

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 07/08/2020.

VICTOR HUGO LINO RUFINO

Bioprospecção do fungo endofítico *Hypoxylon investiens*
isolado da alga marinha *Asparagopsis taxiformis* para obtenção
de compostos bioativos.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Química para obtenção do
título de Mestre em Química.

Orientadora: Dulce Helena Siqueira Silva

Co-Orientadora: Rebeca Previante Medina

Araraquara

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

R926b Rufino, Victor Hugo Lino
Bioprospecção do fungo endofítico *Hypoxylon investiens*
isolado da alga marinha *Asparagopsis taxiformis* para obtenção
de compostos bioativos / Victor Hugo Lino Rufino. –
Araraquara : [s.n.], 2019
111 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Dulce Helena Siqueira Silva

Coorientador: Rebeca Previante Medina

1. Análise cromatográfica. 2. Algas marinhas. 3. Fungos
endofíticos. 4. Ressonância magnética nuclear. 5. Compostos
bioativos. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Bioprospecção do fungo endofítico *Hypoxylon investiens* isolado da alga marinha *Asparagopsis taxiformis* para obtenção de compostos bioativos"

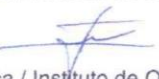
AUTOR: VICTOR HUGO LINO RUFINO

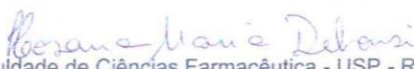
ORIENTADORA: DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA

COORIENTADORA: REBECA PREVIAE MEDINA

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

Profª. Drª. DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA 
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

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

Profª. Drª. HOSANA MARIA DEBONSI 
Departamento de Física e Química / Faculdade de Ciências Farmacêutica - USP - Ribeirão Preto

Araraquara, 07 de agosto de 2019

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome: Victor Hugo Lino Rufino

Endereço Profissional: NUBBE - Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Rua Prof. Francisco Degni, 55 - Araraquara-SP, CEP: 14081-970, SP - Brasil.

Endereço eletrônico: vh_lr@hotmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2011-2016

Graduação: Bacharel em Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara-SP.

Título da Monografia: Agentes quimiopreventivos e outras substâncias bioativas da flora brasileira: bioprospecção em *Garcinia brasiliensis*.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Siqueira Silva

2017

Mestrado: Química, Área de Concentração - Química Orgânica

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara-SP.

Dissertação: Bioprospecção do fungo endofítico *Hypoxylon investiens* isolado da alga marinha *Asparagopsis taxiformis* para obtenção de compostos bioativos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Siqueira Silva

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalhos ou resumos em eventos científicos:

RUFINO, V. H. L.; MEDINA, R. P.; SILVA, D. H. S. Metabolic production analysis of

Hypoxylon investiens, an endophytic fungus isolated from the marine red algae *Asparagopsis taxiformis*. 2018. 41^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Foz do Iguaçu-PR, 2018.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS E CONGRESSOS

- 45^a Semana da Química do Instituto de Química da Unesp Araraquara. 2015.
- XXVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp. Avaliação do potencial antitumoral e desreplicação dos extratos de *Inga edulis* através de CLAE-DAD. Araraquara-SP, 2015.
- XXVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp. Extração, isolamento e caracterização de metabólitos secundários das folhas de *Garcinia brasiliensis*. Araraquara-SP, 2016.
- 1^a Escola de Verão em Química. UNESP, Araraquara - SP. 2018.
- 41^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Foz do Iguaçu-PR, 2018.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo enorme esforço e apoio para que eu pudesse ter a oportunidade de realizar este trabalho.

Aos colegas do NuBBE, especialmente os integrantes do nosso grupo de pesquisa, pela disposição para ajudar e contribuir com diversas etapas do trabalho.

Aos professores e funcionários do IQ-UNESP, pela dedicação e paciência ao ajudar a resolver problemas e transmitir conhecimento. Sei como é difícil manter a alta qualidade da pesquisa realizada pelo nosso Instituto, considerando as dificuldades que temos no Brasil.

À minha orientadora, professora Dulce, por guiar a pesquisa com entusiasmo e dedicação, mesmo carregando o fardo de ser pesquisadora, educadora e ainda ter que administrar recursos e pessoas, sempre visando melhorar a qualidade do nosso ensino e pesquisa.

À minha co-orientadora, Rebeca, por me ensinar tanto sobre diversos experimentos e como realizar uma boa pesquisa, evitando que eu cometesse erros e também ajudando a corrigí-los.

As agências de fomento, CAPES e FAPESP, pelas bolsas e investimentos nas nossas pesquisas.

A todos que conheci, desde a graduação até esse momento, com quem pude dividir momentos de alegria e tristeza, e que me fizeram críticas e elogios. Todos esses momentos foram essenciais para que eu pudesse chegar onde cheguei.

“My eyes are constantly wide open to the extraordinary fact of existence. Not just human existence but the existence of life and how this breathtakingly powerful process, which is natural selection, has managed to take the very simple facts of physics and chemistry and build them up to redwood trees and humans.”

(Richard Dawkins)

“We are all connected; to each other, biologically. To the earth, chemically. To the rest of the universe, atomically.”

(Neil DeGrasse Tyson)

RESUMO

Desde antes das primeiras civilizações até o século XIX, o uso de extratos de produtos naturais de plantas, animais e minerais foi o principal meio para tratamento de doenças. A biodiversidade do bioma marinho é enorme e seus organismos têm mostrado importância para o descobrimento de novos fármacos, embora, até algumas décadas atrás, esse ecossistema tenha sido menos explorado que o ambiente terrestre. As macroalgas encontradas em águas rasas foram um dos primeiros organismos marinhos estudados, sendo as algas vermelhas (Rhodophyta), o grupo mais numeroso e com alta produção de metabólitos bioativos. Os micro-organismos vivendo em simbiose com organismos marinhos podem afetar a produção metabólica de algas e outros hospedeiros. Este estudo de bioprospecção visou analisar extratos do fungo endofítico *Hypoxylon investiens*, isolado da alga marinha vermelha *Asparagopsis taxiformis*. Oito substâncias foram purificadas com o uso de técnicas cromatográficas, em especial a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD), e então, identificadas com base nos dados de ressonância magnética nuclear (RMN) uni e bidimensional, espectrometria de massas (EM) e espectroscopia UV-Vis. Foram identificadas as dicetopiperazinas ciclo(Pro-Tir), ciclo(Pro-Phe) e ciclo(Pro-Leu), além de três isocumarinas: 5-hidroximetil-meleína, 4-hidroxi-5-metilmeleína e 5-metilmeleína, e ainda, duas tetralonas: nodulisporona e isosclerona. Além das substâncias purificadas por CLAE, foram identificados quatro ácidos orgânicos de baixo peso molecular: ácidos 3-(4-hidroxifenil)lático, 5-hidroxi-indolacético, 3-hidroxibutírico e homogentísico, e o monossacarídeo D-manitol, utilizando cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). As frações At01Fr1 a At01Fr5, resultantes do fracionamento preliminar do extrato de *H. investiens* mostraram inibição fraca a moderada das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, envolvidas na Doença de Alzheimer, sendo o melhor resultado, obtido para At01Fr4, com inibição moderada (GI = 48,3%) e seletiva de acetilcolinesterase. Estes dados confirmam a alta quimiodiversidade de endófitos do ambiente marinho e sugerem a necessidade de estudos adicionais, visando a exploração racional dos produtos naturais e de seu potencial biológico, contribuindo ainda para aprofundar o conhecimento deste importante bioma no contexto de práticas de sustentabilidade.

Palavras chave: fungos endofíticos, *Hypoxylon investiens*, alga marinha, *Asparagopsis taxiformis*, quimiodiversidade, citotoxicidade, inibidores de colinesterase, RMN.

ABSTRACT

Since the earliest civilizations through the 19th century, the use of extracts from plants, animals and even minerals was the major option for the treatment of diseases. The biodiversity of the marine environment is huge and its organisms are also important for the discovery of new drugs, although it has been less explored than terrestrial biomes until a few decades ago. The macro-algae found in shallow waters were one of the first marine organisms to be studied, with emphasis on red algae (Rhodophyta), which encompasses the highest number of species and high production of bioactive metabolites. Microorganisms, as fungi and bacteria, living in symbiosis with macro-organisms can affect the metabolic production of algae, invertebrates and other host marine organisms. This bioprospection study aimed to analyze crude extracts of the endophytic fungus *Hypoxylon investiens*, which had been isolated from the red algae *Asparagopsis taxiformis*. Eight compounds were purified using chromatographic techniques, and were further identified based on 1D and 2D nuclear magnetic resonance (NMR), mass spectrometry (MS) and UV-Vis spectroscopy. Diketopiperazines cyclo (Pro-Tyr), cyclo (Pro-Phe) and cyclo (Pro-Leu) were identified, along with three isocoumarins: 5-hydroxymethyl-mellein, 4-hydroxy-5-methylmellein and 5-methylmellein, and two tetralones: nodulisporone and isosclerone. In addition, four low molecular weight organic acids: acids 3-(4-hydroxyphenyl)lactic, 5-hydroxy-indolacetic, 3-hydroxybutiric and homogentisic, and the monosaccharide D-mannitol, were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Fractions At01Fr1 to At01Fr5, resulting from the preliminary fractionation of *H. investiens* extract, showed weak to moderate inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes, involved in Alzheimer disease. Best results were obtained for At01Fr4, which showed moderate (GI = 48,3%) and selective inhibition of acetylcholinesterase. Such data confirm the high chemodiversity of marine endophytes and suggest the need for additional studies, aiming the rational exploration of natural products and their biological potential, and contributes to deepen the knowledge on this important biome in the context of sustainability.

Key words: marine fungi, *Hypoxylon investiens*, *Asparagopsis taxiformis*, chemodiversity, cytotoxicity, cholinesterase inhibitors, NMR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Quantidade de produtos naturais marinhos inéditos descobertos de diferentes filos entre 1940 e 2012.....	21
Figura 2 Local de coleta de organismos marinhos que originaram produtos naturais inéditos entre 1965 e 2014.....	22
Figura 3 Alga marinha <i>Asparagopsis taxiformis</i> na região de Ubatuba (SP).	23
Figura 4 Substâncias isoladas do fungo <i>H. investiens</i>	26
Figura 5 5'-metoxi-1,2,3,4-tetraidro-1,1'-binaftaleno-2,4,4',8-tetrol (A), 8'-metoxi-1,2,3,4-tetraidro-1,1'-binaftaleno-2,2',4,8-tetrol (B) e o ácido 3-nitropropanóico isolados de <i>H. investiens</i>	27
Figura 6 Fungo endofítico <i>Hypoxylon investiens</i> (linhagem AT-01) isolado da alga vermelha <i>Asparagopsis taxiformis</i>	30
Figura 7 Crescimento da linhagem fúngica AT-01 nos meios de cultivo líquido, em escala ampliada (primeiros dias). Da esquerda para direita: AT-01-Malte e AT-01-MBD.	32
Figura 8 Espectros de RMN de ^1H do extrato bruto AT-01-MBD (vermelho), AT-01-Malte (roxo) e AT-01-Czapek (verde) ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz).....	39
Figura 9 Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto AT-01-MBD (preto), AT-01-malte (azul) e AT-01-Czapek (vermelho) no comprimento de onda de 254 nm.	40
Figura 10 Comparação entre o espectro de UV-Vis da substância 5'-metoxi-1,2,3,4-tetraidro-1,1'-binaftaleno-2,4,4',8-tetrol isolado anteriormente (esquerda) (SILVA, A. D., 2016) e espectro da banda cromatográfica com tempo de retenção de 33,18 minutos do extrato AT-01-Malte (direita).	41
Figura 11 Variação da coloração do meio de cultivo MBD após algumas semanas.	42
Figura 12 Comparação dos espectros de RMN de ^1H do meio de cultivo de malte (ciano), extrato bruto AT-01-Malte da escala reduzida (azul) e AT-01-Malte da escala ampliada (violeta).....	43
Figura 13 Comparação dos espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos da escala ampliada AT-01-MBD-Verde e AT-01-MBD-Amarelo.	44
Figura 14 Cromatogramas em gradiente exploratório das seis frações (Fr 1 – Fr 6) no comprimento de onda de $\lambda = 254 \text{ nm}$. Fr 1: Amarelo, Fr 2: preto, Fr 3: azul, Fr 4: vermelho, Fr 5: verde e Fr 6: rosa.	45

Figura 15 Análise da fração 2 ($\lambda = 220$ nm) por CLAE semipreparativa em coluna C18 eluída com H ₂ O:MeOH (85:15 à 40:60 v/v) em 45 min.....	46
Figura 16 Espectros de RMN de ¹ H de nove substâncias isoladas da fração 2 e suas respectivas massas (mg).	47
Figura 17 Espectro no UV-Vis da substância Fr2-P3 (30,45% MeOH:69,55% H ₂ O).	48
Figura 18 Espectro de RMN de ¹ H da substância Fr2-P3 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz).	49
Figura 19 Mapa de contorno de COSY da substância Fr2-P3	50
Figura 20 Mapa de contorno de HSQC da substância Fr2-P3	51
Figura 21 Mapa de contorno de HMBC da substância Fr2-P3	51
Figura 22 Espectro no UV-Vis da substância Fr2-P7 (36,58% MeOH:63,42% H ₂ O).	53
Figura 23 Espectro de RMN de ¹ H da substância Fr2-P7 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz).	54
Figura 24 Mapa de contorno de COSY da substância Fr2-P7	55
Figura 25 Mapa de contorno de HSQC da substância Fr2-P7	56
Figura 26 Mapa de contorno de HMBC da substância Fr2-P7	56
Figura 27 Espectro de massas de alta resolução (<i>full scan</i> , modo positivo) da substância Fr2-P7	57
Figura 28 Espectro no UV-Vis da substância Fr2-P9 (41,77% MeOH:58,23% H ₂ O).	59
Figura 29 Espectro de RMN de ¹ H da substância Fr2-P9 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz).	61
Figura 30 Espectros CSSF dos sinais sobrepostos da substância Fr2-P9 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz).....	61
Figura 31 Mapa de contorno de HMBC de ¹⁵ N da substância Fr2-P9	62
Figura 32 Mapa de contorno de COSY da substância Fr2-P9	62
Figura 33 Mapa de contorno de HSQC da substância Fr2-P9	63
Figura 34 Mapa de contorno de HMBC da substância Fr2-P9	64
Figura 35 Sobreposição dos espectros TOCSY 1D da substância Fr2-P9	64
Figura 36 Espectro de massas de alta resolução (<i>full scan</i> , modo positivo) da substância Fr2-P9	65
Figura 37 Espectro no UV-Vis da substância Fr2-P12 (45,96% MeOH:54,04% H ₂ O).	67
Figura 38 Espectro de RMN de ¹ H da substância Fr2-P12 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz).	68

Figura 39 Mapa de contorno de COSY da substância Fr2-P12	69
Figura 40 Mapa de contorno de HSQC da substância Fr2-P12	70
Figura 41 Mapa de contorno de HMBC da substância Fr2-P12	70
Figura 42 Espectro de massas de alta resolução (<i>full scan</i> , modo positivo) da substância Fr2-P12	71
Figura 43 Análise da fração 3 ($\lambda = 220$ nm) por CLAE semipreparativa em coluna C18 eluída com H ₂ O:MeOH (60:40 à 45:55 v/v) em 30 min.....	73
Figura 44 Espectros de RMN de ¹ H de seis substâncias isoladas da fração 3 e suas respectivas massas (mg).	74
Figura 45 Espectro no UV-Vis da substância Fr3-P1 (46,15% MeOH:53,85% H ₂ O).	75
Figura 46 Espectro de RMN de ¹ H da substância Fr3-P1 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz).	76
Figura 47 Mapa de contorno de COSY da substância Fr3-P1	77
Figura 48 Mapa de contorno de HSQC da substância Fr3-P1	78
Figura 49 Mapa de contorno de HMBC da substância Fr3-P1	79
Figura 50 Espectro MS/MS de alta resolução do íon 245,1294 (modo positivo) para substância Fr3-P1	79
Figura 51 Espectro no UV-Vis da substância Fr3-P3 (47,13% MeOH: 52,87% H ₂ O).	81
Figura 52 Espectro de RMN de ¹ H da substância Fr3-P3	82
Figura 53 Mapa de contorno de COSY da substância Fr3-P3	83
Figura 54 Mapa de contorno de HMBC da substância Fr3-P3	84
Figura 55 Mapa de contorno de HSQC da substância Fr3-P3	84
Figura 56 Espectro de massas de alta resolução (<i>full scan</i> , modo positivo) da substância Fr3-P3	85
Figura 57 Espectro no UV-Vis da substância Fr3-P4 (47,35% MeOH: 52,65% H ₂ O).	87
Figura 58 Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C para Fr3-P4 (600 e 125 MHz) e para 4-hidróxi-5-Metilmeleína.	88
Figura 59 Mapa de contorno de COSY da substância Fr3-P4	89
Figura 60 Mapa de contorno de HMBC da substância Fr3-P4	90
Figura 61 Mapa de contorno de HSQC da substância Fr3-P4	90

Figura 62 Espectro de massas de alta resolução (<i>full scan</i> , modo positivo) da substância Fr3-P4	91
Figura 63 Análise da fração 4 ($\lambda = 220$ nm) por CLAE semipreparativa em coluna C18 eluída com H ₂ O:MeOH (50:50 à 20:80 v/v) em 30 min.....	93
Figura 64 Espectros de RMN de ¹ H de quatro substâncias isoladas da fração 4 e suas respectivas massas (mg).	94
Figura 65 Espectro no UV-Vis da substância Fr4-P5 (68,68% MeOH: 31,32% H ₂ O).	95
Figura 66 Espectro de RMN de ¹ H da substância Fr4-P5	96
Figura 67 Mapa de contorno de COSY da substância Fr4-P5	96
Figura 68 Mapa de contorno de HMBC da substância Fr4-P5	97
Figura 69 Análise da fração 5 ($\lambda = 220$ nm) por CLAE semipreparativa em coluna C18 eluída com H ₂ O:MeOH (50:50 à 10:90 v/v) em 30 min.....	99
Figura 70 Espectros de RMN de ¹ H de cinco substâncias isoladas da fração 5 e suas respectivas massas (mg).	100
Figura 71 Cromatograma CG-EM do extrato de malte (vermelho) sobreposto com o cromatograma do meio de malte (azul). 80 – 280°C (3°C/min).	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Massas obtidas dos extratos brutos de cada meio de cultivo em escala reduzida do fungo <i>Hypoxylon investiens</i>	38
Tabela 2 Massas obtidas dos extratos brutos de cada meio de cultivo em escala ampliada do fungo <i>Hypoxylon investiens</i>	42
Tabela 3 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr2-P3 (600 e 125 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) e para a 2,5-dicetopiperazina ciclo(L-Pro-L-Tir).	52
Tabela 4 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr2-P7 (600 e 125 MHz) e para a Nodulisporona.	58
Tabela 5 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr2-P9 e para Ciclo(D-Pro-D-Leu).....	66
Tabela 6 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 125 MHz) para Fr2-P12 e para a Isosclerona.	72
Tabela 7 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr3-P1 (600 e 125 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) e para a 2,5-dicetopiperazina ciclo(L-Pro-L-Tir).	80
Tabela 8 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr3-P3 (600 e 125 MHz) e para 5-hidróximetil-meleína.	86
Tabela 9 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr3-P4 (600 e 125 MHz) e para 4-hidróxi-5-Metilmeleína.....	92
Tabela 10 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr4-P5 (600 e 125 MHz) e para 5-Metilmeleína.....	98
Tabela 11 Substâncias identificadas por CG-EM.....	102
Tabela 12 Grau de inibição (GI) dos extratos brutos contra células MCF-7 (adenocarcinoma de mama).....	103
Tabela 13 Grau de inibição (GI) dos extratos brutos contra células HCT-116 (carcinoma cólon-retal).....	104
Tabela 14 Resultados dos ensaios de triagem pontual para as enzimas AChE _{ee} e BChE _{hu}	105
Tabela 15 Porcentagens de inibição de <i>Leishmania infantum</i> para cada fração...105	

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
δ_H	Deslocamento químico de 1H (em ppm)
δ_C	Deslocamento químico de ^{13}C (em ppm)
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
Å	Angstrom
AChE	Enzima Acetilcolinesterase
AChE-ee	Enzima Acetilcolinesterase de Enguia Elétrica
AChE-hu	Enzima Acetilcolinesterase Humana
AcOEt	Acetato de Etila
AT	<i>Asparagopsis taxiformis</i>
BChE-hu	Enzima Butirilcolinesterase Humana
C18	Sílica Gel de Fase Reversa Octadecil Silano
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	Centímetro
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CPG	Cromatografia de Permeação em Gel
CSSF	<i>Chemical Shift Selective Filter</i>
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dupleto
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
<i>dqd</i>	Duplo quádruplo dupleto
EM	Espectrometria de Massas
EPM	Erro Padrão da Média
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>

GI%	<i>Growth Innibition</i>
HCT-116	Linhagem de células de adenocarcinoma de cólon humano
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
ICERs	<i>Immobilized Capillary Enzyme Reactor</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamento
kPa	Quilopascal
Leu	Leucina
<i>m</i>	Multiplete
MBD	Meio de Batata e Dextrose
MCF-7	Linhagem de Célula Tumoral de Mama Humana
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
MHz/Hz	Megahertz/Hertz
min	Minutos
mL	Mililitro
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiozol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
NaOCl	Hipoclorito de sódio
nm	Nanômetro
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
¹³ C RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
¹ H RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<i>s</i>	Singleto
T	Tesla
<i>t</i>	Tripleto
Tir	Tirosina
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
tR	Tempo de retenção
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Produtos Naturais	19
1.2 Organismos Marinhos	20
1.3 Algas vermelhas	22
1.4 Fungos endofíticos	23
1.5 Fungos do gênero <i>Hypoxylon</i>	24
2 OBJETIVO	28
2.1 Estratégias para atingir o objetivo	28
3 PARTE EXPERIMENTAL	29
3.1 Coleta da alga	29
3.2 Isolamento e identificação da linhagem fúngica	29
3.3 Obtenção dos extratos brutos em escala reduzida e ampliada	30
3.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H e RMN de ^{13}C)	32
3.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)	32
3.6 Fracionamento do extrato bruto por Cromatografia em coluna (CC)	33
3.7 Espectrometria de massas de alta resolução	33
3.8 Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)	33
3.9 Ensaio biológicos	35
3.9.1 Análise de citotoxicidade	35
3.9.2 Análise de atividade anticolinesterásica	35
3.9.3 Análise de atividade leishmanicida	36
4 RESULTADOS	38
4.1 Análise dos extratos brutos em escala reduzida	38
4.1.1 Análise por RMN de ^1H	38
4.1.2 Análise por CLAE-DAD analítico	39

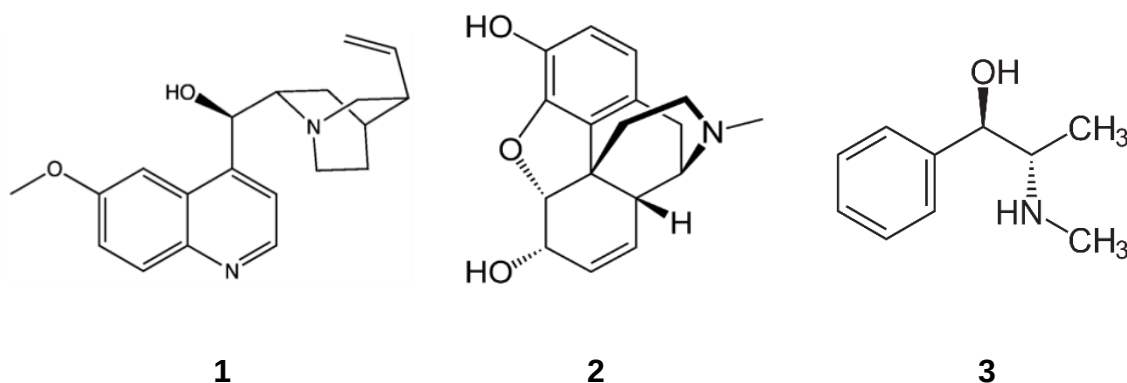
4.2 Cultivo em escala ampliada	41
4.3 Fracionamento do extrato bruto	44
4.4 Purificação da fração 2	46
4.4.1 Elucidação estrutural da substância Fr2-P3	47
4.4.2 Elucidação estrutural da substância Fr2-P7	53
4.4.3 Elucidação estrutural da substância Fr2-P9	59
4.4.4 Elucidação estrutural da substância Fr2-P12	67
4.5 Purificação da Fração 3	73
4.5.1 Elucidação estrutural da substância Fr3-P1	74
4.5.2 Elucidação estrutural da substância Fr3-P3	81
4.5.3 Elucidação estrutural da substância Fr3-P4	87
4.6 Purificação da Fração 4	93
4.6.1 Elucidação estrutural da substância Fr4-P5	94
4.7 Análise da Fração 5 e Fração 1	99
4.8 Análise do extrato de malte por CG-EM	101
4.9 Ensaios biológicos	103
4.9.1 Análise de citotoxicidade	103
4.9.2 Análise de atividade anticolinesterásica	104
4.9.3 Análise de atividade leishmanicida	105
5 CONCLUSÃO	106
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos Naturais

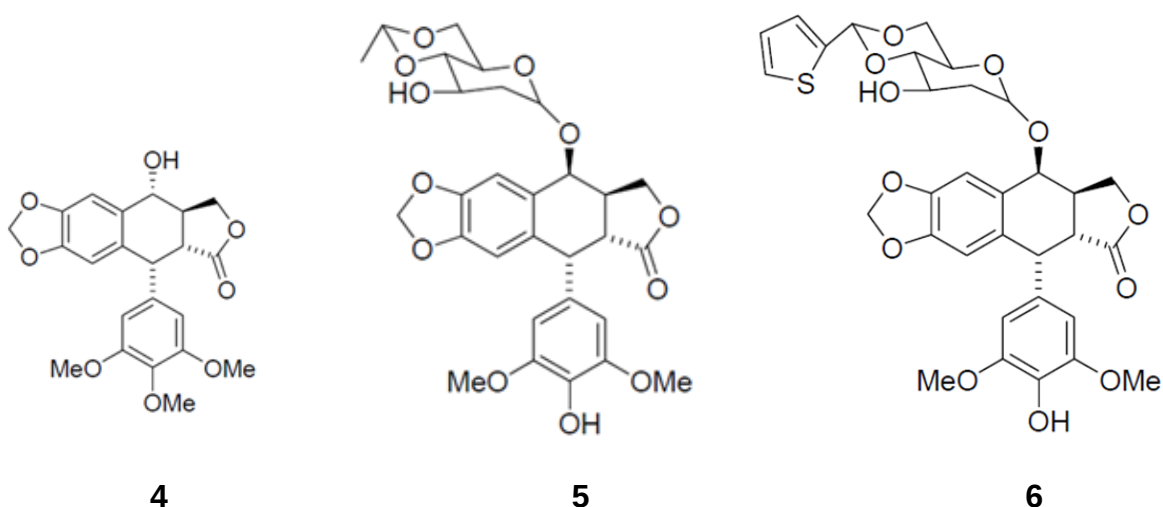
Uma das peculiaridades do ser humano é a capacidade de observar e manipular a natureza de maneira que nenhum outro ser vivo consegue, uma característica fundamental para evolução e sobrevivência da nossa espécie. Desde épocas pré-históricas até o século XIX, o uso de extratos e misturas de produtos naturais era praticamente a única opção para o tratamento das diversas doenças e distúrbios do corpo humano. Registros milenares, como os dos chineses e mesopotâmicos, revelam o uso de diversas plantas, animais e minerais para o preparo de remédios. (PATWARDHAN, 2004)

Os estudos fitoquímicos e microbiológicos se intensificaram com o avanço das técnicas de isolamento e elucidação estrutural, contribuindo para o avanço da farmacologia moderna, que busca o tratamento de doenças através de substâncias isoladas e não somente de extratos. A partir do século 19 começaram a surgir importantes fármacos: a morfina (**1**) foi isolada em 1804 da papoula (*Papaver Somniferum*) e até hoje é utilizada como analgésico. Em 1820 Caventou e Pelletier isolaram a quinina (**2**), um alcalóide anti-malárico presente nas cascas de algumas espécies de *Cinchona*. Outro exemplo clássico de bioprospecção é o isolamento da efedrina (**3**) em 1887, que foi utilizada no tratamento de asma. (CRAGG; NEWMAN, 2013)



Muitos dos agentes terapêuticos disponíveis atualmente foram desenvolvidos devido ao avanço da química sintética, embora quase metade dos novos fármacos das últimas décadas tenham sido obtidos diretamente de produtos naturais ou são

baseados nas estruturas das substâncias isoladas a partir de fontes naturais. (NEWMAN; CRAGG, 2016) Um exemplo é a podofilotoxina (**4**) que foi isolada da *Podophyllum peltatum* e se liga irreversivelmente com a tubulina, o que impede o crescimento da célula tumoral. O etoposídeo (**5**) e o teniposídeo (**6**) são derivados sintéticos da podofilotoxina, porém possuem mecanismo de ação diferente desta: a morte celular ocorre devido inibição da topoisomerase II, impedindo a clivagem do complexo enzima-DNA, induzindo a apoptose celular. Esses três compostos são utilizados no tratamento de câncer de pulmão, leucemias, linfomas, sarcoma de tecido mole, neuroblastoma, entre outros. (HANDE, 2006)

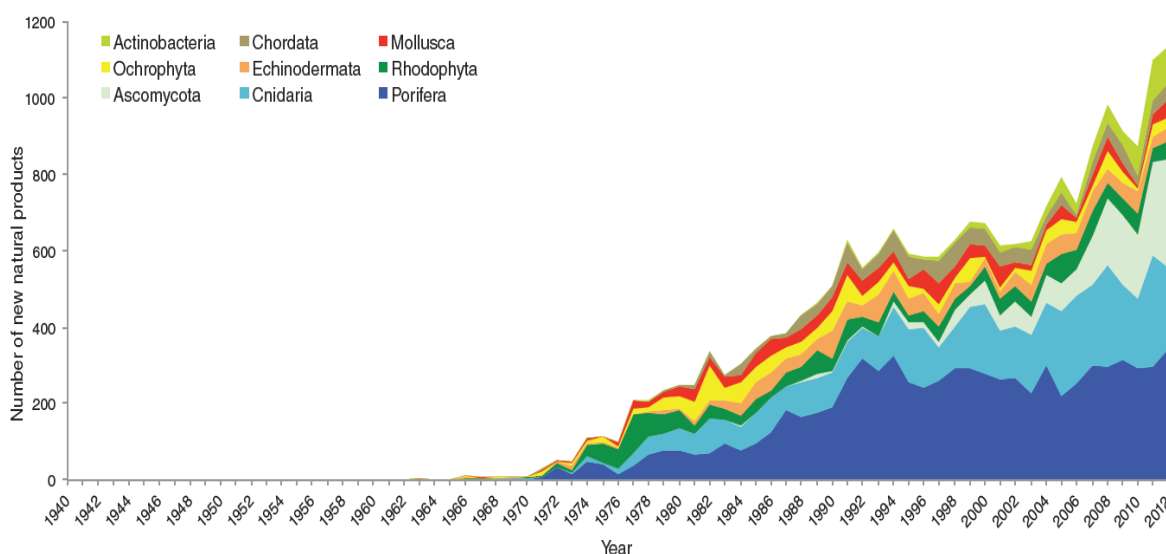


1.2 Organismos Marinhos

Os organismos marinhos podem ser tão diversos e abundantes quanto os terrestres e ambos são fontes de substâncias importantes para a cura de patologias e/ou a manutenção de uma vida saudável. Apesar dos mares e oceanos constituírem um dos maiores ecossistemas do planeta, os organismos marinhos foram bem menos explorados que os terrestres, principalmente devido a maior dificuldade de coletar espécimes (GERWICK; MOORE, 2012). Uma das primeiras descobertas com produtos naturais marinhos biologicamente ativos só foi relatada na década de 1950 por Bergmann e Feeney, que isolaram dois nucleosídeos (espongouridina e espongotimidina) da esponja *Tectitethya crypta*. (BERGMANN; FEENEY, 1951)

Apesar dos estudos com organismos marinhos terem começado nos anos 40, foi somente nos anos 70 que houve o aumento considerável na descoberta de novos produtos naturais marinhos. Nesses primeiros 30 anos foram relatadas 50 novas substâncias (**Figura 1**), o que equivale a menos de 0,2% do total de 26.000 produtos naturais marinhos conhecidos atualmente. (LEAL; CALADO, 2015)

Figura 1 Quantidade de produtos naturais marinhos inéditos descobertos de diferentes filos entre 1940 e 2012.

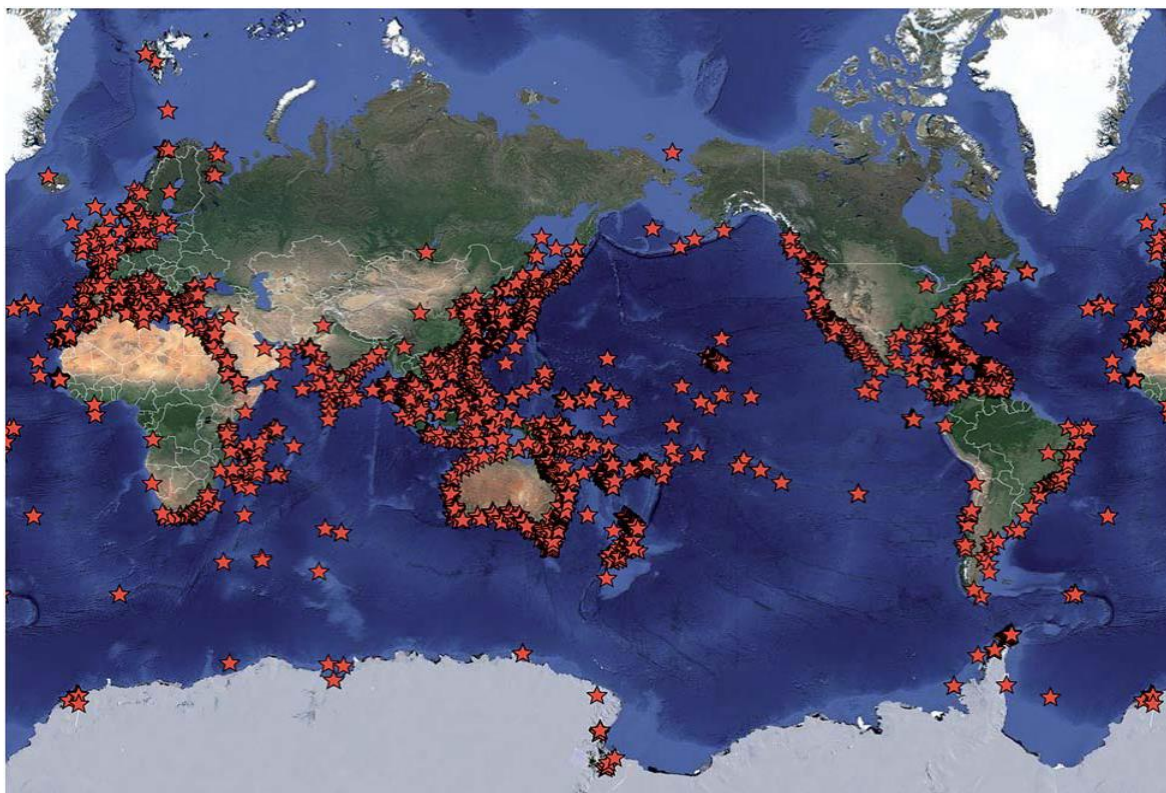


Fonte: Leal; Calado, 2015.

Devido as diferentes condições de crescimento, os organismos marinhos apresentam diferenças na produção metabólica em relação aos terrestres. No geral, os organismos marinhos apresentam metabólitos com cadeias e anéis maiores, mais substituintes halogenados, são mais hidrofóbicos e possuem menos anéis aromáticos. (SHANG et al., 2018)

Essa diversidade de metabólitos e a falta de estudos do ecossistema marinho têm chamado a atenção dos pesquisadores pelo grande potencial de descoberta de novos compostos bioativos. Essa questão é especialmente importante para o Brasil, já que temos uma das maiores costas marinhas do mundo e, ainda assim, a descoberta de novos compostos a partir dos mares da América do sul (538) continua menor do que na Coreia do Sul (848) (**Figura 2**). (BLUNT et al., 2016)

Figura 2 Locais de coleta de organismos marinhos que originaram produtos naturais inéditos entre 1965 e 2014.



Fonte: Blunt et al., 2016.

1.3 Algas vermelhas

As macro-algas encontradas em águas rasas foram um dos primeiros organismos marinhos a serem estudados por serem de fácil coleta. Ainda assim existem muitas espécies de algas a serem estudadas, sendo que só no Brasil foram identificadas 111 novas espécies da classe Rhodophyceae no período de 2010 a 2015. (MENEZES; BICUDO; MOURA, 2015)

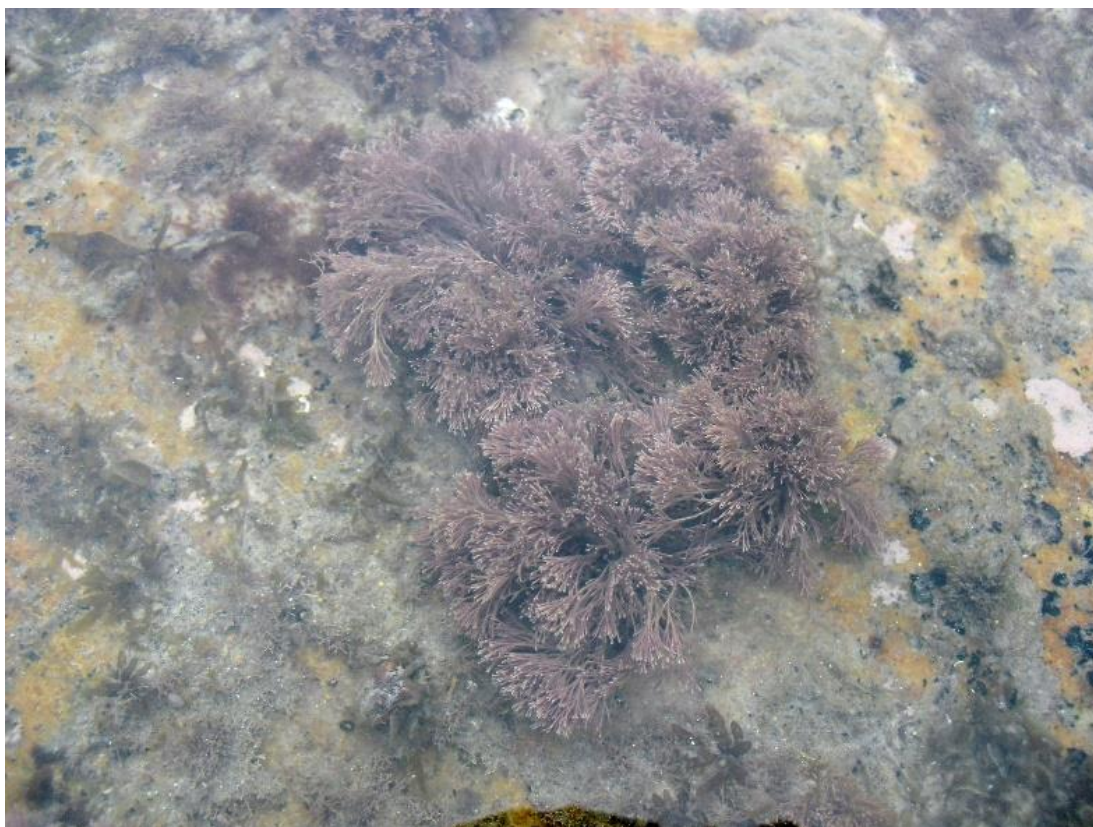
As macro-algas vermelhas (Rhodophyta) se destacam como o grupo com maior número de espécies (aproximadamente 7000) e por apresentarem alta variedade de metabólitos bioativos. (GUIRY, 2012)

Essas algas podem ser encontradas em diversas regiões do globo, a maioria no fundo do mar, mas também podem viver ligadas em substratos rochosos perto da costa. São conhecidas espécies produtoras de metabólitos halogenados com diferentes estruturas. (FAULKNER, 2001)

Devido a maior acessibilidade em relação a outros organismos marinhos e devido à sua grande quimiodiversidade, as algas continuam sendo uma das principais fontes de material para estudo com produtos naturais marinhos.

A alga vermelha *Asparagopsis taxiformis* (**Figura 3**), utilizada para o isolamento dos fungos endofíticos estudados nesse trabalho, foi coletada no litoral norte do Estado de São Paulo. Estudos demonstraram que essa espécie produz substâncias com atividade antibacteriana (MANILAL; SELVIN; GEORGE, 2012), leishmanicida (GENOVESE et al., 2009) e antifúngica (EL-BAROTY et al., 2007).

Figura 3 Alga marinha *Asparagopsis taxiformis* coletada na região de Ubatuba (SP).



Fonte: Medina, 2016.

1.4 Fungos endofíticos

Assim como no ambiente terrestre, os organismos marinhos podem viver associados a micro-organismos como fungos e bactérias, o que pode ser fundamental para a sobrevivência dos dois organismos. Os micro-organismos endofíticos vivem entre os tecidos do hospedeiro onde conseguem obter nutrientes

sem provocar danos, podendo até produzir substâncias que protegem o hospedeiro de agentes patógenos ou ajudam em seu desenvolvimento. Para sobreviver nesse ambiente os endófitos precisam resistir ao sistema imunológico do hospedeiro e vencer a competição por nutrientes com outros micro-organismos, por isso a maioria dos endófitos dominantes são produtores de metabólitos secundários que agem como antifúngicos, anticarcinogênicos, imunossupressores ou antioxidante. (JIA et al., 2016; KLIMOVA; PEÑA; SÁNCHEZ, 2016)

A importância da simbiose entre organismos para obtenção de substâncias é cada vez mais evidente, já que estudos revelaram que diversos compostos bioativos isolados de organismos marinhos, na verdade foram sintetizados pelos seus micro-organismos associados. (OLIVEIRA; FELÍCIO; DEBONSI, 2012)

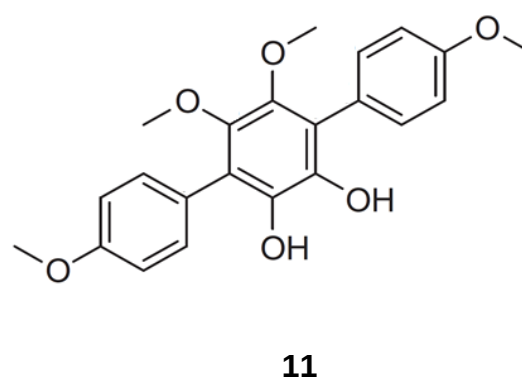
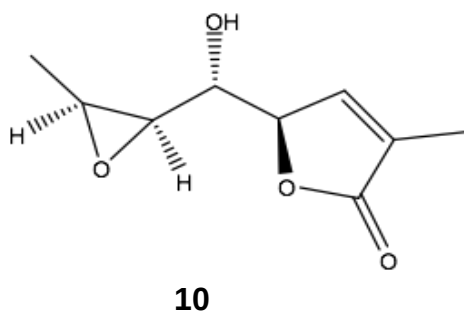
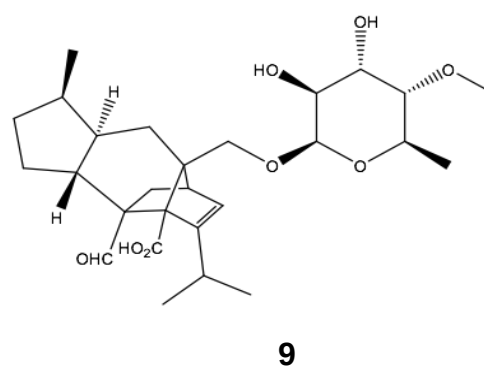
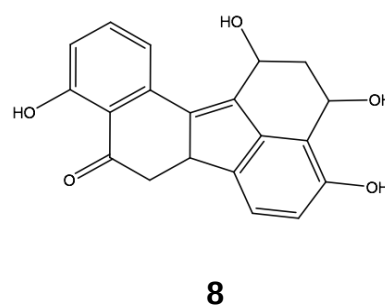
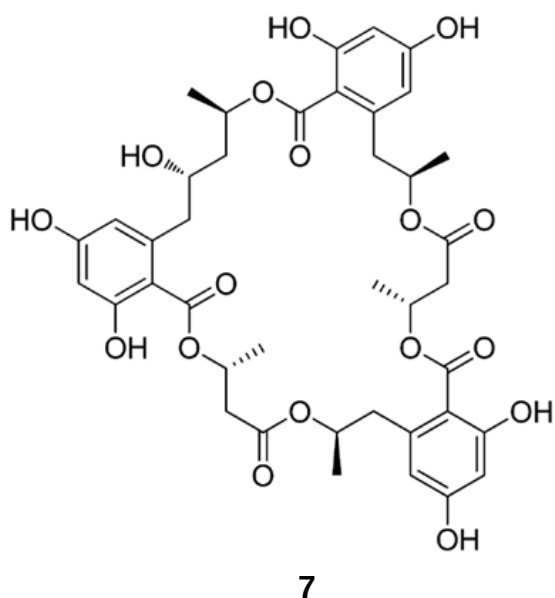
A variação de fatores como a temperatura, água, quantidade de luz, tipo de nutrientes e pH podem mudar drasticamente o desenvolvimento de uma espécie, podendo alterar a quantidade e as espécies de micro-organismos vivendo em simbiose com o hospedeiro. (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012)

Devido a biodiversidade de organismos hospedeiros e a dificuldade de identificar micro-organismos, a quantidade de fungos endofíticos estudados ainda é pequena. Estimativas demonstram a existência de mais de um milhão de espécies de fungos endofíticos, sendo que menos de 10% foram estudados. (STROBEL; DAISY, 2003)

1.5 Fungos do gênero *Hypoxylon*

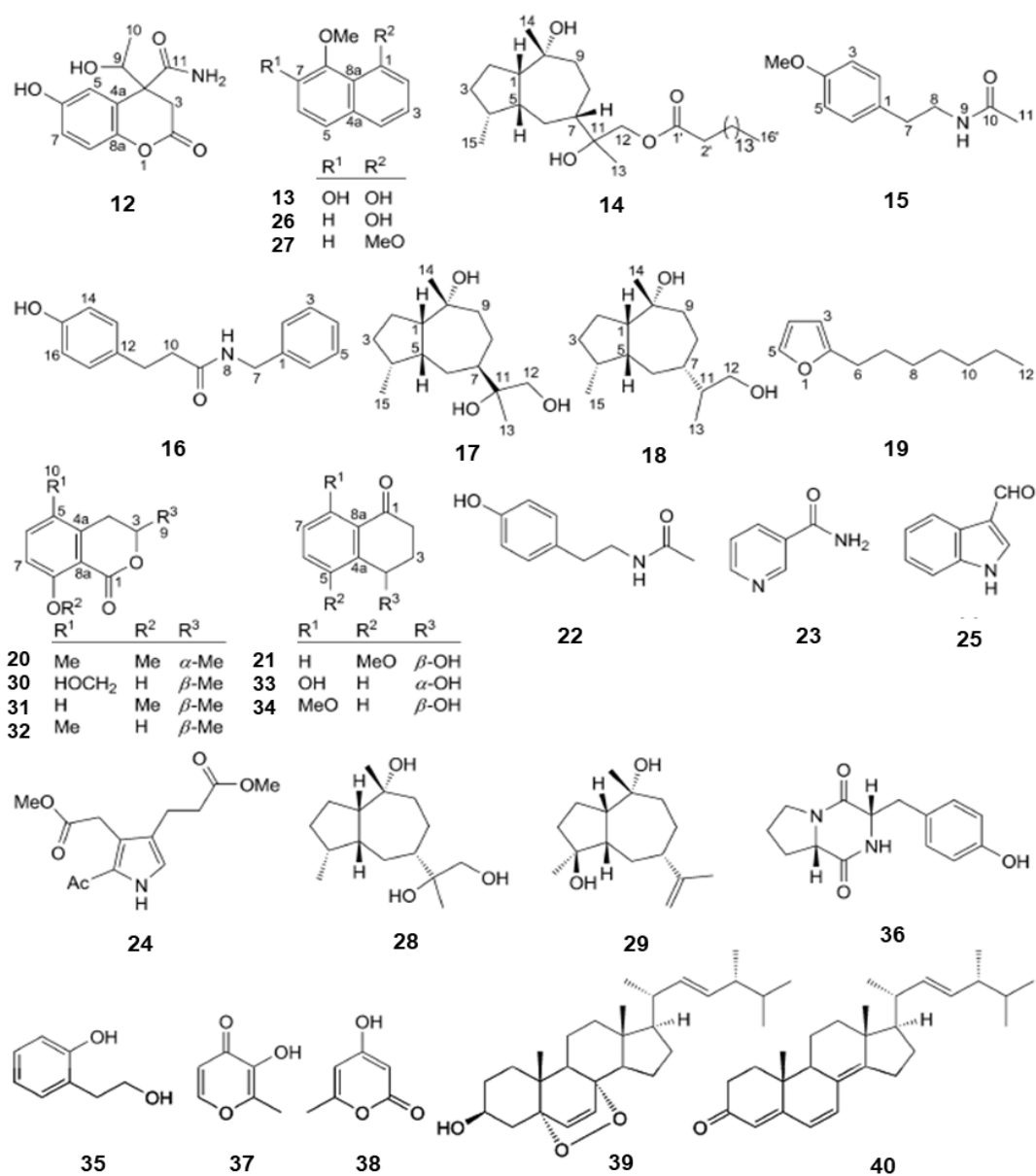
O gênero *Hypoxylon*, pertencente à família Xylariaceae, é constituído de aproximadamente 130 espécies (ÜHLBAUER et al., 2002). Esse gênero é um dos poucos da família que produzem metabólitos secundários policetídicos do tipo azafilonas (ZHANG et al., 2016). Diversas substâncias que apresentaram atividades biológicas foram isoladas de fungos desse gênero como, por exemplo, a Menisporopsina A (7). Esse macrociclo, isolado de *H. oceanicum*, apresentou atividade antimalárica, antimicrobiana e citotóxica contra a linhagem BC-1 (câncer de mama) (CIMMINO et al., 2017). O Hypoxylonol C (8), que é um derivado do benzofluoranteno, foi encontrado em *H. truncatum* e apresentou atividades antiproliferativa, antiangiogênica e citotóxica (FUKAI et al., 2012; FUKAI et al., 2014). Da espécie *H. croceum* foram isoladas a sordarina (9) e hipoxilactona (10), sendo

que ambas apresentaram atividade antifúngica (DAFERNER et al., 1999). O Riquenil A (**11**) é um derivado trifenílico com atividade citotóxica e antioxidante, sendo que essa substância foi encontrada nas espécies *H. fendleri* e *H. rickii*. (INTARAUDOM et al., 2017; KUHNERT et al., 2015)



A espécie *H. investiens* possui poucos estudos de prospecção químico-biológica, por isso seu potencial para obtenção de compostos bioativos é pouco conhecido. Chang e colaboradores (2014) descreveram o isolamento de 29 substâncias dessa espécie (**Figura 4**) sendo que algumas foram descritas pela primeira vez como produtos naturais (**15-21**) e outras são substâncias já conhecidas (**22-40**).

Figura 4 Substâncias isoladas do fungo *H. investiens*.

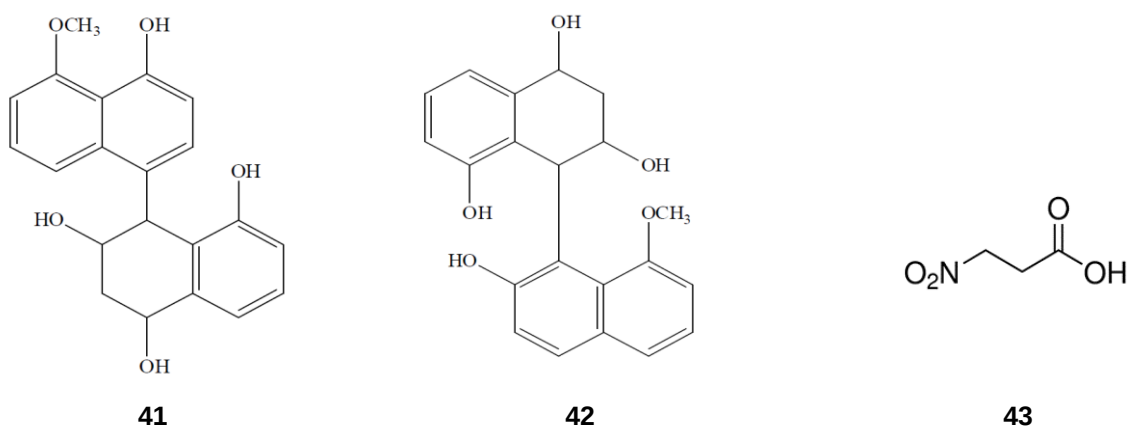


Fonte: Chang et al., 2014; adaptado pelo autor.

Um estudo recente revelou ainda que essa espécie é produtora das enzimas amilase, celulase, lipase e lacase, que apresentam potencial de aplicação em diversos bioprocessos. A lacase, por exemplo, pode ser usada na desintoxicação de efluentes de fábricas de papel, biorremediação de solos contaminados, síntese de polímeros e na catálise em reações para síntese de fármacos (TOGHUEO et al., 2017).

Esse fungo também foi estudado anteriormente em nosso grupo de pesquisa (SILVA, 2016), tendo sido possível isolar duas substâncias inéditas derivadas do naftaleno (**41** e **42**), além do ácido 3-nitropropanóico (**43**), obtido com alto rendimento (**Figura 5**).

Figura 5 5'-metoxi-1,2,3,4-tetraidro-1,1'-binaftaleno-2,4,4',8-tetrol (**41**), 8'-metoxi-1,2,3,4-tetraidro-1,1'-binaftaleno-2,2',4,8-tetrol (**42**) e o ácido 3-nitropropanóico (**43**) isolados de *H. investiens*.



Fonte: Silva, 2016.

O presente estudo visa continuar a busca por metabólitos bioativos a partir do extrato do fungo *H. investiens*, já que no estudo anterior foram identificadas frações promissoras que possivelmente continham outros derivados de naftaleno, além da importância do reisolamento dos binaftalenos para estudos de bioatividade e determinação da estereoquímica.

5 CONCLUSÃO

Os extratos do fungo endofítico *Hypoxylon investiens*, isolado da alga marinha vermelha *Asparagopsis taxiformis*, investigados neste trabalho foram submetidos a análises químicas e de atividade biológica no contexto de estudos de bioprospecção. As metodologias utilizadas para cultivo da linhagem fúngica foram otimizadas e resultaram na seleção do meio de malte para produção do extrato em escala ampliada. Com o uso da técnica cromatográfica CLAE-DAD, foi possível isolar três dicetopiperazinas: ciclo(Pro-Tir), ciclo(Pro-Phe) e ciclo(Pro-Leu), duas tetralonas: nodulisporona e isosclerona, e três isocumarinas: 5-hidroximetil-meleína, 4-hidroxi-5-metilmeleína e 5-metilmeleína. Essas substâncias foram identificadas utilizando RMN uni e bidimensional, espectrometria de massas e espectroscopia UV-Vis. Também foram identificados quatro ácidos orgânicos de baixo peso molecular: ácidos 3-(4-hidroxifenil)lático, 5-hidroxi-indolacético, 3-hidroxibutírico e homogentísico, e ainda, o monossacarídeo D-manitol por CG-EM..

Os extratos brutos e frações semipurificadas foram analisados em ensaios para avaliação de atividade anticolinesterásica e citotóxica e apresentaram atividade fraca a moderada. No estudo anticolinesterásico, a fração At01Fr4 apresentou seletividade e moderada atividade inibitória de acetilcolinesterase de enguia elétrica (AChE_{ee}) com grau de inibição de 48,4%. No estudo de citotoxicidade com as linhagens MCF-7 e HCT-116, os extratos apresentaram atividades fracas. Diversas bioatividades foram relatadas na literatura para as substâncias isoladas, sugerindo que a fermentação desse fungo, em outras condições de cultivo, pode levar a uma maior produção de metabólitos bioativos além de possíveis substâncias inéditas.

Considerando que o fungo *H. investiens* foi ainda pouco estudado, com raros relatos na literatura, este trabalho também contribui para aumentar o conhecimento referente à quimiodiversidade de micro-organismos associados a organismos marinhos, uma área dos estudos com produtos naturais ainda pouco explorada no Brasil. De forma global, nossos dados sugerem a necessidade de estudos adicionais, visando a exploração racional dos produtos naturais do ambiente marinho e de seu potencial biológico, contribuindo ainda para aprofundar o conhecimento deste importante bioma no contexto de práticas de sustentabilidade.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELOBORODOVA, N. et al. Effect of phenolic acids of microbial origin on production of reactive oxygen species in mitochondria and neutrophils. **Journal of Biomedical Science**, v. 19, p. 1–9, 2012.

BERGMANN, W.; FEENEY, R. J. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. I. **Journal of Organic Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 981–987, jun 1951.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 382–431, 2016.

CAFÊU, M. C. Estudo químico e avaliação biológica dos fungos endofíticos *Xylaria* sp. e *Colletotrichum crassipes* isolados de *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). 255 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

CHANG, H. et al. Inhibitory Effects of Constituents of an Endophytic Fungus *Hypoxylon investiens* on Nitric Oxide and Interleukin-6 Production in RAW264.7 Macrophages. **Chemistry & Biodiversity**, v. 11, p. 949–961, 2014.

CHOI, J. Y. et al. Podophyllotoxin acetate triggers anticancer effects against non-small cell lung cancer cells by promoting cell death via cell cycle arrest, ER stress and autophagy. **International Journal of Oncology**, v. 47, n. 4, p. 1257–1265, 2015

CIMMINO, A. et al. Application of Mosher's method for absolute configuration assignment to bioactive plants and fungi metabolites. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.144, p. 59-89, fev. 2017.

COUCHÉ, E.; FKYERAT, A.; TABACCHI, R. Asymmetric Synthesis of the *cis*- and *trans*-3,4-Dihydro-2,4,8- trihydroxynaphthalen-1(2*H*)-ones. **Helvetica Chimica Acta**, v. 86, p. 210–221, 2003.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

DAFERNER, M. et al. Hypoxysordarin, a new sordarin derivative from *Hypoxylon croceum*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 54, n. 7/8, p. 474-480, 1999.

EL-BAROTY, G. S. et al. Contribution to the aroma, biological activities, minerals, protein, pigments and lipid contents of the red alga: *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trevisan. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 3, n. 12, p. 1825-1834, 2007.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 1–49, 2001.

FUKAI, M. et al. Antiangiogenic activity of hypoxylonol C. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 4, p. 1065–1068, abr. 2014.

FUKAI, M. et al. Hypoxylonols C–F, Benzo[*j*]fluoranthenes from *Hypoxylon truncatum*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 1, p. 22–25, jan. 2012.

GENOVESE, G. et al. The Mediterranean Red Alga *Asparagopsis*: A Source of Compounds against *Leishmania*. **Marine Drugs**, v. 7, p. 361–366, 2009.

GERWICK, W. H.; MOORE, B. S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 1, p. 85–98, jan. 2012.

GUIRY, M. D. How many species of algae are there? **Journal of Phycology**, v. 48, p. 1057–1063, 2012.

GUO, X. et al. Synergistic algicidal effect and mechanism of two diketopiperazines produced by *Chryseobacterium* sp. strain GLY-1106 on the harmful bloom-forming *Microcystis aeruginosa*. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–12, jun. 2015.

HANDE, K. R. Topoisomerase II inhibitors. **Update on Cancer Therapeutics**, v. 1, p. 3–15, 2006.

HUANG, C. et al. Discovery, synthesis, biological evaluation and molecular docking study of (R)-5-methylmellein and its analogs as selective monoamine oxidase A inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 10, p. 2027–2040, 2019.

IMBERT, T. F. Discovery of podophyllotoxins. **Biochimie**, v. 80, n. 3, p. 207–222, 1998

INTARAUDOM, C. et al. Terphenyl derivatives and drimane-Phthalide/isoindolinones from *Hypoxylon fenderi* BCC32408. **Phytochemistry**, v. 139, p. 8–17, 2017.

JIA, M. et al. A Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants: A Systematic Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–14, jun. 2016.

KAMISUKI, S. et al. Nodulisporol and Nodulisporone, novel specific inhibitors of human DNA polymerase λ from a fungus, *Nodulisporium* sp. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 3109–3114, 2007

KARANAM, G. et al. Anticancer Effect of Marine Sponge-Associated *Bacillus pumilus* AMK1 Derived Dipeptide Cyclo (-Pro-Tyr) in Human Liver Cancer Cell Line Through Apoptosis and G2/M Phase Arrest. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, p. 1–13, abr. 2019.

KLIMOVA, E. M.; PEÑA, K. R.; SÁNCHEZ, S. Endophytes as sources of antibiotics. **Biochemical Pharmacology**, v. 134, p. 1–17, jun. 2017.

KUHNERT, E. et al. Rickenyls A–E, antioxidativeterphenyls from the fungus *Hypoxylon rickii* (Xylariaceae, Ascomycota). **Phytochemistry**, v. 118, p. 68–73, 2015.

KUMAR, N. et al. Isolation of proline-based cyclic dipeptides from *Bacillus* sp. N strain associated with rhabditid entomopathogenic nematode and its antimicrobial properties. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 355–364, fev. 2013.

KUMAR, S. N.; MOHANDAS, C; NAMBISAN, B. Purification of an antifungal compound, cyclo(L-Pro-D-Leu) for cereals produced by *Bacillus cereus* subsp. *thuringiensis* associated with entomopathogenic nematode. **Microbiological Research**, v. 168, n. 5, p. 278–288, 2013.

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

LEAL, M. C.; CALADO, R. Marine natural products: Biodiscovery, biodiversity, and bioproduction. **Bioactive Natural Products: Chemistry and Biology**, p. 473–490, 2015.

LI, Y. et al. Anti-proliferative effects of isosclerone isolated from marine fungus *Aspergillus fumigatus* in MCF-7 human breast cancer cells. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 12, p. 2292–2298, 2014.

MANILAL, A.; SELVIN, J.; GEORGE, S. *In vivo* therapeutic potentiality of red seaweed, *Asparagopsis* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta) in the treatment of Vibriosis in *Penaeus monodon* Fabricius. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 2, p. 165–175, 2012.

MEDINA, R. P. Prospecção química e biológica das algas vermelhas *Asparagopsis taxiformis* e *Pyropia spiralis* e seus fungos endofíticos. 430 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

MENEZES, M.; BICUDO, C. E. M.; MOURA, C. W. N. Update of the Brazilian floristic list of algae and cyanobacteria. **Rodriguesia**, v. 66, n. 4, p. 1047–1062, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 2, p. 55–63, dez. 1983.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

OKUNO, T. et al. Structures and Phytotoxicity of Metabolites from *Valsa ceratosperma*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 997-1001, 1986.

OLIVEIRA, A. L. L. de; FELÍCIO, R. de; DEBONSI, H. M. Marine natural products: chemical and biological potential of seaweeds and their endophytic fungi. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 4, p. 906-920, jul./ago. 2012.

PATWARDHAN, B.; VAIDYA, A. D. B.; CHORGHADE, M. Ayurveda and natural products drug discovery. **Current Science**, v. 86, n. 6, p. 789–799, 2004.

PROMGOOL, T. et al. Bioactive homogentisic acid derivatives from fruits and flowers of *Miliusa velutina*. **Fitoterapia**, v. 134, n. p. 65–72, fev. 2019.

RUKACHAISIRIKUL, V. et al. An [11]Cytochalasin Derivative from the Marine-Derived Fungus *Xylaria* sp. PSU-F100. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, n. 12, p. 1409–1411, 2009.

SHANG, J. et al. A cheminformatic insight into the differences between terrestrial and marine originated natural products. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 58, p. 1182–1193, 2018.

SILVA, A. D. Bioprospecção do fungo endofítico *Hypoxylon investiens* associado à alga marinha *Asparagopsis taxiformis*: potencial antifúngico, anticolinesterásico e antitumoral. 2016. 150 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491–502, 2003.

SUGIYAMA, Y. Indole derivatives from a marine sponge-derived yeast as DPPH radical scavengers. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 11, p. 2069-2071, nov. 2009.

TOGHUEO, R. M. K. et al. Enzymatic activity of endophytic fungi from the medicinal plants *Terminalia catappa*, *Terminalia mantaly* and *Canangaodorata*. **South African Journal of Botany**, v. 109, p. 146–153, 2017.

ÜHLBAUER, A. et al. Macrocarpones, novel metabolites from stromata of *Hypoxylon macrocarpum*, and new evidence on the chemotaxonomy of *Hypoxylon* species. **Mycological Progress**, v. 1, n. 3, p. 235–248, 2002.

WANG, G. et al. Two diketopiperazine cyclo(PRO-PHE) isomers from marine bacteria *Bacillus subtilis* sp. 13-2. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 46, n. 4, p. 583–585, 2010.

ZHANG, S. et al. Antiviral anthraquinones and azaphilones produced by an endophytic fungus *Nigrospora* sp. from *Aconitum carmichaeli*. **Fitoterapia**, v. 112, p. 85–89, 2016.

ZHAO, S. et al. Dihydroisocoumarins from *Radix Glycyrrhizae*. **Chemistry Central Journal**, v. 99, p. 10–15, 2018.