem citotoxicidade promissora, é importante notar que os benzopiranos têm importância como agentes anticâncer, incluindo investigações clínicas de benzopiranos de terceira geração em um estudo de Fase 1 (KURAMOCHI *et al.*, 2013; STEVENSON *et al.*, 2018).

Tabela 10. Avaliação da atividade antimicrobiana para as substâncias **1-6**.

Compostos	CIM (CFM) [µg/mL]							
	<i>E. coli</i>	<i>S. setubal</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>
1	– ^a	– ^a	– ^a	250 (250)	125 (125)	125 (125)	62,5 (125)	NE
2	– ^a	– ^a	– ^a	125 (125)	125 (125)	15,6 (125)	31,2 (125)	15,6 (62,5)
3	– ^a	– ^a	– ^a	250 (250)	125 (125)	125 (125)	62,5 (500)	NE
4	– ^a	– ^a	– ^a	62,5 (62,5)	15,6 (125)	15,6 (125)	15,6 (125)	62,5 (125)
5	– ^a	– ^a	– ^a	62,5 (125)	31,2 (125)	7,8 (125)	7,8 (125)	7,8 (125)
6	– ^a	– ^a	– ^a	62,5 (125)	31,2 (125)	62,5 (125)	31,2 (125)	31,2 (62,5)
Ampicilina	12,5	25,0	0,39	NA	NA	NA	NA	NA
Anfotericina B	NA	NA	NA	10,0	0,78	0,78	0,39	0,78
Fluconazol	NA	NA	NA	R	NA	NA	NA	NA

^a Não apresentou atividade na maior concentração testada; NE: não avaliado; NA: não aplicável; R: resistente.

Tabela 11. Valores de CI₅₀ (µM) para as substâncias **1-6** contra linhagens de célula tumoral.

Compostos	LM3	LP07	MCF-7
1	– ^a	– ^a	– ^a
2	– ^a	– ^a	– ^a
3	– ^a	– ^a	– ^a
4	> 100	> 100	> 100
5	> 100	> 100	> 100
6	39,2* (38,1–40,3)**	> 100	34,4* (33,2–35,6)**
Doxorubicina	0,02* (0,02–0,02)**	0,05* (0,04–0,05)**	0,04* (0,04–0,04)**

^a Não apresentou atividade na maior concentração testada; * valores médios; ** 95% intervalo de confiança.

Fonte: Adaptado de AMORIM *et al.*, 2019.

4.9. Análise por LC-MS do extrato AcOEt quando o endófito *P. sporulosa* foi cultivado em PDB e direcionamento para isolamento de compostos nitrogenados

A análise do extrato AcOEt do endófito *P. sporulosa* quando cultivado em PDB por LC-MS (Figura 26) permitiu a aquisição de dados de m/z dos íons presentes na matriz, as fragmentações de segunda ordem MS/MS dos íons precursores e os espectros de absorção na região do UV. Estas informações foram organizadas e utilizadas para anotação das esporulaldeinas A-F descritas anteriormente para evitar o reisolamento destas substâncias (Tabela 12).

Nesta etapa, observou sinais de íons de m/z que apresentavam fórmulas moleculares de substâncias nitrogenadas, e consequentemente, que ainda não haviam sido isoladas quando o endófito *P. sporulosa* havia sido cultivado em Arroz. Dessa forma, a tentativa de isolar esses compostos foi idealizada e o direcionamento do fracionamento do extrato AcOEt do endófito *P. sporulosa* cultivado em meio líquido PDB por técnicas cromatográficas (CPG utilizando Sephadex® LH-20 e HPLC-DAD) resultou no isolamento de novas substâncias derivadas das isoquinolinas (**7-9**) a partir da fração J2.

Figura 26. Cromatogramas do extrato do endófito *P. sporulosa* cultivado em PDB: **A)** BPC no modo positivo; **B)** BPC no modo negativo; **C)** UV em 270nm.

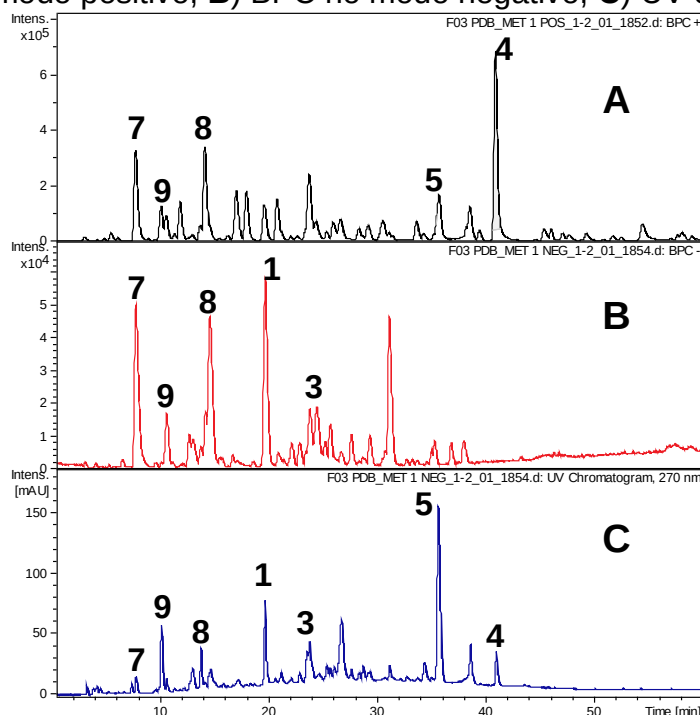
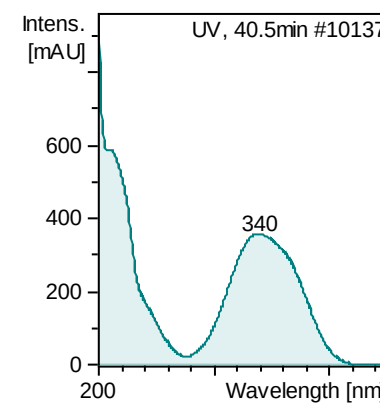
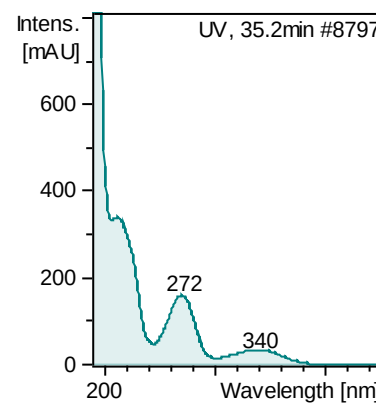
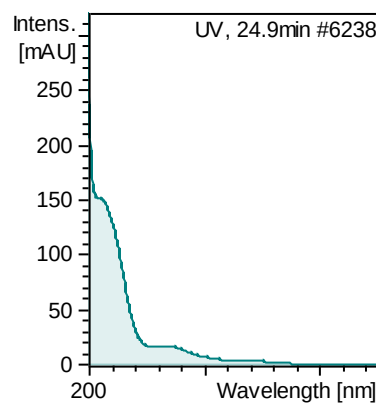
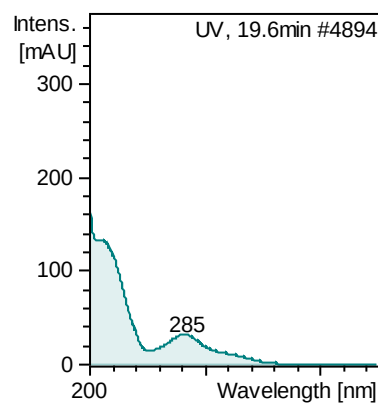
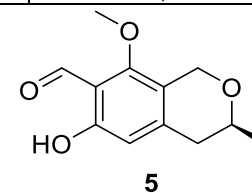
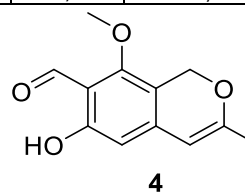
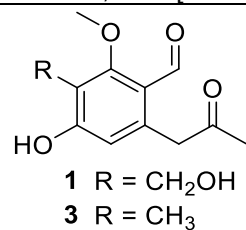


Tabela 12. Esporulosaldeinas identificadas por LC-MS no extrato do endófito *P. sporulosa* cultivado em PDB.

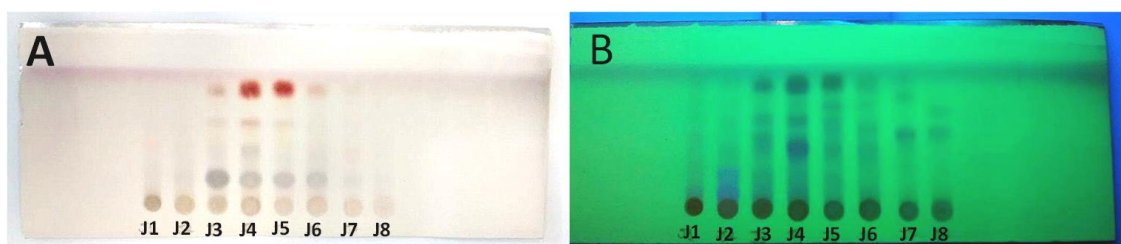
Substâncias	T _i (min)	m/z encontrado	Erro (ppm)	UV (nm)	MS/MS	Literatura
Sporulosaldein A (1)	19,6	237,0780 [M - H] ⁻	-4,9	217; 285	206	Amorim <i>et al.</i> , 2019
Sporulosaldein C (3)	24,9	221,0819 [M - H] ⁻	0,4	212; 285	192, 206	Amorim <i>et al.</i> , 2019
Sporulosaldein D (4)	40,5	221,0802 [M + H] ⁺	4,7	225; 253sh; 340	203, 189	Amorim <i>et al.</i> , 2019
Sporulosaldein E (5)	35,2	223,0955 [M + H] ⁺	4,6	223; 272; 340	205, 192	Amorim <i>et al.</i> , 2019



4.10. Fracionamento do extrato AcOEt proveniente do meio de cultivo em PDB e isolamento das substâncias

Após cromatografia de permeação em gel (Sephadex[®] LH-20) do extrato proveniente do meio de cultivo em PDB de *P. sporulosa* (1,05 g), as frações foram reagrupadas de acordo com as suas semelhanças de coloração e R_f por análise de CCD resultando em 8 frações finais codificadas de J1-J8 (Figura 27).

Figura 27. Análise por CCD das 8 frações finais codificadas de J1-J8 [gel de sílica, AcOEt/CHCl₃ (1:1, v/v), **A**) anisaldeído/H₂SO₄ e **B**) luz UV $\lambda = 254$ nm]



Depois de reagrupadas, as frações foram secas e suas massas determinadas. A tabela 13 mostra a distribuição das massas das frações obtidas após o procedimento de separação cromatográfica do extrato por permeação em gel. O rendimento do processo de fracionamento utilizando esta técnica cromatográfica foi de 84,7 %, pois foi aplicado na coluna 1,027 g de extrato e o total das massas obtidas das frações foi de 870,2 mg, havendo uma perda de 156,8 mg de extrato.

A fração J2 foi selecionada para purificação devido a percepção anteriormente por análise de LC-DAD-MS de que os picos cromatográficos de íons de razão m/z que forneciam fórmulas moleculares nitrogenadas apresentavam seus espectros de absorção na região do UV similares aos que estavam presentes na fração J2 analisada por HPLC-DAD. Assim, esta fração foi submetida à otimização cromatográfica por HPLC-DAD analítico (figura 28) e escalonado para purificação por HPLC-DAD preparativo resultando no isolamento das substâncias **7** ($t_r = 12,8$ min, 18,2 mg), **8** ($t_r = 23,4$ min, 3,7 mg), **9** ($t_r = 19,7$ min, 7.2 mg) e **10** ($t_r = 16,7$ min, 4,3 mg). Os picos cromatográficos relacionados às substâncias isoladas da fração J2 de *P. sporulosa* estão representados no cromatograma da figura 28 e seus respectivos espectros de absorção na região do UV representados na figura 29.

De acordo com a similaridade dos espectros de absorção na região do UV esperava-se que os compostos **7**, **8** e **9** fossem da mesma classe de substâncias, e o composto **10** a outra classe de metabólitos.

Tabela 13. Distribuição das massas das frações após separação por permeação em gel e agrupamentos por CCD.

Frações	Agrupamento	Massa (mg)
J1	01-52	270,6
J2	53-64	195,2
J3	65-78	126,7
J4	79-95	135,3
J5	96-112	67,6
J6	113-132	35,9
J7	133-150	23,2
J8	151-196	15,7
Massa Total		870,2

Figura 28. Cromatograma HPLC-DAD analítico da fração J2 de *P. sporulosa*. Coluna Luna RP18 com 250 x 4,6 mm d.i.; 5 μ m), λ = 254-330 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: MeOH + TFA 0,05% (B) e H₂O + TFA 0,05% (A). O gradiente foi de 20-100% B (50 min), volume 10 μ L.

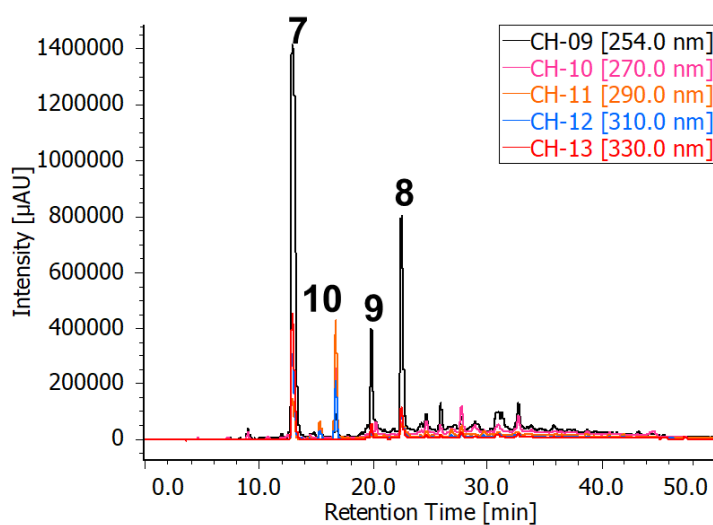
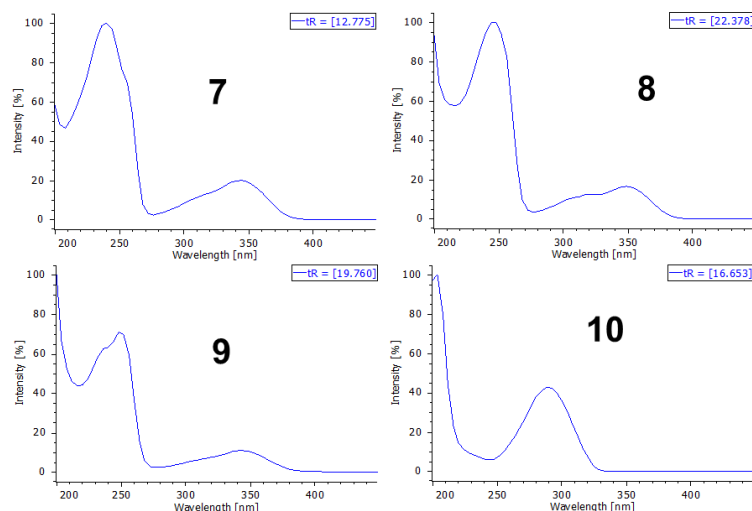


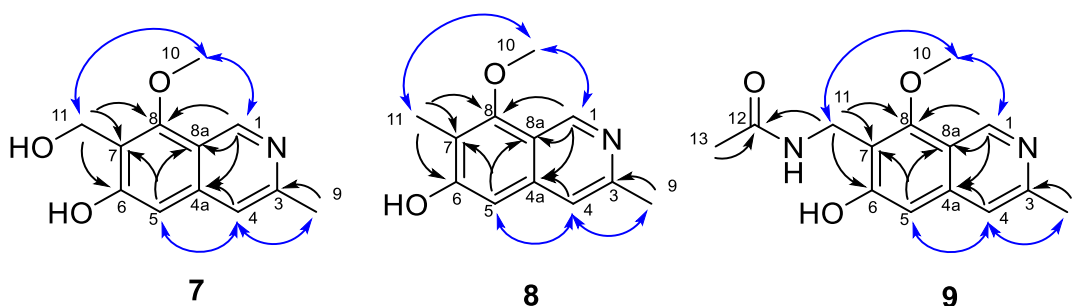
Figura 29. Espectros de absorção na região do UV das substâncias **7-10**, na fração J2 de *P. sporulosa*.



4.11. Elucidação estrutural das substâncias 7-9

Após proceder a separação por HPLC-DAD preparativo da fração J2 de *P. sporulosa* cultivado em PDB, foi realizado a análise por métodos espectroscópicos e espectrométricos das substâncias **7-9** (Figura 30)

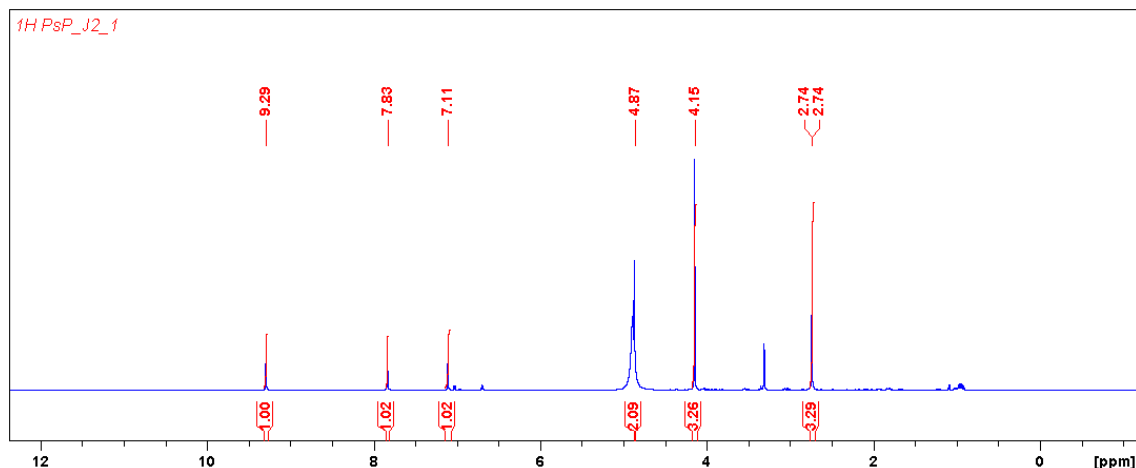
Figura 30. Substâncias **7-9** e suas principais correlações observadas no experimento de HMBC ($\rightarrow$) e as interações em NOESY ($\leftrightarrow$).



Análise dos espectros de RMN de ^1H e HSQC da substância **7** (Figuras 31 e 33) mostrou a presença de hidrogênios aromáticos, um simpleto em δ_{H} 7,11 (1H, s, H-5), δ_{H} 7,83 (1H, s, H-4) e δ_{H} 9,29 (1H, s, H-1), este último hidrogênio apresentou maior deslocamento químico devido estar em posição orto ao nitrogênio do anel piridinico (Tabela 14). Adicionalmente, percebeu-se a presença de sinal de grupo metila em δ_{H} 2,74 (3H, d, $J = 0,6$ Hz, H-9), sinal de

grupo metoxila em δ_H 4,15 (3H, s, H-10) e também, sinal de oximetileno em δ_H 4,87 (2H, s, H-11).

Figura 31. Espectro de RMN de ^1H da substância **7** (600 MHz, CD_3OD).



No espectro de RMN de ^{13}C da substância **7** (Figura 32), observou-se 12 sinais de ressonância (Tabela 14). A presença de carbonos oxigenados com deslocamentos químicos típicos de carbonos quaternários com grupos hidroxila ligado, carbono 6 [δ_C 168,0 (C-6)], e grupo metoxila ligado, carbono 8 [δ_C 160,5 (C-8)], assim como de metila [δ_C 18,7 (C-9)] e o carbono da metoxila [δ_C 65,9 (C-10)]. Observou-se ainda deslocamento típico de metileno oxigenado [δ_C 54,4 (C-11)], carbono de metino ligado a átomo de nitrogênio [δ_C 142,2 (C-1)], e os carbonos quaternários em δ_C 143,8 (C-3), δ_C 143,3 (C-4a), δ_C 126,9 (C-7) e δ_C 117,8 (C-8a).

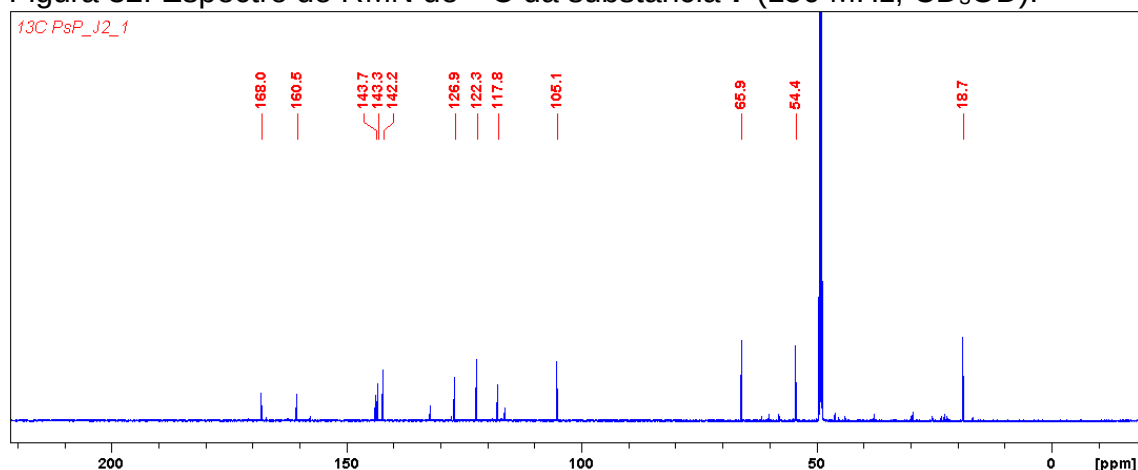
Com o mapa de correlação HSQC (Figura 33) foi possível atribuir todos os hidrogênios a seus respectivos carbonos à ^1J e com os experimentos HMBC (Figura 34) foi possível atribuir as correlações à ^2J e ^3J , possibilitando fazer a atribuição aos carbonos quaternários. A atribuição do grupo metila no carbono quaternário C-3 deve-se às correlações de H-9 com C-3 e C-4. Ainda foram observadas correlações nos experimentos de HMBC (Figura 34) entre os hidrogênios H-5 com o C-5, C-7, C-4a, C-8a; do hidrogênio H-4 com o C-4a, C-5, C-8a, C-9; e do hidrogênio metino H-1 com C-8, C-8a e C-4a justificando que C-1 e C-4 estavam interligados por uma ligação dupla do anel benzênico pentasubstituído.

Tabela 14. Dados de RMN de ^1H (600 MHz), ^{13}C (150 MHz), HMBC e NOESY para a substância **7** (CD_3OD).

7				
Posição	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , tipo	HMBC	NOESY
1	9,29 s	142,2, CH	117,8; 143,8; 143,3	4,15
3	-	143,8, C		
4	7,83 sl	122,3, CH	18,7; 105,1; 117,8; 143,8; 143,3	7,11; 2,74
4a	-	143,3, C		
5	7,11 s	105,1, CH	117,8; 122,3; 126,9; 168,0	7,83
6	-	168,0, C		
7	-	126,9, C		
8	-	160,5, C		
8a	-	117,8, C		
9	2,74 d (0,6)	18,7, CH_3	122,3; 143,8; 143,3	7,83
10	4,15 s	65,9, CH_3	160,5	4,87; 9,29
11	4,87 s	54,4, CH_2	126,9; 160,5; 168,0	4,15

Dados importantes foram obtidos no experimento de NOESY 1D (Figuras 35 e 36) auxiliando na posição dos substituintes na molécula proposta. No espectro de NOESY 1D, irradiando em H-10 observaram-se interações com H-1 e H-11 (Figura 35), e que estes quando irradiados só faziam interação com H-10, posicionando o substituinte metoxila entre o grupo oximetileno (H-11) e o grupo metino (H-1). Adicionalmente, irradiando em H-4 observaram-se interações com H-5 e H-9 (Figura 36), e que estes quando irradiados apresentam apenas interação com H-4, posicionando o hidrogênio H-4 entre o grupo metila e o hidrogênio aromático H-5 e corroborando com os dados de HMBC.

Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **7** (150 MHz, CD_3OD).



O espectro de massas de alta resolução para **7** no modo negativo, apresentou o íon da molécula desprotonada em m/z 218,0819 $[M - H]^-$ (Calculado m/z 218,0816) (Figura 37), compatível com a fórmula molecular $C_{12}H_{13}NO_3$ confirmando assim a estrutura.

Assim, a substância proposta para **7** foi denominada como 7-(hidroximetil)-8-metoxi-3-metilisoquinolina-6-ol (Figura 30). e está sendo descrita pela primeira vez na literatura.

Figura 33. Mapa de contornos HSQC da substância **7** (600 e 150 MHz, CD_3OD).

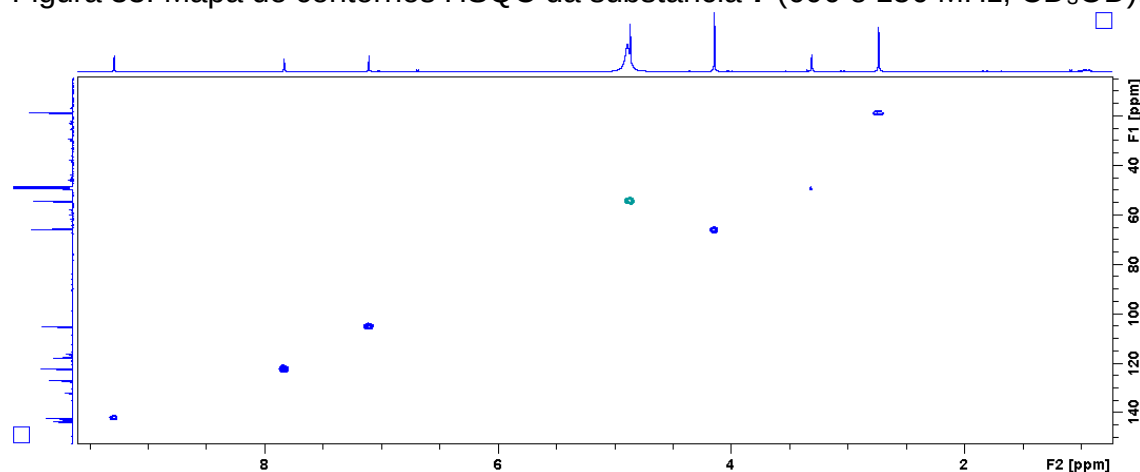


Figura 34. Mapa de contornos HMBC da substância **7** (600 e 150 MHz, CD_3OD).

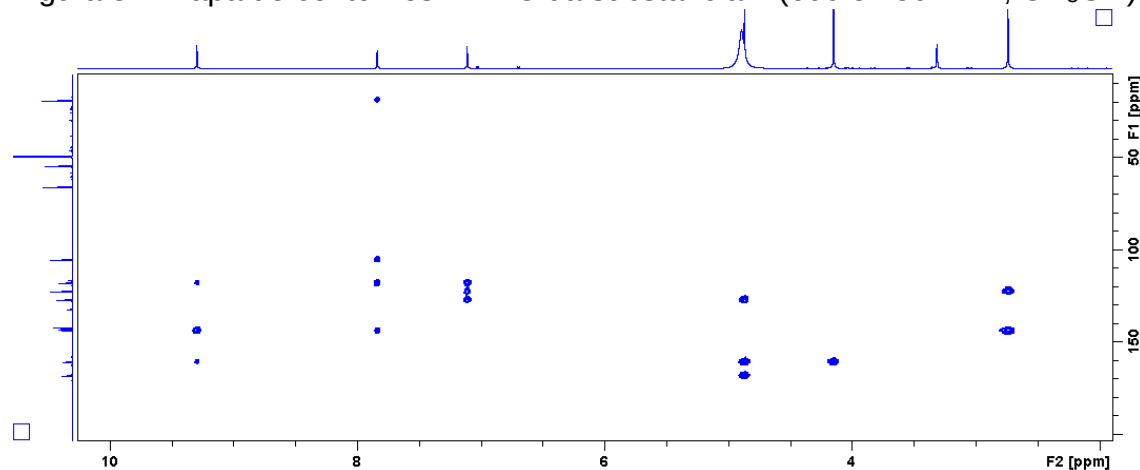


Figura 35. Experimento NOESY 1D, espectro de RMN de ^1H (A), irradiando em δ 7,83 (B) e irradiando em δ 4,15 (C) da substância **7** (600 MHz, CD_3OD).

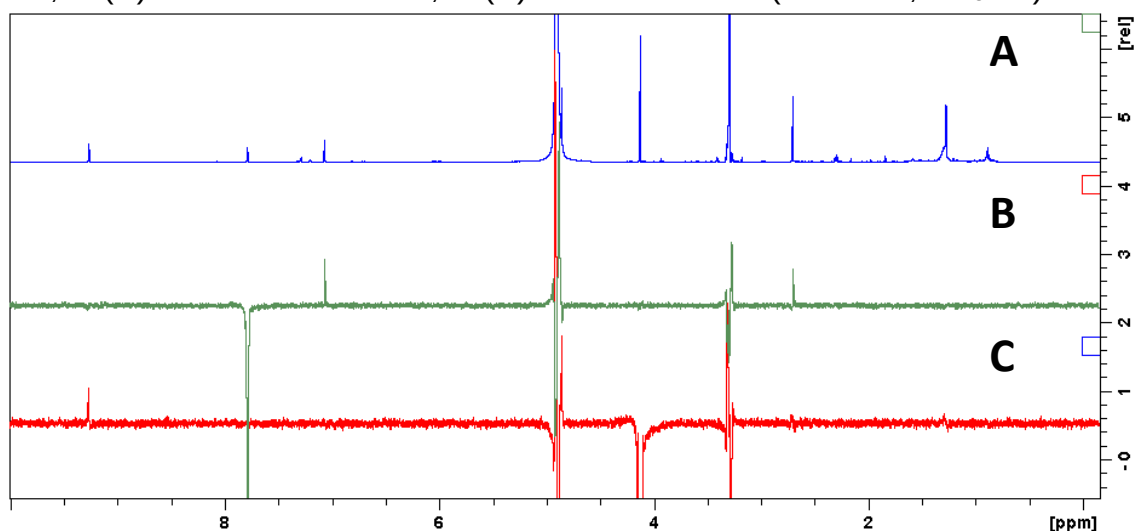


Figura 36. Ampliação do experimento NOESY 1D, espectro de RMN de ^1H (A), irradiando em δ 7,83 (B) e irradiando em δ 4,15 (C) da substância **7** (600 MHz, CD_3OD).

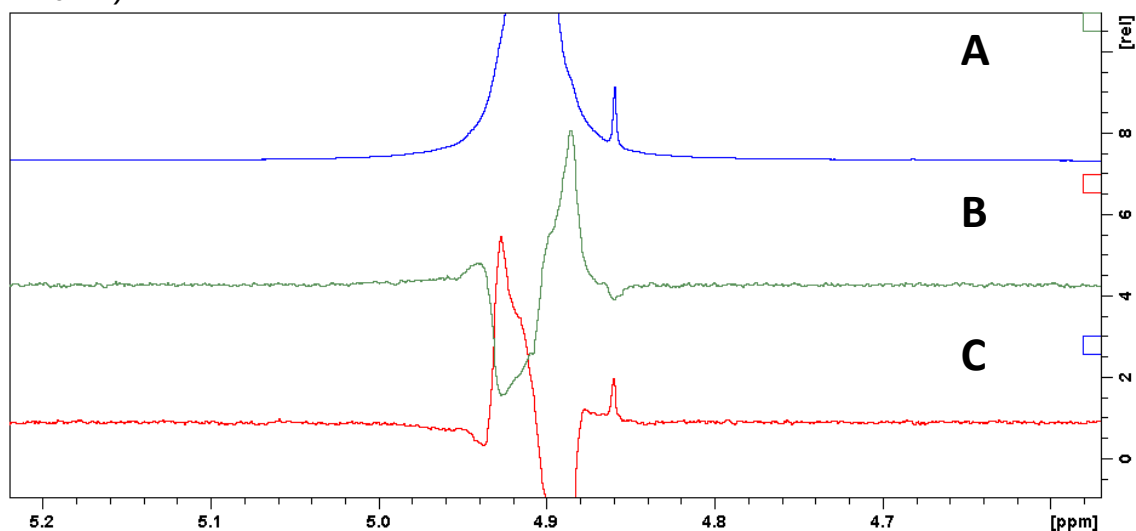
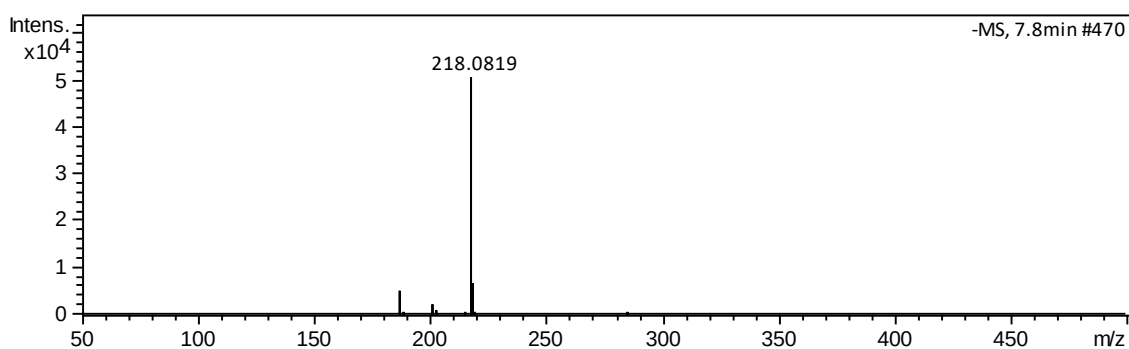


Figura 37. Espectro de massas de primeira-ordem de **7** obtido em modo negativo.



O composto **8** (Figura 30) foi isolado como um sólido amorfo amarelo, onde sua fórmula molecular, determinada pela análise HRMS ($[M-H]^-$ m/z 202,0866, calculado m/z 202,0874) (Figura 38), foi considerada $C_{12}H_{13}NO_2$, exibindo um átomo de oxigênio a menos em relação ao metabólito secundário **7**, implicando a presença de 7 índices de deficiência de hidrogênio. Os dados espectrais de RMN 1D e 2D do composto **8** (Figuras 39-42) exibiram características quase idênticas às do composto **7** (Tabela 15), sendo a principal diferença a substituição do grupo oximetileno na posição C-7 do anel aromático por um grupo metila (δ_H 2,36, δ_C 9,9).

O composto **9** (Figura 30) também foi isolado como um sólido amorfo amarelo, onde sua fórmula molecular, determinada pela análise de HRMS ($[M-H]^-$ m/z 259.1095, calculado m/z 259,1088) (Figura 43), foi encontrada como $C_{14}H_{16}N_2O_3$, sugerindo a presença de 8 índices de deficiência de hidrogênio. Os dados espectrais de RMN mono e bidimensionais do composto **9** (Figuras 44-47) também indicaram que este composto era análogo à **7** e **8**, com a diferenciação de um grupo metil acetamida (δ_H 2,07, δ_C 20,7; δ_C 172.5) posicionado em C-7 do anel aromático (Tabela 15).

Dessa forma, as substâncias propostas para **8** e **9** foram denominadas como 8-metoxi-3,7-dimetilisoquinolina-6-ol e *N*-(6-hidroxi-8-metoxi-3-metilisoquinolina-7-il) metil acetamida, respectivamente, e estão sendo descritas pela primeira vez.

Tabela 15. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) para **7-9**.

	7		9		8	
no.	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , tipo	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , tipo	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type
1	9,29 s	142,2, CH	9,35 s	142,6, CH	9,24 s	141,2, CH
3	-	143,8, C	-	144,2, C	-	142,9, C
4	7,83 sl	122,3, CH	7,88 sl	122,5, CH	7,83 sl	122,1, CH
4a	-	143,3, C	-	143,8, C	-	142,1, C
5	7,11 s	105,1, CH	7,13 s	105,1, CH	7,08 s	104,3, CH
6	-	168,0, C	-	167,6, C	-	168,1, C
7	-	126,9, C	-	122,7, C	-	125,4, C
8	-	160,5, C	-	162,0, C	-	159,1, C
8a	-	117,8, C	-	117,6, C	-	117,8, C
9	2,74 d (0,6)	18,7, CH ₃	2,75 d (0,7)	18,8, CH ₃	2,73 sl	18,7, CH ₃
10	4,16 s	65,9, CH ₃	4,12 s	66,0, CH ₃	4,02 s	63,5, CH ₃
11	4,87 s	54,4, CH ₂	5,35 s	56,6, CH ₂	2,36 s	9,9, CH ₃
12				172,5, C		
13			2,07 s	20,7, CH ₃		

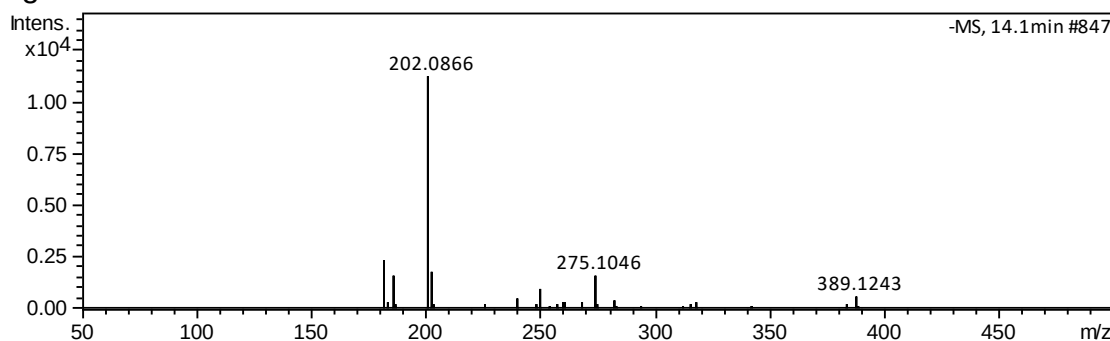
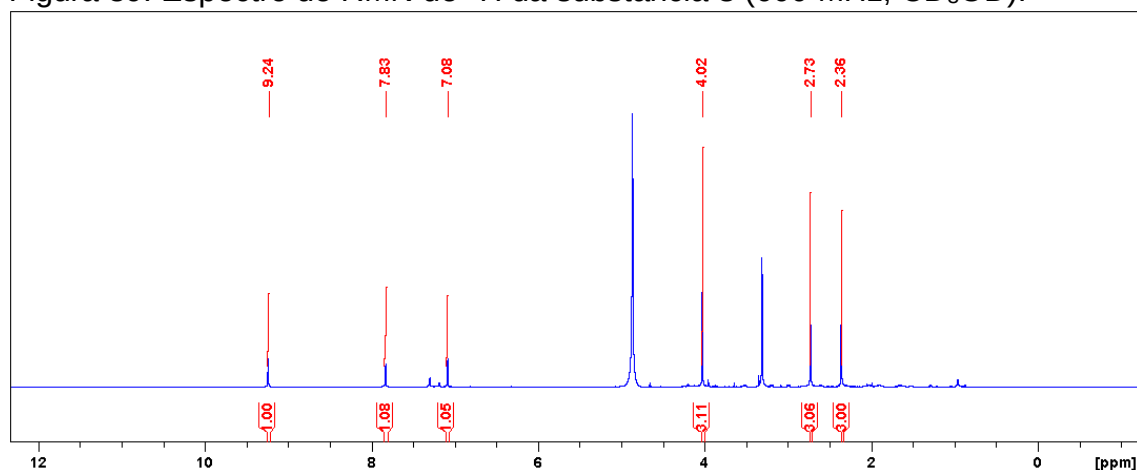
Adquiridos em CD₃OD.Figura 38. Espectro de massas de primeira-ordem de **8** obtido em modo negativo.Figura 39. Espectro de RMN de ^1H da substância **8** (600 MHz, CD₃OD).

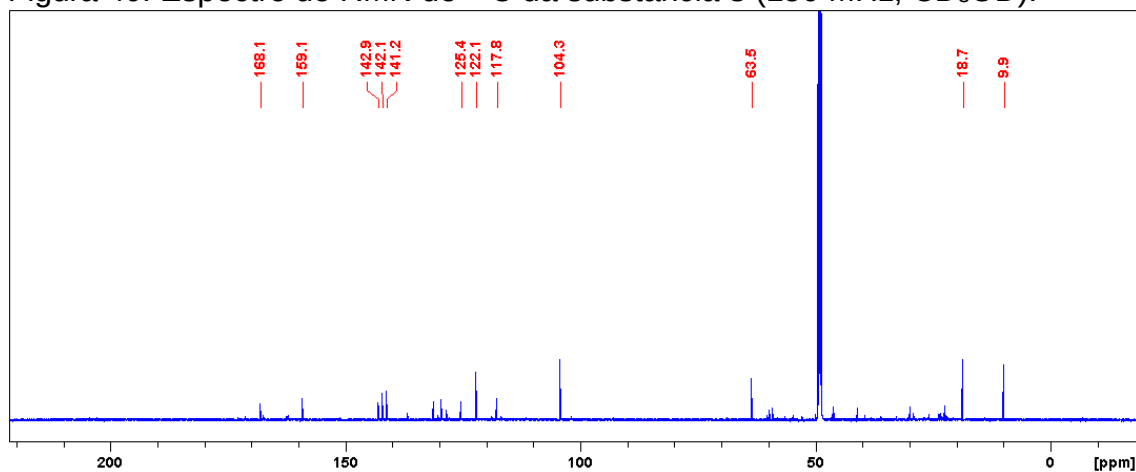
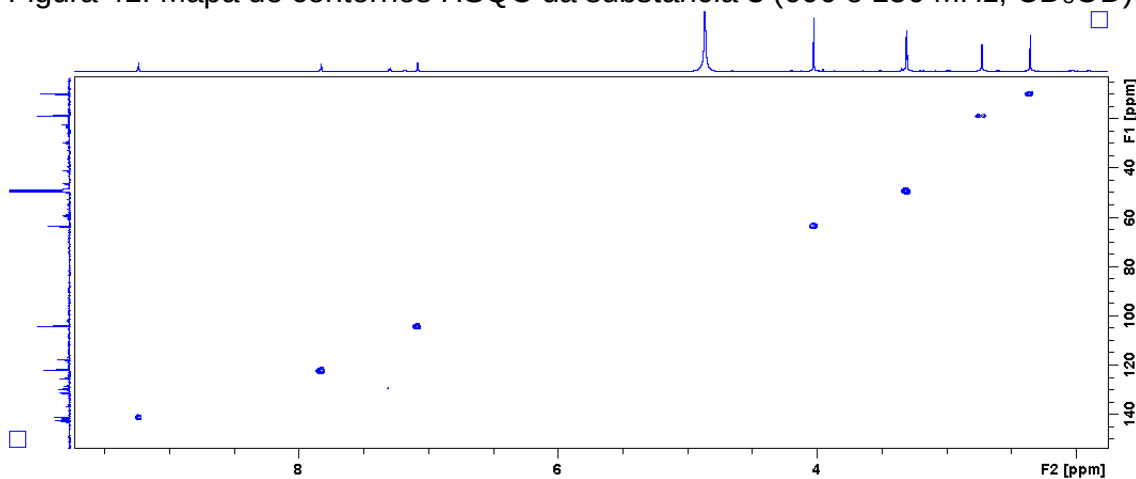
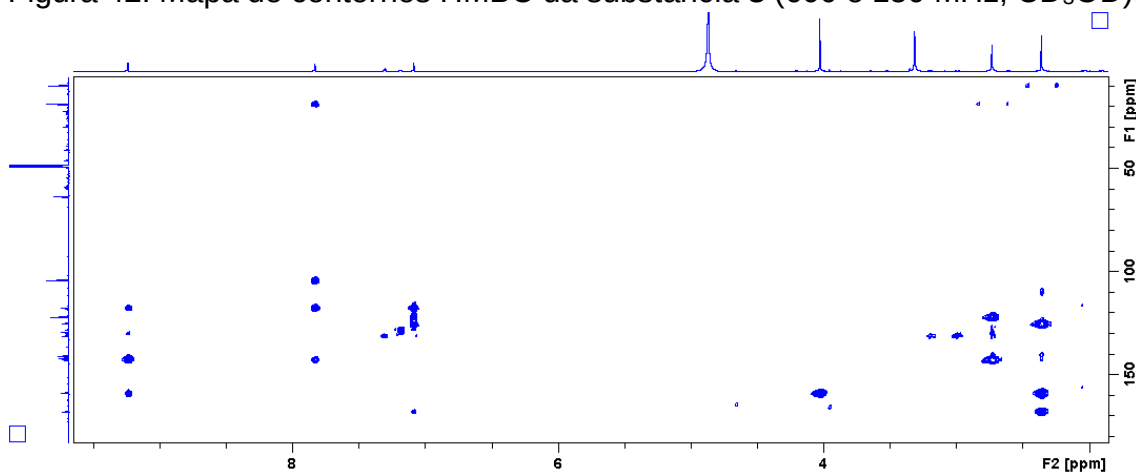
Figura 40. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **8** (150 MHz, CD_3OD).Figura 41. Mapa de contornos HSQC da substância **8** (600 e 150 MHz, CD_3OD).Figura 42. Mapa de contornos HMBC da substância **8** (600 e 150 MHz, CD_3OD).

Figura 43. Espectro de massas de primeira-ordem de **9** obtido em modo negativo.

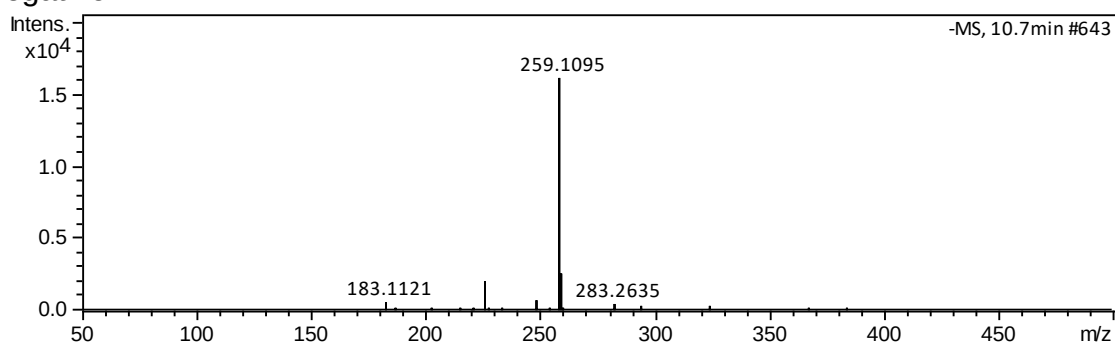


Figura 44. Espectro de RMN de ¹H da substância **9** (600 MHz, CD₃OD).

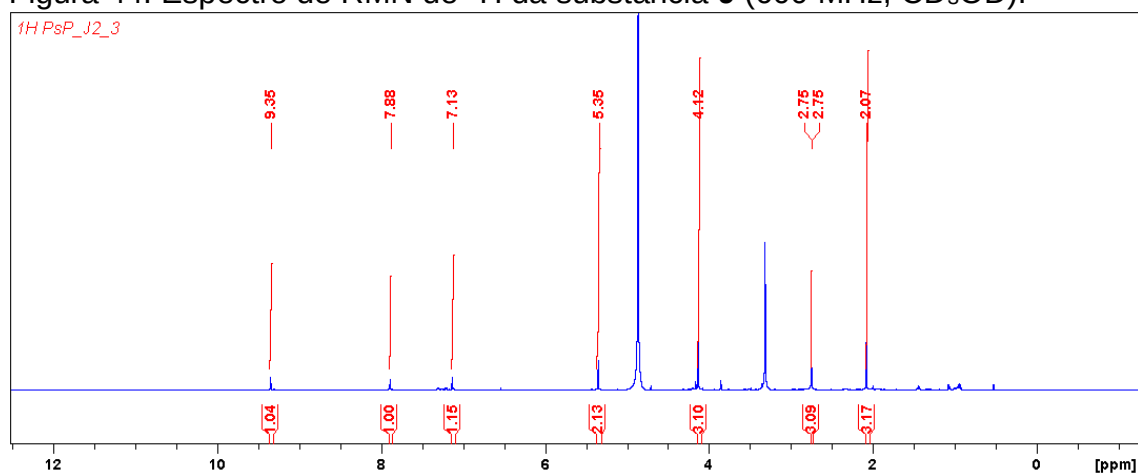


Figura 45. Espectro de RMN de ¹³C da substância **9** (150 MHz, CD₃OD).

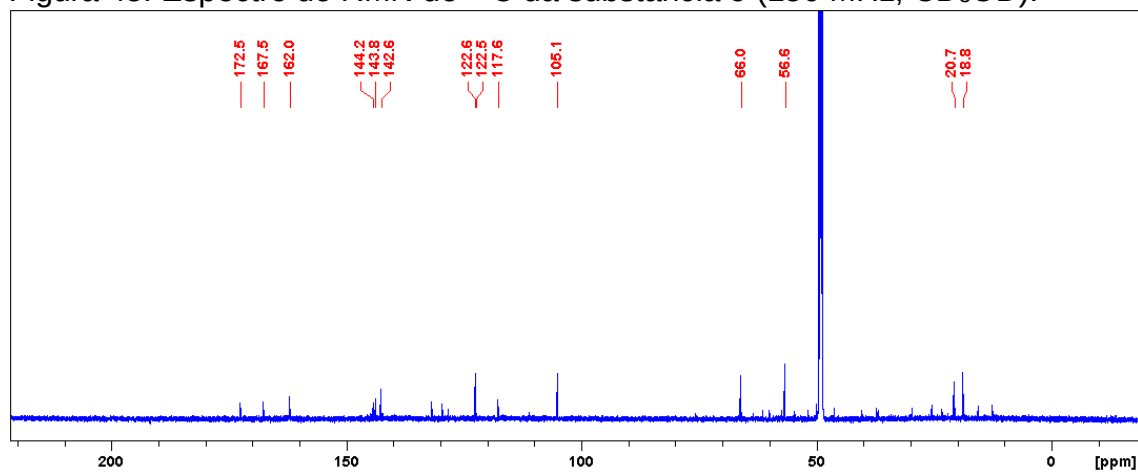


Figura 46. Mapa de contornos HSQC da substância **9** (600 e 150 MHz, CD₃OD).

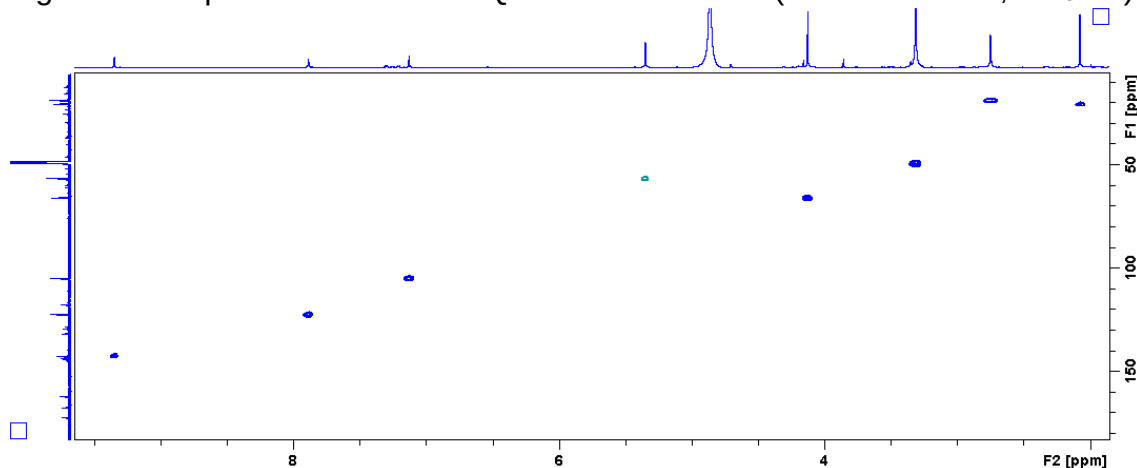
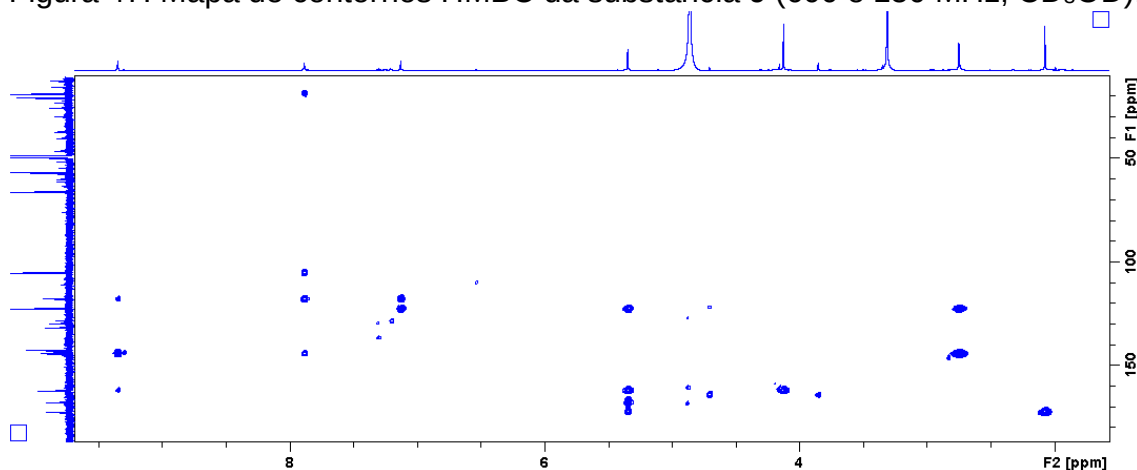


Figura 47. Mapa de contornos HMBC da substância **9** (600 e 150 MHz, CD₃OD).



4.12. Identificação da substância **10**

O composto **10** (Figura 48) foi isolado como um sólido amorfo branco, onde sua fórmula molecular, determinada por análises dos dados de RMN mono e bidimensionais (Figuras 49-53) e HRMS ($[M + H]^+$ m/z 185,0795, calculado m/z 185,0808) (Figura 54), foi encontrada como C₉H₁₂O₄.

A análise dos dados espectroscópicos e espectrométricos, e análise da rotação óptica de $[\alpha]_D^{20} + 37$ (c 0,2, MeOH, literatura: + 35 (c 0,2, MeOH), permitiu identificar o composto como sendo (S)-Chaetoquadrin F (Tabela 16) (FUJIMOTO *et al.*, 2003). Este metabólito está sendo descrito pela primeira vez no gênero *Paraphaeosphaeria*.

Figura 48. Substância **10** e suas principais correlações observadas no experimento de HMBC ($\rightarrow$) e as interações em COSY ($\leftrightarrow$).

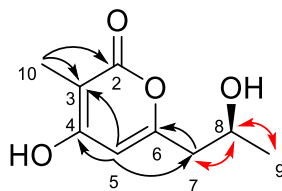


Tabela 16. Comparação dos dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) para o composto **10** com o descrito por Fujimoto *et al.*, 2003 (CD_3OD)

10		Chaetoquadrin F Fujimoto <i>et al.</i> , 2003 (CD_3OD)		
Posição	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , tipo	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , tipo
2	-	169,1, C	-	169,1, C
3	-	99,3, C	-	99,3, C
4	-	167,7, C	-	167,7, C
5	6,06 s	102,8, CH	6,05 s	102,8, CH
6	-	162,0, C	-	162,0, C
7a	2,58 dd (14,3; 5,1)	43,9, CH	2,57 dd (14,8; 5,4)	43,9, CH
7b	2,53 dd (14,3; 7,9)		2,52 dd (14,8; 6,8)	
8	4,11 m	66,2, CH	4,10 m	66,2, CH
9	1,22 d (6,3)	23,4, CH_3	1,21 d (6,4)	23,4, CH_3
10	1,86 s	8,2, CH_3	1,85 s	8,2, CH_3

Figura 49. Espectro de RMN de ^1H da substância **10** (600 MHz, CD_3OD).

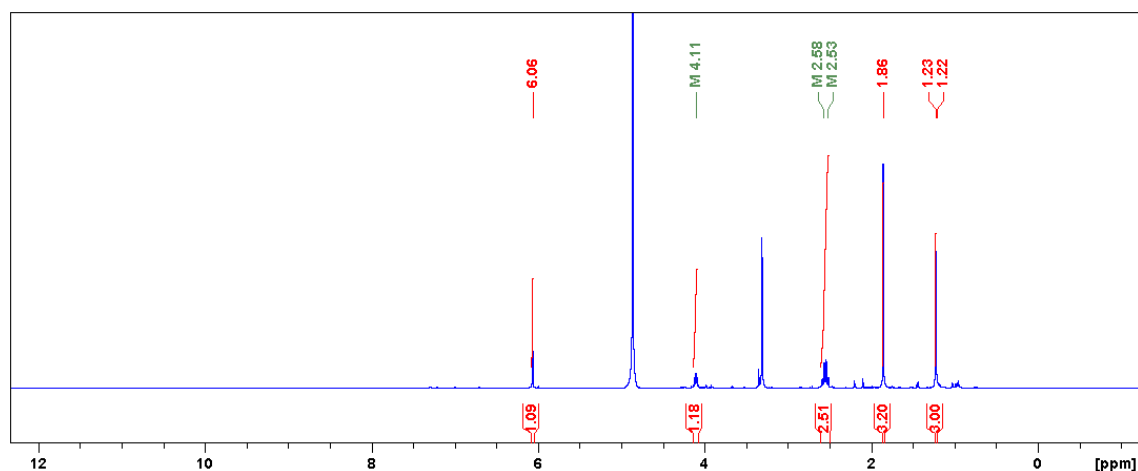


Figura 50. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **10** (150 MHz, CD_3OD).

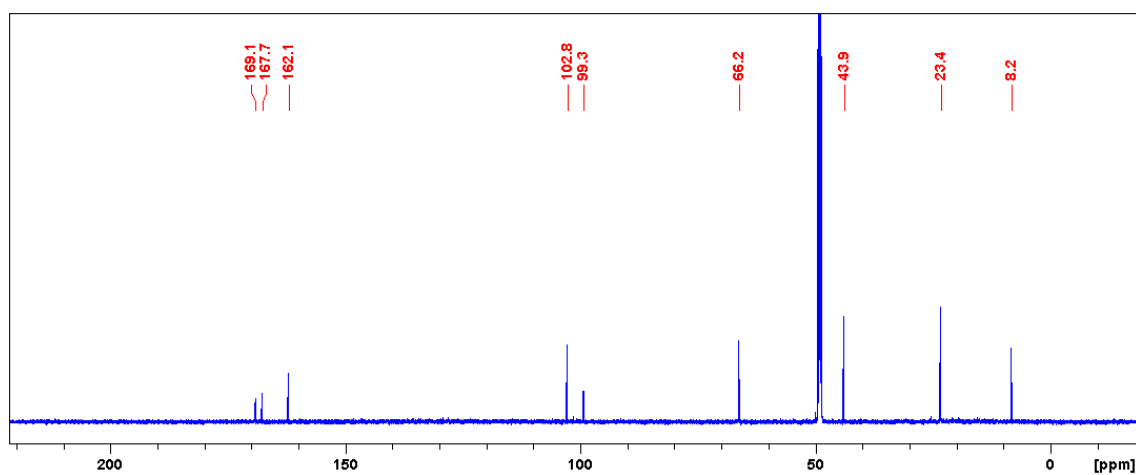


Figura 51. Mapa de contornos HSQC da substância **10** (600 e 150 MHz, CD_3OD).

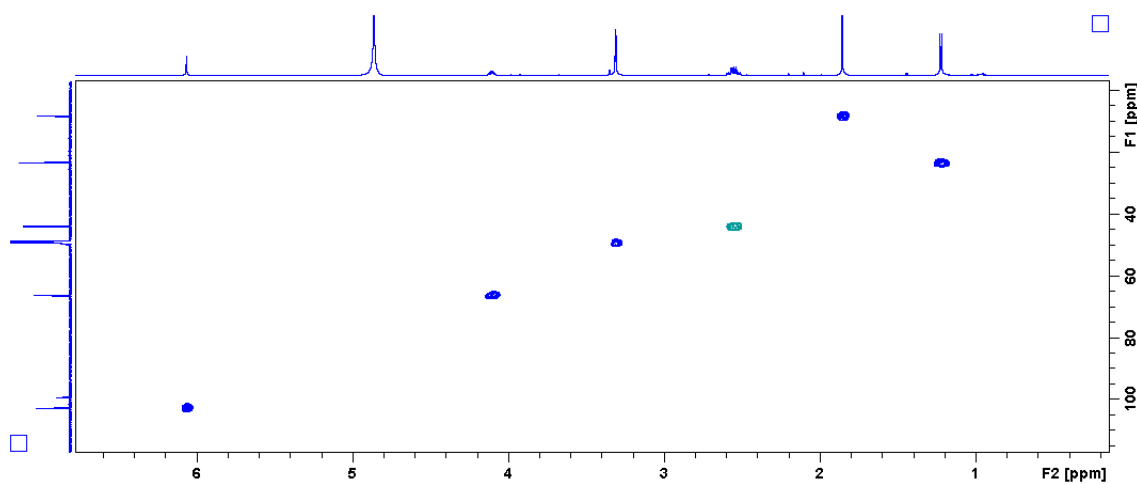


Figura 52. Mapa de contornos HMBC da substância **10** (600 e 150 MHz, CD_3OD).

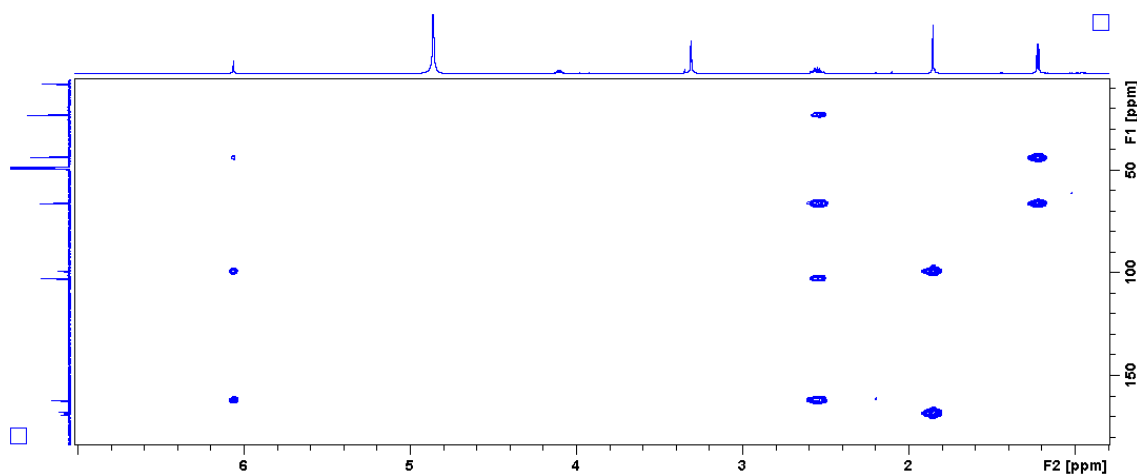


Figura 53. Mapa de contornos COSY da substância **10** (600 MHz, CD₃OD).

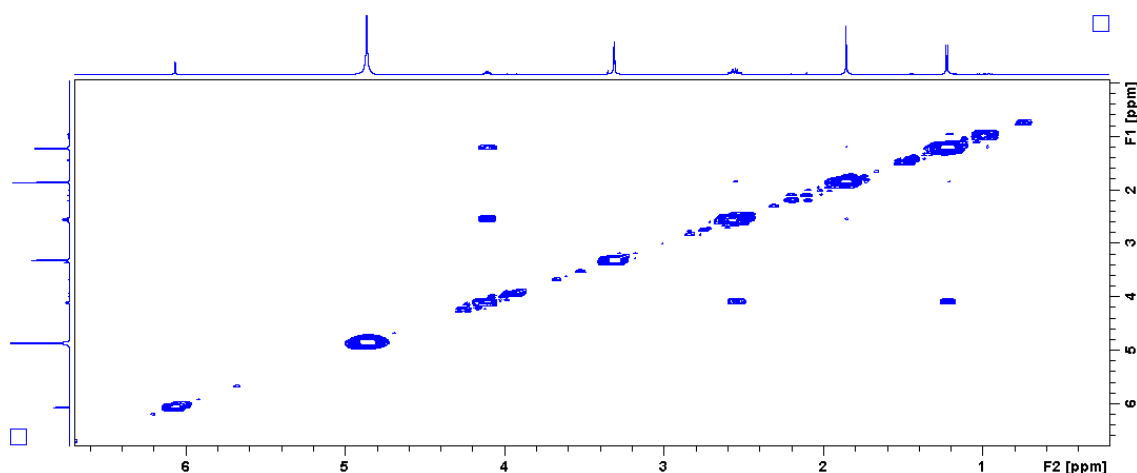
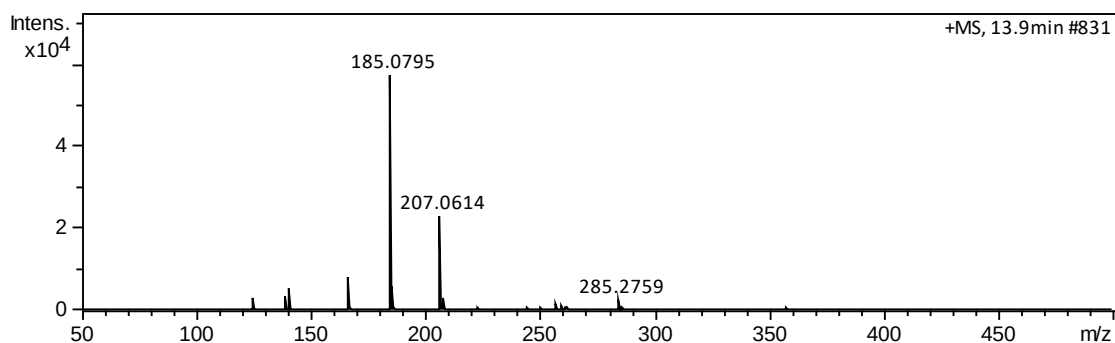


Figura 54. Espectro de massas de primeira-ordem de **10** obtido em modo positivo.



4.13. Cultivo de *Cochliobolus eragrostidis* em diferentes meios de cultivo líquidos e sólidos, e avaliação da atividade biológica dos extratos

Seguindo o mesmo procedimento realizado anteriormente para o endófito *P. sporulosa*, o cultivo de *C. eragrostidis* em diferentes meios de cultivo líquidos e sólidos em escala reduzida resultou nas massas de extratos brutos mencionadas na Tabela 17. Os meios de cultivo que proporcionaram a maior quantidade de extrato obtido foram Malte e PDB, respectivamente.

Tabela 17. Massas dos extratos brutos obtidos em diferentes meios de cultivo de *Cochliobolus eragrostidis*.

	Meios de cultivo						
	PDB	YM	Malte	Czapek®	Nutrient®	Arroz	Milho
Massa (mg)	147,6	120,8	305,7	128,0	50,2	106,9	110,5

Os ensaios antimicrobiano e antitumoral para os extratos do endófito *C. eragrostidis* obtidos em escalada reduzida conduziram aos resultados mostrados na Tabelas 18 e 19. Os extratos provenientes do cultivo do endófito em Malte e PDB apresentaram as melhores atividades biológicas para o ensaio de antitumoral, sendo que no extrato em Malte não foi possível calcular o CI_{50} porque apresentou atividade na menor concentração avaliada (7,8 $\mu\text{g/mL}$) impossibilitando o cálculo através da curva dose-resposta. Adicionalmente, no ensaio antimicrobiano o extrato em Malte apresentou-se o mais promissor com CIMs de 125-250 $\mu\text{g/mL}$ para as linhagens de bactéria e levedura avaliadas. Dessa forma, foram selecionados os meios de cultivo líquidos Malte e PDB para inoculação do endófito *C. eragrostidis* em escala ampliada obtendo maior quantidade em massa de extratos para posteriormente fracionamento, isolamento e identificação dos metabólitos secundários.

Tabela 18. Valores de CI_{50} dos extratos em diferentes meios de cultivos de *C. eragrostidis* avaliados frente às linhagens de células tumorais.

Extratos Avaliados	$CI_{50} \pm (DP)$ [$\mu\text{g/mL}$]		
	LM3	LP07	MCF-7
Arroz	$33,81 \pm 2,19$	$97,38 \pm 1,66$	$41,52 \pm 1,33$
Milho	$59,78 \pm 2,24$	$121,76 \pm 0,78$	$70,18 \pm 4,81$
PDB	$16,90 \pm 2,54$	$27,09 \pm 0,75$	$89,99 \pm 23,30$
YM	$66,93 \pm 4,62$	$100,95 \pm 13,03$	$24,45 \pm 3,52$
Malte	< 7,8	< 7,8	< 7,8
Nutrient®	$63,48 \pm 4,59$	$380,72 \pm 13,58$	$68,63 \pm 7,15$
Czapek®	$291,30 \pm 4,13$	$296,14 \pm 3,94$	$279,27 \pm 11,29$
Doxorubicina	$0,024 \pm 0,005$	$0,028 \pm 0,006$	$0,030 \pm 0,007$

n=3, 95% de intervalo de confiança.

Tabela 19. Valores de CIM dos extratos em diferentes meios de cultivos de *C. eragrostidis* avaliados frente às linhagens de bactérias e leveduras.

Extratos Avaliados	CIM µg/mL]			
	Bactérias Gram-negativa		Bactéria Gram-positiva	Leveduras
	<i>E. coli</i>	<i>S. setubal</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
	(ATCC25922)	(ATCC25923)	(ATCC19196)	(ATCC10231)
Arroz	1000	1000	1000	500
Milho	1000	1000	1000	500
PDB	500	500	>1000	>500
YM	>1000	1000	1000	500
Malte	125	250	250	250
Nutrient [®]	1000	1000	>1000	500
Czapek [®]	>1000	1000	>1000	500
Ampicilina	12,5	25,0	0,30	NA
Anfotericina B	NA	NA	NA	4,0
Fluconazol	NA	NA	NA	R

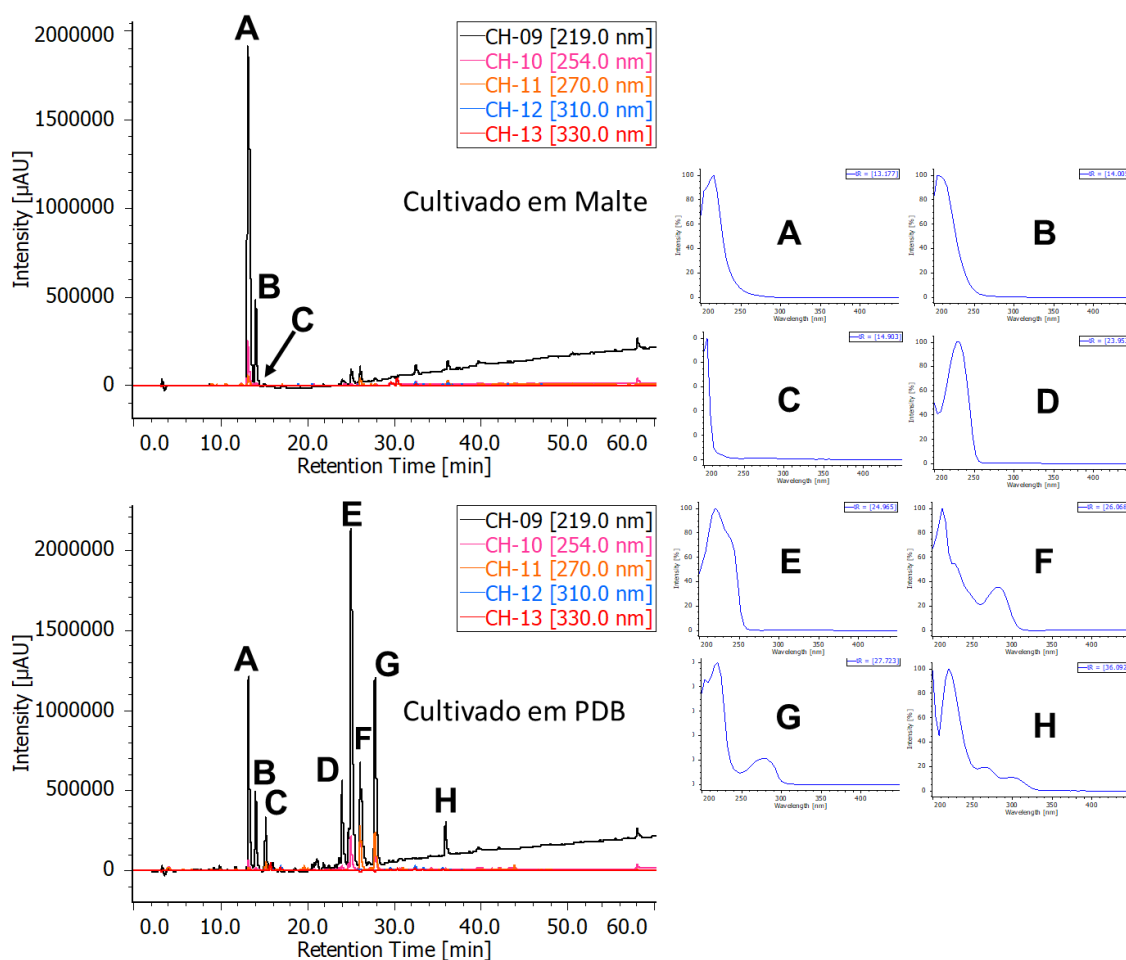
NA: Não aplicável; R: Resistente.

Para a obtenção do extrato AcOEt proveniente do cultivo em PDB de *C. eragrostidis* em escala ampliada, o endófito foi inoculado em 60 erlenmeyers obtendo 2,3 g de extrato. Quando cultivado em Malte, foi inoculado em 40 erlenmeyers obtendo 2,5 g de extrato.

4.14. Registro dos *fingerprints* por HPLC-DAD dos extratos PDB e Malte do endófito *C. eragrostidis*

Da mesma forma que realizado para o endófito *P. sporulosa*, os *fingerprints* dos extratos brutos mais promissores obtidos de *C. eragrostidis*, Malte e PDB, foram registrados por HPLC-DAD analítico (Figura 55).

Figura 55. Cromatogramas dos extratos brutos obtidos em PDB e Arroz do endófito *C. eragrostidis* (Coluna Thermo® Hypersil GOLD aQ RP18 com 250 x 4,6 mm d.i.; 5 μ m), λ = 219-330 nm, vazão 1,0 mL/min. FM: MeOH + TFA 0,1% (B) e H₂O + TFA 0,1% (A). O gradiente foi de 5-100% B (60 min), volume 10 μ L.



Analisando os *fingerprints* observou-se a presença de mesmas substâncias em ambos extratos, porém em proporções diferentes. Destacando-se que os picos cromatograficos A, B, C e D apresentavam espectros de absorção no UV similares compreendendo faixa de absorção entre 200-250 nm sugerindo que estes metabólitos pertencessem à mesma classe de substâncias. Adicionalmente, os picos F, G e H apresentavam deslocamentos de bandas para comprimentos de onda maiores que 250 nm, indicando a presença de compostos com sistemas mais extensos ou de outra classe de metabólitos secundários.

4.15. Fracionamento do extrato proveniente do meio de cultivo em PDB de *C. eragrostidis* e isolamento das substâncias

O extrato proveniente do meio de cultivo em PDB de *C. eragrostidis* (1,0 g) foi submetido ao fracionamento por cromatografia de coluna contendo C-18 e a distribuição das massas das frações obtidas após o fracionamento do extrato PDB de *C. eragrostidis* apresentada na tabela 20. O rendimento do processo de fracionamento utilizando esta técnica cromatográfica foi de 89,1%, explicada por substâncias que ficaram retidas na fase estacionária utilizada.

Tabela 20. Distribuição das massas das frações após fracionamento por CC do extrato PDB de *C. eragrostidis*.

Frações	Massa (mg)
M1 (10:90) MeOH:H ₂ O)	488,6
M2 (25:75, MeOH:H ₂ O)	158,9
M3 (50:50, MeOH:H ₂ O)	68,0
M4 (75:25, MeOH:H ₂ O)	32,0
M5 (100% MeOH)	27,0
M6 (100% AcOEt)	116,2
Massa total	890,7

A fração M1 foi purificada por HPLC-DAD sob condições isocrática de eluição (H₂O (A), MeCN (B); 10% B, 60 min) resultando no isolamento de **11** (320,8 mg), **12** (5,7 mg) e **13** (13,2 mg).

As frações M2 e M3 foram agrupadas e purificadas por HPLC-DAD em modo isocrático de eluição (H₂O (A), MeCN (B), 20% B, 30 min) resultando no isolamento de **14** (7,9 mg), **15** (5,1 mg), **16** (2,9 mg) e **17** (0,7 mg).

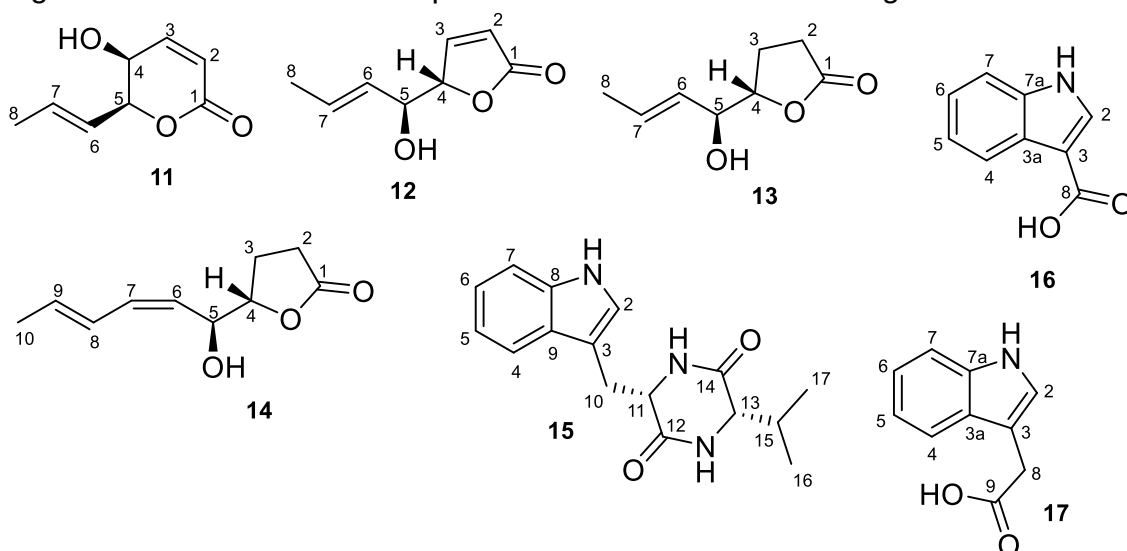
4.16. Identificação estrutural das substâncias 11-17

Os compostos **11-14** (Figura 56) foram obtidos como óleos incolores após purificação das frações por HPLC-DAD. Entre eles, o composto **11** foi obtido em grande proporção de massa, e então foi identificado primeiro como sendo a substância fomalactona com base nos dados de RMN (Figuras 57-58), que foram consistentes com aqueles reportados na literatura (WU *et al.*, 2012). Da mesma

maneira, os compostos **12-14** foram identificados como musacina D, musacina E e sapinofuranona A, respectivamente, comparados com dados reportados na literatura (Tabela 21) (EVIDENTE *et al.*, 1999; FUKUSHIMA *et al.*, 1998; WU *et al.*, 2012).

Os compostos **15-17** foram obtidos como sólidos brancos amorfos, e foram identificados a partir da comparação dos dados espectroscópicos com reportados na literatura (Tabela 22) sendo como ciclo(L-valina-L-triptofano) (PEDRAS; SMITH; TAYLOR, 1998), indol-3-ácido carboxílico (TAN *et al.*, 2004) e indol-3-ácido acético (SUN *et al.*, 2010a), respectivamente.

Figura 56. Estruturas dos compostos **11-17** isolados de *C. eragrostidis*.



O composto **11** apresentou por análises de espectrometria de massas de alta resolução um íon molecular cationizado $[M + Na]^+$ m/z 177,0514 (calcd m/z 177,0522) (Figura 66) que, junto com os dados de RMN, indicou uma fórmula molecular de $C_8H_{10}O_3$, implicando a presença de um índice de deficiência de hidrogênio igual a 4. Os espectros de RMN de ^1H e DEPTQ deste composto forneceu quatro metinos olefinicos em δ_H 5,98 (δ_C 122,3), δ_H 7,03 (δ_C 146,4), δ_H 5,78 (δ_C 126,5) e δ_H 5,91 (δ_C 131,4), assim como dois oximetinos em δ_H 4,20 (δ_C 63,4; C-4) e δ_H 4,82 (δ_C 81,2; C-5), e um grupo metil (δ_H 1,74, δ_C 17,8) e uma carbonila em δ_C 163,7. Os dados acima foram comparados com a literatura permitindo a identificação do composto **11** como fomalactona. A dupla ligação em C-2/C-3 ($^3J_{2,3} = 9,7$ Hz) está em posição *cis*, enquanto em C-6/C-7 está em

posição *trans* ($^3J_{6,7} = 15,6$ Hz). As configurações em C-4 e C-5 foram obtidas a partir das constantes de acoplamento entre H-3 e H-4 ($J = 5,4$ Hz) e H-4 e H-5 ($J = 3,1$ Hz) sugerindo que H-4 e H-5 apresentavam-se em pseudo-equatorial e pseudo-axial, respectivamente. Adicionalmente, a curva de ECD (Figura 59) demonstrou um efeito *Cotton* positivo em torno de 265 nm determinando que C-5 apresentava configuração *S* de acordo com o reportado na literatura (EVANS JR.; ELLESTAD; KUNSTMANN, 1969). O valor de rotação óptica obtido corrobora para as configurações absolutas dos centros estereogênicos descritos anteriormente como (4*S*,5*S*), $[\alpha]_D^{20} + 171$ (c 0,4, EtOH, literatura: + 178 (c 0,49, EtOH) (MURAYAMA; SUGIYAMA; YAMASHITA, 1986).

Figura 57. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do composto **11**.

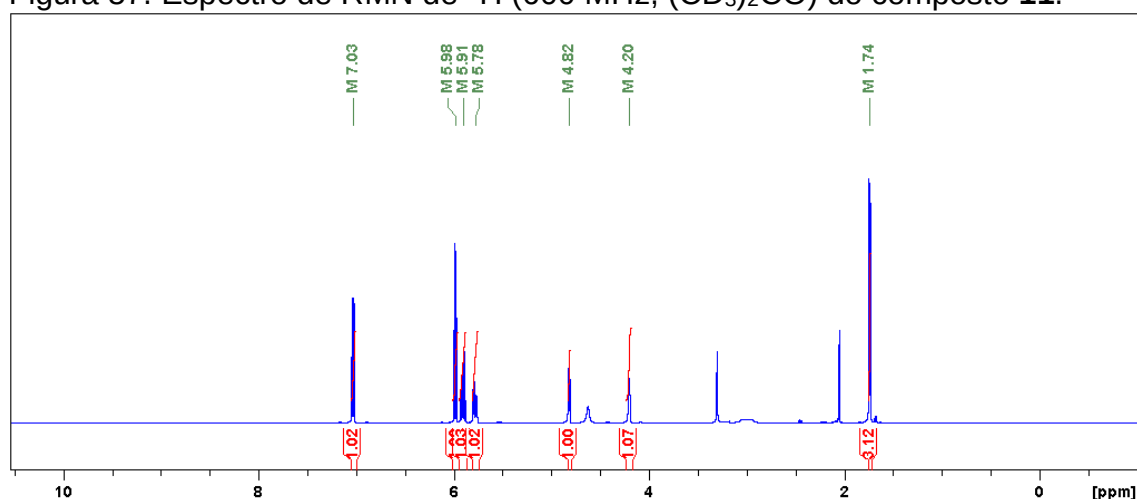


Figura 58. Espectro de RMN de DEPTQ (150 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do composto **11**.

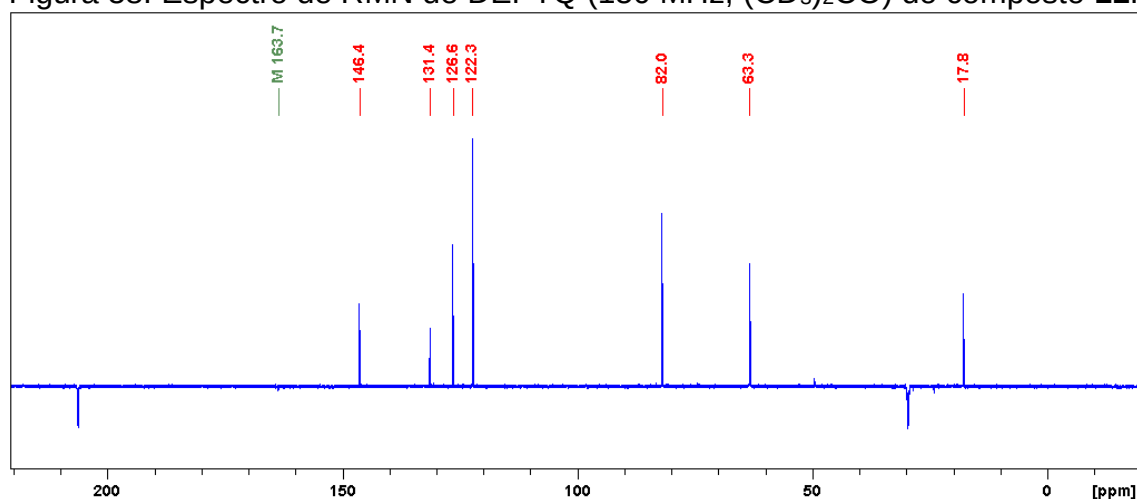
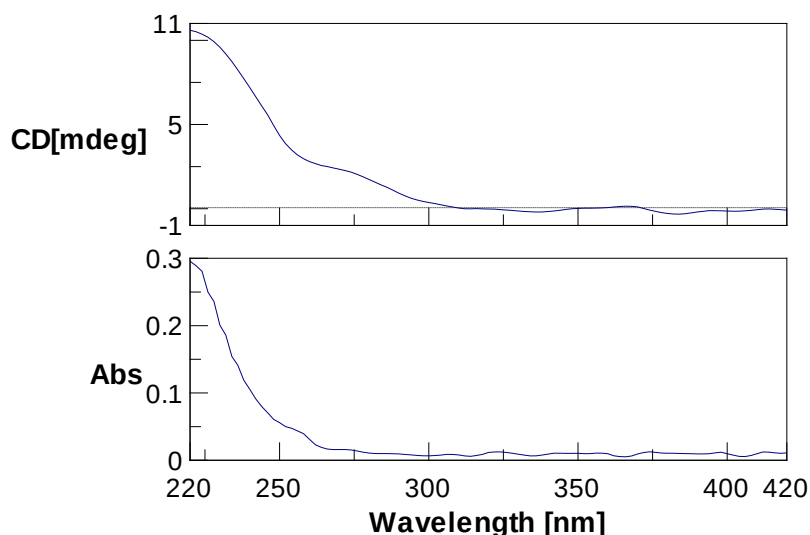


Figura 59. Espectro de ECD do composto **11** (ACN:H₂O) .



Da mesma forma, o composto **12** também apresentou a mesma fórmula molecular que o composto **11** (íon molecular cationizado $[M + Na]^+$ m/z 177,0514 (calcd m/z 177,0522) (Figura 67). Entretanto, sinais de deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ^1H e DEPTQ (Figuras 60 e 61) possibilitavam a mudança de um anel de 6 membros para um anel de 5 membros devido a maiores deslocamentos químicos para os hidrogênios H-2 (δ_H 6,15, dd, $J = 5,7$; 2,1 Hz) e H-3 (δ_H 7,65, dd, $J = 5,7$; 1,6 Hz), além de observar que os deslocamentos químicos para C-4 e C-5 eram o contrário do que o obtidos para **11**, corroborando para a identificação do composto como sendo musacina D. A dupla ligação em C-2/C-3 ($^3J_{2,3} = 5,7$ Hz) está em posição *cis*, enquanto em C-6/C-7 está em posição *trans* ($^3J_{6,7} = 15,3$ Hz). O valor de rotação óptica obtido de $[\alpha]_D^{20} - 121$ (c 0,5, CHCl₃, literatura: $-131,6$ (c 0,6, CHCl₃) determinou as configurações dos centros estereogênicos como 4S,5S (FUKUSHIMA *et al.*, 1998).

O composto **13** apresentou por análises de espectrometria de massas de alta resolução um íon molecular cationizado $[M + Na]^+$ m/z 179,0671 (calcd m/z 179,0679) (Figura 68) que, junto com os dados de RMN, indicou uma fórmula molecular de C₈H₁₂O₃, implicando a presença de um índice de deficiência de hidrogênio igual a 3. Os espectros de RMN de ^1H e DEPTQ (Figura 62 e 63) de **13** mostrou a presença de dois grupos metilenos em δ_H 2,59/2,52 (δ_C 28,6; C-2) e δ_H 2,22/2,07 (δ_C 23,9; C-3) referentes à redução nos carbonos C-2 e C-3 em

relação ao análogo composto **12** (Figura 56). A dupla ligação em C-6/C-7 está em posição *trans* ($^3J_{6,7} = 15,4$ Hz). O valor de rotação óptica obtido de $[\alpha]_D^{20} + 63$ (c 0,7, CHCl₃, literatura: + 51,2 (c 0,76, CHCl₃) determinou as configurações dos centros estereogênicos como 4S,5S (FUKUSHIMA *et al.*, 1998).

O composto **14** apresentou por análises de espectrometria de massas de alta resolução um íon molecular cationizado $[M + Na]^+ m/z$ 205,0845 (calcd m/z 205,0835) (Figura 69) que, junto com os dados de RMN, indicou uma formula molecular de C₁₀H₁₄O₃, implicando o índice de deficiência de hidrogênio igual a 4. Os espectros de RMN de ¹H e DEPTQ (Figura 64 e 65) deste composto forneceram quatro metinos olefinicos em δ_H 5,22 (δ_C 126,2), δ_H 6,15 (δ_C 133,5), δ_H 6,41 (δ_C 127,7) e δ_H 5,83 (δ_C 133,8), assim como dois oximetinos em δ_H 4,52 (δ_C 84,6) e δ_H 4,77 (δ_C 69,4), dois metilenos em δ_H 2,54 (δ_C 29,3) e δ_H 2,20 (δ_C 22,7), um grupo metil (δ_H 1,79, δ_C 18,4) e uma carbonila em δ_C 180,5. Os dados acima sugeriram que o composto **14** era um análogo à musacina D (**12**) e musacina E (**13**) com uma extensão da cadeia em C-5 pela presença de dois hidrogênios olefinicos a mais que **13** (Figura 56). A dupla ligação em C-6/C-7 ($^3J_{6,7} = 11,2$ Hz) está em posição *cis*, enquanto em C-8/C-9 está em posição *trans* ($^3J_{8,9} = 14,8$ Hz). O valor de rotação óptica obtido de $[\alpha]_D^{20} + 55$ (c 0,7, CHCl₃, literatura: + 65,2 (c 1,3, CHCl₃) determinou as configurações dos centros estereogênicos como 4S,5S (EVIDENTE *et al.*, 1999).

Figura 60. Espectro de RMN de ¹H (600 MHz, (CD₃)₂CO) do composto **12**.

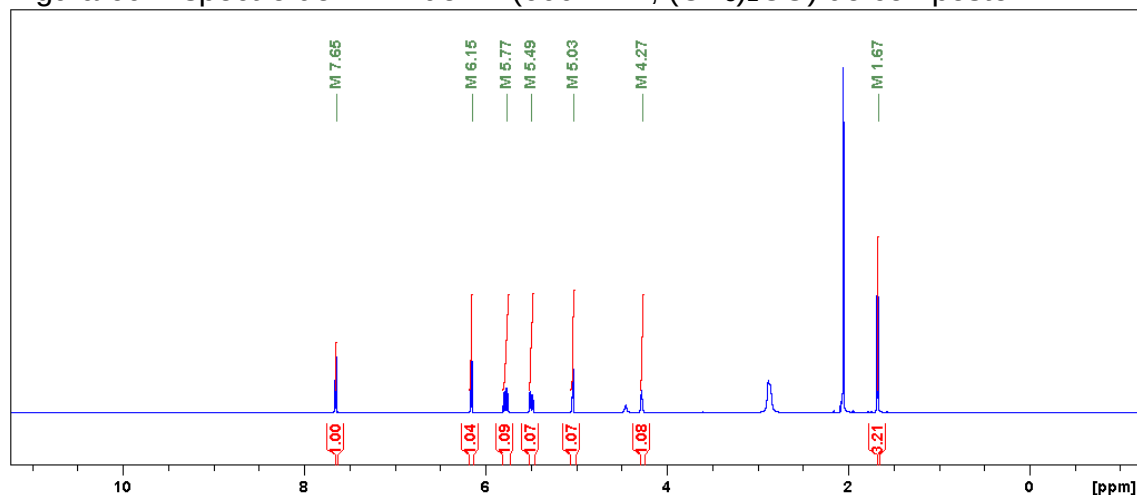


Figura 61. Espectro de RMN de DEPTQ (150 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do composto **12**.

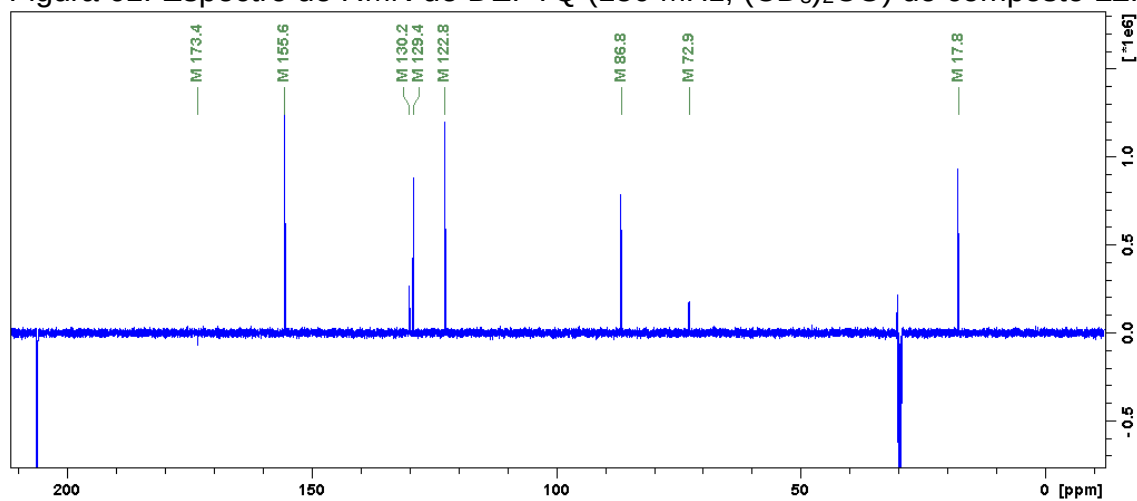


Figura 62. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3Cl) do composto **13**.

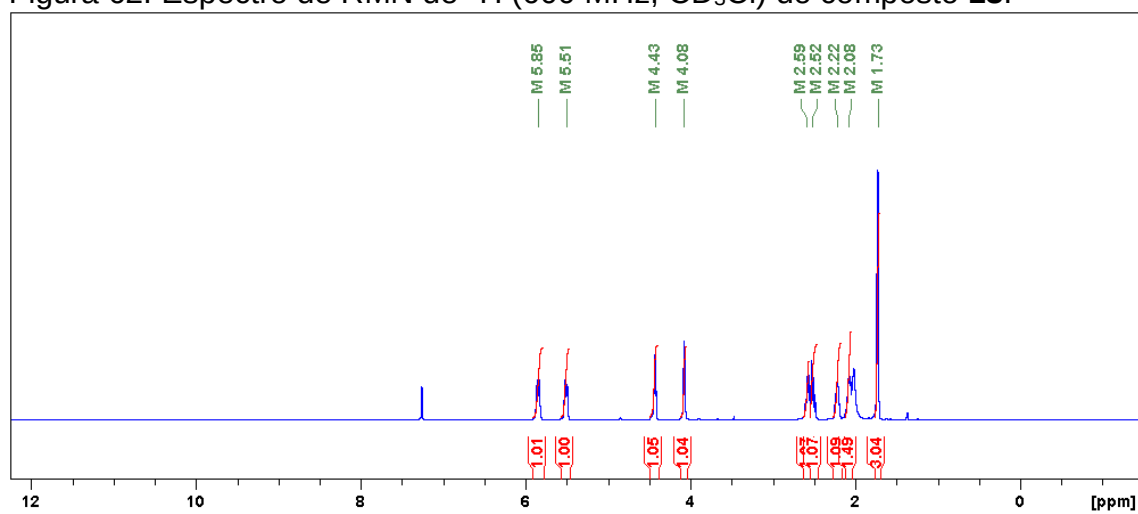
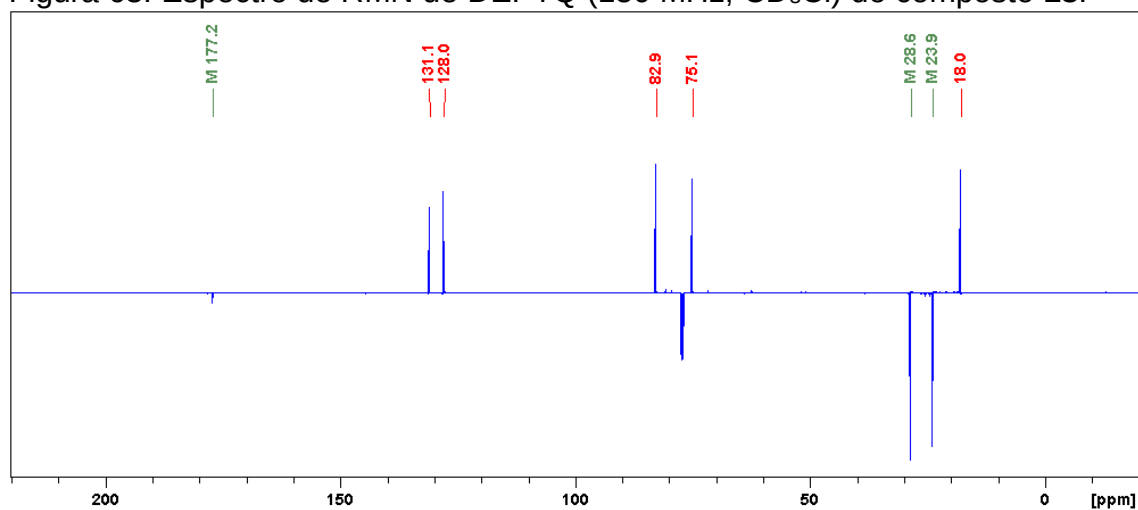


Figura 63. Espectro de RMN de DEPTQ (150 MHz, CD_3Cl) do composto **13**.



O composto **15** apresentou por análises de espectrometria de massas de alta resolução um íon molecular $[M + H]^+$ m/z 286,1556 (calcd m/z 286,1550) (Figura 71) que, junto com os dados de RMN, indicou uma formula molecular de $C_{16}H_{19}N_3O_2$, implicando a presença de um índice de deficiência de hidrogênio igual a 9. Os espectros de RMN de ^1H (Figura 70), HMBC (Figura 72) e o valor da rotação óptica obtido $[\alpha]_D^{20} - 70$ (c 0.1, MeOH, literatura: $- 65$ (c 0.11, MeOH), forneceram os dados que possibilitaram a identificação do composto como sendo ciclo(L-valina-L-triptofano) de acordo com os dados reportados na literatura por Pedras e colaboradores (1998), sendo as configurações absolutas dos carbonos C-11 e C-13 como 11S,13S.

O composto **16** apresentou por análises de espectrometria de massas de alta resolução um íon molecular $[M + H]^+$ m/z 162,0553 (calcd m/z 162,0550) (Figura 74) que, junto com os dados de RMN, indicou uma formula molecular de $C_9H_7NO_2$, implicando a presença de um índice de deficiência de hidrogênio igual a 7. O espectro de RMN de ^1H (Figura 73) possibilitou a identificação do composto como indol-3-ácido carboxílico quando comparado com dados da literatura (TAN *et al.*, 2004). Não foi possível encontrar dados de RMN de ^{13}C na literatura em CD_3OD , portanto foi realizado análise por HRMS/MS (Figuras 74 e 75) desta substância corroborando com a identificação do composto **16**, observando a formação dos ions m/z 118,0656 $[C_8H_8N]^+$ (100), m/z 144,0448 $[M - H_2O + H]^+$ (100) e m/z 116,0497 $[M - H_2O - CO + H]^+$ (45).

O composto **17** apresentou por dados de RMN similaridade em relação ao metabólito **16**, sendo que a diferença é o incremento de um grupo metileno em sua estrutura química na posição C-3 do indol. Os espectros de RMN de ^1H e HMBC (Figuras 76 e 77) possibilitou a identificação do composto como indol-3-ácido acético quando comparado com dados reportados na literatura (SUN *et al.*, 2010a).

Tabela 21. Comparação dos dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) para os compostos **11-14** com o reportado na literatura

11		Fomalactona (WU <i>et al.</i> , 2012)	
Posição	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1	-	163,7	-
2	5,98 dd (9,7; 0,5)	122,3	5,98 d (9,9)
3	7,03 dd (5,4; 9,7)	146,4	6,93 dd (5,4; 9,9)
4	4,20 dd (5,4; 3,1)	63,3	4,13 dd (5,4; 3,1)
5	4,82 dd (7,5; 3,1)	81,2	4,73 dd (7,1; 3,1)
6	5,78 ddd (15,6; 7,4; 1,7)	126,5	5,70 ddd (15,5; 7,1; 1,5)
7	5,91 ddq (15,6; 6,6; 0,9)	131,4	5,89 m
8	1,74 ddd (6,6; 1,5; 0,8)	17,8	1,73 d (6,2)
12		Musacina D (WU <i>et al.</i> , 2012)	
1	-	173,4	-
2	6,15 dd (5,7; 2,1)	122,8	6,20 dd (6,0; 2,3)
3	7,65 (dd 5,7; 1,6)	155,6	7,50 dd (6,0; 1,5)
4	5,03 m	86,8	5,02 dl (4,5)
5	4,27 tl (5,4)	72,9	4,40 brs
6	5,49 ddq (15,3; 6,9; 1,7)	130,2	5,52 ddd (15,5; 7,5; 1,5)
7	5,77 (15,3; 6,6; 1,5)	129,4	5,89 m
8	1,67 ddd (6,6; 1,7; 0,7)	17,9	1,76 d (6,5)
13		Musacina E (FUKUSHIMA <i>et al.</i> , 1998)	
1	-	177,2	-
2	2,59 m 2,52 m	28,6	2,61 ddd (17,9; 9,9; 6,0) 2,52 ddd (17,9; 9,4; 8,4)
3	2,22 m 2,07 m	23,9	2,23 dddd (6,0; 7,2; 9,4; 13,1) 2,08 (7,2; 8,4; 9,9; 13,1)
4	4,43 dt (7,1; 5,5)	82,9	4,44 dt (7,2; 5,5)
5	4,08 tl (5,7)	75,1	4,09 tl (6,0)
6	5,51 dddq (15,4; 6,6; 3,2; 1,7)	128,0	5,52 ddq (15,4; 7,2; 1,7)
7	5,85 ddq (15,4; 6,6; 1,2)	131,1	5,86 ddq (15,4; 6,5; 0,9)
8	1,73 d (6,5)	18,0	1,74 dd (6,5; 1,7)
14		Sapinofuranona A (EVIDENTE <i>et al.</i> , 1999)	
1	-	180,5	-
2	2,54 m	29,3	2,60 m 2,50 m
3	2,20 m	22,7	2,20 (m)
4	4,52 ddd (7,7; 6,4; 3,4)	84,6	4,51 dt (7,2; 3,1)
5	4,77 ddd (8,6; 3,4; 1,1)	69,4	4,88 dd (8,4; 3,1)
6	5,22 ddq (11,2; 8,6; 0,7)	126,2	5,20 dd (11,0; 8,4)
7	6,15 dd (11,2; 11,0)	133,5	6,15 dd (11,2; 11,0)
8	6,41 ddq (14,8; 11,0; 1,7)	127,7	6,30 ddq (13,7; 11,2; 1,8)
9	5,83 dddq (14,8; 6,7; 1,1; 0,7)	133,8	5,82 dq (13,7; 6,8)
10	1,79 dd (6,7; 1,6)	18,4	1,80 dd (6,8; 1,8)

Tabela 22. Comparação dos dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) para os compostos **15-17** com reportados na literatura

15		ciclo(L-valina-L-triptofano) (PEDRAS; SMITH; TAYLOR, 1998)		
Posição	δ_{H} (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
2	7,08 s	125,5	7,07 s	125,5
3	-	129,3	-	129,2
4	7,61 ddd (8,0; 1,0; 0,8)	119,8	7,60 dd (8,0; 1,0)	119,8
5	7,07 ddd (8,0; 8,0; 1,0)	120,9	7,06 ddd (8,0; 8,0; 1,0)	120,0
6	7,00 ddd (8,0; 8,0; 1,0)	122,4	6,99 ddd (8,0; 8,0; 1,0)	122,4
7	7,30 ddd (8,0; 1,0; 0,8)	112,2	7,29 dd (8,0; 1,0)	112,2
8	-	138,1	-	138,1
9	-	109,9	-	109,8
10	3,36 ddd (14,6; 5,5; 0,5) 3,23 ddd (14,6; 4,5; 0,6)	30,6	3,36 dd (15,0; 5,5) 3,25 dd (15,0; 4,5)	30,6
11	4,29 ddd (5,5; 4,5; 1,5)	57,5	4,28 ddd (5,5; 4,5; 1,5)	57,3
12	-	169,9	-	170,2
13	3,56 dd (5,0; 1,5)	61,3	3,55 dd (5,0; 1,5)	61,3
14	-	169,6	-	169,2
15	1,44 m	33,4	1,45 m	33,4
16	0,67 d (7,0)	19,2	0,88 d (7,0)	19,1
17	0,25 d (7,0)	16,9	0,26 d (7,0)	16,9
16 (CD₃OD)		Indol-3-ácido carboxílico (TAN <i>et al.</i> , 2004)		
2	7,95 s	133,4	7,94 s	*
3	-	108,6	-	*
3a	-	127,5	-	*
4	8,08 dd (8,0; 1,3)	122,4	8,05 dd (8,0; 1,1)	*
5	7,18 ddd (8,0; 8,0; 1,3)	122,0	7,17 ddd (8,0; 8,0; 1,1)	*
6	7,20 ddd (8,0; 8,0; 1,3)	123,6	7,19 ddd (8,0; 8,0; 1,1)	*
7	7,44 dd (8,0; 1,3)	112,9	7,43 dd (8,0; 1,1)	*
7a	-	138,2	-	*
8	-	169,3	-	*
17		Indol-3-ácido acético (SUN <i>et al.</i> , 2010a)		
2	7,15 s	119,6	7,17 s	119,4
3	-	128,8	-	128,3
3a	-	110,0	-	108,9
4	7,56 d (7,9)	119,6	7,53 d (7,9)	121,1
5	6,99 t (7,5)	122,2	7,02 t (7,5)	122,6
6	7,08 t (7,5)	124,4	7,11 t (7,5)	124,7
7	7,32 d (8,1)	112,1	7,35 d (8,0)	112,3
7a	-	138,1	-	138,1
8	3,68 s	33,3	3,65 s	33,9
9	-	178,1	-	177,7

^aSinais foram atribuídos com base nos dados de HSQC e HMBC. *Não há dados em CD₃OD.

Figura 64. Espectro de RMN de ^1H da substância **14** (600 MHz, CD_3OD).

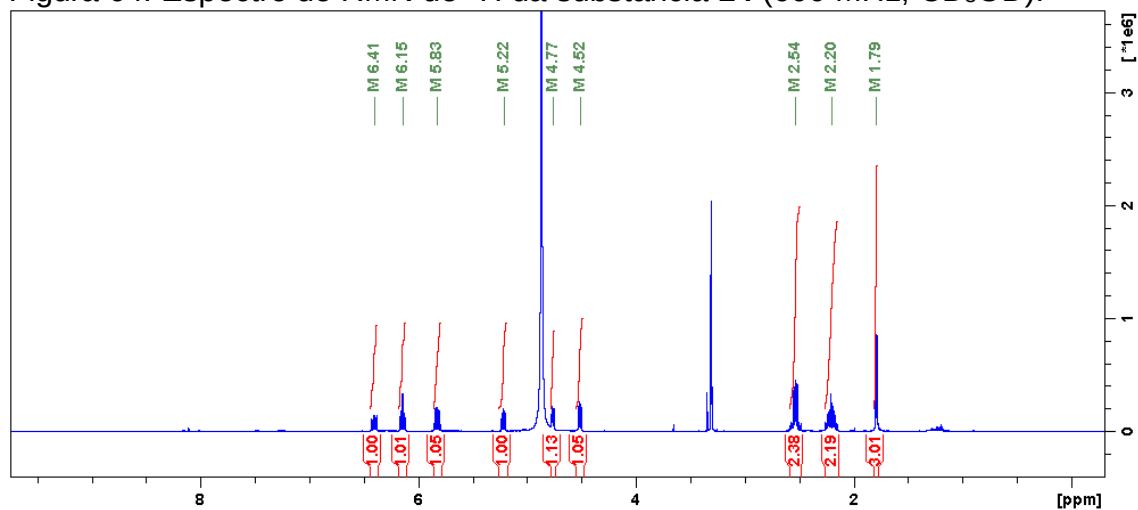


Figura 65. Espectro de RMN de DEPTQ da substância **14** (600 MHz, CD_3OD).

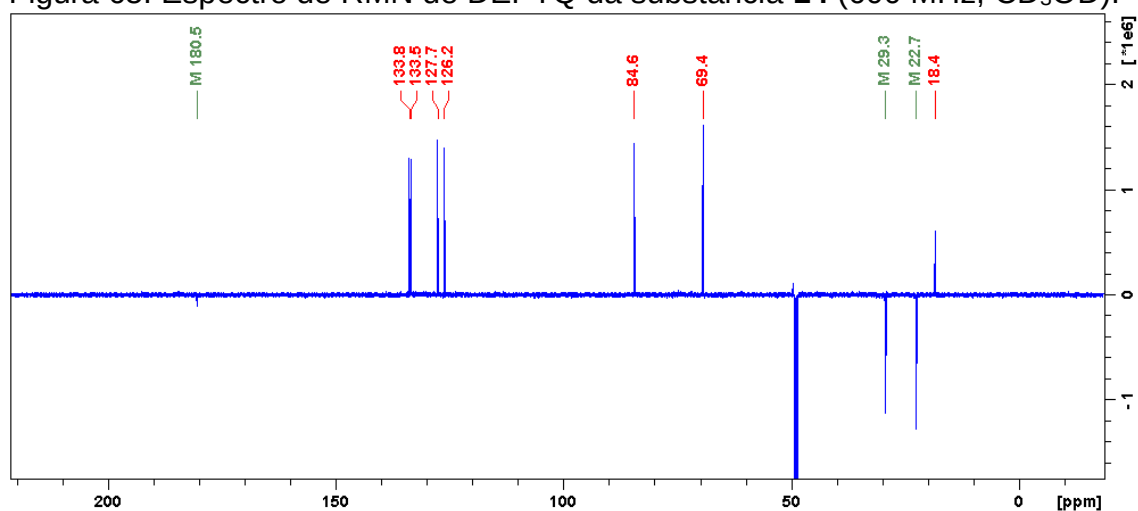


Figura 66. Espectro de HRMS do composto **11** em modo positivo de ionização.

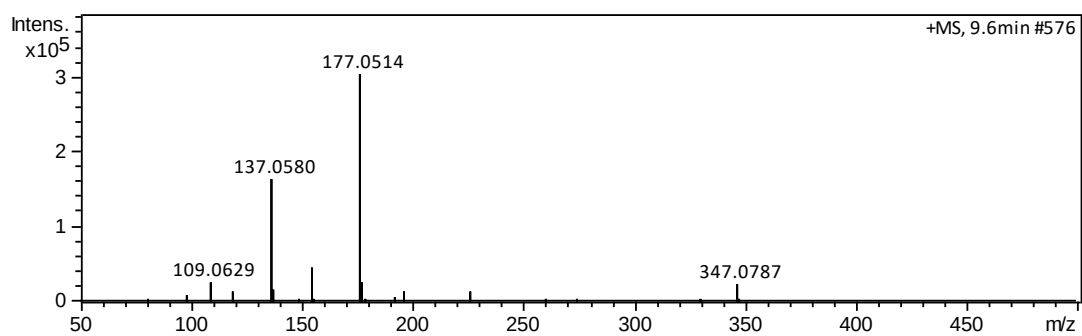


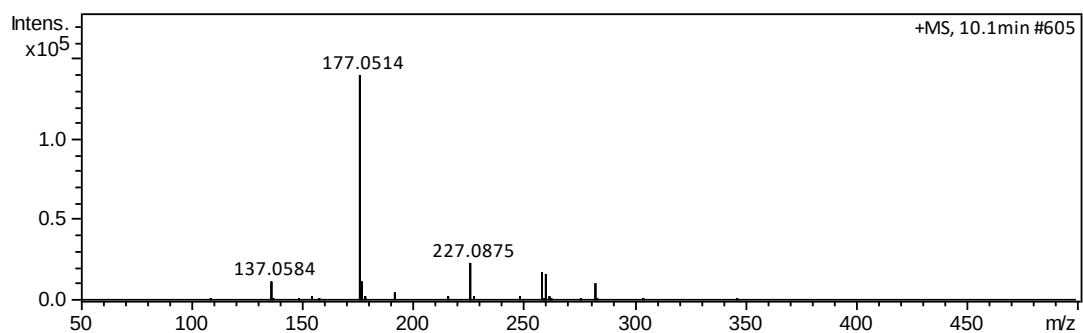
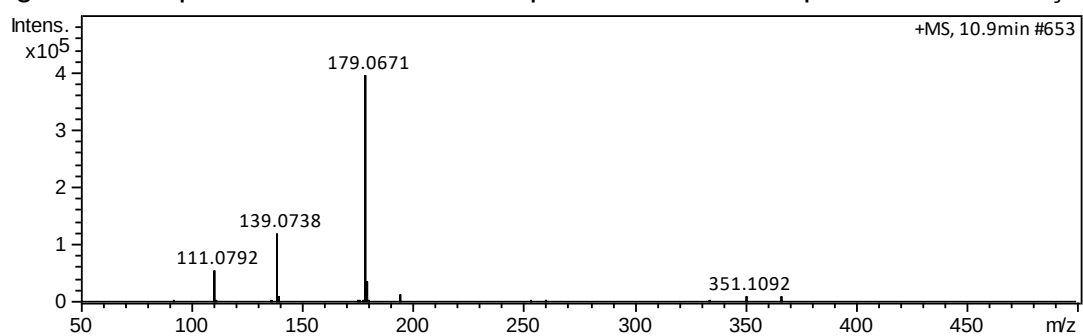
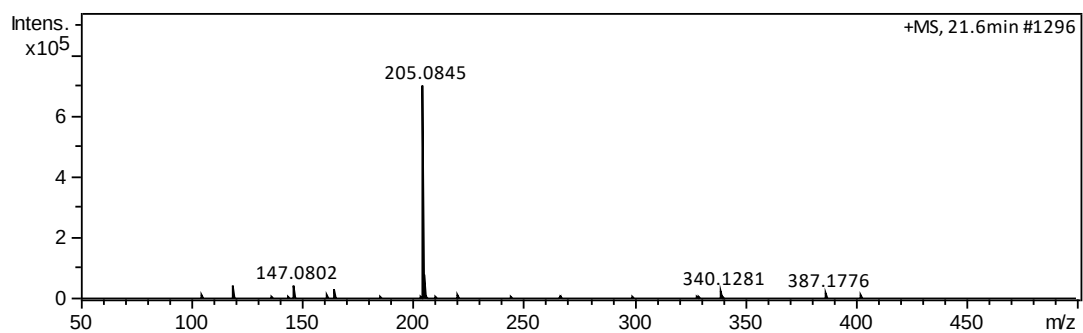
Figura 67. Espectro de HRMS do composto **12** em modo positivo de ionização.Figura 68. Espectro de HRMS do composto **13** em modo positivo de ionização.Figura 69. Espectro de HRMS do composto **14** em modo positivo de ionização.

Figura 70. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) do composto **15**.

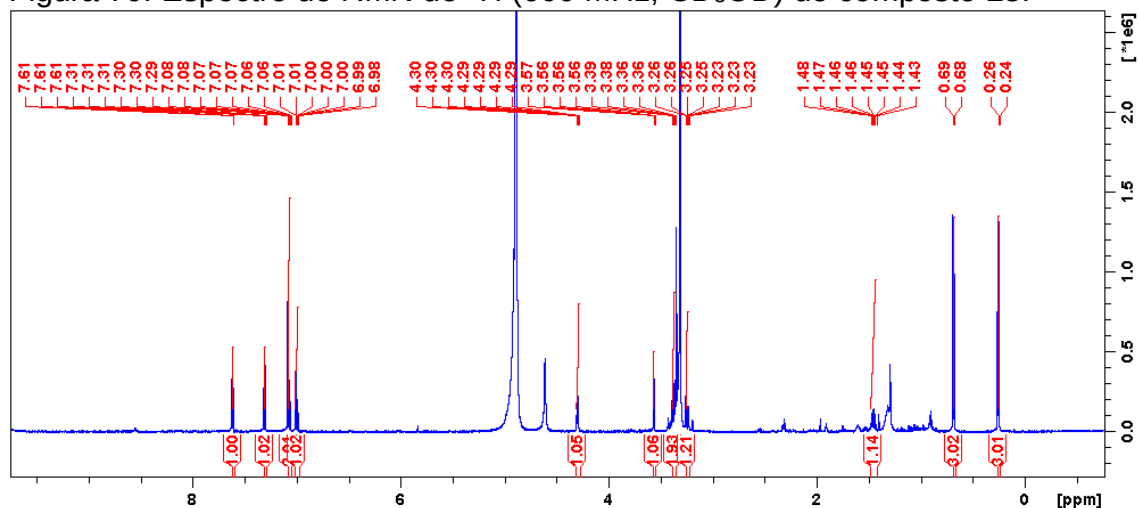


Figura 71. Espectro de HRMS do composto **15** em modo positivo de ionização.

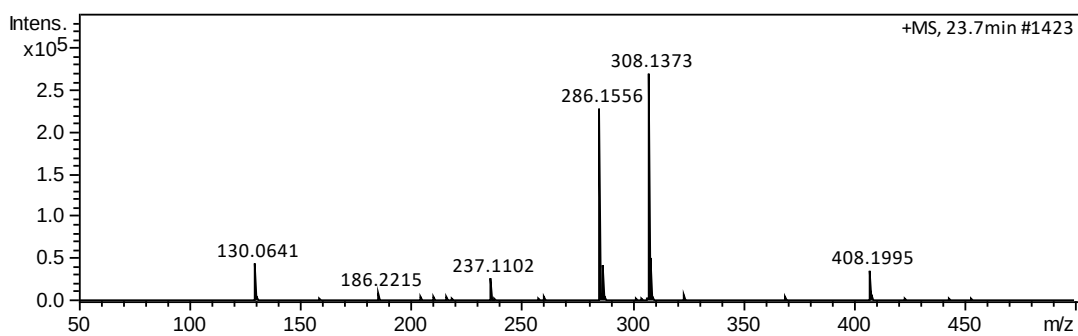


Figura 72. Espectro de RMN de HMBC (600 e 150 MHz, CD_3OD) do composto **15**.

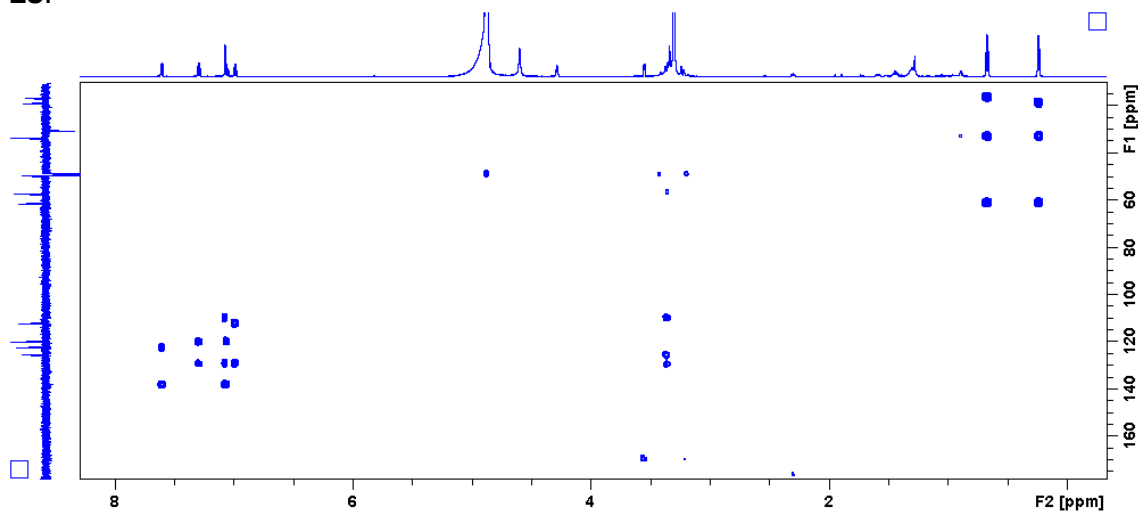


Figura 73. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) do composto **16**.

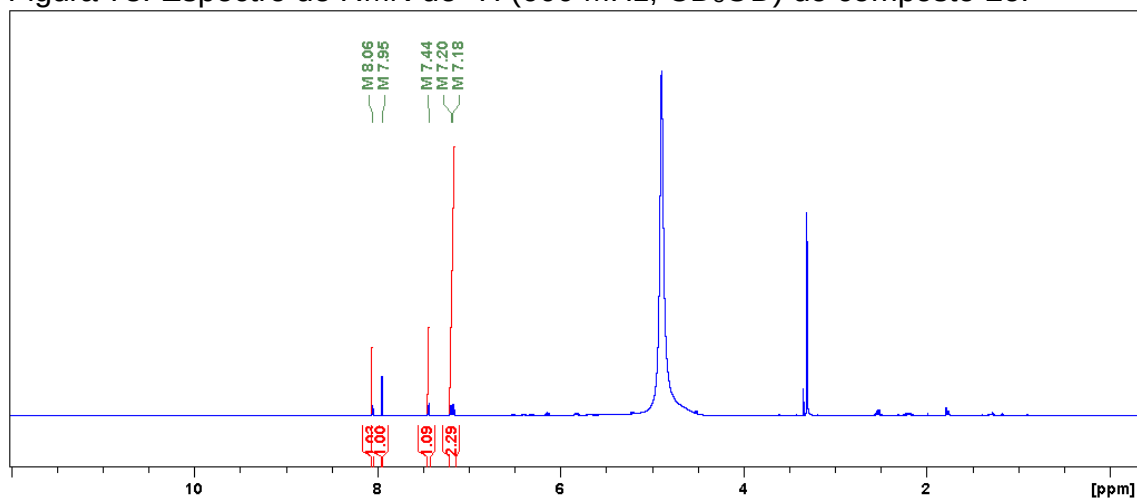


Figura 74. Espectro de HRMS do composto **16** em modo positivo de ionização.

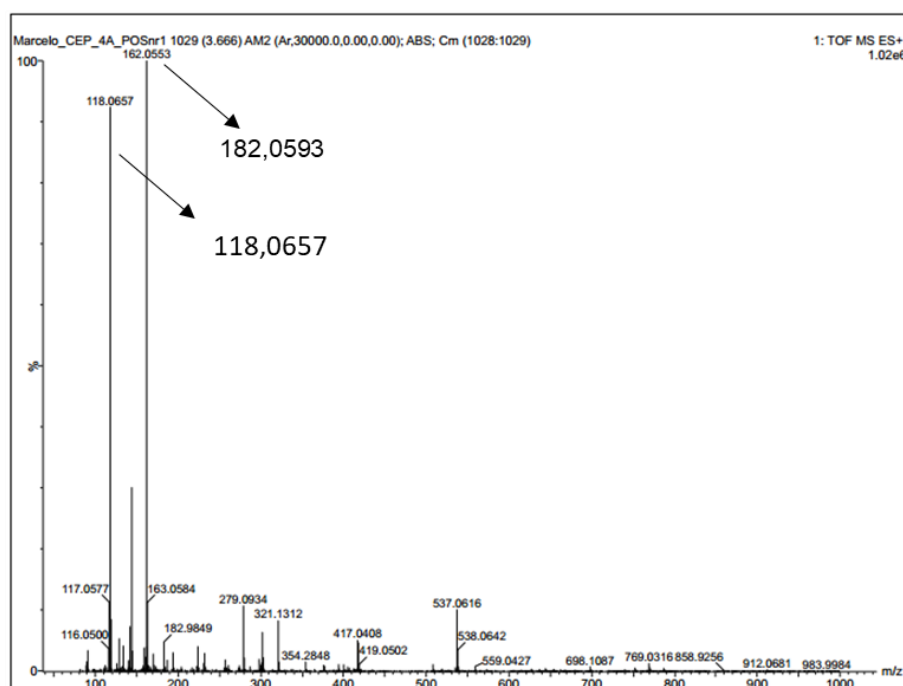


Figura 75. Espectro de HRMS de segunda ordem do composto **16** em modo positivo de ionização.

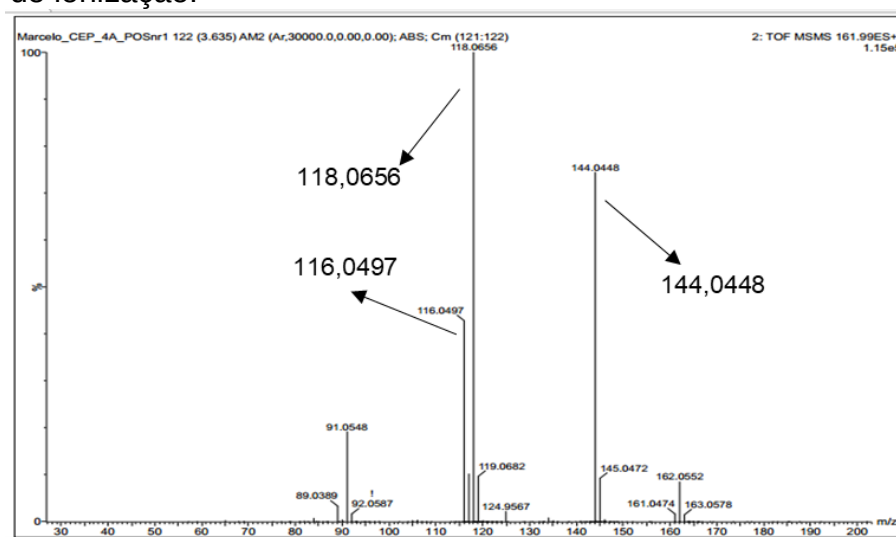


Figura 76. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) do composto **17**.

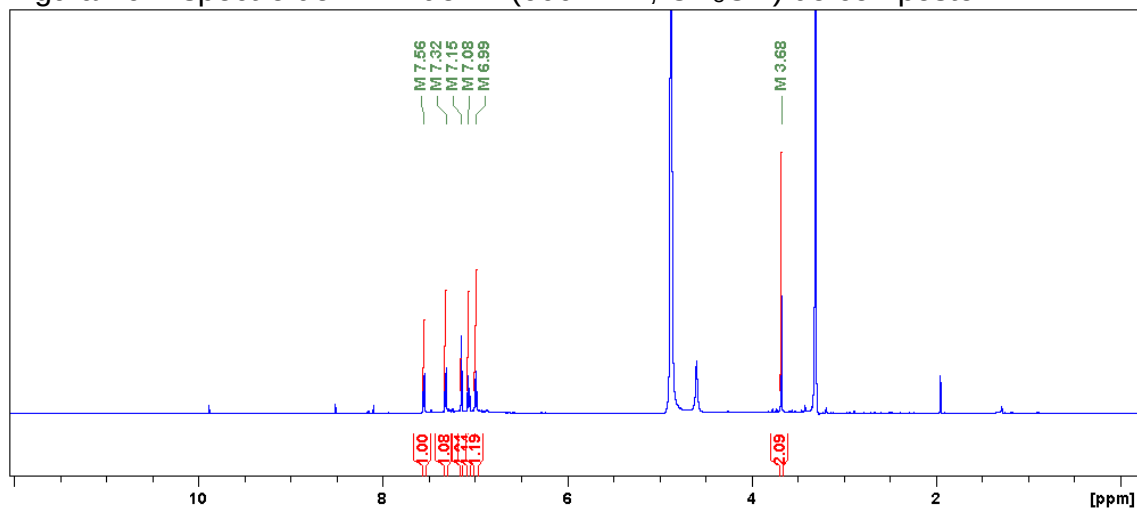
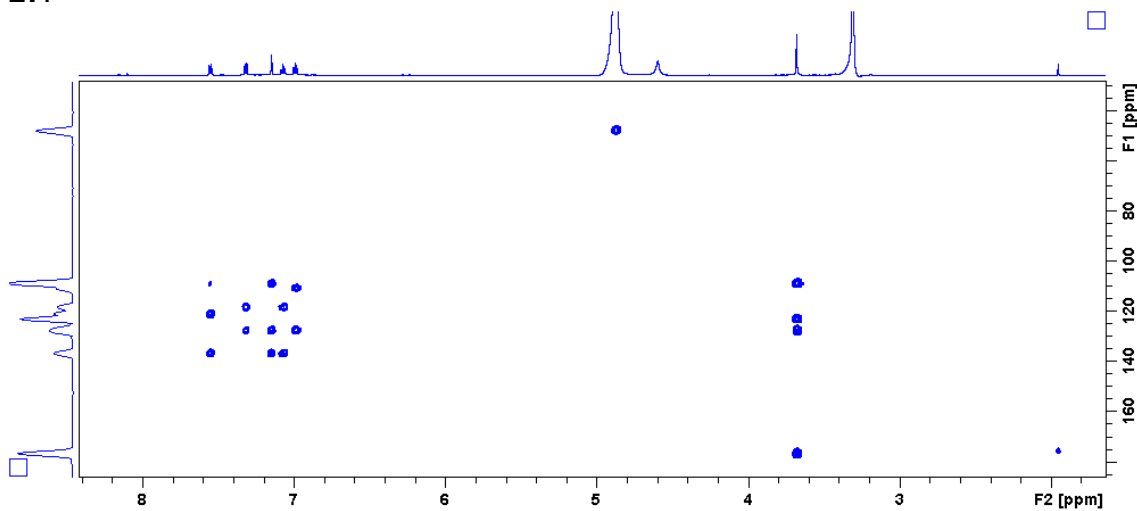


Figura 77. Espectro de RMN de HMBC (600 e 150 MHz, CD_3OD) do composto **17**.



4.17. Avaliação da atividade citotóxica das substâncias 11-17

Os metabólitos isolados **11-17** foram submetidos a ensaio de citotoxicidade para as células tumorais SKBR3, T98G e U87MG, e a concentração inibidora de crescimento *in vitro* (Cl₅₀) dos compostos está resumida na Tabela 23.

Os metabólitos **12-17** não exibiram efeitos inibitórios em 50% para as células tumorais avaliadas (> 30 µg/mL). Entretanto, o metabólito **11** (fomalactona) exibiu valores de Cl₅₀ promissores de citotoxicidade para as linhagens avaliadas, Cl₅₀ de 7,4 µg/mL para T98G; 8,8 µg/mL para U87GM e 5,3 µg/mL para SKBR3. Assim, o metabólito **11** pode ser considerado o princípio ativo responsável pela atividade citotóxica apresentada pelo extrato produzido por *C. eragrostidis*.

Os resultados obtidos destacam o interesse na investigação do metabólito secundário **11** em busca de derivados semi-sintéticos que possam proporcionar maiores atividades citotóxicas para as linhagens tumorais avaliadas em estudos futuros.

Tabela 23. Valores de Cl₅₀ (µg/mL) para as substâncias **11-17** contra linhagens de célula tumoral.

Substâncias	SKBR3 (Média ± DP)	T98G (Média ± DP)	U87GM (Média ± DP)
11	5,3 ± 0,5	7,4 ± 0,7	8,8 ± 0,9
12	> 30	> 30	> 30
13	> 30	> 30	> 30
14	> 30	> 30	> 30
15	> 30	> 30	> 30
16	> 30	> 30	> 30
17	> 30	> 30	> 30
Doxorubicina^a	50	50	50

^aControle positivo na concentração de 50 µg/mL (MOREIRA, 2016).. n=3; 95% intervalo de confiança.

A substância fomalactona (**11**) é um metabólito com atividades biológicas importantes descritas na literatura isolada de diferentes microrganismos. Quando isolada de *Nigrospora sacchari*, mostrou atividade herbicida contra plântulas em um teste em estufa (EVANS JR.; ELLESTAD; KUNSTMANN, 1969), enquanto que de *Nigrospora sphaerica* inibiu o crescimento de fungos

patogênicos, como *Phytophthora infestans* e *Phytophthora capsini*, através da inibição da germinação de esporângios e zoósporos (KIM *et al.*, 2001).

Adicionalmente, é relatado que um composto similar à fomalatona, o composto 6-alil-5,6-diidro-5-hidroxipiran-2-ona, isolado de espécies do gênero *Drechslera*, exibiu atividade antitumoral com um valor de CI_{50} menor que 4 $\mu\text{g/mL}$ e atividade antimicrobiana competitiva para cetoconazol (GUIRAUD *et al.*, 1994).

4.18. Estudo químico do extrato AcOEt obtido de *Aspergillus terreus* na presença e ausência de modificador epigenético SAHA

O trabalho relacionado ao fungo endofítico *Aspergillus terreus*, isolado de *Astragalus lentiginosus*, foi desenvolvido na Universidade do Arizona, Tucson/AZ, EUA, sob supervisão do Prof. Dr. Leslie Gunatilaka, no estágio de doutoramento realizado durante o período de 10 meses (julho de 2018 a abril de 2019).

A utilização de modificadores epigenéticos no meio de cultura de fungos é uma estratégia importante para a produção de novas substâncias com potencial biológico.

Em vista disso, o fungo endofítico *Aspergillus terreus* foi cultivando em meio líquido PDB na presença de 5-AZA (500 μM), SAHA (500 μM), curcumina (500 μM), bem como na ausência desses modificadores epigenéticos, seguindo de análises dos extratos brutos por HPLC-DAD. O endófito *A. terreus* mostrou diferenças nos perfis de HPLC entre os extratos derivados de uma cultura cultivada com SAHA e a cultura controle (Figura 78). Além disso, o endófito foi investigado em diferentes concentrações de SAHA (100, 250 e 500 μM) no meio PDB que resultou em perfis muito semelhantes quando cultivados com 250 e 500 μM de SAHA em escala reduzida e os extratos foram agrupados (dados não mostrados).

A investigação química do caldo de cultura tratado com SAHA levou ao isolamento de dois novos metabólitos de 3-pirona-cumarinas, **18** e **19**, e uma nova isocumarina, 3,4-diidro-3-metil-6,7,8-triidroxi-1*H*-2-benzopiran-1-ona (**20**), juntamente com os compostos conhecidos como (+)-terreína (**21**), (–)-6-hidroximeleina (**22**), (–)-ortosporina (**23**), (–)-6,7-dimetoximeleina (**24**), (–)-6-metoximeleina (**25**), farnesol (**26**), (–)-3,4-diidro-3-metil-5,6,8-triidroxi-1*H*-2-

benzopiran-1-ona (**27**) e 3-metilorselinato de etila (**28**) (Figura 79). Adicionalmente, os compostos **18** e **19** foram submetidos às modificações estruturais fornecendo os derivados semi-sintéticos **18a**, **18b** e **19a** que auxiliaram na elucidação estrutural de seus precursores naturais.

As substâncias **29** (anilina) e **30** (éster metílico do ácido suberanílico) são derivados do modificador epigenético SAHA (**31**) utilizado no meio de cultivo.

Figura 78. (A) Perfil químico por HPLC-DAD dos extratos AcOEt de *A. terreus* cultivado em PDB e (B) PDB contendo 250 μ M SAHA detectados por absorção na região do UV em 254 e 391 nm.

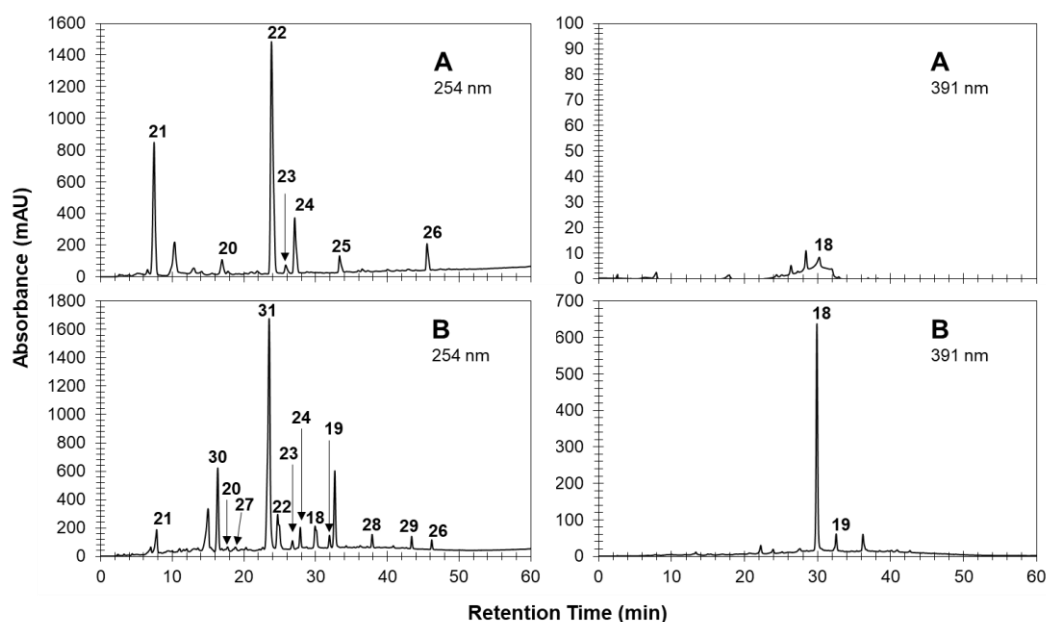
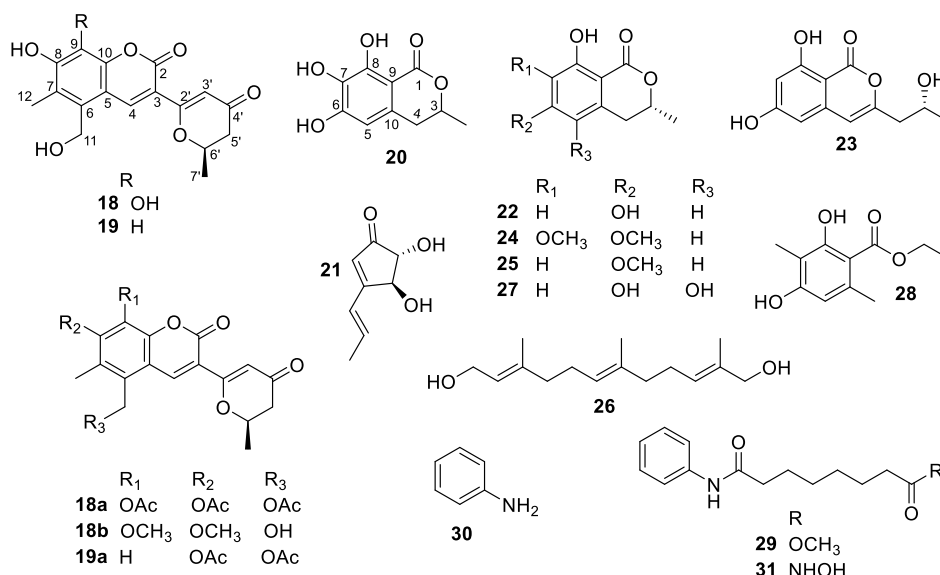


Figura 79. Estruturas dos compostos **18-31** e os derivados semi-sintéticos **18a-18b** e **19a**.



Este é o primeiro relato da ocorrência de pigmentos 3-pirona-cumarinas no gênero fúngico *Aspergillus*, bem como de um fungo endofítico usando modificadores epigenéticos. As 3-pirona-cumarinas são uma classe rara de metabólitos fúngicos que foram relatados anteriormente em *Monascus anka* IFO 30878, com estereoconfiguração indefinida na porção pirona. Esta classe de metabólitos também foi obtida das folhas da planta *Bambusa pervariabilis* McClure (HOSSAIN; OKUYAMA; YAMAZAKI, 1996; SUN *et al.*, 2010b).

As 3-pirona-coumarinas conhecidas até o momento foram descritas como compostos inibidores potentes da monoamina oxidase (MAO) (HOSSAIN; OKUYAMA; YAMAZAKI, 1996). Compostos sintéticos adicionais que contêm uma estrutura central com certa similaridade a 3-pirona-cumarinas, incluindo 3-aryl-cumarinas e 3-fenilcarboxamida-cumarinas, foram recentemente documentados como potentes agentes anti-Alzheimer, além de antioxidantes e inibidores da MAO (FONSECA *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2019).

É importante notar que a concentração dos novos compostos **18-20** exibiu uma diferença significativa entre PDB e PDB + SAHA por HPLC-DAD (Figura 78). O cultivo de *A. terreus* na presença de SAHA induziu a produção do metabólito **18** aproximadamente 28 vezes maior do que quando o fungo cresceu somente em PDB (Tabela 24). No entanto, a concentração do metabólito **20** é maior quando o fungo cultivado em PDB sem o modificador epigenético SAHA (cerca em 14,5 vezes que o obtido quando há o crescimento do endófito em PDB + SAHA, Tabela 24). Para o metabólito **19** foi observada a produção apenas no extrato PDB + SAHA.

Tabela 24. Área dos picos cromatográficos dos metabólitos **18** e **20** nos extratos AcOEt com e sem modificador SAHA por HPLC-DAD.

Composto	PDB área do pico	PDB + SAHA área do pico
18^a	336	9277.4
20^b	6807	469.2

^aÁrea do pico detectado em 391 nm, ^bÁrea do pico detectado em 254 nm

4.19. Elucidação estrutural das substâncias 18-20

A substância **18** (Figura 80) foi isolada como um sólido amorfo amarelo e com valor de rotação óptica de $[\alpha]_D^{23} + 56,3$ (c 0,04, CH₃OH). A análise por espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) deste composto exibiu um íon $[M + H]^+$ em m/z 333,0952 (calculado m/z 333,0969) (Figura 87) que, juntamente com os dados de RMN, indicou uma fórmula molecular de C₁₇H₁₆O₇, implicando a presença de um índice de deficiência de hidrogênio de 10. Absorções a 1697 cm⁻¹ (éster α,β conjugado) e 1645 cm⁻¹ (cetona α,β conjugada) foram observadas no espectro no IV (Figura 86).

Os espectros de RMN de ¹H e HSQC (Figuras 81 e 83) do composto **18** exibiram sinais de dois grupos metinos aromáticos em δ_H 8,75 (δ_C 142,2) e δ_H 6,55 (δ_C 105,3), bem como de um oximetileno em δ_H 4,71 (δ_C 55,7) sobreposto a um outro grupo de oximetino em δ_H 4,71 (δ_C 75,7); esses espectros também apresentaram outros sinais em δ_H 2,52 (δ_C 42,5), δ_H 2,22 (δ_C 11,5) e em δ_H 1,51 (δ_C 20,1), que foram atribuídos a um grupo metileno e dois grupos metil, respectivamente (Tabela 25).

Os dados de RMN de ¹³C (Figura 82). obtidos para o composto **18** revelaram 17 ressonâncias que foram atribuídas a nove carbonos da porção cumarina (δ_C 157,5, 112,1, 142,2, 109,8, 130,3, 122,2, 151,1, 130,3 e 145,6) com os grupos oximetileno e metil (δ_C 55,7 e 11,5); e também cinco carbonos da porção pirona (δ_C 163,6, 105,3, 192,9, 42,5, 75,7 e 190,0) com um grupo metil (δ_C 20,1) (Tabela 25).

As principais correlações de HMBC (Figura 84) de H-4 (δ_H 8,75) a C-3 (δ_C 112,1) e C-2' (δ_C 163,6) e H-3' (δ_H 6,55) a C-3 e C-2' foram importantes para estabelecer a conectividade entre as frações cumarina e pirona, ligadas por uma ligação C-3/C-2'. O metabólito **18** foi submetido às reações de acetilação e metilação para fornecer **18a** e **18b**, respectivamente, para auxiliar na elucidação estrutural de **18**. O produto metilado (**18b**) indicou a presença de dois grupos hidroxila fenólicos com base nos dados de RMN (Figuras 93-96). O espectro NOESY 2D (Figura 92) do composto **18a** apresentou melhor resolução quando comparado ao de **18**, sem sinais sobrepostos que permitiram observar as interações NOE de H₂-11 (δ_H 5,40) com H-4 (δ_H 8,72) e H₃-12 (δ_H 2,30) para **18a**.

Isso confirmou o posicionamento do grupo oximetileno entre o grupo metila e o hidrogênio aromático na estrutura do composto **18**.

Os espectros de RMN mono e bidimensionais dos produtos semi-sintéticos **18a** e **18b** encontram-se nas figuras 88-96.

Figura 80. Correlações de HMBC, COSY e NOESY envolvendo o metabólito **18** e seus derivados triacetato (**18a**) e dimetoxi (**18b**).

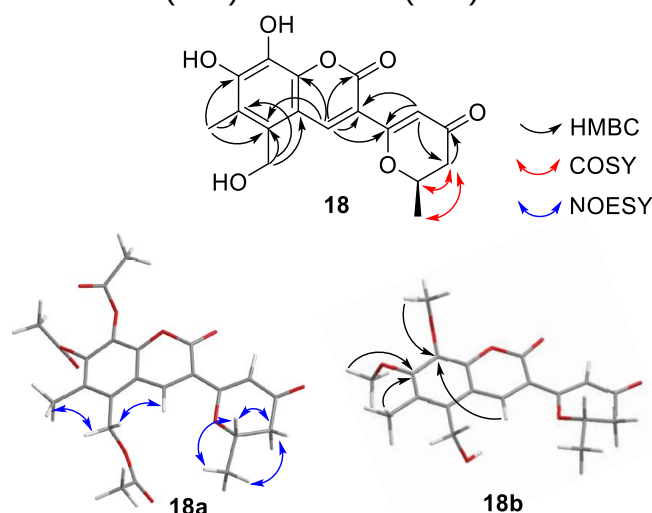


Tabela 25. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) para as substâncias **18-20**.

Posição	18^a		19^a		20^b	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , tipo	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , tipo	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , tipo
1						172,2, C
2		157,5, C		158,4, C		
3		112,1, C		105,3, C	4,66 m	78,0, C
4	8,75 s	142,2, CH	8,62 s	141,4, CH	2,85 ddd (16,2; 3,9; 0,7) 2,77 ddd (16,2; 11,0; 1,1)	35,0, CH ₂
5		109,8, C		105,3, C	6,27 dd (0,7; 1,1)	107,4, CH
6		130,3, C		138,8, C		153,9, C
7		122,2, C		124,4, C		132,6, C
8		151,1, C		167,8, C		152,5, C
9		130,3, C	6,44 br s	100,8, CH		101,9, C
10		145,6, C		155,9, C		133,0, C
11	4,71 s	55,7, CH ₂	4,66 s	56,5, CH ₂	1,46 d (6,3)	21,0, CH ₃
12	2,22 s	11,5, CH ₃	2,14 s	11,4, CH ₃		
2'		163,6, C		164,8, C		
3'	6,55 s	105,3, CH	6,50 s	104,1, CH		
4'		192,9, C		193,0, C		
5'	2,49-2,56 ^c	42,5, CH ₂	2,44-2,51 ^b	42,6, CH ₂		
6'	4,71 m	75,7, CH	4,63 m	75,6, CH		
7'	1,51 d (6,4)	20,1, CH ₃	1,48 d (6,4)	20,3, CH ₃		

^a Adquirido em DMSO-*d*₆, ^b adquirido em CD₃OD, ^c sobreposição com o sinal do resíduo do solvente.

Tabela 26. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) para os derivados semi-sintéticos de **18** e **19**.

Posição	18a ^a		18b ^b		19a ^a	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , tipo	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , tipo	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , tipo
2		155,6, C		157,5, C		156,8, C
3		119,5, C		116,4, C		119,1, C
4	8,72 s	139,3, CH	8,78 s	142,0, CH	8,70 s	139,3, CH
5		116,9, C		114,3, C		116,1, C
6		130,3, C		134,4, C		133,7, C
7		129,4, C		128,0, C		128,6, C
8		145,5, C		155,6, C		153,1, C
9		130,7, C		138,7, C	7,11 s	111,3, C
10		145,5, C		147,0, C		153,0, C
11	5,40 s	58,2, CH ₂	4,71 s	56,5, CH ₂	5,42 s	58,5, CH ₂
12	2,30 s	12,5, CH ₃	2,29 s	12,0, CH ₃	2,28 s	12,3, CH ₃
2'		162,1, C		163,3, C		162,4, C
3'	6,83 s	107,9, CH	6,55 s	106,0, CH	6,86 s	107,8, CH
4'		193,7, C		193,5, C		193,7, C
5'	2,58 dd (16,8; 12,8) 2,56 dd (16,8; 3,7)	43,2, CH ₂	2,50-2,58 ^c	42,9, CH ₂	2,56 dd (16,7; 12,8) 2,53 dd (16,7; 3,7)	43,2, CH ₂
6'	4,68 m	76,1, CH	4,71 m	76,4, CH	4,68 m	76,0, CH
7'	1,58 d (6,4)	20,5, CH ₃	1,50 d (6,3)	20,5, CH ₃	1,56 d (6,4)	20,5, CH ₃
OAc	2,08 s	20,7, CH ₃ ; 170,3, C			2,07 s	20,8, CH ₃ ; 170,4, C
OAc	2,37 s	20,3, CH ₃ ; 167,3, C			2,38 s	20,8, CH ₃ ; 168,3, C
OAc	2,39 s	20,3, CH ₃ ; 167,0, C				
OCH ₃			3,91 s	61,4, CH ₃		
OCH ₃			3,92 s	61,7, CH ₃		

^a Adquirido em CDCl₃, ^b adquirido em DMSO-*d*₆, ^c sobreposição com o sinal do residuo do solvente.

Figura 81. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **18**.

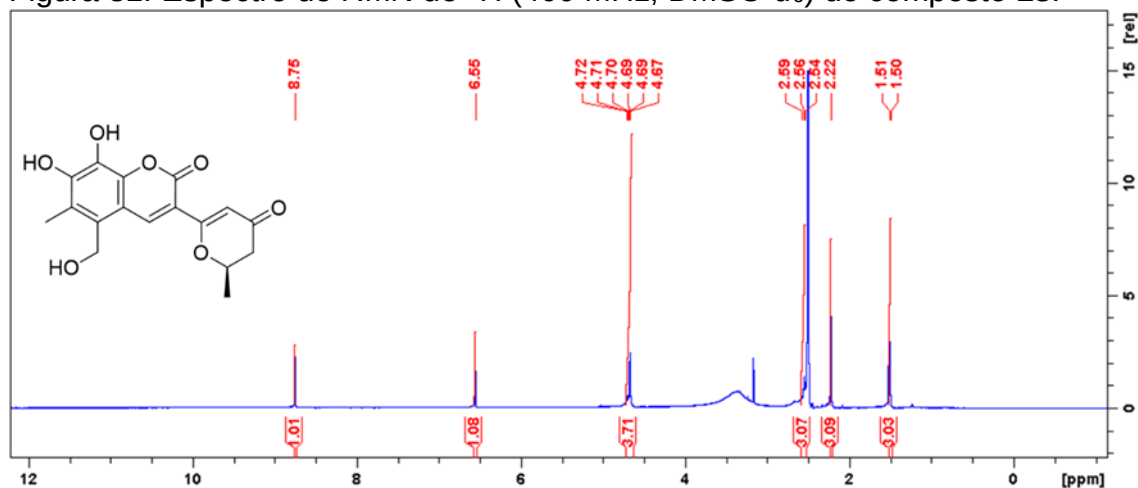


Figura 82. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **18**.

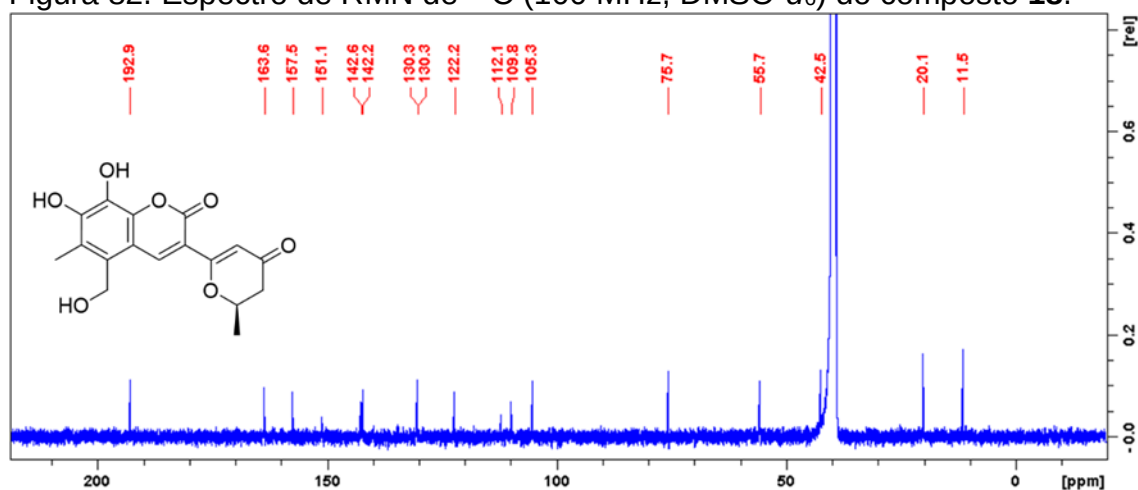


Figura 83. Mapa de contornos HSQC do composto **18** (400 e 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

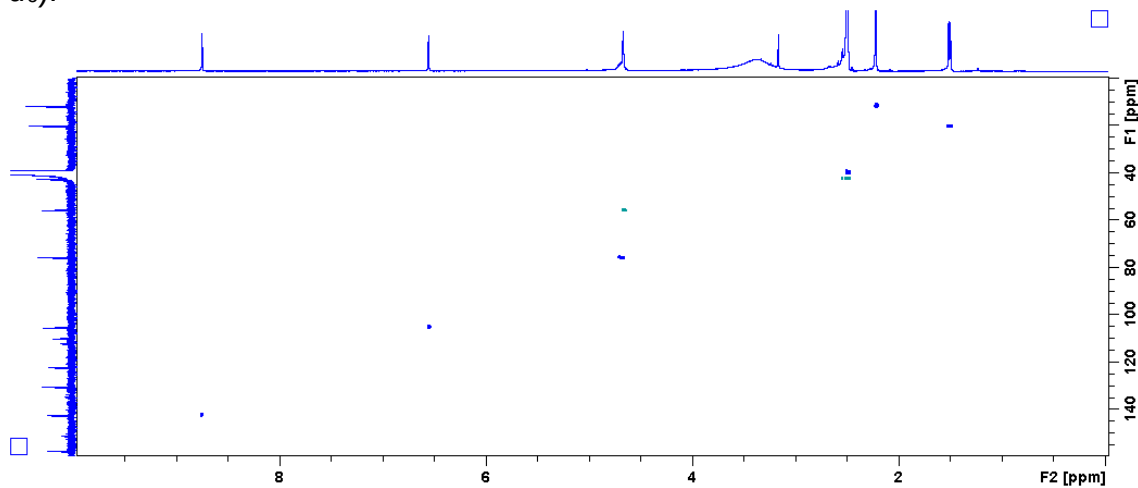


Figura 84. Mapa de contornos HMBC do composto **18** (400 e 100 MHz, DMSO- d_6).

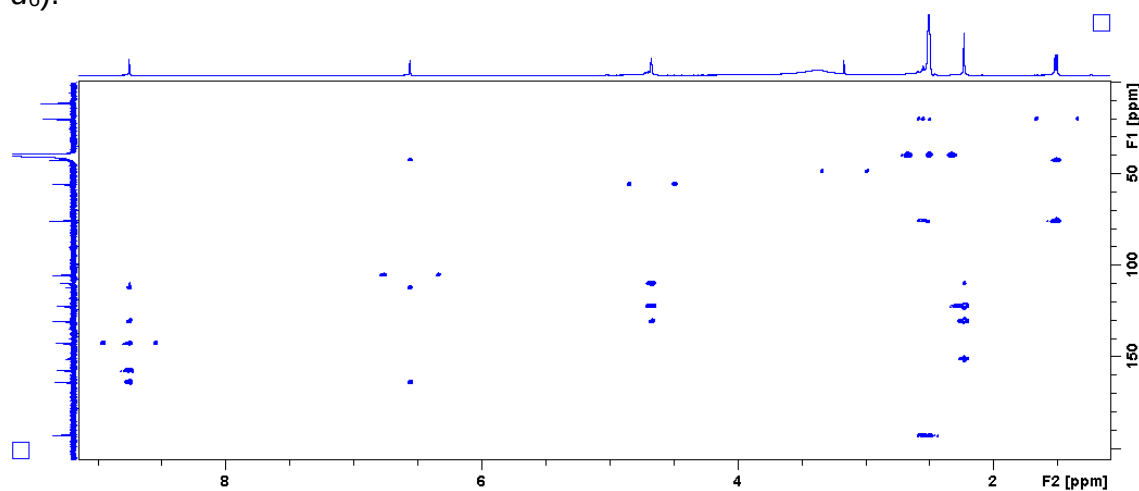


Figura 85. Experimento COSY do composto **18** (400 MHz, DMSO- d_6).

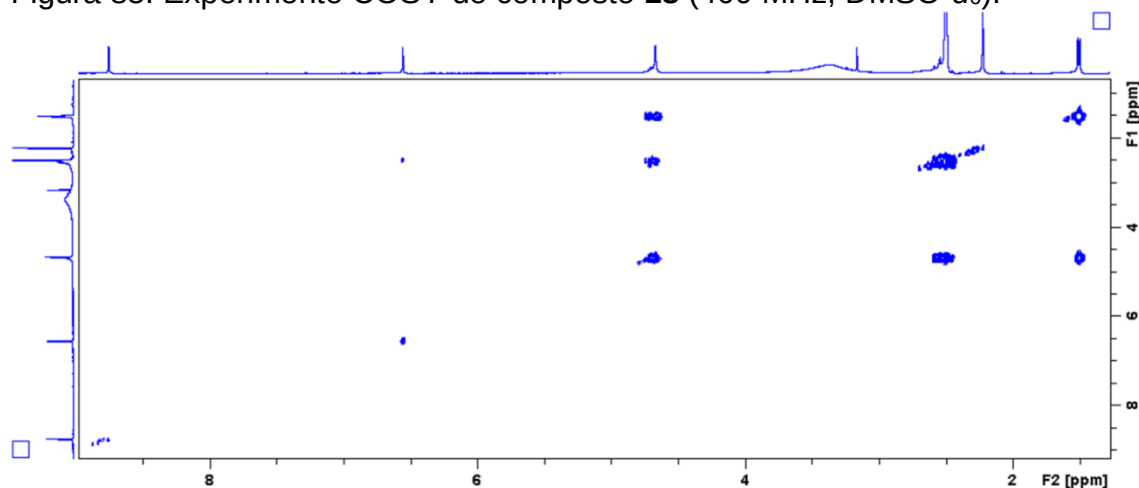


Figura 86. Espectro no IV do composto **18**.

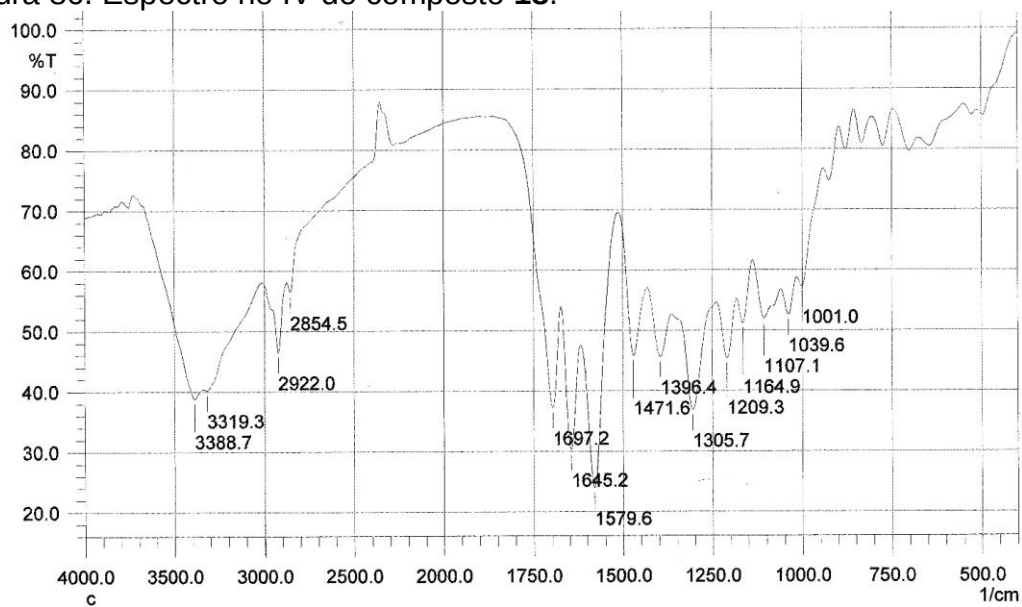


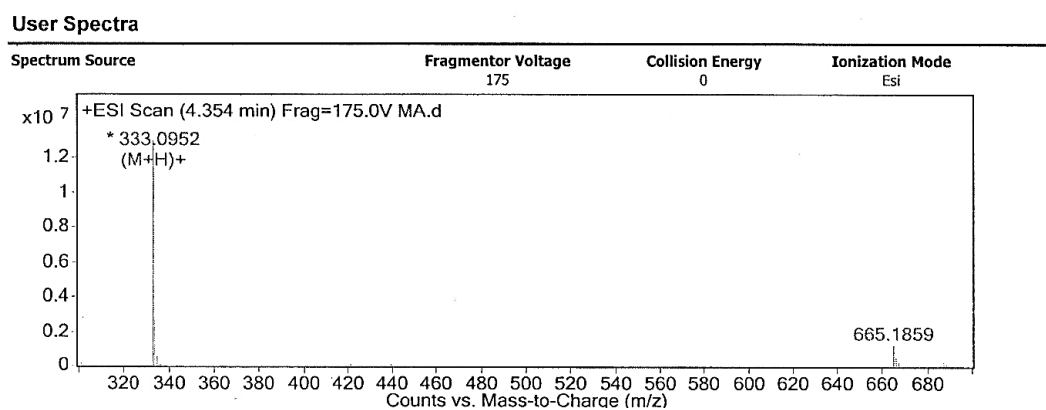
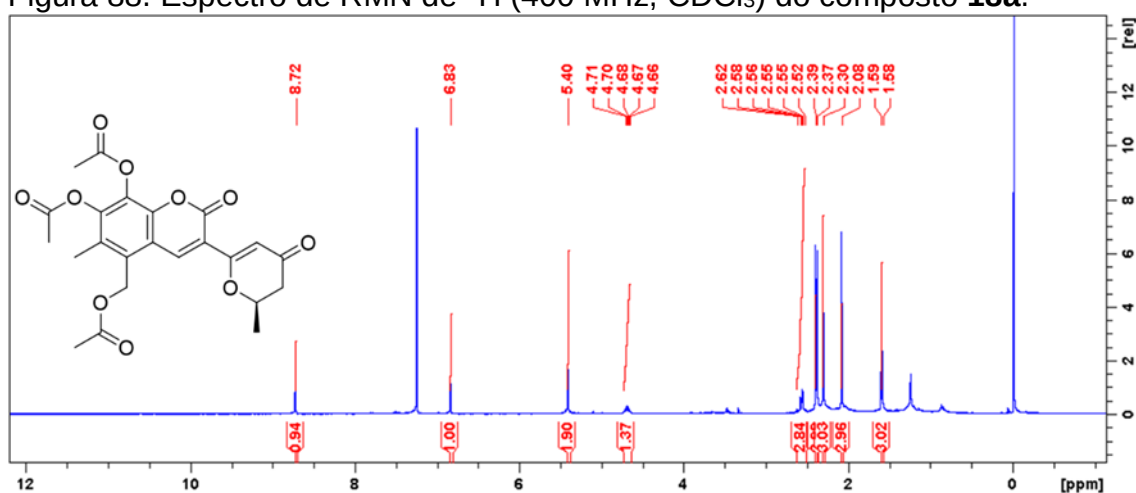
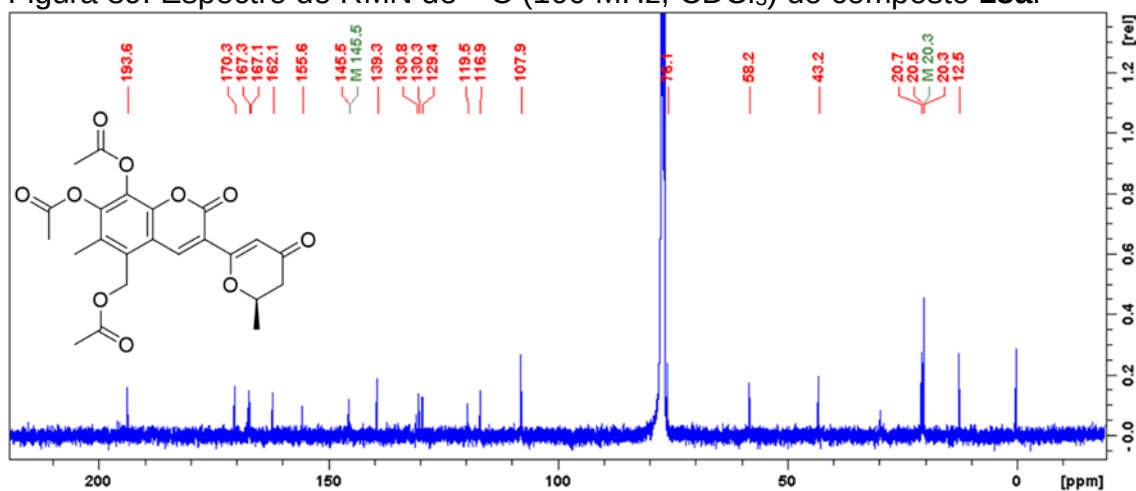
Figura 87. Espectro de HRMS do composto **18**.Figura 88. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **18a**.Figura 89. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **18a**.

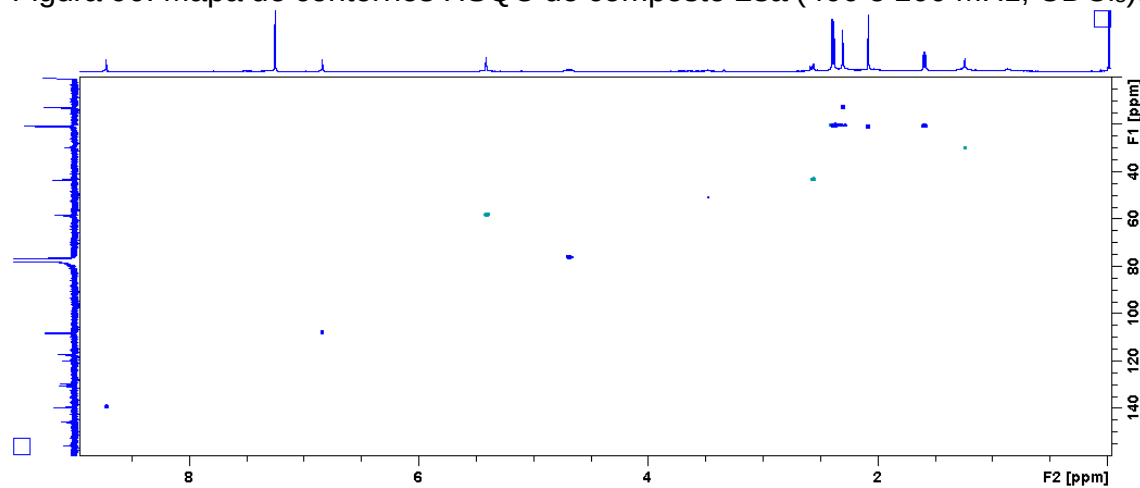
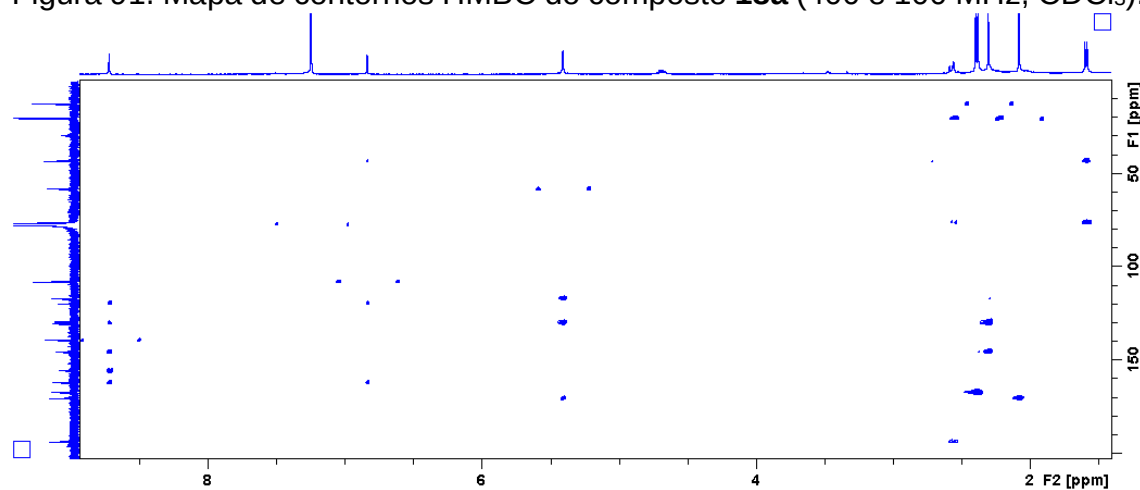
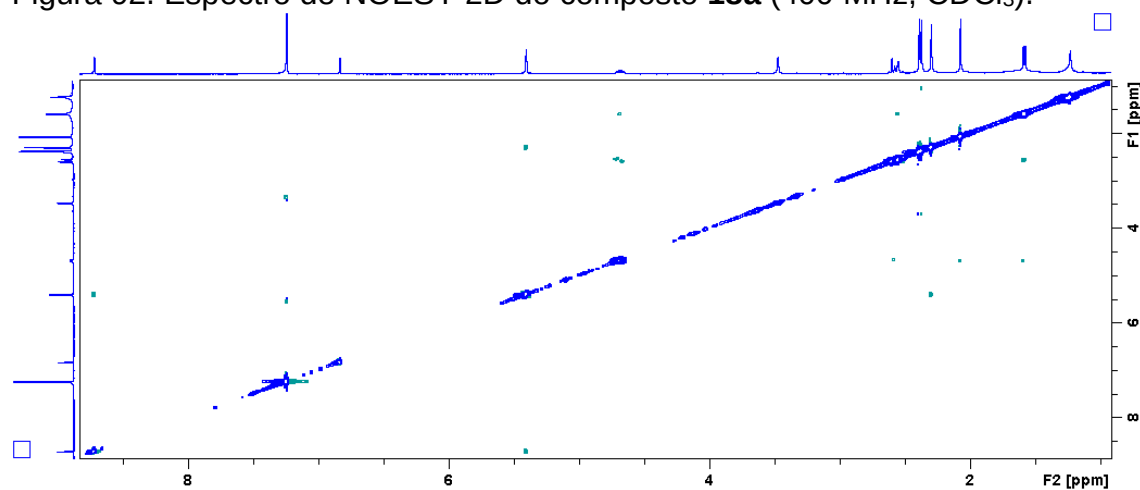
Figura 90. Mapa de contornos HSQC do composto **18a** (400 e 100 MHz, CDCl_3).Figura 91. Mapa de contornos HMBC do composto **18a** (400 e 100 MHz, CDCl_3).Figura 92. Espectro de NOESY 2D do composto **18a** (400 MHz, CDCl_3).

Figura 93. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **18b**.

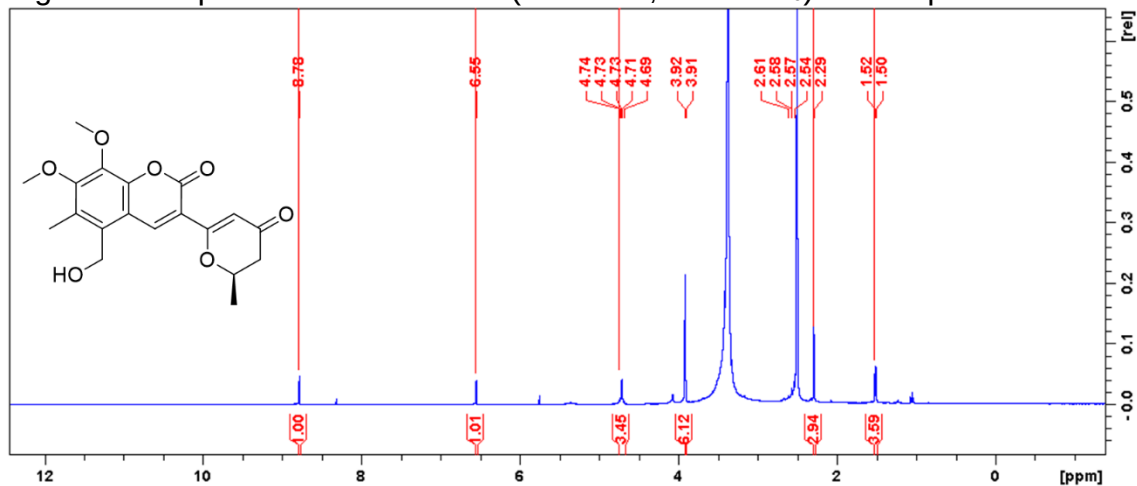


Figura 94. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **18b**.

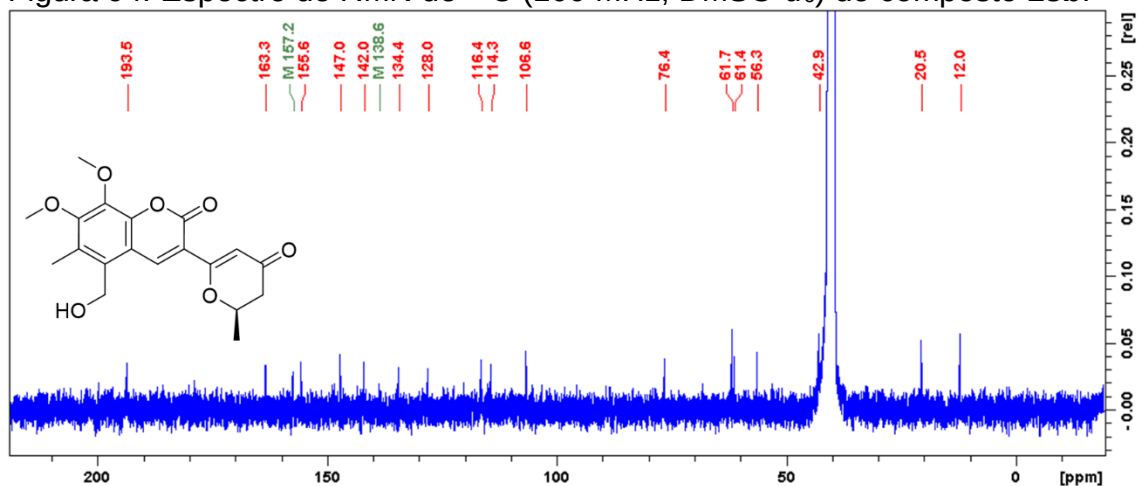


Figura 95. Mapa de contornos HMBC do composto **18b** (400 e 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

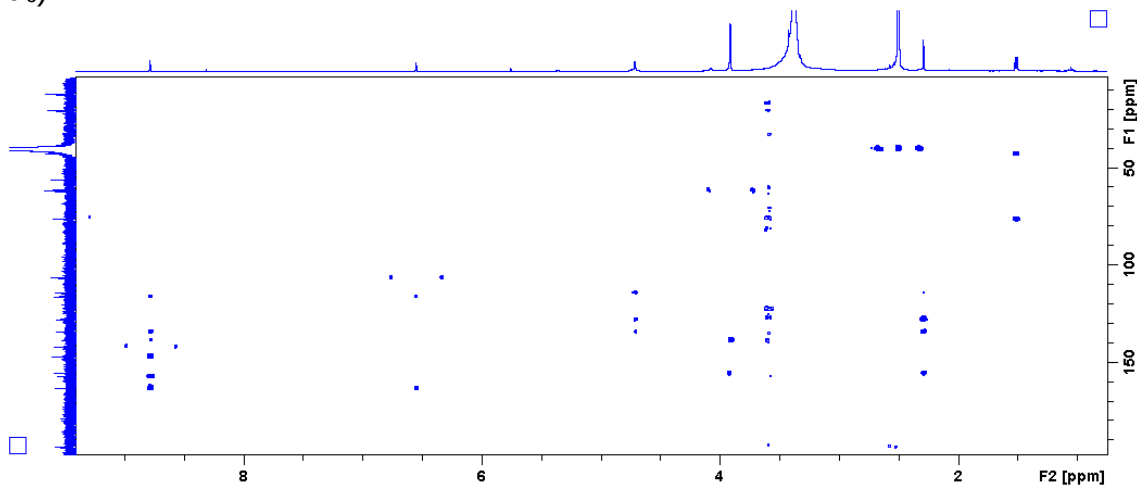
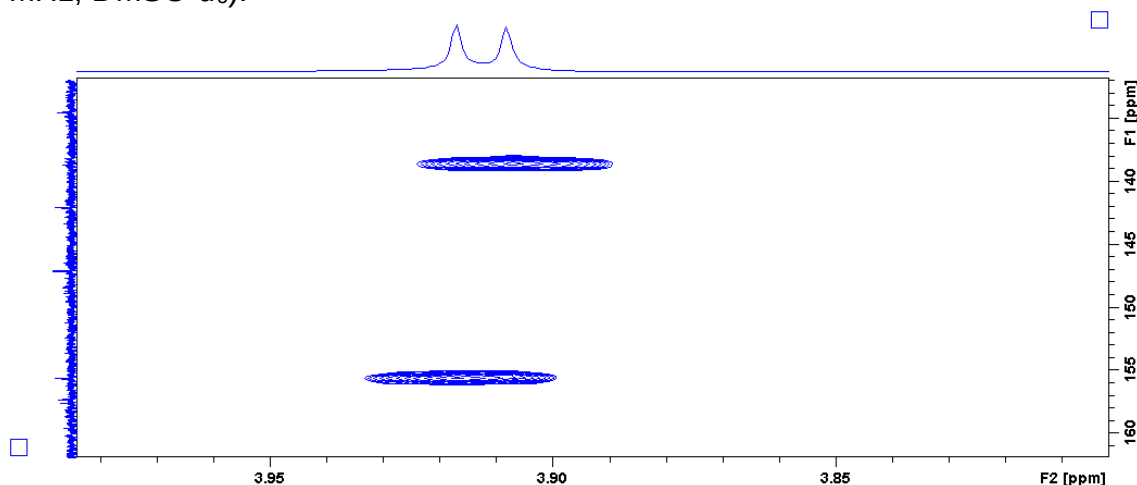


Figura 96. Expansão do mapa de contornos HMBC do composto **18b** (400 e 100 MHz, DMSO- d_6).

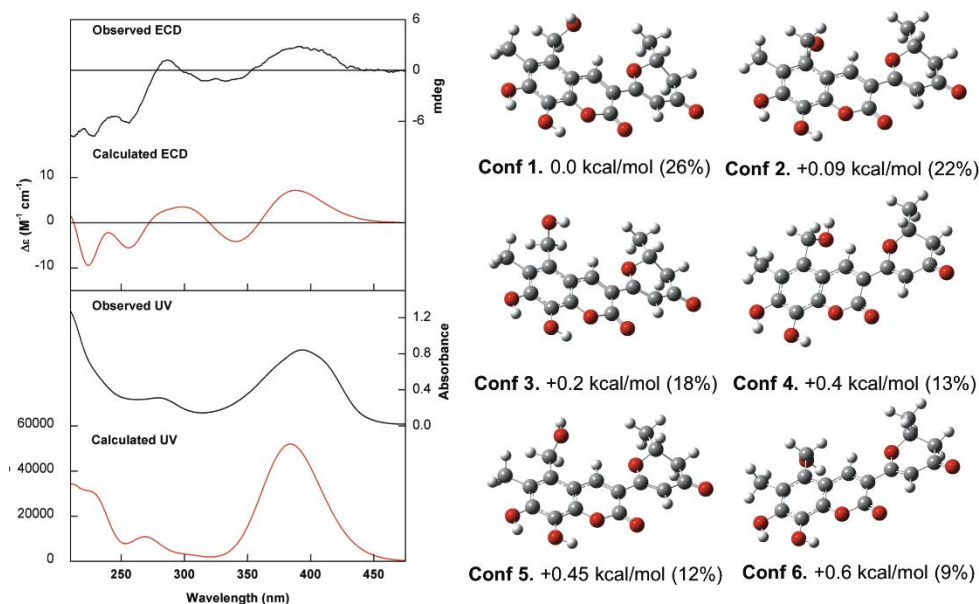


A configuração absoluta de **18** foi determinada sem ambiguidade pela comparação de seu espectro experimental de dicroísmo circular eletrônico (ECD), obtido em metanol, com o calculado no nível CAM-B3LYP/PCM (MeOH)/TZVP//B3LYP/PCM (MeOH)/6-31G (d). Os seis confôrmers de menor energia identificados para (*R*)-**18** resultaram no mesmo padrão de ECD calculado, com efeitos *Cotton* positivos em torno de 400 e 300 nm e efeitos negativos em torno de 350 e 250 nm. A excelente correlação entre os dados experimentais e os calculados levou à atribuição de (+)-**18** como *R* (Figura 97).

Determinou-se que o metabólito **19** (Figura 98), obtido também como um sólido amorfo amarelo e rotação óptica de $[\alpha]_D^{23} + 43,7$ (c 0,04, CH₃OH), possui a fórmula molecular C₁₇H₁₆O₆ por uma combinação de análise de HRMS ($[M + H]^+$ m/z 317,1029, calculado m/z 317,1020) (Figura 105) e dados de RMN, com os mesmos 10 índices de deficiência de hidrogênio, sugerindo um análogo reduzido de **18**. O espectro no IV de **19** (Figura 104) exibiu absorções em 1724 (éster α,β conjugado) e 1635 cm⁻¹ (cetona α,β conjugada).

A comparação dos dados de RMN de ¹H, HSQC e ¹³C de **19** (Figuras 99-101) com **18** revelou que eles diferem pela redução do grupo hidroxila em C-9 presente em **18** por um hidrogênio aromático em **19** [δ_H 6,44 (1H, brs, H-9), δ_C 100,8 (CH)] (Tabela 26). Isso foi confirmado ainda pelos dados do HMBC (Figura 102), que mostraram uma correlação entre H-9 com C-5 (δ_C 105.3), C-7 (δ_C 124.4) e C-10 (δ_C 155.9) e H-4 (δ_H 8,62) com C-6 (δ_C 138,8) (Figura 103).

Figura 97. (Esquerda) Comparação dos espectros de UV e ECD observados de (+)-**18** em metanol (traço preto) com os espectros de UV e ECD [CAM-B3LYP/PCM (MeOH)/TZVP] calculados da média de Boltzmann dos seis mais baixos conformêros de energia identificados para (*R*)-**18** (traço vermelho). (Direita) Estruturas otimizadas, energias relativas livres de Gibbs e população de Boltzmann (%) dos conformêros de menor energia de (*R*)-**18** no nível B3LYP/PCM (MeOH)/6-31G (d).



A configuração absoluta de (+)-**19** também foi determinada como *R* pela comparação dos dados de ECD observados e calculados (Figura 106). A substituição de um grupo hidroxila, diretamente ligado ao cromóforo aromático, por um átomo de hidrogênio em C-9 não resultou em nenhuma alteração significativa nas propriedades quiróticas de **19** quando comparado com **18**.

Adicionalmente, o metabólito **19** foi submetido à reação de acetilação fornecendo o produto semi-sintético **19a** que apresenta seus espectros de RMN mono e bidimensionais nas figuras 107-110.

O metabólito **20** (Figura 98) obtido como um sólido amorfo branco apresentou rotação óptica de $[\alpha]_D^{23} - 46.8$ (c 0,06, CH₃OH). Este metabólito possui a fórmula molecular C₁₀H₁₀O₅ por uma combinação de análise HRMS ($[M + H]^+$ m/z 211,0605, calculado m/z 211,0601) (Figura 118) e dados de RMN, indicando índice de deficiência de hidrogênio igual a 6. O espectro no IV mostrou bandas de absorção intensas em 3398 cm⁻¹ (hidroxila) e 1643 cm⁻¹ (carbonila de éster) (Figura 117).

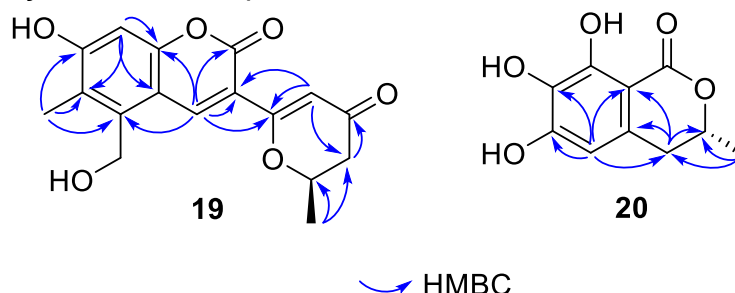
Os dados espectroscópicos de RMN de ^1H de **20** (Figuras 111-113) forneceram as ressonâncias de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 6,27 com acoplamento ^4J (dd, $J = 0,7$ e $1,1$ Hz, H-5) com os hidrogênios diastereotópicos do grupo metileno em δ_{H} 2,85 (ddd, $J = 16,2, 3,9$ e $0,7$ Hz, H-4) e δ_{H} 2,77 (ddd, $J = 16,2, 11,0$ e $1,1$ Hz, H-4), um grupo metila em δ_{H} 1,46 (d, $J = 6,3$ Hz, H-11) e um sinal de grupo oximetino em δ_{H} 4,56 (m, H-3).

A combinação dos espectros de ^{13}C e HSQC de **20** (Figuras 114 e 115) exibiu 10 sinais de carbonos que poderiam ser atribuídos como 7 carbonos sp^2 , incluindo uma carbonila de lactona α,β -insaturada (δ_{C} 172,2), e três carbonos sp^3 (δ_{C} 21,0, 35,0 e 78,0). Os dados de RMN 1D e 2D sugeriram uma estreita relação estrutural com a substância 6-hidroximeleina (**22**) (QUANG *et al.*, 2013) diferenciando apenas devido a presença de um grupo hidroxila a mais em **20**.

A diferença entre as substâncias **20** e **27** é o posicionamento do hidrogênio aromático. Para a substância **20** o hidrogênio aromático está localizado em C-5, enquanto que para **27** está localizado em C-7. Foi possível observar no espectro de RMN de ^1H de **20** acoplamentos a longa distância observados entre H-5 e H-4 (Figuras 110-113), bem como correlações por dados de HMBC (Figura 116) de H-5 com C-4 (δ_{C} 35,0) e H-4 com C-5 (δ_{C} 107,7) corroborando para o posicionamento do hidrogênio aromático em C-5.

Finalmente, a configuração absoluta de **20** foi confirmada como *R* pela comparação dos espectros de ECD (Figura 119) que mostrou efeito *Cotton* negativo em torno de 270 nm (transição $n \rightarrow \pi^*$, lactona CO) com a autêntica (*R*)-5,6-dimetoximeleina (**24**), bem como em (*R*)-meleina e (*R*)-6-metoximeleina (ARAKAWA, 1968; GOVINDACHARI; PATANKAR; VISWANATHAN, 1971).

Figura 98. Correlações de HMBC para **19** e **20**.



Assim, o metabólito **20** foi identificado como (-)-(R)-3,4-diidro-3-metil-6,7,8-triidroxi-1*H*-2-benzopiran-1-ona.

Figura 99. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **19**.

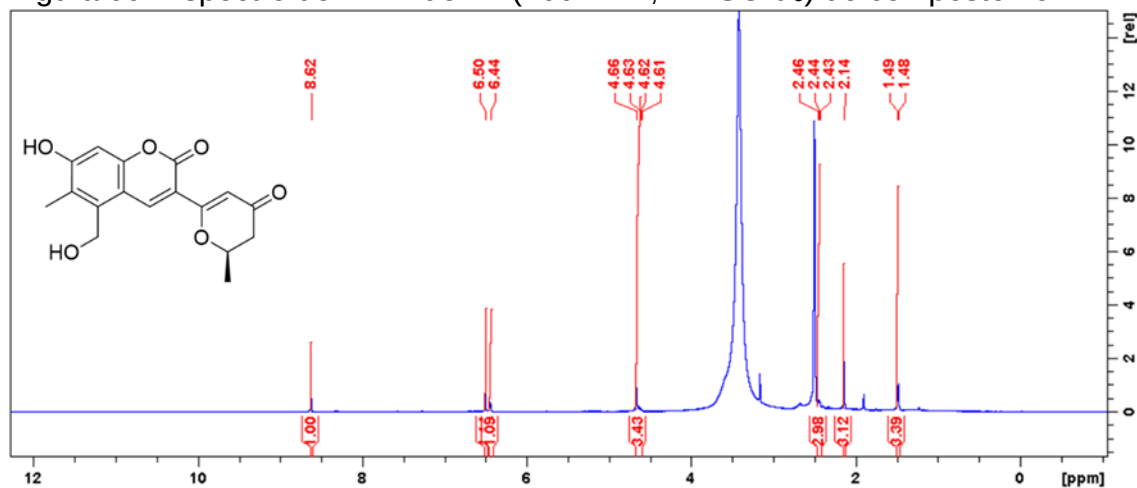


Figura 100. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **19**.

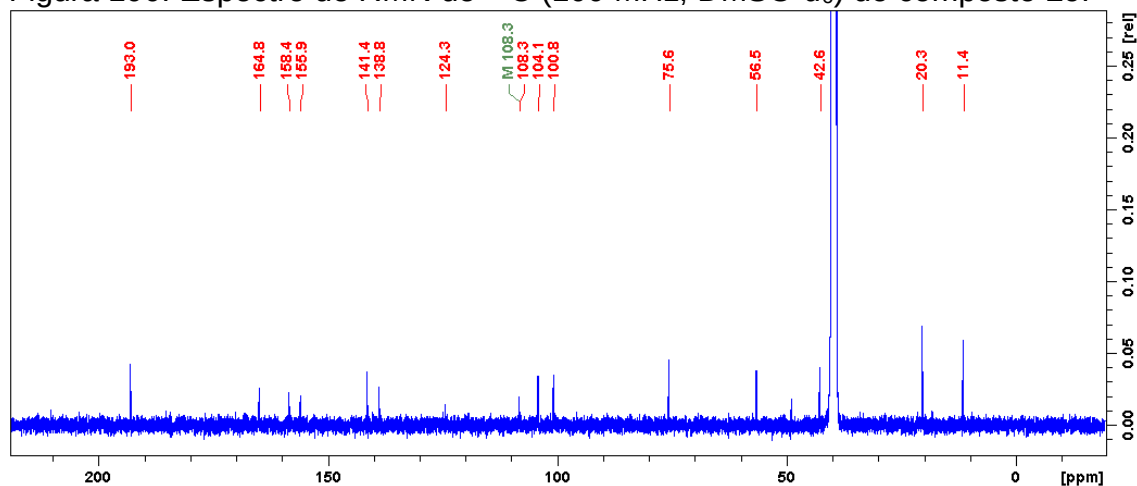


Figura 101. Mapa de contornos HSQC do composto **19** (400 e 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

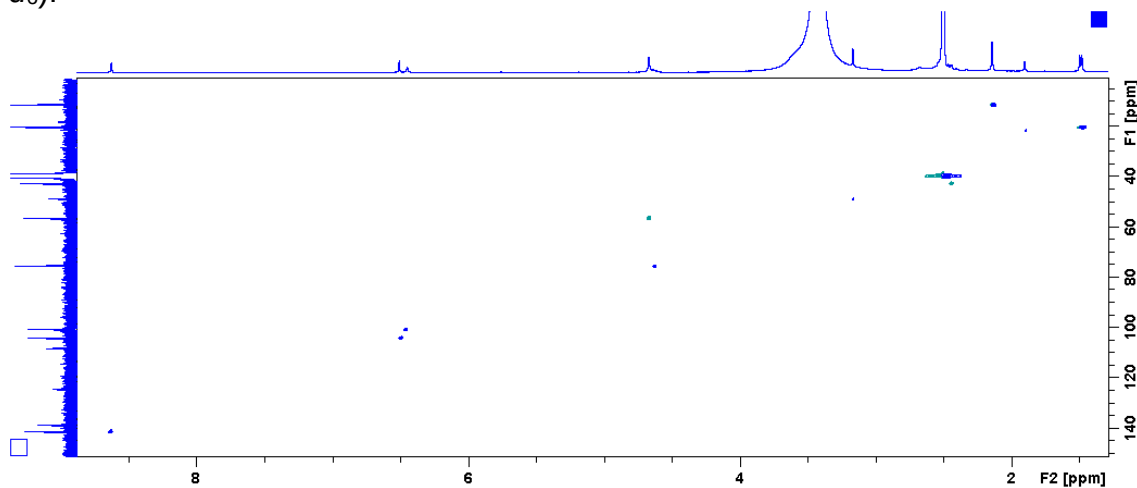


Figura 102. Mapa de contornos HMBC do composto **19** (400 e 100 MHz, DMSO- d_6).

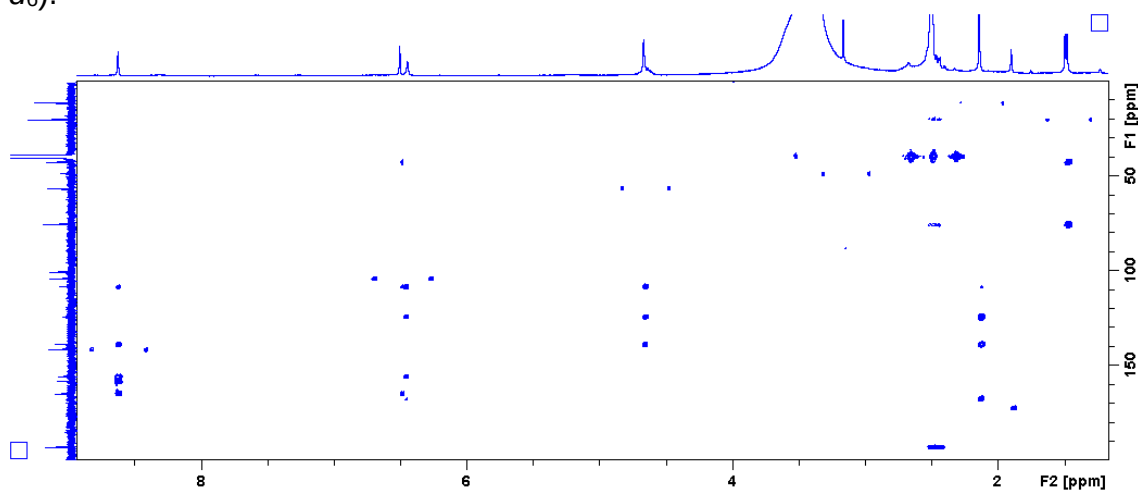


Figura 103. Expansão do mapa de contornos HMBC do composto **19** (400 e 100 MHz, DMSO- d_6).

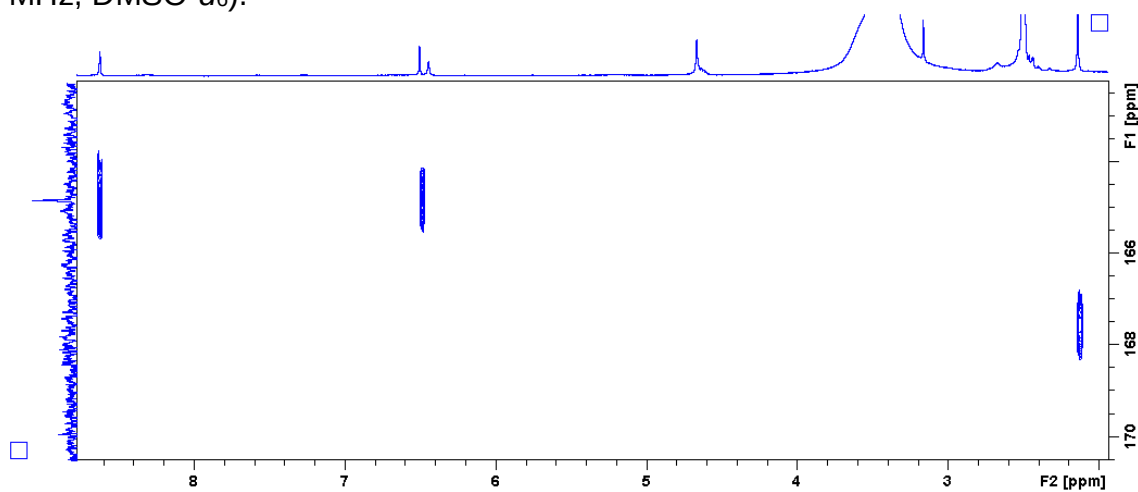


Figura 104. Espectro de IV do composto **19**.

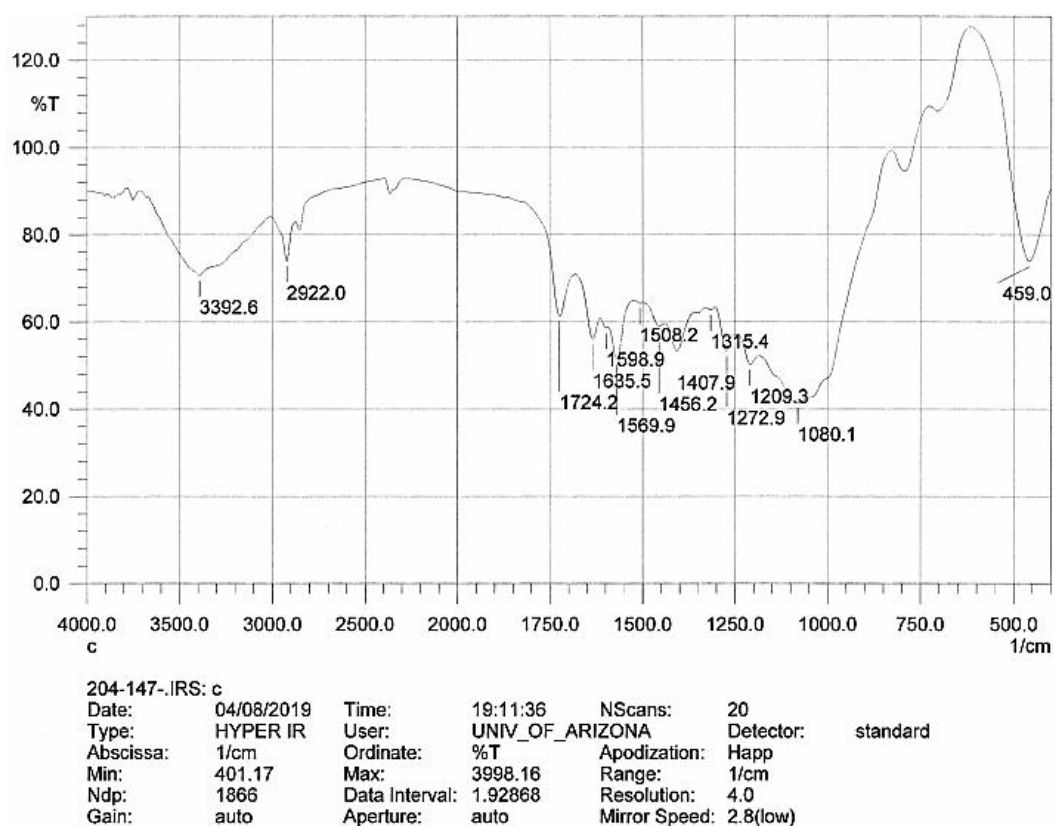


Figura 105. Espectro de HRMS do composto **19**.

Qualitative Analysis Report

User Spectra

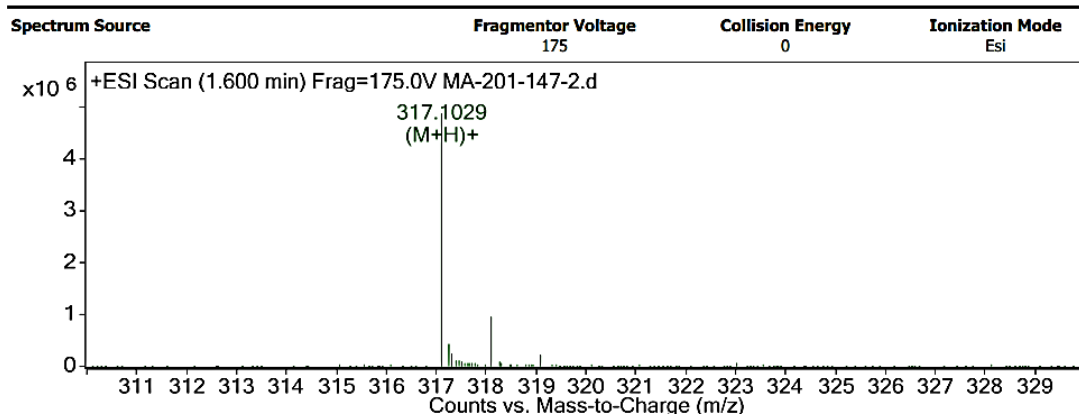


Figura 106. Comparação dos espectros de UV e ECD observados de (+)-**19** em metanol (traço preto) com os espectros de UV e ECD [CAM-B3LYP/PCM (MeOH)/TZVP] calculados da média de Boltzmann dos seis conformeros de menor energia identificado para (*R*)-**19** (traço vermelho).

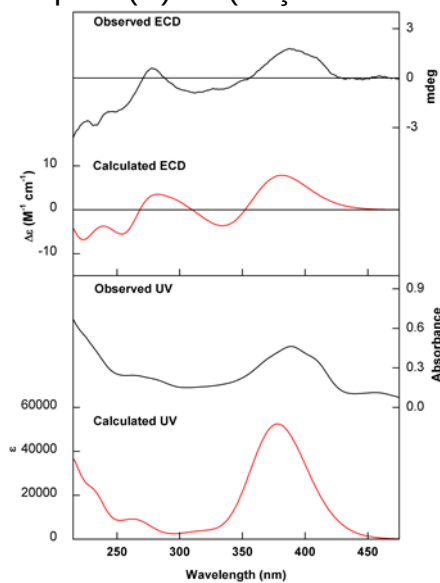


Figura 107. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **19a**.

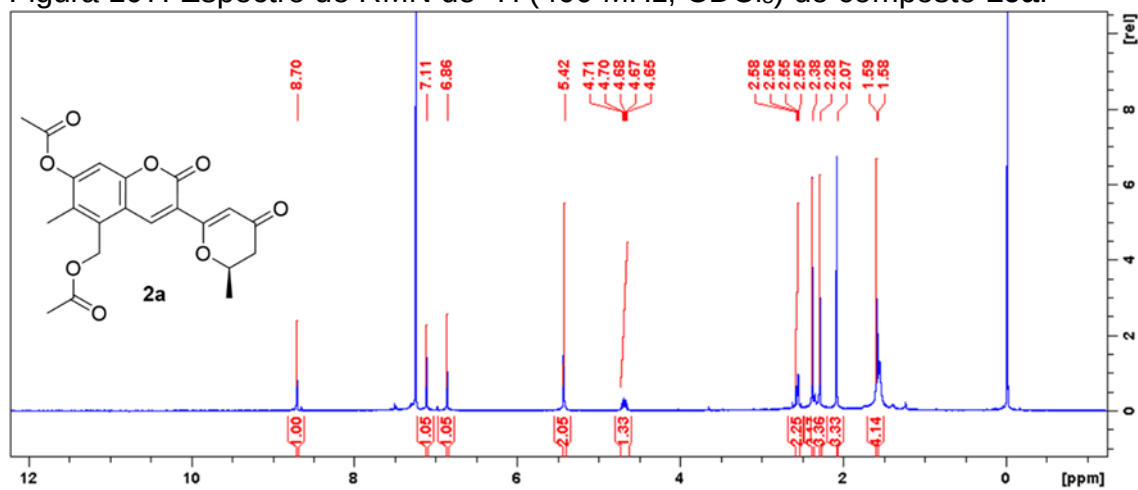


Figura 108. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **19a**.

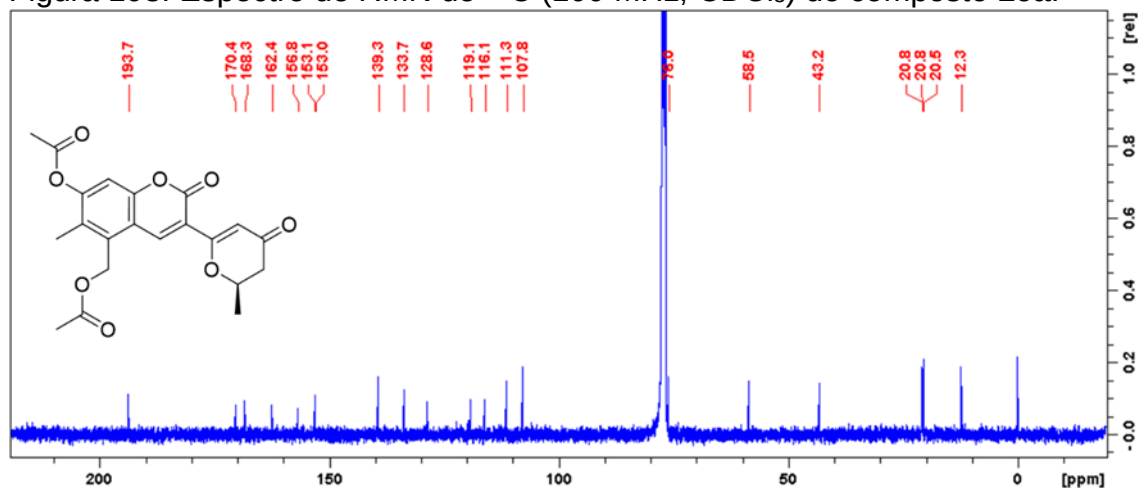


Figura 109. Mapa de contornos HSQC do composto **19a** (400 e 100 MHz, CDCl_3).

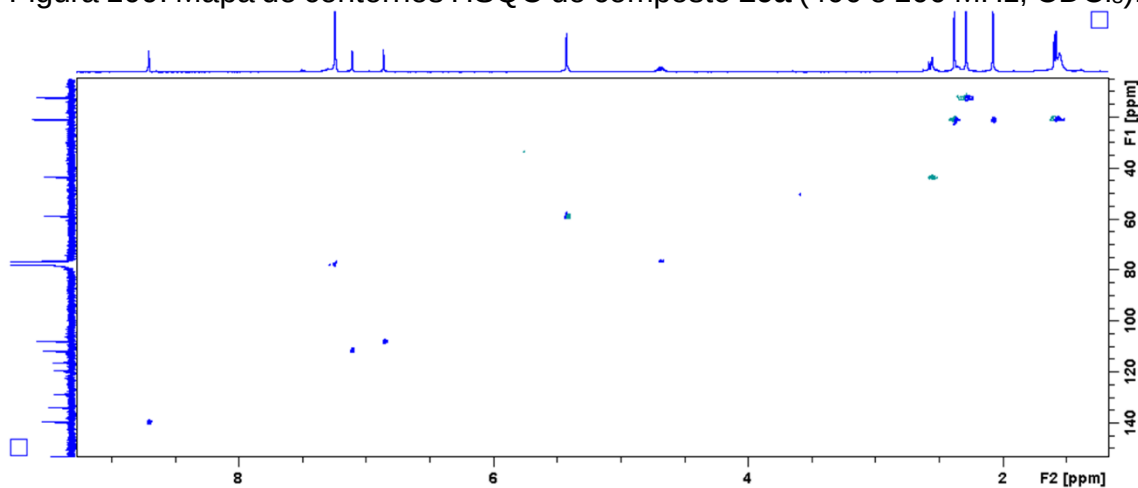


Figura 110. Mapa de contornos HMBC do composto **19a** (400 e 100 MHz, CDCl_3).

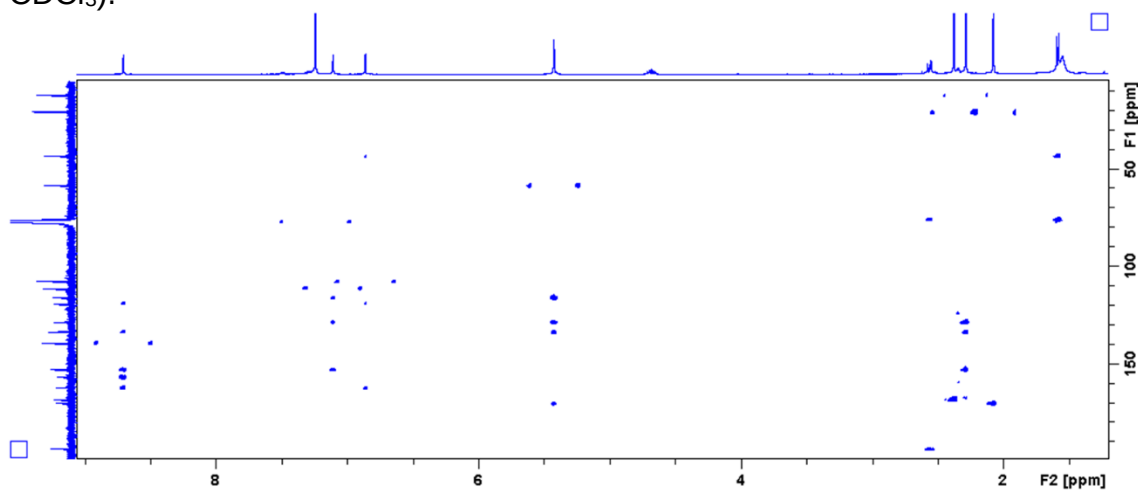


Figura 111. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) do composto **20**.

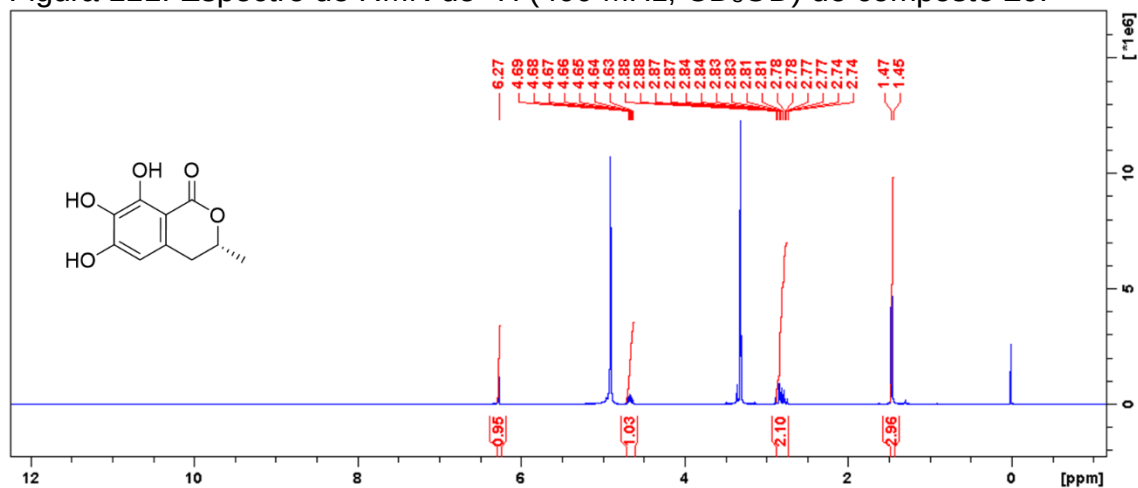


Figura 112. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) do composto **20**.

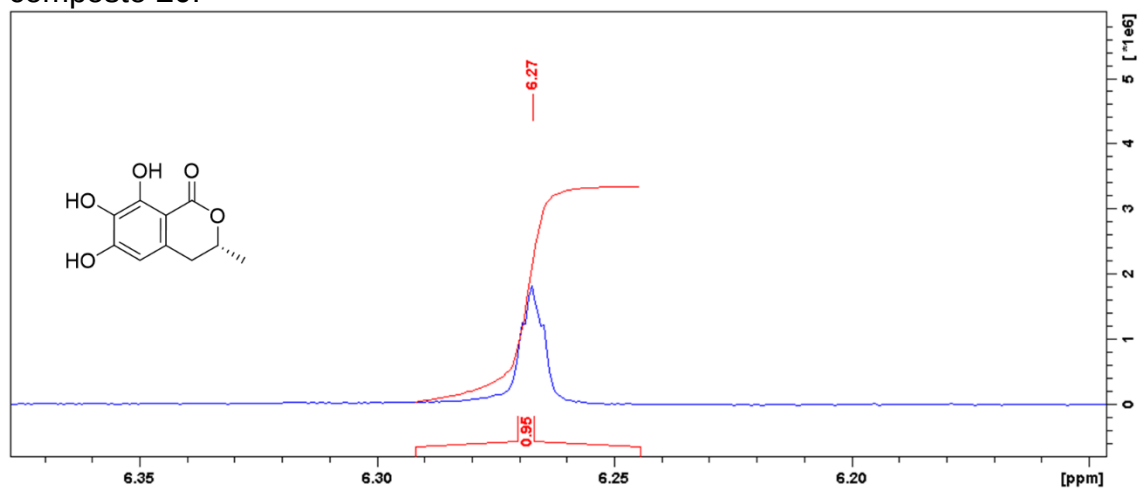


Figura 113. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) do composto **20**.

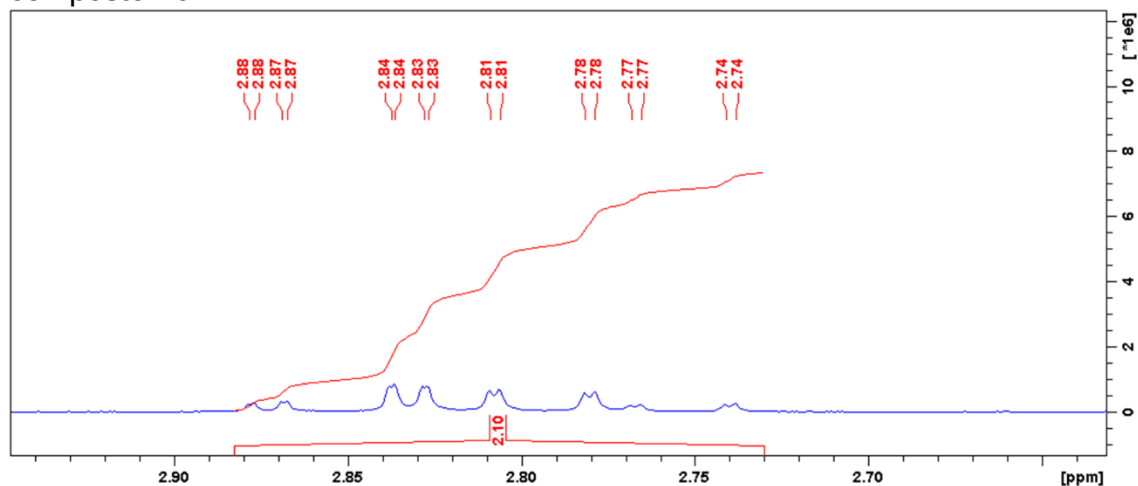


Figura 114. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) do composto **20**.

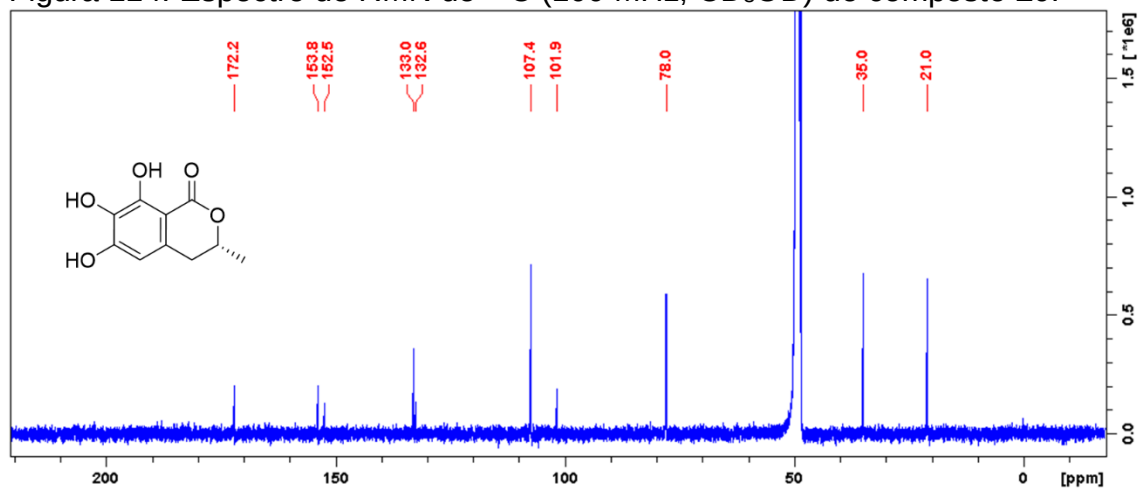


Figura 115. Mapa de contornos HSQC do composto **20** (400 e 100 MHz, CD_3OD).

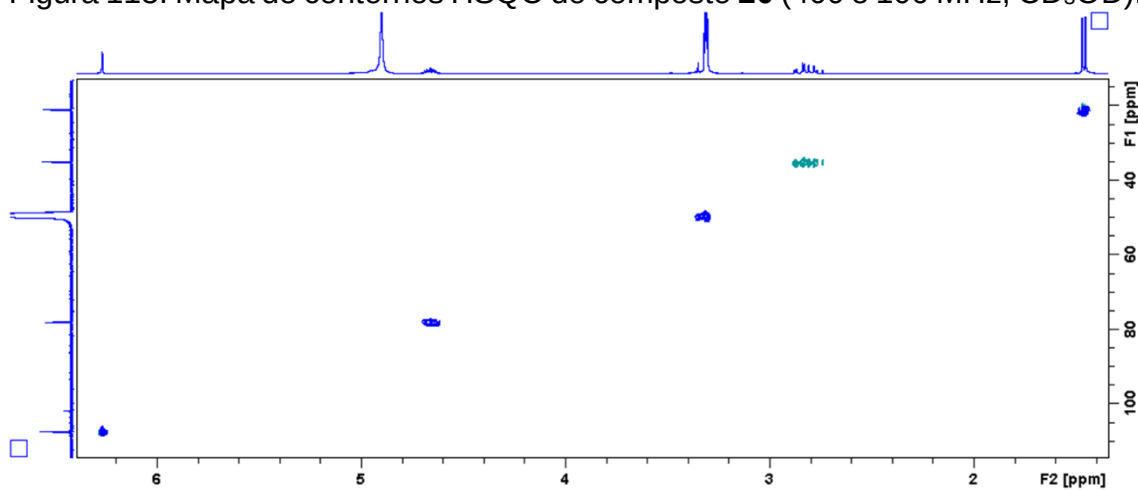


Figura 116. Mapa de contornos HMBC do composto **20** (400 e 100 MHz, CD_3OD).

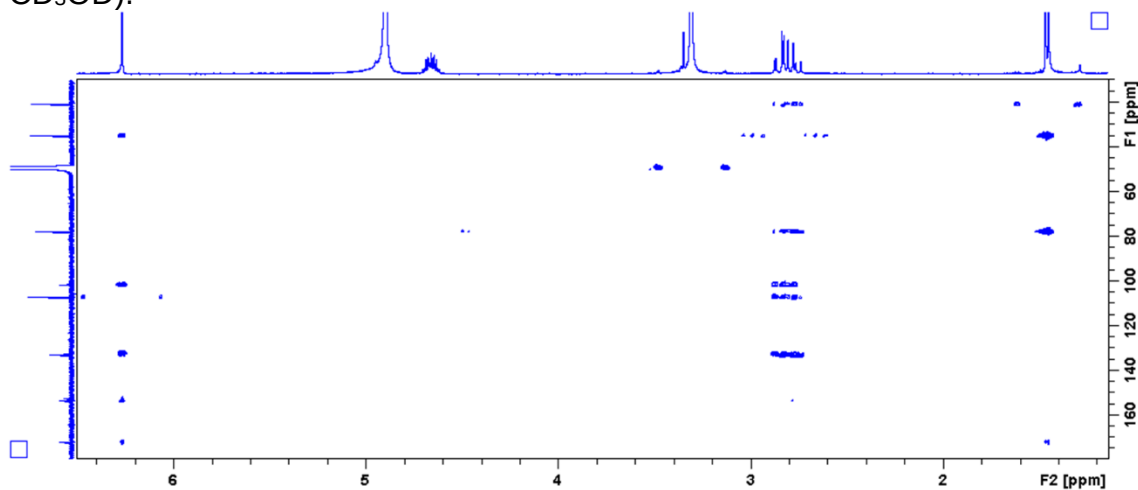


Figura 117. Espectro no IV de 20.

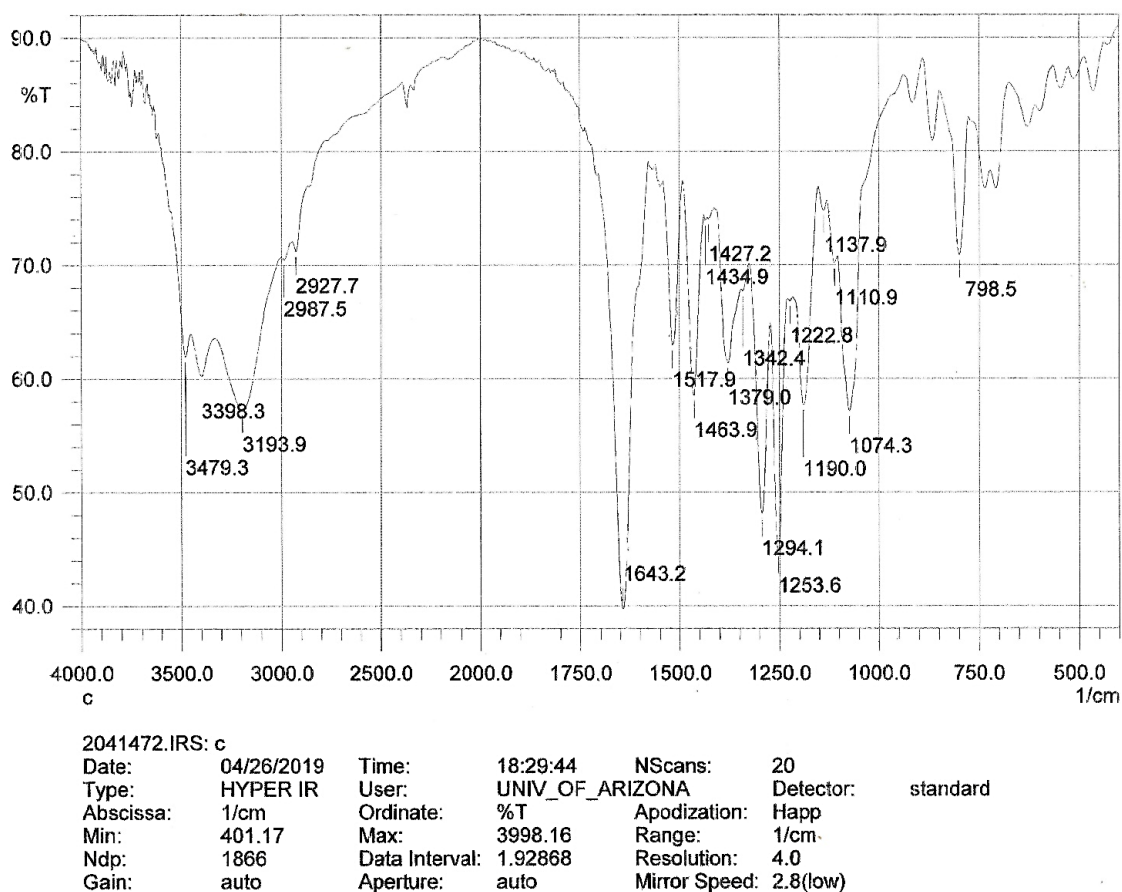


Figura 118. Espectro de HRMS do composto 20.

Qualitative Analysis Report

User Spectra

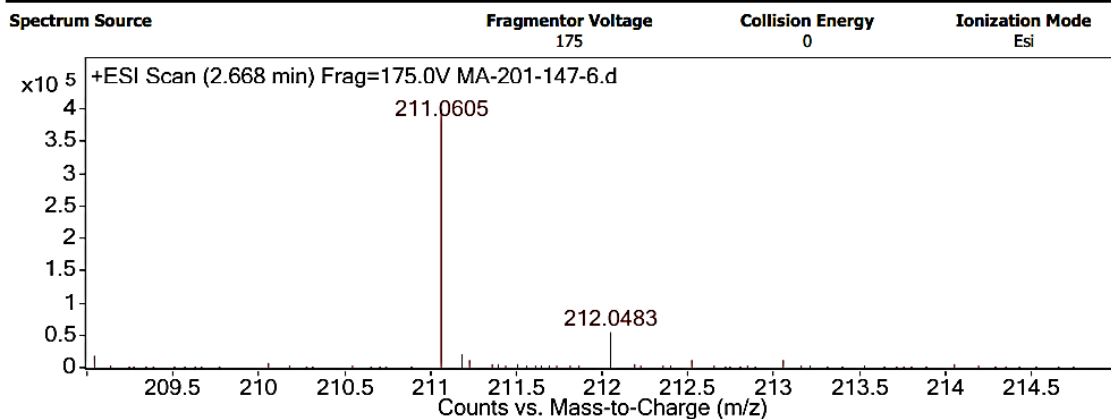
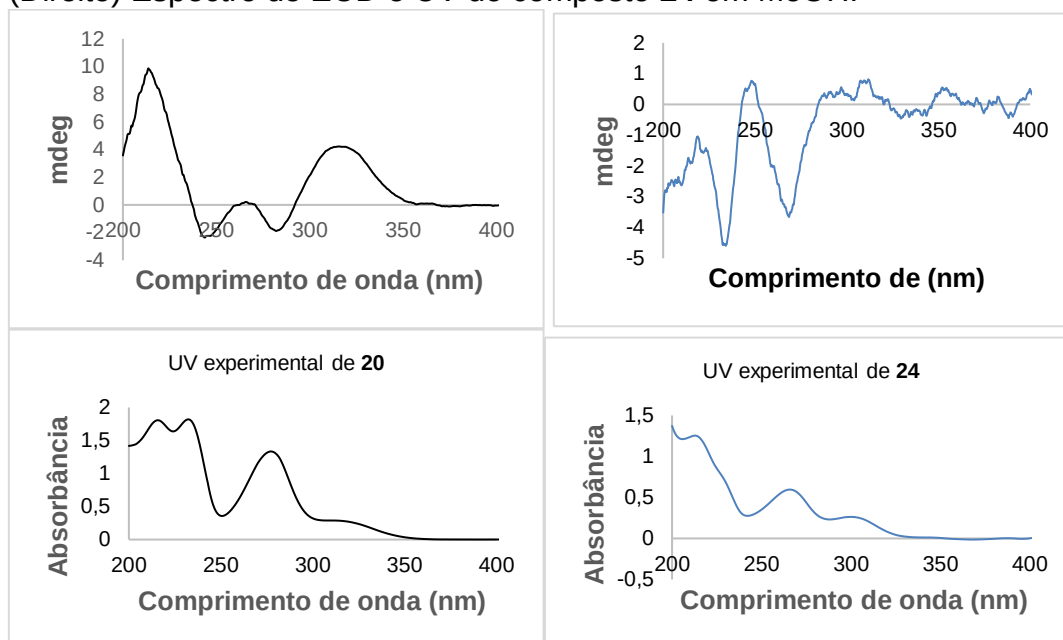
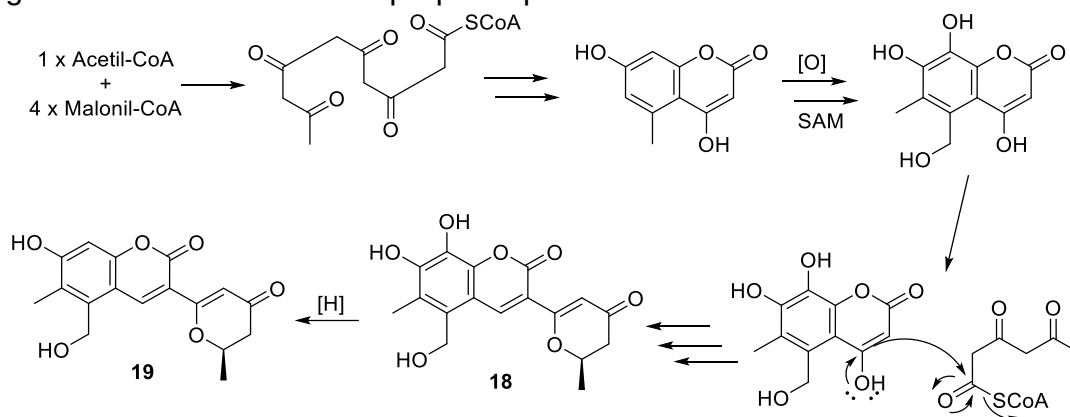


Figura 119. (Esquerda) Espectro de ECD e UV do composto **20** em MeOH. (Direito) Espectro de ECD e UV do composto **24** em MeOH.



Uma provável via biossintética para as substâncias **18** e **19** envolvendo uma ligação entre a porção cumarina e pirona está representada na Figura 120. O produto intermediário 4,7-diidroxi-5-metilcumarina foi produzido por PKs de *Aspergillus niger* e *Gerbera hybrida* (GIROL *et al.*, 2012; PIETIÄINEN *et al.*, 2016). A extensão da cadeia policetílica ocorre através de um ataque nucleofílico do produto intermediário 4,7-diidroxi-5-metilcumarina a triacetil-CoA, seguido de ciclização, desidratação e redução para formar o metabólito **18** e, posteriormente, a redução em C-9 para fornecer o metabólito **19**.

Figura 120. Via biossintética proposta para as substâncias **18** e **19**.



4.20. Identificação das substâncias 21-28

A identificação dos metabolites **21-28** (Figura 79) foi estabelecida por comparação de seus dados espectroscópicos de RMN (Figuras 121-132) e dados físicos de rotação óptica com aqueles reportados como (+)-terreina (**21**) (LIAO *et al.*, 2012; TRABOLSY *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2016), (-)-(R)-6-hidroximeleina (**22**) (ISLAM; ISHIGAMI; WATANABE, 2007; QUANG *et al.*, 2013), (-)-(R)-ortosporina (**23**) (ICHIHARA *et al.*, 1989; WU *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2016a), (-)-(R)-6,7-dimetoximeleina (**24**) (CHOUDHARY *et al.*, 2004; GOVINDACHARI; PATANKAR; VISWANATHAN, 1971), (-)-(R)-6-metoximeleina (**25**) (ISLAM; ISHIGAMI; WATANABE, 2007; TANAHASHI; TAKENAKA; HAMADA, 2011), farnesol (**26**) (DEBARBER *et al.*, 2004), (-)-(R)-3,4-diidro-3-metil-5,6,8-triidroxi-1H-2-benzopirran-1-ona (**27**) (KROHN *et al.*, 1997) e 3-metilorselinato de etila (**28**) (KAWAHARA *et al.*, 1988).

Figura 121. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) do composto **21**.

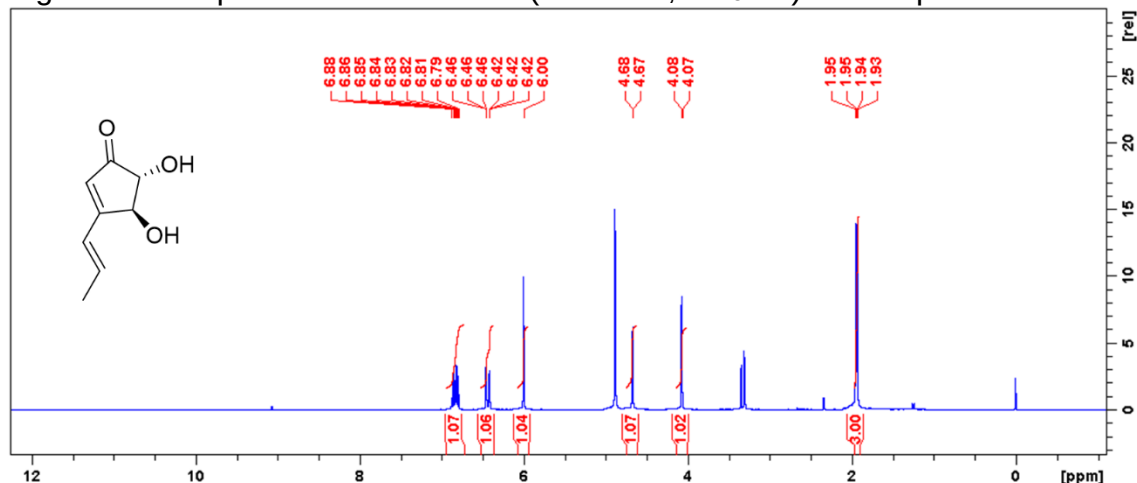


Figura 122. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) do composto **21**.

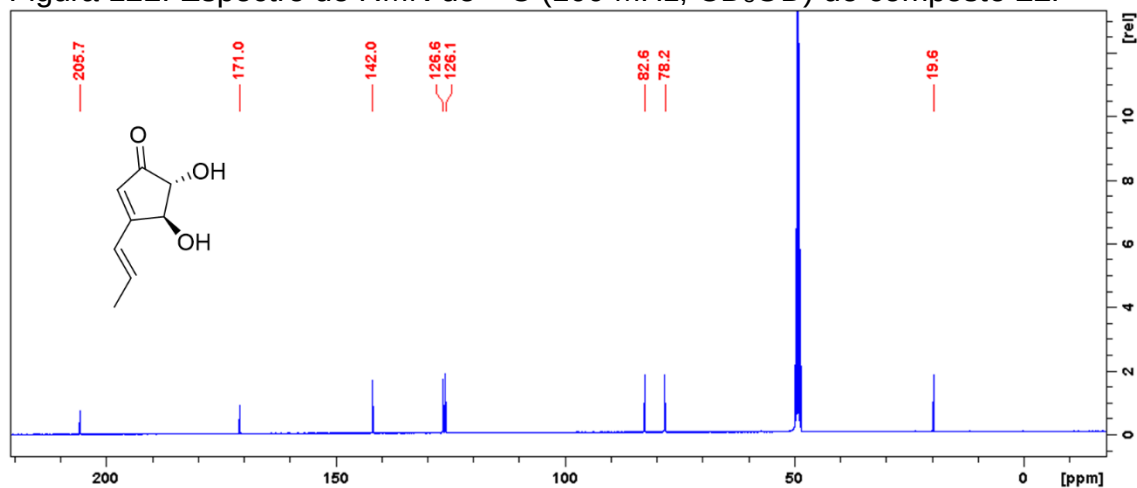


Figura 123. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **22**.

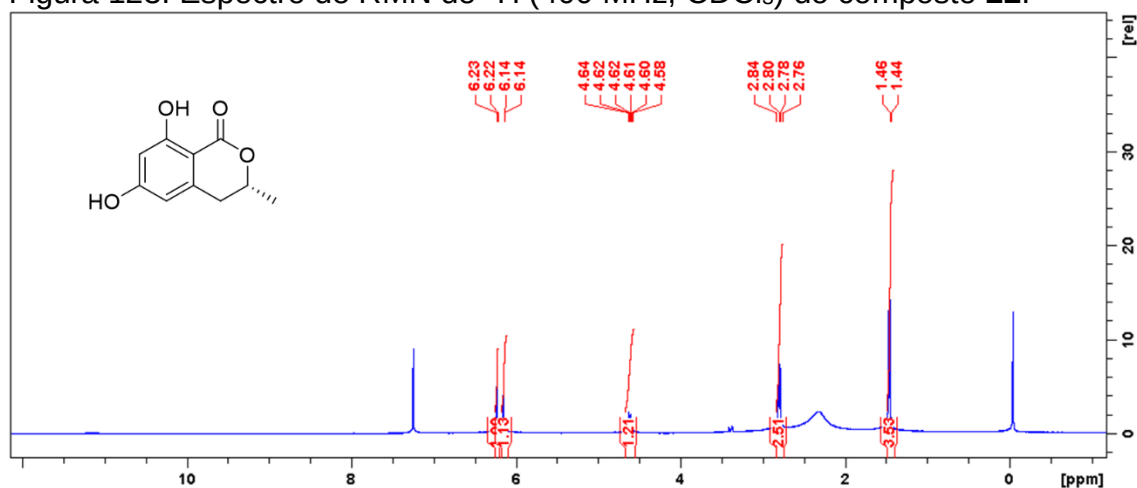


Figura 124. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **22**.

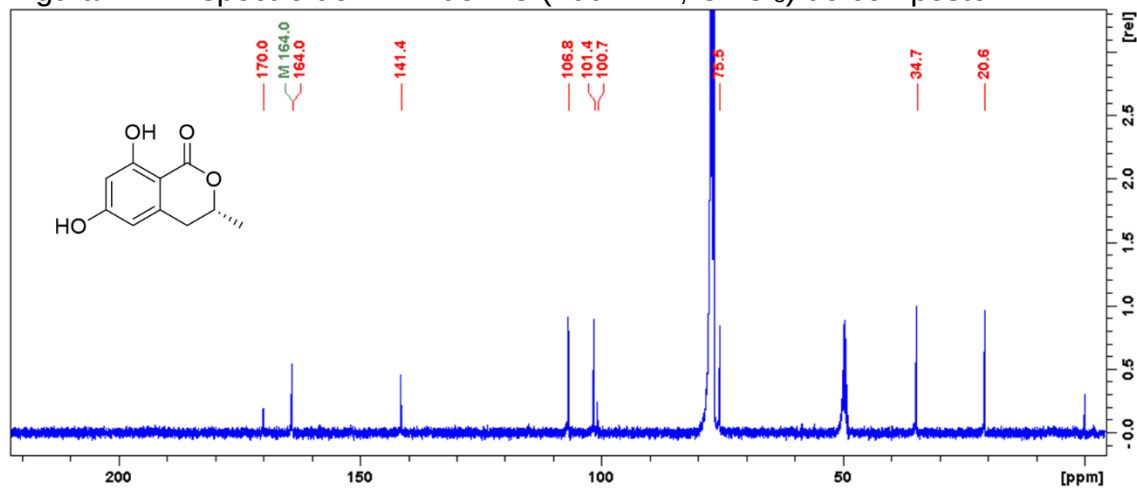


Figura 125. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do composto **23**.

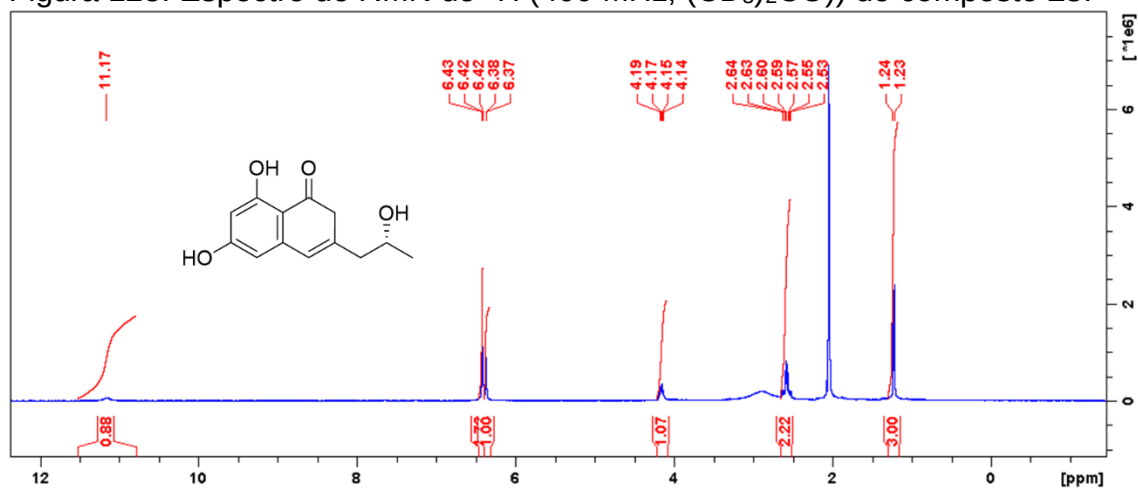


Figura 126. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **24**.

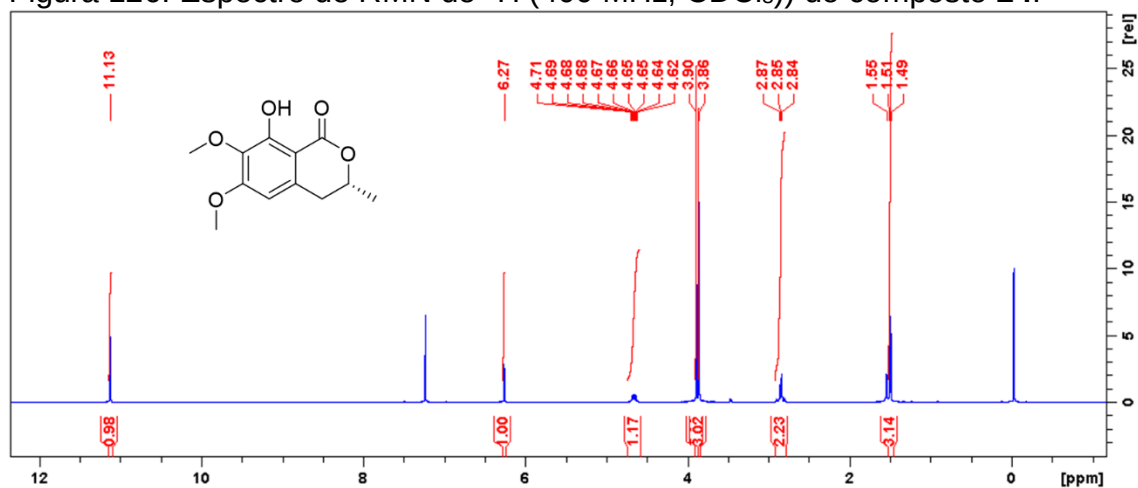


Figura 127. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **24**.

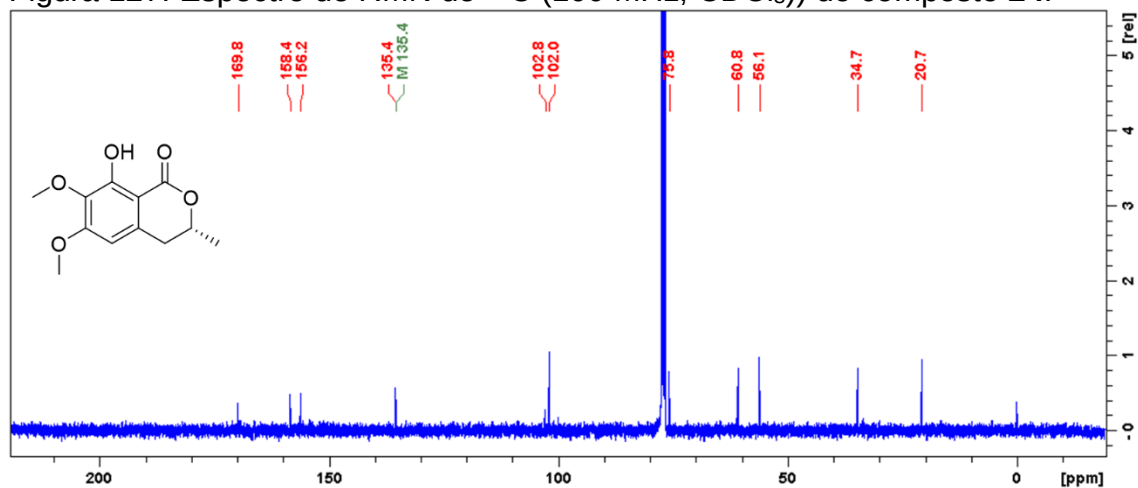


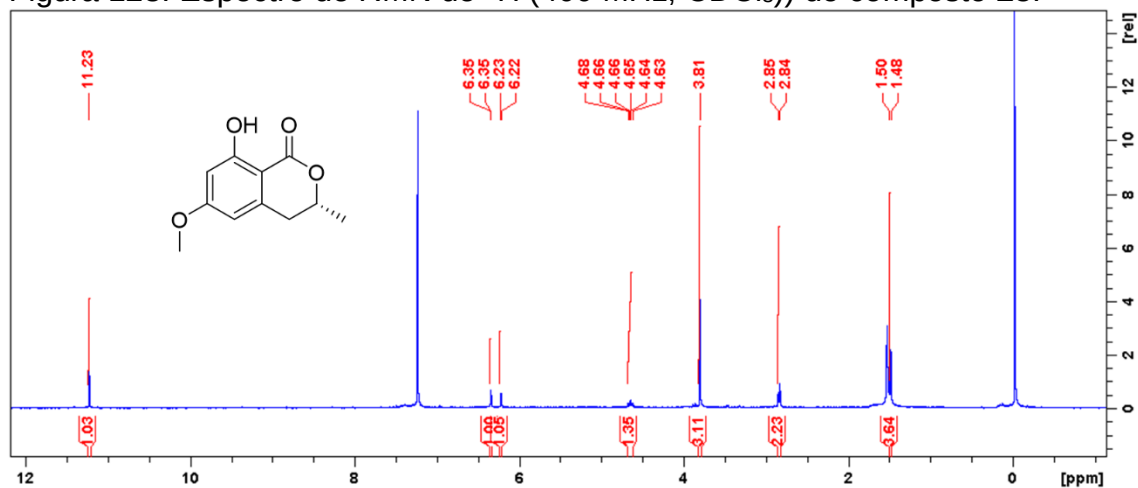
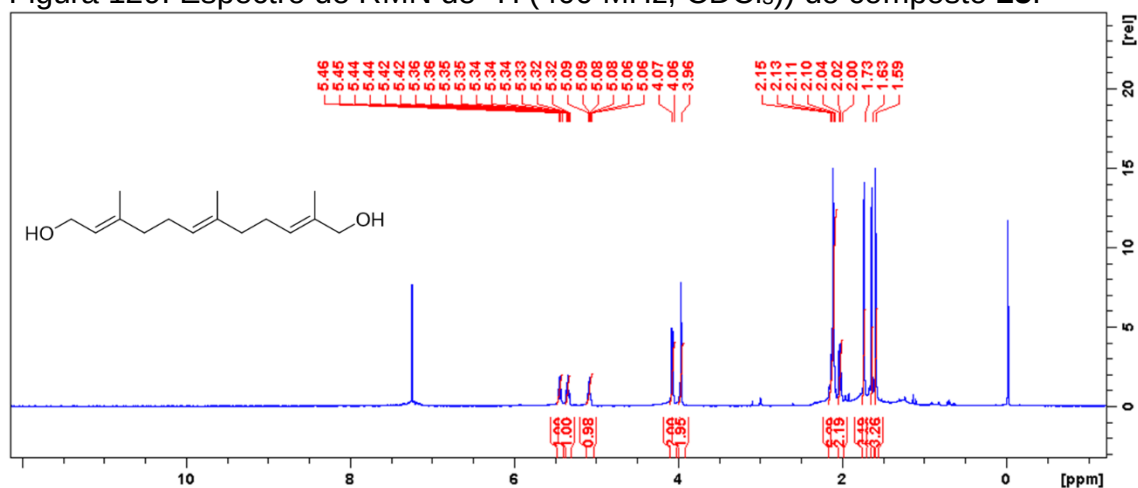
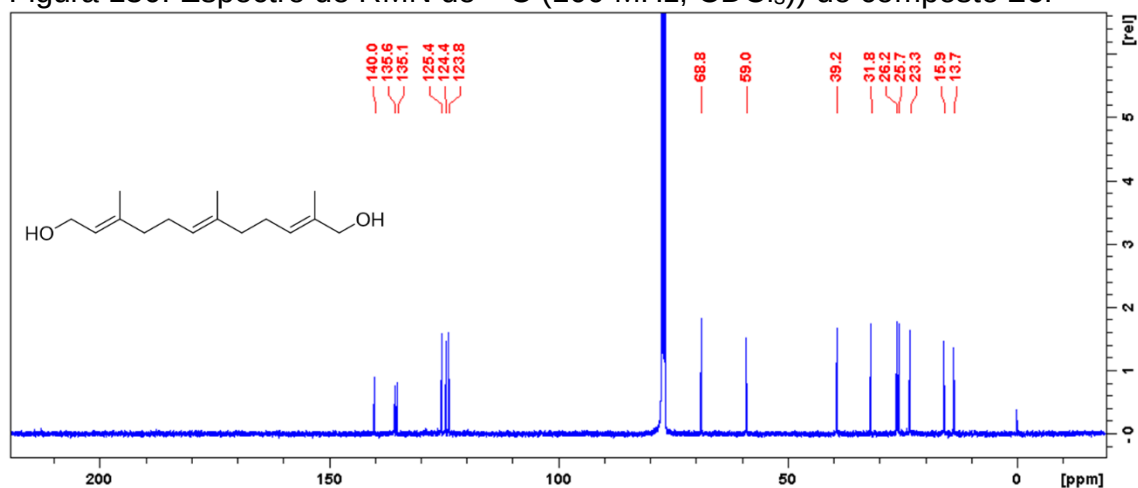
Figura 128. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **25**.Figura 129. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **25**.Figura 130. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **26**.

Figura 131. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **27**.

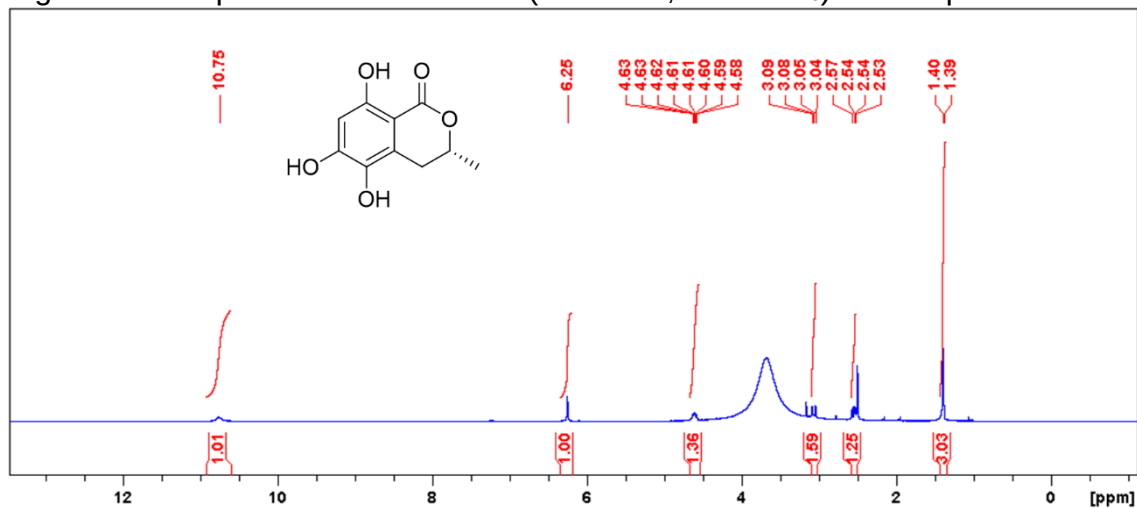
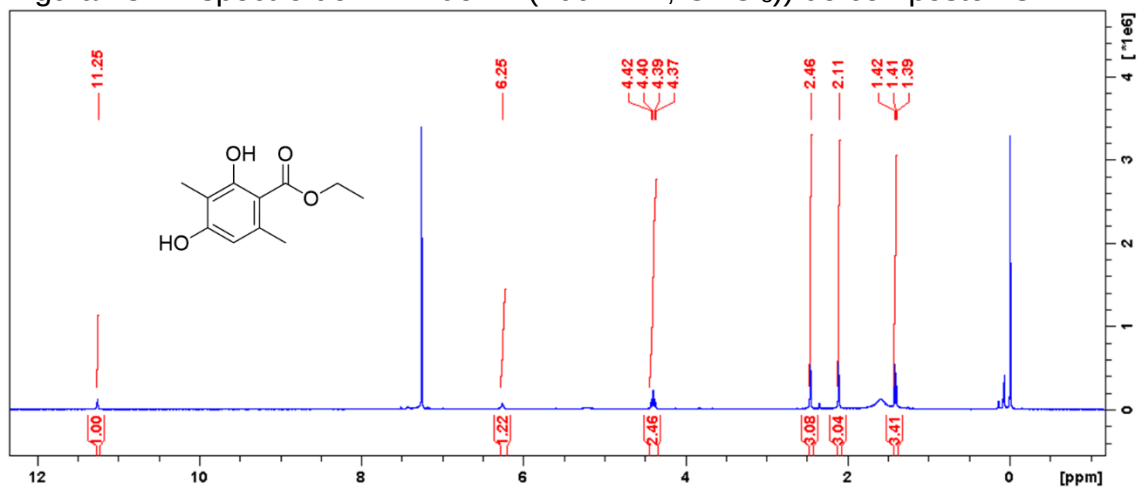


Figura 132. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **28**.



5. CONCLUSÕES

A continuidade dos estudos de fungos endofíticos associados à *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae) conduziu a obtenção de novas substâncias bem como de metabólitos bioativos corroborando com a alta capacidade biossintética dos fungos endofíticos.

As linhagens de fungos endofíticos isoladas de *P. planifolius* durante o Mestrado foram cultivadas em meio líquido PDB e submetidas a triagem biológica (ensaios antimicrobiano e citotoxicidade) de seus extratos brutos AcOEt culminando na seleção e identificação dos endófitos *Paraphaeosphaeria sporulosa* e *Cochliobolus eragrostidis* para continuidade dos estudos químicos.

O estudo realizado com os endófitos *P. sporulosa* e *C. eragrostidis* a partir do cultivo em escala reduzida destes endófitos em diferentes meios líquidos comerciais (Extrato de Malte, PDB, YM, Czapek® e Nutrient®) e meios sólidos (Milho e Arroz) permitiu uma avaliação da potencialidade antimicrobiana e citotóxica dos extratos brutos em busca de metabólitos secundários ativos.

A triagem biológica direcionou a seleção dos meios de cultivo PDB e Arroz para o estudo em escala ampliada de *P. sporulosa* e os meios de cultivo PDB e Extrato de Malte para *C. eragrostidis*.

Do cultivo em escala ampliada de *P. sporulosa* no meio sólido de Arroz e do fracionamento do extrato ACN nos conduziu ao isolamento de seis novas substâncias derivadas de benzaldeído e benzopirano, denominadas como esporulosaldeinas A-F (**1-6**), com boa atividade antifúngica (CIM <100 µg/mL) contra linhagens de *Candida* spp. demonstrando a importância de estudos com fungos endofíticos como fonte promissora de novos compostos bioativos.

O cultivo de *P. sporulosa* em meio líquido PDB resultou no extrato AcOEt que foi submetido a derreplicação por LC-MS com o intuito de direcionar ao isolamento de substâncias nitrogenadas. Dessa forma, o fracionamento deste extrato por técnicas cromatográficas permitiu o isolamento de três novas 3-metilisoquinolinas, 7-(hidroximetil)-8-metoxi-3-metilisoquinolina-6-ol (**7**), 8-metoxi-3,7-dimetilisoquinolina-6-ol (**8**) e N-(6-hidroxi-8-metoxi-3-metilisoquinolina-7-il) metil acetamida (**9**), além de chaetoquadrin F (**10**) identificada pela primeira vez no gênero *Paraphaeosphaeria*.

O cultivo em escala ampliada do endófito *C. eragrostidis* no meio de

cultivo líquido de PDB produziu o extrato AcOEt que após fracionamento cromatográfico foi isolado sete substâncias, fomalactona (**11**), musacina D (**12**), musacina E (**13**), sapinofuranona A (**14**), ciclo(L-valina-L-triptofano) (**15**), indol-3-ácido carboxílico (**16**) e indol 3-ácido acético (**17**). A atividade promissora dos extratos quando *C. eragrostidis* foi cultivado em PDB e Malte deve-se a presença de **11** que apresentou potencial atividade frente às células tumorais avaliadas, podendo ser considerada o princípio ativo destes extratos.

É importante destacar que os metabólitos secundários identificados dos extratos produzidos pelos fungos endofíticos isolados de *P. planifolius*, até o momento, demonstraram-se diferentes dos metabólitos identificados da espécie vegetal hospedeira *P. planifolius*.

O uso de modificador epigenético SAHA no cultivo do fungo endofítico *Aspergillus terreus* isolado de *Astragalus lentiginosus*, espécie vegetal do Deserto de Sonora, ativou a expressão gênica das vias biossintéticas silenciosas uma vez que se observou que SAHA induziu a produção de metabólitos secundários analisado por HPLC-DAD. Este endófito foi cultivado em escala ampliada na presença e ausência de SAHA resultando no isolamento de dois novos metabólitos de 3-pirona-cumarinas, **18** e **19**, e uma nova isocumarina, 3,4-diidro-3-metil-6,7,8-triidroxi-1*H*-2-benzopiran-1-ona (**20**), juntamente com os compostos conhecidos como terreína (**21**), 6-hidroximeleina (**22**), ortosporina (**23**), 6,7-dimetoximeleina (**24**), 6-metoximeleina (**25**), farnesol (**26**), 3,4-diidro-3-metil-5,6,8-triidroxi-1*H*-2-benzopiran-1-ona (**27**) e 3-metilorselinato de etila (**28**). Adicionalmente, os metabólitos **18** e **19** foram submetidos às modificações estruturais fornecendo os derivados semi-sintéticos **18a**, **18b** e **19a** que auxiliaram na elucidação estrutural dos seus precursores naturais **18** e **19**. Dessa maneira, podemos concluir que o uso da abordagem epigenética pode ser uma estratégia útil para a produção de novas substâncias.

Os resultados obtidos neste estudo são de grande importância e enfatizam a necessidade de estudar esse nicho de microrganismos diante ao aumento no desmatamento de diversas espécies vegetais, pois conduzem ao conhecimento da diversidade química e potencialidade biológica dos metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos associados aos seus hospedeiros em diferentes biomas.

6. REFERÊNCIAS

- ALDRICH, T. J.; ROLSHAUSEN, P. E.; ROPER, M. C.; READER, J. M.; STEINHAUS, M. J.; RAPICAVOLI, J.; VOSBURG, D. A.; MALONEY, K. N. Radicinin from *Cochliobolus* sp. inhibits *Xylella fastidiosa*, the causal agent of Pierce's Disease of grapevine. **Phytochemistry**, v. 116, p. 130–137, 2015.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4168–4170, 2001.
- ALURAPPA, R.; REDDY, M.; BOJEGOWDA, M.; MALLESH, N. K.; CHOWDAPPA, S. Characterisation and bioactivity of oosporein produced by endophytic fungus *Cochliobolus kusanoi* isolated from *Nerium oleander* L. **Natural Product Research**, v. 28, n. 23, p. 2217–2230, 2014.
- AMARAL, F. P.; NAPOLITANO, A.; MASULLO, M.; SANTOS, L. C.; FESTA, M.; VILEGAS, W.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. HPLC-ESIMSⁿ Profiling, isolation, structural elucidation, and evaluation of the antioxidant potential of phenolics from *Paepalanthus geniculatus*. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 547–556, 2012.
- AMORIM, M. R.; SOMENSI, A.; ARAUJO, A. R.; BONIFÁCIO, B. V.; BAUAB, T. M.; SANTOS, L. C. DOS. Compounds of *Anthostomella brabeji*, an endophytic fungus isolated from *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 6, p. 1048–1054, 2016.
- AMORIM, M. R. DE; HILÁRIO, F.; FERNANDO, M.; JUNIOR, S.; JUNIOR, J. M. B.; BAUAB, T. M.; ARAÚJO, A. R.; CARLOS, I. Z.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. New benzaldehyde and benzopyran compounds from the endophytic fungus *Paraphaeosphaeria* sp. F03 and their antimicrobial and cytotoxic activities. **Planta Medica**, v. 85, p. 957–964, 2019.
- AMORIM, M. R. DE; HILARIO, F.; SANO, P. T.; BUAB, T. M.; SANTOS, L. C. DOS. Antimicrobial activity of *Paepalanthus planifolius* and its major components against selected human pathogens. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 4, p. 766–774, 2018.
- ANDRADE, M. J. G.; GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; VAN DEN BERG, C. *Blastocaulon* (Eriocaulaceae), a synonym of *Paepalanthus*: morphological and molecular evidence. **Taxon**, v. 60, n. 1, p. 178–184, 2011.
- ARAKAWA, H. Die absolutkonfiguration des melleins. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 41, p. 2541, 1968.
- ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 51–66, 2007.
- BAE, H.; SICHER, R. C.; KIM, M. S.; KIM, S.; STREM, M. D.; MELNICK, R. L.; BAILEY, B. A. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in

Theobroma cacao. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 11, p. 3279–3295, 2009.

BICALHO, B.; GONC, R. A. C.; PAULA, A.; ZIBORDI, M. Antimicrobial compounds of fungi vectored by *Clusia* spp. (Clusiaceae) pollinating bees. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 58c, p. 746–751, 2003.

BOIK, J. **Natural compounds in cancer therapy**. Princeton: Oregon Medical Press, 2001. 521 p.

CAMPOS, F. F.; ROSA, L. H.; COTA, B. B.; CALIGIORNE, R. B.; ALMEIDA, M.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. Leishmanicidal metabolites from *Cochliobolus* sp., an endophytic fungus isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 12, e348, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000348>.

CHOUDHARY, M. I.; MUSHARRAF, S. G.; MUKHMOOR, T.; SHAHEEN, F.; ALI, S.; ATTA-UR-RAHMAN. Isolation of bioactive compounds from *Aspergillus terreus*. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 59b, p. 324–328, 2004.

CICHEWICZ, R. H. Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners. **Natural Product Reports**, v. 27, p. 11–22, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M27-A2**: reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 2nd ed. Wayne, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M27-A9**: methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 9th ed. Wayne, 2012.

COSTA, C. R. L. M.; MENOLLI, R. A.; OSAKU, E. F.; TRAMONTINA, R.; MELO, R. H.; AMARAL, A. E.; DUARTE, P. A. D.; CARVALHO, M. M.; SMIDERLE, F. R.; SILVA, J. L. C.; MELLO, R. G. Exopolysaccharides from *Aspergillus terreus*: production, chemical elucidation and immunoactivity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 654–664, 2019.

COSTA, F. N.; TROVO, M.; SANO, P. T. Eriocaulaceae na Cadeia do Espinhaço: riqueza, endemismo e ameaças. **Megadiversidade**, v. 4, n. 1, p. 77–85, 2008.

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

DEBARBER, A. E.; BLEYLE, L. A.; ROULLET, J. B. O.; KOOP, D. R. ω -Hydroxylation of farnesol by mammalian cytochromes P450. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1682, p. 18–27, 2004.

DEMAIN, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **Journal of Industry Microbiology and**

Biotechnology, v. 41, p. 185–201, 2014.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305–311, 2005.

EVANS JR., N. H.; ELLESTAD, G. A.; KUNSTMANN, M. P. Two new metabolites from an unidentified *Nigrospora* species. **Tetrahedron Letters**, v. 22, p. 1791–1794, 1969.

EVIDENTE, A.; SPARAPANO, L.; FIERRO, O.; BRUNO, G.; MOTTA, A. Sapinofuranones A and B, two new 2(3*H*)-dihydrofuranones produced by *Sphaeropsis sapinea*, a common pathogen of conifers. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 253–256, 1999.

FISCH, K. M.; GALLASPY, A. F.; GIPSON, M.; HENRIKSON, J. C.; HOOVER, A. R.; JACKSON, L.; NAJAR, F. Z.; WAGELE, H.; CICHEWICZ, R. H. Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 1199–1213, 2009.

FONSECA, A.; REIS, J.; SILVA, T.; MATOS, M. J.; BAGETTA, D.; ORTUSO, F.; ALCARO, S.; URIARTE, E.; BORGES, F. Coumarin versus chromone monoamine oxidase B inhibitors: quo vadis? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 16, p. 7206–7212, 2017.

FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E.; CARVALHO JR., A. A.; COSTA, A.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; MAIA, L. C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; NADRUZ COELHO, M. A.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRAD, D. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio, 2010.

FUJIMOTO, H.; NOZAWA, M.; OKUYAMA, E.; ISHIBASHI, M. Six new constituents from an ascomycete, *Chaetomium quadrangulatum*, found in a screening study focused on monoamine oxidase inhibitory. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 3, p. 247–251, 2003.

FUKUSHIMA, T.; TANAKA, M.; GOHBARA, M.; FUJIMORI, T. Phytotoxicity of three lactones from *Nigrospora sacchari*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 4, p. 625–630, 1998.

GIROL, C. G.; FISCH, K. M.; HEINEKAMP, T.; GÜNTHER, S.; HÜTTEL, W.; PIEL, J.; BRAKHAGE, A. A.; MÜLLER, M. Regio- and stereoselective oxidative phenol coupling in *Aspergillus niger*. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, p. 9788–9791, 2012.

GIULIETTI, A. M.; HENSOLD, N.; PARRA, L. R.; ANDRADE, M. J. G.; van den BERG, C.; HARLEY, R. M. The synonymization of *Philodice* with *Syngonanthus* (Eriocaulaceae). **Phytotaxa**, v. 60, p. 50–56, 2012.

GOVINDACHARI, T. R.; PATANKAR, S. J.; VISWANATHAN, N. Isolation and structure of two new dihydroisocoumarins from *Kigelia pinnata*.

Phytochemistry, v. 10, n. 7, p. 1603–1606, 1971.

GUBIANI, J. R.; WIJERATNE, E. M. K.; SHI, T.; ARAUJO, A. R.; ARNOLD, A. E.; CHAPMAN, E.; GUNATILAKA, A. A. L. An epigenetic modifier induces production of (10'S)-verruculide B, an inhibitor of protein tyrosine phosphatases by *Phoma* sp. nov. LG0217, a fungal endophyte of *Parkinsonia microphylla*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 6, p. 1860–1866, 2017.

GUIRAUD, P.; STEIMAN, R.; SEIGLE-MURANDI, F.; BARTOLI, M. H. Antimicrobial and antitumoral activities of 6-Allyl-5,6-dihydro-5-hydroxypyran-2-one produced by a new *Drechslera* species. **Pharmazie**, v. 49, p. 279–281, 1994.

GUIRAUD, P.; STEIMAN, R.; SEIGLE-MURANDI, F.; GUSMAO, N. B. Antimicrobial and antitumor activities of mycosporulone. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 1222–1224, 1999.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 509–526, 2006.

GUO, D.-L.; QIU, L.; FENG, D.; HE, X.; LI, X.-H.; CAO, Z.-X.; GU, Y.-C.; MEI, L.; DENG, F.; DENG, Y. Three new α -pyrone derivatives induced by chemical epigenetic manipulation of *Penicillium herquei*, an endophytic fungus isolated from *Cordyceps sinensis*. **Natural Product Research**, p. 1–7, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1544974>.

GUSMÃO, N. B.; KAOUADJI, M.; STEIMAN, R. Coniothyriol, an uncommon polyketide from *Coniothyrium sporulosum*. **Natural Product Letters**, v. 2, n. 4, p. 287–292, 1993.

GUSMÃO, N. B.; STEIMAN, R.; SEIGLE-MURANDI, F. Mycosporulone, a metabolite from *Coniothyrium sporulosum*. **Journal of Natural Products**, v. 36, n. 12, p. 2189–2192, 1993.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895–914, 1997.

HASHIMOTO, M.; WAKANA, D.; UEDA, M.; KOBAYASHI, D.; GODA, Y.; FUJII, I. Product identification of non-reducing polyketide synthases with C-terminus methyltransferase domain from *Talaromyces stipitatus* using *Aspergillus oryzae* heterologous expression. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 7, p. 1381–1384, 2015.

HERNANDEZ, I. L. C.; GODINHO, M. J. L.; SCHEFER, A. B.; FERREIRA, A. G.; BERLINCK, R. G. S. *N*-Acetyl- γ -hydroxyvaline lactone, an unusual amino acid derivative from a marine *Streptomyces*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 664–665, 2000.

HERTWECK, C. Hidden biosynthetic treasures brought to light. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 7, p. 450–452, 2009.

HILARIO, F.; CHAPLA, V. M.; ARAUJO, A. R.; SANO, P. T.; BAUAB, T. M.; SANTOS, L. C. Antimicrobial screening of endophytic fungi isolated from the aerial parts of *Paepalanthus chiquitensis* (Eriocaulaceae) led to the isolation of secondary metabolites produced by *Fusarium fujikuroi*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 8, p. 1389–1395, 2017.

HOSSAIN, C. F.; OKUYAMA, E.; YAMAZAKI, M. A new series of coumarins derivatives having monoamine oxidase inhibitory activity from *Monascus anka*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 44, n. 8, p. 1535–1539, 1996.

HYEON, S.; OZAKI, A. Isolation of α,β -Dehydrocurvularin and β -Hydroxycurvularin from *Alternaria tomato* as sporulation-suppressing factors. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, n. 8, p. 1663–1664, 1976.

ICHIHARA, A.; HASHIMOTO, M.; TAKAMASA, H.; TAKEDA, I.; SASAMURA, Y.; SAKAMURA, S.; SATO, R.; TAJIMI, A. Structure, synthesis, and stereochemistry of (+)-orthosporin, a phytotoxic metabolite of *Rhynchosporium orthosporum*. **Chemistry Letters**, p. 1495–1498, 1989.

IOCA, L. P.; ALLARD, P.; BERLINCK, R. G. S. Thinking big about small beings – the (yet) underdeveloped microbial natural products chemistry in Brazil. **Natural Product Reports**, v. 31, p. 646–675, 2014.

ISLAM, M. S.; ISHIGAMI, K.; WATANABE, H. Synthesis of (–)-mellein, (+)-ramulosin, and related natural products. **Tetrahedron**, v. 63, n. 5, p. 1074–1079, 2007.

JIA, M.; CHEN, L.; XIN, H.; ZHENG, C.; RAHMAN, K.; HAN, T. A Friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–14, 2016.

JIANG, S.-J.; QIANG, S.; ZHU, Y.-Z.; DONG, Y.-F. Isolation and phytotoxicity of a metabolite from *Curvularia eragrostidis* and characterisation of its modes of action. **Annals of Applied Biology**, v. 152, p. 103–111, 2008.

KAMEL, R. A.; ABDEL-RAZEK, A. S.; HAMED, A.; REHAM, R.; STAMMLER, H. G.; FRESE, M.; SEWALD, N.; IBRAHIM, R.; STAMMLER, H. G.; FRESE, M.; SEWALD, N.; SHAABAN, M. Isoshamixanthone: a new pyrano xanthone from endophytic *Aspergillus* sp. ASCLA and absolute configuration of epiisoshamixanthone. **Natural Product Research**, p. 1–11, 2019.

KAUL, S.; GUPTA, S.; AHMED, M.; DHAR, M. K. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, p. 487–505, 2012.

KAWAHARA, N.; NOZAHARA, K.; NAKAJIMA, S.; UDAGARA, S.-I.; KAWAI, K. New Metabolites related to 3-Methylorsellinate from *Aspergillus silvaticus*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 1, p. 398–400, 1988.

KHARWAR, R. N.; MISHRA, A.; GOND, S. K.; STIERLE, D. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 1208–1228, 2011.

KIM, J.-C.; CHOI, G. J.; PARK, J.; KIM, H. T.; CHO, K. Y. Activity against plant pathogenic fungi of phomalactone isolated from *Nigrospora sphaerica*.

Pesticide Management Science, v. 57, p. 554–559, 2001.

KROHN, A.; BAHRAMSARI, R.; FLORKE, U.; LUDEWIG, K.; Kliche-Spory, C.; MICHEL, A.; AUST, H.-J.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; ANTUS, S.

Dihydroisocoumarins from fungi: isolation, structure elucidation, circular dichroism and biological activity. **Phytochemistry**, v. 45, n. 2, p. 313–320, 1997.

KURAMOCHI, K.; TSUBAKI, K.; KURIYAMA, I.; MIZUSHINA, Y.; YOSHIDA, H.; TAKEUCHI, T.; KAMISUKI, S.; SUGAWARA, F.; KOBAYASHI, S. Synthesis, structure, and cytotoxicity studies of some fungal isochromanes. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 1737–1745, 2013.

KUSARI, P.; KUSARI, S.; SPITELLER, M.; KAYSER, O. Implications of endophyte-plant crosstalk in light of quorum responses for plant biotechnology.

Applied Microbiology and Biotechnology, v. 99, p. 5383–5390, 2015.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry and Biology**, v. 19, p. 792–798, 2012.

LI, C.; SAROTTI, A. M.; HUANG, P.; DANG, U. T.; HURDLE, J. G.; TAMARA, P.; PEZZUTO, J. M.; TURKSON, J.; CAO, S. NF- κ B inhibitors, unique γ -pyranol- γ -lactams with sulfide and sulfoxide moieties from Hawaiian plant *Lycopodiella cernua* derived fungus *Paraphaeosphaeria neglecta*. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–10, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10537-1>.

LI, C.; YANG, B.; FENSTEMACHER, R.; TURKSON, J.; CAO, S. Lycopodiellactone, an unusual lactone-isochromanone from a Hawaiian plant-associated fungus *Paraphaeosphaeria neglecta* FT462. **Tetrahedron Letters**, v. 56, p. 1724–1727, 2015.

LI, D.; WEI, J.; HUA, H.; LI, Z. Antimicrobial constituents from the flowers of *Trollius chinensis*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 16, n. 10, p. 1018–1023, 2014.

LIAO, W.-Y.; SHEN, C.-N.; LIN, L.-H.; YANG, Y.-L.; HAN, H.-Y.; CHEN, J.-W.; KUO, S.-C.; WU, S.-H.; LIAW, C.-C. Asperjinone, a nor-neolignan, and terrein, a suppressor of ABCG2-expressing breast cancer cells, from thermophilic *Aspergillus terreus*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 4, p. 630–635, 2012.

LIU, W.; WANG, L.; WANG, B.; XU, Y.; ZHU, G.; LAN, M.; ZHU, W.; SUN, K. Diketopiperazine and diphenylether derivatives from marine algae-derived *Aspergillus versicolor* OUCMDZ-2738 by epigenetic activation. **Marine Drugs**, v. 17, n. 6, p. 1–12, 2019.

LIU, Y.; LI, Z.; VEDERAS, J. C. Biosynthetic incorporation of advanced precursors into dehydrocurvularin, a polyketide phytotoxin from *Alternaria cinerariae*. **Tetrahedron**, v. 54, p. 15937–15958, 1998.

MAFEZOLI, J.; XU, Y.-M.; HILÁRIO, F.; FREIDHOF, B.; ESPINOSA-ARTILES, P.; DOS SANTOS, L. C.; DE OLIVEIRA, M. C. F.; GUNATILAKA, A. A. L. Modulation of polyketide biosynthetic pathway of the endophytic fungus, *Anteaglonium* sp. FL0768, by copper (II) and anacardic acid. **Phytochemistry Letters**, v. 28, p. 157–163, 2018.

MANAMGODA, D. S.; CAI, L.; BAHKALI, A. H.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. *Cochliobolus*: an overview and current status of species. **Fungal Diversity**, v. 51, p. 3–42, 2011.

MASI, M.; FREDA, F.; SANGERMANO, F.; CALABR, V.; CIMMINO, A.; CRISTOFARO, M.; MEYER, S.; EVIDENTE, A. Radicinin, a fungal phytotoxin as a target-specific bioherbicide for invasive buffelgrass (*Cenchrus ciliaris*) control. **Molecules**, v. 24, p. 1–11, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24061086>.

MASI, M.; MEYER, S.; CLEMENT, S.; CIMMINO, A.; CRISTOFARO, M.; EVIDENTE, A. Cochliotoxin, a dihydropyranopyran-4,5-dione, and its analogues produced by *Cochliobolus australiensis* display phytotoxic activity against Buffelgrass (*Cenchrus ciliaris*). **Journal of Natural Products**, v. 80, p. 1241–1247, 2017a.

MASI, M.; MEYER, S.; CLEMENT, S.; PESCIPELLI, G.; CIMMINO, A.; CRISTOFARO, M.; EVIDENTE, A.; CHIMICHE, S.; FEDERICO, N.; UNIVERSITARIO, C.; ANGELO, M. S.; CINTIA, V. Chloromonilinic acids C and D, phytotoxic tetrasubstituted 3-chromanonacrylic acids isolated from *Cochliobolus australiensis* with potential herbicidal activity against Buffelgrass (*Cenchrus ciliaris*). **Journal of Natural Products**, v. 80, p. 2771–2777, 2017b.

MOREIRA, T. F. **Perfil antioxidante e efeito dos extratos, frações e das antraquinonas crisofanol, emodina e fisciona de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* sobre a viabilidade celular e estresse oxidativo em células tumorais de colo uterino e carcinoma oral.**

Orientador: Iguatemy Lourenço Brunetti. 2016. 160 f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MURAYAMA, T.; SUGIYAMA, T.; YAMASHITA, K. Total synthesis of natural (+)-phomalactone, (+)-acetylphoma-lactone, (+)-asperlin and their isomers. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 1923–1924, 1986.

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, 2015.

- PEDRAS, M. S. O. C.; SMITH, K. C.; TAYLOR, J. L. Production of 2,5-dioxopiperazine by a new isolate type of the blackleg fungus *Phoma lingam*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1575–1577, 1998.
- PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 1, 524 p.
- PIETIÄINEN, M.; KONTTURI, J.; PAASELA, T.; DENG, X.; AINASOJA, M.; NYBERG, P.; HOTTI, H.; TEERI, T. H. Two polyketide synthases are necessary for 4-hydroxy-5-methylcoumarin biosynthesis in *Gerbera hybrida*. **The Plant Journal**, v. 87, n. 6, p. 548–558, 2016.
- QIAO, Y.; XU, Q.; FENG, W.; TAO, L.; LI, X.; LIU, J.; ZHU, H. Asperpyridone A: an unusual pyridone alkaloid exerts hypoglycemic activity through the insulin signaling pathway. **Journal of Natural Products**, v. 82, p. 2925–2930, 2019.
- QUANG, D. N.; LAM, D. M.; HANH, N. T. H.; QUEB, D. D. Cytotoxic constituents from the fungus *Daldinia concentrica* (Xylariaceae). **Natural Product Research**, v. 27, n. 4–5, p. 486–490, 2013.
- REKHA, K. J.; BALA, M.; ARYA, V. Endophytic fungus: a potential source of biologically synthesized nanoparticle. **Journal of Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 1–7, 2013.
- REUTER, S.; GUPTA, S. C.; PARK, B.; GOEL, A.; AGGARWAL, B. B. Epigenetic changes induced by curcumin and other natural compounds. **Genes and Nutrition**, v. 6, n. 2, p. 93–108, 2011.
- RUHLAND, W. Eriocaulaceae. In: ENGLER, A. (Ed.). **Das pflanzenreich**: regni vegetabilis conspectus. Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann, 1903. v. 13, p. 1–294.
- SAIKKONEN, K.; WA, P.; HELANDER, M.; FAETH, S. H. Evolution of endophyte – plant symbioses. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 6, p. 275–280, 2004.
- SANTOS, L. C.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; ALBERT, K.; DACHTLER, M.; VILEGAS, W. Planifolin, a new naphthopyranone dimer and flavonoids from *Paepalanthus planifolius*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 122–124, 2001.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, p. 661–686, 2005.
- SHAO, M.; KONG, L.; JIANG, D.; ZHANG, Y. Phytotoxic and antimicrobial metabolites from *Paraphaeosphaeria* sp. QTYC11 isolated from the gut of *Pantala flavescens* larvae. **Record of Natural Products**, v. 10, n. 3, p. 326–331, 2016.
- SHARMA, V. K.; KUMAR, J.; SINGH, D. K.; MISHRA, A.; VERMA, S. K.; GOND, S. K.; KUMAR, A.; SINGH, N.; KHARWAR, R. N. Induction of cryptic and bioactive metabolites through natural dietary components in an endophytic

fungus *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–9, 2017.

SIEBER, T. N. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 75–89, 2007.

SILVA, M. A.; OLIVEIRA, A. P. S.; SANNOMIYA, M.; SANO, P. T.; VARANDA, A. E. PARECIDA; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Flavonoids and a naphthopyranone from *Eriocaulon ligulatum* and their mutagenic activity. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 11, p. 1635–1639, 2007.

STEVENSON, A. J.; AGER, E. I.; PROCTOR, M. A.; ŠKALAMERA, D.; HEATON, A.; BROWN, D.; GABRIELLI, B. G. Mechanism of action of the third generation benzopyrans and evaluation of their broad anti-cancer activity *in vitro* and *in vivo*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 5144, p. 1–11, 2018.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22882-w>.

STROBEL, G. A. Methods of discovery and techniques to study endophytic fungi producing fuel-related hydrocarbons. **Natural Product Reports**, 2014.
DOI: <https://doi.org/10.1039/c3np70129h>.

SUDHA, V.; GOVINDARAJ, R.; BASKAR, K.; AL-DHABI, N. A. Biological properties of endophytic fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, p. 1–7, 2016.

SUN, D.; DONG, W.; LI, X.; ZHANG, H. Indole alkaloids from the roots of *Isatis ingigotica* and their antiherpes simplex virus type 2 (HSV-2) activity *in vitro*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 46, n. 5, p. 763–766, 2010a.

SUN, J.; YUE, Y.-D.; TANG, F.; GUO, X.-F. Coumarins from the leaves of *Bambusa pervariabilis* McClure. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 12, n. 3, p. 248–251, 2010b.

SUN, K.; ZHU, G.; HAO, J.; WANG, Y.; ZHU, W. Chemical-epigenetic method to enhance the chemodiversity of the marine algicolous fungus, *Aspergillus terreus* OUCMDZ-2739. **Tetrahedron**, v. 74, p. 83–87, 2019.

SUZUKI, T.; MIYATA, N. Epigenetic control using natural products and synthetic molecules. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 935–958, 2006.

TAN, J.; BEDNAREK, P.; LIU, J.; SCHNEIDER, B.; SVATOS, A.; HAHNBROCK, K. Universally occurring phenylpropanoid and species-specific indolic metabolites in infected and uninfected *Arabidopsis thaliana* roots and leaves. **Phytochemistry**, v. 65, p. 691–699, 2004.

TANAHASHI, T.; TAKENAKA, Y.; HAMADA, N. Aromatic compounds from cultured lichen mycobionts of three *Graphis* species. **Heterocycles**, v. 83, n. 9, p. 2157–2164, 2011.

TANG, H.-Y.; ZHANG, Q.; GAO, Y.-Q.; ZHANG, A.-L.; GAO, J.-M. Miniolins A-C, novel isomeric furanones induced by epigenetic manipulation of *Penicillium minioluteum*. **RSC Advances**, v. 5, n. 3, p. 2185–2190, 2015.

- TEITEN, M.-H.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Curcumin as a regulator of epigenetic events. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 57, p. 1619–1629, 2013.
- TRABOLSY, Z. B. K. AL; ANOUAR, E. H.; ZAKARIA, N. S. S.; ZULKEFLEE, M.; HASAN, M. H.; ZIN, M. M.; AHMAD, R.; SULTAN, S.; WEBER, J.-F. F. Antioxidant activity, NMR, X-ray, ECD and UV/vis spectra of (+)-terrein: experimental and theoretical approaches. **Journal of Molecular Structure**, v. 1060, n. 1, p. 102–110, 2014.
- VERKLEY, G. J. M.; DUKIK, K.; RENFURM, R.; GÖKER, M.; STIELOW, J. B. Novel genera and species of coniothyrium-like fungi in Montagnulaceae (Ascomycota). **Personia**, v. 32, p. 25–51, 2014.
- WANG, Q.; GE, H.; ZHANG, J.; WU, J.; SONG, Y.; TAN, R. Cochliones A–D, four new tetrahydrochromanone derivatives from endophytic *Cochliobolus* sp. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 12, n. 6, p. 485–491, 2010.
- WILLIAMS, R. B.; HENRIKSON, J. C.; HOOVER, A. R.; LEE, A. E.; CICHEWICZ, R. H.; WILLIAMS, R. B.; HENRIKSON, J. C.; HOOVER, A. R.; LEE, A. E.; CICHEWICZ, R. H. Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 6, n. 11, p. 1857–2020, 2008.
- WU, H.-Y.; WANG, Y.-L.; TAN, J.-L.; ZHU, C.-Y.; LI, D.-X.; HUANG, R.; ZHANG, K.-Q.; NIU, X.-M. Regulation of the growth of cotton bollworms by metabolites from an entomopathogenic fungus *Paecilomyces catenibliquus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 5604–5608, 2012.
- WU, Z.; LIU, D.; HUANG, J.; PROKSCH, P.; ZHU, K.; LIN, W. Hansforesters A–M, polyesters from the sponge-associated fungus *Hansfordia sinuosae* with antibacterial activities. **RSC Advances**, v. 8, n. 69, p. 39756–39768, 2018.
- XIAO, L.; YIN, Y.; SUN, W.; ZHANG, F.; LI, Z. Enhanced production of (+)-terrein by *Aspergillus terreus* strain PF26 with epigenetic modifier suberoylanilide hydroxamic acid. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 11, p. 1635–1639, 2013.
- YANG, J.; ZHANG, P.; HU, Y.; LIU, T.; SUN, J.; WANG, X. Synthesis and biological evaluation of 3-arylcoumarins as potential anti-Alzheimer's Disease agents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 651–656, 2019.
- ZANUTTO, F. V.; BOLDRIN, P. K.; VARANDA, E. A.; SOUZA, S. F. DE; SANO, P. T.; VILEGAS, W.; CAMPANER, L. Characterization of flavonoids and naphthopyranones in methanol extracts of *Paepalanthus chiquitensis* Herzog by HPLC-ESI-IT-MSⁿ and their mutagenic activity. **Molecules**, v. 18, p. 244–262, 2013.
- ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, v. 23, p. 753–771, 2006.

ZHANG, J.-L.; WANG, W.-J.; XU, X.-M.; LI, D.-Y.; HUA, H.-M.; MA, E.-L.; LI, Z.-L. From macrocyclic to linear and further: naturally degradable polyesters from the fungus *Ascotricha* sp. ZJ-M-5. **Tetrahedron**, v. 72, p. 4895–4901, 2016a.

ZHANG, L.-H.; FENG, B.-M.; CHEN, G.; LI, S.-G.; SUN, Y.; WU, H.-H.; BAI, J.; HUA, H.-M.; WANG, H.-F.; PEI, Y.-H. Sporulaminals A and B: a pair of unusual epimeric spiroaminal derivatives from a marine-derived fungus *Paraconiothyrium sporulosum* YK-03. **RSC Advances**, v. 6, p. 42361–42366, 2016b.

ZHAO, C.; GUO, L.; WANG, L.; ZHU, G.; ZHU, W. Improving the yield of (+)-terrein from the salt-tolerant *Aspergillus terreus* PT06-2. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 77, p. 1–9, 2016.

ZHAO, M.; YUAN, L.-Y.; GUO, D.-L.; YE, Y.; DA-WA, Z.-M.; WANG, X.-L.; MA, F.-W.; CHEN, L.; GU, Y.-C.; DING, L.-S.; ZHOU, Y. Bioactive halogenated dihydroisocoumarins produced by the endophytic fungus *Lachnum palmae* isolated from *Przewalskia tangutica*. **Phytochemistry**, v. 148, p. 97–103, 2018.