



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Estudo de modificadores químicos epigenéticos no cultivo de
fungos endofíticos associados à *Paepalanthus chiquitensis*
(Eriocaulaceae) e avaliação da atividade antimicrobiana**

Felipe Hilario

Orientadora: Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos

Coorientadora: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

Araraquara- SP

2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Estudo de modificadores químicos epigenéticos no cultivo
de fungos endofíticos associados à *Paepalanthus
chiquitensis* (Eriocaulaceae) e avaliação da atividade
antimicrobiana**

Felipe Hilario

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e
Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos,
para obtenção do título de Doutor em Ciências
Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos
Coorientadora: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

Araraquara- SP

2020

-
- H641e** Hilario, Felipe.
Estudo de modificadores químicos epigenéticos no cultivo de fungos endofíticos associados à *Paepalanthus chiquitensis* (Eriocaulaceae) e avaliação da atividade antimicrobiana / Felipe Hilario. – Araraquara: [S.n.], 2020.
255 f. : il.
- Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.
- Orientadora: Lourdes Campaner dos Santos.
Coorientadora: Taís Maria Bauab.
1. Eriocaulaceae. 2. *Paepalanthus chiquitensis*. 3. *Fusarium fujikuroi*. 4. *Curvularia lunata*. 5. Fungo endofítico. 6. Epigenética. I. Santos, Lourdes Campaner dos, orient. II. Bauab, Taís Maria, coorient. III. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "ESTUDO DE MODIFICADORES QUÍMICOS EPIGENÉTICOS NO CULTIVO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À PAEPALANTHUS CHIQUITENSIS (ERIOCAULACEAE) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA"

AUTOR: FELIPE HILARIO

ORIENTADORA: LOURDES CAMPANER DOS SANTOS

COORDINADORA: TAIS MARIA BAUAB

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: Sem Área de Conhecimento pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LOURDES CAMPANER DOS SANTOS
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. MARCELO APARECIDO DA SILVA
Departamento de Alimentos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNIFAL

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

Prof. Dr. FERNANDO ROGERIO PAVAN
Departamento de Ciências Biológicas / FCFAR - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. MARGARETE TERESA GOTTARDO DE ALMEIDA
Departamento de Doenças Dermatológicas, Infeciosas e Parasitárias / FAMERP

Araraquara, 27 de março de 2020

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”
Marie Curie

*Dedico este trabalho aos meus pais Eduardo
& Maria Anália, meus irmãos Eduardo Filho
e Luis Fernando Hilário que sempre me
apoiam.
Muito Obrigado!*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por existir, por estar sempre presente na minha vida e por tudo que tem me concedido.

Aos meus pais, Eduardo e Maria Anália, que sempre me incentivaram e por terem acreditado em mim.

Ao meu irmão, Fernando, pela sincera amizade e por sempre poder contar com você.

Ao meu irmão, Eduardo Filho (Júnior), partiu em 2019, mas está marcado em nossos corações e em nossa família.

À minha querida prima Mari e aos meus amados sobrinhos Lê, Bia, Breno e Léo.

À professora Lourdes Campaner dos Santos, pela orientação e, principalmente, pelo aprendizado adquirido, os quais foram essenciais à minha formação e na realização desse trabalho, desde a IC em 2007.

À professora Taís Maria Bauab, minha estimada co-orientadora, por ter aberto as portas de seu laboratório e proporcionar-me a valiosa oportunidade de trabalhar com os ensaios de atividade antimicrobiana, além das enriquecedoras discussões.

Às professoras Rosemeire C. L. R. Pietro & Angela Regina do Araujo pela participação na banca de qualificação e pelas importantes sugestões para a finalização deste trabalho.

Aos professores Marcelo Aparecido da Silva, Roberto Berlinck, Fernando Pavan & Margarete Teresa Gottardo de Almeida, que gentilmente aceitaram o convite para compor a banca de defesa do mestrado.

Ao professor Marcelo Aparecido da Silva pela amizade, orientação e imenso aprendizado durante a iniciação científica.

À professora Angela Regina do Araujo por ter dado a oportunidade em trabalhar com fungos endofíticos, pela parceria, contribuição e pelos valiosos ensinamentos.

A todos os colegas do laboratório de fitoquímica: Aninha, Carlos, Claudinha, Michelle, Guilherme, Rodrigo, Leonardo, Ju Severi, Mayara, Júlia, Raissa, Fabiano, Viviane, Clenilson, Claudia, Maria do Socorro, Lima Neto, Samara, Sauna, Weslei, Daylin, Alexander, Talitinha, Taís, Carlos, Francisco, Fabiana, Mariana Pacífico e Fabiana pela amizade e pela convivência. Foi muito bom ter vocês comigo!

A todos os colegas do laboratório de Fisiologia de Micro-organismos: Patrícia Bento, Matheus Ramos, Larissa, Bruna, Gi, e Luciani Toledo pela amizade, receptividade e prestatividade em todos os momentos.

A todos os colegas do laboratório de Micro-organismos: Juzinha, Carol, Andressa (Blossom), Alana, Rebeca, Vanessa Chapla pela convivência dentro e fora do laboratório.

Aos grandes amigos, Lú (minha irmã), Mat, Gi Cintra, Roça, Jú Bosso, Alice Haddad, Ana Carolinda, Raquel Sabará, Marininha, França, Fuxs, Vardhan, Pei, Dú, Bel, Patrick, Revorta, Naira, Babs e Mari ruiva.

Aos estimados de Araraquara, Mau, Gui, Augustinho e Álvaro!

Aos técnicos João e Marília, do Laboratório de Espectrometria de Massas do Instituto de Química, pelas análises.

Ao Rafael (PT) e Albertinho pelos espectros de IV e DC.

Ao Dr. Nivaldo Borallo, pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Instituto de Química UNESP-Araraquara, pela acolhida e incentivo à vida acadêmica

Agradeço a The University of Oklahoma e aos membros do Natural Product Discovery Group (Norman, Oklahoma-EUA), em especial ao Dr. Jinwoo pela amizade e por tudo que aprendi com vocês. Muito obrigado!

Ao prof. Dr. Robert H. Cichewicz, pela orientação, pelos ensinamentos, compreensão e amizade.

A todos os funcionários da FCFAR e do IQ que contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

À FAPESP pelas bolsas concedidas no Brasil (Processo No. 2016/05480-9) e no exterior (Processo No. 2018/01620-6) e aos funcionários vinculados à FAPESP.

As agências de fomento Capes e CNPq.

RESUMO

Este trabalho apresenta o estudo dos efeitos de modificadores epigenéticos e eliciadores químicos na diversificação metabólica de *Curvularia lunata* e *Fusarium fujikuroi*, fungos isolados de *Paepalanthus chiquitensis* (Eriocaulaceae). Os fungos foram cultivados em PDB (caldo batata dextrose), e as seguintes condições foram investigadas: (PDB + SAHA) ácido hidroxâmico suberoilânilda, (PDB + AZA) 5-azacitidina, (PDB + AA) ácido anacárdico, PDB + Cu²⁺ e PDB + Mg²⁺. Essas condições foram comparadas com o controle PDB. O estudo químico de *C. lunata*, resultou no isolamento das novas γ -lactamas espirocíclicas **C3** e **C4**, e outros cinco compostos conhecidos: triticonas E (**C1**) e F (**C2**), ácido 5-O-metilcurvulínico (**C5**), ácido curvulínico (**C6**) e curvulina (**C7**). As estruturas foram elucidadas por análises espectroscópicas e pela comparação com dados da literatura. Além disso, um estudo computacional foi realizado para determinar a configuração absoluta do C-3' de **C3** e **C4**. As triticonas **C1** e **C2** apresentaram boa atividade antibacteriana para *Escherichia coli*, com CIM de 62,5 μ g/mL. Dos eliciadores químicos utilizados, a suplementação com Mg²⁺ foi a condição que apresentou as diferenças mais significativas no perfil metabólico de *F. fujikuroi*. O extrato PDB + Mg²⁺ preparado do cultivo em escala ampliada foi purificado por métodos cromatográficos e resultou no isolamento e identificação das substâncias: ácido indolacético (**F3**) e seus derivados **F4**, **F8** e **F17**, assim como a auxina ácido fenilacético (**F2**) e seus derivados **F6**, **F11**, **F12**, **F15** e **F18**. Os compostos **F2**, **F3** e **F4** apresentaram os melhores valores de CIM para todas as leveduras do gênero *Cândida* avaliadas. As análises quantitativas por CLAE-DAD dos metabólitos isolados ácido fusárico, AIA, ácido acético-2-(4-butilpicolinamida) e terpestacina foram quantificadas nos extratos obtidos dos cultivos, e o método desenvolvido foi validado. Paralelamente, em colaboração com a Universidade de Oklahoma, foram estudados os seguintes fungos de solo: *Aspergillus arcoverdensis* que resultou no isolamento da verruculogena, fumitremorgina e veriditoxina, apresentou potente atividade contra *Trichomonas vaginalis* (1,0 μ M). O estudo bioguiado de *Cylindrocarpon pauciseptatum* possibilitou o isolamento da fujikurina B, responsável pela atividade antituberculose, não apresentando citotoxicidade em células J774. Por fim, os estudos de *Talaromyces verruculosus*, resultou em frações e substâncias que exibiram atividades biológicas frente as cepas de *T. vaginalis*, *M. tuberculosis* e *C. albicans* na formação de biofilme, sendo não citotóxicas em células J774 e HepG2. O estudo bioguiado de *T. verruculosus* resultou no isolamento de metabolitos com potente atividade inibitória na formação do biofilme de *C. albicans*: duclauxina, bacillisporina F e 1-*epi*-bacillisporin F.

Palavras-chave: Eriocaulaceae, *Paepalanthus chiquitensis*, *Fusarium fujikuroi*, *Curvularia lunata*, fungo endofítico, epigenética

ABSTRACT

This work presents the studies of the effects of epigenetic modifiers and chemical elicitors on the metabolic diversification of *Fusarium fujikuroi* and *Curvularia lunata*, isolated of *Paepalanthus chiquitensis* (Eriocaulaceae). The fungi were grown in PDB (potato dextrose broth) and the following conditions were investigated: (PDB +SAHA) suberoylanilide hydroxamic acid, (PDB +AZA) 5-azacitidine, (PDB +AA) anacardic acid, PDB +Cu²⁺ and PDB + Mg²⁺. These conditions were compared with the PDB control. The chemical study of *C. lunata*, resulted in the isolation of new spirocyclic- γ -lactams **C3** and **C4**, and five known compounds: triticones E (**C1**) and F (**C2**), 5-*O*-methylcurvulinic acid (**C5**), curvulinic acid (**C6**) and curvulin (**C7**). The structures were elucidated by spectroscopic analysis and by comparison with data from the literature. In addition, a computational study was carried out to determine the absolute configuration in the C-3' (**C3** and **C4**). The extract and compounds were tested against bacteria and yeasts. The **C1** and **C2** showed good antibacterial activity for *E. coli*, with a minimum inhibitory concentration of 62.5 μ g/mL. The supplementation with Mg²⁺ into PDB medium was the condition that showed the most significant differences in the metabolic profile of *F. fujikuroi*. The chemical study of extract PDB + Mg²⁺ resulted in the isolation and identification of the metabolites: indoleacetic acid (**F3**) and its derivatives **F4**, **F8** and **F17**, as well of the phenylacetic acid class (**F18**) the derivatives **F2**, **F6**, **F11**, **F12** and **F15** and **F18**. The compounds **F2**, **F3** e **F4** have showed interesting MIC values against all yeast strains tested. The quantitative analysis by HPLC-DAD of the metabolites fusaric acid, indole acetic acid, acetic acid-2-(4-butylicolinamide) and terpestacin were quantified in the extracts prepared of the cultured studied, besides the method was validated. In collaboration with Oklohama University, others activities were studied the following soil fungi: *Aspergillus arcverdensis*, resulted in isolation of verruculogen, fumitremorgin and veriditoxin that demonstrated potential activity against *Trichomonas vaginalis* (1.0 μ M). The bioguided study of *Cylindrocarpum pauciseptatum* made it possible to isolate fujikurin B, responsible for anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and non-cytotoxicity in the J774 cell line. Finally, the studies of *Talaromyces verruculosus*, result in fractions and substances that exhibit several biological activities against *T. vaginalis*, *M. tuberculosis* and *C. albicans* in the biofilm formation, besides showed non cytotoxic in J774 and HepG2 cells. The bioguided study of *T. verruculosus* resulted in the isolation of potent metabolites able to inhibit the formation of *C. albicans* biofilm, named: duclauxin, bacillisporin F and 1-*epi*-bacillisporin F.

Keywords: Eriocaulaceae, *Paepalanthus chiquitensis*, *Fusarium fujikuroi*, *Curvularia lunata*, endophytic fungi, epigenetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Metabólitos secundários produzidos por <i>F. fujikuroi</i>	32
Figura 02a. Metabólitos secundários produzidos por <i>Curvularia</i> spp.	35
Figura 02b. Metabólitos secundários induzidos pela adição de modificadores epigenéticos e eliciadores químicos no cultivo de diversos fungos filamentosos.....	40
Figura 03. Microplaca para a determinação da CIM.....	53
Figura 04. Reação de redução da resazurina	54
Figura 05. Reação de redução do TTC.....	56
Figura 06. Cromatograma representando os perfis dos Ex. AcOEt produzidos em escala reduzida pelo fungo <i>C. lunata</i> isolado das folhas de <i>P. chiquitensis</i> : PDB (A), PDB + Cu ²⁺ (B) PDB + Mg ²⁺ (C) [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ [®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 mm; Solvente A: H ₂ O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min ⁻¹ ; λ= 280 nm]	64
Figura 07. Cromatograma representando os perfis dos Ex. AcOEt em escala reduzida produzido pelo fungo <i>C. lunata</i> isolado das folhas de <i>P. chiquitensis</i> : PDB (A), PDB + SAHA (B), PDB +AZA (C) e PDB +AA (D) [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ [®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 mm; Solvente A: H ₂ O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min ⁻¹ ; λ= 280 nm]	65
Figura 08. Análise por CCDC das frações obtidas do fracionamento por Sephadex LH-20; Sistema de solventes: CHCl ₃ /MeOH/ <i>n</i> -PrOH/H ₂ O (5:6:1:4,v/v/v/v); 1) Fr. 1-11, A-) Uv 254nm e B-) Anisaldeído/H ₂ SO ₄ 5.1.5 Análises por CLAE-DAD das frações 1-11	68
Figura 09. Cromatograma representando os perfis do fracionamento por CLAE-DAD Fr 01-04 (A-C) [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ [®] C18 , 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μm; Solvente A: H ₂ O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min ⁻¹ ; λ= 280 nm]	69
Figura 10. Cromatograma representando os perfis do fracionamento por CLAE-DAD Fr 05-07 (D-F) [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ [®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 mm; Solvente A: H ₂ O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 30 min; vazão de 1,00 mL min ⁻¹ ; λ= 280.....	70
Figura 11. Cromatograma representando os perfis do fracionamento por CLAE-DAD Fr 09-11 (G-I) [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ [®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 mm; Solvente A: H ₂ O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 30 min; vazão de 1,00 mL min ⁻¹ ; λ= 280.....	71
Figura 12. Cromatograma do fracionamento e purificação do Ex. AcOEt preparado a partir do cultivo em escala ampliada de <i>C. lunata</i> (arrumado	72

Figura 13. Cromatogramas A, B, C das substâncias C1-C3 isoladas por CLAE-DAD semipreparativo. [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ [®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H ₂ O + 0,1% TFA; Solvente B. ACN + 0,1 % TFA. Gradiente exploratório de 5-100 % de B em 30 min; vazão de 1,00 mL min ⁻¹ ; λ= 280 nm].	73
Figura 14. Cromatogramas D, E, F das substâncias C4-C7 isoladas por CLAE-DAD semipreparativo. [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ [®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H ₂ O + 0,1% TFA; Solvente B. ACN + 0,1 % TFA. Gradiente exploratório de 5-100 % de B em 30 min; vazão de 1,00 mL min ⁻¹ ; λ= 280 nm].	74
Figura 15. Espectros representativos no UV dos picos 1-6 dos Ex. AcOEt produzido pelo fungo <i>C. lunata</i> . isolado das folhas de <i>P. chiquitensis</i> ; λ = 280 nm].	75
Figura 16A. Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) dos compostos C1-C2 (HILARIO, et al., 2020)	80
Figura 16B. Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) dos compostos C1-C2 (HILARIO, et al., 2020)	81
Figura 17. ESI-QTOF-HRMS dos compostos C1-C2 (HILARIO, et al., 2020).	82
Figura 18. Espectro de <i>g</i> COSY dos compostos C1-C2	83
Figura 19. Mapa de contorno <i>g</i> HSQC dos compostos	83
Figura 20. Mapa de contorno <i>g</i> HMBC dos compostos	84
Figura 21. Estruturas químicas das substâncias C1 e C2 (A) e das triticonas E-F (B)	84
Figura 22. Espectro de IV da substância C3 (HILARIO, et al., 2020)	85
Figura 23. Principais correlações observadas nos experimentos <i>g</i> COSY e <i>g</i> HMBC para os compostos C3 e C4 (HILARIO, et al., 2020)	87
Figura 24. Principais correlações observadas no experimento NOESY para o composto C3 Adaptado de : (HILARIO, et al., 2020)	87
Figura 24A. Estruturas avaliadas por análise computacional (HILARIO, et al., 2020)	88
Figura 25. Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) das substâncias C3 e C4	90
Figura 26. Espectro de RMN de ¹³ C (150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) das substâncias C3 e C4 . (HILARIO, et al., 2020)	91
Figura 27. Espectro de 1H-1H <i>g</i> COSY (DMSO- <i>d</i> ₆)	92
Figura 28. Mapa de contorno <i>g</i> HSQC (DMSO- <i>d</i> ₆) das substâncias C3 e C4	92
Figura 29. Mapa de contorno <i>g</i> HMBC (DMSO- <i>d</i> ₆) das substâncias C3 e C4	93
Figura 30. Estruturas químicas das substâncias C3 e C4	93

Figura 31. Espectro de massas ESI-QTOF-HRMS (modo positivo) das substâncias C3 e C4 . (HILARIO, et al., 2020)	94
Figura 32. Espectro de RMN de NOESY (sinal irradiado em δ 4,10 ppm) das substâncias C3 e C4 (600 MHz, DMSO- d_6). (HILARIO, et al., 2020)	95
Figura 33. Espectro de RMN de NOESY (sinal irradiado em δ 5,67 ppm) das substâncias C3 e C4 (600 MHz, DMSO- d_6)	96
Figura 34. Espectro de RMN de NOESY (sinal irradiado em δ 4,48 ppm) das substâncias C3 e C4 (600 MHz, DMSO- d_6)	97
Figura 35. Proposta de fragmentação por ESI-MS de C5 (HILARIO et al., 2020)	99
Figura 36. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) da substância C5	102
Figura 37. Espectro de ^1H - ^1H $g\text{COSY}$ (600 MHz, DMSO- d_6) da substância C5	103
Figura 38. Mapa de contorno $g\text{HSQC}$ (600 MHz, DMSO- d_6) da substância C5	103
Figura 39. Mapa de contorno $g\text{HMBC}$ (600 MHz, DMSO- d_6) da substância C5	104
Figure 40. ESI-QTOF-HRMS (modo negativo) da substância C5	105
Figura 41. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) da substância C6	106
Figura 42. ESI-QTOF-HRMS (modo positivo) da substância C6	107
Figura 43. Espectro de ^1H - ^1H $g\text{COSY}$ (600 MHz, DMSO- d_6) da substância C6	108
Figura 44. Mapa de contorno $g\text{HSQC}$ (600 MHz, DMSO- d_6) da substância C6	108
Figura 45. Mapa de contorno $g\text{HMBC}$ (600 MHz, DMSO- d_6) da substância C6	109
Figura 46. Estrutura química das substâncias C5 e C6	109
Figura 48. Espectro de ^1H - ^1H $g\text{COSY}$ (300 MHz, CDCl_3) da substância C7	113
Figura 49. Mapa de contorno $g\text{HSQC}$ (300 MHz, CDCl_3) da substância C7	113
Figura 50. Mapa de contorno $g\text{HMBC}$ (300 MHz, CDCl_3) da substância C7	114
Figura 51. Estrutura química da substância C7	114
Figura 52. ESI-QTOF-HRMS da substância C7	115
Figura 53. Crescimento em PDA de <i>C. lunata</i> e metabólitos isolados	117
Figura 54. Cromatograma representando os perfis dos Ex. AcOEt em escala reduzida produzido pelo fungo <i>F. fujikuroi</i> isolado dos capítulos de <i>P. chiquitensis</i> : PDB, PDB + Mg^{2+} , PDB + Cu^{2+} [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ [®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 mm; Solvente A: H_2O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente exploratório de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min ⁻¹ ; λ = 270 nm]	121

- Figura 55.** Cromatograma representando os perfis dos Ex. AcOEt em escala reduzida produzido pelo fungo *F. fujikuroi* isolado dos capítulos de *P. chiquitensis*: PDB, PDB + SAHA, PDB + AZA e PDB + AA [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ[®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 mm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 270 nm] 122
- Figura 56.** Cromatograma representando os perfis do Ex. AcOEt PDB (controle) e sobreposição com os metabólitos isolados e quantificados por CLAE-DAD: A-) JBCS, 2017; B-) PDB; C-) PDB + ácido fusárico [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ[®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 mm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100% de B em 60 min; vazão de 1,0 mL min⁻¹; λ = 270 nm] 125
- Figura 57.** Cromatograma representando os perfis do Ex. AcOEt PDB (controle) e sobreposição com os metabólitos isolados e quantificados por CLAE-DAD: A-) PDB + AIA; B-) PDB + alcaloide; C-) PDB + terpestacina [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ[®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 mm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100% de B em 60 min; vazão de 1,0 mL min⁻¹; λ = 270 nm]..... 126
- Figura 58.** Curvas analíticas dos metabólitos A-B de *F. fujikuroi* 127
- Figura 59.** Curvas analíticas dos metabólitos C-D de *F. fujikuroi* 128
- Figura 60.** Análise por CCD das frações obtidas do fracionamento por Sephadex LH-20; Sistema de solventes: CHCl₃: AcOEt (7:3, v/v); A) iodo e B) Uv 254 nm..... 133
- Figura 61.** Cromatograma representando os perfis do fracionamento por Sephadex LH-20 frações A-C [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ[®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μ m; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 30 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 221 nm]..... 134
- Figura 62.** Cromatograma representando os perfis do fracionamento por Sephadex LH-20 Fr D-F [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ[®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μ m; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 30 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 221 nm] 135
- Figura 63.** Cromatograma representando os perfis do fracionamento por Sephadex LH-20 Frações G-I [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ[®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μ m; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 30 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 221 nm]..... 136
- Figura 64.** Cromatograma representando os perfis do fracionamento por Sephadex LH-20 Frações J-K [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ[®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μ m; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 30 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 221 nm]..... 137
- Figura 65.** Cromatograma do fracionamento e purificação do Ex. AcOEt preparado a partir do cultivo de *F. fujikuroi* **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 66.** Cromatogramas das substâncias **F1-F3** isoladas por CLAE-DAD semi-preparativo [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ[®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μ m; Solvente A. H₂O + 0,1% TFA; Solvente B. ACN + 0,1 % TFA]. 138

Figura 67. Cromatogramas das substâncias F4-F6 isoladas por CLAE-DAD semi-preparativo [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ [®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H ₂ O + 0,1% TFA; Solvente B. ACN + 0,1 % TFA].	140
Figura 68. Cromatogramas das substâncias F7-F9 isoladas por CLAE-DAD semi-preparativo [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ [®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H ₂ O + 0,1% TFA; Solvente B. ACN + 0,1 % TFA].	141
Figura 69. Cromatogramas das substâncias F10-F12 isoladas por CLAE-DAD semi-preparativo [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ [®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H ₂ O + 0,1% TFA; Solvente B. ACN + 0,1 % TFA].	142
Figura 70. Cromatogramas das substâncias F13-F15 isoladas por CLAE-DAD semi-preparativo [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ [®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H ₂ O + 0,1% TFA; Solvente B. ACN + 0,1 % TFA].	143
Figura 71. Cromatogramas das substâncias F16-F17 isoladas por CLAE-DAD semi-preparativo [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ [®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H ₂ O + 0,1% TFA; Solvente B. ACN + 0,1 % TFA].	144
Figura 72. Estrutura química dos compostos produzidos por <i>F. fujikuroi</i> (PDB + Mg ²⁺)	145
Figura 73A. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) da substância F3	147
Figura 73B. Espectro de RMN de <i>g</i> COSY (600 MHz, CD ₃ OD) da substância F3	148
Figura 73D. Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CD ₃ OD) da substância F3	149
Figura 73E. Estrutura química da substância F3	149
Figura 74A. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) da substância F4	151
Figura 74B. Espectro de RMN de COSY (600 MHz, CD ₃ OD) da substância F4	152
Figura 74C. Mapa de contorno <i>g</i> HMBC (600 MHz, CD ₃ OD) da substância F4	152
Figura 74D. Mapa de contorno <i>g</i> HMBC (600 MHz, CD ₃ OD) da substância F4	153
Figura 74E. Estrutura química da substância F4	153
Figura 75A. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) da substância F17	155
Figura 75B. Espectro de RMN de COSY (600 MHz, CD ₃ OD) da substância F17	156
Figura 75C. Mapa de contorno HSQC (600 MHz, CD ₃ OD) da substância F17	156
Figura 75D. Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CD ₃ OD) da substância S17	157
Figura 75E. Estrutura química da substância F17	157
Figura 76A. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) da substância F22	159
Figura 76B. Espectro de RMN de <i>g</i> COSY (600 MHz, CD ₃ OD) da substância F2	160

Figura 76C. Mapa de contorno <i>g</i> HSQC (CD ₃ OD) da substância <u>F2</u>	160
Figura 76D. Mapa de contorno <i>g</i> HMBC (CD ₃ OD) da substância <u>F2</u>	161
Figura 76E. Estrutura química da substância <u>F2</u>	161
Figura 77A. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) da substância <u>F6</u>	163
Figura 77B. Espectro de RMN de <i>g</i> COSY (600 MHz, CD ₃ OD) da substância <u>F6</u>	164
Figura 77C. Mapa de contorno <i>g</i> HSQC (600 MHz, CD ₃ OD) da substância <u>F6</u>	164
Figura 77D. Mapa de contorno <i>g</i> HMBC (600 MHz, CD ₃ OD) da substância <u>S6</u>	165
Figura 77E. Estrutura química da substância <u>F6</u>	165
Figura 78A. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) da substância <u>F11</u>	167
Figura 78B. Espectro de RMN de <i>g</i> COSY (600 MHz, CD ₃ OD) da substância <u>F11</u>	168
Figura 78C. Mapa de contorno <i>g</i> HSQC (CD ₃ OD) da substância <u>F11</u>	168
Figura 78D. Mapa de contorno <i>g</i> HMBC (CD ₃ OD) da substância <u>F11</u>	169
Figura 78E. Estrutura química da substância <u>F11</u>	169
Figura 79A. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) da substância <u>F12</u>	171
Figura 79B. Espectro de RMN de <i>g</i> COSY (600 MHz, CD ₃ OD) da substância <u>F12</u>	172
Figura 79C. Mapa de contorno <i>g</i> HSQC (CD ₃ OD) da substância <u>F12</u>	172
Figura 79D. Mapa de contorno <i>g</i> HMBC (CD ₃ OD) da substância <u>F12</u>	173
Figura 79E. Estrutura química da substância <u>F12</u>	173
Figura 80A. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) da substância <u>F15</u>	175
Figura 80B. Espectro de RMN de <i>g</i> COSY (600 MHz, CD ₃ OD) da substância <u>F15</u>	176
Figura 80C. Mapa de contorno <i>g</i> HSQC (CD ₃ OD) da substância <u>F15</u>	176
Figura 80D. Mapa de contorno <i>g</i> HMBC (CD ₃ OD) da substância <u>F15</u>	177
Figura 80E. Estrutura química da substância <u>F15</u>	177
Figura 81A. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) da substância <u>F18</u>	179
Figura 81B. Espectro de RMN de <i>g</i> COSY (600 MHz, CD ₃ OD) da substância <u>F18</u>	180
Figura 81C. Mapa de contorno <i>g</i> HSQC (CD ₃ OD) da substância <u>F18</u>	180
Figura 81D. Mapa de contorno <i>g</i> HMBC (CD ₃ OD) da substância <u>F18</u>	181

Figura 81E. Estrutura química da substância F18	181
Figura 82. Cromatograma do fracionamento e purificação da subfração 09I por métodos cromatográficos	186
Figura 83. Cromatograma por UCLAE-DAD representando os perfis do extrato AcOEt (05A) e Frações 05B-D obtidas do pré-fracionamento por CLV utilizando sílica como FE, [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 µm; Solvente A: H ₂ O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min ⁻¹ ; Max Plot λ 200-600 nm]	187
Figura 84. Cromatograma por UCLAE-DAD representando os perfis químicos das Frações 05E-I obtidas do pré-fracionamento por CLV utilizando a resina HP20ss como FE [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 µm; Solvente A: H ₂ O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min ⁻¹ ; Max Plot λ 200-600 nm]	188
Figura 85. Cromatograma por UCLAE-DAD das substâncias isoladas 48A-C obtidas por CLAE-DAD semi-preparativo [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 µm; Solvente A: H ₂ O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min ⁻¹ ; Max Plot λ 200-600 nm]	189
Figura 86. Avaliação da atividade Anti- <i>Trichomonas vaginalis</i>	190
Figura 87. Isolamento de 49A por CLAE-DAD no modo semi-preparativo	191
Figura 88. Cromatograma por UCLAE-DAD das frações 21 A-D obtidas por CLAE-DAD semi-preparativo [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 µm; Solvente A: H ₂ O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min ⁻¹ ; Max Plot λ 200-600 nm]	192
Figura 89. Espectro de RMN de ¹ H (500MHz) em CD ₃ OD da verruculogena isolada de <i>Aspergillus Arcoverdensis</i>	195
Figura 90. Espectro de RMN de ¹ H (500MHz) em CD ₃ OD da fumitremorgina A isolada de <i>Aspergillus Arcoverdensis</i>	196
Figura 91. Estruturas químicas: verruculogena e fumitremorgina A	198
Figura 92. RMN de ¹ H (500MHz) CDCl ₃ da viriditoxina isolada de <i>A. Arcoverdensis</i> ...	199
Figura 93. Cromatograma e espectros de UV e EM por UCLAE-DAD-MS da viriditoxina	200
Figura 94. Estrutura química da viriditoxina (49A)	200
Figura 95. Avaliação da atividade anti- <i>Trichomonas vaginalis</i> de 48C e 49A.....	201
Figura 96. Cromatograma do fracionamento e isolamento de 42A.....	203

- Figura 97.** Cromatograma por UCLAE-DAD do extrato AcOEt (07A) e das frações 07B-D obtidas do pré-fracionamento por CLV utilizando sílica como FE, [Coluna Analítica Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 µm; Solvente A: H₂O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min⁻¹; Max Plot λ 200-600 nm]..... 204
- Figura 98.** Cromatograma por UCLAE-DAD representando os perfis das Frações 07E-I obtidas do pré-fracionamento por CLV utilizando HP20ss como FE, [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 µm; Solvente A: H₂O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min⁻¹; Max Plot λ 200-600 nm.. 205
- Figura 99.** Espectro de RMN de ¹H (500MHz) in CD₃OD da fujikurina B isolada de *Cylindrocarpon pauciseptatum* 208
- Figura 100.** Espectro de RMN de ¹³C (125MHz) em CD₃OD da Fujikurina B isolada de *Cylindrocarpon pauciseptatum* 209
- Figura 101.** Perfil químico por UCLAE-DAD-ESI/MS: Fujikurina B 210
- Figura 102.** Estrutura química da fujikurina B 210
- Figura 103.** Cromatograma do fracionamento de 22A por métodos cromatográficos 211
- Figura 104.** Cromatograma por UCLAE-DAD representando os perfis químicos das frações 22A-D obtidas do pré-fracionamento por CLV utilizando sílica como FE, [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 µm; Solvente A: H₂O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min⁻¹; Max Plot λ 200-600 nm]..... 212
- Figura 105.** Cromatograma por UCLAE-DAD representando os perfis químicos das Frações 22E-I do pré-fracionamento por CLV- HP20ss como FE, [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 µm; Solvente A: H₂O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min⁻¹; Max Plot λ 200-600 nm] 213
- Figura 106.** Avaliação da atividade contra *Trichomonas vaginalis* de 22A-I..... 216
- Figura 108.** Cromatograma por UCLAE-DAD representando os perfis das Frações 73A-G obtidas por CLAE-DAD, [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 µm; Solvente A: H₂O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min⁻¹; Max Plot λ 200-600 nm] 219
- Figura 109.** Avaliação da atividade anti- *Trichomonas vaginalis* de 73A-G 220
- Figura 110.** Cromatograma e espectro por UCLAE-DAD-ESI/MS da substância isolada 73D por CLAE-DAD semipreparativo [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 µm; Solvente A: H₂O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min⁻¹; Max Plot λ 200-600 224
- Figura 111.** Cromatograma e espectro por UCLAE-DAD-ESI/MS da substância isolada 73E2 por CLAE-DAD semipreparativo [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 µm; Solvente A: H₂O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min⁻¹; Max Plot λ 200-600 225

Figura 112. Cromatograma por UCLAE-DAD-ESI/MS da substância isolada 73F2 por CLAE-DAD semipreparativo [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 µm; Solvente A: H ₂ O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min ⁻¹ ; Max Plot λ 200-600.....	226
Figura 113. Dado de RMN de ¹ H (500MHz) em CDCl ₃ da duclauxina isolada de <i>Talaromyces verruculosus</i>	227
Figura 114. Dado de RMN de ¹ H (500MHz) em CDCl ₃ da bacillisporina F isolada de <i>Talaromyces verruculosus</i>	228
Figura 115. Dado de RMN de ¹ H NMR (500MHz) em CDCl ₃ da 1- <i>epi</i> -bacillisporina F isolada de <i>T. verruculosi</i>	229
Figura 116. Espectro de DC de D-F.....	230
Figura 117. Estruturas químicas: Duclauxina, Bacillisporina F e 1- <i>epi</i> -Bacillisporina F.....	230
Figura 118. Efeito de diferentes concentrações de 73D em hifas de <i>C. albicans</i> SC5314 ...	231
Figura 119. Curvas Concentração-Resposta para determinação dos valores de IC ₅₀ dos compostos 73D, E2-F2 contra o biofilme de <i>C. albicans</i> SC5314.....	232
Figura 120. Atividade anti- <i>Trichomonas vaginalis</i> de 73D-F.....	233
Figura 122. Isolamento da 84D por métodos cromatográficos	234
Figura 123. Cromatogramas por UCLAE-DAD as frações 81A-H obtidas por CLAE-DAD semipreparativo, [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 µm; Solvente A: H ₂ O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min ⁻¹ ; Max Plot λ 200-600 nm]	235
Figura 124. Cromatogramas por UCLAE-DAD das frações 84A-D obtidas por CLAE-DAD semipreparativo, [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 µm; Solvente A: H ₂ O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min ⁻¹ ; Max Plot λ 200-600 nm]	237
Figura 125. Estrutura química da oxafenalenona (84D)	238
Figura 126. Cromatograma e espectros por UCLAE-DAD-ESI/MS da substância 84D isolada por CLAE-DAD semipreparativo [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 µm; Solvente A: H ₂ O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min ⁻¹ ; Max Plot λ 200-600	239
Figura 127. Espectro de RMN de ¹ H (500MHz) em CD ₃ OD da oxafenalenona SF 226 isolada de <i>Talaromyces verruculosus</i>	240

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Condições de cultivo em escala reduzida de <i>F. fujikuroi</i>	47
Tabela 02. Condições de cultivo em escala reduzida de <i>C. lunata</i>	47
Tabela 03. Cultivo em escala reduzida de <i>Curvularia lunata</i>	66
Tabela 04. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C das substâncias C1 e C2 e comparação com os respectivos valores publicados na literatura	79
Tabela 05. Dados RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) das substâncias C3-C4	86
Tabela 06. Erro absoluto calculado próton ($ \Delta\delta $) e Erro Médio Absoluto (MAE) para as estruturas candidatas C3 e C4 como calculadas com B3LYP/6-311+G (2d, p)//M06-2X/6-31+G(d, p) teoria de nível. (HILARIO, et al., 2020).....	88
Tabela 07. Erro absoluto calculado para carbono ($ \Delta\delta $) e Erro Médio Absoluto (MAE) para as estruturas candidatas C3 e C4 calculadas por B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p) teoria de nível. (HILARIO, et al., 2020)	89
Tabela 08. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) em DMSO- d_6 -mono e bidimensionais das substâncias C5 e C6	101
Tabela 09. Dados de RMN de ^1H (300 MHz) e ^{13}C (150 MHz) da substância C7 (CDCl_3) e comparação com dados da literatura (CDCl_3).....	111
Tabela 10. Atividade antimicrobiana do extrato AcOEt e compostos isolados	116
Tabela 11. Cultivo em escala reduzida de <i>F. fujikuroi</i>	119
Tabela 12. Identificação de substâncias presentes nos cromatogramas (CLAE-DAD) nos Cultivos em escala reduzida do extrato de <i>F. fujikuroi</i>	123
Tabela 13. Dados de calibração dos metabólitos de <i>F. fujikuroi</i>	129
Tabela 14. Recuperação exatidão	130
Tabela 15. Quantidade de metabólitos nos Exs AcOEt de <i>F. fujikuroi</i> *	131
Tabela 16. Frações obtidas do fracionamento por Sephadex LH20 e rendimento em mg	133
Tabela 17. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, em CD_3OD) mono e bidimensionais da substância F3	146
Tabela 18. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD) mono e bidimensionais substância F4	150
Tabela 19. Dados de RMN de ^1H (600MHz) e ^{13}C (CD_3OD) mono e bidimensionais da substância F17	154
Tabela 20. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (CD_3OD) –mono e bidimensionais da substância F2	158

Tabela 21. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (CD_3OD) –mono e bidimensionais da substância F6	162
Tabela 22. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (CD_3OD) –mono e bidimensionais da substância F11	166
Tabela 23. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (CD_3OD) –mono e bidimensionais da substância F12	170
Tabela 24. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (CD_3OD) –mono e bidimensionais da substância F15	174
Tabela 25. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (CD_3OD) –mono e bidimensionais da substância F18	178
Tabela 26. Atividade antimicrobiana dos Extratos AcOEt das condições avaliadas e compostos isolados do cultivo com Mg^{2+}	184
Tabela 27. RMN de ^1H (500 MHz) de 48A e 48C: comparação com a literatura ^a	194
Tabela 28. Dados de RMN de ^1H da viriditoxina e comparação com os da literatura	197
Tabela 29. Avaliação da atividade anti-TB de 07A-I.....	206
Tabela 30. Dados de RMN de ^1H da fujikurina B e comparação com os da literatura	207
Tabela 31 Avaliação da atividade anti-TB (22A-I)	214
Tabela 32. Avaliação da citotoxicidade (22A-I).....	215
Tabela 33. Avaliação da atividade antifúngica e antibiofilme de 22 A-I.....	217
Tabela 34. Atividades antifúngica e antibiofilme de 73A-G.....	220
Tabela 35. Dados de RMN de ^1H dos compostos 73D-F isolados de <i>T. verruculosus</i> e comparação com os da literatura	223
Tabela 36. Valores de IC_{50} de 73E2-F2 contra o biofilme de <i>C. albicans</i> SC5314	231
Tabela 37. Atividade antifúngica e antibiofilme de 81A-H	236

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$[\alpha]_D^{20}$	Rotação específica a 20 °C
λ	Comprimento de onda
δ	Deslocamento químico
1J	Acoplamento a uma ligação
2J	Acoplamento a duas ligações
3J	Acoplamento a três ligações
AA	Ácido anacárdico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AZA	5-azacitidina
<u>C</u>	Substância isoladas de <i>Curvularia lunata</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCD	Cromatografia em camada delgada
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLV	Cromatografia líquida à vácuo
<i>D</i>	Dupleto
<i>Dd</i>	Duplo dupleto
d.i.	Diâmetro interno
<i>Dt</i>	Duplo tripleto
Ex AcOEt	Extrato acetato de etila
ESI-MS	<i>Electrospray Ionisation Mass Spectrometry</i>
FIA-ESI-IT-MS	<i>Flow Injection Analysis - Electrospray Ionization - Ion Trap - Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas acoplada a um ion-trap com interface de Ionização por Electrospray e inserção direta da amostra)
<i>g</i> HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
<i>g</i> HMQC	<i>Heteronuclear multiple-quantum coherence</i>
IR	<i>Infrared</i> (Infravermelho)
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>M</i>	Multiplete
$[M - H]^-$	Molécula desprotonada
$[M + H]^+$	Molécula protonada
<i>m/z</i>	Relação massa carga
AMH	Ágar Müeller-Hinton
MOPS	ácido 3-[N-morfino] propanossulfônico
CMH	caldo Müeller-Hinton
<i>Q</i>	Quadruplete
NOESY	<i>Nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
NPDG-OU	<i>Natural Products Discovery Group, The University of Oklahoma</i>
Nt	não testado

DAD	Photodiode array detector (detector de arranjo de diodos)
PDA	<i>Potato dextrose agar</i> (ágar batata dextrose)
PDB	<i>Potato dextrose broth</i> (meio de batata dextrose)
PBS	tampão fosfato de sódio
PTFE	Politetrafluoroetileno (Teflon)
R_f	Distância percorrida substância / distância percorrida solvente, CCD.
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
S	Singleto
<u>S</u>	Substância isoladas de <i>Fusarium fujokuroi</i>
SAHA	Ácido hidroxâmico suberoilânilida
sL	Singleto largo
TTC	cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
SPE	Extração em fase sólida (<i>Solid phase extraction</i>)
sp.	Espécies
T	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	<i>Total correlation spectroscopy</i>
R_T	Tempo de retenção
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultravioleta
V	Volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
2.1 <i>Fusarium fujikuroi</i>	31
2.2 Gênero <i>Curvularia</i>	33
2.3 Análises quantitativas e validação analítica por CLAE-DAD	36
2.4 Diversificação metabólica e epigenética	38
3. OBJETIVOS	42
3.1 Objetivos gerais:	42
3.2 Objetivos específicos:	42
4. MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 ETAPA QUÍMICA E CULTIVO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS	44
4.1.1 Solventes	44
4.1.2 Meios para cultivo dos micro-organismos	44
4.1.3 Modificadores epigenéticos e íons metálicos	44
4.1.4 Esterilização dos materiais e meios de cultura	44
4.1.5 Manipulação dos micro-organismos	44
4.1.6 Isolamento dos fungos endofíticos	45
4.1.7 Identificação dos fungos endofíticos	45
4.1.8 Micro-organismos	45
4.1.9 Suspensão de hifas-esporos	46
4.1.10 Obtenção dos extratos AcOEt em escala reduzida	46
4.1.11 Obtenção do extrato AcOEt em escala ampliada:	47
4.1.12 Preparo das amostras para as análises por CLAE- DAD	47
4.1.13 Análises por CLAE- DAD no modo analítico	48
4.1.14 Fracionamento do extrato em coluna de permeação em gel	48
4.1.15 Isolamento dos metabólitos por CLAE-DAD no modo semi-preparativo ...	49
4.1.16 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	49
4.1.17 Análise dos metabólitos por ESI-QTOF-HRMS	50
4.1.18 Identificação das substâncias por Ressonância Magnética Nuclear	50
4.1.19 Outros equipamentos	51
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	52
4.2.1 Padronização da suspensão bacteriana	52
4.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima	53
4.2.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima	54

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	54
4.3.1 Padronização da suspensão fúngica.....	54
4.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima	55
4.3.3 Determinação da Concentração Fungicida Mínima	56
4.4 Avaliação da atividade tricomonicida	56
4.5 Avaliação da atividade antimicobacteriana	57
4.6 Determinação da citotoxicidade	57
4.7 Avaliação da atividade antibiofilme de <i>Cândida albicans</i>	58
5. RESULTADOS & DISCUSSÃO: <i>Curvularia lunata</i>	63
5.1 Cultivo em escala reduzida.....	63
5.2 Perfil cromatográfico por CLAE-DAD dos Exs AcOEt de <i>C. lunata</i>	67
5.3 Obtenção do extrato bruto em escala ampliada	67
5.4 Fracionamento por CLAE-DAD do Ex. AcOEt (PDB + Mg^{2+}).....	68
5.5 Isolamento das substâncias C1-C6 por CLAE-DAD	68
5.6 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	76
5.6.1 Substâncias C1 e C2	76
5.6.2 Substâncias C3 e C4	85
5.6.3 Substâncias C5 e C6	98
5.6.4 Substância C7	110
5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	116
6. RESULTADOS & DISCUSSÃO: <i>Fusarium fujikuroi</i>	118
6.1 Efeitos de moduladores epigenéticos e eliciadores químicos em <i>F. fujikuroi</i> : ...	118
6.2 Perfil cromatográfico por CLAE-DAD dos Exs AcOEt de <i>F. fujikuroi</i>	120
6.3 Análise quantitativa dos metabólitos de <i>F. fujikuroi</i> por CLAE-DAD.....	124
6.4 Obtenção do extrato bruto em escala ampliada (PDB + Mg^{2+}).....	132
6.5 Fracionamento do Ex. AcOEt por Sephadex LH-20	133
6.6 Análises por CLAE-DAD das frações A-K.....	133
6.7 Isolamento das substâncias F1-F18 por CLAE-DAD:.....	137
6.8 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL das substâncias isoladas de <i>F. fujikuroi</i>	145
6.8.1 Substância F3 :	145
6.8.2 Substância F4 :	150
6.8.3 Substância F17 :	154
6.8.4 Substância F2 :	158
6.8.5 Substância F6	162
6.8.6 Substância F11	166
6.8.7 Substância F12	170

6.8.8 Substância F15	174
6.8.9 Substância F18	178
6.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	182
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO: <i>Aspergillus arcuoverdensis</i>	185
7.1 Isolamento dos metabólitos ativos de <i>Aspergillus arcuoverdensis</i> :	185
7.2 Avaliação da atividade Anti- <i>Trichomonas vaginalis</i> :	190
7.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	193
7.3.1 151FH48A & 151FH48C:	193
7.3.2 151FH49A:	197
7.4 Avaliação da atividade Anti- <i>Trichomonas vaginalis</i> :	201
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO: <i>Cylindrocarpon pauciseptatum</i>	202
8.1 Isolamento dos compostos ativos de <i>Cylindrocarpon pauciseptatum</i> :	202
8.2 Avaliação da atividade antimicobacteriana:	206
8.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	207
8.3.1 151FH42A	207
9. RESULTADOS E DISCUSSÃO: <i>Talaromyces verruculosus</i>	211
9.1. Isolamento dos compostos ativos de <i>Talaromyces verruculosus</i> :	211
9.2 Avaliação da atividade antituberculose de 22A-I	214
9.3 Avaliação da citotoxicidade de 22A-I	215
9.4 Avaliação da atividade tricomonicida contra <i>T. vaginalis</i> de 22A-I	216
9.5 Avaliação da atividade antifúngica e antibiofilme de 22A-I	217
9.6 Isolamento dos metabólitos ativos da subfração 22I por CLAE-DAD	218
9.7 Atividades anti- <i>Trichomonas vaginalis</i> e antifúngica: 73A-G	220
9.8 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	221
9.8.1 151FH73D:	221
9.8.2 151FH73E2:	222
9.8.3 51FH73F2:	222
9.9 Configuração absoluta de 151FH73D-F2:	230
9.10 Avaliação da atividade antibiofilme de 73D, 73E2 3 73F2:	231
9.11 Avaliação da atividade anti- <i>Trichomonas vaginalis</i> dos compostos (73D-E2)	233
9.12 Isolamento dos metabólitos ativos da 81D por CLAE-DAD	234
9.13 Avaliação da atividade antifúngica das amostras 81A-H	236
9.15 Elucidação estrutural da 84D:	238
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS:	242
11. REFERÊNCIAS:	245

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Estima-se a existência de 1,5 a 5,1 milhões de espécies de fungos no planeta, entretanto menos de 10 % desses micro-organismos foram descobertos e descritos na literatura (AMEND et al., 2019). Em vista disto, pesquisadores de diversas áreas envolvidos no estudo com fungos ficaram intrigados com o seguinte questionamento: onde poderiam existir os demais fungos do planeta? Tal questionamento instigou cientistas nas décadas passadas dando início às pesquisas com plantas, na tentativa de descobrir um reservatório de organismos conhecidos por endofíticos (STROBEL, 2018, 2003).

Dentre as várias descrições para endofíticos na literatura, o termo pode ser definido por bactérias e fungos que colonizam os tecidos vegetais intercelulares e/ou intracelulares, e também compartimentos que existem no exterior da membrana plasmática, o apoplasto (NEWMAN; CRAGG, 2020a, 2020b; STIERLE; STROBEL, 1993).

Esses micro-organismos são considerados uma importante fonte de novas substâncias bioativas (NEWMAN; CRAGG, 2016, 2020b; STROBEL, 2018), sendo também capazes de produzir muitas classes de metabólitos, com várias aplicabilidades na medicina (NEWMAN; CRAGG, 2020a; STROBEL, 2018). Além disso, trabalhos de relevância destacam que aproximadamente 47% das substâncias isoladas de fungos são biologicamente ativas (BILLS; GLOER, 2016).

Estudos recentes envolvendo o isolamento de importantes substâncias provenientes de fungos endofíticos com atividade anticarcinogênica, têm chamado atenção evidenciando a potencialidade destes micro-organismos como fonte de metabólitos secundários anticarcinogênicos. Entre os exemplos de sucesso que merecem destaque estão o paclitaxel (Taxol®) identificado de *Taxomices* e de muitas espécies de *Pestalotiopsis*, assim como a camptotecina, podofilotoxina, vimblastina e vincristina. Todos estes agentes anticarcinogênicos têm como característica em comum o fato de serem produzidos em pequena quantidade pelos fungos endofíticos. Tem sido demonstrado que esses compostos não são artefatos, e que a identificação e controle dos genes envolvidos na expressão das proteínas responsáveis pela biossíntese dos metabólitos secundários podem contribuir significativamente aumentando sua produção pelos micro-organismos (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Os endofíticos podem ser manipulados geneticamente e físico-quimicamente, tanto para aumentar a produtividade de metabólitos desejados quanto para produzir novos análogos de metabólitos bioativos (KHARWAR et al., 2011; SHARMA et al., 2017).

Infelizmente, os métodos de fermentação usuais tais como modo estático, agitação orbital e os meios de cultura artificialmente definidos são opções limitadas para mimetizar o habitat natural de um fungo endofítico. Consequentemente, apenas um subconjunto dos genes responsáveis pela produção de metabólitos secundários são sempre expressos no ambiente artificial de laboratório, limitando assim o potencial desses micro-organismos (SHARMA et al., 2017; WILLIAMS et al., 2008).

O termo epigenética é definido como alterações herdáveis na expressão gênica que ocorrem sem que haja mudanças na sequência de DNA (CHERBLANC et al., 2013). O epigenoma representa uma promissora oportunidade para a obtenção de novos metabólitos secundários de fungos endofíticos e outros micro-organismos.

O uso de modificadores epigenéticos pode ser explorado como uma ferramenta efetiva para promover a expressão das vias biossintéticas silenciosas responsáveis por produzir metabólitos secundários com características únicas (AKONE et al., 2019; LIU et al., 2014). Além disso, tem sido descrito na literatura que oligossacarídeos, íons metálicos e solventes orgânicos como etanol e dimetilsulfóxido são capazes de atuar como eliciadores químicos, isto é, são capazes de induzir a produção e diversificação de metabólitos pelos fungos (AUCKLOO et al., 2017; MAFEZOLI et al., 2018a; PETTIT, 2011). Diferente dos modificadores químicos epigenéticos, os eliciadores químicos induzem a produção de metabólitos secundários por meio de mecanismos inespecíficos ou ainda não determinados (CHAGAS, 2014).

Há diferentes mecanismos epigenéticos envolvidos nas alterações do epigenoma, controlando a acessibilidade transcricional dos genes que codificam as enzimas biossintéticas. Dos mecanismos epigenéticos, os mais estudados e conhecidos são a metilação do DNA e as modificações das histonas (CICHEWICZ, 2010; FISCH et al., 2009). Assim, a presença de inibidores químicos epigenéticos das enzimas HDAC e DNA-metiltransferase pode promover o aumento potencial na produção e diversificação dos metabólitos produzidos pelos micro-organismos (CHUNG et al., 2013).

As vantagens em usar inibidores de pequenas moléculas que têm como alvo o epigenoma reside no fato dessa técnica apresentar baixo custo, sendo de fácil implantação na maioria dos laboratórios de pesquisa, não requerendo o conhecimento prévio sobre sequências genômicas dos fungos (CICHEWICZ, 2010). Adicionalmente, verificou-se que a incorporação de metais pesados nos meios de cultura melhora também a produção de metabólitos fúngicos (MAFEZOLI et al., 2018a; PARANAGAMA; WIJERATNE; GUNATILAKA, 2007).

Em vista do exposto, é necessária a execução de projetos que caracterizem o potencial da associação planta-endofítico e que busquem novas abordagens que sejam mais efetivas na produção de compostos ativos produzidos por fungos endofíticos.

Para tanto, usamos como critério de seleção as espécies de plantas da Serra do Cipó de Minas Gerais. Essa região é privilegiada para o estudo de fungos endofíticos, visto que, as espécies vegetais são endêmicas e de habitat extremo (altitude elevada, solo arenoso com poucos nutrientes, alta incidência de raios ultravioleta e temperaturas elevadas durante o dia e baixas durante a noite). Dessa forma, o estudo de micro-organismos associados às espécies vegetais existentes nessas regiões pode proporcionar metabólitos ativos únicos.

A espécie hospedeira escolhida para o desenvolvimento desse trabalho é *Paepalanthus chiquitensis* Herzog tem como sinonímia *Paepalanthus giganteus* Sano (TROVÓ; SANO, 2010), e representa uma das 1200 espécies pertencentes à Eriocaulaceae. *Paepalanthus* é o maior gênero dessa família, contendo cerca de 400 espécies, das quais mais de 300 existem apenas no Brasil (ANDRINO; COSTA; SANO, 2015); TROVÓ; SANO, 2016).

Portanto, considerando que a espécie é endêmica na região possuindo uma grande diversidade química e biológica, e que existem poucos estudos na literatura de micro-organismos associados com espécies da família, neste trabalho foram estudados os extratos acetato de etila dos fungos endofíticos isolados de *Paepalanthus chiquitensis* que previamente mostraram-se mais promissores, visando a produção de novos metabólitos secundários com atividade antimicrobiana.

Paralelamente, durante o estágio BEPE-FAPESP, Processo nº. 2018/01620-6, uma triagem química dos extratos acetato de etila de três cepas pertencentes ao Banco de Fungos da Universidade de Oklahoma (OU) denominadas *Aspergillus arcoverdensis*, *Cylindrocarpon pauciseptatum* e *Talaromyces verruculosus*, foram estudadas neste trabalho.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

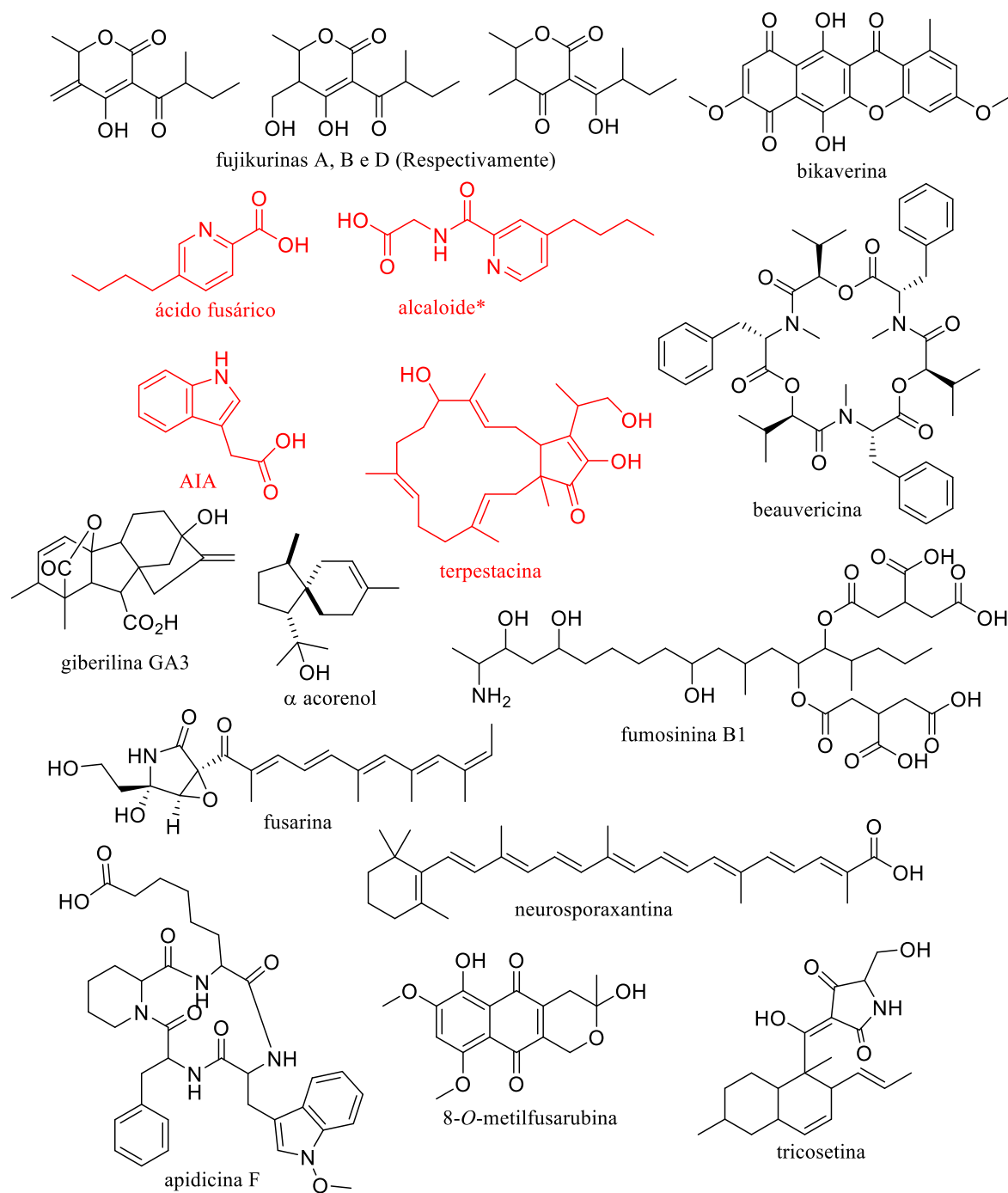
2.1 *Fusarium fujikuroi*

O *Fusarium fujikuroi* é um membro do complexo de espécies *Gibberella fujikuroi* (VON BARGEN et al., 2015a), sendo este fungo ascomiceto patogênico do arroz *F. fujikuroi* é um conhecido produtor de metabólitos secundários de várias classes de compostos (BROCK et al., 2013). O *F. fujikuroi* é causador de uma doença conhecida como bakanae devido à sua capacidade de produzir os hormônios das plantas, as giberelinas. O fungo é também conhecido por produzir micotoxinas nocivas (por exemplo, ácido fusárico e fusarinas) e pigmentos (por exemplo, bikaverina e fusarubinas) (ARNDT et al., 2015).

Outros metabólitos produzidos pelo *F. fujikuroi* estão emonisininas, ácido fusárico e moliniformina. Terpenóides incluem o fito-hormônio giberelina (GBA3) e vários dos seus derivados (BROCK et al., 2013).

Um estudo realizado por VON BARGEN et al., (2015) na qual são discutidos sequenciamento do genoma, revelou que o fungo tem o potencial genético de produzir muito mais metabólitos secundários do que os relatados. Por exemplo, os produtos do *cluster* do gene PKS19 críptico e silencioso que foram recentemente identificados, forneceram os compostos denominados de fujikurinas A – D (Figura 01).

No trabalho de Hilario e colaboradores (2017), foi realizada a triagem da atividade antimicrobiana de vinte e cinco fungos endofíticos isolados das partes aéreas de *Paepalanthus chiquitensis* (Eriocaulaceae) que também foram testadas contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Salmonella* sp., e a levedura *Cândida albicans* resistente ao fluconazol. O extrato acetato de etila produzido por *Fusarium fujikuroi* foi o mais bioativo, sendo escolhido para o estudo químico, proporcionando o isolamento do alcaloide inédito ácido acético-2-(4-butilpicolinamida), além do já mencionado ácido fusárico, do ácido indolacético e da terpestacina (HILARIO et al., 2017). Esta mesma cepa está sendo estudada no presente trabalho. Na Figura 01 está sendo apresentado os principais metabólitos isolados do meio de cultivo de *F. fujikuroi*.

Figura 01. Metabólitos secundários produzidos por *F. fujikuroi*

*ácido acético-2-(4-butilpicolinamida)

Substâncias isoladas por (Hilario et al., 2017)

2.2 GÊNERO *Curvularia*

O gênero *Curvularia* é composto por fungos filamentosos ascomicetos (Filo Ascomycota), Subfilo Ascomycotina, Classe Pezizocomycotina, Ordem Pleosporales e Família Pleosporaceae (KRIZSÁN et al., 2015). Este gênero apresenta mais de 80 espécies, sendo em sua maioria principalmente patógenas do solo ou planta. Recentemente, têm sido relatado por vários estudos que a dificuldade encontrada para a distinção entre as espécies pertencentes às espécies de *Curvularia* são decorrentes também da não correlação da identificação morfológica com a identificação molecular (MANAMGODA et al., 2014).

As espécies pertencentes do gênero *Curvularia* incluem espécies anteriormente classificadas como *Bipolaris* spp. (KRIZSÁN et al., 2015). O gênero inclui várias espécies patógenas de plantas e algumas outras patógenas emergentes oportunistas de humanos (MADRID et al., 2014).

Os conídios das espécies de *Curvularia* tendem a ser curtos (na maioria das espécies são menores de 100 µm) e geralmente retos ou curvos. Quando curvados, os conídios têm células intermédias excessivamente aumentadas, contribuindo para a sua curvatura. Diferentemente, os conídios das espécies de *Bipolaris* são geralmente maiores e mais septados que os de *Curvularia* (geralmente mais de 100 µm) e podem ser retos ou suavemente curvos (MANAMGODA; CAI; MCKENZIE, 2012).

Curvularia faz parte do grupo de fungos dematiáceos, também chamados de fungos negros. Formam um grupo de micro-organismos que possuem coloração escura, devido à presença do pigmento melanina na sua parede celular (DE HOFFMANN, 2011).

A melanina presente nos fungos dematiáceos é formada a partir do polímero diidroxinaftaleno (DNH), produzido no citoplasma e excretado na parede celular. A interação do polímero DNH com macromoléculas como lipídeos, proteínas e carboidratos resultam na formação do complexo melanínico, considerado um fator de virulência associado aos fungos do gênero *Bipolaris* (CALIGIORNE et al., 1999).

As espécies *C. australiensis*, *C. geniculata*, *C. hawaiiensis*, *C. lunata* e *C. spicifera* são as espécies mais frequentemente isoladas em amostras clínicas, causadoras de infecções locais, afetando principalmente o sistema respiratório, a córnea e a pele (KRIZSÁN et al., 2015).

Os fungos dematiáceos têm importância médica por serem causadores de feohifomicoses em humanos e animais (ANTONIASSI et al., 2010). A infecção pode ser cutânea, subcutânea e também sistêmica (REVANKAR et al., 2002). As apresentações clínicas mais comuns são a sinusite alérgica, ceratite, endoftalmite, onicomicose, peritonite peritoneal

associada à diálise, infecções de pulmão e pele, e, menos frequente, as infecções do sistema nervoso central (DA CUNHA et al., 2012).

Muito embora sejam responsáveis por infecções, fungos dematiáceos dentre os quais incluem as diversas espécies de *Curvularia*, são capazes também por produzir vasta gama de metabólitos secundários bioativos.

Entre outros compostos de relevância estão os macrolídeos curvulona A (I) e B (II) produzido por *Curvularia* sp., endofítico isolado da alga marinha *Gracilaria folifera* que apresentou atividade antimicrobiana contra *Microbotryum violaceum* e *Septoria tritici* (DAI et al., 2010). Outro trabalho bastante relevante na área de química de produtos naturais, publicado em 1967, apresentou um estudo comparativo com 13 espécies pertencentes ao gênero *Curvaria*, onde foram descritos o isolamento da curvulina (IV) e do ácido curvulínico (III) (COOMBE; JACOBS; WATSOW, 1968), metabólitos estes que desde então vêm sendo citados em uma série de outros manuscritos recentes.

Dentre os representantes da classe dos alcaloides isolados das espécies pertencentes ao gênero *Curvularia* estão o antimicrobiano curvulamina (V) e o seu derivado (VI) curindolizina que têm atividade antibacteriana e anti-inflamatória (HAN et al., 2016).

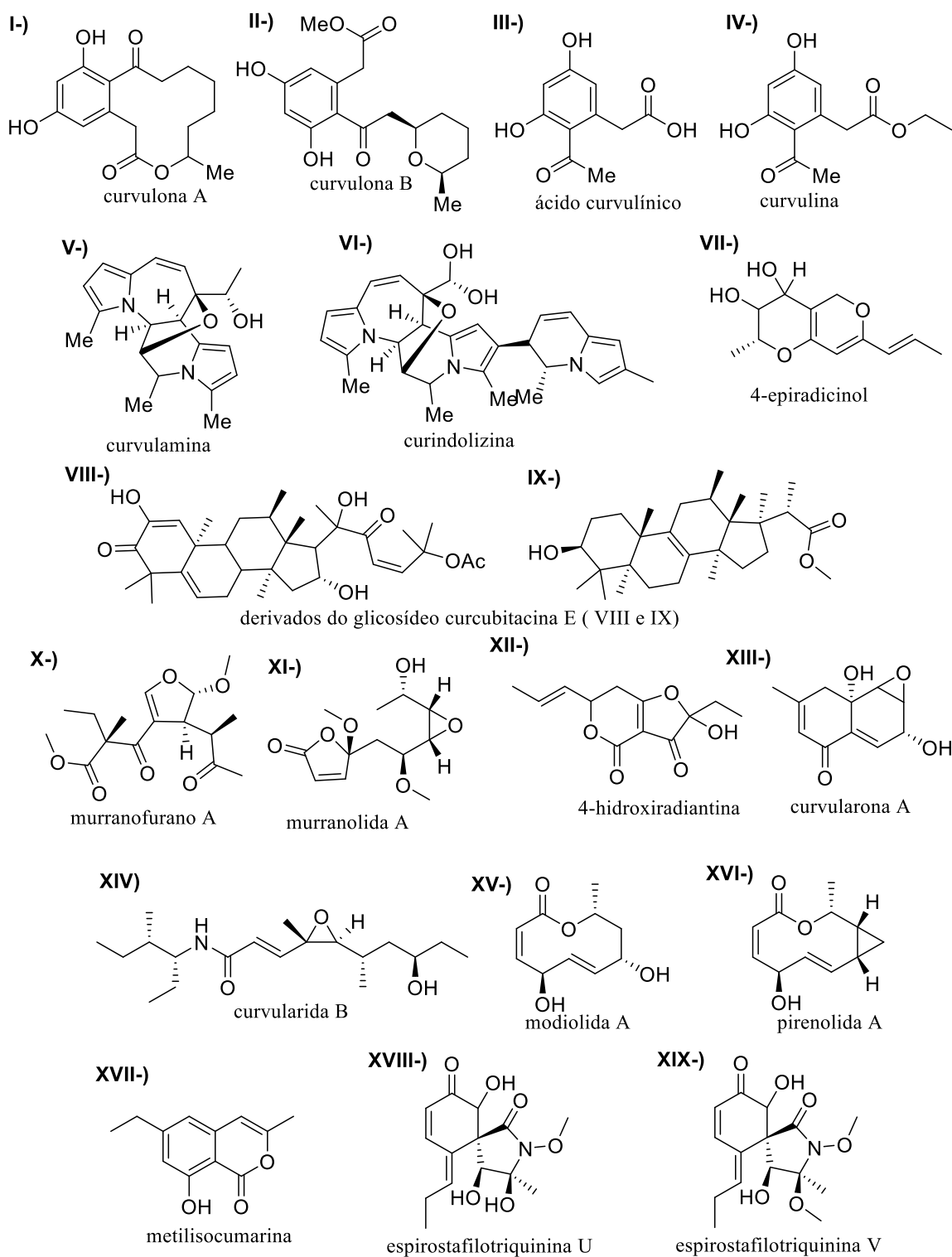
A descoberta de curvularida B (IX) a partir do cultivo de *Curvularia geniculata*, isolado de *Catunaregam tomentosa*, mostrou atividade contra a levedura *Cândida albicans* ATCC 90028, além disso não apresentou citotoxicidade (MARTINEZ-KLIMOVA; RODRÍGUEZ-PEÑA; SÁNCHEZ, 2017).

O glicosídeo curcubitacina E é um triterpeno tetracíclico isolado de espécies da família *Cucurbitaceae*, esse metabólito foi biotransformado por *Curvularia lunata* fornecendo os derivados (VIII e IX) que apresentam as atividades anti-inflamatória e antipirética, comparadas com a dos fármacos acetaminofeno/paracetamol e da indometacina (ABDELKHALEK et al., 2017).

Outros metabólitos de relevância isolados do fungo endofítico *Curvularia* sp., isolado das folhas de *Murraya koenigii*, cultivado em meio sólido (arroz) estão os seguintes compostos: murranolurano A (X), murranolida A (XI), pirenolida A (XVI), modiolida A (XV) e 8-hidroxi-6-metoxi-3-metilisocumarina (XVII). (MONDOL et al., 2017).

As estruturas químicas dos metabólitos secundários supramencionados estão sendo apresentados na Figura 02a.

Figura 02a. Metabólitos secundários produzidos por *Curvularia* spp.



2.3 ANÁLISES QUANTITATIVAS E VALIDAÇÃO ANALÍTICA POR CLAE-DAD

Podemos definir validação analítica como sendo a coleta e avaliação de dados gerados a partir de um determinado processo/método podendo ter aplicabilidade tanto comercial quanto científica. Desta forma, a validação analítica estabelece evidências experimentais de que processo/método/estudo forneça consistentemente resultados reprodutíveis, precisos e exatos e em conformidade com metodologias aceitas e estabelecidas (MCMILLAN, 2016).

Os conceitos e definições para validação analítica podem ser acessados em diferentes guias técnicos regulatórios e compêndios oficiais, dentre os quais podemos listar, por exemplo: as Farmacopéias Brasileira, Americana e Europeia; guias do FDA (Food and Drug Administration), da IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), e não menos importante os guias e diretrizes de agências regulatórias como por exemplo o ICH (International Conference on Harmonization) (PALLASTRELLI, 2013)

Mais especificamente no Brasil, a legislação vigente para a validação de métodos analíticos é a resolução da ANVISA RE nº 899, datada em 29 de maio de 2003 e a ANVISA RDC 27 de 17 de maio de 2012 responsáveis por estabelecer um conjunto de parâmetros de desempenho analítico. No caso de metodologia analítica não descrita em farmacopeias e formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados os parâmetros específicos: especificidade/seletividade, linearidade, exatidão, precisão, robustez, limites de quantificação (AGÊNCIA...2003; AGÊNCIA....2012).

O primeiro parâmetro de validação do método analítico é denominado de especificidade e pode ser definido como sendo a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes da amostra, dentre os quais estão inclusos os interferentes: adjuvantes, impurezas, produtos de degradação e até mesmo outra substância (AGÊNCIA...2012). Porém, o termo mais apropriado segundo a IUPAC no lugar de especificidade é seletividade, ou seja, métodos que respondem a vários compostos químicos que apresentam característica em comum e não a um único (seletivo) (RIBANI et al., 2004).

Segundo a ANVISA, a linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (AGÊNCIA..., 2003). A curva de calibração define a relação existente entre a resposta do detector com a concentração do analito presente na matriz da amostra (MCMILLAN, 2016). Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo 5 concentrações diferentes (AGÊNCIA..., 2003; AGENCIA...2012).

A precisão pode ser dita como sendo a avaliação da proximidade dos resultados obtidos para uma mesma amostra analisada em uma série de repetições. Podemos dividir a precisão em três diferentes categorias: repetibilidade (precisão intra-corrida); precisão intermediária (precisão inter-corrida) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial). (AGÊNCIA..., 2003). A repetibilidade é realizada a partir de análises seguidas, sob mesmas condições em um intervalo de tempo restrito. Enquanto que na precisão intermediária tem como objetivo o efeito de determinadas variações, como análises feitas em diferentes dias, analistas ou equipamentos. Por fim, a reprodutibilidade é referida quanto ao uso do procedimento analítico em laboratórios diferentes. Usualmente, expressa-se a precisão através do Desvio Padrão Relativo Percentual (DPR%), também chamada de Coeficiente de Variação (CV). Mais especificamente para métodos cromatográficos, a avaliação da precisão é feita por meio da injeção de padrões (LANÇAS, 2004). O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (AGÊNCIA..., 2003).

O Limite de Detecção (LD) corresponde a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, em um dado procedimento experimental. Já o Limite de Quantificação (LQ) corresponde a menor concentração de uma substância que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis (RIBANI et al., 2004).

A robustez do método é definida como sendo a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e proposital variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante o uso normal. Por meio deste parâmetro analítico é possível constatar a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, por exemplo: porcentagem e pH da fase móvel, temperatura, comprimento de onda, entre outros (AGÊNCIA..., 2003).

Em suma, os parâmetros analíticos supramencionados tem grande importância uma vez que demonstra a adequabilidade do método para a finalidade pretendida, além do mais assegura a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (AGÊNCIA..., 2003, AGÊNCIA..., 2012; IUPAC, 2002; CHAN, 2011; MCMILLAN, 2016).

Estes parâmetros analíticos foram utilizados neste trabalho, com a finalidade de verificar a variação dos metabólitos secundários produzidos nos extratos estudados com a adição de eliciadores/modificadores epigenéticos.

2.4 DIVERSIFICAÇÃO METABÓLICA E EPIGENÉTICA

Para verificação da eficácia na produção de metabólitos secundários produzidos por endofíticos, infelizmente, os métodos de fermentação usuais tais como modo estático, agitação em “*shaker*” (agitação orbital) e os meios de cultura artificialmente definidos não são opções satisfatórias para mimetizar o habitat natural de um fungo endofítico. Consequentemente, apenas um subconjunto dos genes responsáveis pela produção de metabólitos secundários será sempre expresso no ambiente artificial de laboratório, limitando assim o potencial desses organismos (WILLIAMS et al., 2008).

No entanto, o uso de modificadores epigenéticos pode ser explorado como uma ferramenta efetiva para promover a expressão das vias biossintéticas silenciosas responsáveis por produzir metabólitos secundários com características únicas (LIU et al., 2014). Além disso, tem sido descrito na literatura que oligossacarídeos, metais pesados e solventes orgânicos como etanol e dimetilsulfóxido atuam como eliciadores químicos, ou seja, são capazes de induzir a produção de metabólitos pelos fungos (PETTIT, 2011). Diferente dos modificadores químicos e epigenéticos, os eliciadores químicos induzem a produção de metabólitos secundários por meio de mecanismos inespecíficos ou ainda não determinados (CHAGAS, 2014).

Assim, considerando que existem mecanismos epigenéticos envolvidos na alteração do epigenoma, que controla a acessibilidade transcricional dos genes que codificam as enzimas biossintéticas (CICHEWICZ, 2010; FISCH et al., 2009), o tratamento dos fungos com inibidores químicos das enzimas HDAC e DNA metiltransferase pode promover potencialmente o aumento na produção e diversificação dos metabólitos produzidos por eles (CHUNG, 2013).

As vantagens em usar inibidores de pequenas moléculas que têm como alvo o epigenoma reside no fato dessa técnica ser de baixo custo, sendo de fácil implantação na maioria dos laboratórios de pesquisa não requerendo o conhecimento prévio sobre sequências genômicas dos fungos (CICHEWICZ, 2010). Verificou-se recentemente que a incorporação de metais pesados nos meios de cultura melhora a produção de metabólitos fúngicos (PARANAGAMA et al., 2007).

A incorporação de Cu^{2+} no meio PDB aumentou tanto a produção de metabólitos produzidos por *Anteaglonium* sp. FL0768 quanto afetou drasticamente sua via biossintética, resultando na produção de dímeros de pentacetídeos: palmarumicina CP₄ (**I**), palmarumicina CP₁ (**II**), além do novo metabólito palmarumicina CE₄ (**III**) (MAFEZOLI et al., 2018).

O fungo de solo *Doratomyces microsporus* teve a produção de compostos antimicrobianos induzidos pela incorporação de ácido valpróico durante o seu cultivo em meio líquido, dentre os metabólitos estão o ácido indol-3-acético (AIA) (IV), ácido indol-3-carboxílico (V) e o ácido fenilacético (VI) (ZUTZ et al., 2016).

Quatro novos ácidos tetrâmeros denominados de cladosinas H e I (VII), e J e K (VIII) foram isolados do fungo *Cladosporium sphaerospermum* L3P3 do cultivo com o inibidor de histona desacetilase SAHA (ZHANG et al., 2018).

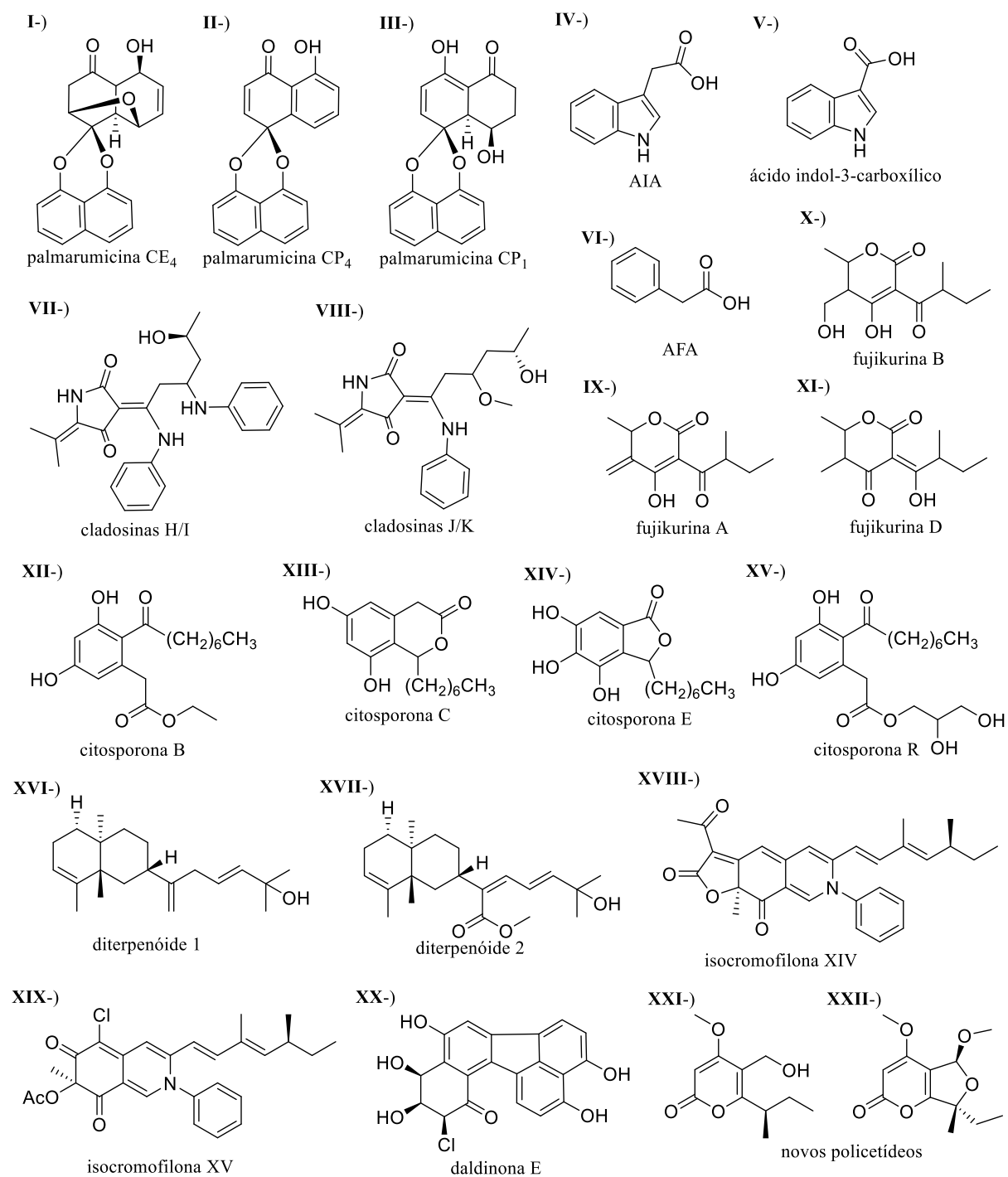
Um estudo com o *Fusarium fujikuroi* envolvendo a ativação do *cluster* de genes que codificam as enzimas conhecidas como policetídeo sintases (PKS19) possibilitou induzir a produção das fujikurinas B-D (IX-XI), novos metabólitos de origem natural (VON BARGEN et al., 2015).

O cultivo do fungo marinho *Leucostoma persoonii* com modificadores epigenéticos resultou em maior produção das conhecidas citosporonas B (XII), C (XIII) e (XIV), bem como a indução resultou na produção da citosporona R (XV), que exibiu promissora atividade contra o *Plasmodium falciparum*, baixa citotoxicidade na linhagem celular A549, e um índice terapêutico de inibição de 90% (BEAU et al., 2012)

A suplementação de um inibidor da DNA metiltransferase, 5-azacitidina (5-AZA), ao meio de cultura de *Penicillium funiculosum*, alterou dramaticamente os perfis metabólicos, fornecendo o isolamento de dois novos diterpenóides prenileudesmano 1 (XVI) e 2 (XVII) (LIU et al., 2014).

O modificador químico epigenético ácido hidroxâmico suberoylanilida (SAHA) induziu a produção de metabólitos por *Penicillium mallochii* CCH01, um fungo isolado do intestino de *Ectropis oblique*, fornecendo o isolamento de dois novos derivados da esclerotioramina: isocromofilona XIV (XVIII) e isocromofilona XV (XIX) (ZHANG et al., 2019). Além disso, a presença de SAHA no cultivo do fungo *Daldinia* sp. induziu a produção de um novo policetídeo pentacíclico clorado, daldinona E (XX) com potente atividade antioxidante (DU; KING; CICHEWICZ, 2014). Dois novos derivados policetídeos α -pirona (XXI e XXII) foram produzidos por *Penicillium herquei* pela adição de 5-AZA na cultura fúngica (GUO et al., 2018), Figura 02b.

Figura 02b. Metabólitos secundários induzidos pela adição de modificadores epigenéticos e eliciadores químicos no cultivo de diversos fungos filamentosos.



OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais:

Realizar estudos químicos e antimicrobianos de metabólitos secundários produzidos por *Fusarium fujikuroi* e *Curvularia lunata*, isolados de *Paepalanthus chiquitensis* (Eriocaulaceae).

Realizar estudos químicos e bioguiados para obter metabólitos secundários biologicamente ativos contra agentes infecciosos e resistentes produzidos por *Aspergillus arcoverdensis*, *Cylindrocarpon pauciseptatum* e *Talaromyces verruculosus* (BEPE/FAPESP).

3.2 Objetivos específicos:

- Realizar os cultivos dos fungos endofíticos em escala reduzida em diferentes condições para investigar os efeitos de modificadores epigenéticos e eliciadores químicos;
- Registrar os perfis cromatográficos dos extratos preparados a partir do cultivo dos fungos endofíticos por CLAE-DAD e CCD;
- Selecionar as condições promissoras para cultivo dos endofíticos em escala ampliada;
- Fracionar os extratos dos fungos endofíticos selecionados até a purificação dos metabólitos secundários por diferentes técnicas cromatográficas;
- Elucidar estruturas químicas por técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C , UV, IV e EM.
- Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica;
- Desenvolver estudos analíticos de quantificação e validação por CLAE-DAD de metabólitos isolados do extrato produzido por *F. fujikuroi*;
- Desenvolver estudos químicos bioguiados para obter bioativos de extratos de fungos de solos (NPDG-OU);
- Preparar e submeter amostras para a biblioteca de PNs de fungos de solo (NPDG-OU);
- Avaliação da atividade antimicobacteriana frente ao *M. tuberculosis* de amostras de fungos de solos (NPDG-OU);
- Determinar citotoxicidade em células HepG2 e J774A de amostras de fungos de solos (NPDG-OU);
- Avaliar a atividade tricomonocida contra *T. vaginalis* de amostras de fungos de solos (NPDG-OU);
- Avaliar a atividade antibiofilme de *C. albicans* de amostras de fungos de solos (NPDG-OU);

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ETAPA QUÍMICA E CULTIVO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

4.1.1 Solventes

- ✓ Solventes PA: Acetona, AcOEt, CHCl₃, DCM, MeOH, *n*-BuOH e *n*-PrOH e (Synthlab[®]); DMSO (Sigma-Aldrich[®]) e EtOH.
- ✓ Solventes CLAE: ACN (Tedia[®]), MeOH (Baker[®]), água purificada em sistema Milli Q (Millipore[®]) e TFA (Mallinckrodt[®]);
- ✓ Solventes deuterados. CDCl₃ (Sigma-Aldrich[®]) e DMSO-*d*₆ (CIL[®]).

4.1.2 Meios para cultivo dos micro-organismos

- ✓ PDA (meio de cultivo sólido) - Potato dextrose agar (Acumedia[®]). 39 g/L de água. [fécula de batata (4 g); dextrose (20 g), ágar (15 g)];
- ✓ PDB (meio de cultivo líquido) - Potato dextrose broth (Acumedia[®]). 24 g/L de água. [fécula de batata (4 g); dextrose (20 g)].
- ✓ Cereal Cherrios[®]

4.1.3 Modificadores epigenéticos e íons metálicos

Os efeitos na produção e diversificação dos metabólitos foram realizados na presença e ausência de modificados químicos epigenéticos. ácido hidroxâmico suberoilânilda (SAHA) e 5- azacitidina (AZA) (Sigma-Aldrich[®]); de íons metálicos Cu²⁺ e Mg²⁺ e do composto fenólico conhecido como ácido anacárdico (AA) (Sigma-Aldrich[®]).

4.1.4 Esterilização dos materiais e meios de cultura

A esterilização de todo material utilizado na manipulação dos micro-organismos, e também dos meios de culturas preparados, foi realizada em autoclave do fabricante Quimis[®], sendo mantidos a temperatura de 121 °C por 15 minutos, Pressão 1 atm.

4.1.5 Manipulação dos micro-organismos

O procedimento de esterilização do material vegetal e manipulação dos micro-organismos foram realizados em capela de vazão laminar (Pachame[®]) PA 310-Serie 172-99.

4.1.6 Isolamento dos fungos endofíticos

Esta etapa do trabalho foi realizada em colaboração com Dra. Vanessa Mara Chapla, orientada da Profa. Dra. Angela Regina de Araújo do Instituto de Química da Unesp (2013-2014). As cepas foram depositadas no Nucleo de Bioensaio, Biossíntesis e ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) em Araraquara.

As cepas foram isoladas das partes aéreas da espécie vegetal *Paepalanthus chiquitensis* (Eriocaulaceae). A espécie foi coletada na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil (19°14'58.92"S, 43°31'04.40"W), em fevereiro de 2012 e identificada pelo Prof. Dr. Paulo Takeo Sano. O voucher (Sano 3402 F) foi depositado no Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo-SP, Brasil. O cadastro desta espécie no SISGEN é A95E3A3.

Metodologia para cultivo e isolamento dos endofíticos de *P. chiquitensis* estão descritos em HILARIO et al., (2017).

4.1.7 Identificação dos fungos endofíticos

Os fungos endofíticos estudados neste trabalho, foram enviados para a Genotyping incubadora, localizada em Botucatu. A identificação foi realizada através 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™).

Os dados obtidos das sequências ITS de cada uma das cepas foram comparadas com a pesquisa BLAST permitindo a identificação das respectivas espécies e os dados obtidos depositados no GenBank. O resultado da pesquisa apresentou 99,0 % de similaridade com o *Fusarium fujikuroi* (número de acesso KJ000432.1 (HILARIO, et al., 2017) e Cadastro no SISGEN nº AA2B67C), enquanto que para a outra cepa estudada neste trabalho apresentou alta porcentagem de similaridade com a espécie *Curvularia lunata* (número de acesso HQ631009.1, e Cadastro no SISGEN nº AFE19D8)

4.1.8 Micro-organismos

Foi realizado o cultivo com modificadores químicos epigenéticos de *Fusarium fujikuroi*, isolado dos capítulos, e *Curvularia lunata*, isolado das folhas de *P. chiquitensis* (Eriocaulaceae).

Durante o estágio BEPE (realizado na University of Oklahoma, Norman-Oklahoma, Estados Unidos) foram estudados os fungos *Aspergillus arcuoverdensis* (190D5) UT6927 RBM-2, *Cylindrocarpon pauciseptatum* (171G12) MO6345 TV8-3 e *Talaromyces verruculosus* (163A4) FL00859 RBM-3.

4.1.9 Suspensão de hifas-esporos

Os fungos *F. Fujikuroi* e *C. lunata* foram repicados em placa de Petri contendo PDA e incubados a 28 °C, por um período de 7-14 dias. Os micélios foram raspados e colocados em tubo tipo Falcon contendo água estéril. As suspensões foram agitadas em vortex e filtradas em separador celular (100 µm). Em seguida, as suspensões foram padronizadas em espectrofotômetro ($OD_{600} = 0.40-0.60$). A suspensão de hifas e esporos foi utilizada no cultivo em meio líquido PDB (itens 4.1.10 e 4.1.11).

4.1.10 Obtenção dos extratos AcOEt em escala reduzida

A suspensão de hifas e esporos preparada como descrita no item 4.1.9 foi utilizada para inocular os fungos *F. Fujikuroi* e *C. lunata* em meio de cultivo líquido PDB. Ambos esses fungos foram cultivados em escala reduzida e avaliados em sete diferentes condições de cultivo, em triplicata. O volume de 750 µL da suspensão de hifas-esporos ($OD_{600} = 0,3$) foi adicionado em cada um dos 21 frascos Erlenmeyer (500 mL) preparados com volumes de PDB apresentados nas Tabelas 01 e 02. As seguintes condições foram avaliadas: PDB (controle), PDB +SAHA; PDB +AZA PDB + Cu^{2+} ; PDB + Mg^{2+} , PDB +AA (Tabela 01 e 02). Os frascos foram mantidos em modo estático a 25 °C.

No 32º dia foi verificado a ausência de glicose (negativo) para o ensaio contendo Mg^{2+} no cultivo de *F. Fujikuroi*, e no 34º dia para o ensaio contendo Cu^{2+} no cultivo de *C. lunata*. Então, para ambos esses dois fungos, o meio líquido aquoso foi separado dos micélios por filtração a vácuo e submetido à partição líquido/líquido com AcOEt (3x 1/3 volume filtrado). As fases orgânicas foram reunidas e lavadas com água destilada (3x 1/5 volume filtrado), sendo posteriormente secas com Na_2SO_4 anidro, o qual foi removido por filtração simples. O solvente orgânico foi removido em evaporador rotativo para obtenção dos extratos brutos. Os perfis cromatográficos dos extratos foram registrados.

Tabela 01. Condições de cultivo em escala reduzida de *F. fujikuroi*

Código	Ensaio	[] final PDB (μm)	Vol. PDB (mL)	[] Sol. estoque (mM)	Vol. Sol. estoque (μL)
FH-51_1	PDB	-	200	-	-
FH-51_2	CuSO ₄	250	200	100	750
FH-51_3	MgSO ₄	250	200	100	750
FH-51_4	SAHA	100	200	5	1000
FH-51_5	AZA	100	200	50	600
FH-51_6	AA	100	200	2	2000

* Soluções estoque de SAHA e AA em 100 % DMSO

Tabela 02. Condições de cultivo em escala reduzida de *C. lunata*.

Código	Ensaio	[] final PDB (μm)	Vol. PDB (mL)	[] Sol. estoque (mM)	Vol. Sol. estoque (μL)
FH-80_1	PDB	-	300	-	-
FH-80_2	CuSO ₄	250	300	100	750
FH-80_3	MgSO ₄	250	300	100	750
FH-80_4	SAHA	2.5	300	5	150
FH-80_5	AZA	100	300	50	600
FH-80_6	AA	4	300	2	600

* Soluções estoque de SAHA e AA em 100 % DMSO

4.1.11 Obtenção do extrato AcOEt em escala ampliada:

Para a obtenção do Ex. AcOEt em escala ampliada, a suspensão de hifas e esporos preparada como descrita no item 4.1.9 foi utilizada para inocular os fungos *F. Fujikuroi* e *C. lunata* em meio de cultivo líquido PDB + Mg²⁺. O volume total de 6,3 L de meio de cultivo líquido PDB (21 frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 300 mL de PDB + Mg²⁺). Os frascos foram mantidos em modo estático, sob temperatura controlada (25 °C) por 35 dias. Ao final do período de fermentação o meio de cultivo foi filtrado. O filtrado aquoso foi submetido a partição líquido/líquido com AcOEt (3x volume total do filtrado), que após a evaporação do solvente resultou nos extratos AcOEt.

4.1.12 Preparo das amostras para as análises por CLAE- DAD

Todos os extratos injetados no cromatógrafo foram previamente submetidos ao *clean-up* em cartucho de SPE de 1000 mg/6 mL (55 μm , Strata-X, Phenomenex®) preenchidos com sílica de fase reversa C18, (1 mg da amostra para 10 mg de fase estacionária sílica C18). Os

cartuchos foram primeiramente ativados com MeOH (100%, 2,0 mL, 3 vezes), 20 mg de cada um dos extratos foi solubilizado em 2,0 mL de MeOH a 100 %. Após isso, o extrato foi aplicado no cartucho de SPE e eluído com a mesma fase móvel utilizadas nas etapas de ativação do cartucho e solubilização da amostra. O eluato foi levado a capela até a secura, solubilizado na concentração de 5 mg/mL (MeOH:H₂O, 8:2, v/v) e, por fim, filtrados em membrana de PTFE de 0,22 µm (Millex[®], Merck Millipore), coletados em vials de 1,5 mL e analisados por CLAE-DAD.

4.1.13 Análises por CLAE- DAD no modo analítico

Para registrar os cromatogramas dos extratos e das substâncias isoladas dos fungos de *P. chiquitensis*, utilizou-se cromatógrafo líquido de alta eficiência (analítico, gradiente quaternário) modelo PU-2089 (Jasco[®]), acoplado a detector de arranjo de fotodiodos com faixa de varredura de 195-650 nm e intervalo mínimo de 1 nm, modelo MD-2010 (Jasco[®]). Para a aquisição e processamento dos dados cromatográficos foi utilizado o software EZChrom Elite Client/Server versão 3.1.7 (Chromatec[®]). As análises foram realizadas utilizando uma coluna de fase reversa RP18, modelo Luna 2 (Phenomenex[®]) de 250 x 4,6 mm d.i., apresentando partículas com tamanho médio de 5 µm protegida com uma coluna de guarda (Phenomenex[®]) de 4 x 3 mm d.i. As substâncias foram injetadas por de um injetor Rheodyne[®] 7125 com um loop de 100 µL, volume de injeção de 20 µl, vazão de 1,0 mL/min.

4.1.14 Fracionamento do extrato em coluna de permeação em gel

O extrato AcOEt produzido a partir do cultivo do fungo endofítico de *F. fujikuroi* foi fracionado em coluna de vidro com 85 cm de altura por 2,5 cm de diâmetro interno, empacotada com Sephadex[®] LH-20 (Pharmacia), acoplada à bomba peristáltica P1 18-1110-91 e a um coletor automático de frações RedFrac (Pharmacia[®]), com capacidade para 95 frações. Para o fracionamento, o extrato (1,5 g) foi solubilizado em MeOH (7,0 mL), e em seguida centrifugado por 10 minutos a 3500 rpm (centrífuga CELM[®], COMBATE), separando-se o precipitado do sobrenadante. O sobrenadante foi filtrado com algodão e aplicado na coluna de sephadex LH-20, eluída com MeOH a 100%. Foram obtidas 49 frações de aproximadamente 10 mL cada, as quais foram submetidas a triagem química por CCD.

O extrato AcOEt preparado a partir do cultivo de *Fusarium fujikuroi* foi fracionado em coluna de vidro com 60 cm de altura por 1,0 cm de diâmetro interno, empacotada com Sephadex[®] LH-20 (Pharmacia), eluída com os sistemas de solventes Hex-DCM (1:4, v/v),

DCM-Acetona (3:4, v/v), DCM-Acetona (1:4, v/v), DCM-MeOH (1:1, v/v), e finalmente MeOH, sendo utilizado 50,0 mL de cada um destes sistemas de solventes. Foram coletadas 59 frações (10 mL) cada, analisadas por CCD e foram reunidas em conformidade com os seus perfis químicos sendo reunidas em 11 outras frações.

4.1.15 Isolamento dos metabólitos secundários por CLAE- DAD no modo semi-preparativo

As análises preparativas das para purificação das substâncias isoladas dos fungos endofíticos isolados de *P. chuquitensis* por CLAE- DAD foram executadas usando cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo PU-2086 (Jasco®), acoplado a detector de arranjo de fotodiodos, monitorado nos comprimentos de onda $\lambda=270$ nm, $\lambda=280$ nm, $\lambda=305$ nm e $\lambda=366$ nm, modelo MD-2010 (Jasco®). Para a aquisição e processamento dos dados cromatográficos foi utilizado o software Chromnav (Jasco®). As análises foram realizadas utilizando uma coluna de fase reversa RP18, modelo Luna 2 (Phenomenex®) de 250 x 10,0 mm d.i., apresentando partículas com tamanho médio de 10 μ m protegida com uma coluna de guarda (Phenomenex®) de 4,0 x 3,0 mm d.i. A fração estudada foi injetada através de um injetor Rheodyne® 7125, com um loop de 500 μ L, volume de injeção de 100-500 μ l.

Para análises preparativas para purificação das substâncias isoladas dos fungos de solos estudadas em Oklohama foram realizadas por CLAE-DAD modelo Waters 1525 (Waters®), sistema binário de solventes, acoplado a DAD. As análises foram realizadas utilizando uma coluna de fase reversa RP18, modelo Kinetex ou Biphenyl (Phenomenex®) de 250 x 10,0 mm d.i., apresentando partículas com tamanho médio de 10 μ m protegida com uma coluna de guarda (Phenomenex®) de 4,0 x 3,0 mm d.i. A fração estudada foi injetada através de um injetor Rheodyne® com um loop de 500 μ L, volume de injeção de 75-400 μ l, vazão 4,0 mL/min.

4.1.16 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para a análise dos extratos, das frações obtidas do fracionamento por sephadex LH-20 e da purificação por coluna cromatográfica de sílica e CLAE-DAD preparativo, foram utilizadas placas de sílica gel, UV 254, marca Sorbent Technologies®, base de alumínio 200 μ m. Cada fração obtida das etapas de fracionamento e purificação foi aplicada em uma placa de sílica de 20x5cm. As placas foram eluídas com sistema de solvente quaternário (CHCl₃: MeOH: *n*-PrOH. H₂O, 5:6:1:4 v/v/v/v) e com sistema de solvente binário (CHCl₃.AcOEt 1/1 v/v). Após a eluição, reveladas primeiro com a luz UV, e em seguida foi borrifada uma solução

de anisaldeído/H₂SO₄. As placas foram posteriormente levadas a uma estufa a 130 °C. Após revelação das cromatoplasas, as frações que apresentaram mesmos R_fs (fatores de retenção) e coloração foram reunidas e transferidas para o mesmo frasco. As reuniões foram concentradas até a secura em evaporador rotativo, as massas medidas em balança analítica e armazenadas ao abrigo da luz e umidade.

4.1.17 Análise dos metabólitos por ESI-QTOF-HRMS e UCLAE-DAD/ESI-MS

Para espectrometria em alta resolução, os espectros das substâncias purificadas foram obtidos em um espectrômetro de massas Q-TOF MaXis Impact™, equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em vazão contínuo a 3 µL/min. As amostras foram solubilizadas em MeOH:H₂O (1:1, v/v) e foram ionizadas por electrospray (ESI).

Análise das substâncias isoladas dos extratos produzidos por fungos de solos estudadas em Oklohama foram realizadas em um equipamento de UPCLAE-DAD-ESI/MS Shimadzu 2020. As amostras foram solubilizadas em MeOH 100% e foram ionizadas por electrospray (ESI). Foi utilizada uma coluna Kinetex (Phenomenex®) C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 µm; Solvente A: H₂O + 0,05% ácido fórmico; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min⁻¹; Max Plot λ 200-600 nm.

4.1.18 Identificação das substâncias por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN unidimensional: ¹H, ¹³C e NOESY-1D, e bidimensional: ¹H-¹H-COSY, HSQC, HMBC, 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).

Para as análises de RMN das substâncias isoladas dos extratos preparados a partir dos cultivos de fungos de solos estudadas em Oklahoma foi utilizado o espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Varian VNMR (400 e 500 MHz para ¹H; 100 e 125 MHz para ¹³C)

Os solventes utilizados na dissolução das amostras para obtenção dos espectros foram CDCl₃, CD₃OD, ou DMSO-*d*₆ (CIL®) com pureza ≥ 99,9%, usando como referência o sinal do resíduo do solvente não-deuterado. O software Mestre Nova foi utilizado na aquisição dos deslocamentos químicos e interpretação de cada espectro.

4.1.19 POP-NPDG: pré-fracionamento de Exs. AcOEt da escala ampliada em Cheerios:

A metodologia empregada para preparar os extratos brutos AcOEt dos cultivos em escala ampliada assim como as etapas cromatográficas para realização dos pre-fracionamentos foram realizados em conformidade com o procedimento operacional padrão (POP) do Natural Products Discovery Group (NPDG) da University of Oklahoma: Pré-fracionamento de extratos AcOEt preparados em escala ampliada em Cheerios. A metodologia para preparo e envio de amostras para os diferentes bioensaios e encaminhamento para acerto na biblioteca de produtos naturais foram realizadas conforme descrito nesse mesmo POP do NPDG.

Para a obtenção do Ex. AcOEt em escala ampliada, foram utilizados três sacos de cultivo de fungos em meio sólido Cherrios. Os sacos foram mantidos em modo estático, sob temperatura controlada (25 °C) por 3 semanas. Ao final do período de fermentação o meio sólido contendo a massa micelar foi transferido para béquer de 2L, seguido da adição de AcOEt até a completa imersão do conteúdo transferido ao frasco.

A extração dos metabolitos foi realizada mecanicamente com um batedor adaptado, após homogeneizado foi mantido em repouso por 2 horas. Após esse período, foi realizada a filtração à vácuo através de um tecido de algodão. O solvente removido em evaporador rotativo.

Os extratos AcOEt preparados após a remoção do solvente em evaporador rotativo, foram submetidos à cromatografia líquida à vácuo (CLV), em coluna de sílica gel, eluída com hexano/DCM (1:1, v/v), DCM (100%), DCM/MeOH (10:1, v/v) e MeOH (100%), fornecendo quatro subfrações de 1,0 L cada. A subfração DCM/MeOH; 10:1, v/v resultante do pré-fracionamento por CLV em sílica gel foi novamente submetida à CLV, utilizando como FE a resina Diaion HP20ss, eluída com MeOH:H₂O: 30%, 50%, 70%, 90%, 100% MeOH e DCM:MeOH (1:1, v/v), resultando em seis subfrações, 1L cada. Os solventes foram removidos em evaporador rotativo.

As amostras submetidas para bioensaio e biblioteca de PNs do NPDG foram preparadas em DMSO (100%) na concentração de 5,0 mg/ml para Ex. AcOEt e 2,0 mg/ml para as frações obtidas em ambas etapas cromatográficas.

4.1.20 Outros equipamentos

- ✓ Balanças analíticas (Marte®, AL 200; Shimatzu, AY220) com capacidade para 200g e precisão de 0,001g.
- ✓ Evaporador rotativo (Heidolph®, Laborota 4001. efficient) equipado com bomba à vácuo (Heidolph®, Rotavac valve control).

4.1.21 Análise de dicroísmo circular

As análises de dicroísmo circular eletrônico foram realizadas em dois espectropolarímetros, Jasco® J-815 e Jasco® J-810, usando uma cela de quartzo com comprimento do caminho óptico de 1,0 mm.

4.1.22 Análises infravermelho (IV)

Os espectros por espectroscopia de absorção vibracional na região do infravermelho (IV) foram obtidos no espectrômetro Thermo Scientific Nicolet iS5 FT-IR 17.

4.1.23 Análises de rotação óptica

Os espectros de dispersão de rotação óptica foram realizados em um Polarímetro digital a JASCO Dip-370 (Jasco®) usando MeOH como solvente.

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada no Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos da FCFAr. Unesp Araraquara sob a co-orientação da Profa. Dra. Taís Maria Bauab.

4.2.1 Padronização da suspensão bacteriana

Foram preparados cultivos das bactérias *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella* sp (ATCC 19196) 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 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.

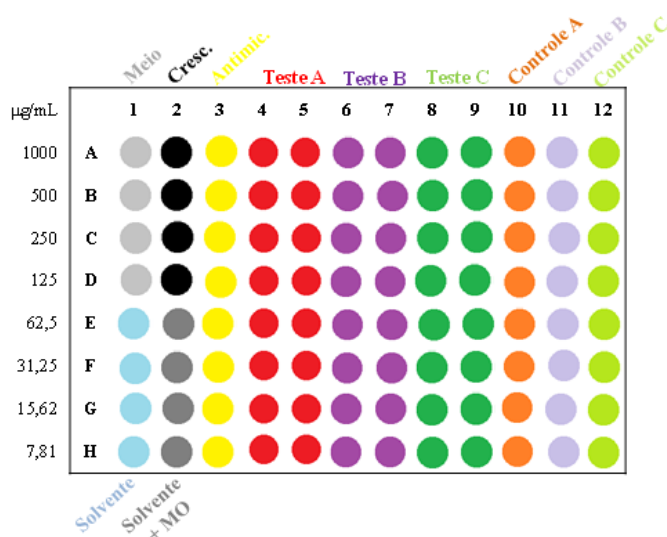
4.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A avaliação da atividade antibacteriana e a determinação das CIM dos extratos produzidos por fungos endofíticos isolados de *P. chiquitensis* (Eriocaulaceae) foram realizados segundo a técnica de microdiluição em caldo em conformidade com a norma M7-A6 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006).

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 adicionada 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 (Figura 03).

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

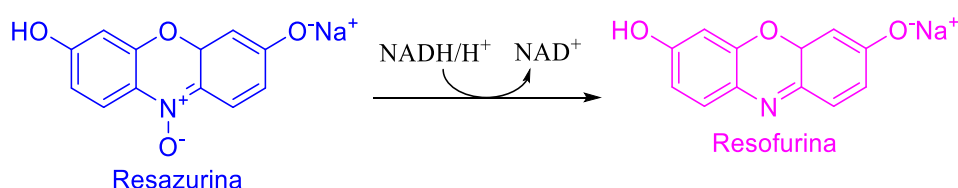
Figura 03. Microplaca para a determinação da CIM.



Fonte: Adaptado de (BONIFÁCIO, 2014).

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 (Figura 04). 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.

Figura 04. Reação de redução da resazurina



Fonte: Adaptada de FUKUSHIMA et al., 2003

4.2.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Antes da adição de resazurina, uma alíquota de cada poço foi semeada em placas de Petri contendo agar Müeller-Hinton (MHA), e incubadas durante 24 h em estufa a 37°C.

Após esse período foram observados os pontos onde ocorreu crescimento microbiano, determinando assim a concentração bactericida mínima (CBM) que é definida como a menor concentração testada onde não ocorreu crescimento microbiano após a realização da subcultura. Os testes foram realizados em triplicata.

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

4.3.1 Padronização da suspensão fúngica

Foi preparado cultivo de levedura *C. albicans* (ATCC 10231) em caldo sabouraud dextrose (caldo SD), e incubados a 37 °C por 48 horas. Após o tempo de incubação, foi feita a padronização da levedura. O cultivo foi transferido para tampão fosfato (PBS) 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 (PBS) seguido de diluição 1.20

em meio RPMI (Meio Roswell Park Memorial Institute) 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.

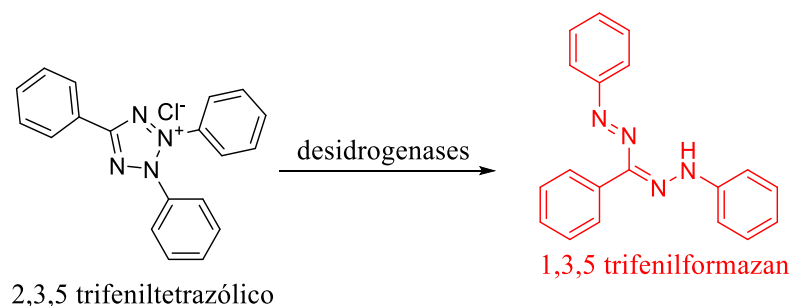
4.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A avaliação da atividade antifúngica e a determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos extratos produzidos por fungos endofíticos isolados de *P. chiquitensis* (Eriocaulaceae) foi realizada segundo a técnica de microdiluição em caldo em conformidade com a norma M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 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 μ L de RPMI 1640, ajustado a pH 7,0 com tampão MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanossulfônico) e esterilizado por membrana filtrante. Seguido de 100 μ L de cada um dos extratos, diluídos em DMSO 20% (dimetilsulfóxido) na concentração inicial de 2000 μ g/mL. Após a homogeneização, uma alíquota de 100 μ L da mistura foi retirada e transferida para o próximo poço, realizando diluições seriadas na razão 1.1 sucessivamente da coluna A até H (Figura 03). Um volume de 100 μ L da suspensão de levedura padronizada foi adicionada em cada poço completando um volume final de 200 μ L, a concentração final no poço A foi de 1000 μ g/mL e no poço H foi de 7,8 μ g/mL.

Como controle positivo foi utilizado solução de anfotericina B na concentração de 16 μ g/mL e fluconazol a 128 μ g/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 μ L cloreto de 2,3,5- trifeniltetrazólio (TTC) (0,02 g/mL) como indicador (Figura 05). 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. Os poços que apresentaram atividade permanecem incolores, enquanto os poços nos quais houve crescimento microbiano se coram de vermelho (Duarte et al., 2005). Os testes foram realizados em triplicata.

Figura 05. Reação de redução do TTC

Fonte: Adaptada de DUARTE et al, 2005.

4.3.3 Determinação da Concentração Fungicida Mínima

Antes da adição do indicador TTC nas microplacas, uma alíquota de cada poço foi semeada em placas de Petri contendo agar Sabouraud dextrose (SDA), e incubadas durante 48 horas em estufa a 37 °C. Após esse período foi observado os pontos onde ocorreram crescimento microbiano, determinando assim a concentração fungicida mínima (CFM) que é definida como a menor concentração testada na qual não ocorreu crescimento microbiano após a realização da subcultura. Os testes foram realizados em triplicata.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRICOMONICIDA

A avaliação da atividade tricomonicida frente a cepa do parasita *T. vaginalis* foi realizado pelo Dr. Jarrod King, pesquisador associado, University of Oklahoma do NPDG (Norman, Oklahoma-Estados Unidos), a metodologia utilizada para avaliação da atividade contra o parasita foi publicada recentemente, sendo o responsável pelo desenvolvimento e padronização do método descrito a seguir (KING et al., 2019).

Foi utilizada a cepa de *T. vaginalis* Donne (ATCC PRA-98) em meio de cultivo TYI-S33 a 37 °C em tubos fechados com tampa de rosca. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços em condições empregando níveis reduzidos de oxigênio e níveis aumentados de dióxido de carbono (microaerófilo). As amostras foram solubilizadas em DMSO. Os controles utilizados nos testes foram DMSO 1% (solvente) e o metronidazol 25 µM (positivo).

Para a padronização do inóculo foi utilizado o volume de 250 µL de *T. vaginalis* da criopreservação (N₂ líquido com 5% DMSO), após o descongelamento a 37 °C, foi transferido para um tubo com tampa de rosca contendo 12 mL de meio TYI-S-33. Após 24 h de incubação a 37 °C foi realizada a contagem dos parasitas vivos ($>3,0 \times 10^7$ células por tubo). A cultura

padronizada foi então diluída em TYI-S33 para obtenção de 40,000 células do parasita em 100 μ L de meio por poço.

As microplacas foram incubadas por 17 h a 37 °C, após isso foi pipetado o volume de 100 μ L de uma solução de fixação (PBS, 1% de glutaraldeído, 5 μ M de iodeto de propídio, e 5 μ M de laranja de acridina), em todos os poços. Foram então agitadas em agitador orbital por 30 s para viabilizar o desprendimento celular, e incubadas por 3 h a 37 °C para viabilização da fixação e coloração feitos no teste.

Por fim, foram quantitativamente fotografadas usando a Perkin Elmer Operetta e analisados usando o pacote de software Harmony 3.5.1.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA

A avaliação da atividade antimicobacteriana e a determinação da citotoxicidade (tópico 4.7) foram realizados pelo Prof. Dr. Kyle Rohde, da University of Central Florida (FELIX et al., 2017).

Foi utilizada cepa de *Mycobacterium tuberculosis* (CDC 1551), incluindo outra derivada de CDC 1551 com plasmídeos repórter. As amostras foram testadas em microplacas de 384 poços, foi usado um dispensador automático para a preparação das microplacas, (Precision robotic liquid handler-BioTeK). Foram investigados os controles: DMSO a 0,5%, rifampicina 160 μ M e isoniazida 10 μ M. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Os inóculos foram diluídos em caldo Middlebrook 7H9 OADC, e a densidade óptica ajustada em 0,05 a 600 nm. A leitura foi realizada por fluorescência GFP (proteína verde fluorescente) após incubação de 6 dias a 37 °C em leitor microplacas Synergy H4 (BioTek).

Para a avaliação da atividade antimicobacteriana frente ao *M. tuberculosis* latente / dormiente foi usado o modelo MSD (*Multi-Stress Dormancy*). A leitura por fluorescência foi realizada após 7 dias em leitor de microplacas Synergy™ H4 (BioTeK). Nos ensaios luminescentes com Mtb-Lux a DO₆₀₀ foi ajustada em 0,01, e foram utilizadas microplacas de cultivo na cor branca, demais ensaios microplacas pretas

4.6 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Foram utilizadas as linhagens celulares de macrófagos J774A e HepG2 (células de carcinoma hepatocelular humano). O meio de cultivo utilizado foi o DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecc, Gibco), o meio foi suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Atlanta Biologicals). Foram utilizadas microplacas de cultivo celular na cor preta.

No dia anterior à realização do ensaio, foram semeadas na concentração de $2,5 \times 10^4$ células/poço, foi utilizado o volume 30 μL . Após 6 h de incubação, as amostras (20 $\mu\text{g/mL}$) e os controles (0,5% DMSO e 2% Triton X) foram adicionados nos poços das microplacas.

A avaliação da viabilidade celular foi determinada após 24h, pela redução da resazurina. A cor azul é indicativa de ausência de multiplicação/inviabilidade celular, enquanto que a cor rosa evidencia viabilidade celular.

A fluorescência foi medida após incubação de 4 h a 37 °C por excitação a 560 nm e emissão a 590 nm usando um leitor de microplacas SynergyTM H4 (BioTeK). As amostras que tiveram 20% de inibição nas células J774 foram consideradas citotóxicas e eliminadas do estudo.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE *Cândida albicans*

A avaliação da atividade antibiofilme de *C. albicans* foi realizada pela Profa. Dra. Jianlan Yoi, University of Oklahoma- NPDG (Norman, Oklahoma-Estados Unidos).

Foi utilizada a cepa de *Cândida albicans* SC5314, cedida por A. Dongari-Bagtzoglou (University of Connecticut Health Center). Os meios de cultivos utilizados para realização dos testes foram o caldo de infusão cérebro-coração (meio BHI, Becton Dickinson) e o RPMI-1640 [RPMI-1640 (Sigma), MOPS 0,17 M (0,17 M Sigma)].

A metodologia utilizada no teste foi realizada em conformidade com as diretrizes do CLSI, norma M27-A3 (2008), com as seguintes modificações: a levedura *C. albicans* SC5314 foi cultivada em meio BHI (Becton Dickinson) a 35 °C durante 12 h. As células foram sedimentadas por centrifugação, lavadas com PBS (solução salina tamponada com fosfato, pH 7,4), e ressuspensas em meio RPMI-1640.

As amostras foram preparadas em DMSO na concentração de 2,0 μM , o meio RPMI-1640 foi utilizado nos ensaios. Alíquotas de 100 μL da suspensão padronizada do inóculo de levedura ($2,5 \times 10^3$ células por mL^{-1}) foram adicionadas ao meio de cultivo contendo as amostras diluídas ou DMSO (até 2%, v/v) antes de serem transferidas para placas de 96 poços. Após 48 h de incubação a 37 °C, a viabilidade celular foi medida pela leitura da DO (densidade óptica) em espectrofotômetro a 600 nm. As microplacas foram lavadas com PBS, sendo então realizada novamente a leitura da DO_{600} para avaliar a inibição do biofilme.

Os valores de IC_{50} foram calculadas utilizando a ferramenta de cálculo desenvolvida pela AAT Bioquest (<<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>>). O corante colorimétrico

utilizado foi o reagente branco de calco-flúor e as imagens foram obtidas no Operetta High-Content Imaging System. A e a leitura foi realizada por fluorescência.

4.8. METODOLOGIA COMPUTACIONAL: configuração absoluta em C-3' de **C3** e **C4**

Para elucidar a configuração absoluta no estereocentro C-3' das substâncias **C3** e **C4** um estudo computacional foi realizado em colaboração com grupo de pesquisa do Prof. Nailton Monteiro do Nascimento Junior (IQ- UNESP, Araraquara) e seu orientado de mestrado Victor de Souza Batista.

Para elucidar a estereoquímica absoluta do núcleo de carbono C-3', foi realizado um estudo computacional seguindo as diretrizes propostas por Willoughby, Jansma e Hoyer, com pequenas modificações (WILLOUGHBY et al., 2004). Inicialmente, todas as estruturas candidatas, **3A**, **3B**, **4A** e **4B** (Figura 24a), foram construídas no software Discovery Studio Visualizer (v.17.0.2.1076) com todos os átomos de hidrogênio explicitados (DASSAULT SYSTÈMES, 2017). Os confôrmeros para todas essas estruturas foram gerados usando o módulo gerador de confôrmeros do software CSD Mercury (MACRAE, et al., 2008). Nesta etapa, o software foi solicitado a minimizar a geometria de entrada antes de iniciar a busca conformacional.

O número máximo de conformações foi definido como 200, com no máximo duas torções incomuns, amostrando um máximo de 1.000.000 de conformações por molécula e com uma probabilidade mínima de rotâmero de 0,05%. Os confôrmeros gerados foram inspecionados para garantir que todos os rotâmeros e invertâmeros lógicos previstos fossem encontrados, bem como para remover estruturas redundantes. Esta etapa resultou em 16 confôrmeros para as estruturas **3A** e **4A** e 20 confôrmeros para as estruturas **3B** e **4B**.

Todos os confôrmeros foram então submetidos à otimização geométrica e cálculo de frequências vibracionais no Gaussian 09, utilizando o funcional M06-2X com o conjunto de bases 6-31+G (d,p) (GAUSSIAN 09, 2013; ZHAO, et al., 2008; PETERSSON et al., 1988; PETERSSON et al., 1991). Uma grade de integração refinada foi solicitada durante os cálculos. Os efeitos da solvatação do DMSO foram considerados através do formalismo do modelo contínuo polarizado de equações integrais (IEFPCM) e as cavidades do soluto foram construídas usando raios padrão de átomos unidos (UA0) (MENNUCCI, et al., 1997a; 1997b; TOMASI et al., 1999; BARONE, et al., 1997). As geometrias de saída das estruturas avaliadas foram inspecionadas para remover conformações redundantes. A etapa resultou em 12 conformações para a estrutura **3A**, 8 para as estruturas **3B**, **4A** e **4B**.

Após a remoção das geometrias redundantes, os tensores atômicos de blindagem química (σ) ^1H e ^{13}C dos confôrmeros otimizados foram computados no nível do funcional da densidade usando o formalismo do orbital atômico *gauge-independent* (GIAO) (LONDON, 1937; DITCHFIELD, 1974; WOLINSKI, 1990). Para tal, se utilizaram o funcional B3LYP BECKE, 1993; LEE, et al., 1988; VOSKO, et al., 1980; STEPHENS, et al., 1994) e o conjunto de bases 6-311+G (2d,p) e uma grade de integração refinada foi solicitada novamente. A solvatação do DMSO foi abordada através do IEFPCM novamente, mas nesta etapa as cavidades do solvente do substrato foram modeladas por raios atômicos individuais (BONDI, 1964). Os tensores de blindagem de RMN computados foram convertidos em desvios químicos de referenciados, conforme definido na Equação 1, onde σ é o tensor de blindagem de RMN computado e δ é o deslocamento químico referenciado (LODEWYK, et al., 2011).

$$\delta = \frac{\sigma - \text{intercepto}}{\text{inclinação}}$$

O *intercept* e o *slope* são fatores de escalonamento empiricamente derivados que são aplicáveis ao nível de teoria usado neste trabalho e são independentes da estrutura em estudo. Os valores desses parâmetros, resumidos na Tabela abaixo, foram obtidos a partir da referência para o método e criados pela abordagem proposta por Lodewyk, Siebert e Tantillo (2011).

Fatores de escalonamento para o nível de teoria B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p).

	Fatores de escalonamento	
	<i>Slop</i>	<i>Intercept</i>
^1H	-1,0767	31,9477
^{13}C	-1,0522	181,2412

Em seguida, os fatores de ponderação de Boltzmann para cada confôrmero são determinados a 25 ° C usando as energias livres obtidas nos cálculos de frequência vibracional, resultando em uma contribuição da fração molar para cada confôrmero, χ_i . Essas contribuições são então aplicadas aos tensores de blindagem de RMN computados para cada núcleo de cada confôrmero individualmente para fornecer os tensores de blindagem de RMN médios ponderados por Boltzmann para cada um. As contribuições da fração molar são calculadas

conforme definido pela Equação 2, onde $-E^*i$ é a diferença de energia livre do i -ésimo indicador menos do que o mais estável, R é a constante universal dos gases e T é a temperatura em Kelvin.

$$x_i = \frac{e^{\left(\frac{-E^*i}{RT}\right)}}{\sum_{i=1}^n e^{\left(\frac{-E^*i}{RT}\right)}}$$

Os desvios químicos experimentais (δ_i^{exp}) e computados (δ_i^{comp}) são então comparados entre si através do erro absoluto ($|\Delta\delta|$) e do erro absoluto médio (MAE) entre eles, conforme descrito nas Equações 3 e 4, nas quais N é o número de desvios químicos únicos usados na comparação. Os tensores de blindagem para núcleos quimicamente equivalentes são ponderados antes da análise do MAE, neste caso, isso era necessário para os hidrogênios metálicos de C-9 e C-10. Os desvios químicos calculados para as estruturas denominadas **A** e **B** também foram ponderadas pela média delas, dado que as moléculas **C3** e **C4** existem em uma mistura diastereoisomérica.

$$|\Delta\delta| = \sum_{i=1}^N |\delta_i^{comp} - \delta_i^{exp}|$$

$$MAE = |\Delta\delta_{avg}| = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |\delta_i^{comp} - \delta_i^{exp}|$$

RESULTADOS & DISCUSSÃO

5. RESULTADOS & DISCUSSÃO: *Curvularia lunata*

5.1 Cultivo em escala reduzida

A espécie *C. lunata* foi avaliada em seis diferentes condições de cultivo com o objetivo de investigar os efeitos na produção de metabólitos secundários pelo fungo na presença de modificadores epigenéticos (ZAHA, AZA e AA) e de eliciadores químicos (íons de cobre e magnésio).

Conforme descrito em material e métodos, a extração dos metabólitos foi realizada após ter sido verificado no meio de cultivo a ausência de glicose. Após 32 dias de inoculação do fungo em caldo, foi visto nos ensaios contendo SAHA e AA a ausência de glicose no meio de cultivo, e então foi realizada a extração dos metabólitos de todos os ensaios.

As massas e os rendimentos obtidos para os extratos AcOEt são apresentados na Tabela 03. Os melhores rendimentos foram vistos para os ensaios contendo PDB + Cu²⁺ e PDB + Mg²⁺, o rendimento relativo quando comparado com o controle PDB foi de 143 e 151%, respectivamente.

Considerando a natureza de média polaridade das substâncias extraídas pela partição com AcOEt, os extratos obtidos em escala reduzida foram submetidos às análises por CLAE-DAD. Os perfis cromatográficos dos extratos foram comparados possibilitando verificar a reprodutibilidade e a variabilidade dos metabólitos produzidos pelo endofítico estudado *C. lunata* (Figuras 06 e 07).

Os ensaios foram realizados em triplicata: inoculação, extração e registro dos cromatogramas por CLAE-DAD.

Figura 06. Cromatograma representando os perfis dos Ex. AcOEt produzidos em escala reduzida pelo fungo *C. lunata* isolado das folhas de *P. chiquitensis*: PDB (A), PDB + Cu²⁺ (B) PDB + Mg²⁺ (C) [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ[®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 mm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 280 nm]

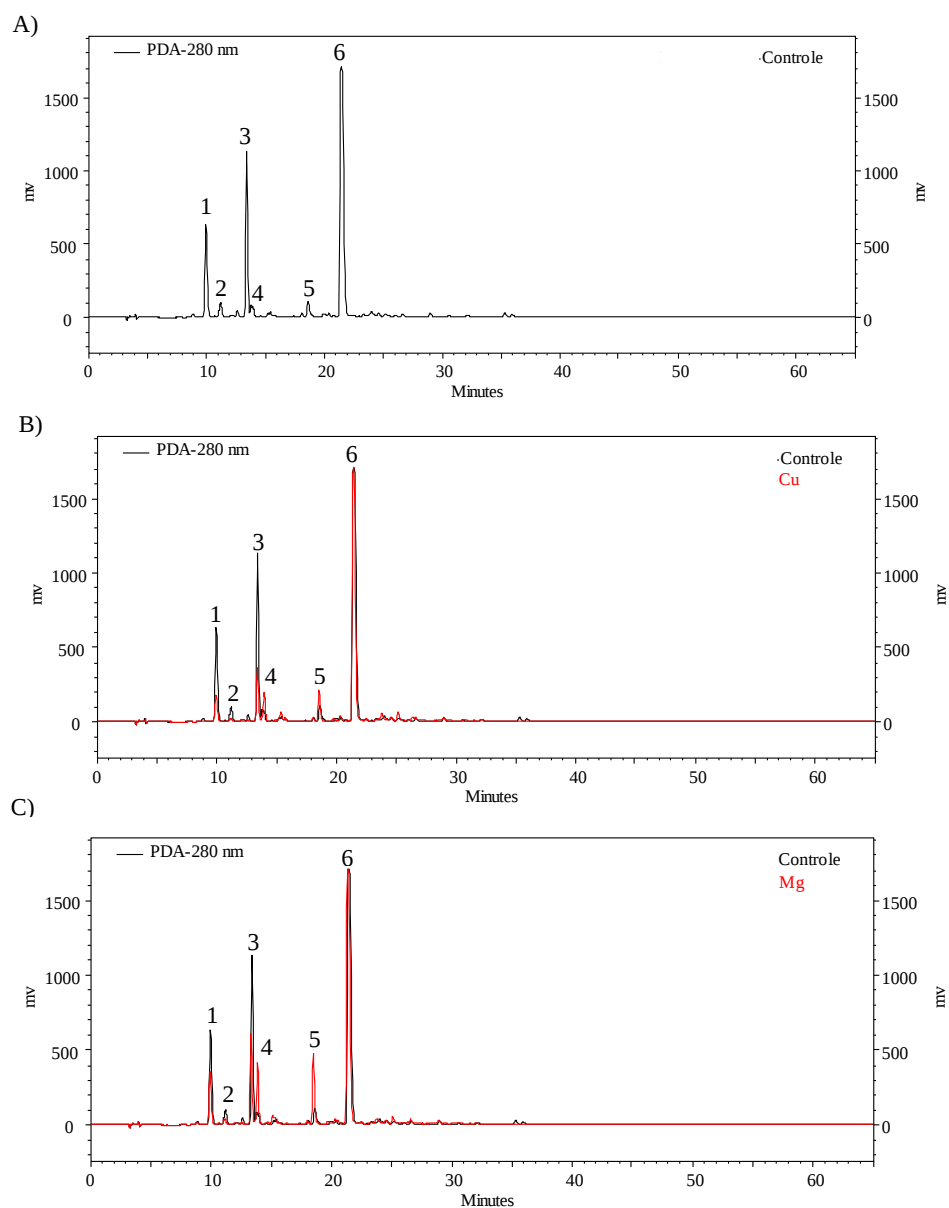


Figura 07. Cromatograma representando os perfis dos Ex. AcOEt em escala reduzida produzido pelo fungo *C. lunata* isolado das folhas de *P. chiquitensis*: PDB (A), PDB + SAHA (B), PDB +AZA (C) e PDB +AA (D) [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ[®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 mm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 280 nm]

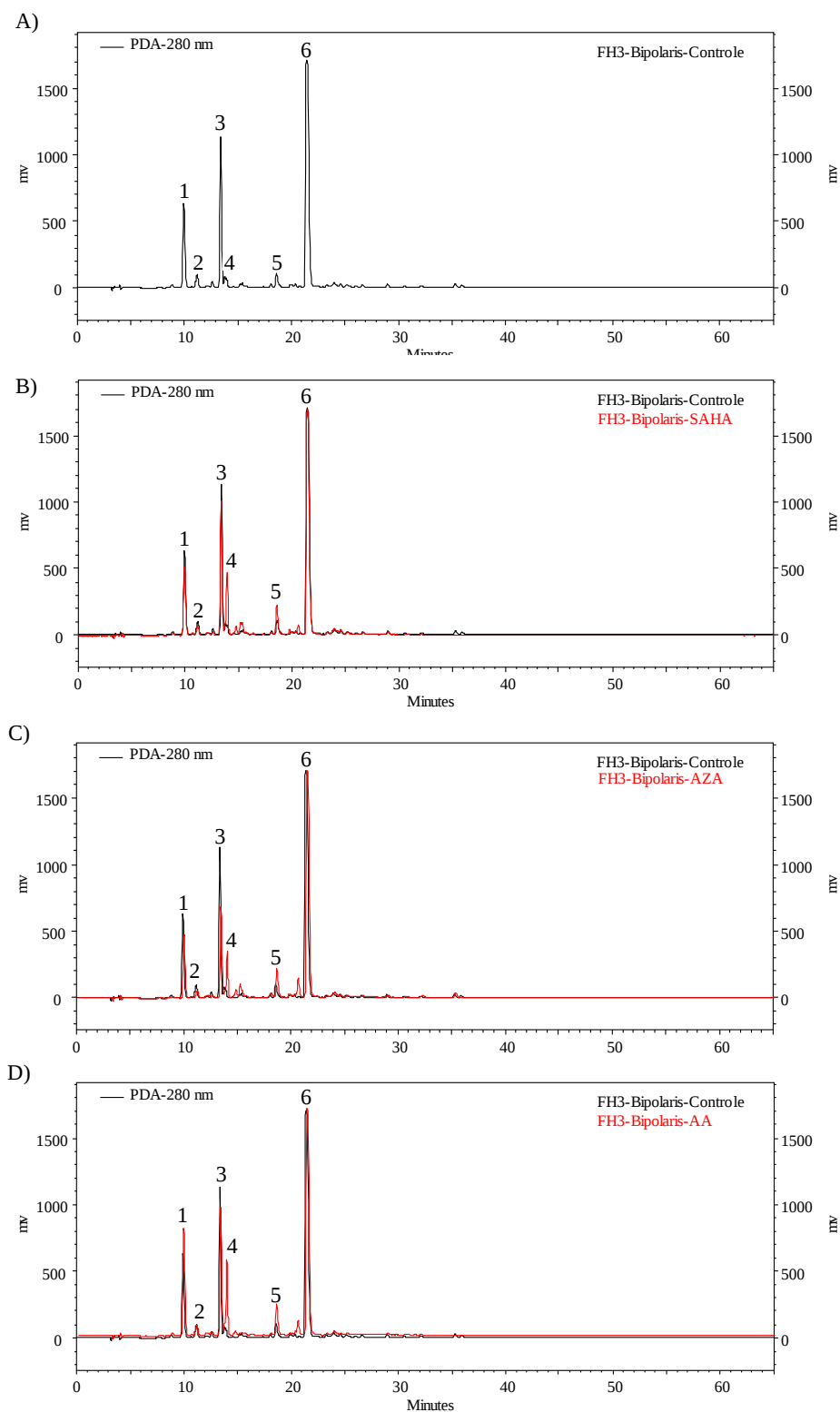


Tabela 03. Cultivo em escala reduzida de *Curvularia luneta*

Código	Experimento	Vol. PDB em mL	glicose (32 dias)	Massa em mg do Ex AcOEt	Massa total em mg do Ex AcOEt	Rendimento relativo ao controle PDB em %
FH-03-01_1A	PDB	300	++	45,7		
FH-03-01_1B	PDB	300	++	63,8	152,3	-
FH-03-01_1C	PDB	300	++	42,8		
FH-03-01_2A	CuSO ₄	300	+	86,1		
FH-03-01_2B	CuSO ₄	300	+	75,3	241,4	143
FH-03-01_2C	CuSO ₄	300	+	80,0		
FH-03-01_3A	MgSO ₄	300	-	19,3		
FH-03-01_3B	MgSO ₄	300	-	62,5	161,8	151
FH-03-01_3C	MgSO ₄	300	-	80,0		
FH-03-01_4A	SAHA	300	+	62,3		
FH-03-01_4B	SAHA	300	+	64,5	187,9	123
FH-03-01_4C	SAHA	300	+	61,1		
FH-03-01_5A	AZA	300	+	51,0		
FH-03-01_5B	AZA	300	+	58,0	162,6	101
FH-03-01_5C	AZA	300	+	53,6		
FH-03-01_6A	AA	300	++	42,0		
FH-03-01_6B	AA	300	++	65,0	179,0	108
FH-03-01_6C	AA	300	++	57,0		

5.2 Perfil cromatográfico por CLAE-DAD dos Exs AcOEt de *Curvularia lunata*

Os extratos produzidos em escala reduzida: PDB (controle), PDB + Cu²⁺, PDB + Mg²⁺, PDB + SAHA, PDB + AZA e PDB + AA foram submetidos à análise por CLAE-DAD.

O cromatograma do crescimento em escala reduzida do PDB (controle) foi comparado com os demais cromatogramas na presença de íons de cobre e magnésio (Figura 06), e na presença dos modificadores epigenéticos SAHA, AZA e AA (Figura 07). Os picos numerados de **1-6** representam as seis substâncias mais representativas vistas nos cromatogramas registrados.

A avaliação dos perfis cromatográficos obtidos, mostrou grande semelhança qualitativa entre o PDB (controle) com os demais experimentos cultivados na presença de íons metálicos, modificadores epigenéticos e do eliciador químico AA, portando não foi visto significativa diversificação química dos metabólitos secundários produzidos pelo endofítico *C. lunata*.

Os picos **2** ($t_r = 11,24$ min) e **6** ($t_r = 21,27$ min) apresentaram intensidades dos seus sinais com valores muito próximos em todas as seis condições avaliadas quando comparado com o controle PDB, não havendo aparentemente significativa diferença entre a quantidade dessas substâncias produzidas pelo endofítico nesses experimentos, porém, os picos **1** ($t_r = 9,94$ min) e **5** ($t_r = 18,51$ min) quando comparado com o cromatograma do controle PDB como mostrado nos cromatogramas das Figuras 06 e 07, apresentaram diminuição nas intensidades dos seus sinais com valores inferiores ao do controle PDB, mostrando assim que tanto os eliciadores químicos quanto os modificadores epigenéticos suprimiram parcialmente a produção desses metabólitos.

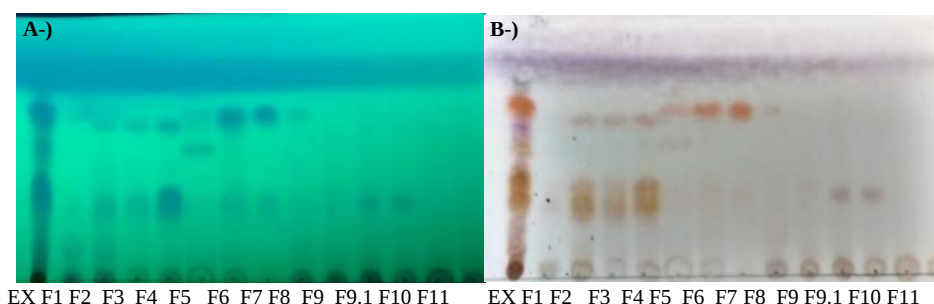
5.3 Obtenção do extrato bruto em escala ampliada

A incorporação de íons de Mg²⁺ no meio de cultivo PDB (Figura 06, cromatograma C) foi a condição mais interessante por ter proporcionado aumento na produção dos metabólitos referentes aos picos **4** ($t_r = 13,86$ min) e **5** ($t_r = 18,51$ min), sendo essas substâncias de interesse visto que não foram isoladas durante o mestrado devido ao baixo rendimento obtido em sua purificação. Portanto, foi a condição escolhida para o cultivo em escala ampliada, conforme a metodologia descrita no item 3.1.11. Resultando no Ex. AcOEt para dar sequência as etapas químicas de fracionamentos e isolamento de metabólitos.

5.4 Fracionamento por CLAE-DAD do Ex. AcOEt (PDB + Mg²⁺)

O Ex. AcOEt preparado do cultivo PDB + Mg²⁺ foi submetido ao fracionamento por CLAE-DAD resultando em 11 frações (**F1-11**), que foram analisadas por CCD (Figura 08) e CLAE-DAD em modo analítico e seus cromatogramas estão apresentas nas Figuras 9-11.

Figura 08. Análise por CCDC das frações obtidas do fracionamento por Sephadex LH-20; Sistema de solventes: CHCl₃/MeOH/*n*-PrOH/H₂O (5:6:1:4,v/v/v/v); 1) Fr. 1-11, A-) Uv 254nm e B-) Anisaldeído/H₂SO₄5.1.5 Análises por CLAE-DAD das frações 1-11



Os perfis cromatográficos por CCD (Figura 08) evidenciou que algumas frações apresentaram poucos *spots* como Fr 05, Fr 06 e Fr 07, aparentemente tornando-se promissoras para continuidade dos estudos, enquanto Fr 02, Fr 03 e Fr 04 apresentaram maior numero de *spots* com substâncias de maior polaridade. Considerando-se também a massa obtida dessas frações, iniciamos o fracionamento pelas Frações denominadas Fr 04 e Fr 05-06.

Pode-se visualizar o perfil cromatográfico por CLAE-DAD das frações Fr 01-04 (Figura 09); Fr 05- 07 (Figura 10); Fr 09- Fr 11 (Figura 11), evidenciando que as frações Fr 05 – Fr 07, nas condições analisadas, encontram-se mais separadas e, portanto, aparentemente mais fáceis de serem purificadas

5.5 Isolamento das substâncias **C1-C6** por CLAE-DAD

A purificação por CLAE-DAD da fração Fr 04 resultou no isolamento das substâncias **C1+C2** (1,2 mg) e **C3+C4** (1,6 mg); da fração Fr 05-06 resultou no isolamento de outras duas substâncias: **C6** (0,6 mg) e **C7** (0,8 mg). As condições experimentais estão apresentadas no item 3.1.15 e no Cromatograma de fracionamento e isolamento do Ex. AcOEt (Figura 12). Os cromatogramas por CLAE-DAD analítico das substâncias isoladas e dos respectivos espectros no UV estão apresentados nas Figuras 13 (**C1-C3**) e 16 (**C4-C6**).

Figura 09. Cromatograma representando os perfis do fracionamento por CLAE-DAD Fr 01-04 (A-C) [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® **C18**, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ= 280 nm]

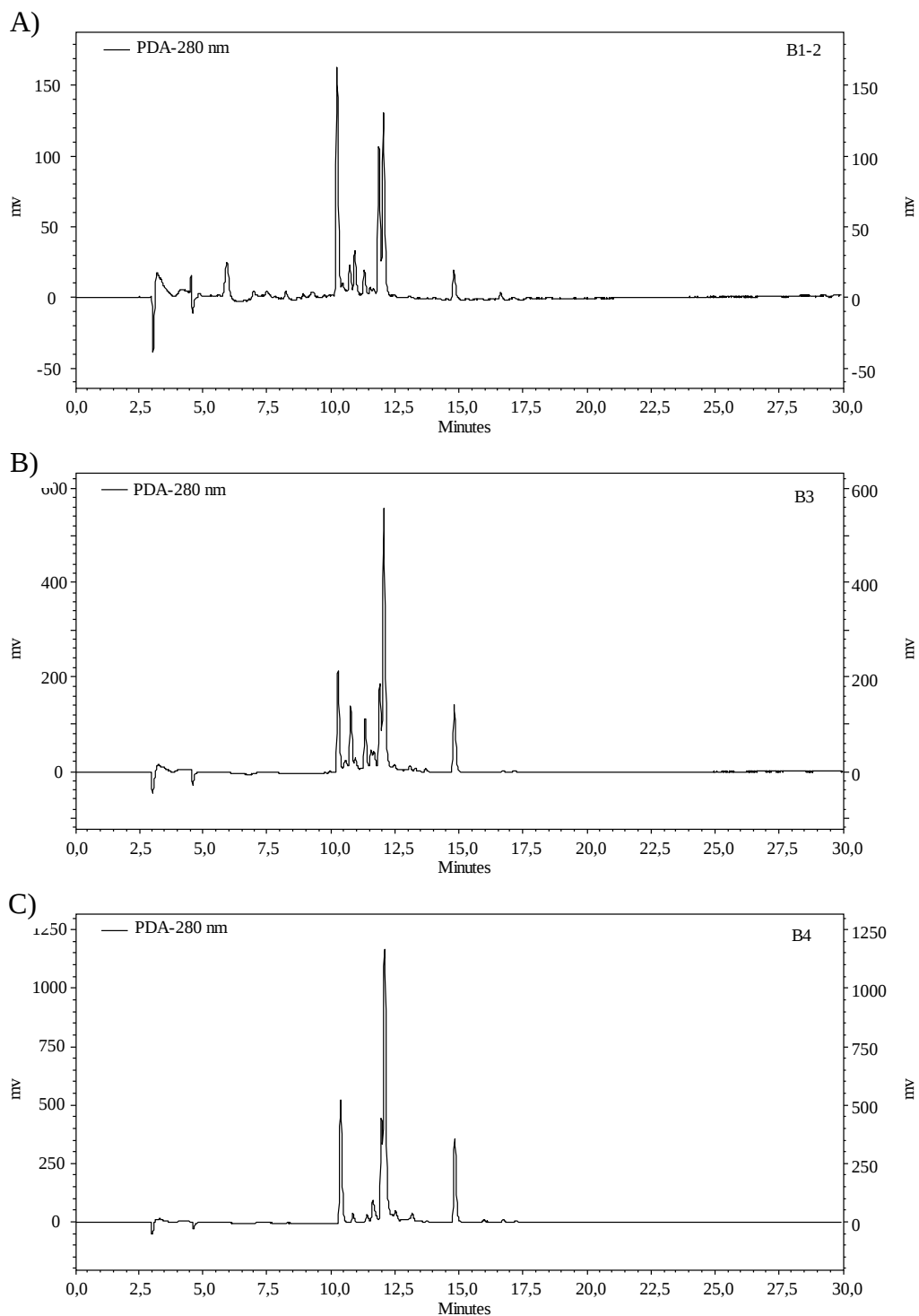


Figura 10. Cromatograma representando os perfis do fracionamento por CLAE-DAD Fr 05-07 (D-F) [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 mm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 30 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 280

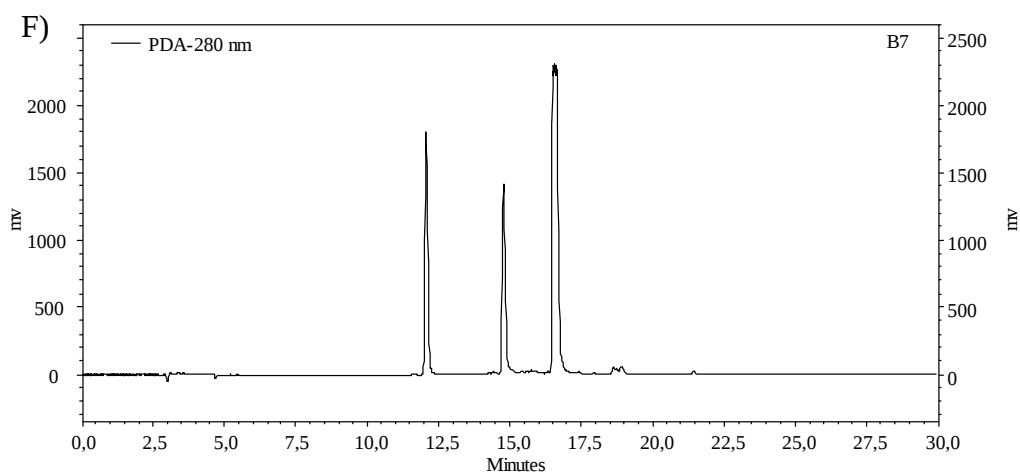
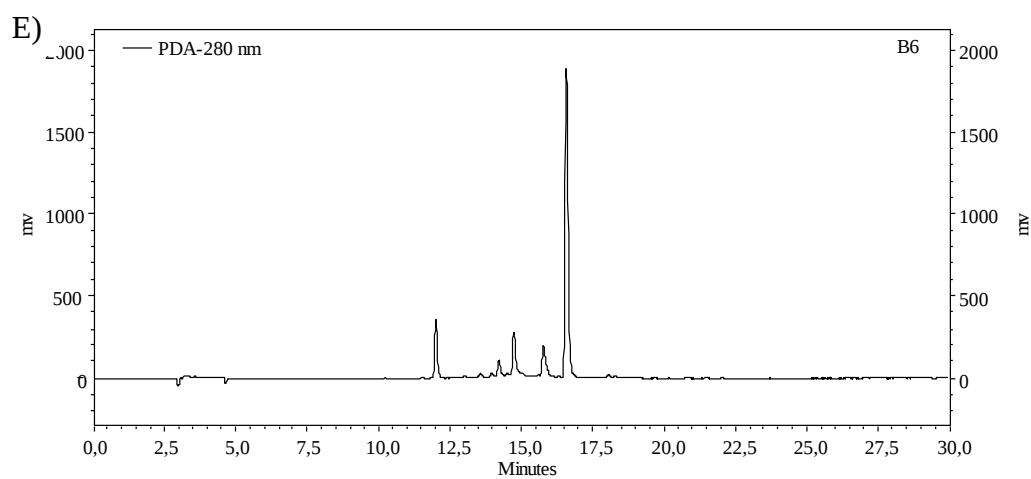
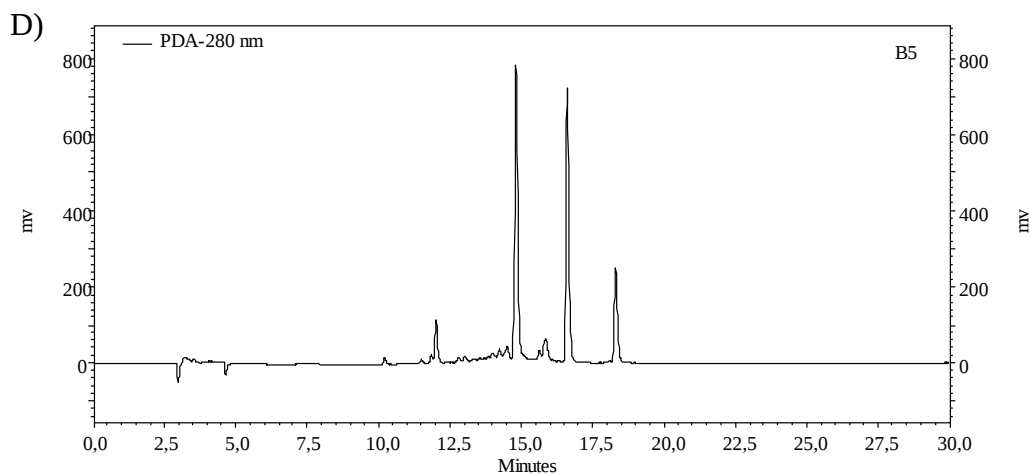


Figura 11. Cromatograma representando os perfis do fracionamento por CLAE-DAD Fr 09-11 (G-I) [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 mm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 30 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 280

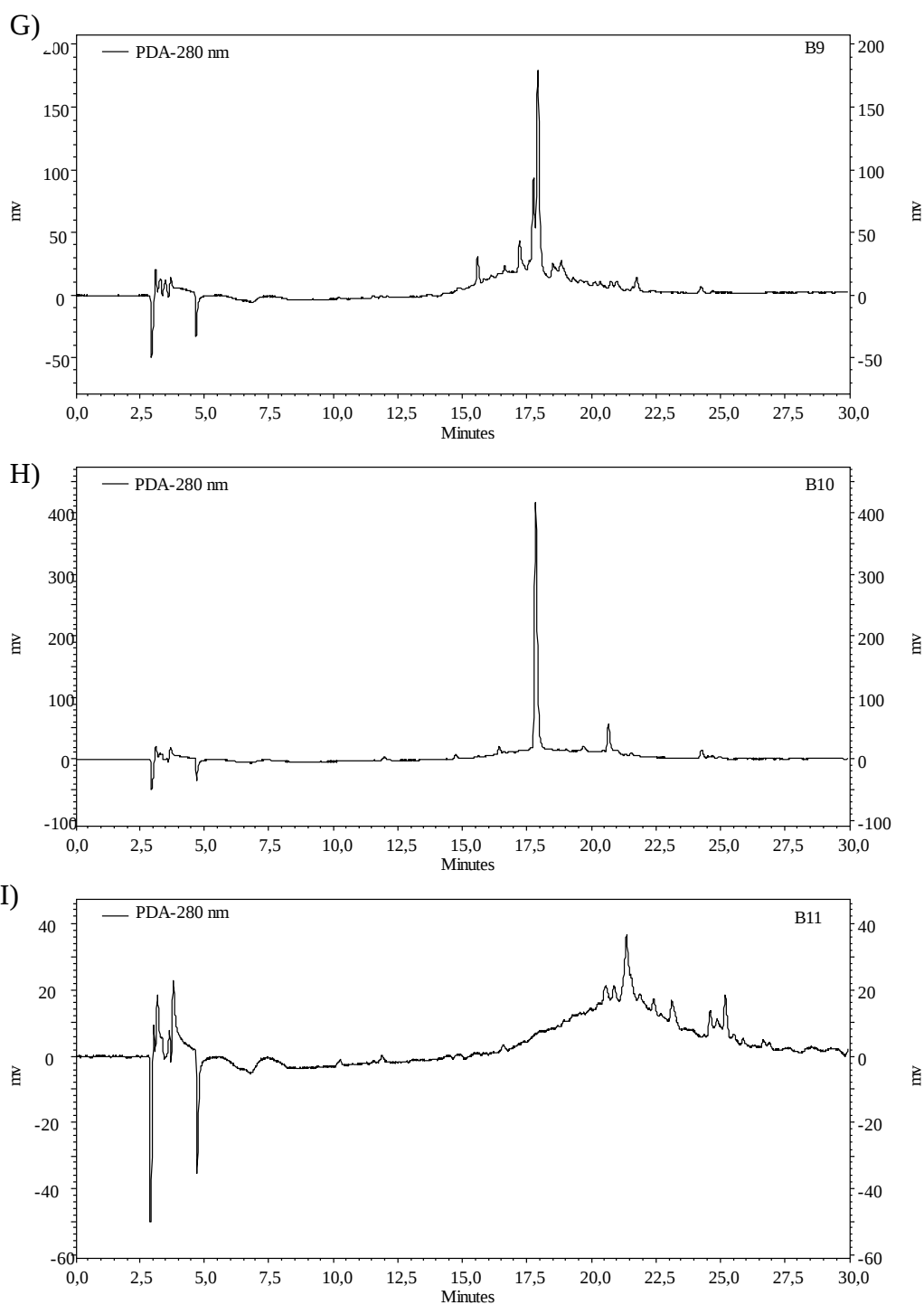


Figura 12. Cromatograma do fracionamento e purificação do Ex. AcOEt preparado a partir do cultivo em escala ampliada de *C. lunata*

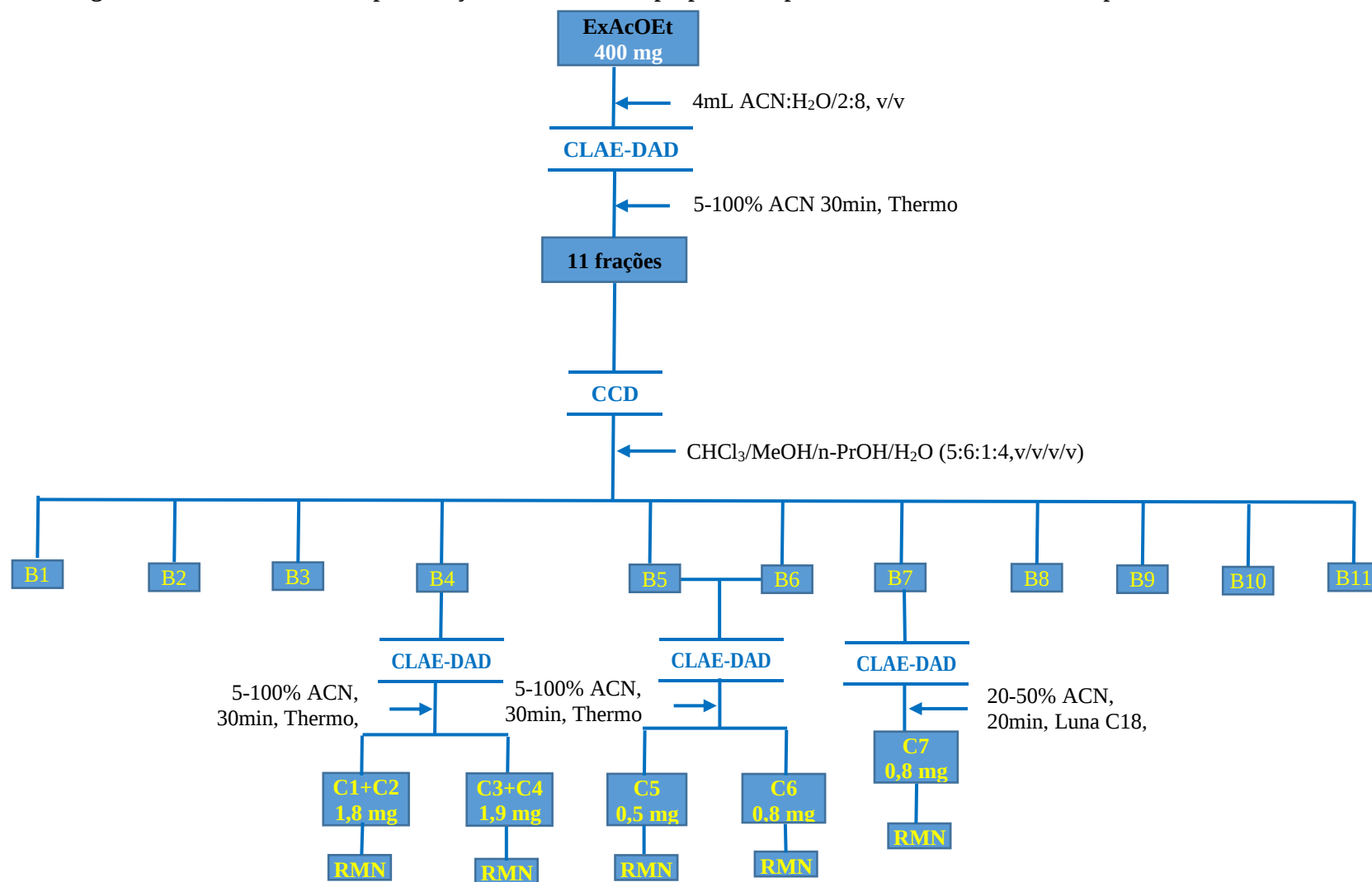


Figura 13. Cromatogramas A e B, respectivos das substâncias **C1+C2** e **C3+C4** isoladas por CLAE-DAD semipreparativo. [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ[®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μ m; Solvente A. H₂O + 0,1% TFA; Solvente B. ACN + 0,1 % TFA. Gradiente exploratório de 5-100 % de B em 30 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 280 nm].

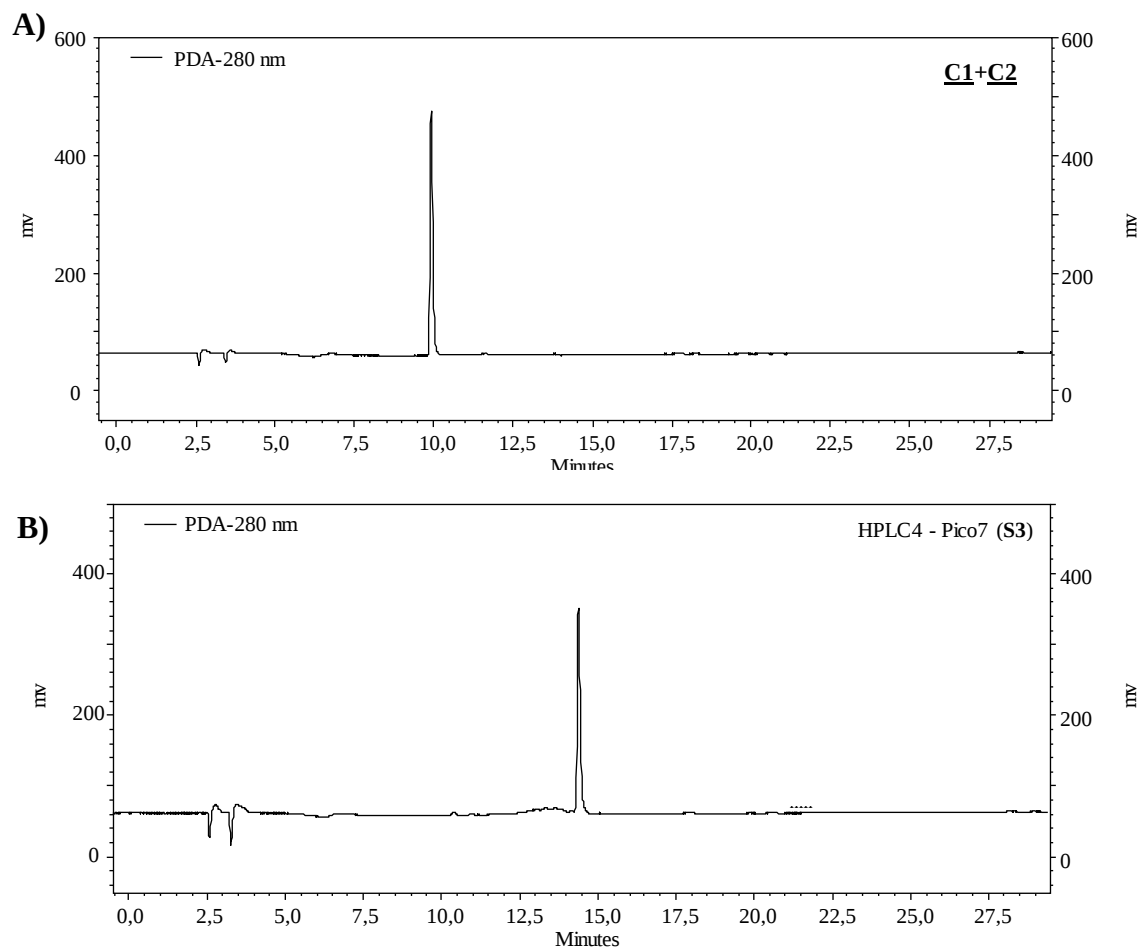
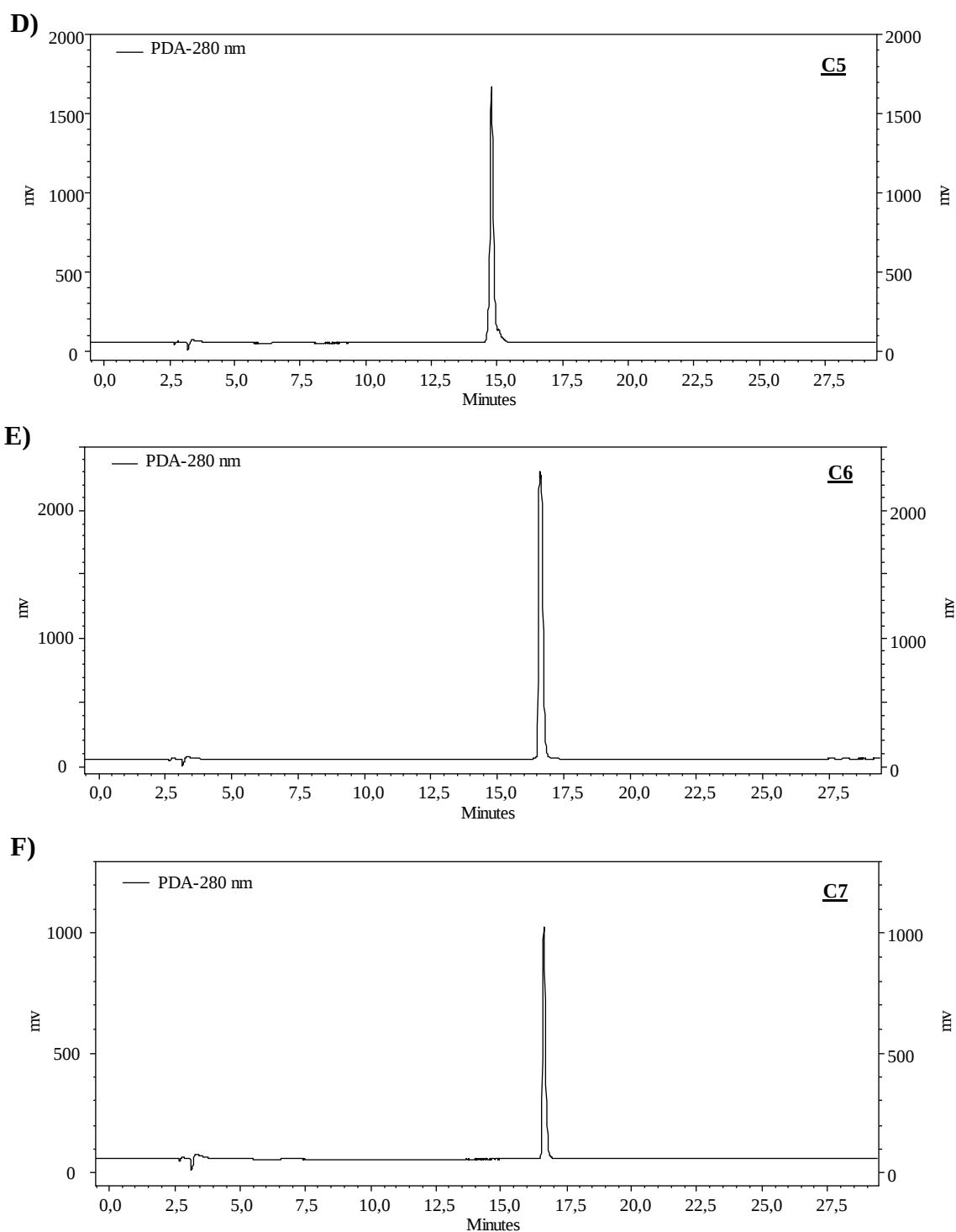


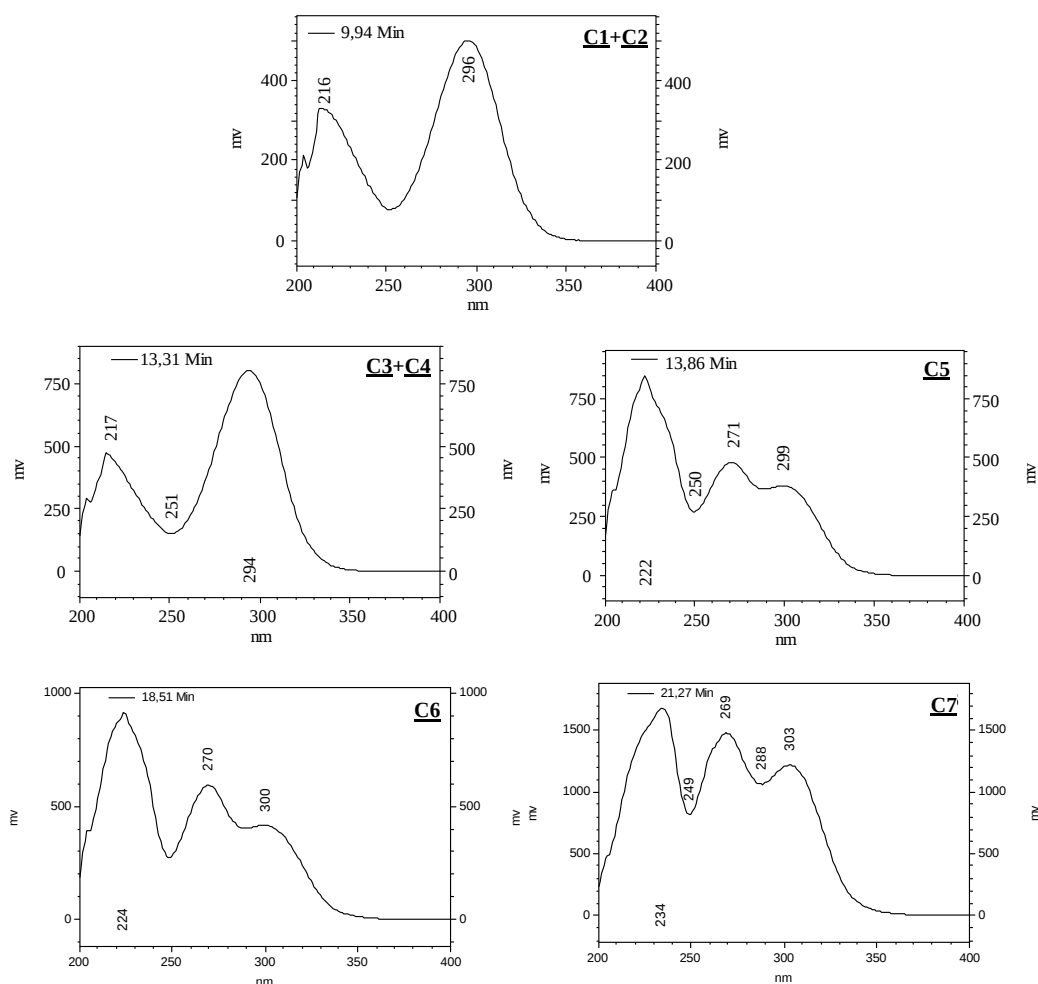
Figura 14. Cromatogramas D, E, F das substâncias **C5-C7** isoladas por CLAE-DAD semipreparativo. [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ[®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μ m; Solvente A. H₂O + 0,1% TFA; Solvente B. ACN + 0,1 % TFA. Gradiente exploratório de 5-100 % de B em 30 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 280 nm].



Análise dos espectros no UV para todos os seis experimentos estudados (Figura 15) mostra dois padrões distintos com máximos de absorções. Os picos de **1-3** exibiram duas bandas, uma com λ_{max} na faixa de 211-217 nm e uma segunda banda com λ_{max} na faixa de 294-298 nm. Esse dado pode ser interpretado como preditivo de que os três compostos fazem parte de uma mesma classe de metabólitos, os quais possuem os mesmos grupos cromóforos e consequentemente perfis bastante similares no espectro de UV.

Os picos **4-6** apresentaram padrão distinto de absorção no espectro de UV, possuindo três bandas: uma primeira com λ_{max} de 222-234 nm, uma segunda com λ_{max} de 269-271 nm e uma terceira com λ_{max} de 299-303 nm, sugerindo assim, pertencer a uma classe diferente de metabólitos.

Figura 15. Espectros representativos no UV dos picos **1-7** dos Exs. AcOEt preparados a partir do cultivo de *C. lunata* isolado das folhas de *P. chiquitensis*; $\lambda = 280$ nm.



5.6 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

5.6.1 Substâncias **C1** e **C2**

O espectro de UV apresentou máximos de absorção em 214 e 295 nm (Figura 15, cromatograma A), típicos de carbonila α,β -insaturada e conjugada (MASI et al., 2014).

No experimento de RMN de ^1H de **C1** (Tabela 04, Figuras 16A-B) foi observado a duplicidade de sinais por todo o espectro de hidrogênio, sugerindo uma mistura de compostos. O padrão de integração dos sinais presentes no espectro de RMN de ^1H , indicou que os dois compostos estavam presentes numa proporção de 2:1. A discussão para determinação estrutural destes compostos será realizada mediante os códigos **C1** e **C2**.

No espectro de hidrogênio (Figura 16B) foram observados seis sinais de hidrogênios olefínicos (δ 7,11 a 5,93). Além disso, sinais de deslocamentos químicos de hidrogênios alifáticos na região de δ 2,27 a δ 1,03 referentes aos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos para **C1** e **C2**.

Os sinais duplicados em δ 5,98 e 5,93 (1H cada, d , $J=9,6$ Hz); 7,11 e δ 7,05 (1H cada, d , $J=9,6$ Hz); e δ 6,36 e 6,18 (1H cada, t , $J=7,8$ Hz) foram atribuídos aos três hidrogênios olefínicos conjugados em H-8, H-9 e H-12 para cada uma das unidades dos dois isômeros, em mistura, respectivamente. Sendo H-8 e H-9 ligados em dupla ligação no anel cicloexenona.

Os sinais característicos de hidrogênios diastereotópicos de dois grupos metilênicos foram observados como multipletos em δ 2,27 e 2,12 (CH_2 -13) para **C1** e δ 2,22 e 2,09 (CH_2 -13) para **C2**. Adicionalmente, outros dois sinais de hidrogênios metínicos foram observados em δ 4,00 e 3,85 (H-4) e δ 4,75 para H-6, respectivamente para **C1** e **C2**. O espectro apresentou também sinais de hidrogênios metílicos em δ 1,67 e 1,58 (3H cada, s), CH_3 -11, e também em δ 1,05 e 1,03 (3H, t , $J=7,1$ Hz) atribuídas aos hidrogênios da posição CH_3 -14, respectivamente. Finalmente foram observados sinais de metoxilas ligadas a nitrogênio δ 4,10 e 3,99 (CH_3 -15).

No experimento de ^1H - ^1H gCOSY (Figura 18) é evidente a correlação entre os hidrogênios olefínicos H-9 e o H-8. O sistema de *spin* foi observado em H-12 acoplando com ambos os hidrogênios do grupo metileno (H_2 -13) assim como os do grupo metila CH_3 -14.

Os dados do mapa de contorno *g*HSQC de **C1** e **C2** confirmaram a presença de 32 carbonos correspondentes a três carbonos sp^2 (C-8, C-9 e C-12), incluindo um carbono sp^2 quaternário (C-10), um metileno (C-13), um grupo N-metoxi (C-15), dois grupos metila (C-11 e C-14) e três carbonos carbinólicos (C-3, C-4 e C-6). Também foram observados os sinais de dois grupos carbonila (C-1 e C-7), Figura 19.

O mapa de contorno *g*HMBC (Figura 20) possibilitou verificar as correlações a 3J existentes entre o hidrogênio olefínico H-9 com os carbonos C-5, C-7 e C-10, evidenciando que o átomo de carbono C-5 possui correlações com os dois anéis: a cicloexenona e o anel da ciclopentanamida. A cadeia lateral 1-propenil foi atribuída em C-10 pelos acoplamentos observados entre H-9 e C-12. Para estabelecer a posição do carbono da carbonila C-1 observou-se uma correlação com o hidrogênio em H-6 no espectro *g*HMBC (Figura 20).

O mapa de contorno *g*HSQC (Figura 19) permitiu atribuir todos os deslocamentos químicos a todos os carbonos e hidrogênios correspondentes (Tabela 04) e **C1** e **C2** foram identificadas como sendo 4,6-diidroxi-2,3-dimetoxi-3-metil-10-propilideno-2-azaspiro[4,5]dec-8-eno-1,7-diona. Suas estruturas químicas foram confirmada pelos dados da análise ESI-QTOF-HRMS (Figura 17) exibindo os sinais respectivos do íon da forma dimérica sodiada $[2M+Na]^+$ m/z 617,2318, o íon sodiado $[M+Na]^+$ m/z 320,1103, identificando juntamente com os demais dados de RMN a fórmula molecular como $C_{14}H_{19}NO_6$, as estruturas químicas de **C1** e **C2** estão apresentadas na Figura 21.

Os dados espectroscópicos de HRMS, RMN de 1H e ^{13}C e UV registrados para os compostos (**C1** e **C2**) foram comparados com os dados da literatura, sendo elas chamadas de triticonas E e F (HALLOCK; LU; CLARDY, 1993; MASI et al., 2014).

Estes mesmos autores descrevem a dificuldade em purificar esses dois isômeros, pois apresentam um único *spot* em CCD e um único pico quando realizada CLAE-DAD com várias fases estacionárias e sistemas de solventes, e portanto, os identificam em uma mistura 10:9. A estereoquímica relativa dos dois epímeros em C-6 foi verificada pelos autores por experimentos NOESY nos carbons C-3, C-4 e em C-6. Assim para triticona F (Figura 21a), existe acoplamento entre os hidrogênios CH₃-11 com os hidrogênios em H-4 e CH₃-15 indicando que os CH₃-11 encontra-se face oposta a hidroxila da posição C-4. Também não foi observado a correlação do hidrogênio em C-6 com os hidrogênios em CH₃-11, confirmando que os hidrogênios em CH₃-11 e a hidroxila em C-6 estão na mesma face do anel cicloexenona. Quanto a estereoquímica relativa da triticona E (Figura 21 a), os autores observaram que houve novamente uma correlação de CH₃-11 com o hidrogênio em C-4, indicando que as estereoquímicas em C-4 e C-5 eram as mesmas que na triticona F. No entanto, para a triticona

E houve uma correlação dos hidrogênios CH_3 -11 com o hidrogênio em C-6, evidenciando uma estereoquímica contrária em C-6, como mostrado na Figura 21 a. Então a estereoquímica relativa da triticona E foi determinada como sendo 3S*,4R*,5S*,6R* enquanto da F 3S*,4R*,5S*,6S* (HALLOCK; LU; CLARDY, 1993).

Ainda na tentativa de explicar a dificuldade em purificá-los, os autores aqueceram a mistura de triticonas E e F a 70 °C e observaram que ambas as substâncias da mistura permaneceram inalteradas, assim como a relação entre elas. Neste caso os autores concluíram que não é viável uma abertura retro-aldol, como ocorre em outras triticonas que possuem a carbonila em C-4 (HALLOCK; LU; CLARDY, 1993; SUGAWARA, et al, 1988).

Nas triticonas identificadas C1 e C2, neste trabalho, não foi realizado o experimento NOESY por não haver mais substância para realizar o experimento, portanto não foi determinada a configuração relativa dos centros estereogênicos C-3, C-4 e C-6.

A triticona E foi também identificada no extrato acetato de etila do fungo endofítico *Bipolaris*, isolado de duas espécies de *macrophytes* aquáticas: *Eichhornia azurea* (Kunth) e *Eichhornia crassipes* (Mart.) e o extrato apresentou atividade antileishmanial com CI de 70–84.2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. (ALMEIDA, et. Al., 2018). Outros autores como Wang et al. (2018) isolaram as triticonas E e F do extrato de um derivado marinho, o fungo *Cochliobolus lunatus* SCSIO41401.

Tabela 04. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C das substâncias **C1** e **C2** e comparação com os respectivos valores publicados na literatura

POSIÇÃO	Isolados de <i>C. lunata</i> [CDCl ₃ , 600 MHz] (HILARIO, et al., 2020)				(HALLOCK; LU; CLARDY, 1993) [CDCl ₃ , 400 MHz]			
	*C1		*C2		*C1 (Triticona E)		*C2 (Triticona F)	
	$^{**}\delta^{13}\text{C}^{\text{C}}$	$\delta^1\text{H}$ (m, J)	$^{**}\delta^{13}\text{C}^{\text{C}}$	$\delta^1\text{H}$ (m, J)	$\delta^{13}\text{C}^{\text{C}}$	$\delta^1\text{H}$ (m, J)	$\delta^{13}\text{C}^{\text{C}}$	$\delta^1\text{H}$ (m, J)
1	167,6 (C=O)	–	167,6 (C=O)	–	166,5 (C=O)	–	167,4 (C=O)	–
3	86,6 (C)	–	86,5 (C)	–	86,4 (C)	–	86,4 (C)	–
4	73,5 (CH)	4,0 (s)	73,5 (CH)	3,85 (s)	73,1 (CH)	3,80 (s)	73,1 (CH)	3,85 (s)
5	56,8 (C)	–	56,8 (C)	–	56,5 (C)	–	56,6 (C)	–
6	73,5 (CH)	4,75 (s)	73,5 (CH)	4,75 (s)	73,3 (CH)	4,73 (s)	73,3 (CH)	4,73 (s)
7	196,1 (C=O)	–	196,6 (C=O)	–	195,2 (C=O)	–	196,9 (C=O)	–
8	119,9 (CH)	5,95 (d, 10,2)	121,1 (CH)	5,93 (d, 10,2)	119,9 (CH)	5,95 (d, 9,9)	120,7 (CH)	5,91 (d, 9,9)
9	153,0 (CH)	7,11 (d, 10,2)	153,1 (CH)	7,05 (d, 10,2)	152,7 (CH)	7,08 (d, 9,9)	152,9 (CH)	7,04 (d, 9,9)
10	127,8 (C)	–	128,9 (C)	–	127,2 (C)	–	128,5 (C)	–
11	23,1 (CH ₃)	1,67 (s)	18,8 (CH ₃)	1,58 (s)	23,7 (CH ₃)	1,66 (s)	18,7 (CH ₃)	1,56 (s)
12	154,4 (CH)	6,36 (t, 7,8)	151,0 (CH)	6,18 (t, 7,8)	154 (CH)	6,35 (t, 7,5)	150,6 (CH)	6,17 (t, 7,5)
13	30,9 (CH ₂)	2,27 (m) 2,12 (m)	23,8 (CH ₂)	2,22 (m) 2,09 (m)	30,9 (CH ₂)	2,25 (m)	23,4 (CH ₂)	2,10 (m)
14	13,5 (CH ₃)	1,05 (t, 8,4)	13,5 (CH ₃)	1,03 (t, 7,8)	13,1 (CH ₃)	1,05 (t, 7,1)	13,3 (CH ₃)	1,02 (t, 7,1)
15	65,0 (N-OCH ₃)	3,99 (s)	65,0 (N-OCH ₃)	4,10 (s)	64,7 (N-OCH ₃)	3,99 (s)	68,6 (N-OCH ₃)	4,07 (s)

* δ em ppm e J em Hz; ** valores atribuídos pelas análises dos experimentos gHSQC e gHMBC

Figura 16A. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) dos compostos C1-C2 (HILARIO, et al., 2020)

Felipe FJ(5)-pico1 1H presat 01/05/2014

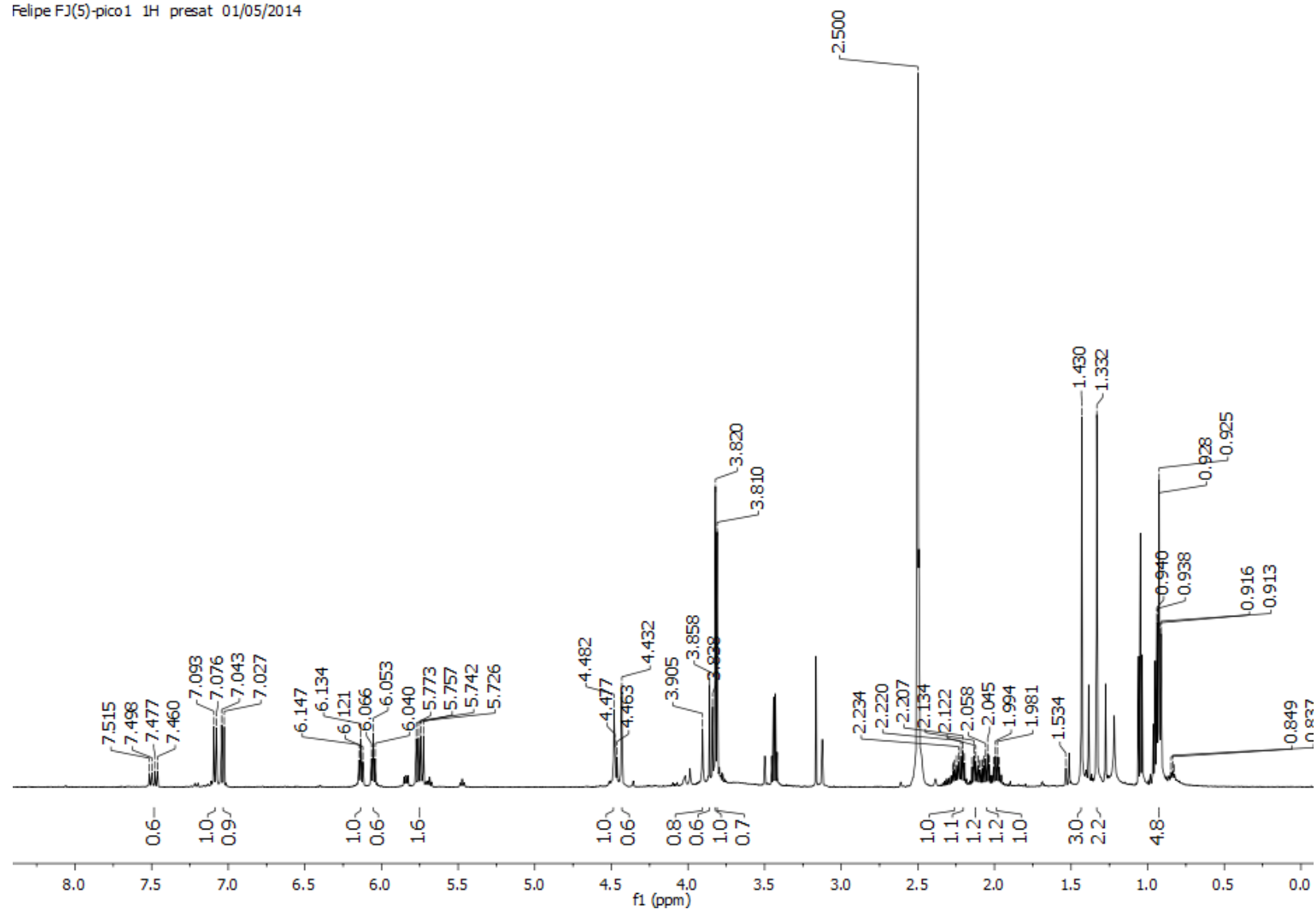
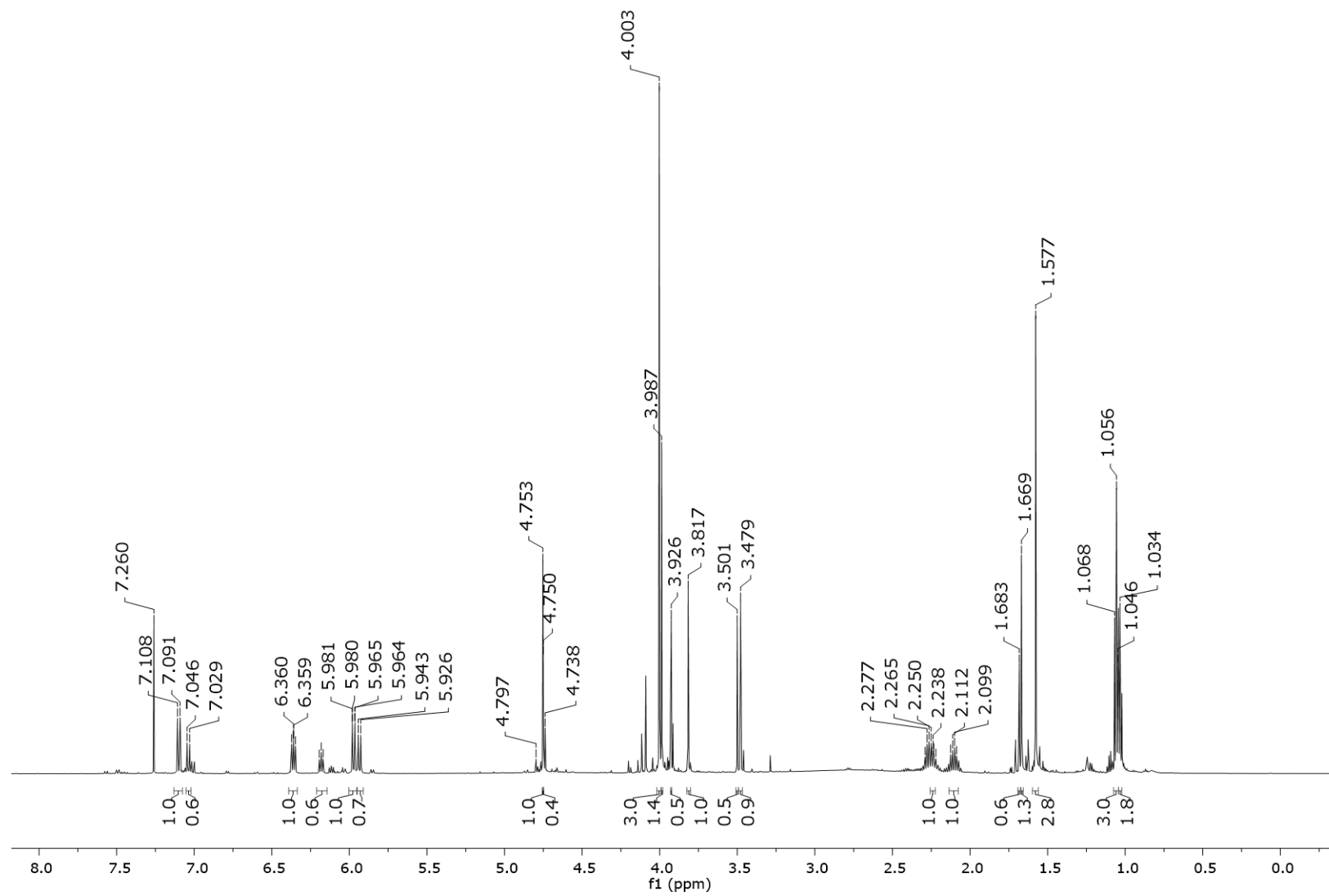


Figura 16B. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) dos compostos **C1-C2** (HILARIO, et al., 2020)



(HILARIO, et al., 2020)

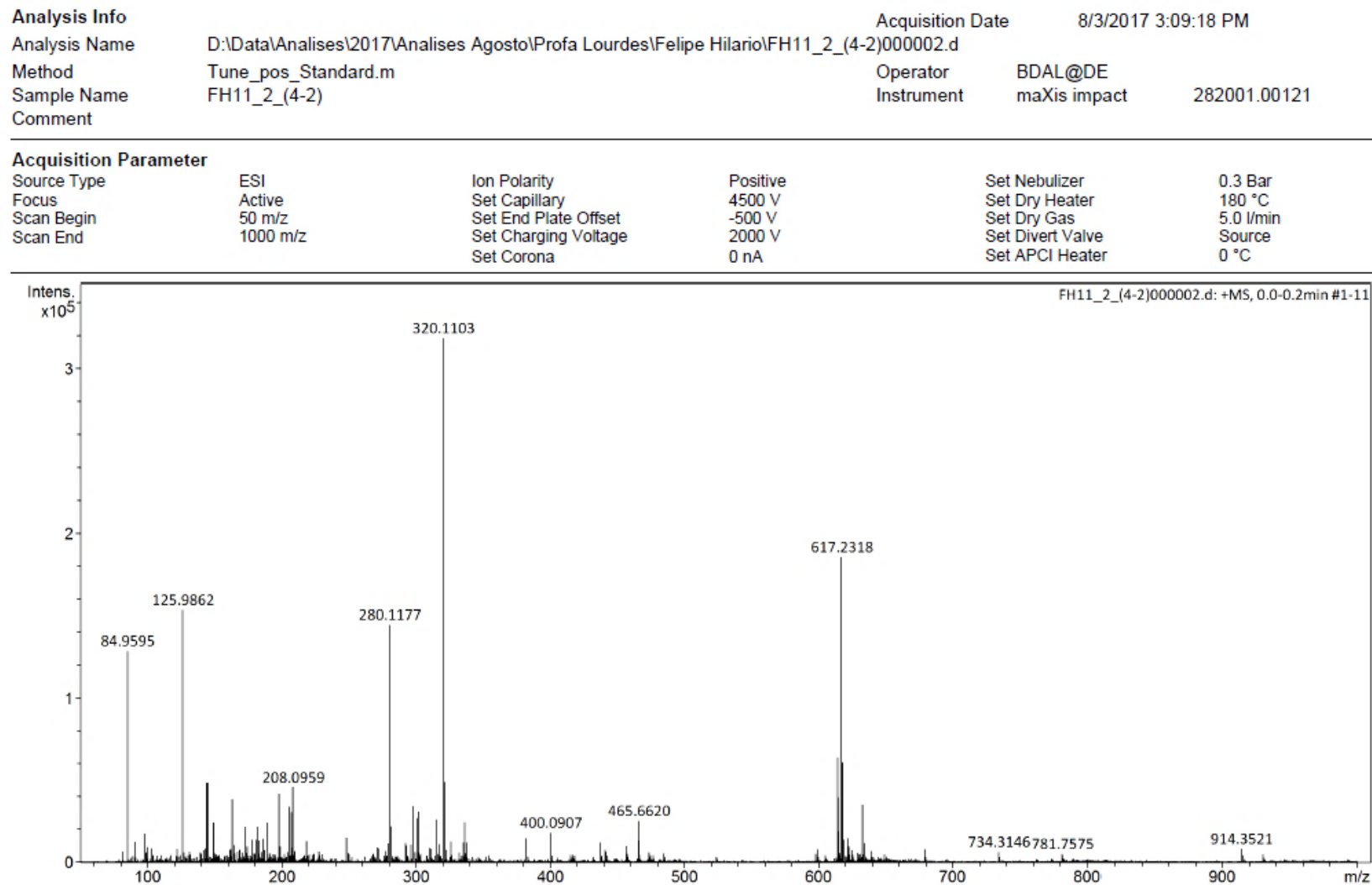
Figura 17. ESI-QTOF-HRMS dos compostos **C1-C2** (HILARIO, et al., 2020)

Figura 18. Espectro de *g*COSY dos compostos C1-C2 (HILARIO, et al., 2020)

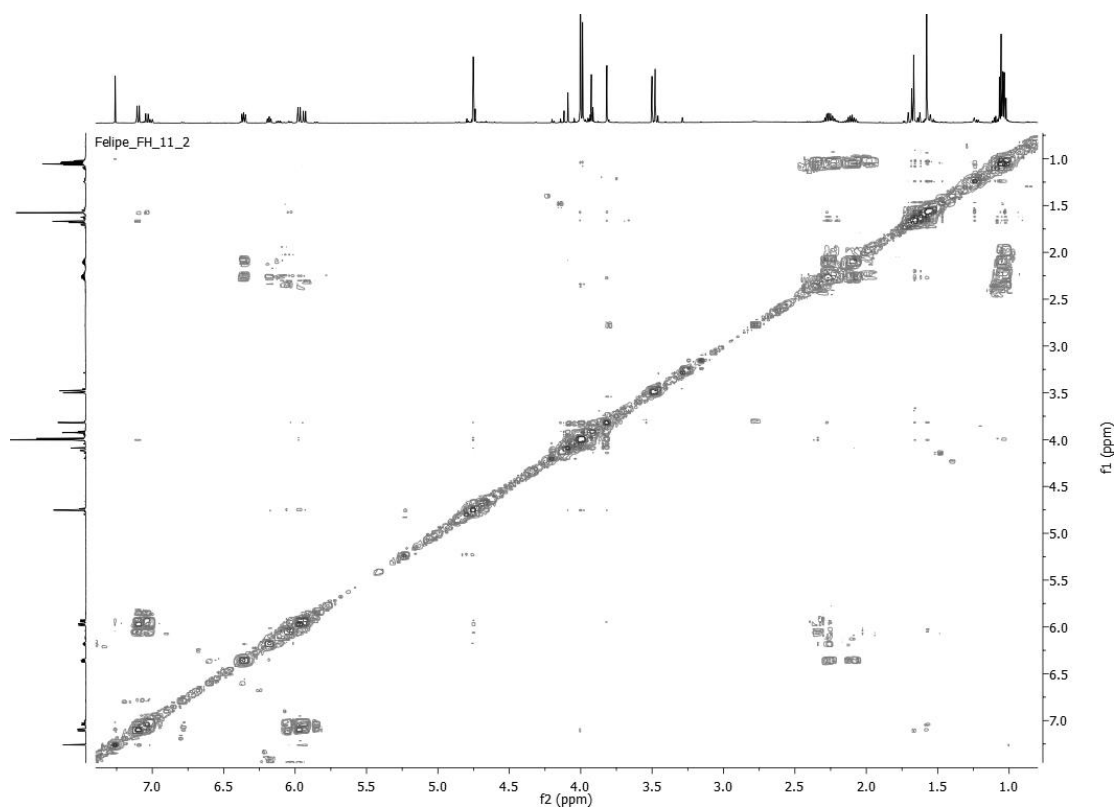


Figura 19. Mapa de contorno *g*HSQC dos compostos C1-C2 (HILARIO, et al., 2020)

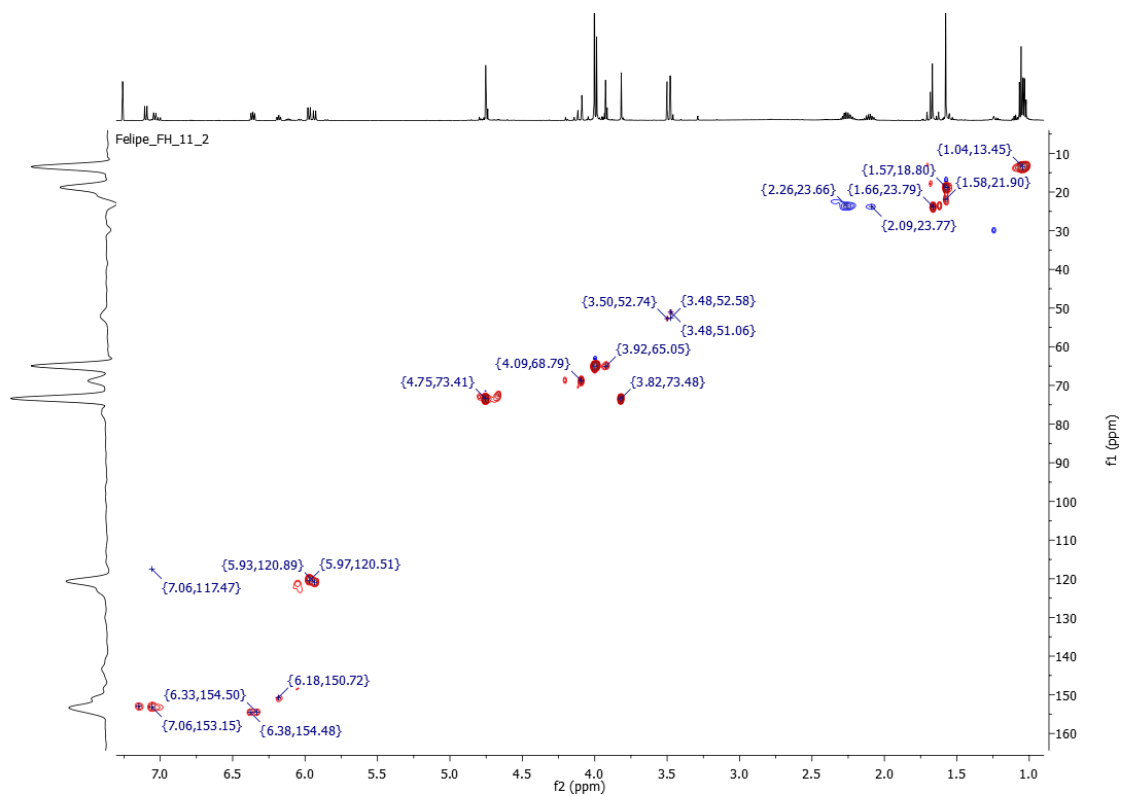


Figura 20. Mapa de contorno *g*HMBC dos compostos **C1-C2** (HILARIO, et al., 2020)

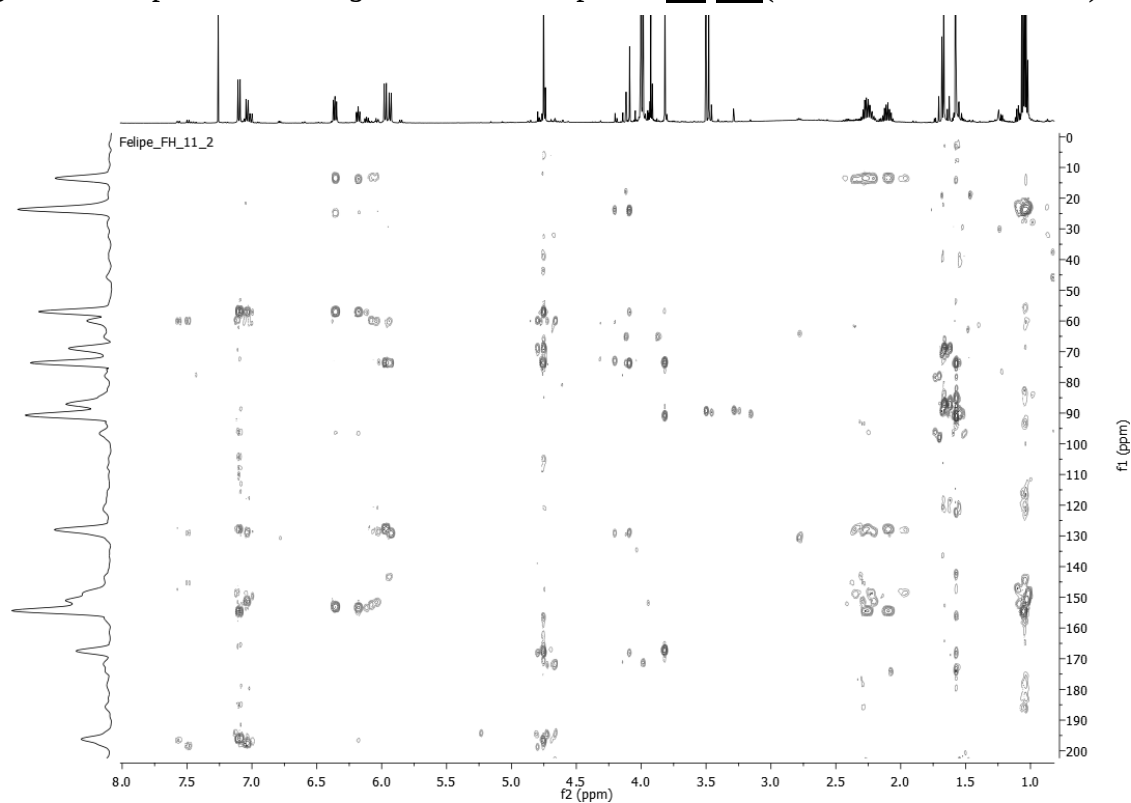
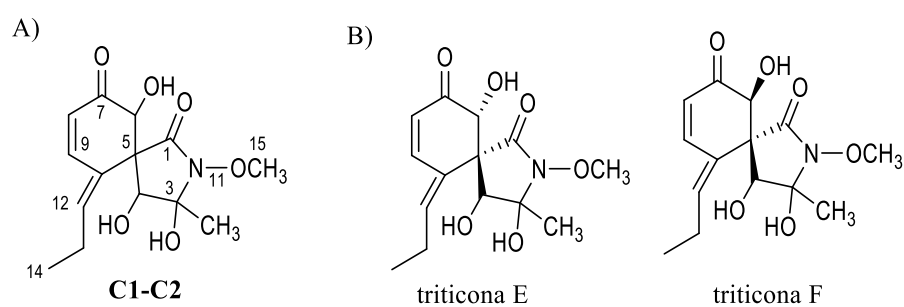


Figura 21. Estruturas químicas das substâncias **C1** e **C2** (A) e das triticonas E-F (B)

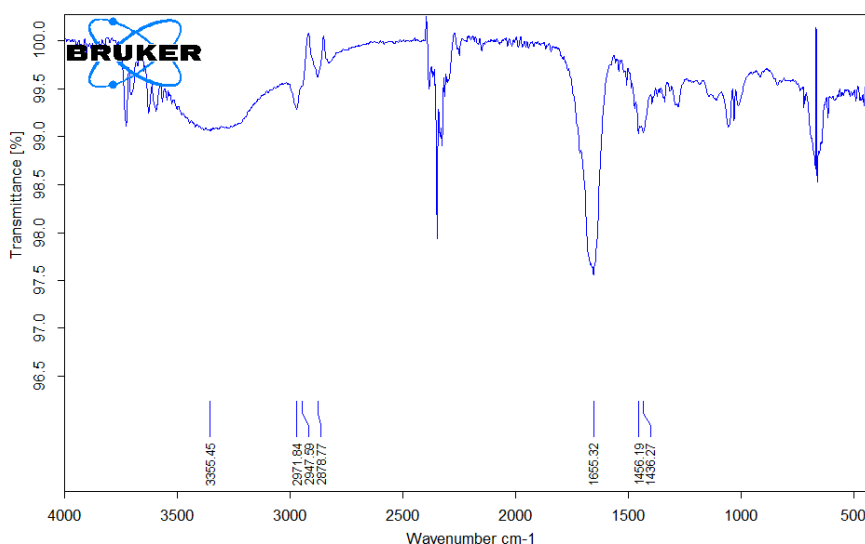


Triticonas E e F: (HALLOCK; LU; CLARDY, 1993)

5.6.2 Substâncias **C3** e **C4**

O espectro de IV dos compostos **C3** e **C4** (Figura 22) evidenciou a presença uma banda larga em 3355 cm^{-1} devido ao estiramento OH, caraterístico grupo funcional hidroxila, além disso foi observado em 1655 cm^{-1} a sobreposição das bandas intensas de carbonila de cetona α - β -insaturada e de uma amida.

Figura 22. Espectro de IV da substância **C3** (HILARIO, et al., 2020)



No espectro de RMN de ^1H das substâncias **C3** e **C4** (Tabela 05, Figura 25) foram observados sinais aos pares por todo o espectro, a integração indicou a presença de 32 hidrogênios, sendo atribuídos os sinais de 16 hidrogênios para **C3** e de 16 hidrogênios para **C4**, devido estarem na razão de 2:1. Foram observados três sinais de hidrogênios olefínicos que foram atribuídos para cada estrutura **C3** e **C4**, respectivamente: δ_{H} 7,52 e 7,48 (*d*, $J=12$ Hz, H-3); 5,84 e 5,82 (*d*, $J = 12$ Hz, H-4); 5,65 e 5,57 (*t*, $J=7.5$ Hz, H-7). Os hidrogênios H-3 e H-4 estão ligados em dupla ligação no anel ciclohexanona, indicando que esses hidrogênios estão em *cis*.

Os sinais característicos de hidrogênios diastereotópicos de dois grupos metilênicos foram observados em δ_{H} 2,14 (*m*, H₂-4'a) e 1,82 (*m*, H₂-4'b); 1,86 (*m*, H₂-8a) e 1,79 (*m*, H₂-8b). Adicionalmente, dois sinais de hidrogênios metínicos foram observados em δ_{H} 4,11 e 3,91 (*t*, H-3'); outros dois sinais de hidrogênios metínicos oxigenados foram observados em δ_{H} 4,47 e 4,46 (*d*, $J=6,5$ Hz, H-6). A presença de grupos metoxila foi observada em δ_{H} 3,86 e 3,84 (*s*, N-OMe-10). Por fim, dois grupos metilas em δ_{H} 0,96 e 0,95 (*t*, $J=7,5$ Hz, H₃-9).

Tabela 05. Dados RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) das substâncias **C3-C4**

Posição	C3 ^{a,b}		C4 ^{a,b}	
	δ_{C}	δ_{H} m (J) ^c	δ_{C}	δ_{H} m (J) ^c
1	59,9 (C)	–	60,6 (C)	–
2	130,0 (C)	–	131,5 (C)	–
3	142,8 (CH)	7,52 <i>d</i> (12,0)	143,1 (CH)	7,48 <i>d</i> (12,0)
4	124,0 (CH)	5,84 <i>d</i> (12,0)	124,2 (CH)	5,82 <i>d</i> (12,0)
5	198,6 (C)	–	199,1 (C)	–
6	73,1 (CH)	4,47 <i>d</i> (6,5)	73,2 (CH)	4,46 <i>d</i> (6,5)
7	141,0 (CH)	5,65 <i>t</i> (7,5)	142,8 (CH)	5,57 <i>t</i> (7,5)
8	22,4 (CH ₂)	1,86 <i>m</i>	22,4 (CH ₂)	1,86 <i>m</i>
		1,79 <i>m</i>		1,79 <i>m</i>
9	14,2 (CH ₃)	0,96 <i>t</i> (7,5)	14,3 (CH ₃)	0,95 <i>t</i> (7,5)
2'	152,4 (C)	–	152,7 (C)	–
3'	58,8 (CH)	4,11 <i>t</i> (13,2)	58,8 (CH)	3,91 <i>t</i> (13,2)
4'	28,3 (CH ₂)	2,14 <i>m</i>	28,3 (CH ₂)	2,14 <i>m</i>
		1,82 <i>m</i>		1,82 <i>m</i>
5'	200,7 (C)	–	200,8 (C)	–
6'	130,0 (C)	–	130,1 (C)	–
7'	166,1 (C)	–	167,6 (C)	–
10	65,0 (OCH ₃)	3,86 <i>s</i>	65,3 (OCH ₃)	3,84 <i>s</i>
6'-OH	–	7,92 <i>sL</i>	–	7,92 <i>sL</i>

^a δ em ppm (ref. TMS); ^b solvente deuterado utilizado DMSO-*d*6; ^c *J* em Hz. (HILARIO, et al., 2020)

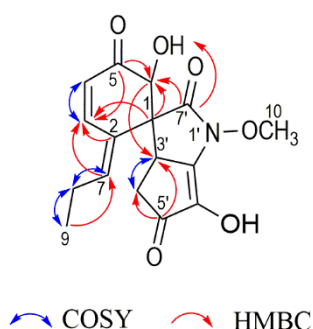
No experimento de 1H–1H *g*COSY (Figura 27) é evidente a correlação entre os hidrogênios olefínicos H–3 e H–4. O sistema de *spin* foi observado de H–7 acoplado com ambos os hidrogênios do grupo metileno de H₂–8, assim como os do grupo metila de H₃–9. Além disso, foi observado a correlação de H–3' acoplado com os hidrogênios do grupo metileno de H₂–4', as principais correlações estão apresentadas na Figura 23.

Os dados de RMN de ^{13}C (Figura 26) e *g*HSQC (Figura 28) de **C3** e **C4** apresentaram variedade de sinais, existindo majoritariamente em pares por todo o espectro. Foi possível confirmar a presença de 32 carbonos, sendo atribuído 16 carbonos para cada isômero, correspondentes a três carbonos metínicos sp^2 (C–3, C–4 e C–7), incluindo outros dois carbonos quaternários sp^2 (C–2 e C–6'), um carbono quaternário sp^3 (C–1), dois metilenos (C–4' e C–8), um grupo N–metoxi (C–10), um grupo metila (C–9), um carbono carbinólico (C–6). Também foram observados os sinais de três grupos carbonilas (C–5, C–5' e C–7').

O mapa de contorno *g*HMBC (Figura 29) possibilitou verificar as correlações a 3J existentes entre o hidrogênio H–3' com os carbonos C–1 e C–6 evidenciando a junção da ciclohexanona com o anel lactama. A cadeia lateral 1-propenil foi atribuída em C–2 pelos

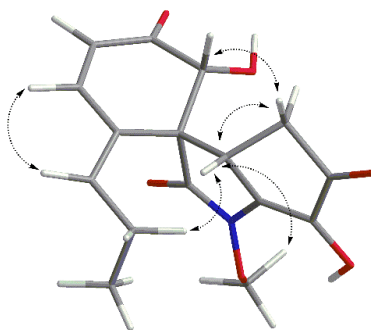
acoplamentos observados entre H-3 e C-1 e confirmada a partir das correlações do H-3 com C-2 e C-7. Estes resultados permitiram que os deslocamentos químicos fossem atribuídos a todos os carbonos e hidrogênios correspondentes (Tabela 05, Figura 23). As estruturas químicas foram confirmadas pelos dados da análise ESI-QTOF-HRMS (Figura 31) exibindo um íon em m/z 320,1137 $[M+H]^+$ (calc. 320,1134) identificando juntamente com os demais dados de RMN a fórmula molecular como $C_{16}H_{18}NO_6$.

Figura 23. Principais correlações observadas nos experimentos g COSY e g HMBC para os compostos **C3** e **C4** (HILARIO, et al., 2020)



A configuração relativa do estereocentro em C-6 da substância **C4** foi observada pela correlação no espectro NOESY (Figuras 32-34) entre H-6 com H-3', sendo essa interação ausente para **C3**. Portanto, a configuração relativa em C-6 foi determinada como sendo S^* em **C4** e R^* em **C3**

Figura 24. Principais correlações observadas no experimento NOESY para o composto **C3**
Adaptado de: (HILARIO, et al., 2020).



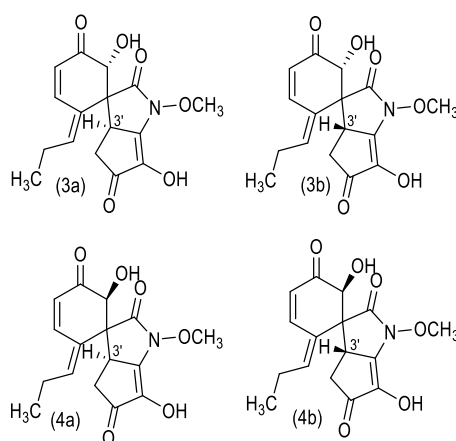
A configuração absoluta do carbono situado na posição 3' dos compostos **C3** e **C4** foi determinada por estudos de análise computacional (item 4.8). As tabelas de correlação ^1H e ^{13}C das estruturas em avaliação são apresentadas nas Tabelas 06 e 07. Esta etapa resultou em 16 confôrmers para as estruturas **3A** e **4A** e 20 confôrmers para as estruturas **3B** e **4B**.

A análise do Erro Médio Absoluto (MAE) para o ^1H está apresentada na Tabela 06, onde foi possível observar que os desvios químicos calculados da mistura diastereoisomérica de **C3** e **C4** apresentaram melhor correlação com as subestruturas do grupo A (Figura 25), o que significa que o hidrogênio ligado ao C-3' está situado para trás do sistema de anéis bicíclicos. Observa-se também que erro absoluto, para o par B (Figura 24 e Tabela 06) é aproximadamente 1,6 vezes maior para ambos os casos.

Tabela 06. Erro absoluto calculado próton ($|\Delta\delta|$) e Erro Médio Absoluto (MAE) para as estruturas candidatas **C3** e **C4** como calculadas com B3LYP/6-311+G (2d, p)//M06-2X/6-31+G(d, p) teoria de nível. (HILARIO, et al., 2020)

	^1H			
	A_{avg}		B_{avg}	
	MAE	$ \Delta\delta $	MAE	$ \Delta\delta $
3_{exp}	0,25	2,77	0,41	4,50
4_{exp}	0,26	2,89	0,43	4,68

Figura 24A. Estruturas químicas avaliadas por análise computacional (HILARIO, et al., 2020)



Esta tendência é revertida para as correlações feitas a partir dos deslocamentos químicos para ^{13}C , pois o MAE e o erro absoluto para as subestruturas do grupo B são as que tiveram os deslocamentos químicos de ^{13}C calculados a partir desse nível de teoria, não são então úteis

para uma distinção clara entre estereoisômeros e, portanto, é possível afirmar com segurança que as análises de ^1H são mais relevantes para este estudo (WIITALA; CRAMER; HOYE, 2007; WILLOUGHBY; JANSMA; HOYE, 2014). Assim, os desvios químicos calculados indicam que o estereocentro C-3' tem configuração absoluta como sendo S.

Tabela 07. Erro absoluto calculado para carbono ($|\Delta\delta|$) e Erro Médio Absoluto (MAE) para as estruturas candidatas **C3** e **C4** calculadas por B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p) teoria de nível. (HILARIO, et al., 2020)

^{13}C				
	A_{avg}		B_{avg}	
	MAE	$ \Delta\delta $	MAE	$ \Delta\delta $
3_{exp}	4,38	70,08	4,01	64,19
4_{exp}	4,43	70,95	3,99	63,87

As estruturas químicas de **C3** e **C4** foram caracterizadas respectivamente como sendo a (1*S**,2*Z*,3*Z*,3'*S*,6*R**)- e (1*S**,2*Z*,3*Z*,3'*S*,6*S**)-6,6'-diidroxí-1'-metoxi-2-propilideno-3',4'-diidro-2'*H*-espiro[cicloexeno-1,3'-ciclopenta[b]pirrol]-3-eno-2',5,5'(1'*H*)-triona (Figura 30). As γ -lactamas espiro-cíclicas (**C3**) e (**C4**) foram publicadas recentemente como novos metabólitos descritos na literatura (HILARIO et al., 2020).

Semelhantemente as triticonas E (**C1**) e F (**C2**), os compostos **C3** e **C4** foram obtidos como uma mistura de formas interconvertíveis (2:1). Mesmo após o extenso trabalho cromatográfico, não foi possível o isolamento dos isômeros. As duas novas γ -lactamas espirocíclicas **C3** e **C4** são interessantes compostos similares às triticonas e possivelmente podem compartilhar semelhanças biogênicas com espirostafilettriquinas/triticonas.

Assim como nas triticonas E (**C1**) e F (**C2**), nas γ -lactamas espirocíclicas (**C3**) e (**C4**) a única diferença existente é a configuração C-6, sendo também obtidas como uma mistura epimérica inseparável. Existem evidências de que toda a classe química deve ser considerada biossintética ou intermediária apenas quando a configuração absoluta de C-6 foi caracterizada (WALSER-VOLKEN; TAMM, 1996).

Controversamente, em trabalhos recentes, outros compostos têm sido descritos como produtos naturais, mesmo ausente a descrição de determinação da configuração absoluta (GOMEZ et al., 2018; MASI et al., 2014; RAWLINSON et al., 2019). Por esse lado, as duas novas γ -lactamas espirocíclicas (**C3**) e (**C4**) estão sendo relatadas como um novo produto natural devido à sua característica híbrida de um diastereoisômero e um composto semelhante a triticona devido ao núcleo γ -lactâmico espirocíclico na estrutura.

Figura 25. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) das substâncias **C3** e **C4** (HILARIO, et al., 2020)

Felipe FJ(5)-pico3

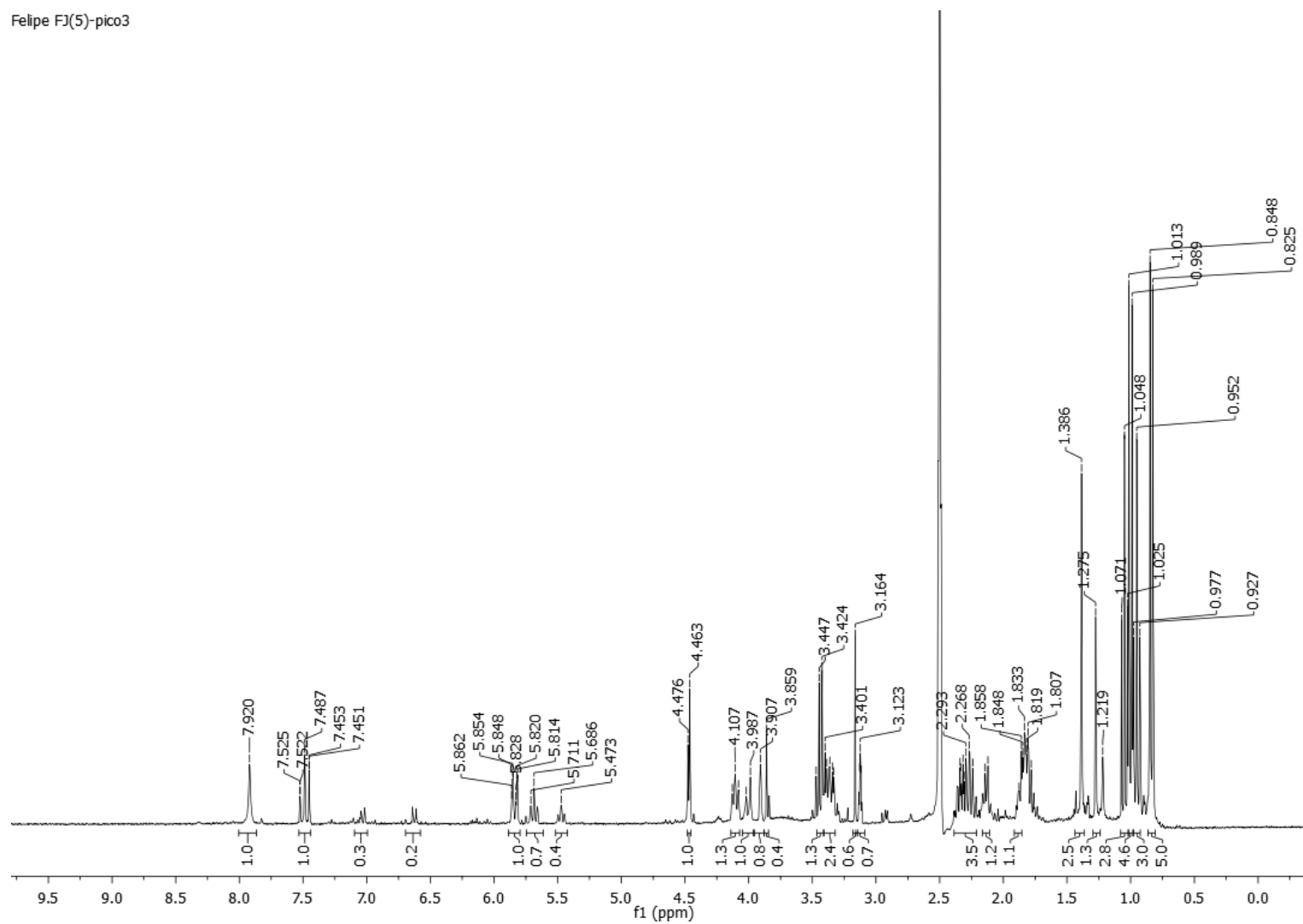


Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) das substâncias **C3** e **C4** (HILARIO, et al., 2020)

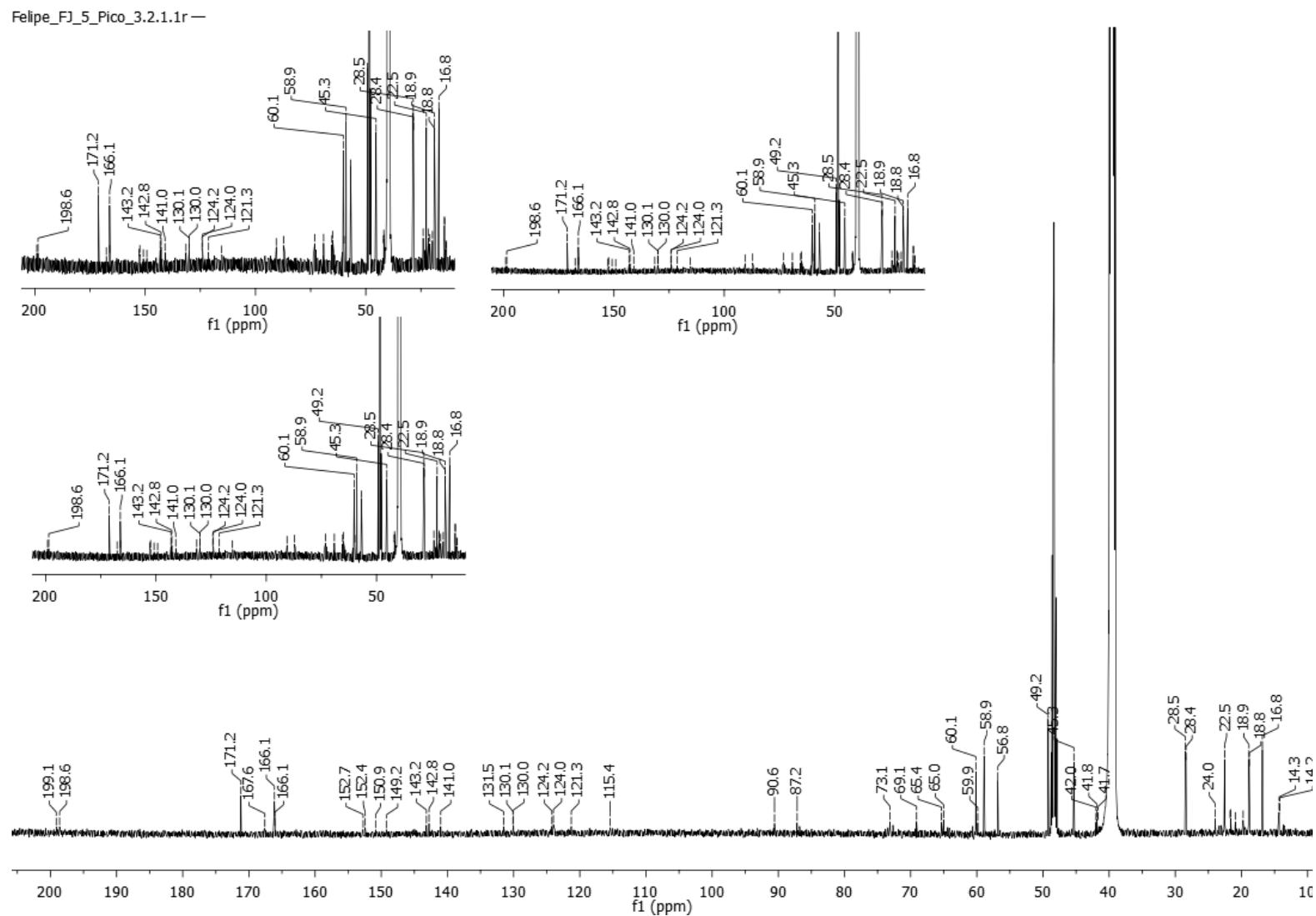


Figura 27. Espectro de *g*COSY (DMSO-*d*₆) das substs. **C3** e **C4** (HILARIO, et al., 2020)

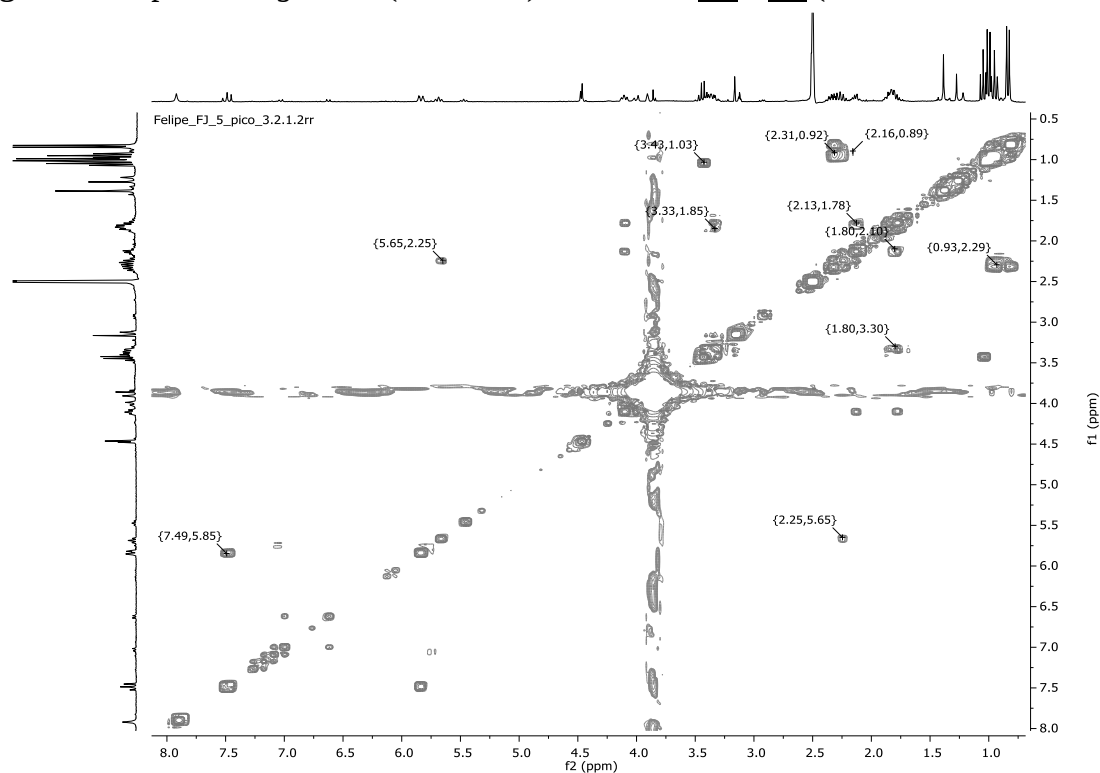


Figura 28. Mapa de contorno *g*HSQC (DMSO-*d*₆) de **C3** e **C4** (HILARIO, et al., 2020)

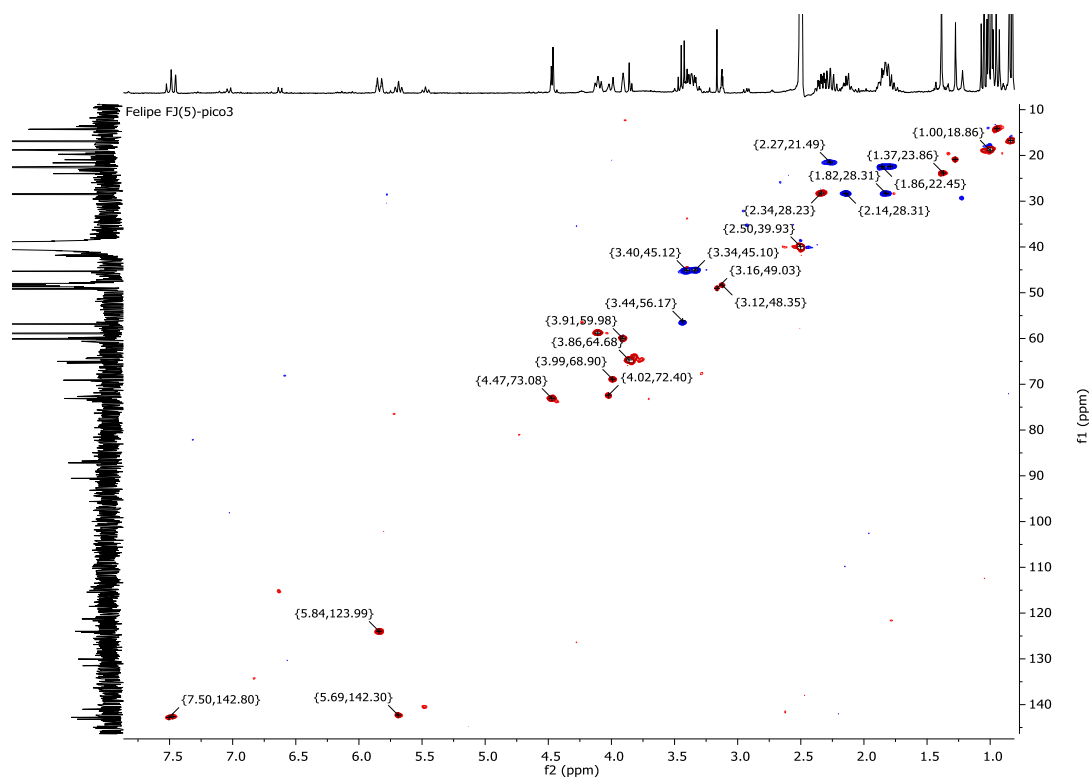


Figura 29. Mapa de contorno gHMBC (DMSO-d₆) de C3 e C4 (HILARIO, et al., 2020)

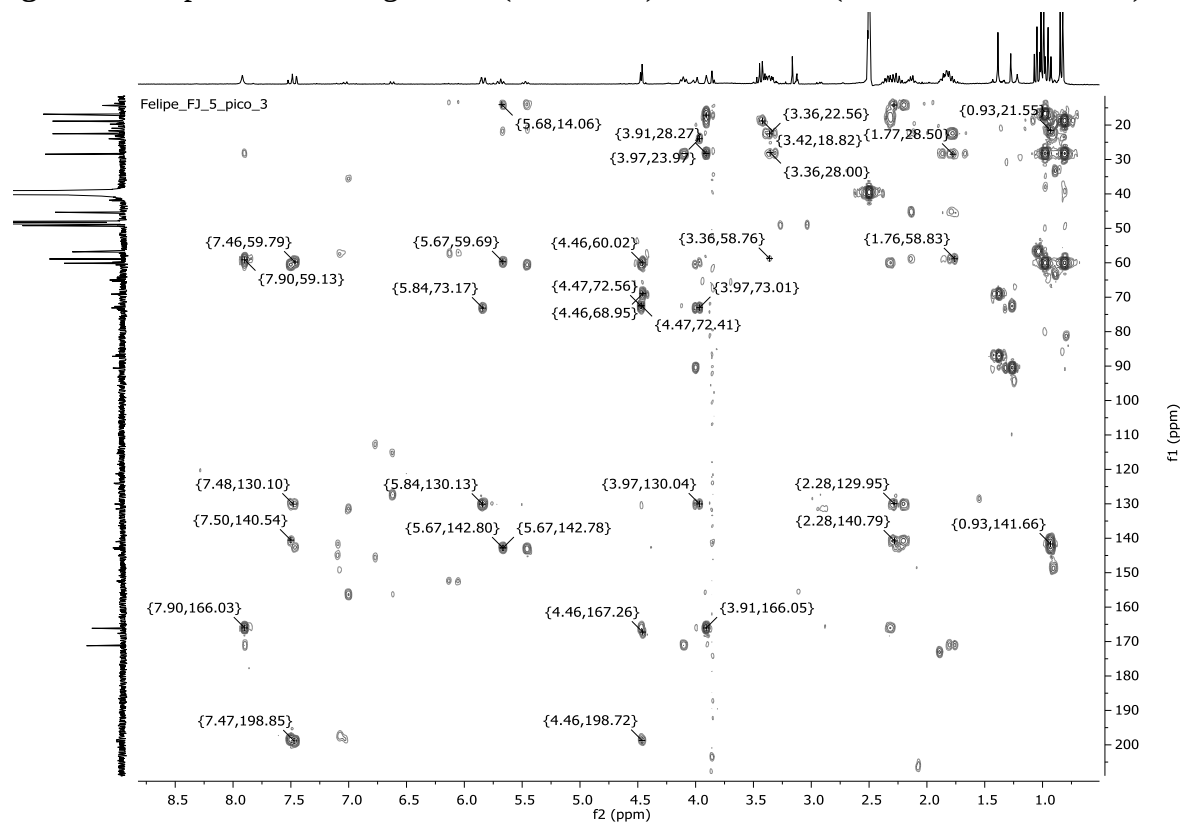


Figura 30. Estruturas químicas das substâncias **C3** e **C4**: (HILARIO, et al., 2020)

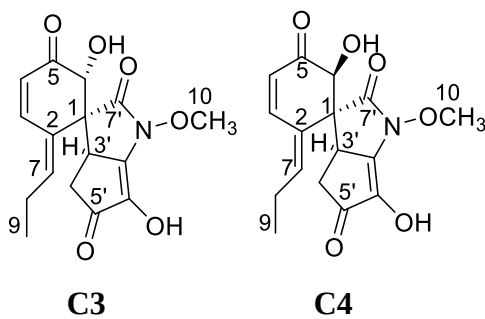


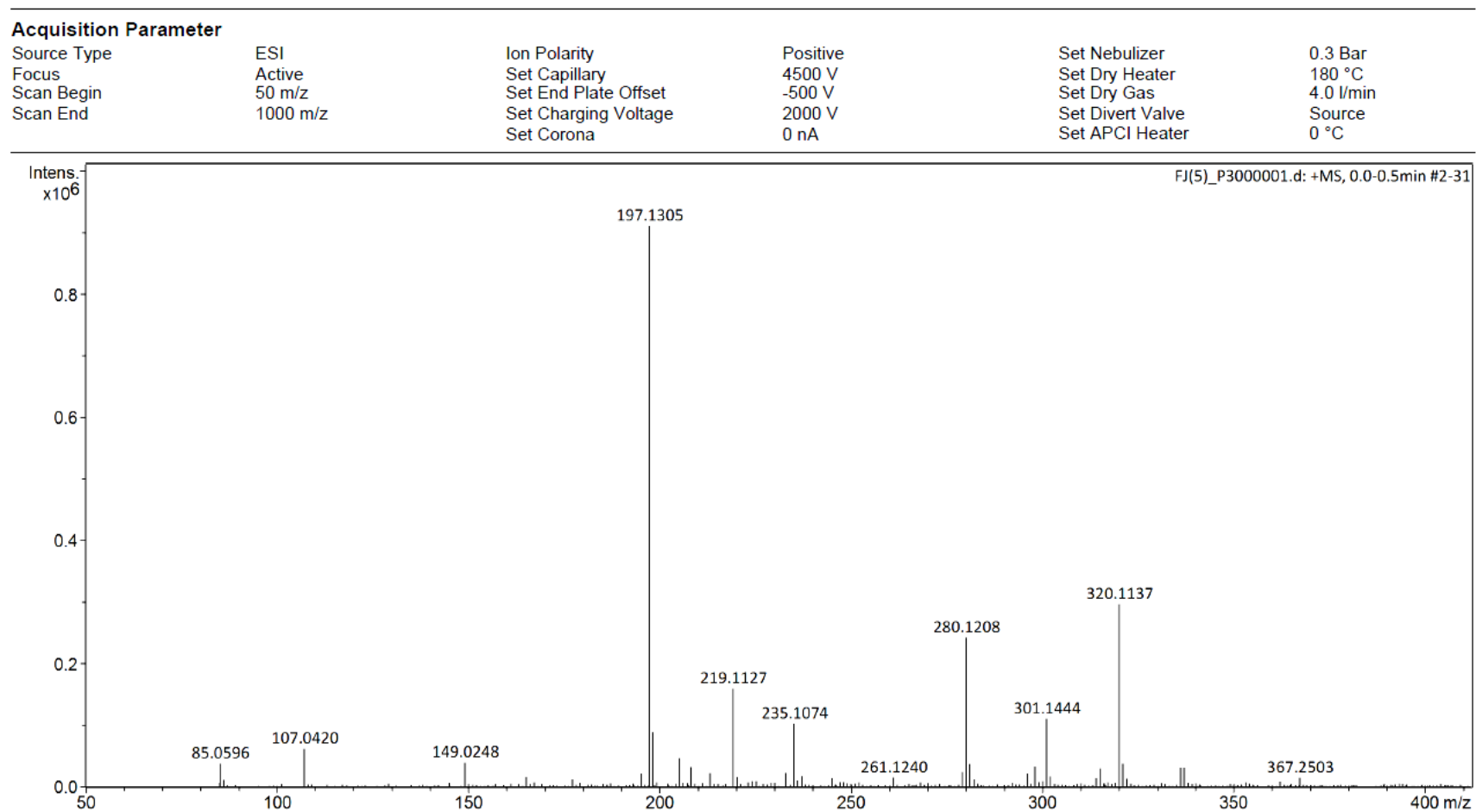
Figura 31. Espectro de massas ESI-QTOF-HRMS (modo positivo) das substâncias **C3** e **C4** (HILARIO, et al., 2020)

Figura 32. Dado de RMN de NOESY (sinal em δ 4,10 ppm) das substâncias **C3** e **C4** (600 MHz, DMSO- d_6) (HILARIO, et al., 2020)

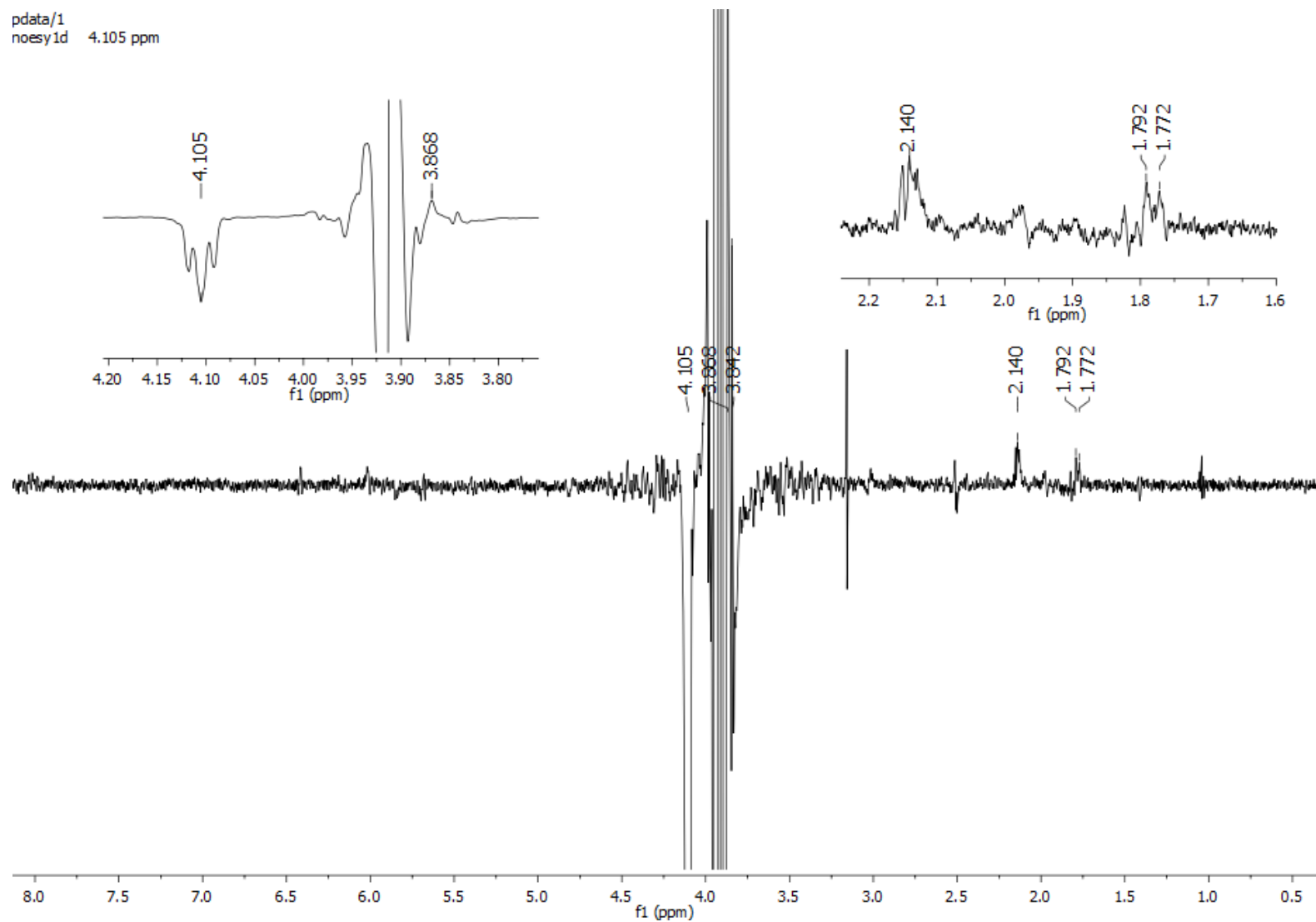


Figura 33. Dado de RMN de NOESY (sinal irradiado em δ 5,67 ppm) das substâncias **C3** e **C4** (600 MHz, DMSO- d_6) (HILARIO, et al., 2020)

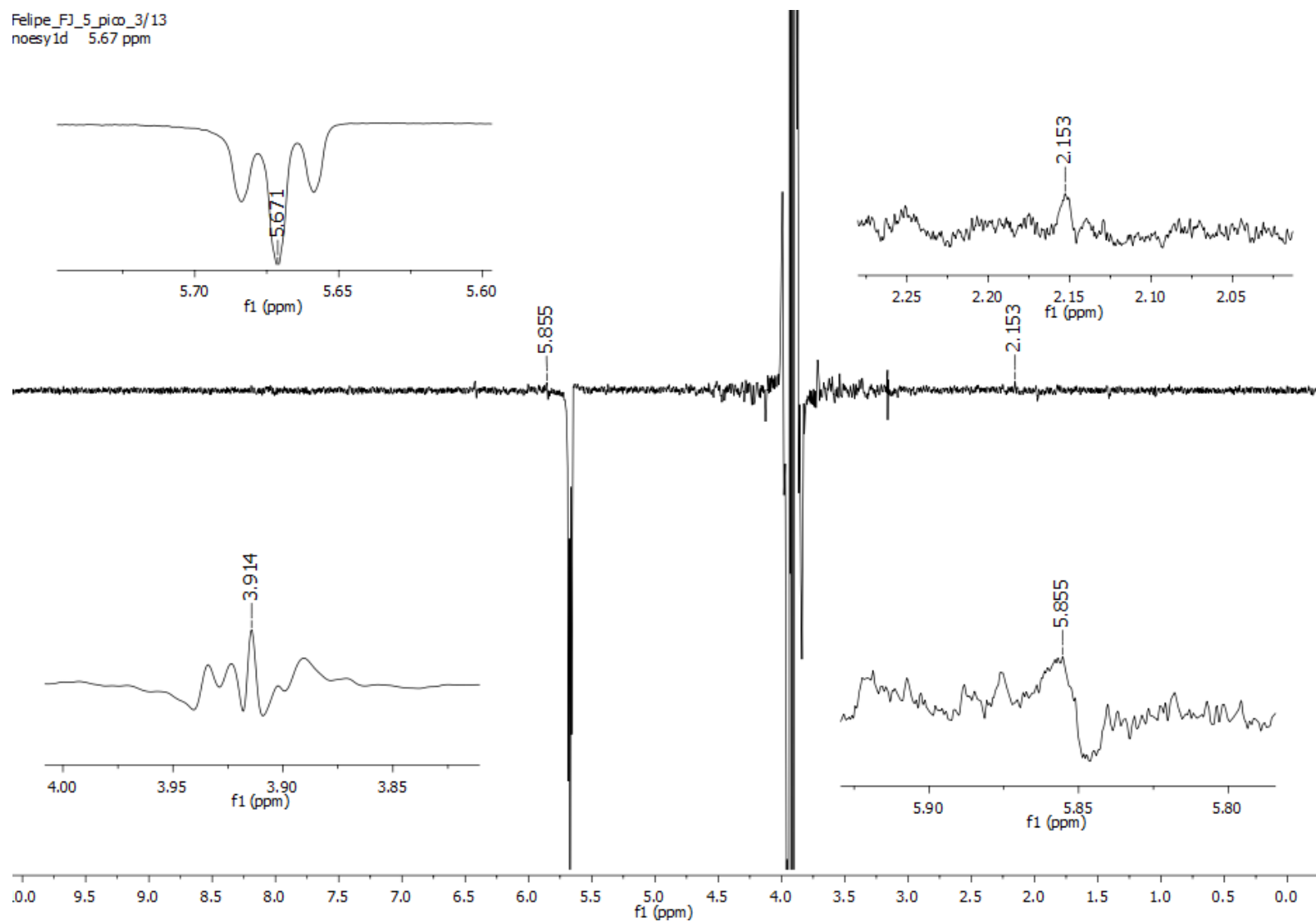
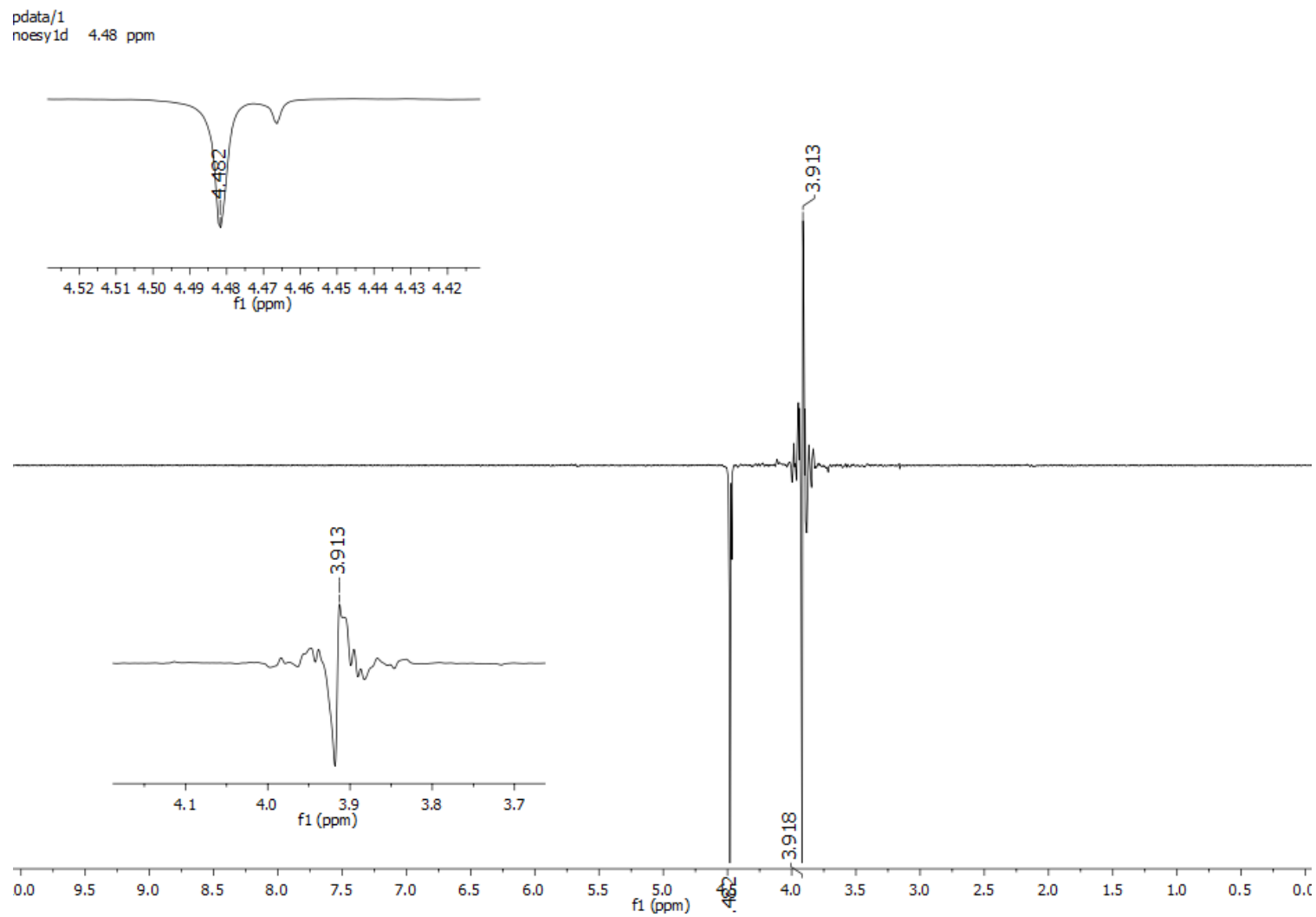


Figura 34. Dado de RMN de NOESY (sinal irradiado em δ 4,48 ppm) das substâncias **C3** e **C4** (600 MHz, DMSO- d_6) (HILARIO, et al., 2020)



5.6.3 Substâncias **C5** e **C6**

O espectro de RMN de ^1H das substâncias **C5** e **C6** (Tabela 08, Figuras 36 e 41, respectivamente) foram observados dois sinais de hidrogênios aromáticos em δ 6,36 e 6,31 (*d*, $J = 2,5$ Hz) para **C5** e em δ 6,27 e 6,12 (*d*, $J = 2,4$ Hz) para **C6** referentes a hidrogênios *meta*-acoplados, que foram atribuídos aos hidrogênios H-4 e H-6, respectivamente.

O deslocamento químico de hidrogênios metilênicos foi observado em δ 3,52 (**C5**) e δ 3,49 (**C6**), correspondente aos hidrogênios na posição H-7. Tanto no espectro de RMN de ^1H de **C5** como no de **C6** foi visto um singlete respectivamente em δ 2,49 e 2,38 correspondentes a uma metila (CH_3 -10). Enquanto **C5** apresentou um singlete em δ 3,71, correspondente a uma metoxila (OCH_3 -5) em **C6** apresentou um singlete em δ 10,10, sendo este sinal atribuído ao hidrogênio do grupo hidroxila (OH -5).

O experimento de ^1H - ^1H *g*COSY (Figuras 37 e 42) não apresentou informação estrutural para nenhuma das substâncias **C5** e **C6**.

O experimento *g*HSQC (Figuras 38 e 43) possibilitou atribuir os hidrogênios a seus respectivos carbonos e estão demonstrados na Tabela 08.

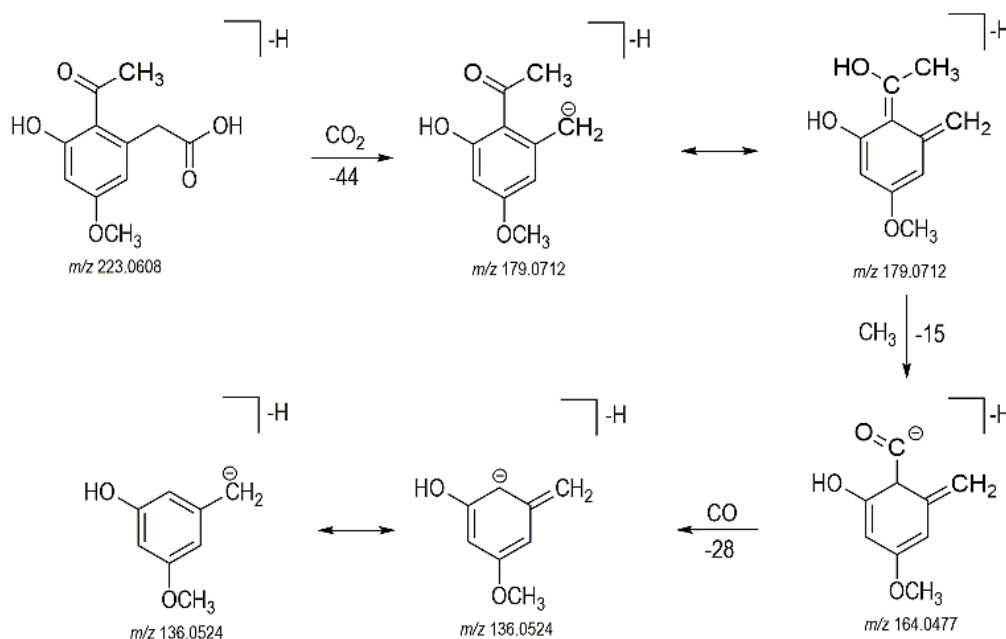
No espectro de *g*HMBC (Figuras 39 e 44) pode-se observar sinais de carbonos referentes as carbonilas de cetonas em δ 203,0 e 202,3 e de ácidos carboxílicos em δ 172,7 e 172,6 em **C9** e **C8**, respectivamente. Estes deslocamentos químicos puderam ser observados pela correlação a 3J existente entre os hidrogênios em H_3 -10 com o carbono do grupo cetona em $\text{C}=\text{O}$ -9. Também foi observado a correlação a 3J entre os hidrogênios em H_2 -7 com a carbonila ácido carboxílico em COOH -8.

A correlação dos hidrogênios aromáticos de **C5** foi observada respectivamente entre o hidrogênio em δ 6,36 (H-4) com os carbonos em δ 109,0 (C-6), 121,0 (C-1), 135,0 (C-2), 157,0 (C-3) e 165,0 (C-5), e entre o hidrogênio em δ 6,31 (H-6) com os carbonos δ 39,0 (C-7), 100,0 (C-3), 121,0 (C-1), 157,0 (C-3) e 165,0 (C-5). Como mostrado na Tabela 08, as correlações observadas para os hidrogênios aromáticos de **C6** em δ 6,27 (H-4) e 6,12 (H-6) foram semelhantes de **C5**. Portanto, pode-se verificar pelas análises do experimento *g*HMBC que tanto para **C5** quanto como para **C6**, o padrão de substituição do anel aromático é o mesmo.

O espectro de HRMS de **C5** (modo negativo, Figura 40) evidenciou o íon da molécula desprotonada em m/z 223,0608 $[M - H]^-$ (calculado 223,0606). Observa-se ainda a perda de 44 Da que foi atribuída a uma molécula de CO_2 $[M - 44 - H]^-$ fornecendo o íon em m/z 179,0712. Seguido da perda de um grupo metila $[M - 44 - 15 - H]^-$, íon em m/z 164,0477 e a partir deste a perda de CO $[M - 44 - 15 - 28 - H]^-$, m/z 136,0524 (Figura 35) confirmando que esta molécula possui a fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_5$. Portando esta molécula foi identificada como sendo ácido 5-O-metilcurvulínico (Figura 46). Estudos realizados por Guarantini et al., (2006) evidenciam que eliminação em compostos aromáticos ocorre em modo positivo (moléculas protonadas e sodiadas) e em ionização no modo negativo (moléculas desprotonadas). Foi observado que as reações de eliminação podem ocorrer com íons moleculares radiculares ($M^{\cdot-}$) em sistemas Π conjugados gerados por ESI (DEMARQUE et al., 2016).

As reações de deslocamento são também um processo de fragmentação comum que leva à eliminação de CO e CO_2 de estruturas cíclicas. Nestes casos, a reação de deslocamento é precedida pela clivagem da ligação acíclica. A figura 35 traz uma proposta de fragmentação para a substância **C5**.

Figura 35. Proposta de fragmentação por ESI-MS de **C5** (HILARIO et al., 2020)



A análise ESI-QTOF-HRMS de **C6** (modo positivo, Figura 42) evidenciou o íon da molécula protonada em m/z 211,0602 $[M + H]^+$ (calculado 211,0608), sendo observado também o íon da molécula cationizada com sódio em m/z 223,0422 $[M + Na]^+$ (calculado 223,0426), confirmando que esta substância possui a fórmula molecular $C_{11}H_{12}O_5$. Portanto esta molécula foi identificada como sendo ácido curvulínico (Figura 46). Os dados de RMN de 1H e ^{13}C de **C6** são bastante similares com os registrados para **C5**, sendo análogas e tendo como diferença estrutural a presença de um grupo hidroxila na posição C-5 (**C6**) enquanto que nesta mesma posição há um grupo metoxila em **C5**, como confirmado pelos dados de HRMS.

Neste trabalho, está sendo descrito pela primeira vez a elucidação estrutural detalhada da substância **C5**. Poucos trabalhos foram realizados e estão disponíveis nos bancos de dados relatando estudos com **C5**, dentre eles podemos destacar os trabalhos publicados entre os anos de 1957-1980. (BOLLER et al., 1957; CLAYDON; ELGERSMA; GROVE, 1980; GROVE; POPLE, 1979; HARDEGGER et al., 1966).

Os espectros no UV de **C5** (λ_{max} 223, 269 e 300 nm) e de **C6** (λ_{max} 233, 269 e 300 nm) é característico de um composto aromático.

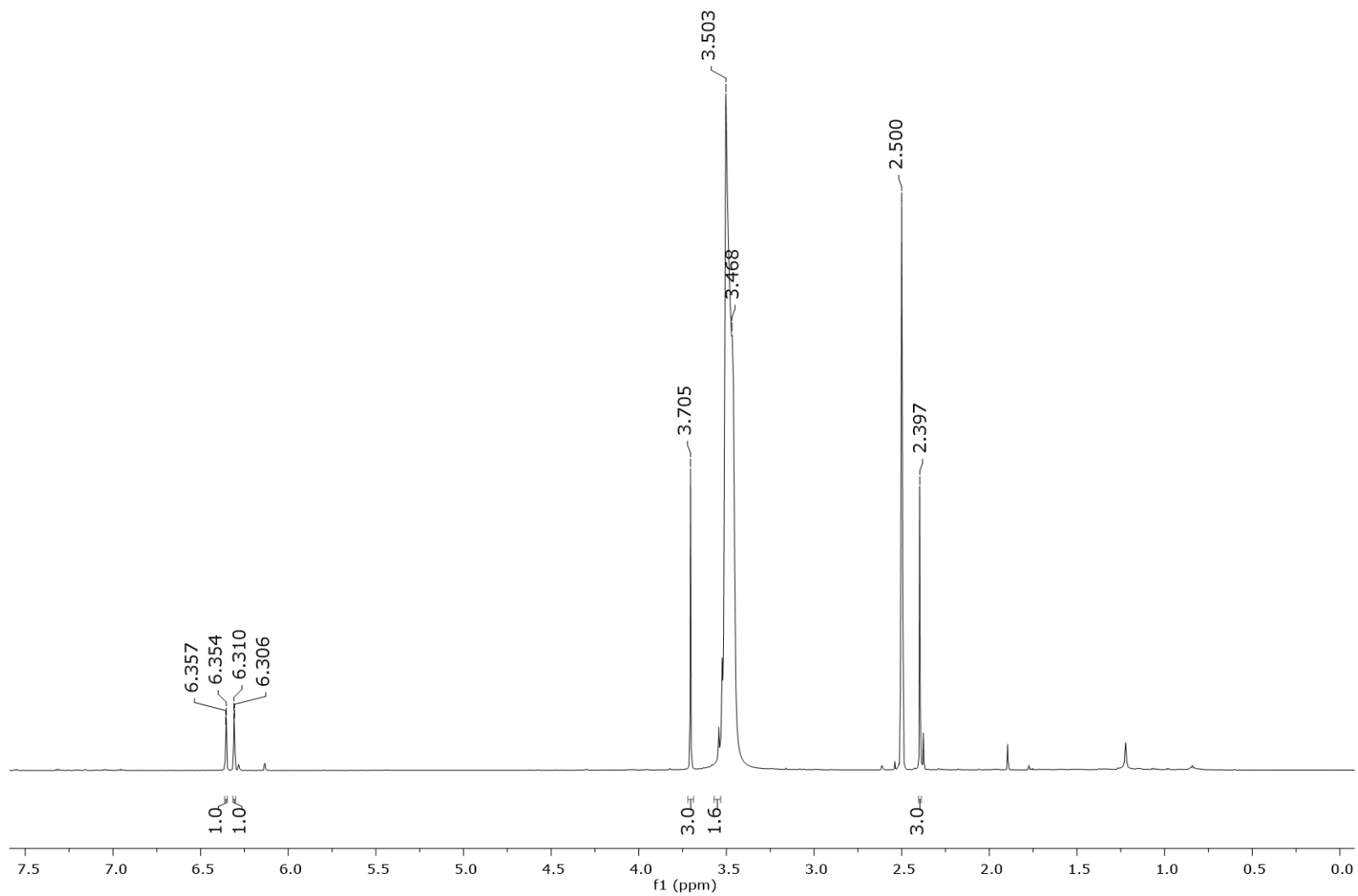
Tabela 08. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ -mono e bidimensionais das substâncias **C5** e **C6**

Posição	C5			C6		
	$^*\delta^{13}\text{C}^{\text{C}}$	$\delta^1\text{H}$ (<i>m</i> , <i>J</i> Hz)	HMBC	$^*\delta^{13}\text{C}^{\text{C}}$	$\delta^1\text{H}$ (<i>m</i> , <i>J</i> Hz)	HMBC
1	121,0 (Cq)	—	—	119,8 (Cq)	—	—
2	135,0 (Cq)	—	—	136,6 (Cq)	—	—
3	157,0 (Cq)	—	—	159,1 (Cq)	—	—
4	100,0 (CH)	6,36 (<i>d</i> , 2,5)	109,0; 121,0; 135,0; 157,0; 165,0	101,2 (CH)	6,27 (<i>d</i> , 2,4)	110,2; 119,8; 159,1
5	165,0 (Cq)	—	—	159,6 (Cq)	—	—
6	109,0 (CH)	6,31 (<i>d</i> , 2,5)	39,0; 100,0; 121,0; 157,0; 165,0	110,2 (CH)	6,12 (<i>d</i> , 2,4)	39,5; 101,2; 119,8; 159,1
7	39,0 (CH_2)	3,52 (<i>s</i>)	109,0; 121,0; 135,0	39,5 (CH_2)	3,49 (<i>s</i>)	110,2; 136,6; 172,6
8	172,7 (C=O)	—	—	172,6 (C=O)	—	—
9	203,0 (C=O)	—	118,4; 127,2	202,3 (C=O)	—	119,8; 127,2
10	31,8 (CH_3)	2,49 (<i>s</i>)	203,0	31,8 (CH_3)	2,38 (<i>s</i>)	203,0
5-OCH ₃	54,9 (CH_3)	3,70 (<i>s</i>)	165,0	—	—	—
5-OH	—	—	—	—	9,81 (<i>s</i>)	101,2; 119,8; 159,6

* Sinais atribuídos pela análise HSQC e HMBC

Figura 36. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **C5** (HILARIO, et al., 2020)

Felipe_H5_6_P1



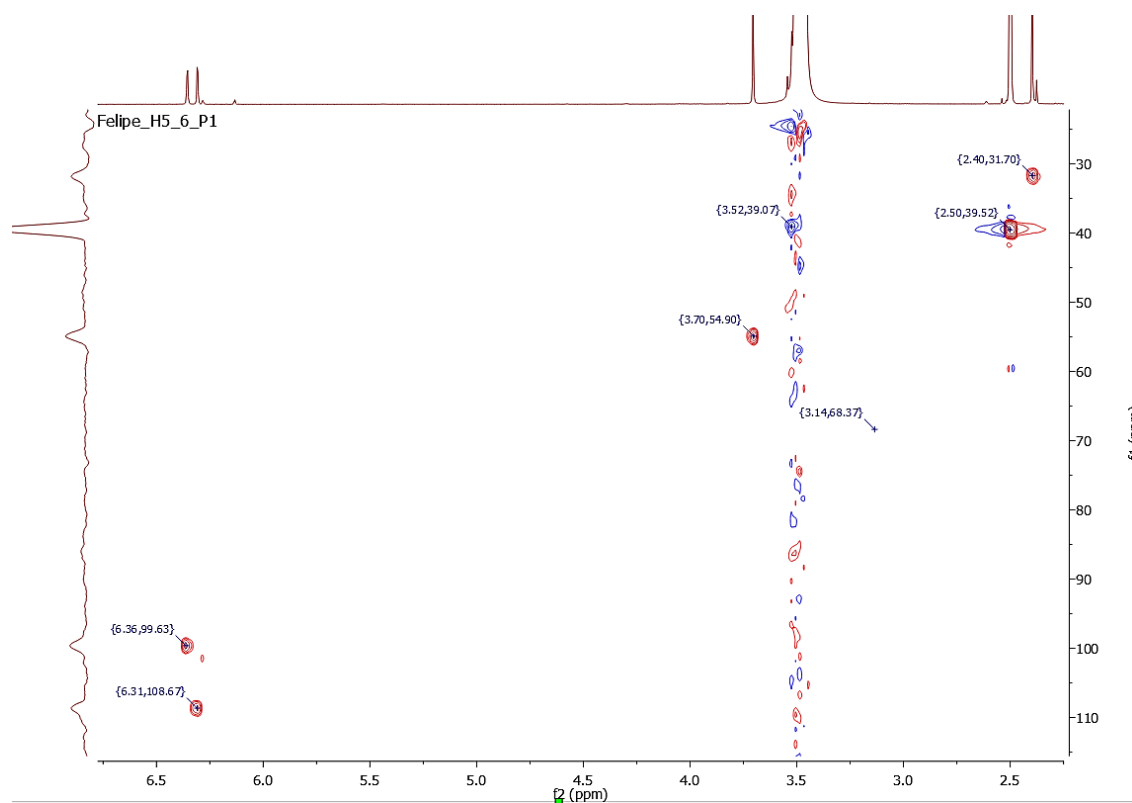


Figura 39. Mapa de contorno *g*HMBC (DMSO-*d*₆) de **C5** (HILARIO, et al., 2020)

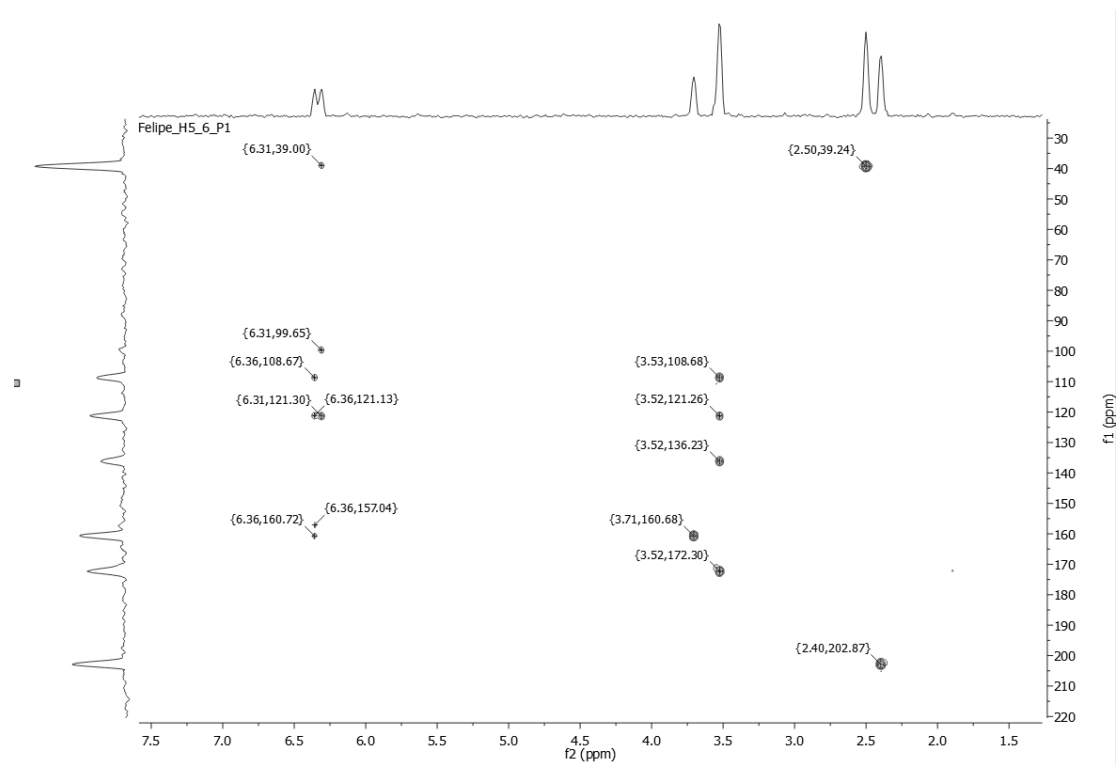


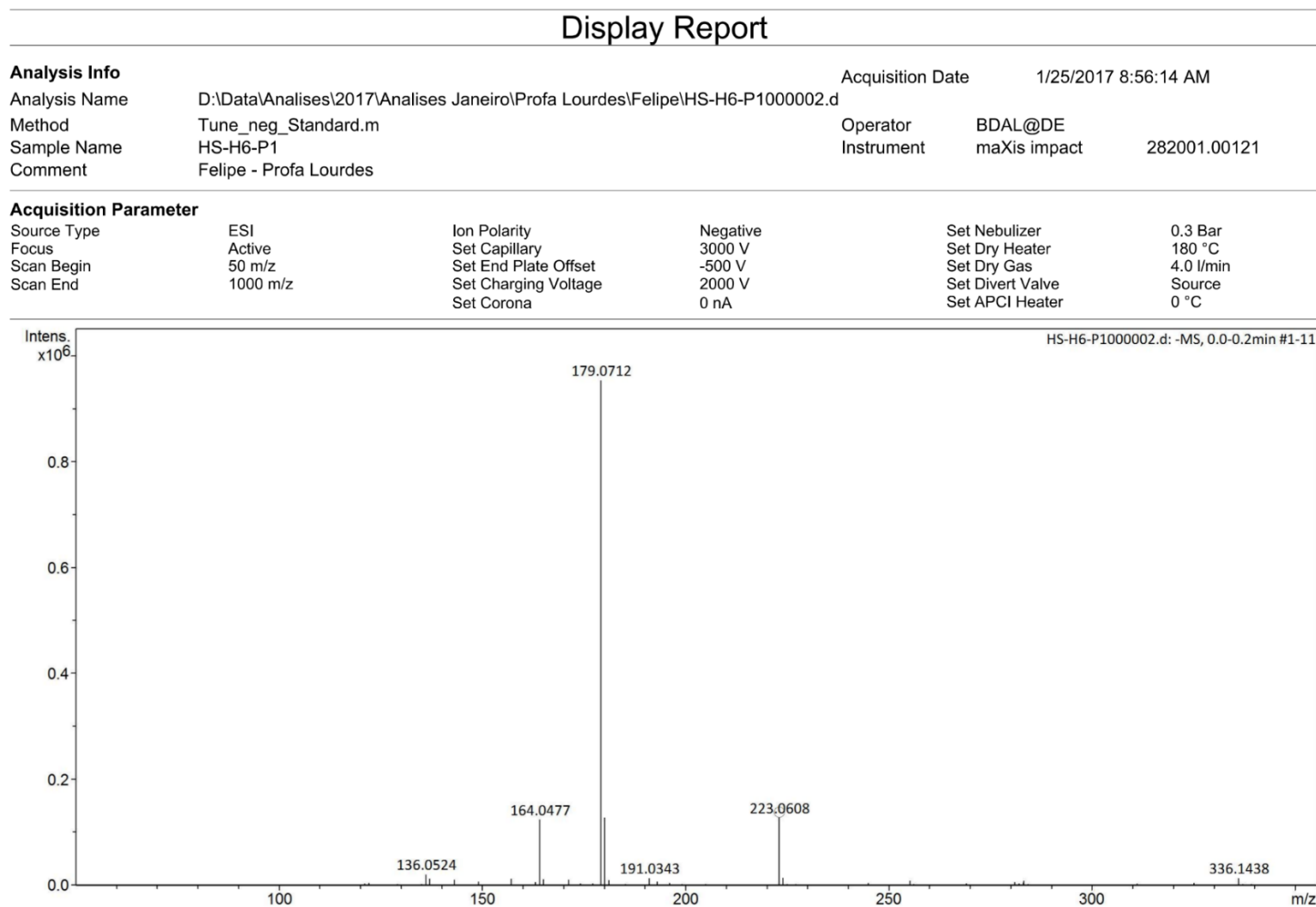
Figure 40. ESI-QTOF-HRMS (modo negativo) da substância **C5** (HILARIO, et al., 2020)

Figura 41. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) da substância **C6** (HILARIO, et al., 2020)

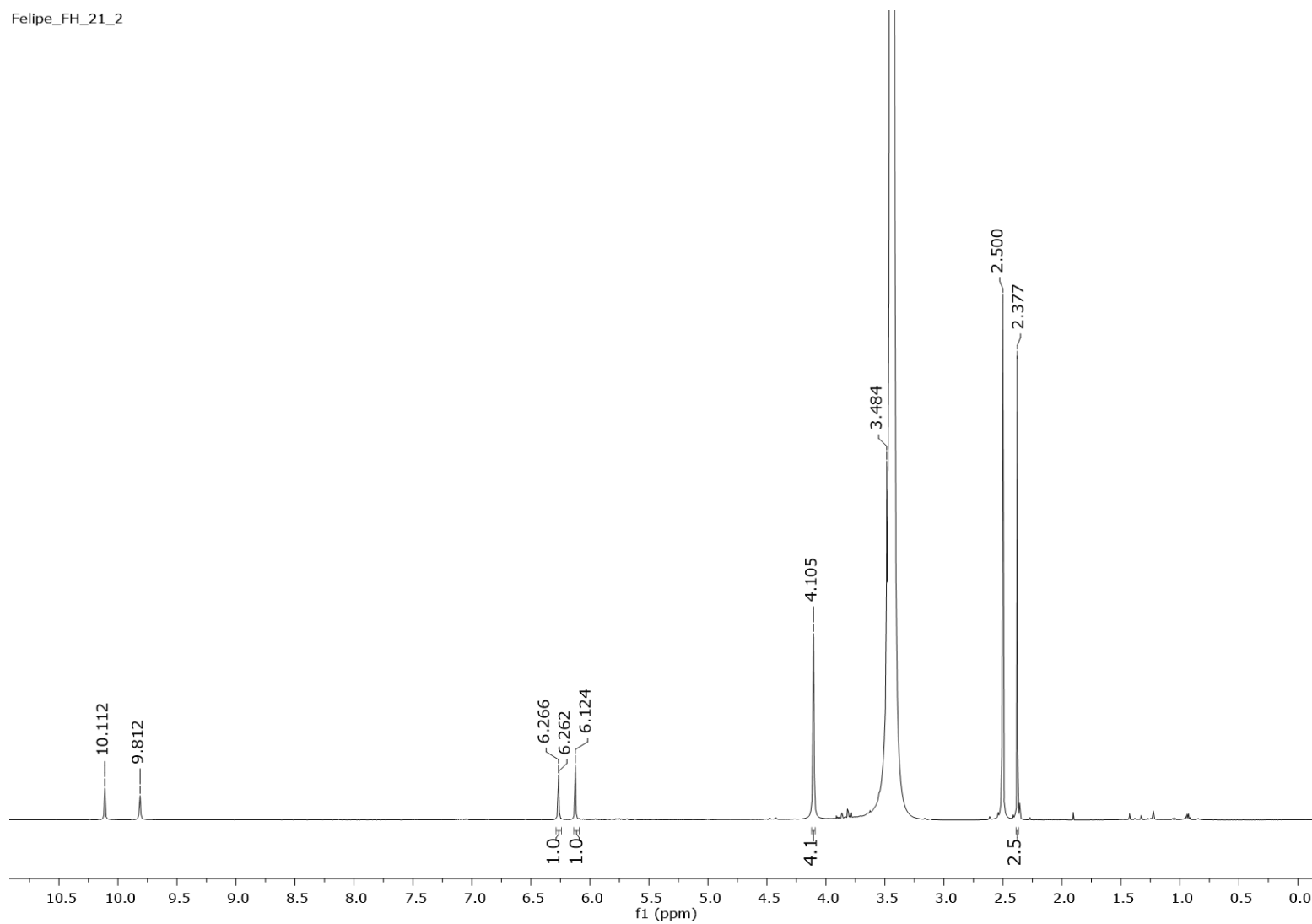


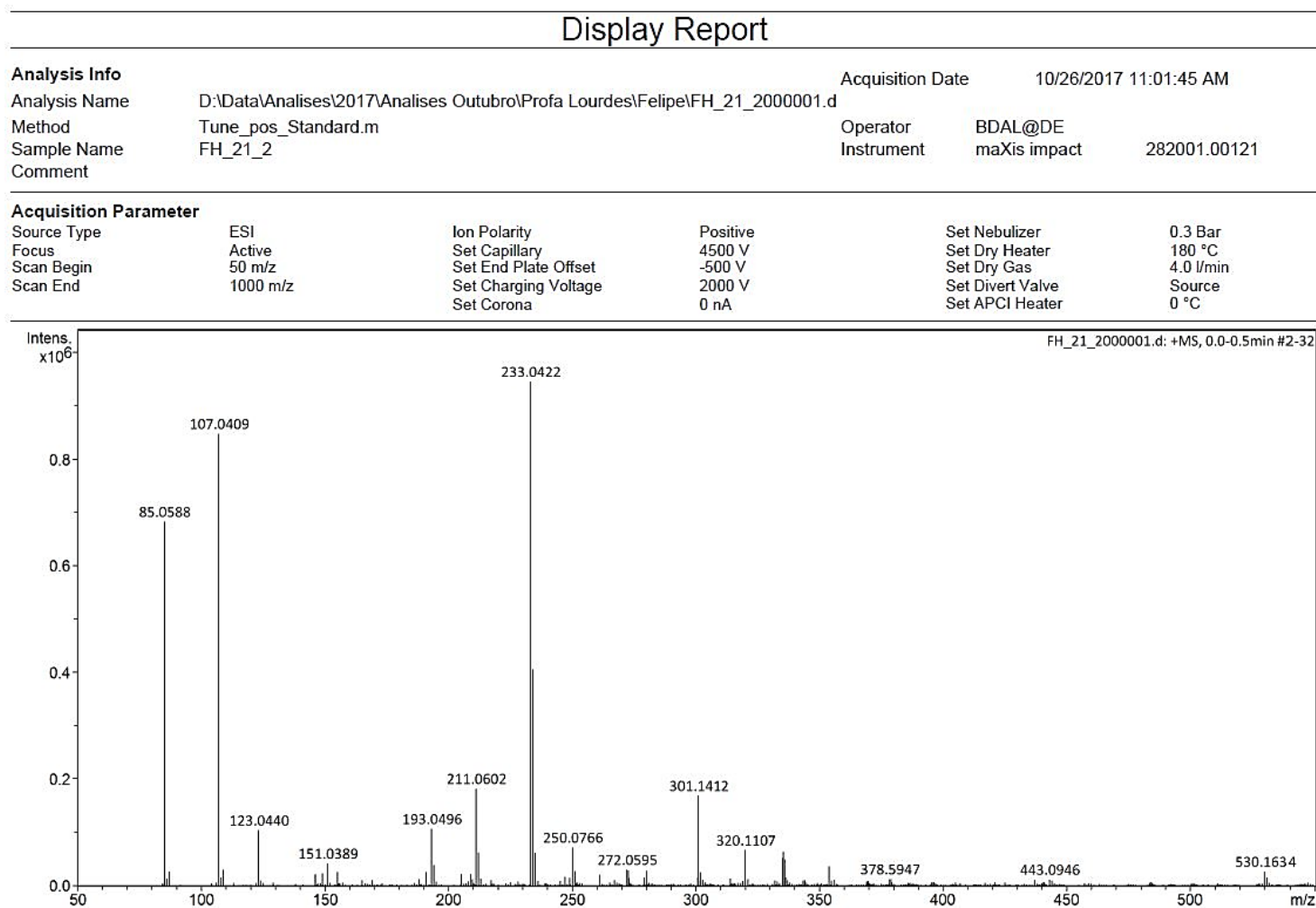
Figura 42. ESI-QTOF-HRMS (modo positivo) da substância **C6** (HILARIO, et al., 2020)

Figura 43. Espectro de ^1H - ^1H *g*COSY (600 MHz, DMSO- d_6) de **C6** (HILARIO, et al., 2020)

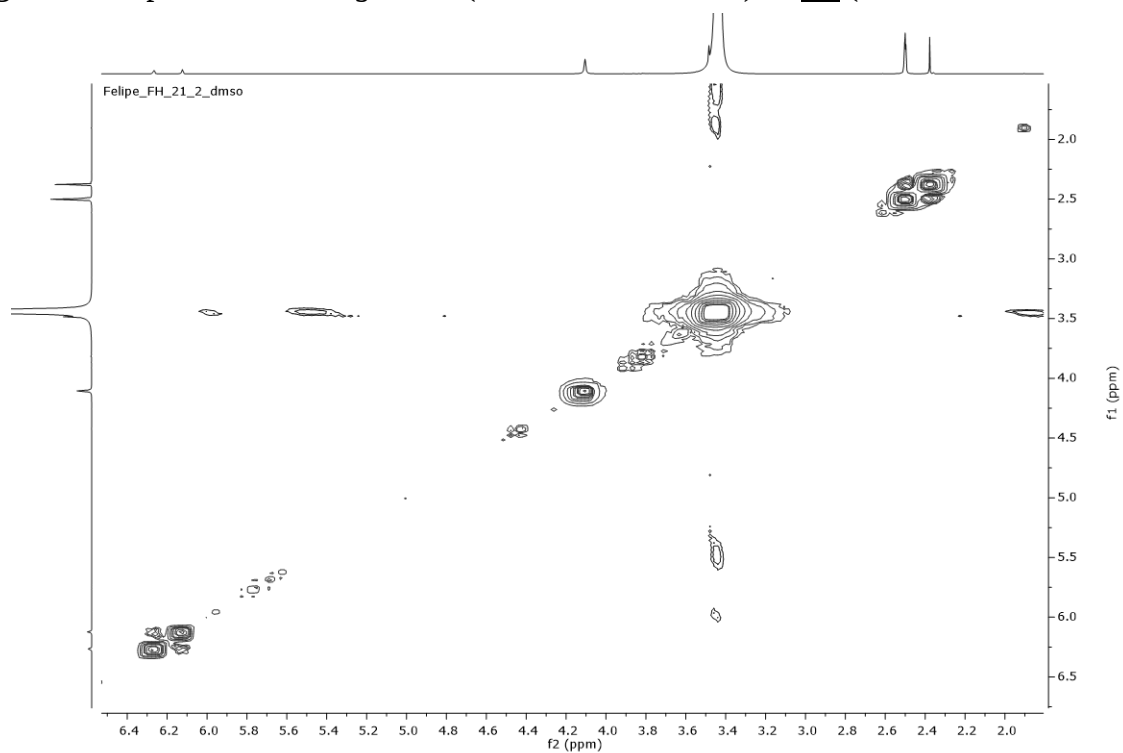


Figura 44. Mapa de contorno *g*HSQC (600 MHz, DMSO- d_6) de **C6** (HILARIO, et al., 2020)

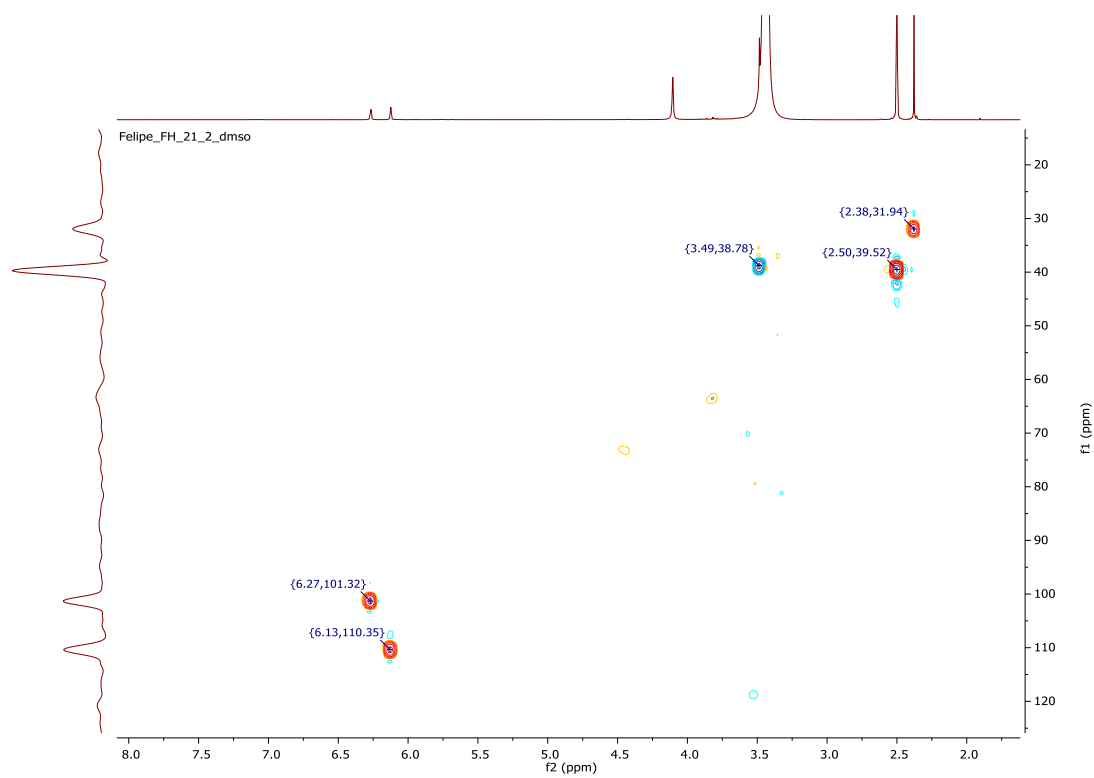


Figura 45. Mapa de contorno *g*HMBC (DMSO-*d*₆) de **C6** (HILARIO, et al., 2020)

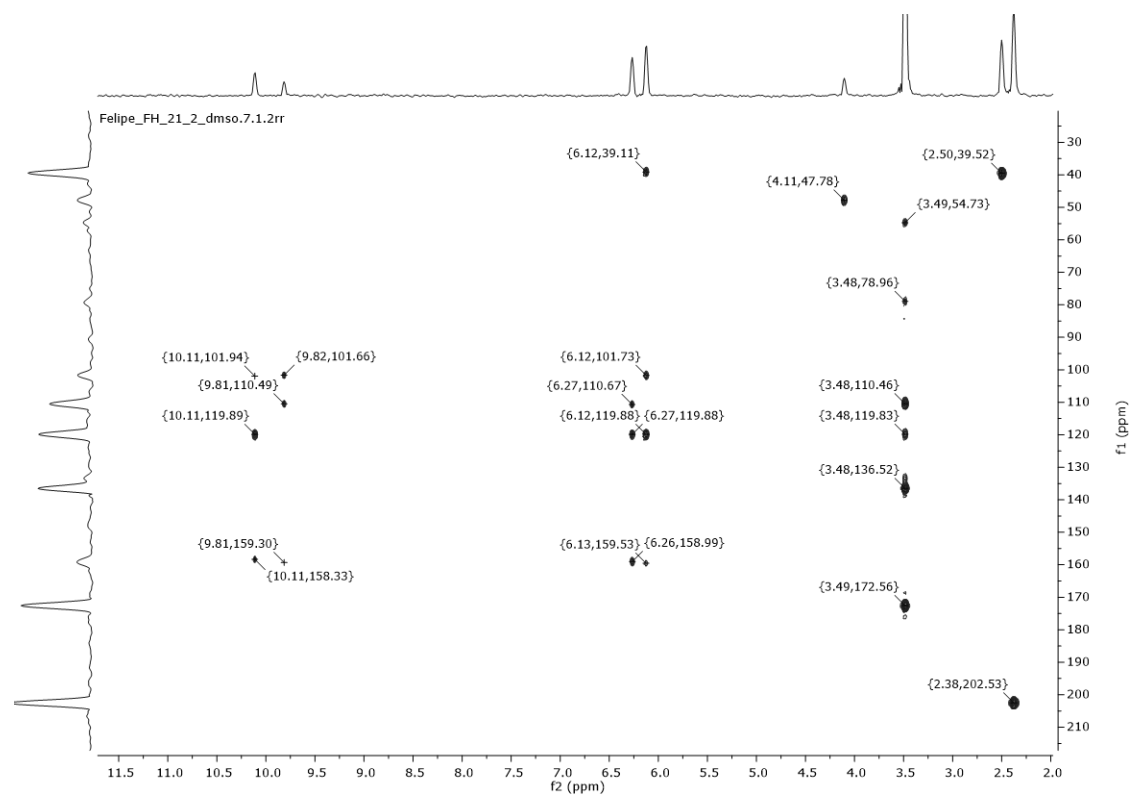
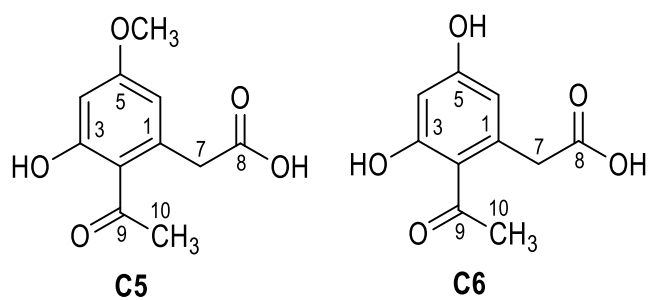


Figura 46. Estrutura química das substâncias **C5** e **C6** de (HILARIO, et al., 2020)



5.6.4 Substância **C7**

O espectro de RMN de ^1H da substância **C7** (Tabela 09, Figura 47) apresentou dois sinais de hidrogênios aromáticos *meta*-acoplados (d, $J = 2,5$ Hz) δ 6,32 e 6,28 que foram atribuídos a H-4 e H-5, respectivamente. É também evidente um tripleto em δ 1,26 ($J = 7,0$ Hz), correspondente a uma metila CH_3 -8. Os deslocamentos químicos de hidrogênios metilênicos foram observados em δ 4,17 (2H, q, $J = 7,2$ Hz), δ 3,87 (2H, s), correspondentes aos OCH_2 -C8 e CH_2 -7 respectivamente. Ainda foi observado um singlete em δ 2,60 (3H, s) correspondente a uma outra metila, que foi atribuída CH_3 -10.

No experimento *g*COSY (Figura 48) observa-se a correlação entre os hidrogênios δ 4,17 OCH_2 -C8 com os hidrogênios em δ 1,26 CH_3 -C8.

Os experimentos *g*HSQC (Figura 49) possibilitaram atribuir os hidrogênios a seus respectivos carbonos e estão demonstrados na Tabela 09.

No espectro de *g*HMBC (Figura 50) pode-se observar sinais de carbonos referentes a carbonila de cetona em δ 203,4 e de éster em δ 170,9. Estes deslocamentos químicos puderam ser observados pela correlação a 2J e a 3J existente entre os hidrogênios δ 3,87 e 4,17 com o carbono do grupo éster em δ 170,9 (COO -8). Também foi observado a correlação a 2J entre os hidrogênios em δ 2,60 com a carbonila do grupo cetona em δ 203,4 (C=O -9). A correlação dos hidrogênios aromáticos foi observada respectivamente entre δ 6,32 (H-4) com os carbonos em δ 112,4 (C-6) e entre o hidrogênio em δ 6,28 (H-6) com os carbonos δ 103,1 (C-4), 115,7 (C-2), 41,5 (C-7).

O espectro de ESI-QTOF-HRMS (*full scan*-modo negativo), (Figura 52) evidenciou o íon da molécula desprotonada em m/z 237,0769 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calculado 237,0763), confirmando que esta molécula possui a fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_5$. Portando esta molécula foi identificada como sendo acetato de etila-2-(2-acetil-3,5-diidroxifenil) ou também conhecida como curvulina (VARMA et al., 2006), Figura 51.

Tabela 09. Dados de RMN de ^1H (300 MHz) e ^{13}C (150 MHz) da substância **C7** (CDCl_3) e comparação com dados da literatura (CDCl_3)

POSIÇÃO	C7 (HILARIO, et al., 2020)				Curvulina (VARMA et al., 2006)	
	^{13}C	^1H (<i>m</i> , <i>J</i>)	COSY	HMBC	^{13}C	^1H (<i>m</i> , <i>J</i>)
1	137,4 (C)				137,4 (C)	
2	115,7 (C)				119,0 (C)	
3	161,3 (C)				161,3 (C)	
4	103,1 (CH)	6,32 (<i>d</i> , 2,5)		112,4	102,3 (CH)	6,30 (<i>d</i> , 2,3)
5	160,9 (C)				161,2 (C)	
6	112,4 (CH)	6,28 (<i>d</i> , 2,5)		41,5; 103,1; 115,7	111,9 (CH)	6,35 (<i>d</i> , 2,3)
7	41,5 (CH_2)	3,87 (<i>s</i>)		112,4; 115,7; 137,4; 170,9	40,1 (CH_2)	3,76 (<i>s</i>)
8	170,9 (C=O)				171,3 (C=O)	
9	203,4 (C=O)				203,3 (C=O)	
10	31,9 (CH_3)	2,60 (<i>s</i>)		203,4	31,7 (CH_3)	2,51 (<i>s</i>)
C-8 (OCH_2)	61,4 (CH_2)	4,17 (<i>q</i> , 7,0)	1,26		60,6 (CH_2)	4,10 (<i>q</i> , 7,1)
C-8 ($-\text{CH}_3$)	13,9 (CH_3)	1,26 (<i>t</i> , 7,0)		61,4	14,0 (CH_3)	1,19 (<i>t</i> , 7,1)

* δ em ppm e *J* em Hz; ** valores atribuídos pelas análises dos experimentos HSQC e HMBC

Figura 47. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância **C7** (HILARIO, et al., 2020)

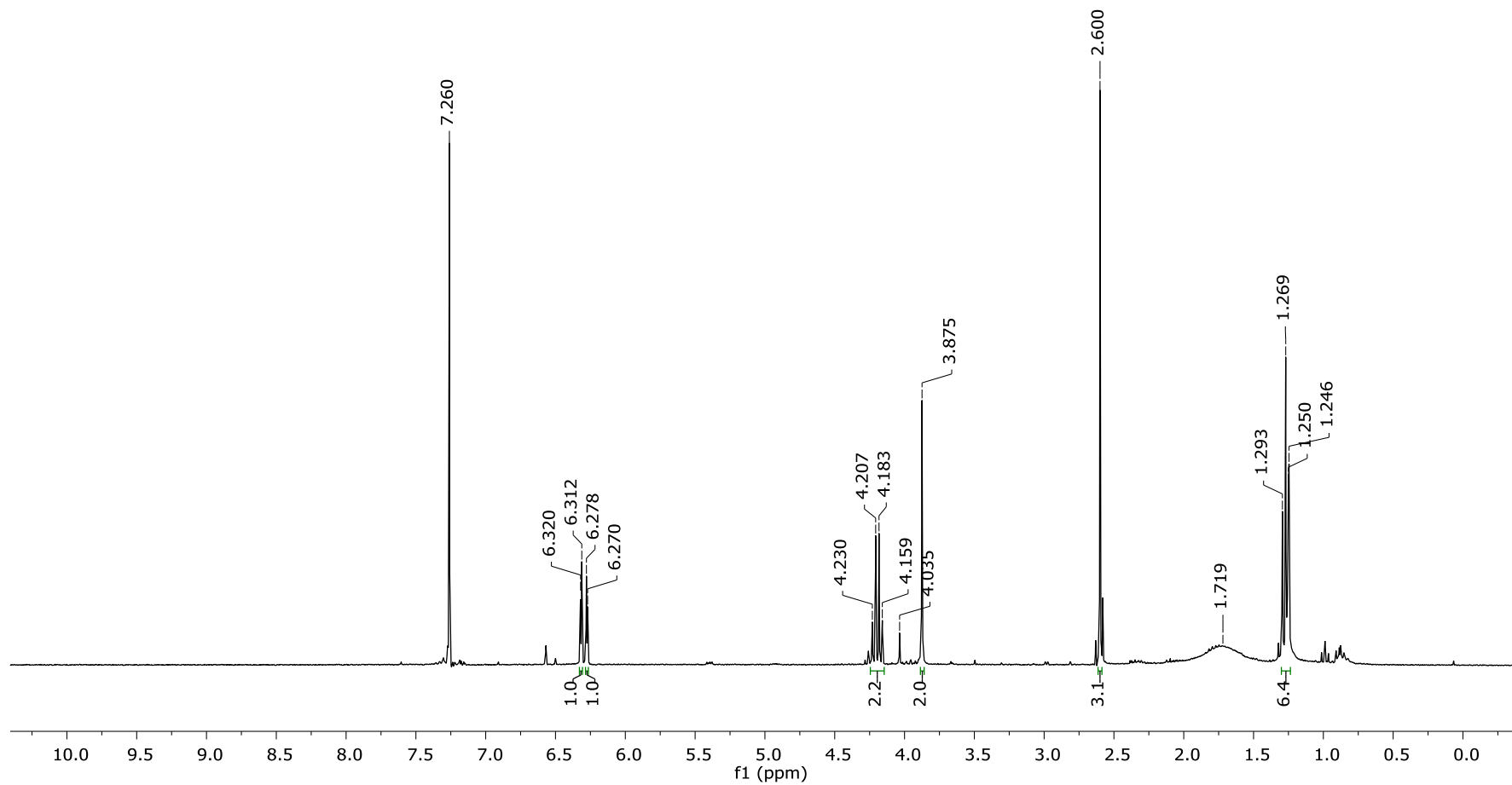


Figura 48. Espectro de ^1H - ^1H $g\text{COSY}$ (300 MHz, CDCl_3) de **C7** (HILARIO, et al., 2020)

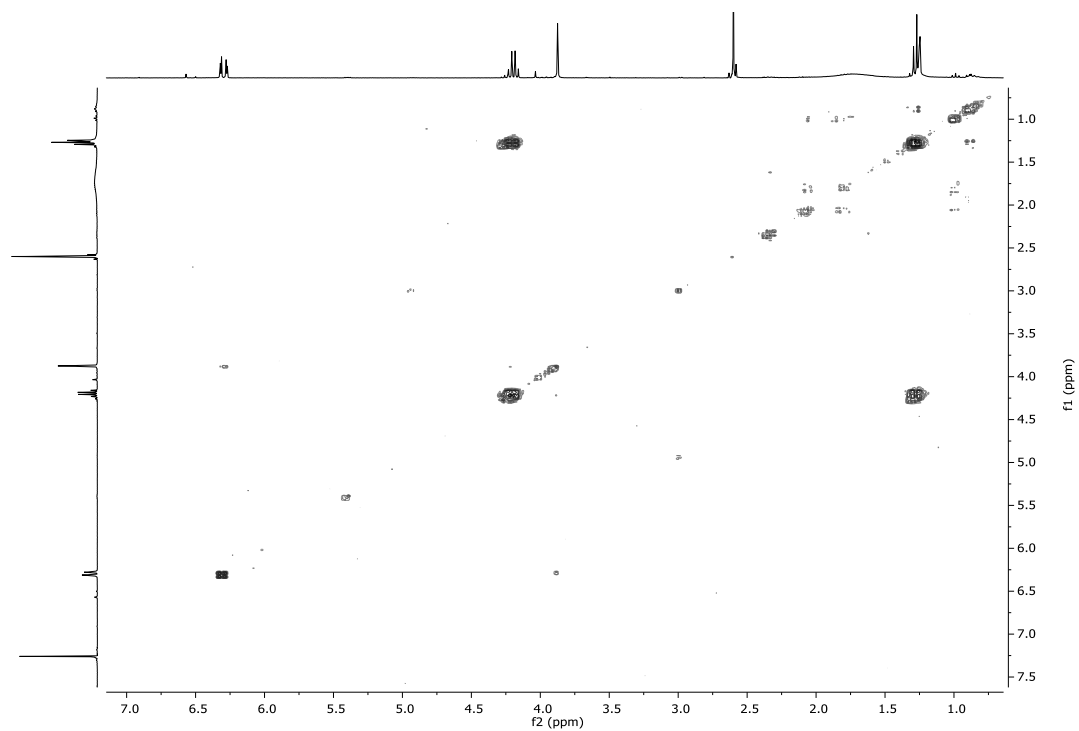


Figura 49. Mapa de contorno $g\text{HSQC}$ (300 MHz, CDCl_3) de **C7** (HILARIO, et al., 2020)

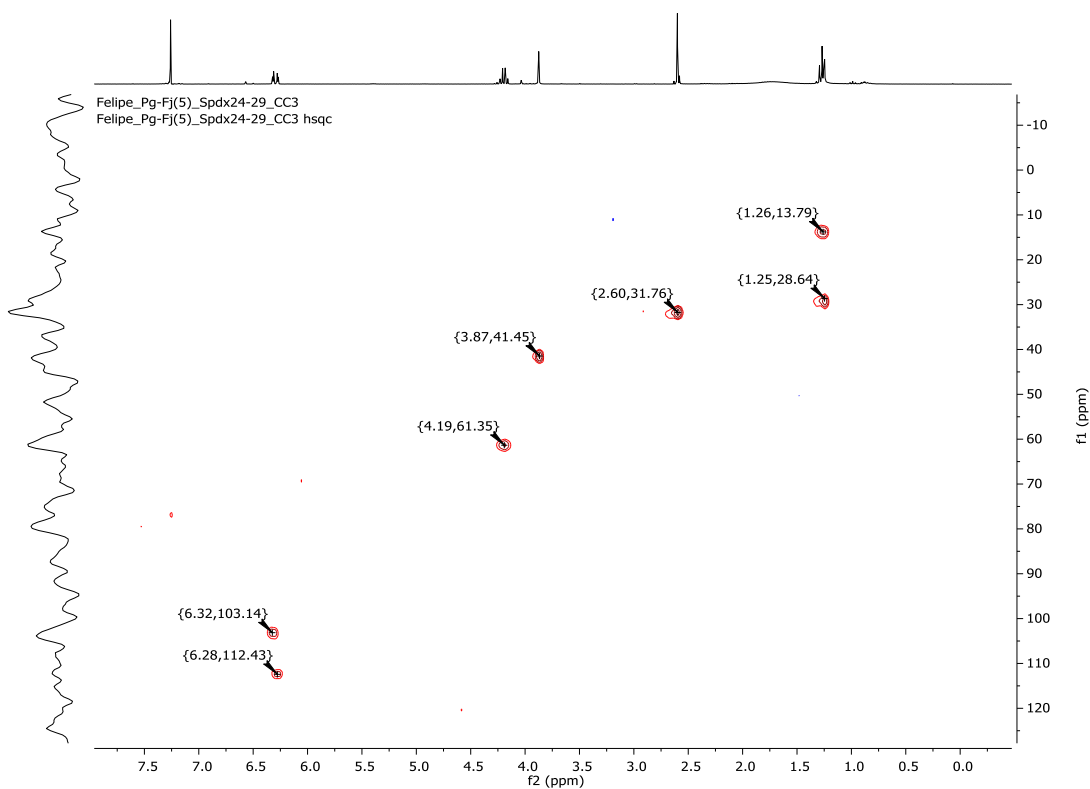


Figura 50. Mapa de contorno *g*HMBC (300 MHz, CDCl₃) de **C7** (HILARIO, et al., 2020)

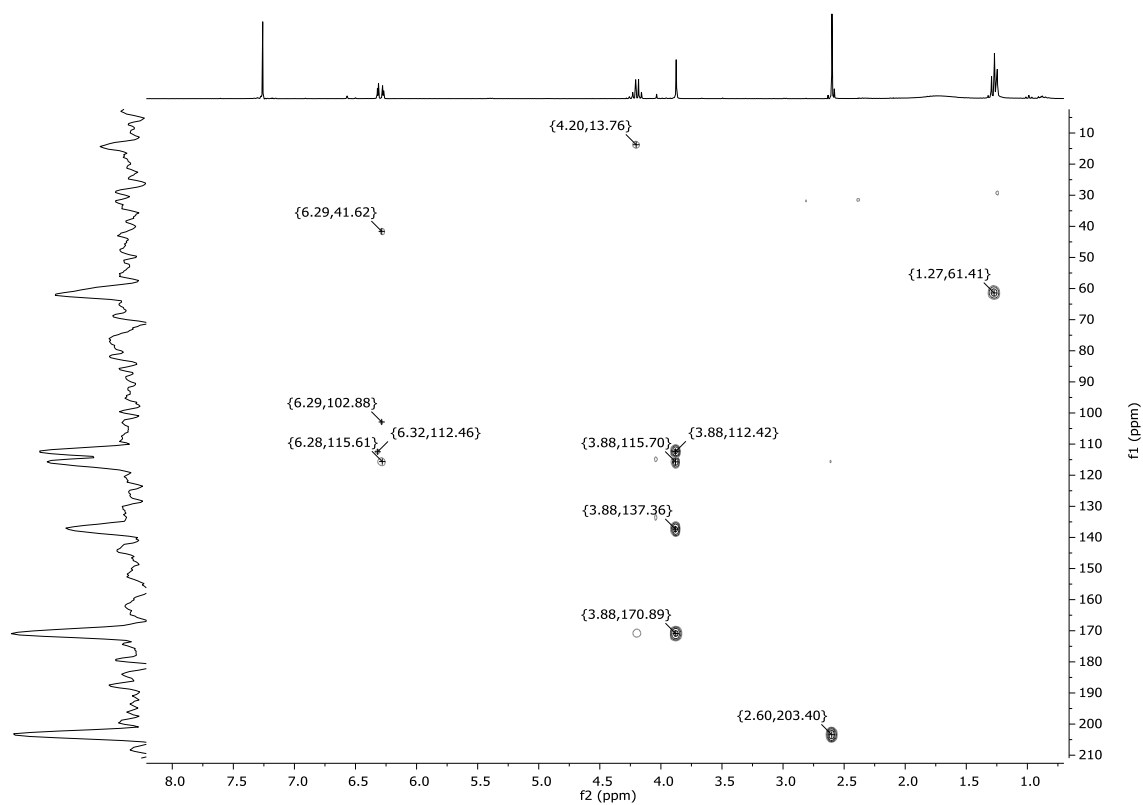


Figura 51. Estrutura química da substância **C7** (HILARIO, et al., 2020)

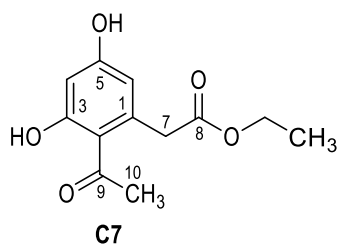
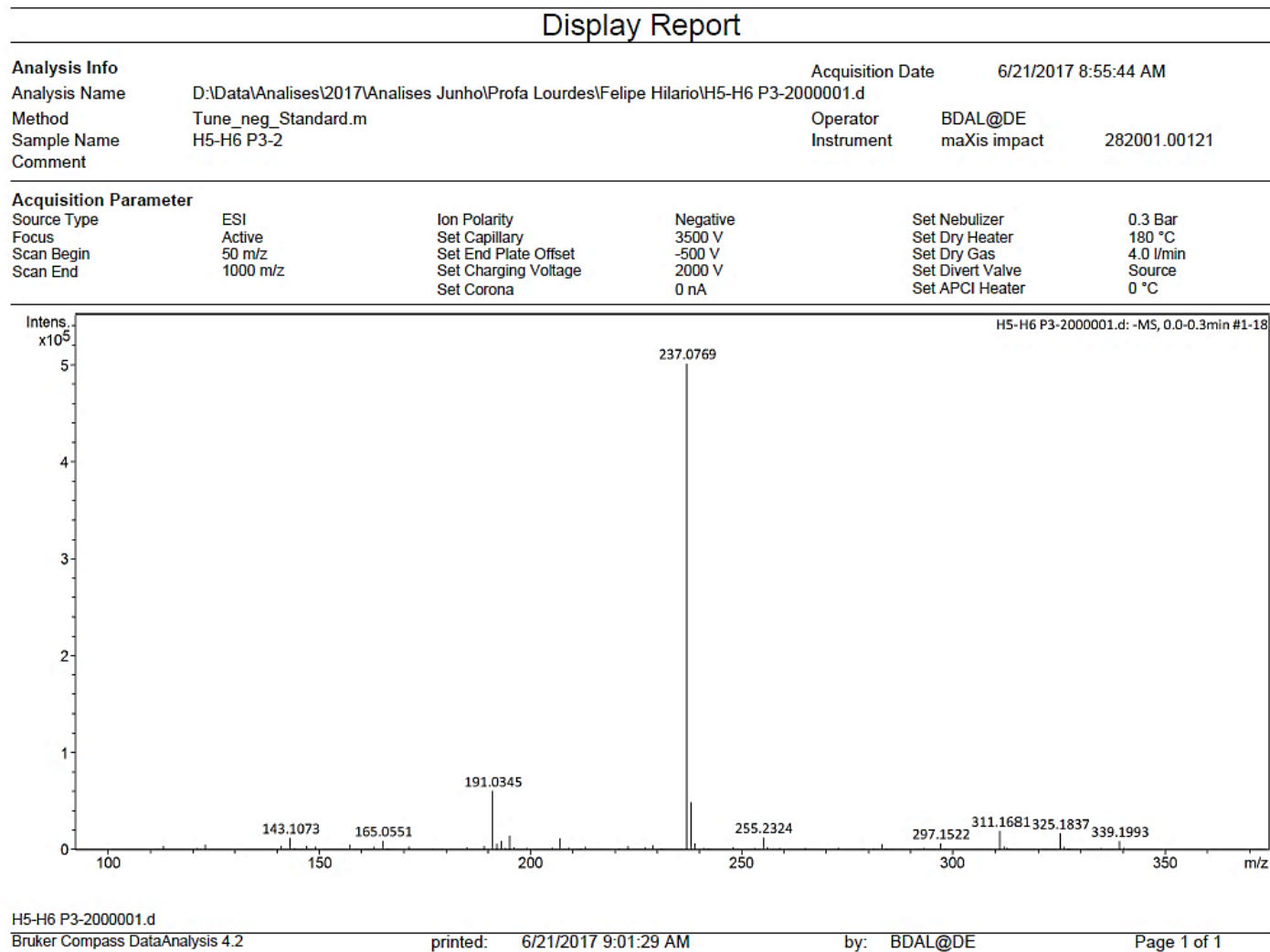


Figura 52. ESI-QTOF-HRMS da substância **C7** (HILARIO, et al., 2020)

5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana e a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram testadas contra quatro micro-organismos patogênicos humanos: *S. aureus* (bactéria Gram-positiva), *Salmonella* sp. *E. coli* (bactérias Gram-negativas) e a levedura *C. albicans* resistente ao fluconazol (Tabela 10).

A literatura não fornece um consenso em termos de valores específicos de CIM para produtos de origem natural tanto para extrato bruto quanto para produtos isolados. Por exemplo, extratos com valores de CIM inferiores a 500 µg/mL podem ser considerados como sendo inibidores potentes, enquanto que valores de CIM entre 600 e 1500 µg/mL são tidos como inibidores moderados e por fim, valores de CIM superiores a 1600 µg/mL são descritos como inibidores fracos (ALIGIANNIS et al., 2001). Outro trabalho descreve que extratos com valores de CIM inferiores a 1000 µg/mL podem ser considerados como tendo boa atividade antimicrobiana e para substâncias isoladas, valores inferiores de 1000 µg/mL (WEBSTER et al., 2008).

Tabela 10. Atividade antimicrobiana do extrato AcOEt e compostos isolados

Amostra	CIM (CBM) ^a			CIM (CFM) ^a
	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Ex AcOEt	1000 (1000)	—	1000 (—)	—
C1-C2	62,5 (1000)	—	1000 (—)	—
C5	—	—	—	—
C7	—	—	—	—
(+) ^b	7,8	12,5	0,15	NA
(+) ^{c1}	NA	NA	NA	8,0
(+) ^{c2}	NA	NA	NA	R

^aValores em µg/mL; ^bampicilina para bactéria, ^{c1}anfoterecina B e ^{c2}fluconazol para levedura; (—) CIM/CBM/CFM > 1000 µg/mL; NA: não aplicável; R: resistente.

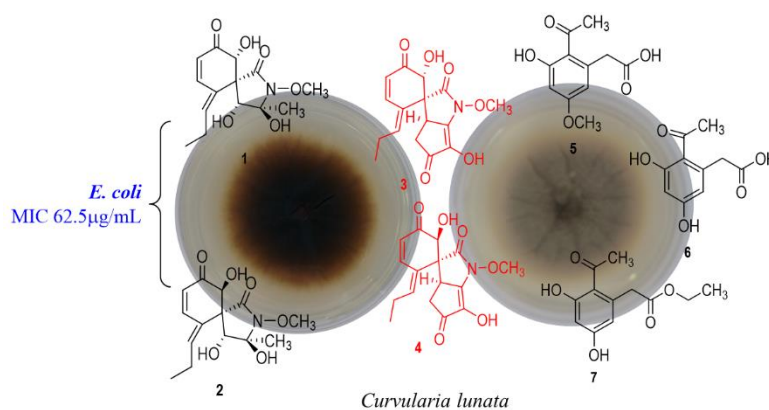
No geral, o extrato AcOEt e os compostos testados apresentaram baixa atividade antimicrobiana contra o quatro micro-organismos avaliados com exceção das substâncias **C1-C2** que apresentaram atividade para *E. coli*. A faixa de valores de CIM encontrada para o ensaio antibacteriano foi de 1000-62,5 µg/mL, porém nenhuma das amostras apresentaram atividade antifúngica contra a levedura *C. albicans* resistente ao fluconazol.

O extrato AcOEt apresentou baixa atividade antibacteriana, sendo o valor da CIM de 1000 µg/ml contra *E. coli* e *S. aureus*. Os metabólitos secundários **C1-C2** apresentaram o valor da CIM de 62,5 µg/mL para *E. coli*, sendo considerado este valor como bom para a atividade antibacteriana de metabólito secundário isolado. Por outro lado, os compostos **C5** e **C7** apresentaram valores da CIM superiores às concentrações testadas para estes dois compostos e portando não tiveram resultados significativos quanto ao ensaio antimicrobiano.

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) para o Ex. AcOEt e para os compostos **C1-C2** foi de 1000 µg/mL, além disso **C1-C2** apresentou comportamento bacteriostático para *E. coli* até a concentração de 62,5 mg/mL.

Na Figura 53 está sendo ilustradas as substâncias isoladas de *F. fujikuroi* e que foram ativas para *E. coli*.

Figura 53. Crescimento em PDA de *C. lunata* e metabólitos isolados



Fonte: Hilario et al, (2020)

Obs.: em vermelho os metabólitos inéditos do trabalho publicado por HILARIO et al., 2020

6. RESULTADOS & DISCUSSÃO: *Fusarium fujikuroi*

6.1 Efeitos da adição de moduladores epigenéticos e eliciadores químicos em *F. fujikuroi*:

O fungo *F. fujikuroi* foi cultivado em seis diferentes condições de cultivo com o objetivo de investigar os efeitos na produção e diversificação de metabólitos secundários pelo fungo na presença de moduladores epigenéticos (ZAHA, 5-AZA e AA), e de eliciadores químicos metálicos (íons cobre e magnésio) em meio de cultura PDB. Portanto, foram estudadas as seguintes condições: PDB (controle), PDB + Cu²⁺, PDB + Mg²⁺, PDB + SAHA, PDB + AZA e PDB + AA. Além disso, essas últimas cinco condições foram comparadas com o controle PDB (apenas meio de cultura

Todo o trabalho desenvolvido com os moduladores químicos e epigenéticos foi padronizado da inoculação (mesmo volume da suspensão de hifas-esporos) até o fim do cultivo, dando seguimento com etapas de extração dos metabólitos produzidos pelo fungo por partição L/L com AcOEt. Conforme descrito em material e métodos, a ausência de glicose no meio de cultivo foi o parâmetro utilizado para dar seguimento com as demais etapas químicas para obtenção dos extratos AcOEt para cada uma das condições avaliadas.

Como estamos investigando um estudo comparativo de perfis químicos, é importante evitar que o fungo tenha como fonte de energia os próprios metabólitos secundários. Complementarmente, sabe-se que o maior rendimento na produção de metabólitos ocorre quando o nível de glicose no meio é o mais baixo ou até ausente (MAFEZOLI et al., 2018; WIJERATNE et al., 2014).

A extração dos metabólitos ocorreu no 31º dia, após inoculado em PDB, sendo verificado o nível de glicose negativo nos ensaios contendo íons de cobre e magnésio e baixa concentração nos frascos com SAHA, 5-AZA, AA e PDB (controle).

A massa e o rendimento obtidos para os extratos AcOEt estão apresentados na Tabela 11. Os melhores rendimentos foram vistos para os ensaios com SAHA e AA, quando comparados com o controle PDB, tiveram rendimentos de 159 % e 161 %, respectivamente.

Considerando a natureza de média a alta polaridade das substâncias extraídas pela partição com AcOEt, os extratos obtidos em escala reduzida foram submetidos às análises por CLAE-DAD. Os perfis cromatográficos dos extratos foram comparados possibilitando verificar a reprodutibilidade e a variabilidade dos metabólitos produzidos por *Fusarium fujikuroi* (Figuras 54-55).

Tabela 11. Cultivo em escala reduzida de *F. fujikuroi*

Código	Experimento	Vol. PDB em mL	glicose (32 dias)	Massa em mg Ex AcOEt	Massa total em mg do Ex AcOEt	Rendimento relativo ao controle PDB em %
FH-02-54_1A	PDB	200	++	18,2		
FH-02-54_1B	PDB	200	++	15,2	42,2	-
FH-02-54_1C	PDB	200	++	8,8		
FH-02-54_2A	CuSO ₄	200	+	16,5		
FH-02-54_2B	CuSO ₄	200	+	14,4	43,8	104
FH-02-54_2C	CuSO ₄	200	+	12,9		
FH-02-54_3A	MgSO ₄	200	+	19,3		
FH-02-54_3B	MgSO ₄	200	+	21,1	50,3	119
FH-02-54_3C	MgSO ₄	200	+	9,9		
FH-02-54_4A	SAHA	200	+	20,6		
FH-02-54_4B	SAHA	200	-	27,2	67,3	159
FH-02-54_4C	SAHA	200	-	19,5		
FH-02-54_5A	AZA	200	-	3,6		
FH-02-54_5B	AZA	200	+	12,0	29,9	71
FH-02-54_5C	AZA	200	+	14,3		
FH-02-54_6A	AA	200	-	21,3		
FH-02-54_6B	AA	200	-	33,4	68,1	161
FH-02-54_6C	AA	200	-	13,4		

Obs.: ensaios realizados em triplicata (A, B, C);

6.2 Perfil cromatográfico por CLAE-DAD dos Exs AcOEt de *F. fujikuroi*

Os metabólitos presentes nos extratos AcOEt preparados em escala reduzida: PDB (controle), PDB + Cu²⁺, PDB + Mg²⁺, PDB + SAHA, PDB + AZA e PDB + AA foram analisados por CLAE-DAD analítico.

A avaliação dos perfis cromatográficos (Figuras 54 e 55) mostrou grande semelhança qualitativa entre o controle (PDB) com os experimentos: PDB + Cu²⁺, PDB + SAHA, PDB + AZA e PDB + AA. Entretanto, PDB + Mg²⁺ quando comparado com o controle (PDB) induziu diferenças significativas no metabolismo secundário de *F. fujikuroi* (Figura 54).

Nas figuras 54 e 55 são apresentados os perfis cromatográficos do crescimento em escala reduzida das seis condições estudadas, e a sobreposição do controle com os demais experimentos. Os picos representativos foram numerados nos cromatogramas de **1** a **31**, os dados referentes aos tempos de retenção são apresentados na Tabela 12.

Na Figura 54 evidencia também a presença de 16 novos picos cromatográficos que surgiram em decorrência da adição de íons Mg⁺² no meio de cultivo PDB.

Para o melhor entendimento e comparação dos dados quanto a produção e diversificação química, foi realizado estudos analíticos de quantificação por CLAE-DAD analítico, visando a complementariedade dos dados.

Figura 54. Cromatograma representando os perfis dos Ex. AcOEt em escala reduzida produzido pelo fungo *F. fujikuroi* isolado dos capítulos de *P. chiquitensis*: PDB, PDB + Mg^{2+} , PDB + Cu^{2+} [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 mm; Solvente A: H_2O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente exploratório de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 270 nm]

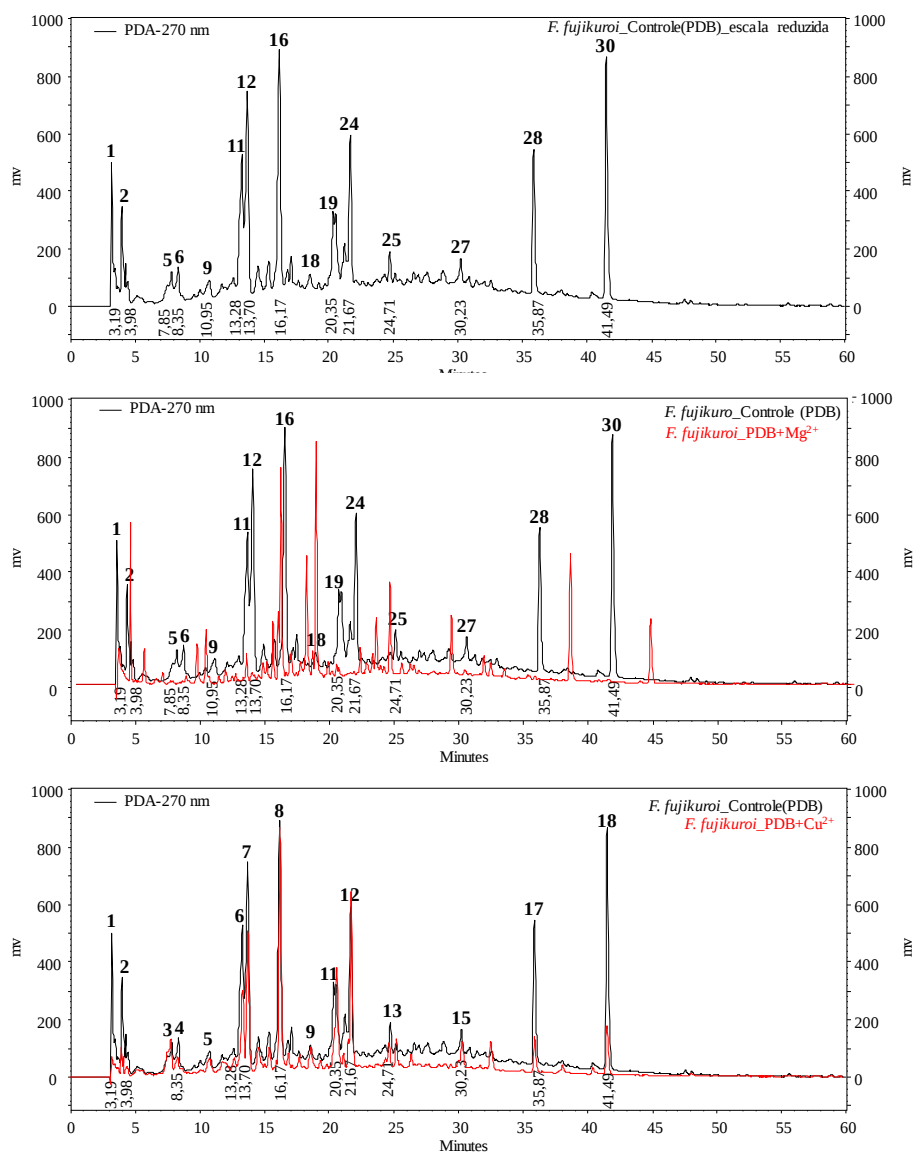


Figura 55. Cromatograma representando os perfis dos Ex. AcOEt em escala reduzida produzido pelo fungo *F. fujikuroi* isolado dos capítulos de *P. chiquitensis*: PDB, PDB + SAHA, PDB +AZA e PDB +AA [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 mm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 270 nm]

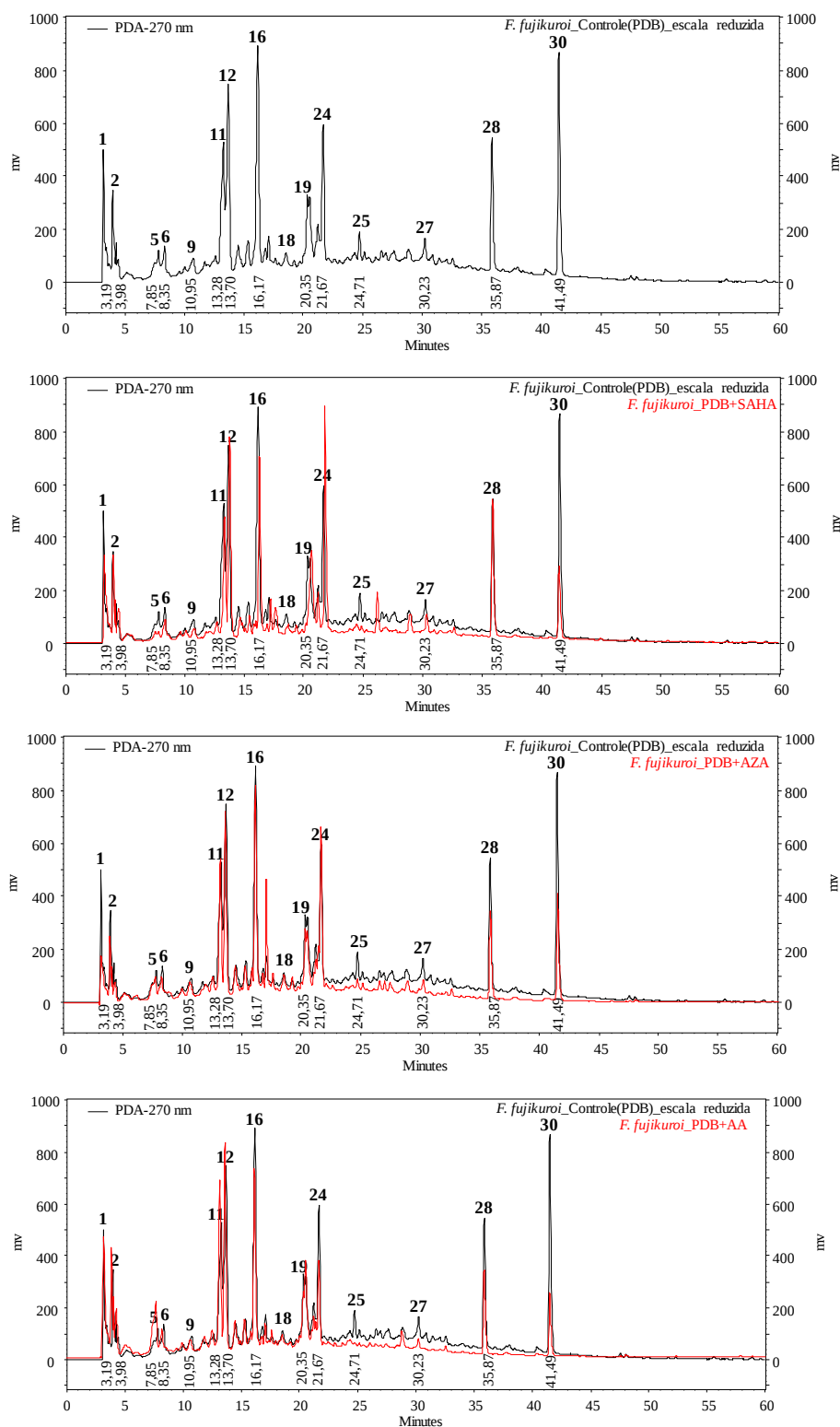


Tabela 12. Identificação de substâncias presentes nos cromatogramas (CLAE-DAD) nos Cultivos em escala reduzida do extrato de *F. fujikuroi*

Pico	t _r	Controle	Mg ²⁺	Cu ²⁺	SAHA	AZA	AA
1	3,19	x		x	x	x	x
2	3,98	x		x	x	x	x
3	4,21		x				
4	5,27		x				
5	7,83	x		x		x	x
6	8,35	x		x		x	x
7	9,32		x				
8	10,01		x				
9	10,95	x	x	x		x	
10	13,13	x	x	x		x	
11	13,28	x		x	x	x	x
12	13,7	x		x	x	x	x
13	15,15		x				
14	15,57		x				
15	15,75		x				
16	16,17	x		x		x	x
17	17,72		x		x		
18	18,45		x				
19	20,35			x		x	x
20	21,67		x		x	x	
21	21,85		x		x	x	
22	23,07		x				
23	24,13		x				
24	21,67	x		x	x	x	x
25	24,71	x		x	x	x	
26	28,85		x		x		
27	30,23	x		x	x	x	
28	35,87	x		x	x	x	x
29	37,97		x				
30	41,49	x		x	x	x	x
31	44,15						

Obs. Experimento realizado em triplicata

6.3 Análise quantitativa dos metabólitos secundários de *F. fujikuroi* por CLAE-DAD

A quantificação por CLAE-DAD de quatro metabólitos secundários isolados e identificados do Ex. AcOEt preparado a partir do cultivo de *F. fujikuroi* em meio líquido PDB (HILARIO et al., 2017b), foi realizado empregando o método de padronização externa, que consiste na construção de curva analítica de padrão externo em diferentes concentrações.

As quatro curvas analíticas foram construídas a partir de cinco a seis diluições partindo de suas respectivas soluções estoque. Sendo assim, as diluições seriadas foram realizadas obedecendo aos seguintes intervalos de concentração: ácido fusárico 1000-62,5 µg mL; AIA 500-31,25 µg mL; alcaloide indólico (ácido acético-2-(4-butilpicolinamida)) 100-6,25 e para o sesterterpeno chamado de terpestacina de 2000-62,5 µg mL.

O sistema de solventes utilizados nas diluições foi H₂O/ACN (8:2, v/v), as soluções resultantes foram injetadas no CLAE-DAD em triplicata, sendo padronizado o volume de injeção de 20,0 µL para todas as amostras. O comprimento de onda empregado na quantificação foi em 270 nm (Figura 54-55), devido a seletividade deste comprimento de onda para os compostos estudados.

Nos cromatogramas correspondentes (Figuras 56-57), a área de um pico de interesse, registrada pelo detector DAD em função das soluções em diferentes concentrações conhecidas, foram os dados correlacionados para serem plotadas em um gráfico

As curvas analíticas A-B e C-D são apresentadas nas Figuras 58 e 59, respectivamente. Como pode ser visto, todas as quatro curvas analíticas apresentaram boa linearidade em seus intervalos de concentração estudados. Os coeficientes de correlação (r) com valores superiores a 0,99 (Tabela 13) indicam que há uma boa correlação linear entre as áreas e as concentrações estudadas neste trabalho.

O método CLAE-DAD foi validado para a determinação do ácido fusárico (1), ácido indolacético (2), ácido 2- (4-butilpicolinamida) acético (3) e o sesterterpene terpestacina (4) pela análise dos seguintes parâmetros: linearidade, sensibilidade, especificidade, precisão intra-ensaio e inter-ensaio, exatidão, LOD e LOQ (Tabela 13). Esses metabólitos foram isolados do extrato de acetato de etila preparado a partir de *F. fujikuroi* em meio PDB (HILARIO et al., 2017).

Figura 56. Cromatograma representando os perfis do Ex. AcOEt PDB (controle) e sobreposição com os metabólitos isolados e quantificados por CLAE-DAD: A-) JBCS, 2017; B-) PDB; C-) PDB + ácido fusárico [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ[®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 mm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100% de B em 60 min; vazão de 1,0 mL min⁻¹; λ = 270 nm

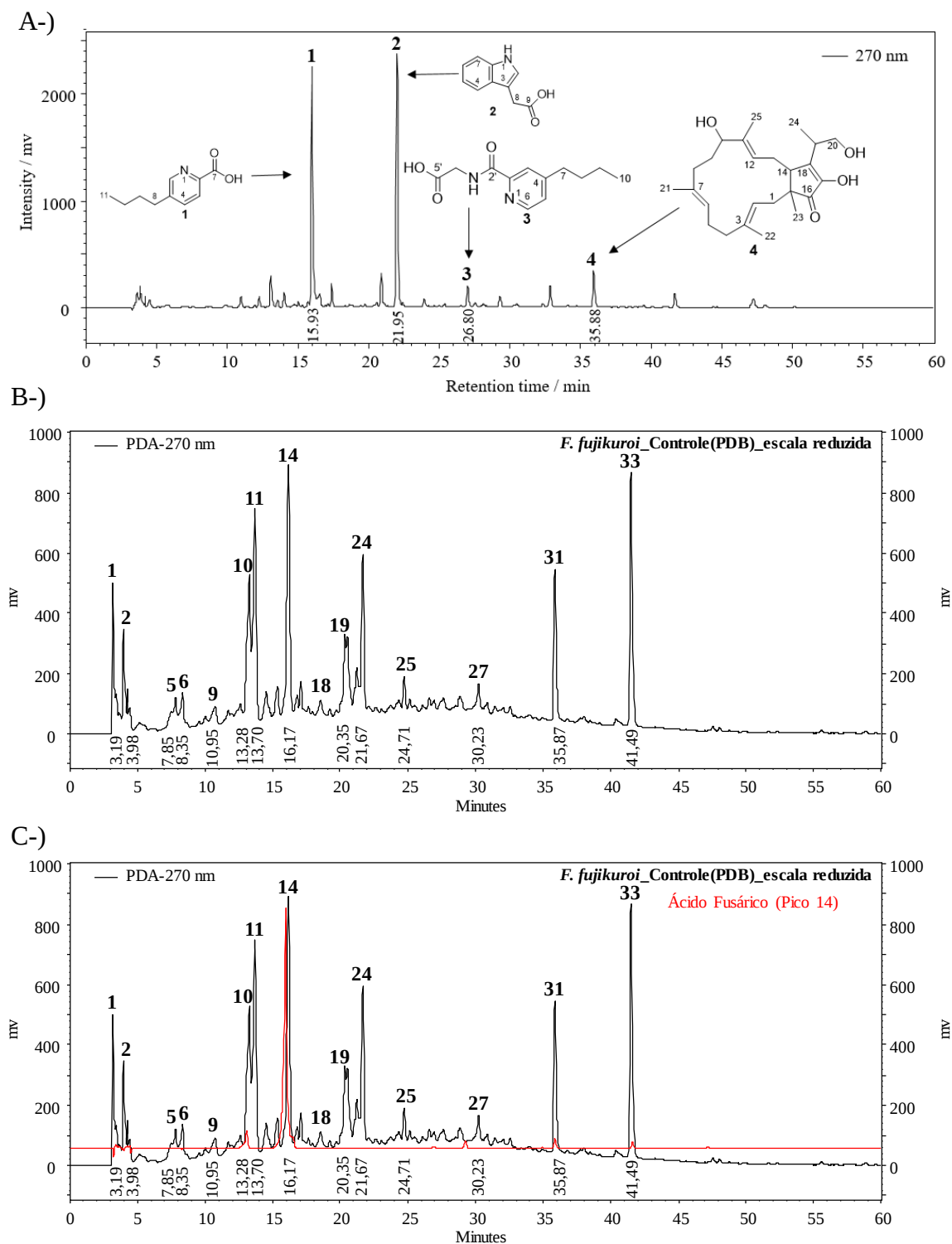


Figura 57. Cromatograma representando os perfis do Ex. AcOEt PDB (controle) e sobreposição com os metabólitos isolados e quantificados por CLAE-DAD: A-) PDB + AIA; B-) PDB + alcaloide; C-) PDB + terpestacina [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ[®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 mm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100% de B em 60 min; vazão de 1,0 mL min⁻¹; λ = 270 nm

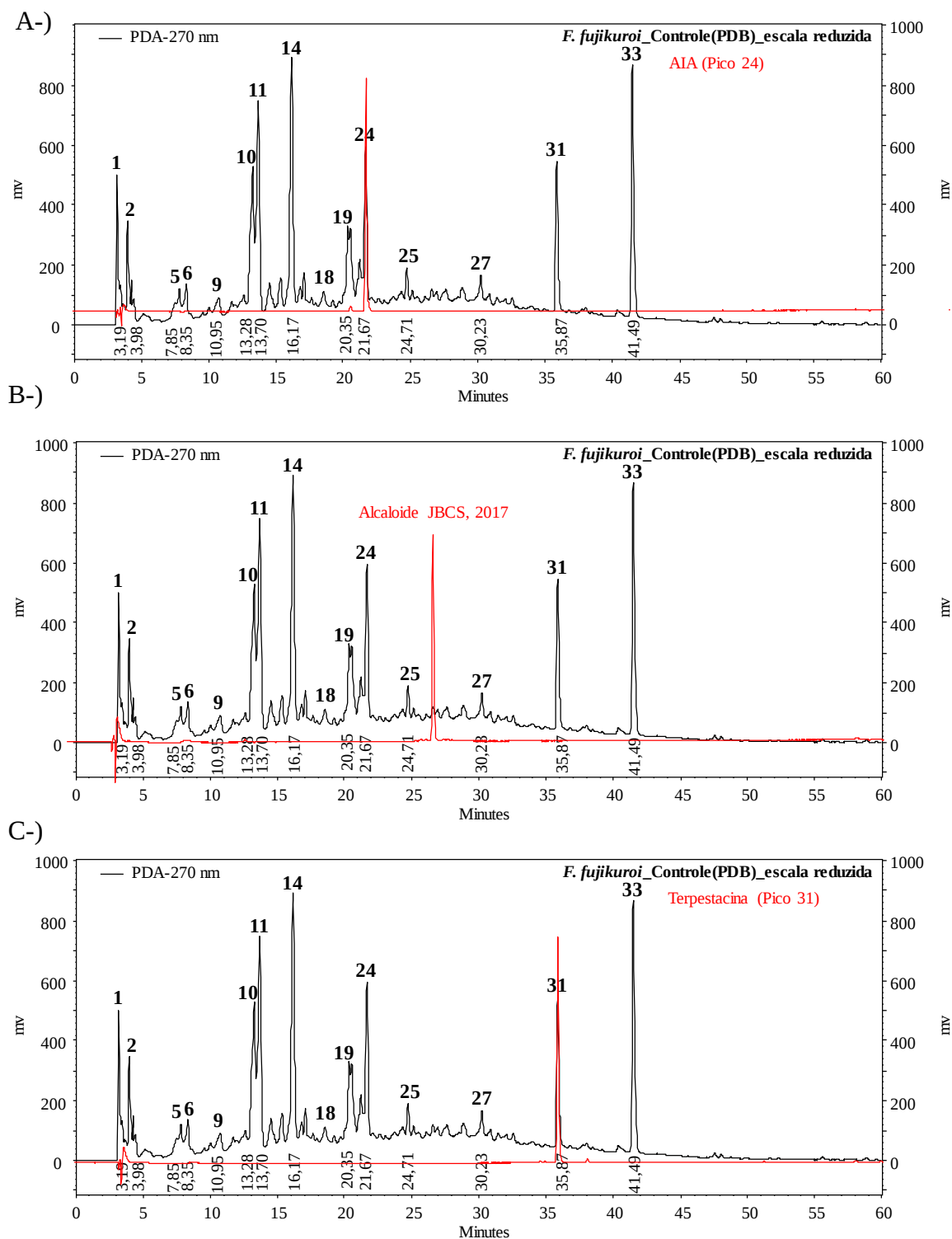


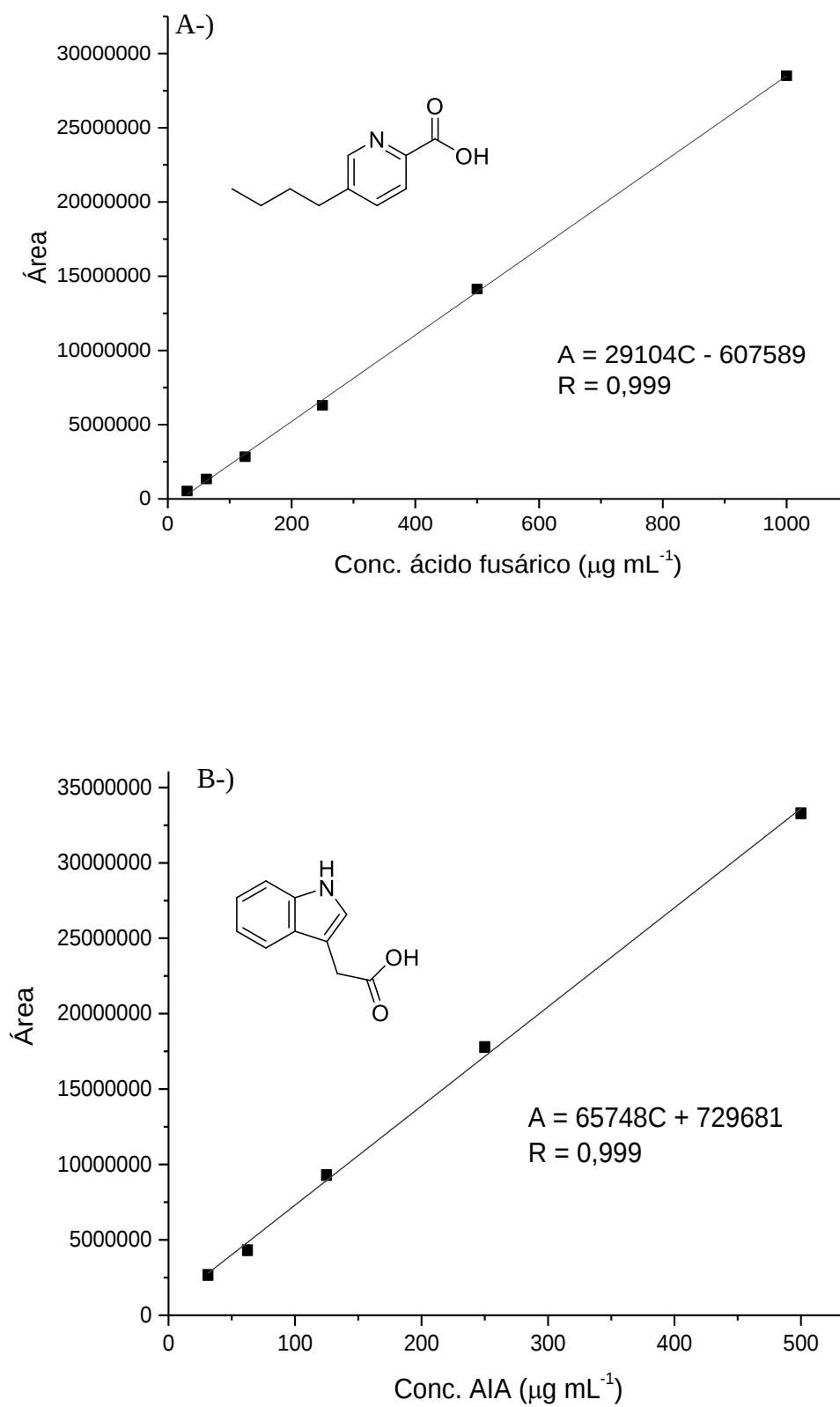
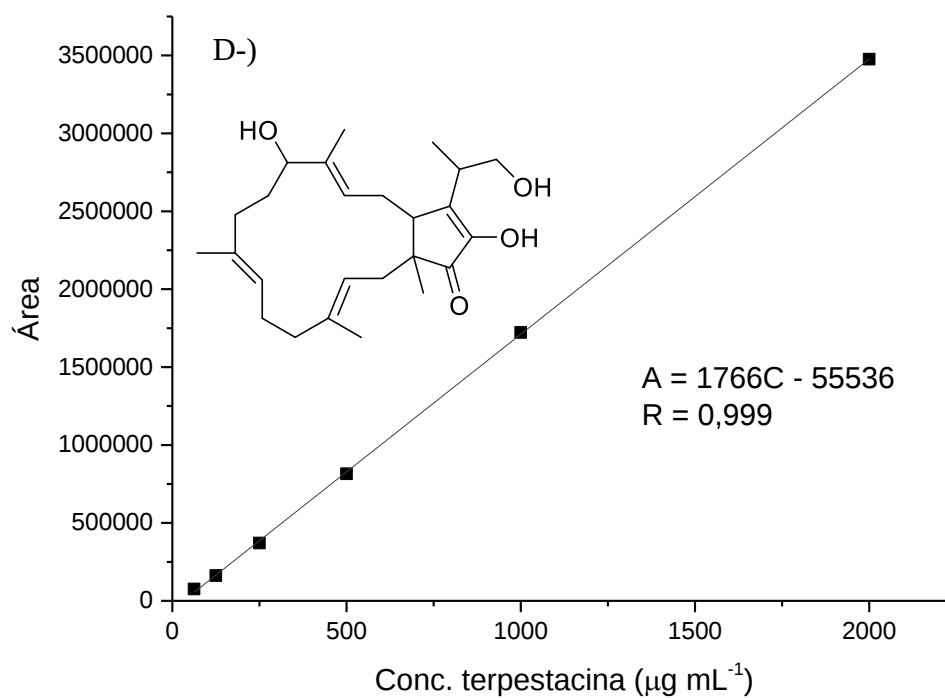
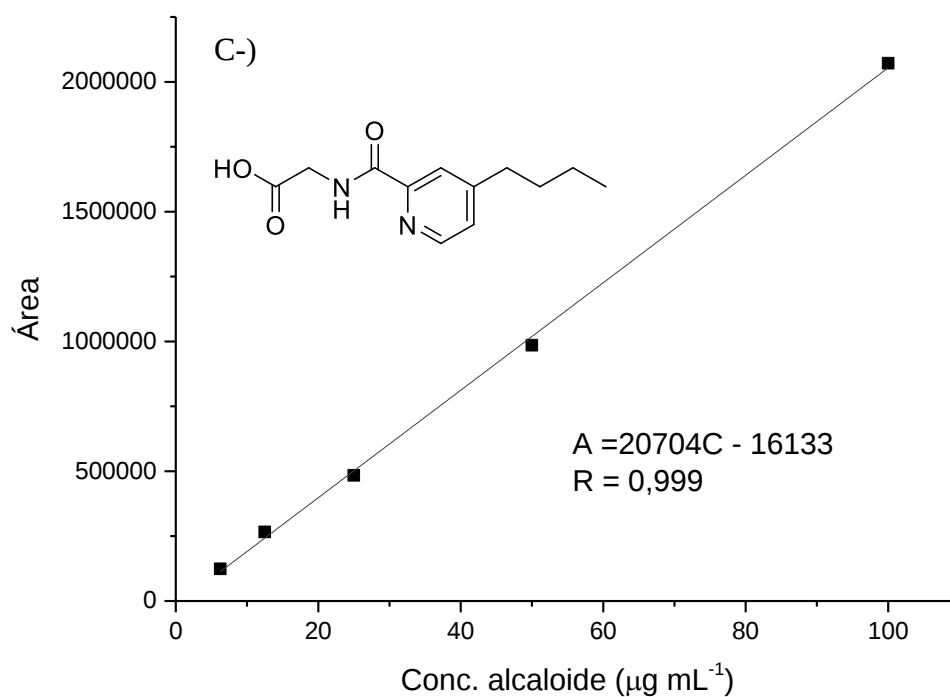
Figura 58. Curvas analíticas dos metabólitos A-B de *F. fujikuroi*

Figura 59. Curvas analíticas dos metabólitos C-D de *F. fujikuroi*

A equação da curva resultante permitiu calcular as concentrações de ácido fusárico, AIA, do alcaloide indólico e também da terpestacina nos seguintes extratos AcOEt: PDB (controle), PDB + Mg²⁺, PDB + Cu²⁺, PDB + SAHA, PDB + AZA e PDB + AA (Figuras 58 e 59, Tabela 13).

Os valores dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir dos parâmetros analíticos obtidos das curvas (Tabela 13), em conformidade com os preconizados pela IUPAC, sendo assim, as seguintes fórmulas foram utilizadas:

- Para o cálculo do limite de detecção (LD):

$$LD = 3,3 \times \frac{DP}{a}$$

- Para o cálculo do limite de quantificação (LQ):

$$LQ = 10 \times \frac{DP}{a}$$

Onde, DP é o desvio padrão da resposta e α é a inclinação da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

Tabela 13. Dados de calibração dos metabólitos de *F. fujikuroi*

Compostos	Equação da reta A = aC + b	Coef. de correlação (r)	LD (µg mL ⁻¹)	LQ (µg mL ⁻¹)	DP*
Ác. fusárico	29104C – 607589	0,999	29,9	90,6	293656
AIA	65748C + 729681	0,999	27,4	82,9	545335
Alcaloide	20704C – 16133	0,999	4,52	17,59	28380
Terpestacina	1766C – 55536	0,999	28,9	87,43	15440

*DPR = Desvio Padrão Relativo da resposta

Os resultados obtidos para os LD e de LQ estão apresentados na Tabela 13, como pode ser visto, os valores obtidos para ambos parâmetros revelam uma boa sensibilidade do método para os quatro metabólitos analisados, apresentado portando boa detectabilidade frente ao PDA, podendo assim ser aplicado para quantificação dos metabólitos secundários produzidos pelo *F. fujikuroi* presentes nos extratos AcOEt.

A exatidão do método foi avaliada por meio do ensaio de recuperação. Conforme apresentado na Tabela 14, para cada um dos quatro metabólitos secundários isolados de *F. fujikuroi*, diferentes concentrações das substâncias isoladas estudadas foram adicionadas separadamente nos extratos AcOEt (5mg.mL). Além disso, foi injetado no CLAE o branco, que consistiu na adição do sistema de solvente utilizado nas análises, ACN:H₂O (8:2, v/v) ao extrato AcOEt, na proporção de 1:1 (v/v), 20mL foram injetados no CLAE-DAD em triplicata.

Tabela 14. Recuperação exatidão

Composto	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)
Ác. fusárico	250,0	103,95
	125,0	118,86
	62,5	119,06
	500,0	90,34
AIA	250,0	104,70
	125,0	90,56
	100,0	114,65
Alcaloide	25,0	107,78
	6,25	93,41
	1000,0	97,61
Terpestacina	250,0	112,41
	125,0	119,70

A porcentagem de recuperação foi dada a partir da concentração média obtida experimentalmente e a concentração teórica correspondente após a adição da substância isolada, multiplicada por 100, sendo assim, a seguinte fórmula foi utilizada:

$$\text{Exatidão} = \frac{C_A - C_B}{C_T} \times 100$$

Onde C_A é a concentração calculada para cada um dos metabólitos isolados de *F. fujikuroi*, extrato mais analito (dopado, “spiked”), C_B é a concentração calculada para o extrato não dopado (branco) e C_T a concentração teórica utilizada na recuperação.

De acordo com Ribani e colaboradores (2004), valores de recuperação devem estar entre 70-120% (RIBANI et al., 2004). Os valores de recuperação obtidos, conforme mostrados na Tabela 14, estão entre 90 e 119%, estando, portanto, dentro do intervalo aceitável para os valores de recuperação.

A seletividade do método foi avaliada por meio da comparação do tempo de retenção e de espectro no UV para cada substância estudada nas análises quantitativas por CLAE-DAD, sendo esses dados comparados com os seus respectivos picos registrados nos cromatogramas dos seis extratos estudados (PDB, PDB + Cu²⁺, PDB + Mg²⁺, PDB + SAHA, PDB + AZA e PDB + AA).

Tabela 15. Quantidade de metabólitos nos Exs AcOEt de *F. fujikuroi**

EXPERIMENTO	Substância (µg mL ⁻¹)			
	Ác. Fusárico	AIA	Alcaloide	Terpestacina
PDB (Controle)	27,93 ± 0,66	ND	ND	558,89 ± 11,82
PDB + Cu ²⁺	33,79 ± 0,20	41,19 ± 0,35	ND	257,83 ± 2,07
PDB + Mg ²⁺	28,87 ± 0,33	21,07 ± 0,09	48,46 ± 1,76	592,83 ± 10,86
PDB + SAHA	23,28 ± 0,70	41,92 ± 0,86	ND	885,84 ± 9,53
PDB + AZA	34,59 ± 0,56	24,50 ± 1,01	ND	622,28 ± 42,30
PDB + AA	34,76 ± 0,37	17,47 ± 0,23	ND	553,40 ± 10,12

ND = Não Detectado

*Cada valor representa a média ± DP para três experimentos independentes (n=3).

A determinação da concentração de ácido fusárico (1), ácido indolacético (2), 2-ácido acético-(4-butilpicolinamida) (3) e terpestacina (4) foi estabelecida nos experimentos: PDB (controle), PDB + Cu²⁺, PDB + Mg²⁺, PDB + SAHA, PDB + AZA e PDB + AA. Assim, foi possível estabelecer quantitativamente as concentrações de quatro metabólitos secundários isolados de *F. fujikuroi* nos seis extratos AcOEt preparados na presença e na ausência de modificadores epigenéticos e eliciadores químicos

Quando comparamos o controle (PDB) com os demais extratos AcOEt foi visto que a concentração de ácido fusárico nos seis extratos AcOEt não teve grandes alterações quantitativamente, por exemplo, enquanto a concentração de ácido fusárico no controle foi de 27,93 ± 0,66 µg/mL, o menor valor quantificado foi para o PDB + SAHA (23,28 ± 0,70 µg/mL) e o maior para (PDB + AA) 34,76 ± 0,37 µg/mL. Sendo assim, os modificadores epigenéticos e eliciadores químicos utilizados não tiveram tão significativas influências na via metabólica responsável pela produção de ácido fusárico.

Diferentemente do ácido fusárico, o AIA teve maior variação na sua produção, e que muito embora seja uma toxina bem conhecida como metabólito isolado de *Fusarium* spp., no experimento realizado em escala reduzida, esse metabólito secundário foi ausente no controle (PDB), estando na faixa de 17,47-24,50 ± 0,23-1,01 µg/mL para os experimentos PDB + AA, PDB + Mg²⁺ e PDB + AZA. Enquanto isso, as concentrações de 41,19 ± 0,35 µg/mL foi obtida

para PDB + Cu²⁺ e $41,92 \pm 0,86 \mu\text{g/mL}$ para PDB + SAHA. A presença de SAHA e íons de cobre no meio de cultivo PDB levaram a um aumento de quase 50% na produção de AIA.

Não foi possível realizar a quantificação nos extratos AcOEt para o ácido acético-2-(4-butilpicolinamida). Somente para o extrato PDB + Mg²⁺, o que sugere que a presença íons Mg²⁺ no meio de cultivo favorece por algum mecanismo não conhecido a sua produção.

O sesterterpeno terpestacina é o metabólito majoritário nitidamente em todos os seis extratos AcOEt estudados, obedecendo faixa de concentração entre $257,83 \pm 2,07$ (PDB + Cu²⁺) e $885,84 \pm 9,53$ (PDB + SAHA), valores mínimos e máximos, respectivamente. Quando comparado com os demais metabólitos secundários é possível notar que a terpestacina pode estar presente no extrato AcOEt em até 38 vezes quando comparado com os demais metabólitos, como visto no experimento contendo PDB + SAHA, a concentração desse alcaloide foi de $885,84 \pm 42,30$ enquanto que a de ácido fusárico foi de $23,28 \mu\text{g/mL} \pm 0,70$.

Portanto, diante dos resultados obtidos nessa etapa do trabalho, envolvendo análise quantitativa de quatro metabólitos presentes em seis diferentes extratos AcOEt produzido a partir do cultivo em meio líquido de *F. fujikuroi*, foi possível confirmar quantitativamente a resposta deste fungo endofítico isolado dos capítulos de *P. chiquitensis* (Eriocaulaceae). A presença de íons Mg²⁺ alterou significativamente o perfil químico, e assim como descrito anteriormente, em linhas gerais a presença de SAHA, AZA, AA e Cu²⁺ são capazes de modificar também os metabólitos secundários produzidos pelo referido micro-organismo, principalmente em maiores concentrações.

6.4 Obtenção do extrato bruto em escala ampliada (PDB + Mg²⁺)

As análises dos perfis cromatográficos por CLAE-DAD registrados para cada um dos seis Exs AcOEt, preparados em escala reduzida a partir do cultivo de *F. fujikuroi* em meio líquido possibilitou averiguar e comparar os metabólitos secundários produzidos por este fungo endofítico em função de diferentes condições de cultivo, sendo elas: PDB (controle), PDB + Cu²⁺, PDB + Mg²⁺, PDB + SAHA, PDB + AZA e PDB + AA.

Quando comparamos o controle (PDB) com os demais experimentos, a presença de íons Mg²⁺ (PDB + Mg²⁺) foi a condição que apresentou melhor resultado quanto a diversificação de metabólitos produzidos pelo endofítico *F. fujikuroi*, tendo também bom rendimento em massa do seu respectivo extrato AcOEt, e por isso foi o escolhido para o crescimento em escala ampliada, seguindo a metodologia descrita no item 4.1.11.

6.5 Fracionamento do Ex. AcOEt por Sephadex LH-20

O Ex. AcOEt produzido em escala ampliada de *F. fujikuroi* (PDB + Mg^{2+}) foi fracionado por Sephadex LH-20 resultando em 11 frações, nomeadas A-K (Tabela 16). As frações foram analisadas por CCD (Figura 60), mostrando que o método de fracionamento foi eficiente exibindo boa separação dos constituintes químicos presentes no Ex. AcOEt (PDB + Mg^{2+}).

Figura 60. Análise por CCD das frações obtidas do fracionamento por Sephadex LH-20; Sistema de solventes: $CHCl_3$: AcOEt (7:3, v/v); A) iodo e B) Uv 254 nm

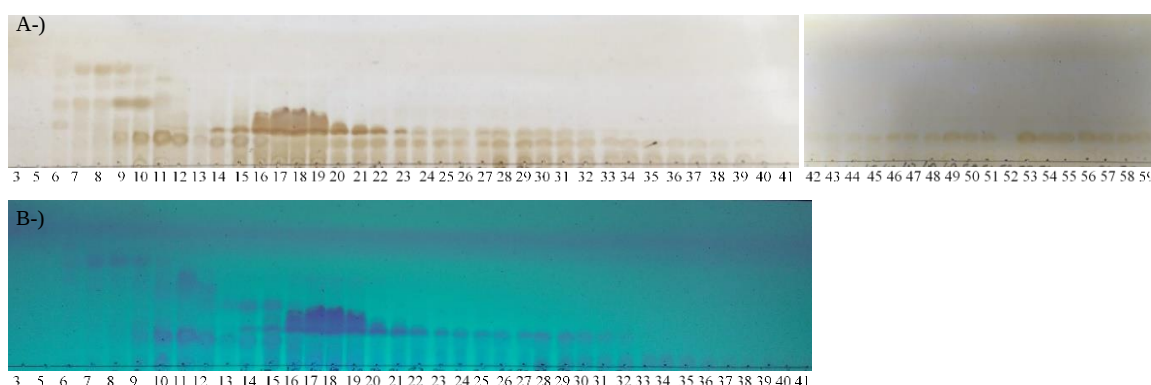


Tabela 16. Frações obtidas do fracionamento por Sephadex LH-20 e rendimento em mg

Código	Reunião	Massa
FH-A	1-8	100
FH-B	9-10	200
FH-C	11-13	47
FH-D	14-15	52
FH-E	16-19	125
FH-F	20-24	48
FH-G	25-32	32
FH-H	33-45	65
FH-I	46-52	35
FH-J	53-58	10
FH-K	59-lavagem	15

6.6 Análises por CLAE-DAD das frações A-K

Os perfis cromatográficos das frações Fr A-K obtidos do fracionamento por Sephadex LH-20 estão apresentados nas Figuras 61-63, cromatogramas A-C, D-F, G-I e J-K. Os perfis cromatográficos das frações evidenciam eficiência no fracionamento por meio de coluna de permeação em gel.

Figura 61. Cromatograma representando os perfis do fracionamento por Sephadex LH-20 frações A-C [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 30 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ= 221 nm].

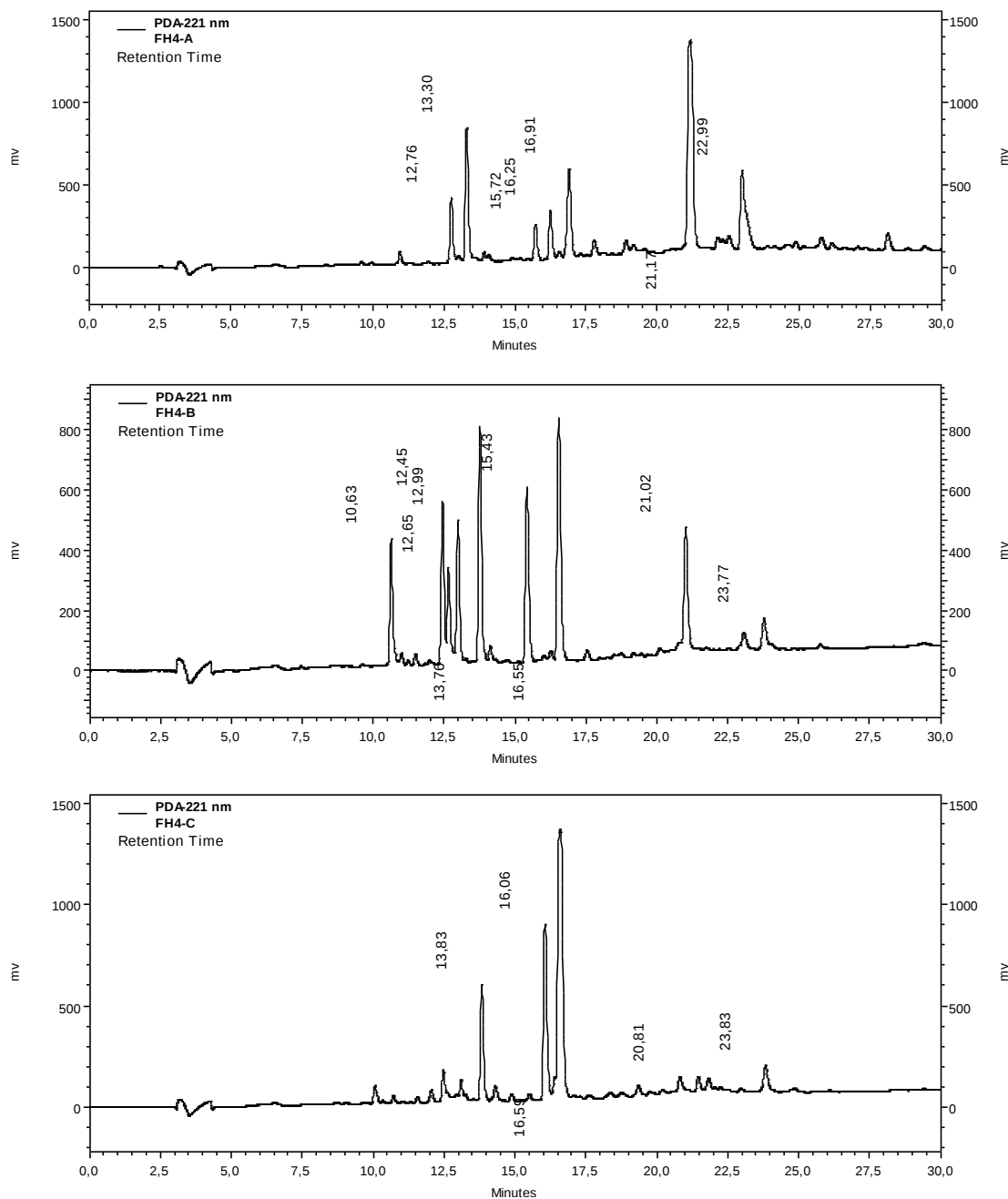


Figura 62. Cromatograma representando os perfis do fracionamento por Sephadex LH-20 Fr D-F [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 30 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 221 nm].

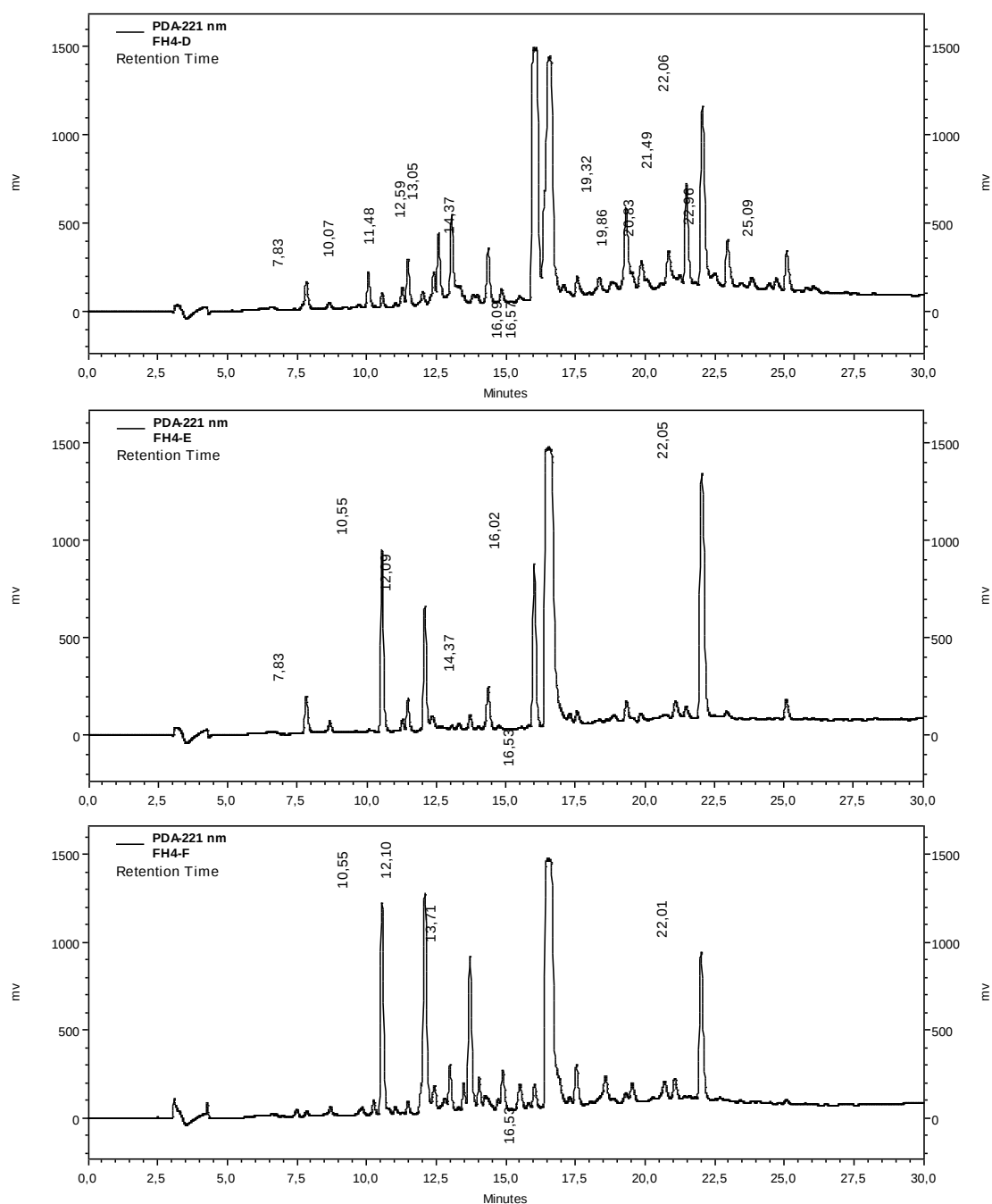


Figura 63. Cromatograma representando os perfis do fracionamento por Sephadex LH-20 Frações G-I [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 30 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 221 nm].

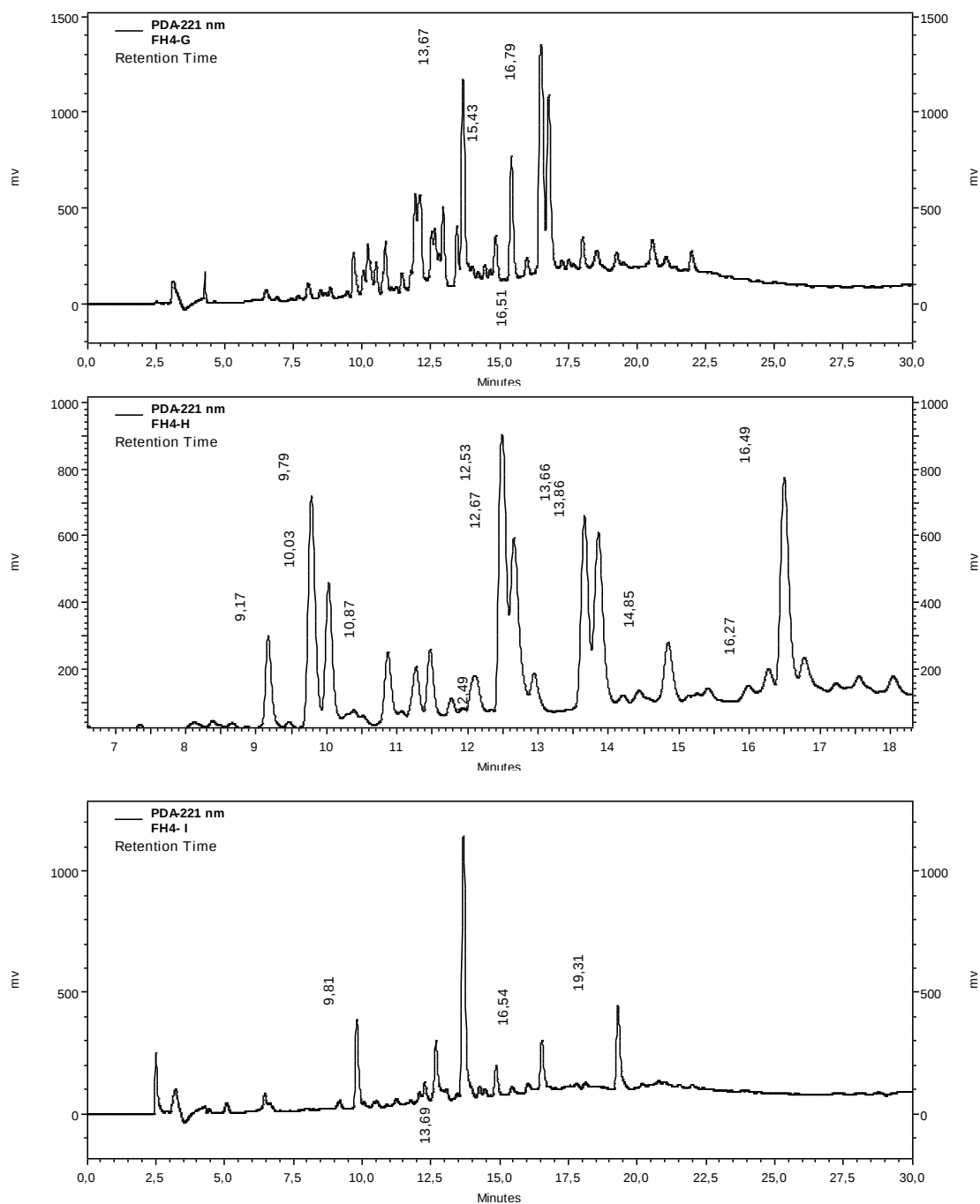
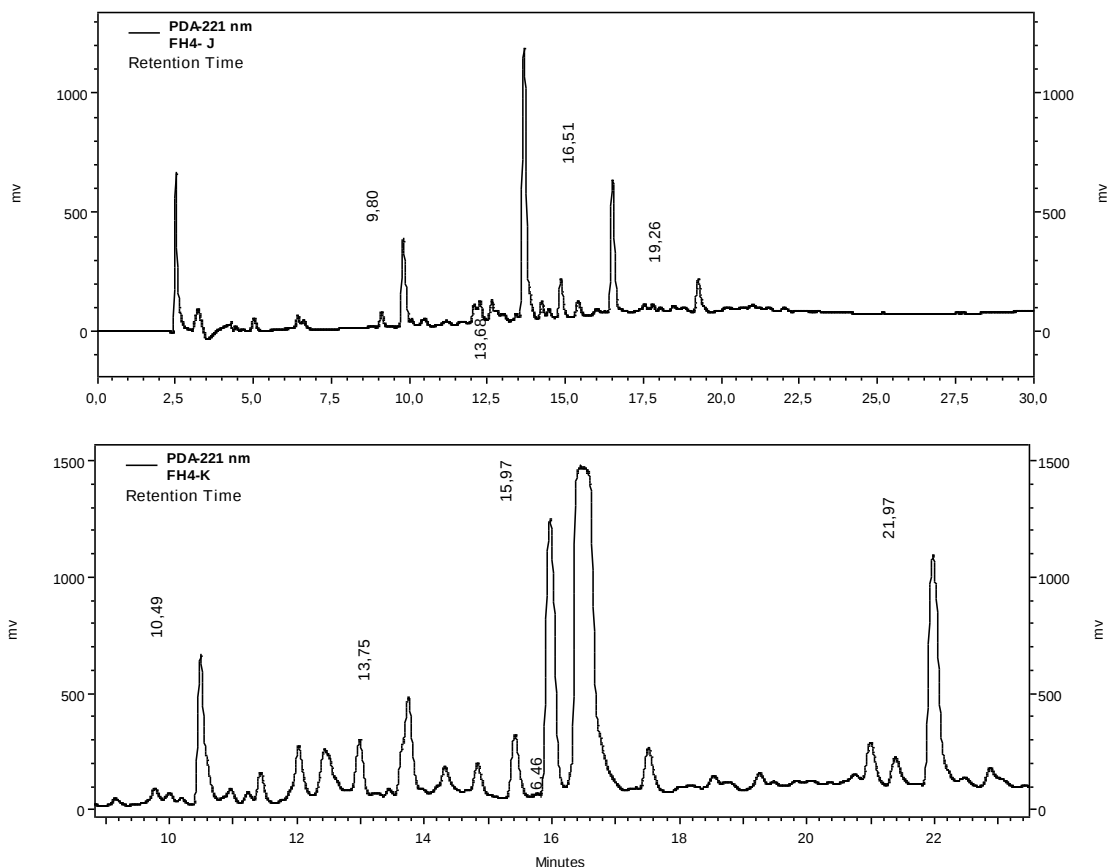


Figura 64. Cromatograma representando os perfis do fracionamento por Sephadex LH-20 Frações J-K [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 30 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ = 221 nm].



6.7 Isolamento das substâncias **F1-F18** por CLAE-DAD:

A purificação por CLAE-DAD das frações B (200 mg), C (47 mg), E (125 mg), I (10 mg) e K (15 mg) do fracionamento por Sephadex LH-20, resultou no isolamento de 18 substâncias **F1-F18**. Cromatograma representativo está sendo mostrado na Figura 65. Os cromatogramas por CLAE-DAD das substâncias estão apresentados nas Figuras 66-71.

A fase móvel consistiu em H₂O (Eluente A) e ACN (Eluente B), ambos contendo 0,05% de TFA. O modo isocrático foi usado para purificar os compostos que produzem Fr B (46% B, 221 nm) (**F8**, 3,0 mg); Fr C (37% B, 221 nm) produzindo compostos (**F11**, 17,5 mg), (**F15**, 5,0 mg) e (**17**, 4,4 mg) e (**F10**, 0,8 mg) e (**F16**, 0,4 mg); Fr I (37% B, 221 nm) produzindo composto (**F12**, 0,4 mg) Fr K (45% B, 221 nm) produzindo composto (**F18**, 0,4 mg). O modo gradiente foi usado para purificar: Fr E (20-100% B por 30 min, 221 nm) proporcionando o composto (**F2**, 2,7 mg), (**F3**, 4,0 mg) e (**F4**, 5,0 mg). Foram isolados 18 metabólitos secundários de *F. fujikuroi*, porém 9 estruturas químicas foram elucidadas.

Figura 65. Fluxograma do fracionamento e purificação do Ex. AcOEt preparado a partir do cultivo de *F. fujikuroi*

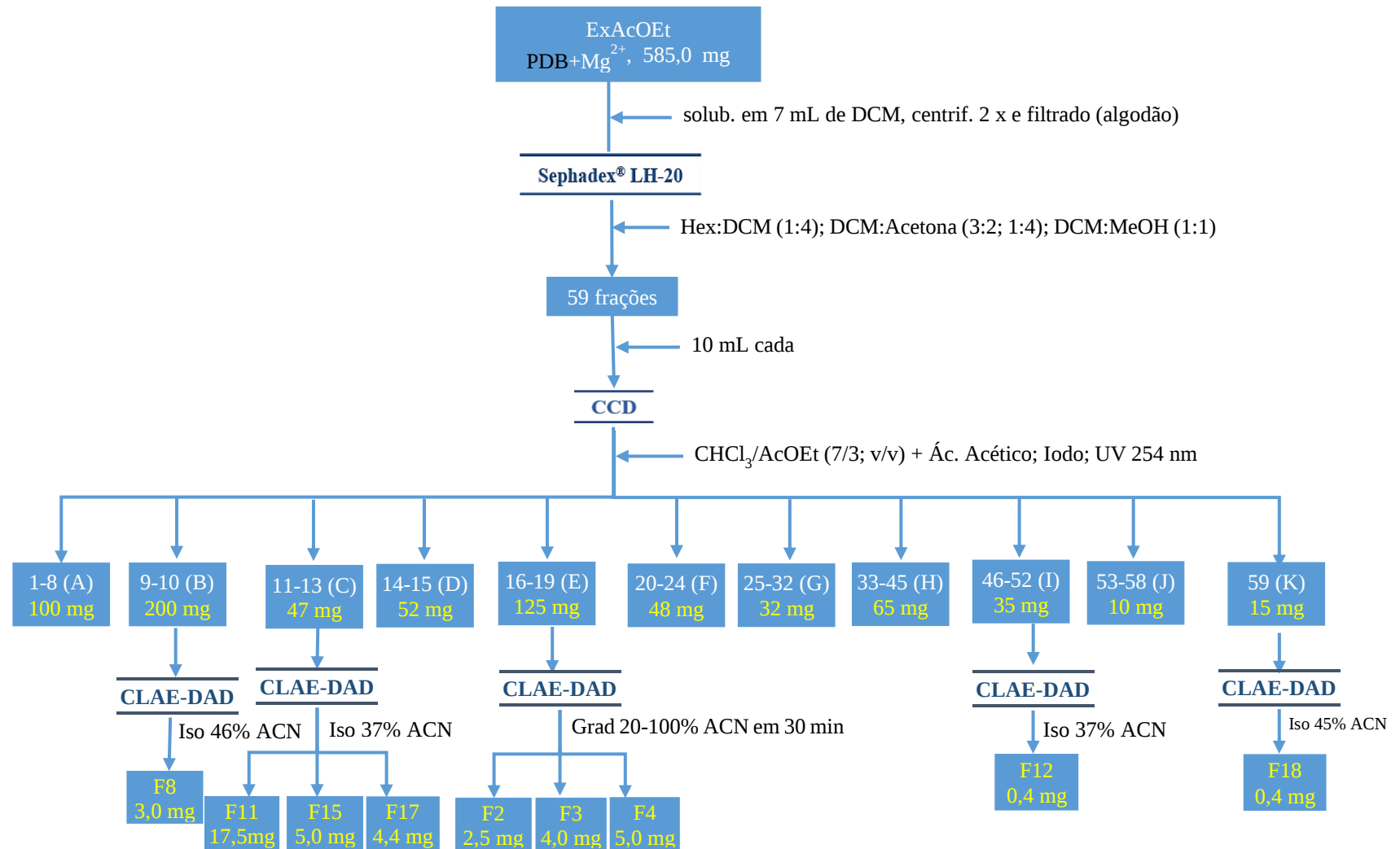


Figura 66. Cromatogramas das substâncias **F1-F3** isoladas por CLAE-DAD semi-preparativo [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H₂O + 0,1% TFA; Solvente B. ACN + 0,1 % TFA].

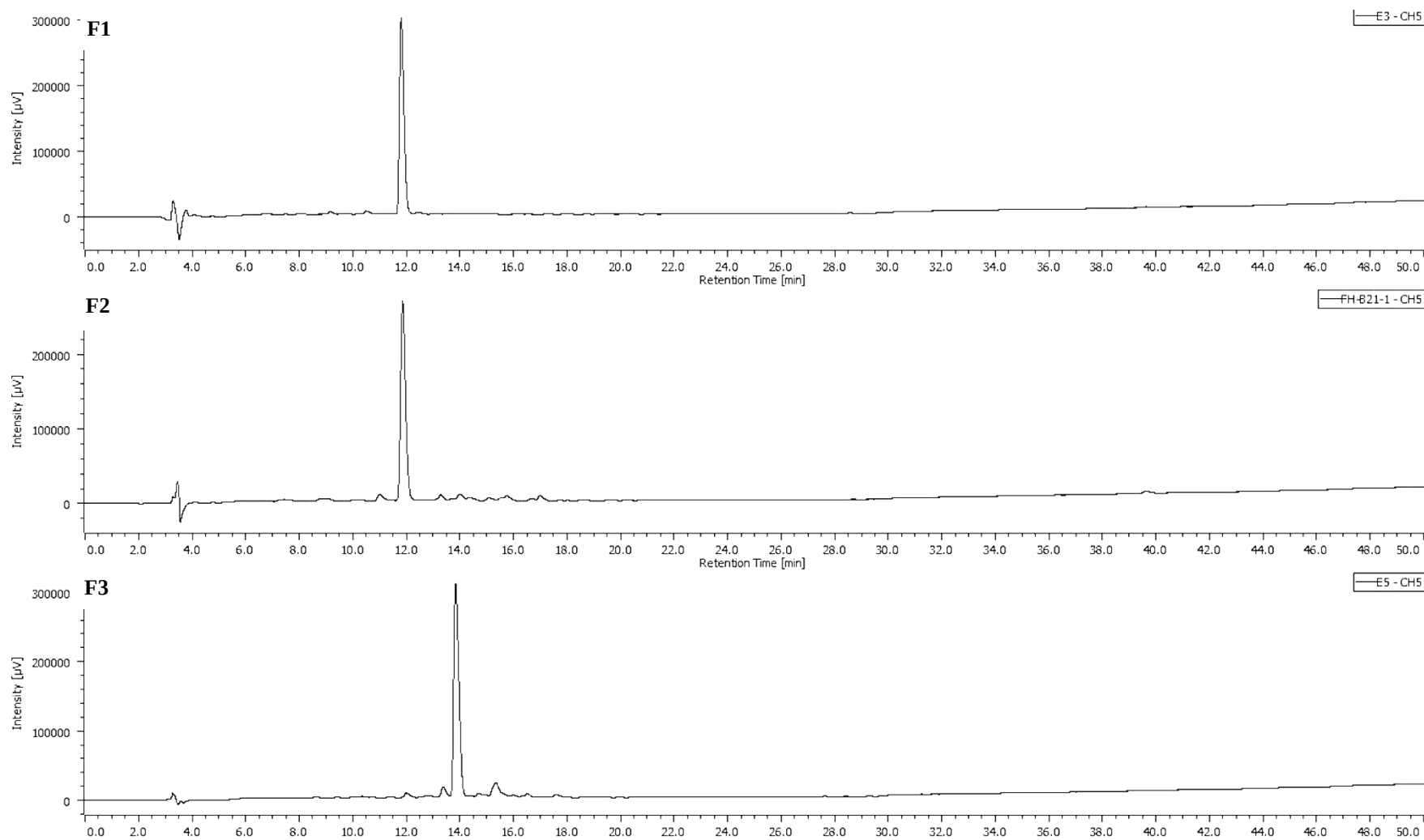


Figura 67. Cromatogramas das substâncias **F4-F6** isoladas por CLAE-DAD semi-preparativo [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ[®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μ m; Solvente A. H₂O + 0,1% TFA; Solvente B. ACN + 0,1 % TFA.

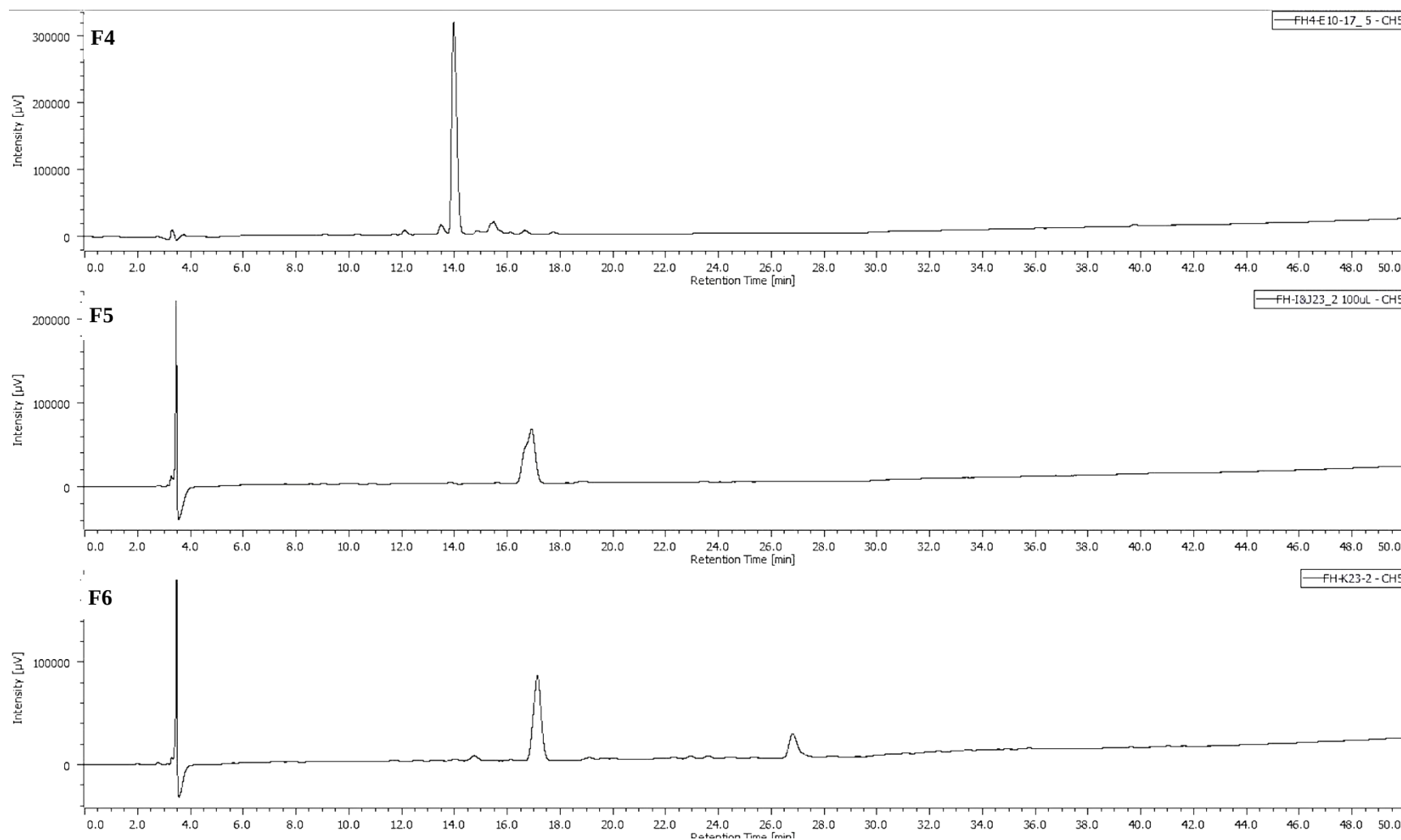


Figura 68. Cromatogramas das substâncias **F7-F9** isoladas por CLAE-DAD semi-preparativo [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ[®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H₂O + 0,1% TFA; Solvente B. ACN + 0,1 % TFA.

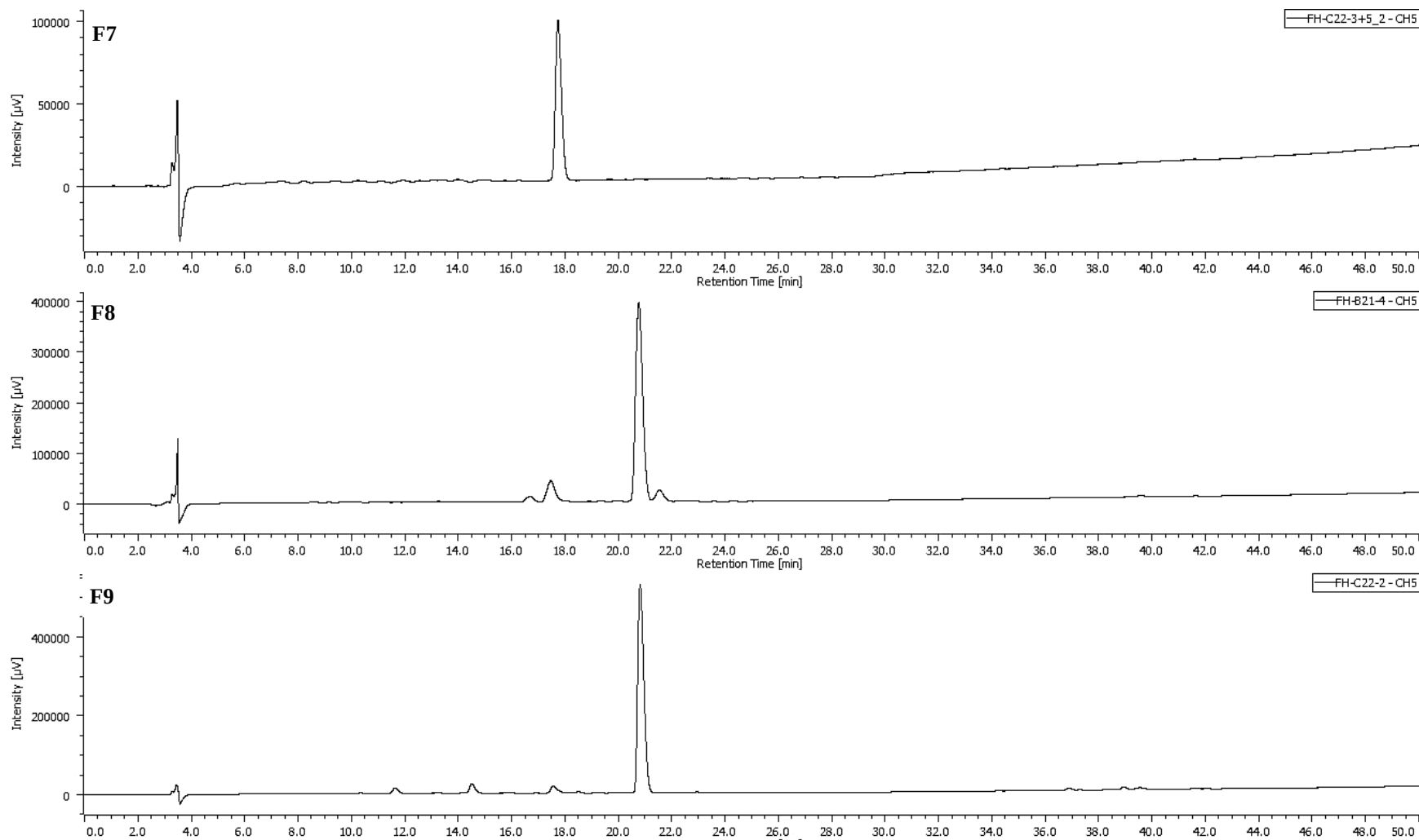


Figura 69. Cromatogramas das substâncias **F10-F12** isoladas por CLAE-DAD semi-preparativo [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ[®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μ m; Solvente A. H₂O + 0,1% TFA; Solvente B. ACN + 0,1 % TFA.

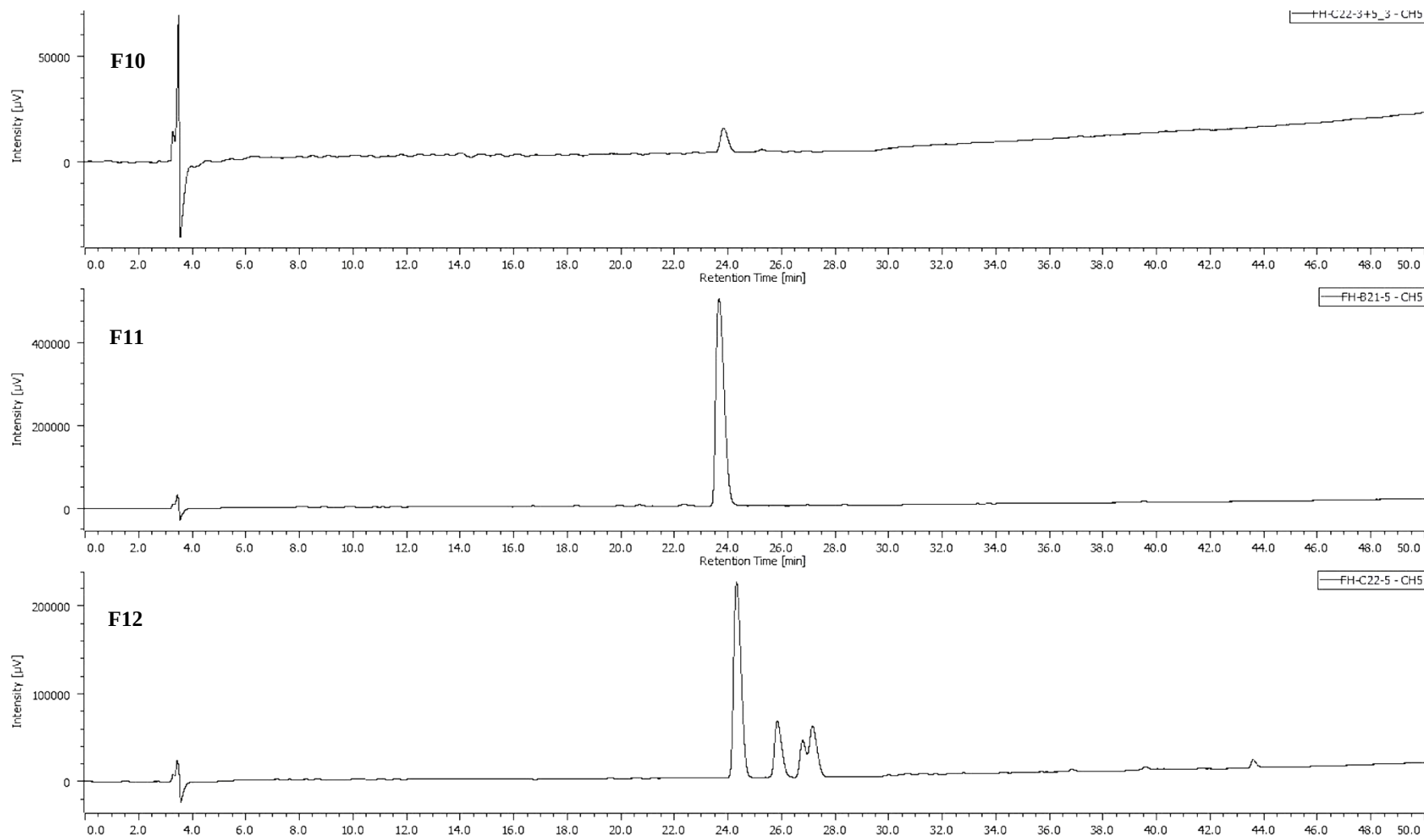


Figura 70. Cromatogramas das substâncias **F13-F15** isoladas por CLAE-DAD semi-preparativo [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ[®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μ m; Solvente A. H₂O + 0,1% TFA; Solvente B. ACN + 0,1 % TFA.

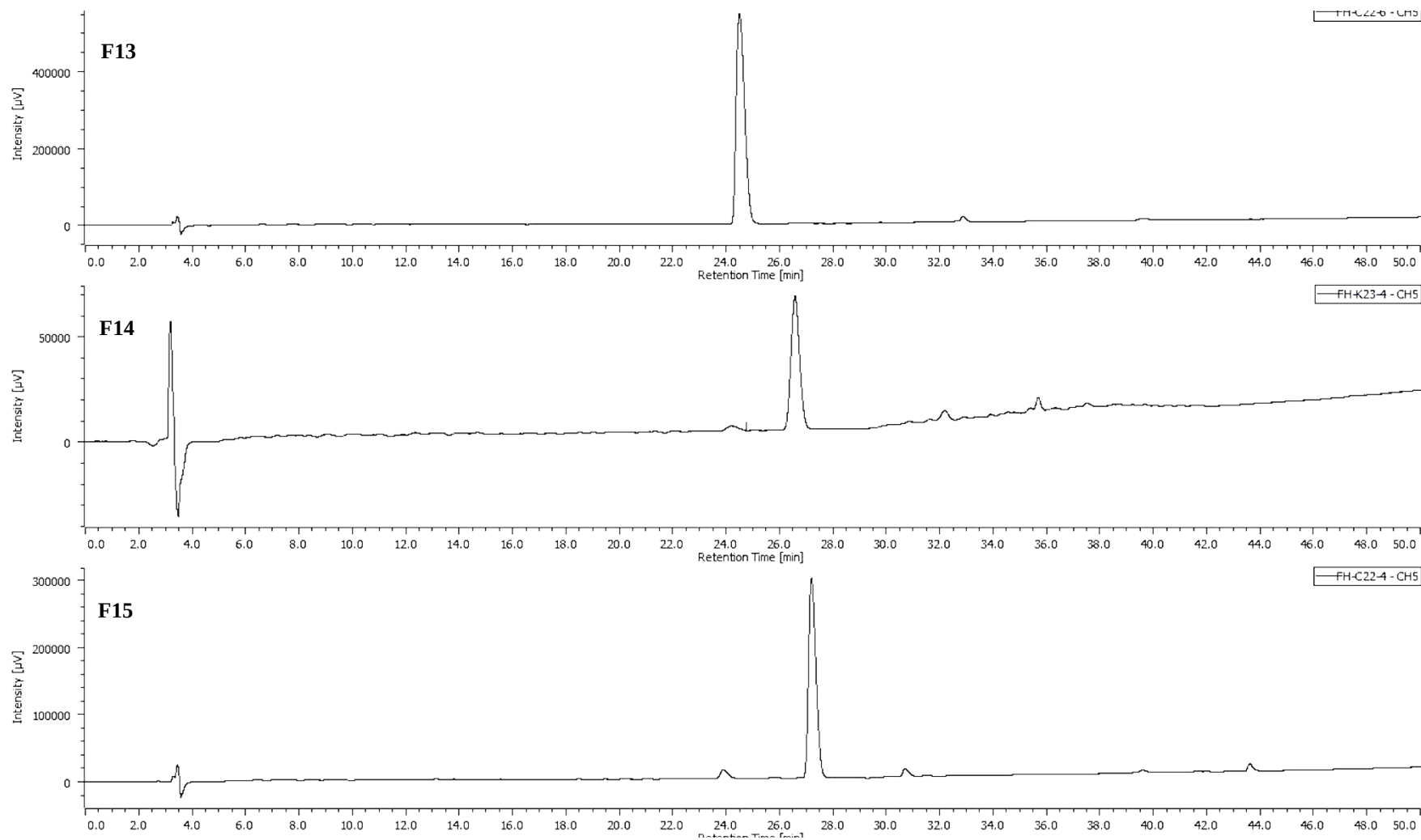
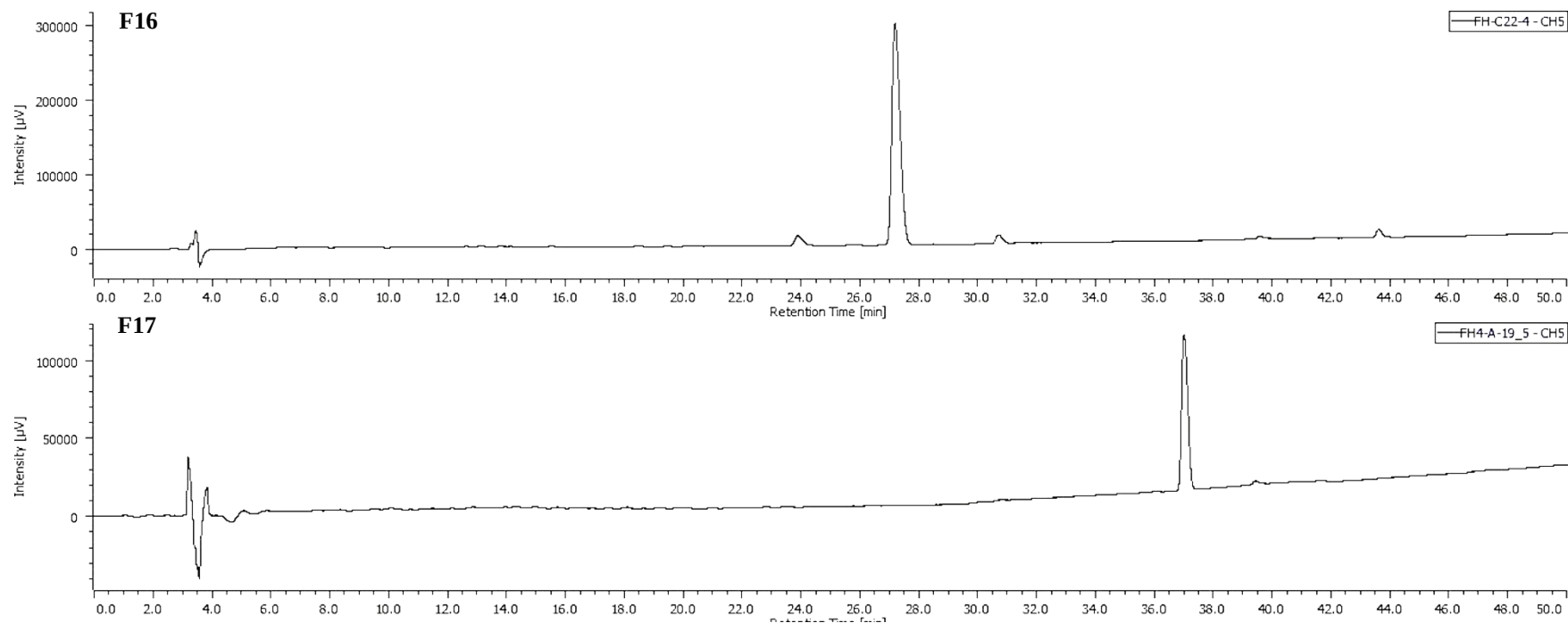


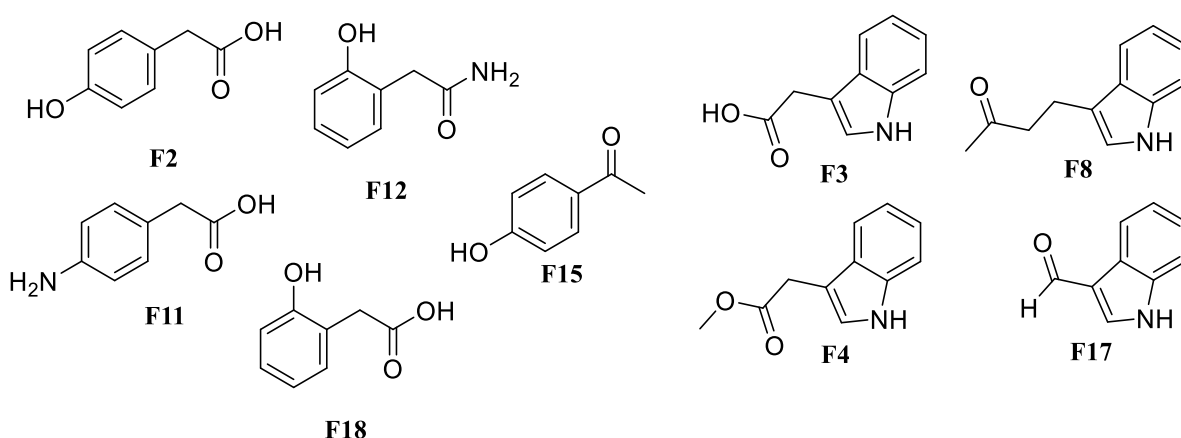
Figura 71. Cromatogramas das substâncias **F16-F17** isoladas por CLAE-DAD semi-preparativo [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ[®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μ m; Solvente A. H₂O + 0,1% TFA; Solvente B. ACN + 0,1 % TFA. Gradiente



6.8 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL das substâncias isoladas de *F. fujikuroi*

O *F. fujikuroi* foi submetido ao cultivo em escala ampliada em meio PDB incorporado com íons Mg^{2+} , forneceu o Ex. AcOEt utilizado para o fracionamento por coluna cromatográfica empacotada com Sephadex LH-20. As frações obtidas foram submetidas a um segundo passo para o isolamento dos metabólitos secundários por CLAE-DAD fornecendo o isolamento de ácido acético-2-(4-hidroxifenil) (**F2**), ácido acético-2-(1*H*-indol-6-il) (**F3**), metil 2-(1*H*-indol-3-il)acetato (**F4**), 4-(1*H*-indol-3-il)butan-2-ona (**F8**), 2-fenilacetamida (**F11**), ácido acético-2-(4-aminofenil) (**F12**), ácido acético-1-(4-aminofenil) (**F15**), 1*H*-indole-6-carbaldeído (**F17**) e ácido acético-2-(3-hidroxifenil) (**F18**), Figura 72.

Figura 72. Estrutura química dos compostos isolados produzidos por *F. fujikuroi* (PDB + Mg^{2+})



6.8.1 Substância **F3**:

O espectro de RMN de 1H da substância **F3** (Tabela 17, Figura 73A) apresentou sinais característicos de hidrogênios indólicos, sendo quatro sinais de hidrogênios aromáticos com deslocamentos químicos em δ 7,53 (*dd*, $J=7,9$ e $1,8$ Hz), 7,01 (*dt*, $J=7,9$ e $1,2$ Hz), 7,10 (*dt*, $J=7,9$, $1,2$ e $1,0$ Hz) e 7,34 (*dd*, $J=7,9$, $1,2$ Hz). Estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-4, H-5, H-6 e H-7, respectivamente. O sinal com deslocamento em δ 7,16 (*d*, $J=2,4$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio H-2 pertencente ao anel indólico. O deslocamento químico de hidrogênio metilênico foi observado em δ 3,73 (2H, *s*), correspondente aos hidrogênios na posição H-8.

No experimento ^1H - ^1H *g*COSY (Figura 73B) foram observadas as correlações entre os hidrogênios aromáticos com deslocamento químico em δ 7,53 (H-4) e δ 7,01 (H-5), e também entre os hidrogênios δ 7,10 (H-6) com o δ 7,34 (H-7).

Os experimentos *g*HSQC (Figura 73C) possibilitaram atribuir os hidrogênios a seus respectivos carbonos e estão demonstrados na Tabela 17.

No espectro de *g*HMBC (Figura 73D) pode-se observar sinais de carbonos referentes a carbonila da função ácido carboxílico em δ 176,2 (C-9). Este deslocamento apresentou correlação a 3J com o hidrogênio em δ 3,73 (CH₂-8), possibilitando atribuí-lo na estrutura. As correlações dos hidrogênios aromáticos foram observadas respectivamente entre δ 7,53 (H-4) com os carbonos δ 107,7 (C-3), δ 121,1 (C-6) e δ 136,7 (C-7a), e entre δ 7,34 (H-7) com os carbonos δ 118,4 (C-5) e δ 127,2 (C-3a). As correlações a 3J do hidrogênio do anel indólico foram observadas entre δ 7,16 (H-2) com os carbonos δ 107,7 (C-3), δ 127,2 (C-3a) e δ 136,7 (C-7a). Também foi observado a correlação a 3J entre os hidrogênios em H₂-8 com a carbonila ácido carboxílico em COOH-9, e com os carbonos δ 127,2 (C-3a) e δ 136,7 (C-7a).

A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C bem como comparação com os dados espectroscópicos da literatura (CHIMATADAR; BASAVARAJ; NANDIBEWOR, 2007; SUN et al., 2010), permitiu identificar a estrutura química dessa substância como sendo o Ácido indolacético (AIA), Figura 73E.

Tabela 17. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, em CD₃OD) mono e bidimensionais da substância **F3**

POSIÇÃO	* δ ^{13}C	δ ^1H	COSY	HMBC
1	-	-	-	-
2	123,2 (CH)	7,16, (<i>d</i> , <i>J</i> =2,4 Hz)	-	107,7; 127,3; 136,7
3	107,7 (Cq)	-	-	-
3a	127,2 (Cq)	-	-	-
4	118,0 (CH)	7,53 (<i>dd</i> , <i>J</i> =7,9 e 1,8 Hz)	7,01; 7,34	107,7; 121,1; 136,7
5	118,4 (CH)	7,01 (<i>dt</i> , <i>J</i> =7,9 e 1,2 Hz)	7,36	110,8; 127,3
6	121,1 (CH)	7,10 (<i>dt</i> , <i>J</i> =7,9, 1,2 e 1,0 Hz)	7,23; 7,48	118,4; 136,7
7	111,4 (CH)	7,34 (<i>dd</i> , <i>J</i> =7,9, 1,2 Hz)	6,98	118,4; 127,2; 127,3
7a	136,7 (Cq)	-	-	-
8	30,5 (CH ₂)	3,73 (<i>s</i>)	-	107,7; 127,3; 176,2
9	176,2 (C=O)	-	-	-

Figura 73A. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) da substância **F3**

Felipe_3.1.fid

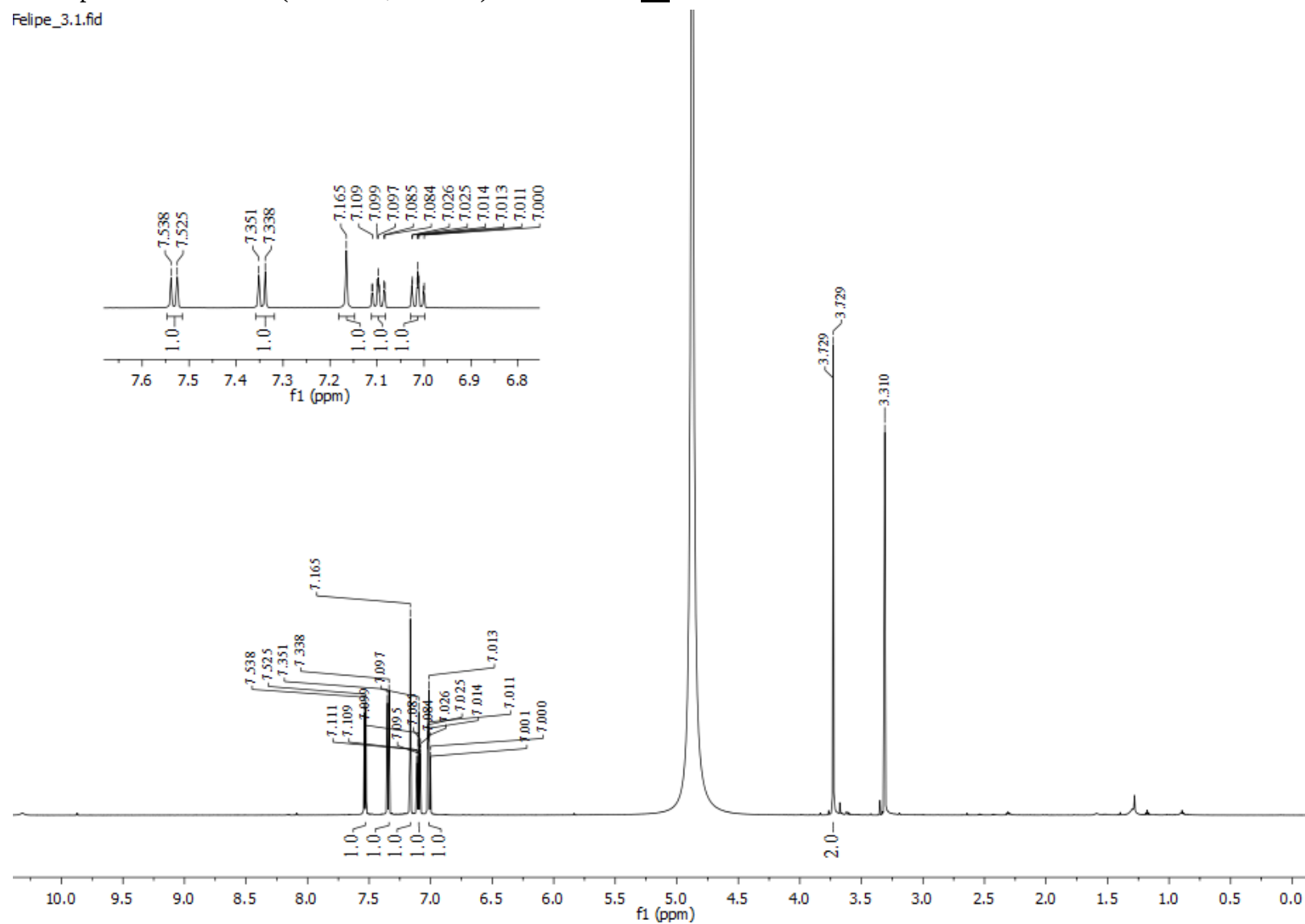


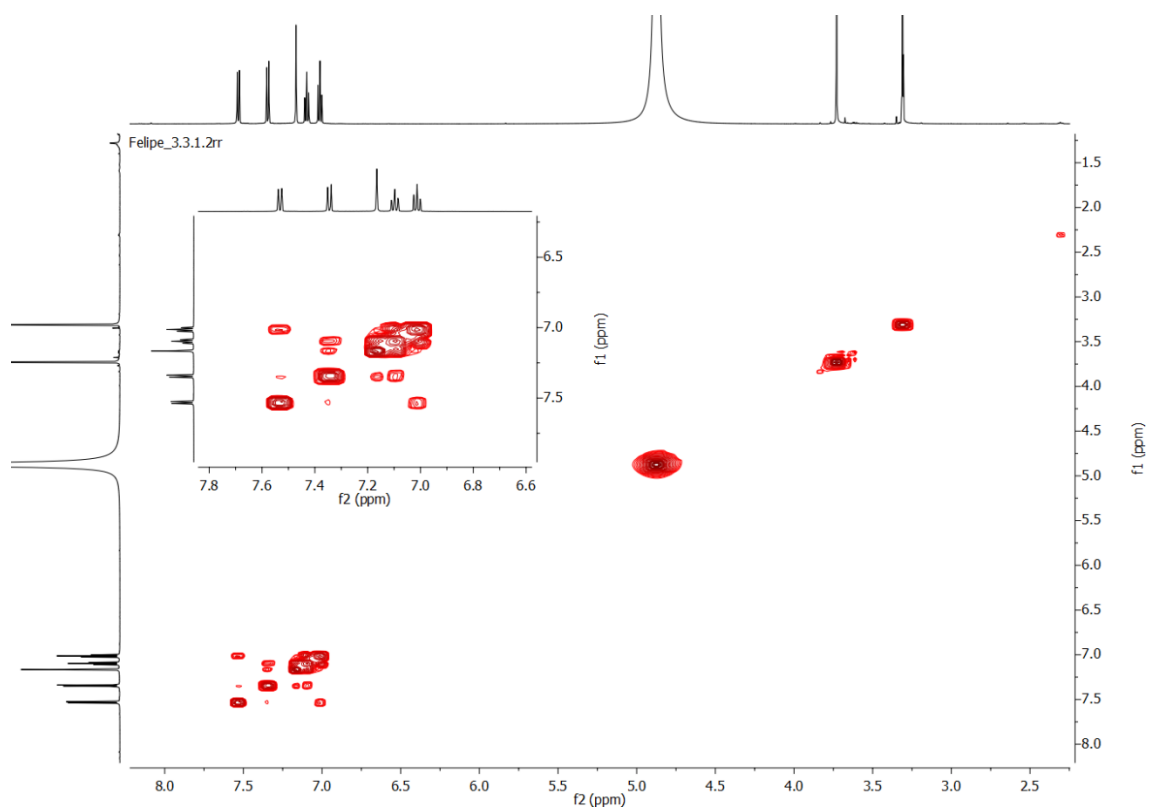
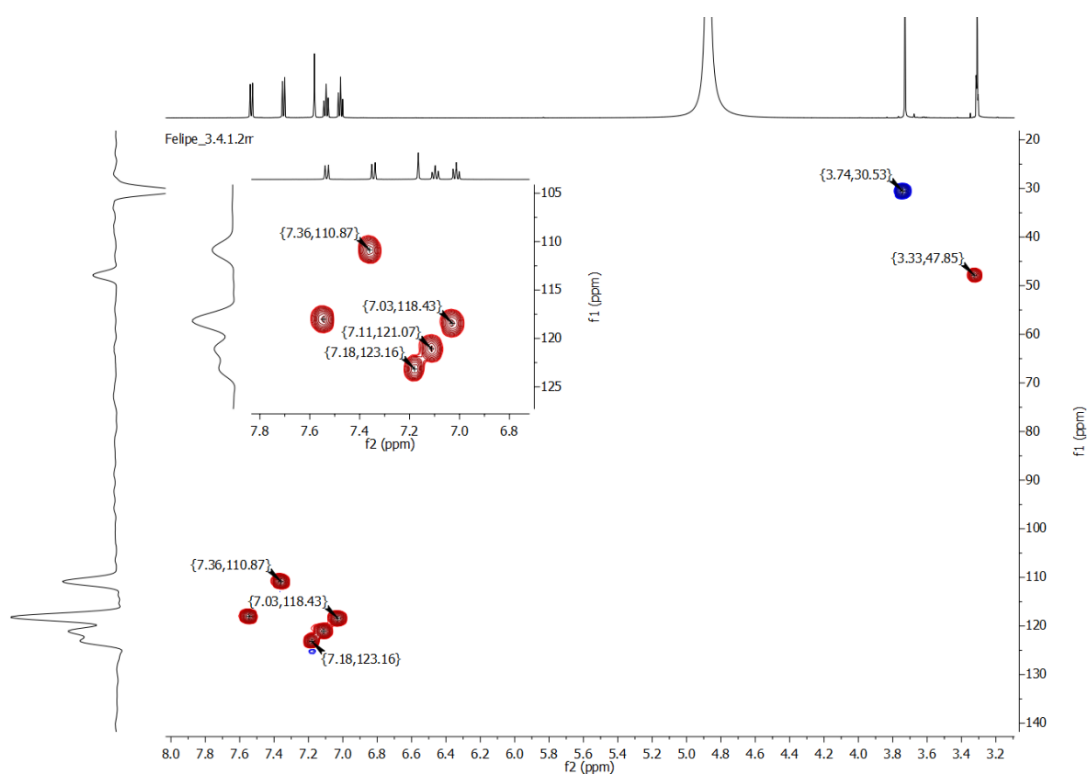
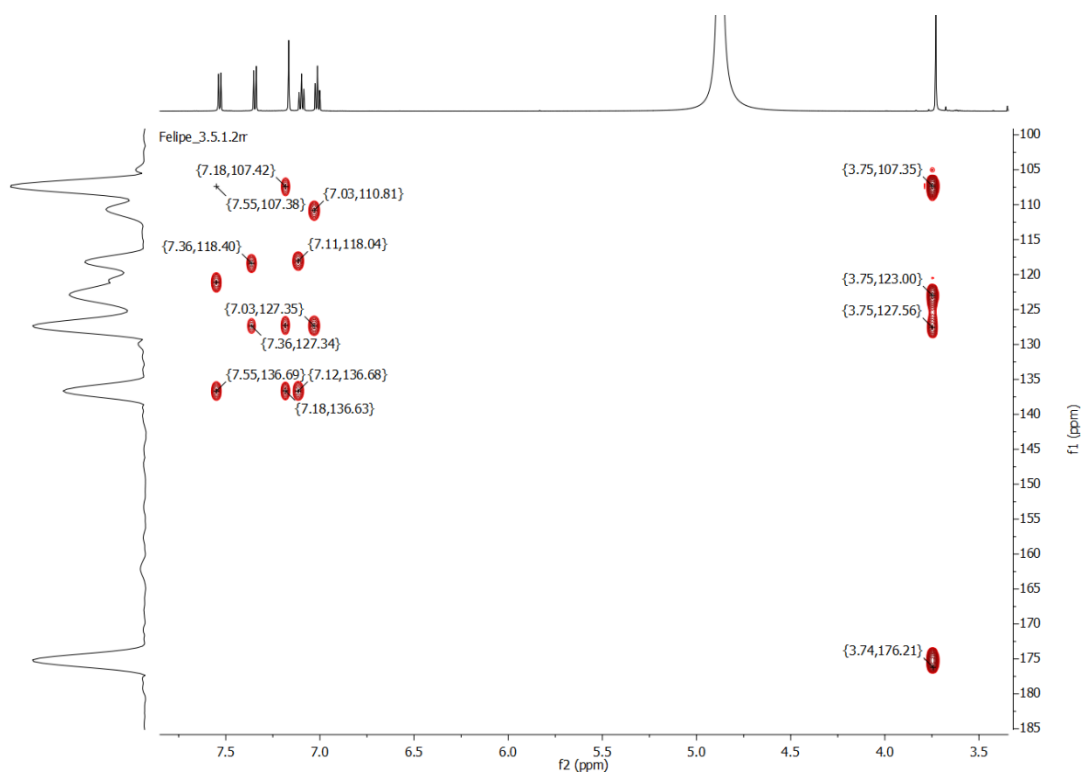
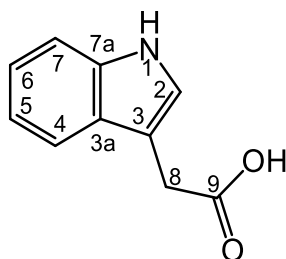
Figura 73B. Espectro de RMN de *g*COSY (600 MHz, CD₃OD) da substância **F3****Figura 73C.** Mapa de contorno HSQC (600 MHz, CD₃OD) da substância **F3**

Figura 73D. Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CD₃OD) da substância **F3****Figura 73E.** Estrutura química da substância **F3**

6.8.2 Substância **F4**:

O espectro de RMN de ^1H da substância **F4** (Tabela 18, Figura 74A) apresentou majoritariamente sinais de hidrogênios muito semelhantes aos da substância **F2**. Essas duas estruturas diferem no substituinte na posição (C-3a). Na substância **F2** observa-se carbonila de ácido carboxílico em δ 176,2 (C-9) enquanto que **F4** há carbonila de éster.

No experimento ^1H - ^1H $g\text{COSY}$ (Figura 74B) foram observadas as mesmas correlações do composto **F2**.

Os experimentos $g\text{HSQC}$ (Figura 74C) possibilitaram atribuir os hidrogênios a seus respectivos carbonos e estão demonstrados na Tabela 18.

No espectro de $g\text{HMBC}$ (Figura 74D) pode-se observar sinal de carbono referente a carbonila da função éster em δ 174,9 (C-9). Este deslocamento apresentou correlação a 3J com os hidrogênios em δ 3,67 (CH_3 -10), possibilitando atribuí-lo na estrutura.

A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C bem como comparação com os dados espectroscópicos da literatura (LIU; JUNG; ZHANG, 2006), permitiu identificar a estrutura química dessa substância como sendo o metil 2-(1*H*-indol-3-il)acetato, Figura 74E.

Tabela 18. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD) mono e bidimensionais substância **F4**

Posição	* δ ^{13}C	δ ^1H (600MHz)	COSY	HMBC
1	-		-	-
2	122,2 (CH)	7,16, (s)		108,2; 127,9; 137,4
3	108,2 (Cq)	-	-	-
3 ^a	127,9 (Cq)	-	-	-
4	119,1 (CH)	7,50 (<i>dd</i> , $J=8,0$ e $1,0$ Hz)	7,01; 7,34	121,8; 137,4
5	119,7 (CH)	7,01 (<i>dt</i> , $J=8,0$, $6,9$, $1,0$ Hz)	7,34	111,6; 127,9
6	122,2 (CH)	7,10 (<i>dt</i> , $J=8,0$, $6,9$, $1,0$ Hz)	7,01	119,1; 137,4
7	112,1 (CH)	7,34 (<i>dd</i> , $J=8,0$ e $1,0$ Hz)	6,98	119,1; 127,9
7a	137,4 (Cq)	-	-	-
8	31,6 (CH_2)	3,77 (s)	-	108,2; 123,9; 127,9; 174,9
9	174,9 (C=O)	-	-	-
10	52,1 (CH_3)	3,67 (s)	-	174,9

Figura 74A. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) da substância **F4**

Felipe_4.2.fid

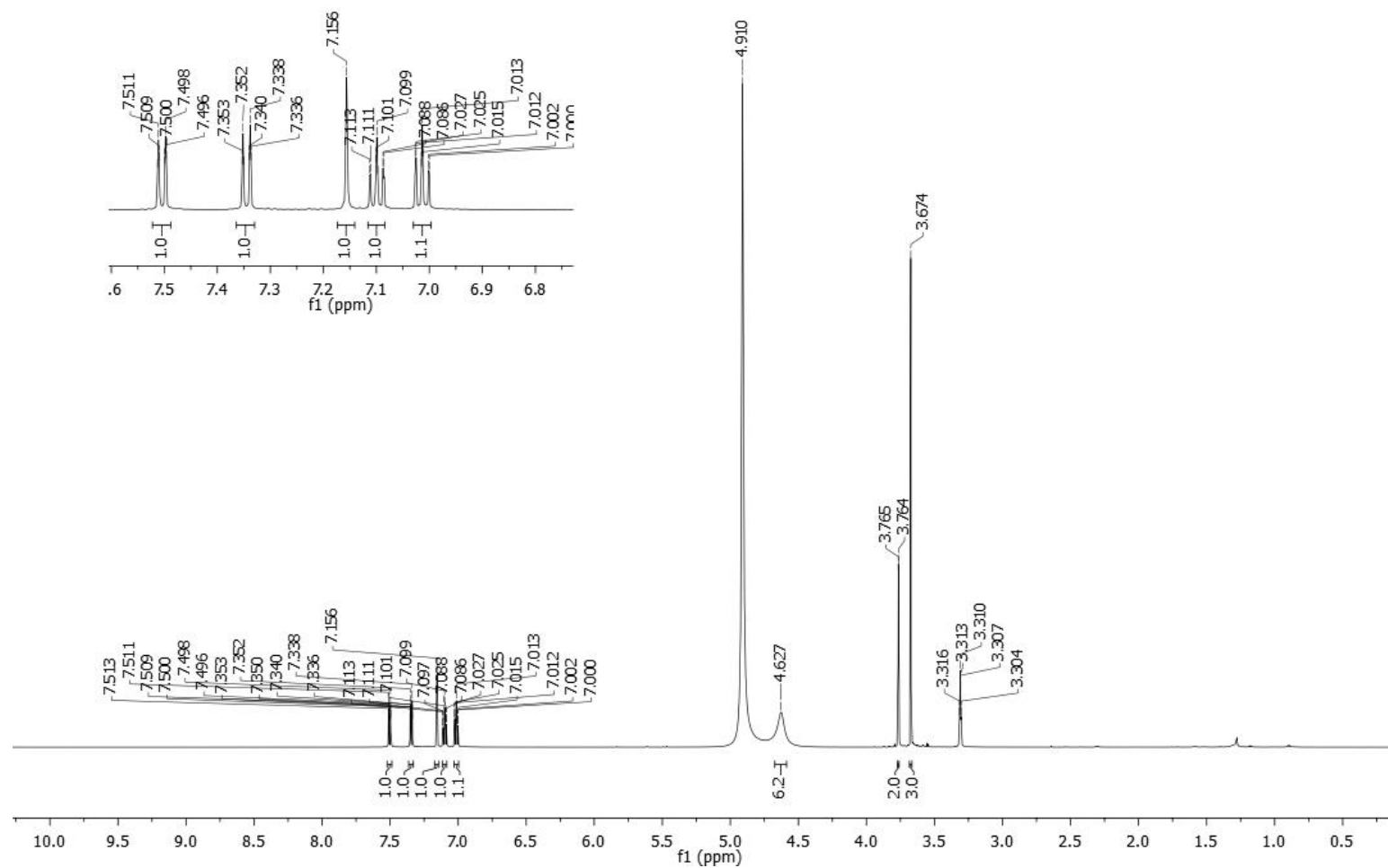


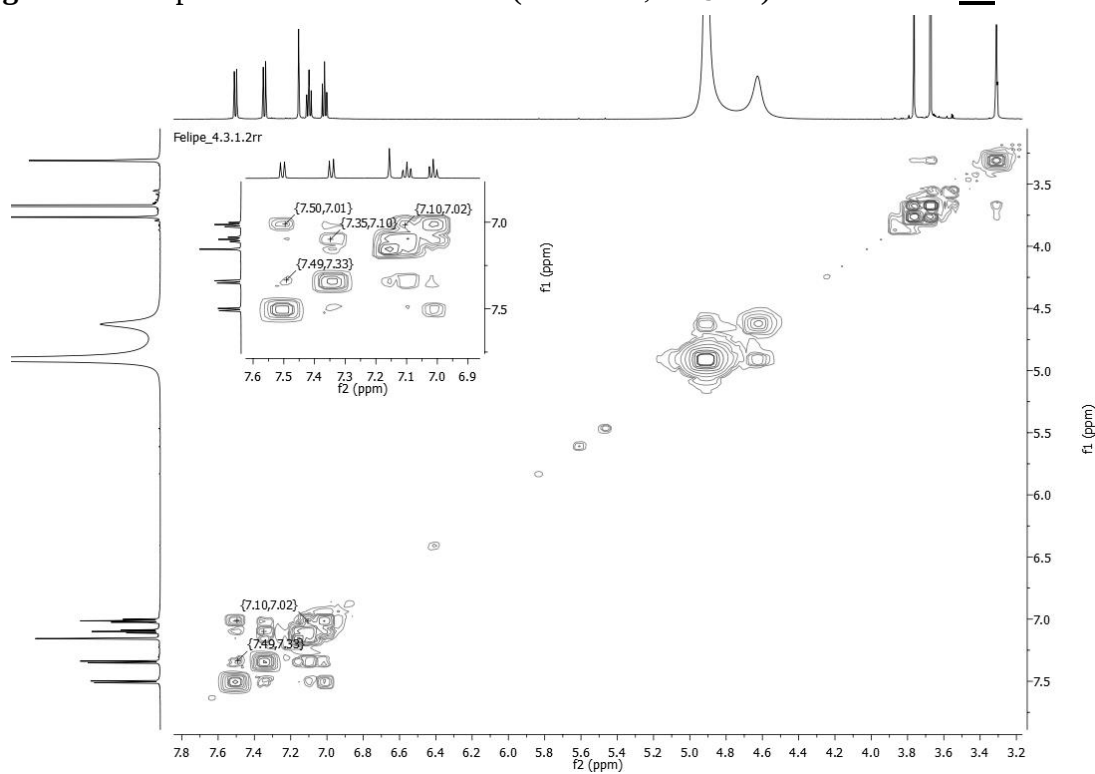
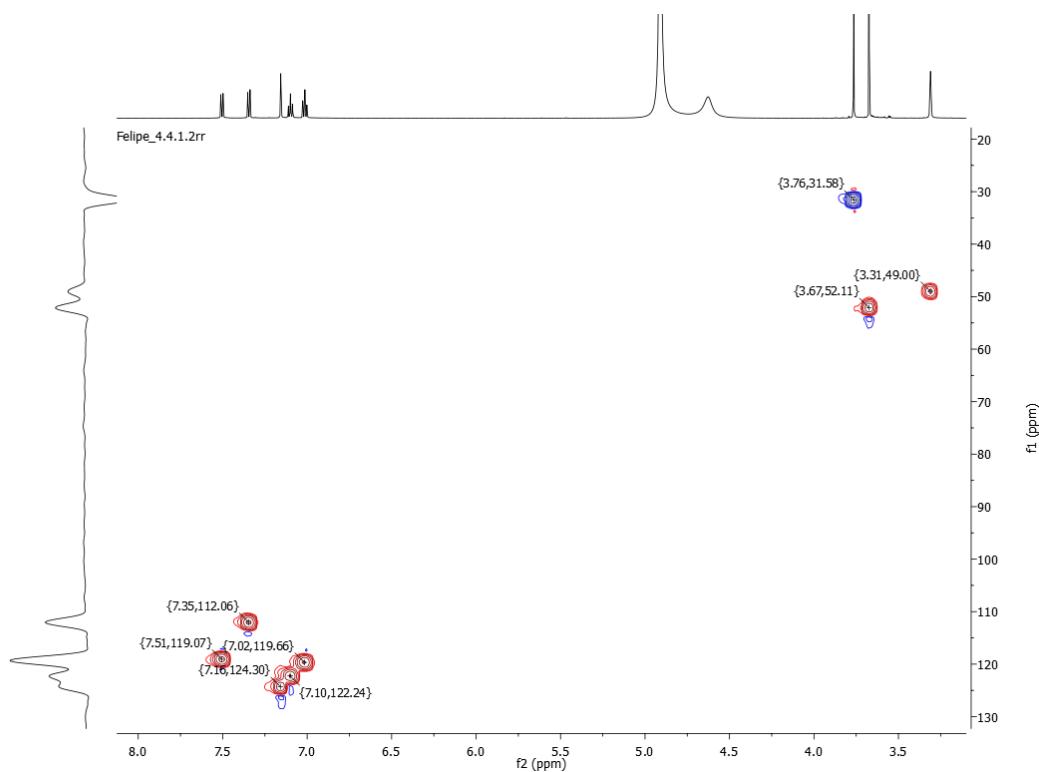
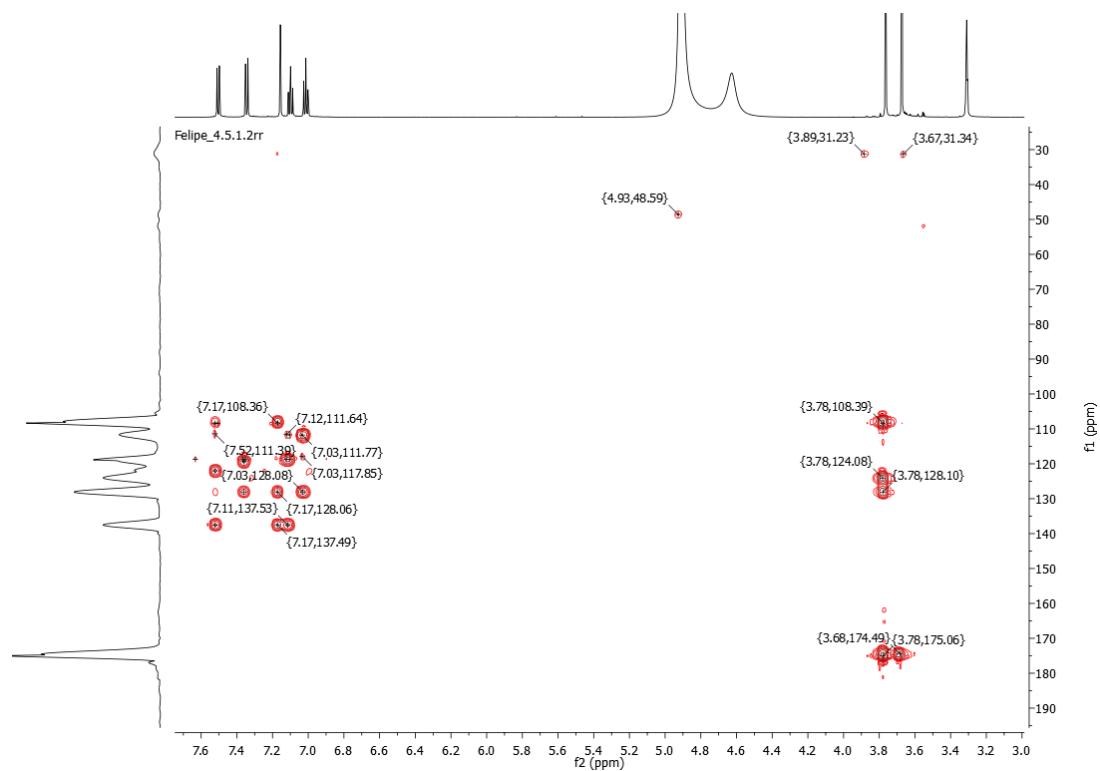
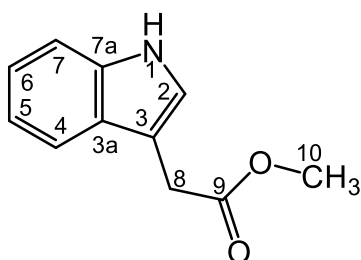
Figura 74B. Espectro de RMN de COSY (600 MHz, CD₃OD) da substância **F4****Figura 74C.** Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CD₃OD) da substância **F4**

Figura 74D. Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CD₃OD) da substância **F4****Figura 74E.** Estrutura química da substância **F4**

6.8.3 Substância **F17**:

O espectro de RMN de ^1H da substância **F17** (Tabela 19, Figura 75A) apresentou majoritariamente sinais de hidrogênios muito semelhantes aos da substância **F2** e **F4**. No entanto o grupo metilênico é ausente em **F17**. Além dessa diferença no substituinte na posição (C-3a). Na substância **F17** observa-se carbonila de aldeído em δ 187,3 (C-8) enquanto que **F4** há carbonila de éster e em **F2** de ácido carboxílico.

O experimento ^1H - ^1H *g*COSY (Figura 75B) foram observadas similares correlações observadas para os compostos **F2** e **F4**.

Os experimentos *g*HSQC (Figura 75C) possibilitaram atribuir os hidrogênios a seus respectivos carbonos e estão demonstrados na Tabela 19.

A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C bem como comparação com os dados espectroscópicos da literatura (EVIDENTE; SURICO, 1986; YANG; CORDELL, 1997), permitiu identificar a estrutura química dessa substância como sendo o 1*H*-indol-3-carbaldeído, Figura 75E.

Tabela 19. Dados de RMN de ^1H (600MHz) e ^{13}C (CD_3OD) mono e bidimensionais da substância **F17**

Posição	* δ ^{13}C	δ ^1H	COSY	HMBC
1	-		-	-
2	122,2 (CH)	7,16, (s)		108,2; 127,9; 137,4
3	108,2 (Cq)	-	-	-
3a	127,9 (Cq)	-	-	-
4	122, 1 (CH)	8,16 (<i>dd</i> , $J=8,0$ e $1,0$ Hz)	7,01; 7,34	121,8; 137,4
5	119,7 (CH)	7,01 (<i>dt</i> , $J=8,0$, 6,9, $1,0$ Hz)	7,34	111,6; 127,9
6	122,2 (CH)	7,10 (<i>dt</i> , $J=8,0$, 6,9, $1,0$ Hz)	7,01	119,1; 137,4
7	112,1 (CH)	7,34 (<i>dd</i> , $J=8,0$ e $1,0$ Hz)	6,98	119,1; 127,9
7a	137,4 (Cq)	-	-	-
8	187,3 (C=O)	9,89 (s)	-	-

Figura 75A. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) da substância **F17**

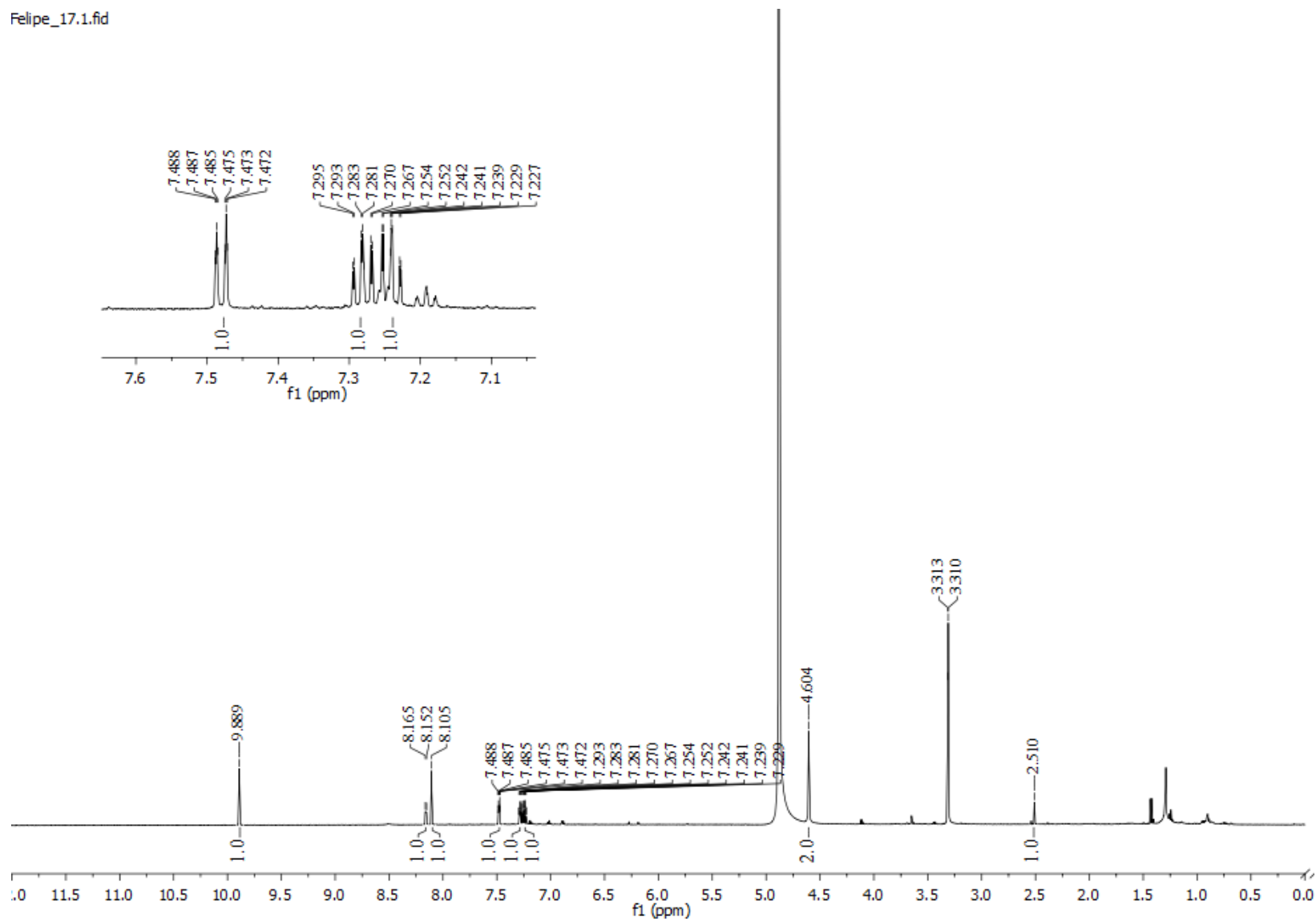


Figura 75B. Espectro de RMN de COSY (600 MHz, CD₃OD) da substância **F17**

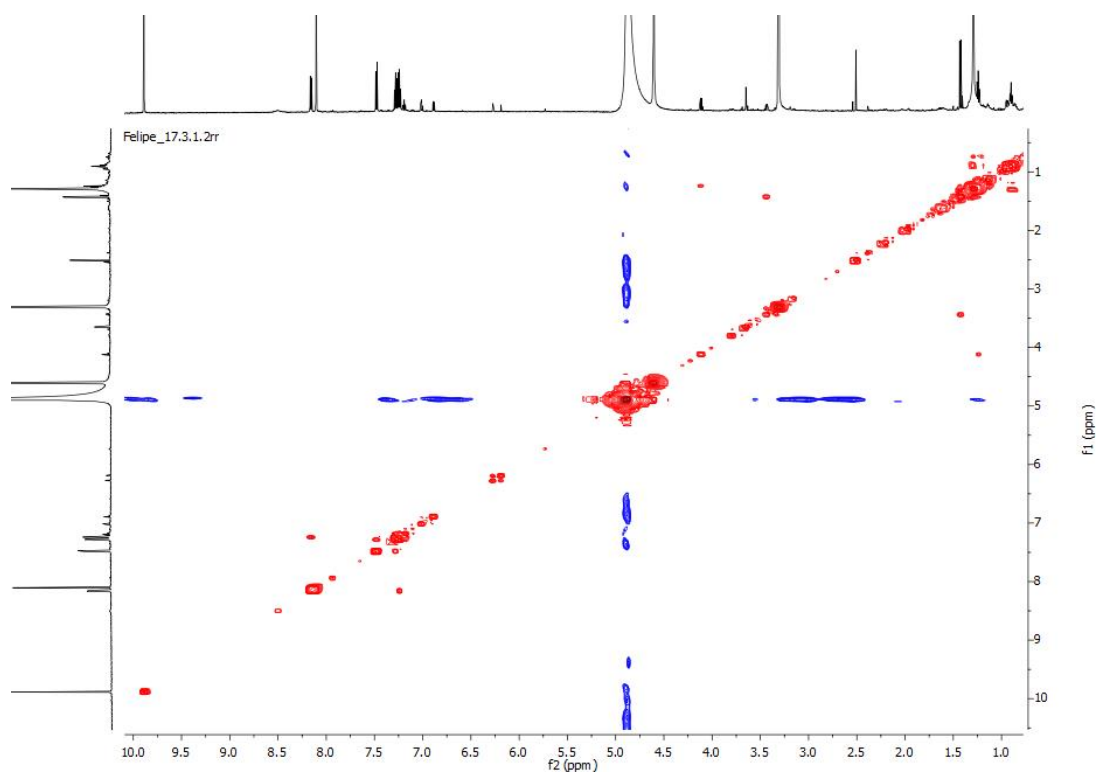


Figura 75C. Mapa de contorno HSQC (600 MHz, CD₃OD) da substância **F17**

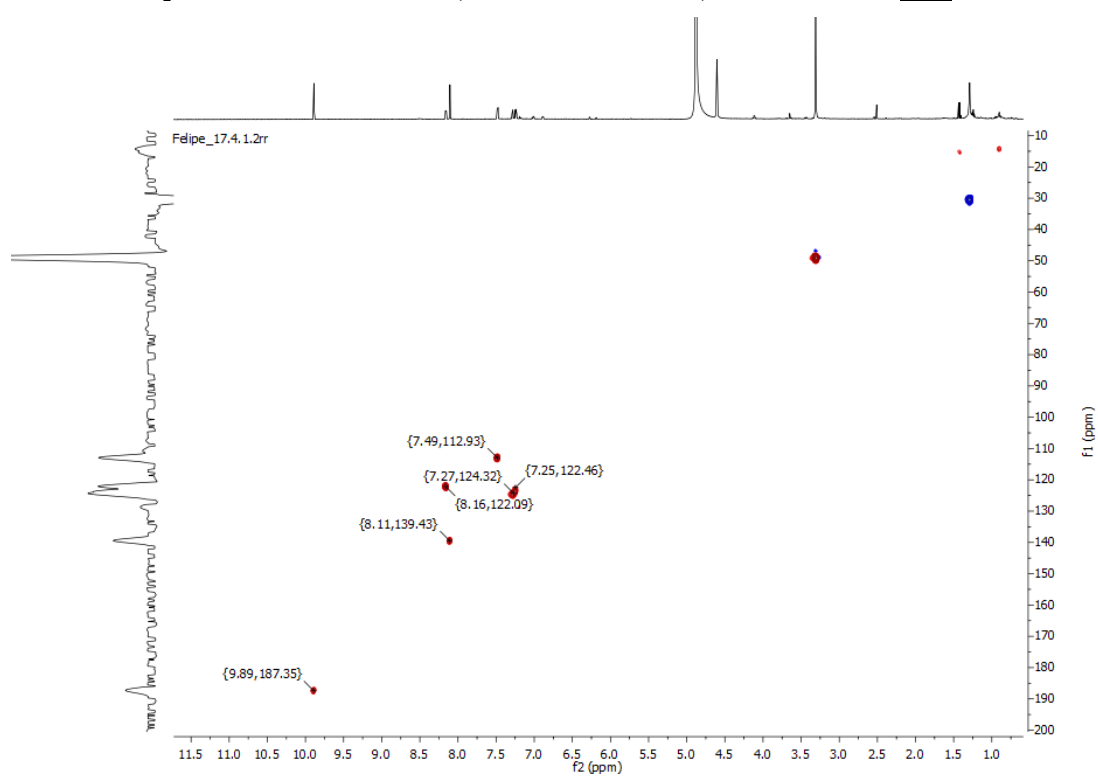


Figura 75D. Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CD₃OD) da substância **S17**

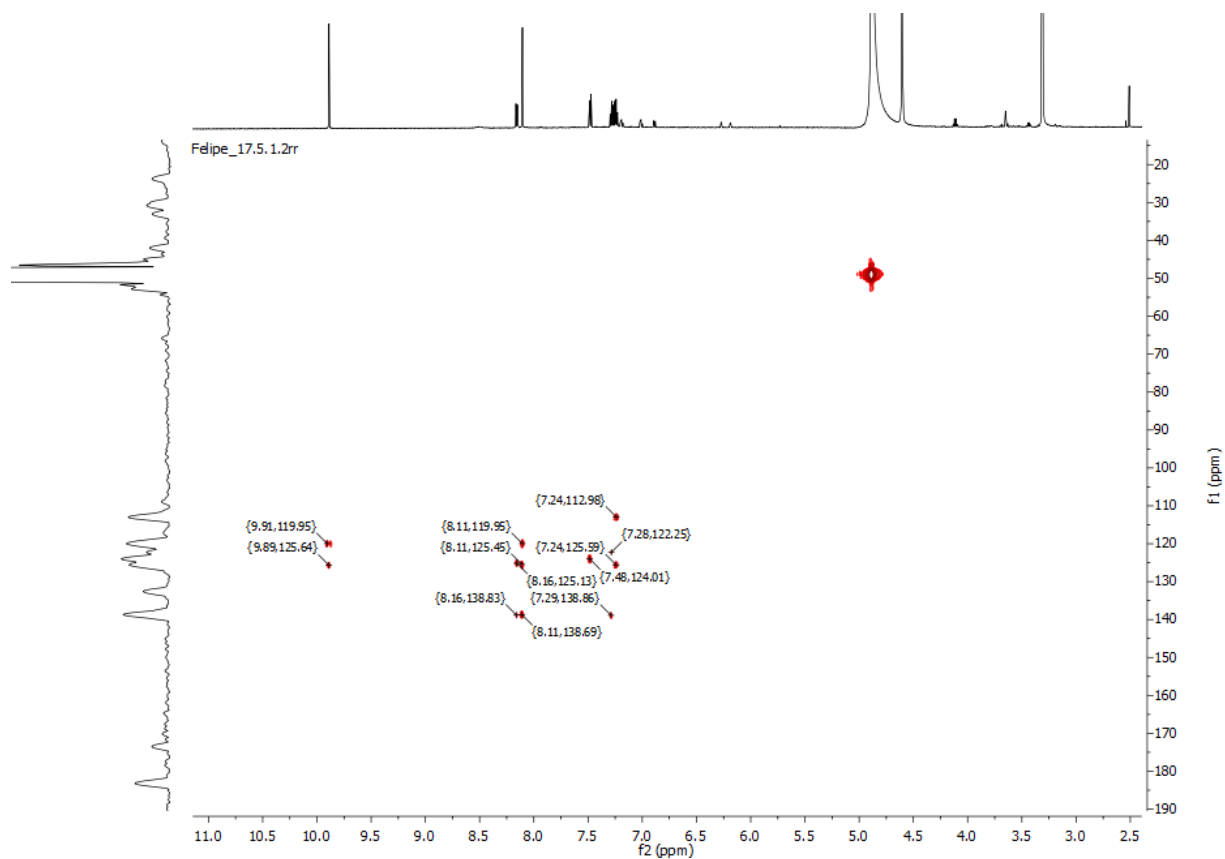
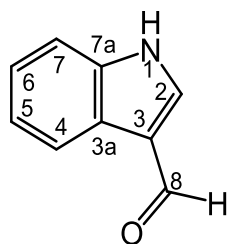


Figura 75E. Estrutura química da substância **F17**



6.8.4 Substância **F2**:

O espectro de RMN de ^1H da substância **F2** (Tabela 20, Figura 76A) apresentou sinais característicos de hidrogênios aromáticos com deslocamentos químicos em δ 7,09 (*d*, $J=8,5$ Hz) *orto*-acoplado com o hidrogênio δ 6,73 (*d*, $J=8,5$ Hz). Estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-2/H-6 e H-3/H-5, respectivamente. O deslocamento químico do hidrogênio metilênico foi observado em δ 3,51 (2H, *s*).

No experimento *g*COSY (Figura 76B) foram observadas as correlações entre os hidrogênios com deslocamento químico em δ 7,09 H-3/H-5 com o δ 6,73 H-2/H-6

Os experimentos *g*HSQC (Figura 76C) possibilitaram atribuir os hidrogênios a seus respectivos carbonos e estão demonstrados na Tabela 20.

No espectro de *g*HMBC (Figura 76D) pode-se observar sinais de carbonos referentes a carbonila da função ácido carboxílico em δ 174,3 (C-8). Este deslocamento apresentou correlação a 3J com o hidrogênio em δ 3,51 (CH₂-7), possibilitando atribuí-lo na estrutura. As correlações dos hidrogênios aromáticos foram observados respectivamente entre δ 7,09 (H-2/H-6) com os carbonos δ 131,0 (C-2 ou C-6), δ 156,9 (C-4) e δ 41,0 (C-7), e entre δ 6,73 (H-3/H-5) com os carbonos δ 115,8 (C-3 ou C-5) e δ 126,6 (C-1) e δ 156,9 (C-4).

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **F2** foram comparados com os publicados na literatura (MILNE et al., 2011) e a molécula foi identificada como sendo ácido 4-hidroxifenilacético (Figura 76E), fórmula molecular C₈H₈O₃.

Tabela 20. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (CD₃OD) –mono e bidimensionais da substância **F2**

Posição	* δ ^{13}C	δ ^1H (<i>m</i> , <i>J</i> Hz)	<i>g</i> COSY	<i>g</i> HMBC
1	126,6 (Cq)	–	–	–
2	131,0 (CH)	7,09 (<i>d</i> , 8,5)	6,73	41,0; 131,0; 156,9
3	115,9 (CH)	6,73 (<i>d</i> , 8,5)	7,09	115,8; 126,6; 156,9
4	156,9 (Cq)	–	–	–
5	115,9 (CH)	6,73 (<i>d</i> , 8,5)	7,09	115,8; 126,6; 156,9
6	131,0 (CH)	7,09 (<i>d</i> , 8,5)	6,73	41,0; 131,0; 156,9
7	41,0 (CH ₂)	3,51 (<i>s</i>)	–	121,6; 131,0; 174,3
8	174,3 (C=O)	–	–	–

* Sinais atribuídos pela análise *g*HSQC e *g*HMBC

Figura 76A. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) da substância **F22**

Felipe_2.1.fid

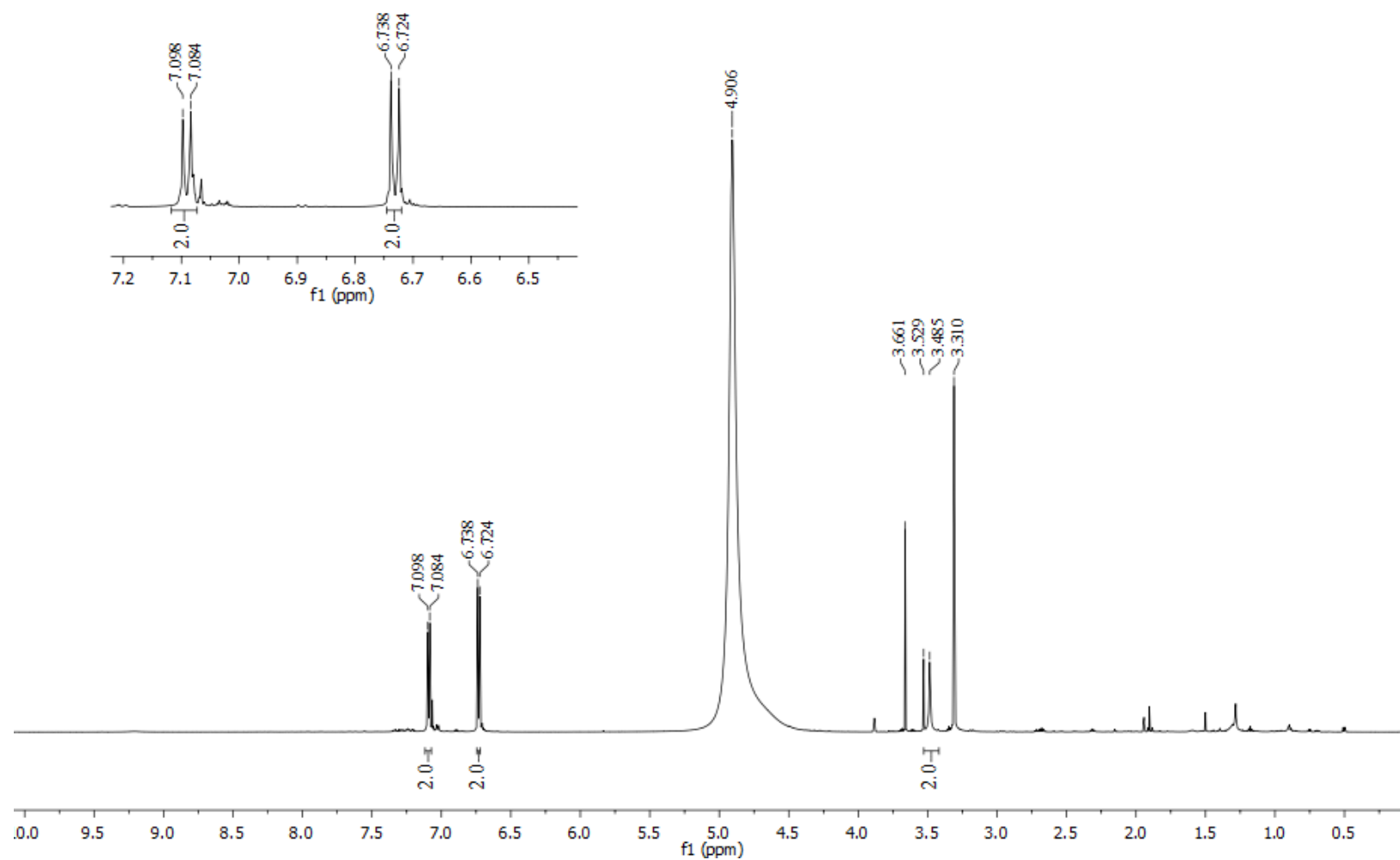


Figura 76B. Espectro de RMN de g COSY (600 MHz, CD_3OD) da substância **F2**

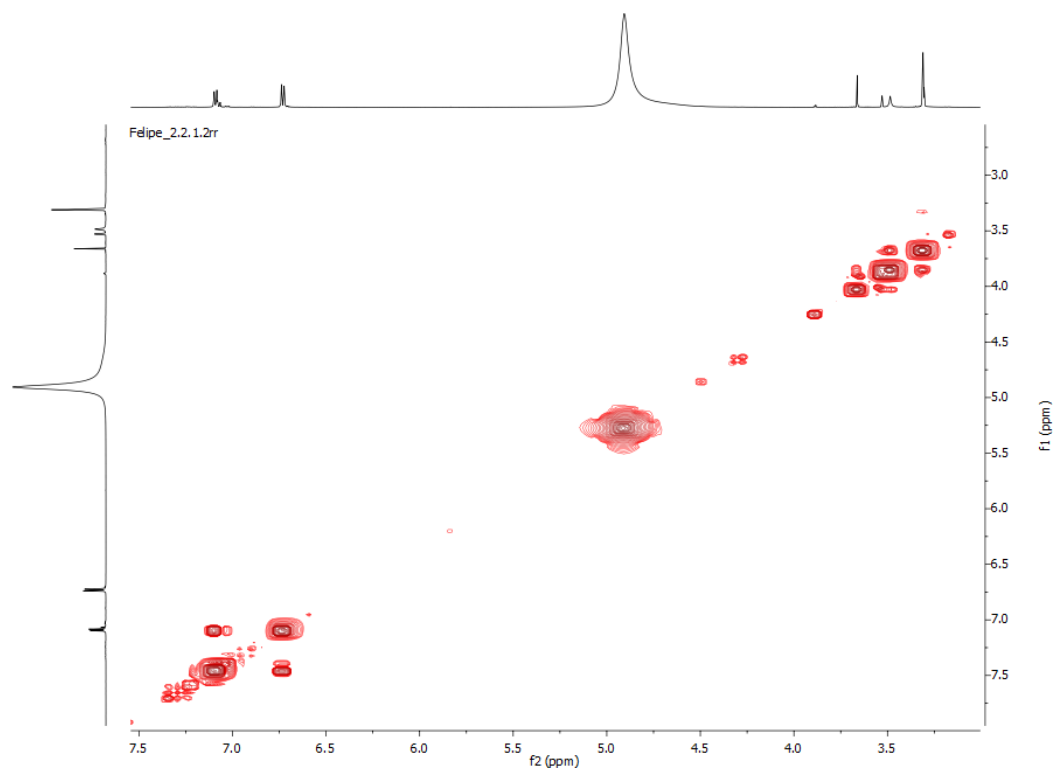


Figura 76C. Mapa de contorno g HSQC (CD_3OD) da substância **F2**

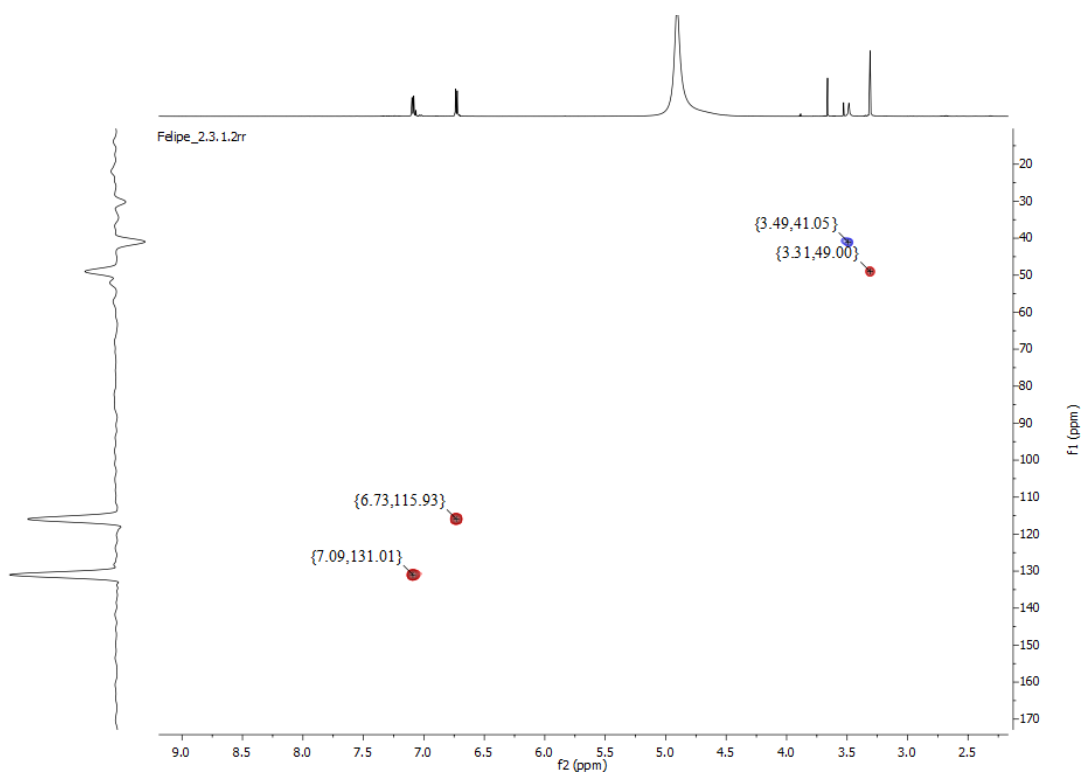


Figura 76D. Mapa de contorno *g*HMBC (CD₃OD) da substância **F2**

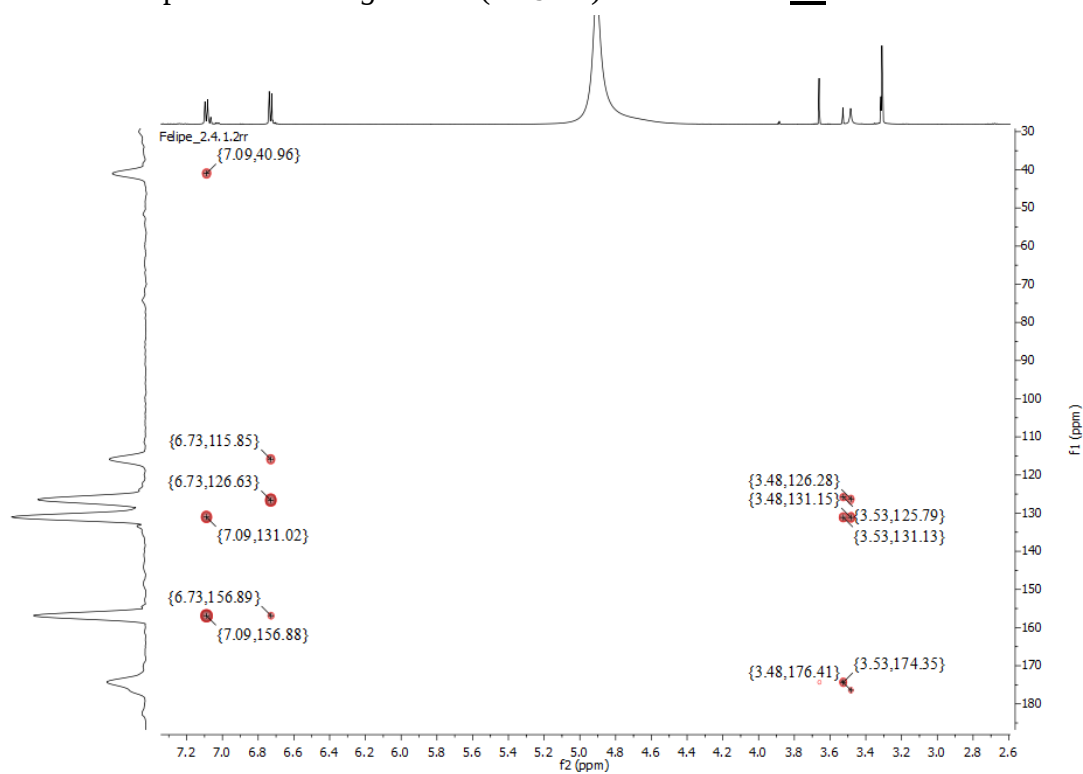
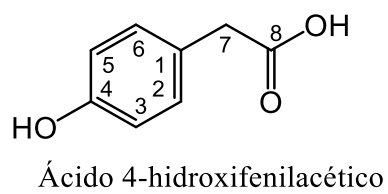


Figura 76E. Estrutura química da substância **F2**



6.8.5 Substância **F6**

O espectro de RMN de ^1H da substância **F6** (Tabela 21, Figura 77A) apresentou sinais característicos de hidrogênios aromáticos com deslocamentos químicos em δ 7,09 (*d*, $J=8,5$ Hz) *orto*-acoplado com o hidrogênio δ 6,73 (*d*, $J=8,5$ Hz). Estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-2/H-6 e H-3/H-5, respectivamente. O deslocamento químico do hidrogênio metilênico foi observado em δ 3,51 (2H, s).

No experimento *g*COSY (Figura 77B) foram observadas as correlações entre os hidrogênios aromáticos em δ 7,24 H-3/H-5 com o δ 6,73 H-2/H-6

Os experimentos *g*HSQC (Figura 77C) possibilitaram atribuir os hidrogênios a seus respectivos carbonos e estão demonstrados na Tabela 21. A substância **F6** possui cinco hidrogênios aromáticos enquanto **F2** possui um grupo hidroxila na posição C-4.

No espectro de *g*HMBC (Figura 77D) pode-se observar sinais de carbonos referentes a carbonila da função ácido carboxílico em δ 175,4 (C-8). Este deslocamento apresentou correlação a 3J com o hidrogênio em δ 3,60 (CH₂-7), possibilitando atribuí-lo na estrutura. As correlações dos hidrogênios aromáticos foram observados respectivamente entre δ 7,09 (H-2/H-6) com os carbonos δ 131,0 (C-2 ou C-6), δ 156,9 (C-4) e δ 41,0 (C-7), e entre δ 6,73 (H-3/H-5) com os carbonos δ 115,8 (C-3 ou C-5) e δ 126,6 (C-1) e δ 156,9 (C-4).

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **F6** foram comparados com os publicados na literatura (ZHOU; ZHANG; PAN, 2005) e a molécula foi identificada como sendo ácido fenilacético (Figura 77E), fórmula molecular C₈H₈O₂.

Tabela 21. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (CD₃OD) –mono e bidimensionais da substância **F6**

Posição	* δ ^{13}C	δ ^1H (<i>m</i> , <i>J</i> Hz)	<i>g</i> COSY	<i>g</i> HMBC
1	135,7 (Cq)	–	–	–
2	127,6 (CH)	7,24 (<i>m</i>)	7,29	131,0
3	129,6 (CH)	7,29 (<i>m</i>)	7,24; 7,28	135,7; 129,6
4	129,4 (CH)	7,28 (<i>m</i>)	7,29	–
5	129,6 (CH)	7,29 (<i>m</i>)	7,24	135,7; 129,4
6	131,0 (CH)	7,24 (<i>m</i>)	7,29	127,6
7	41,7 (CH ₂)	3,60 (<i>s</i>)	–	129,6; 135,7; 175,4
8	175,4 (C=O)	–	–	–

* Sinais atribuídos pela análise *g*HSQC e *g*HMBC

Figura 77A. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) da substância **F6**

Felipe_6.1.fid

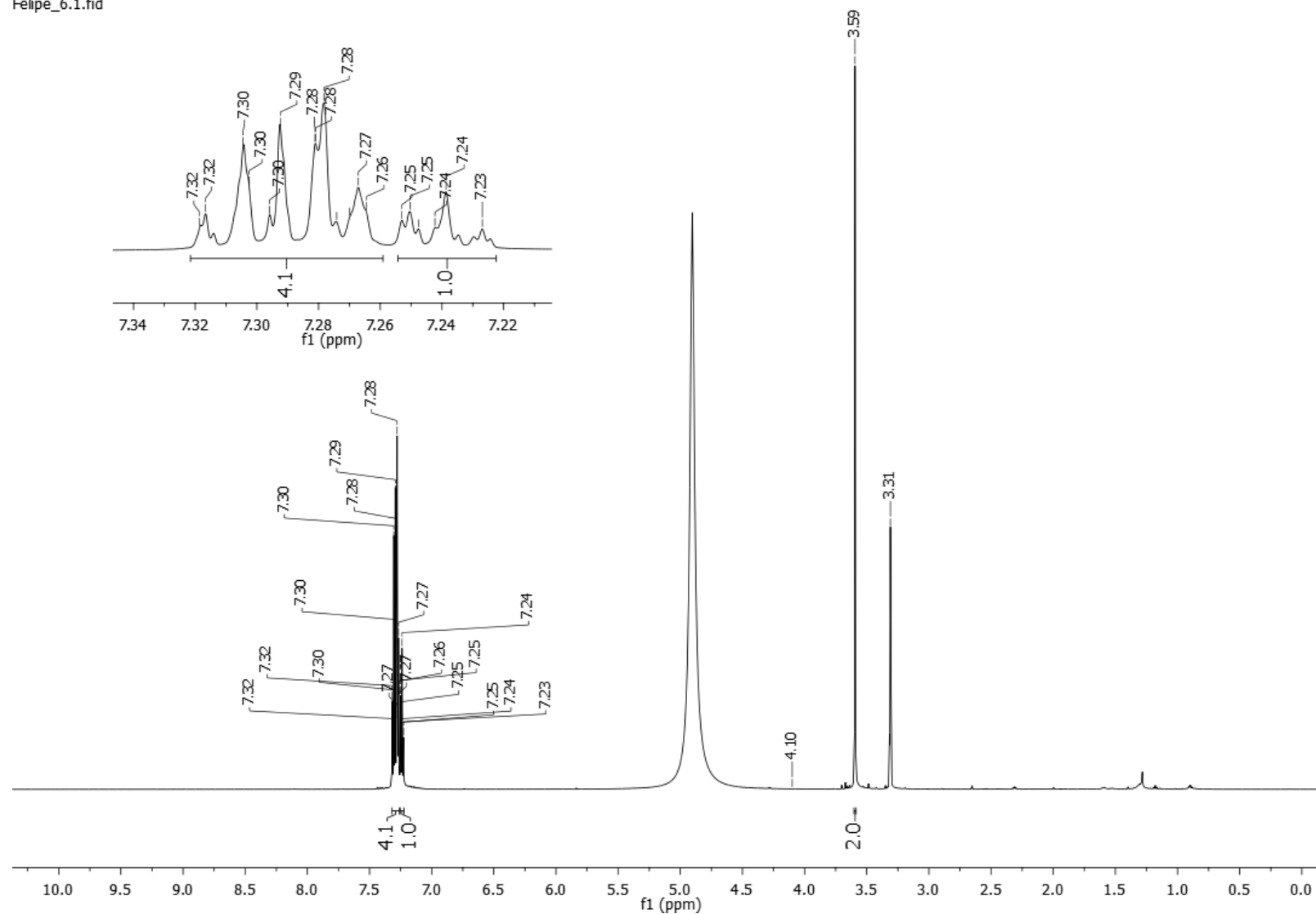


Figura 77B. Espectro de RMN de *g*COSY (600 MHz, CD₃OD) da substância **F6**

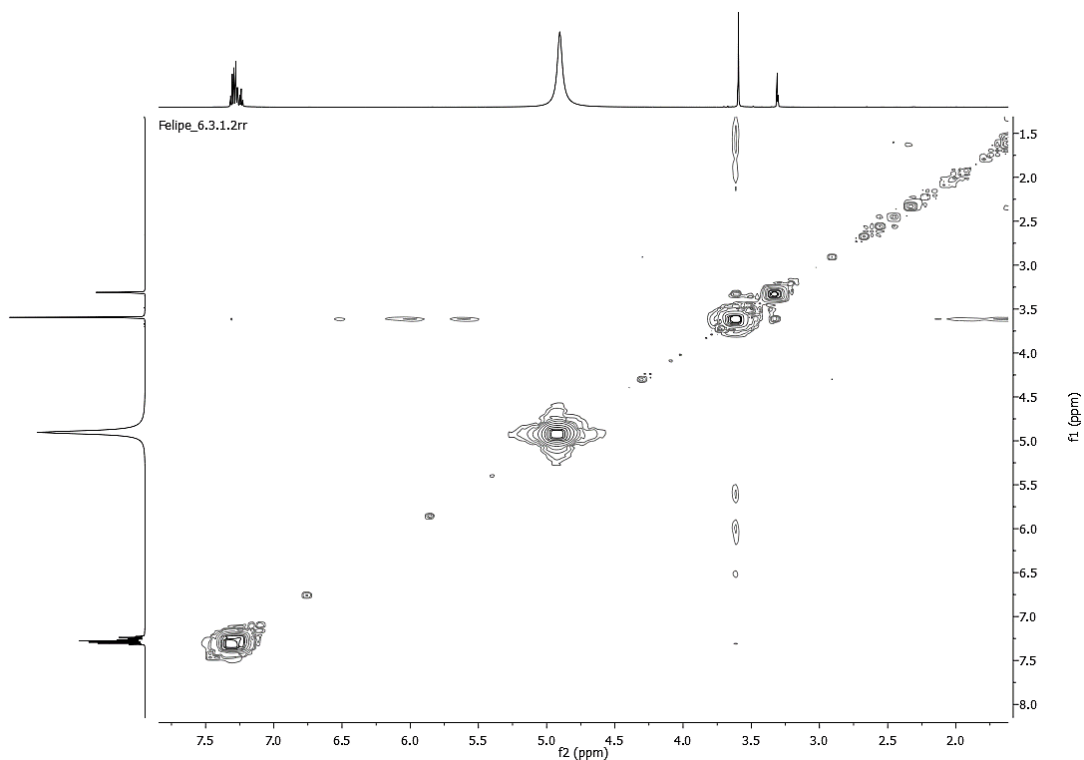


Figura 77C. Mapa de contorno *g*HSQC (600 MHz, CD₃OD) da substância **F6**

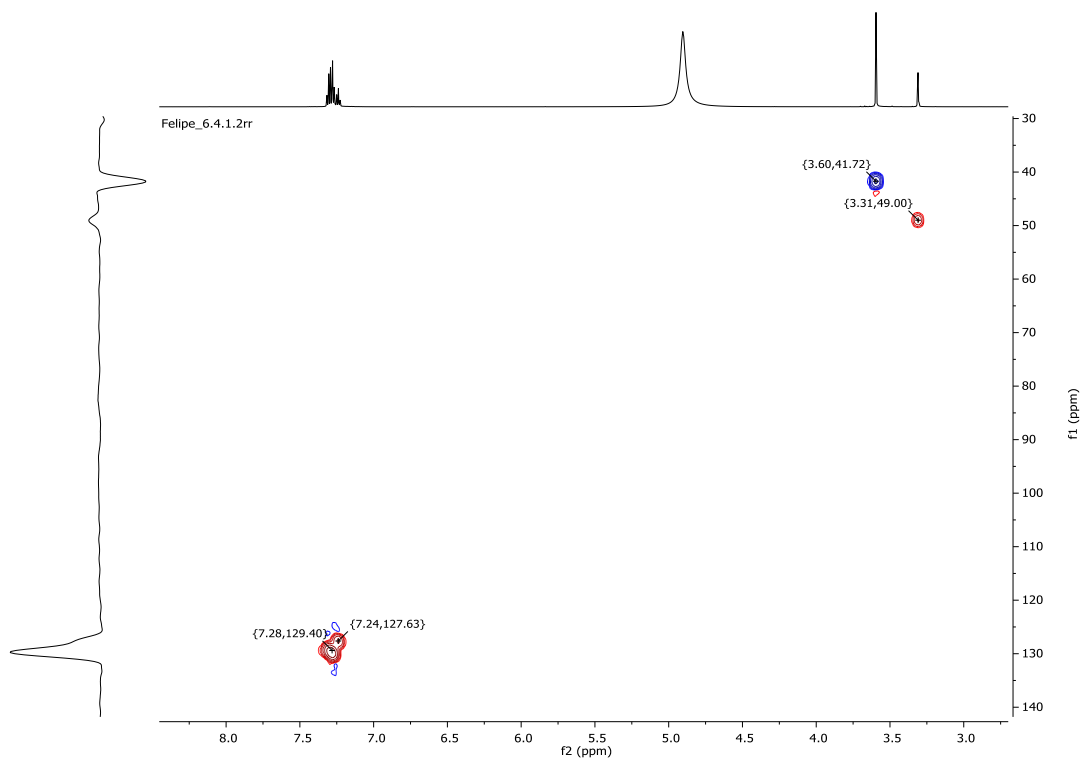


Figura 77D. Mapa de contorno *g*HMBC (600 MHz, CD₃OD) da substância **S6**

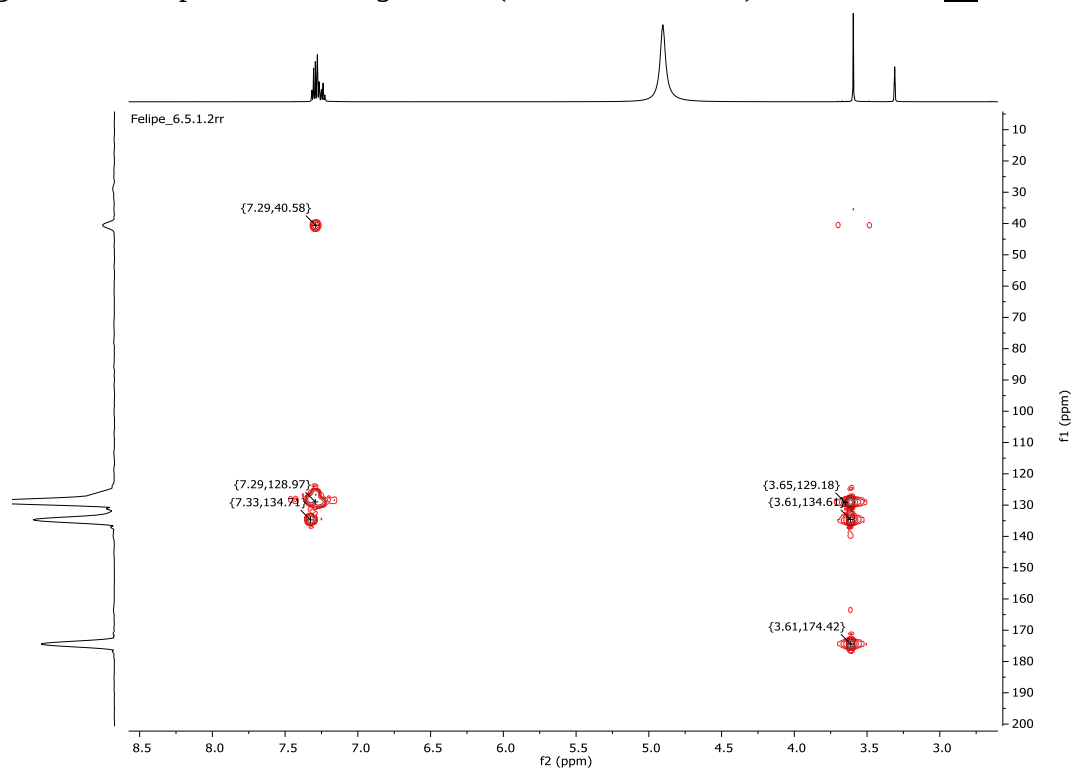
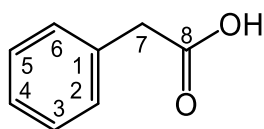


Figura 77E. Estrutura química da substância **F6**



Ácido fenilacético

6.8.6 Substância **F11**

O espectro de RMN de ^1H da substância **F11** (Tabela 22, Figura 78A) apresentou cinco sinais de hidrogênios aromáticos, similares aos observados para **F6**, enquanto que em **F2** são observados apenas quatro desses sinais. O deslocamento químico do hidrogênio metilênico foi observado em δ 3,51 (2H, s). O experimento *g*COSY (Figura 78B) não foi possível observar claramente as correlações esperadas.

Nos espectros de *g*HSQC (78C) juntamente com o espectro de *g*HMBC (Figura 78D) pode-se observar que o sinal de carbono C-4 para **F2** em δ 156,9 enquanto que para **F11** em δ 126,6. Este deslocamento apresentou correlação a 1J com o hidrogênio em δ 7,22 (CH-4), possibilitando atribuí-lo na estrutura.

Como mostrado na Tabelas 20 e 22, as correlações observadas para os hidrogênios aromáticos de **F2** foram diferentes aos de **F11**. Portanto, pode-se verificar pelas análises do experimento *g*HMBC que em **F2** e **F11** o padrão de substituição do anel aromático é diferente, sendo está a diferença existente entre as duas estruturas.

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **F11** foram comparados com os publicados na literatura (ALLEN; BUREL; WILLIAMS, 2010) e a molécula foi identificada como sendo 2-fenilacetamida (Figura 78E), fórmula molecular $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$.

Tabela 22. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (CD_3OD) –mono e bidimensionais da substância **F11**

Posição	* δ ^{13}C	δ ^1H (m, J Hz)	<i>g</i> COSY	<i>g</i> HMBC
1	134,7 (Cq)	–	–	–
2	128,6 (CH)	7,27 (m)	–	126,6; 40,6
3	126,6 (CH)	7,22 (m)	–	128,6
4	126,6 (CH)	7,22 (m)	–	–
5	126,6 (CH)	7,22 (m)	–	–
6	128,6 (CH)	7,27 (m)	–	–
7	40,6 (CH_2)	3,58 (s)	–	129,1; 134,6; 174,3
8	174,3 (C=O)	–	–	–
8-NH ₂	-	5,02		

* Sinais atribuídos pela análise *g*HSQC e *g*HMBC

Figura 78A. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) da substância **F11**

Felipe_11.2.fid

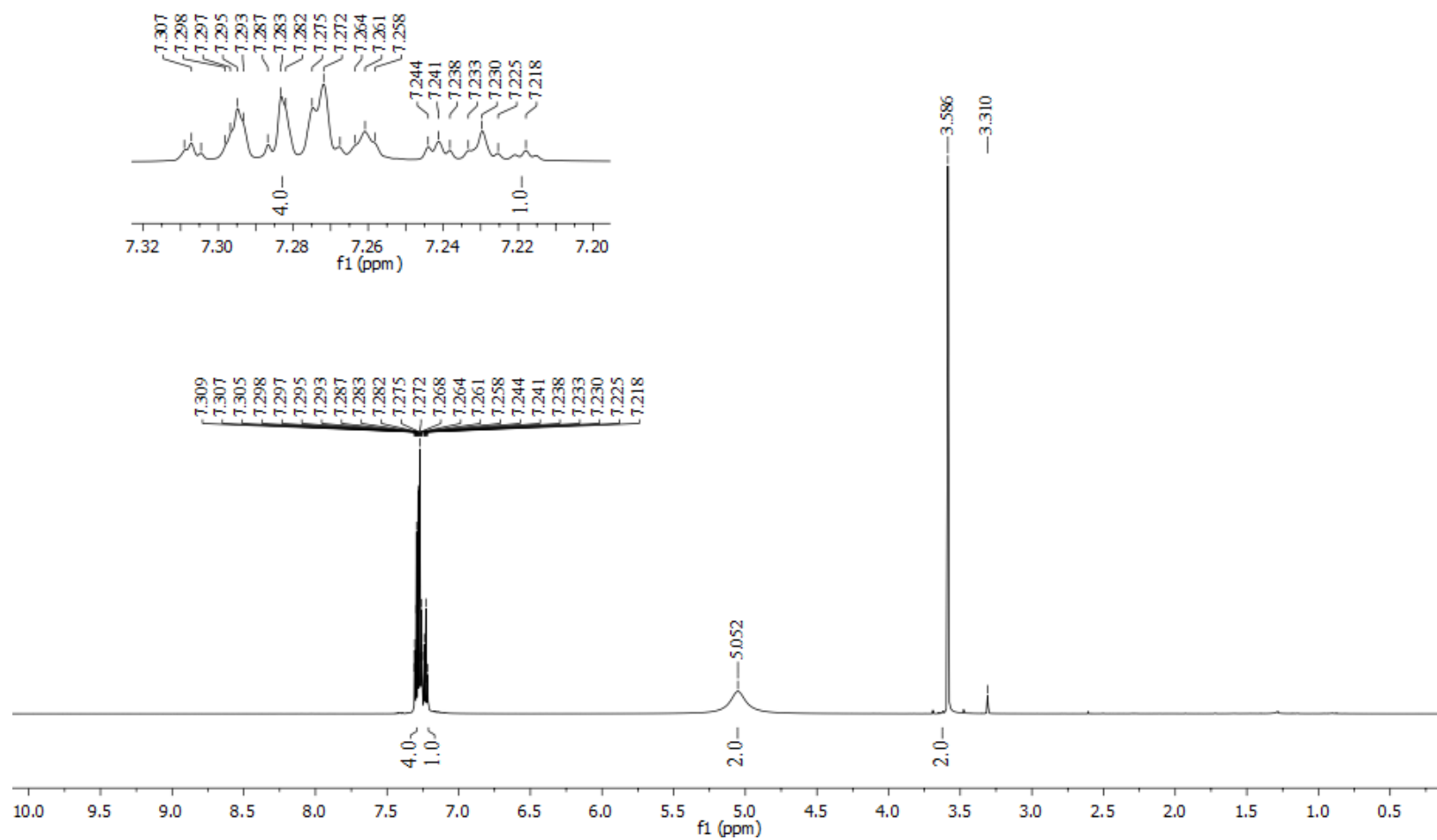


Figura 78B. Espectro de RMN de *g*COSY (600 MHz, CD₃OD) da substância **F11**

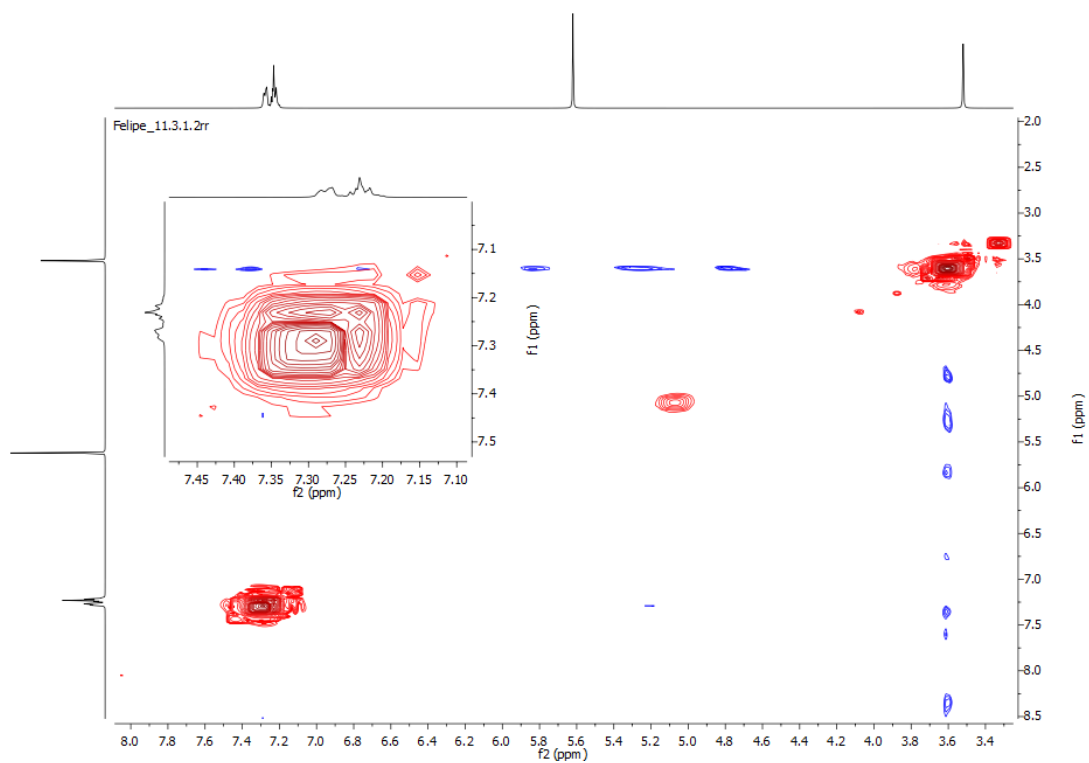


Figura 78C. Mapa de contorno *g*HSQC (CD₃OD) da substância **F11**

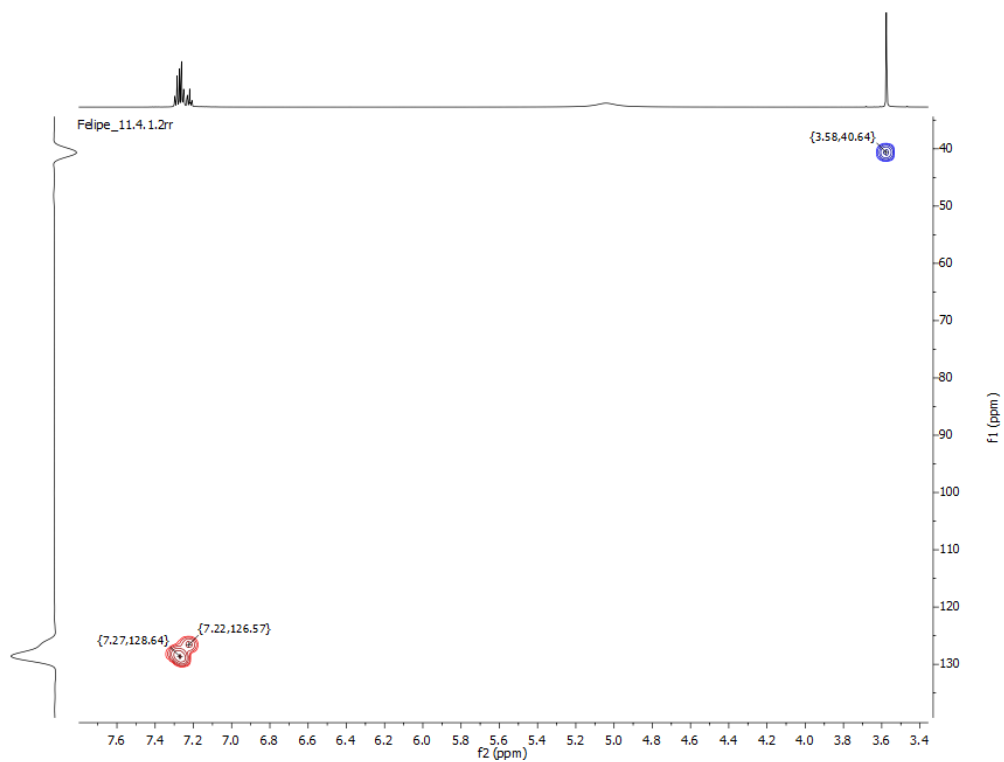
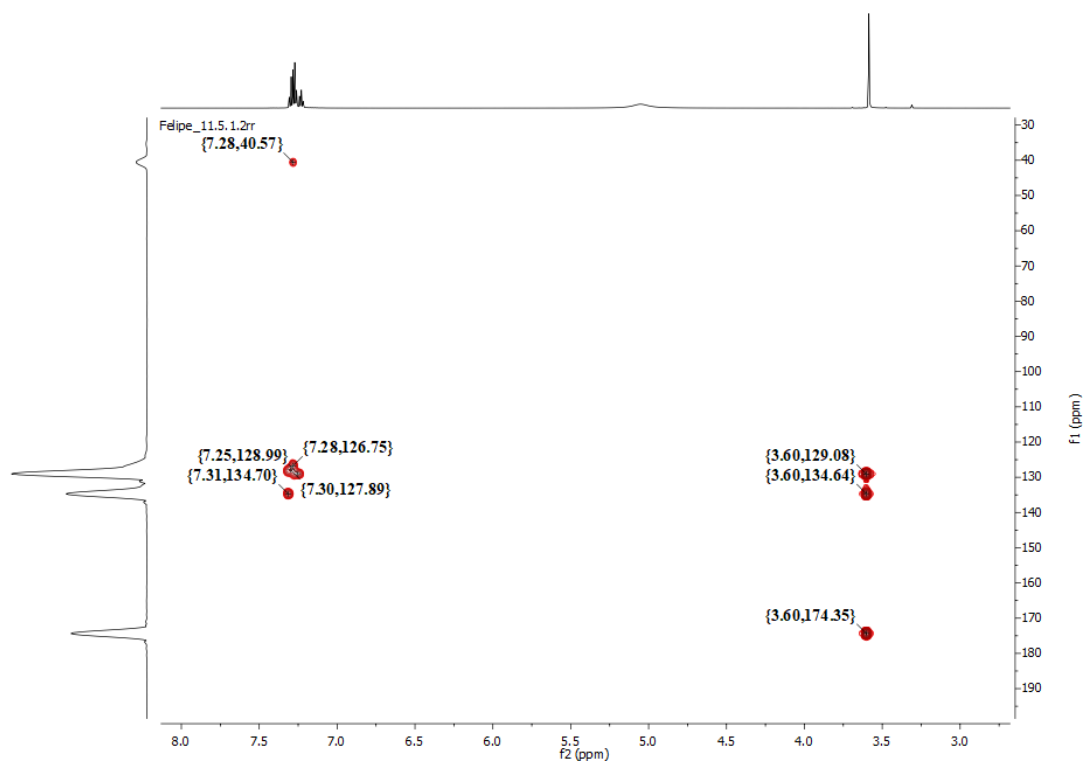
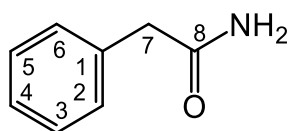


Figura 78D. Mapa de contorno *g*HMBC (CD₃OD) da substância **F11****Figura 78E.** Estrutura química da substância **F11**

2-fenilacetamida

6.8.7 Substância **F12**

O espectro de RMN de ^1H da substância **F12** (Tabela 23, Figura 79A) apresentou quatro sinais característicos de hidrogênios aromáticos com deslocamentos químicos em δ 7,10 e δ 6,78. Estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-2/H-6 e H-3/H-5, respectivamente. O deslocamento químico do hidrogênio metilênico foi observado em δ 3,51 (2H, s).

No experimento *g*COSY (Figura 79B) foram observadas as correlações entre os hidrogênios com deslocamento químico em δ 7,09 H-3/H-5 com o δ 6,73 H-2/H-6

Os experimentos *g*HSQC (Figura 79C) possibilitaram atribuir os hidrogênios a seus respectivos carbonos e estão demonstrados na Tabela 23.

No espectro de *g*HMBC (Figura 79D) pode-se observar sinais de carbonos referentes a carbonila da função amida em δ 174,3 (C-8). Este deslocamento apresentou correlação a 3J com o hidrogênio em δ 3,55 (CH₂-7), possibilitando atribuí-lo na estrutura

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **F12** foram comparados com os publicados na literatura (WANG; PAN; WU, 2007) e a molécula foi identificada como sendo acetamida-2-(2-hidroxifenil) (Figura 79E), fórmula molecular C₈H₉NO₂.

Tabela 23. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (CD₃OD) –mono e bidimensionais da substância **F12**

Posição	* δ ^{13}C	δ ^1H (m, J Hz)	<i>g</i> COSY	<i>g</i> HMBC
1	124,0 (Cq)	–	–	–
2	157,6 (Cq)	–	–	–
3	116,5 (CH)	6,78 (m)	7,10	120,3; 157,6
4	128,7 (CH)	7,10 (m)	6,76	131,7
5	120,3 (CH)	6,76 (m)	–	128,6
6	131,7 (CH)	7,10 (m)	6,76	128,7; 39,5
7	39,5 (CH ₂)	3,55 (s)	–	124,0, 131,7; 178,6
8	178,6 (C=O)	–	–	–

* Sinais atribuídos pela análise *g*HSQC e *g*HMBC

Figura 79A. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) da substância **F12**

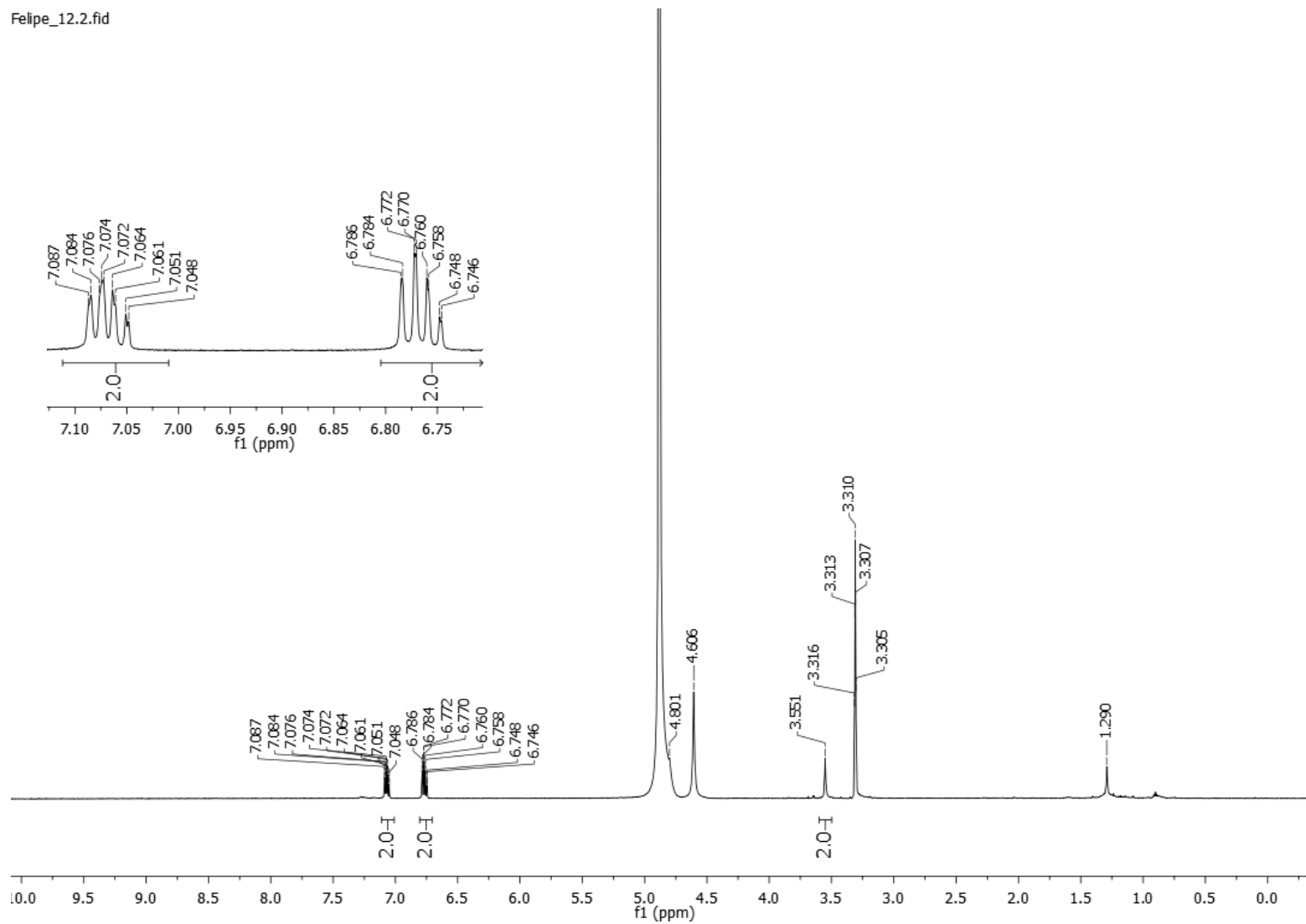


Figura 79B. Espectro de RMN de g COSY (600 MHz, CD_3OD) da substância **F12**

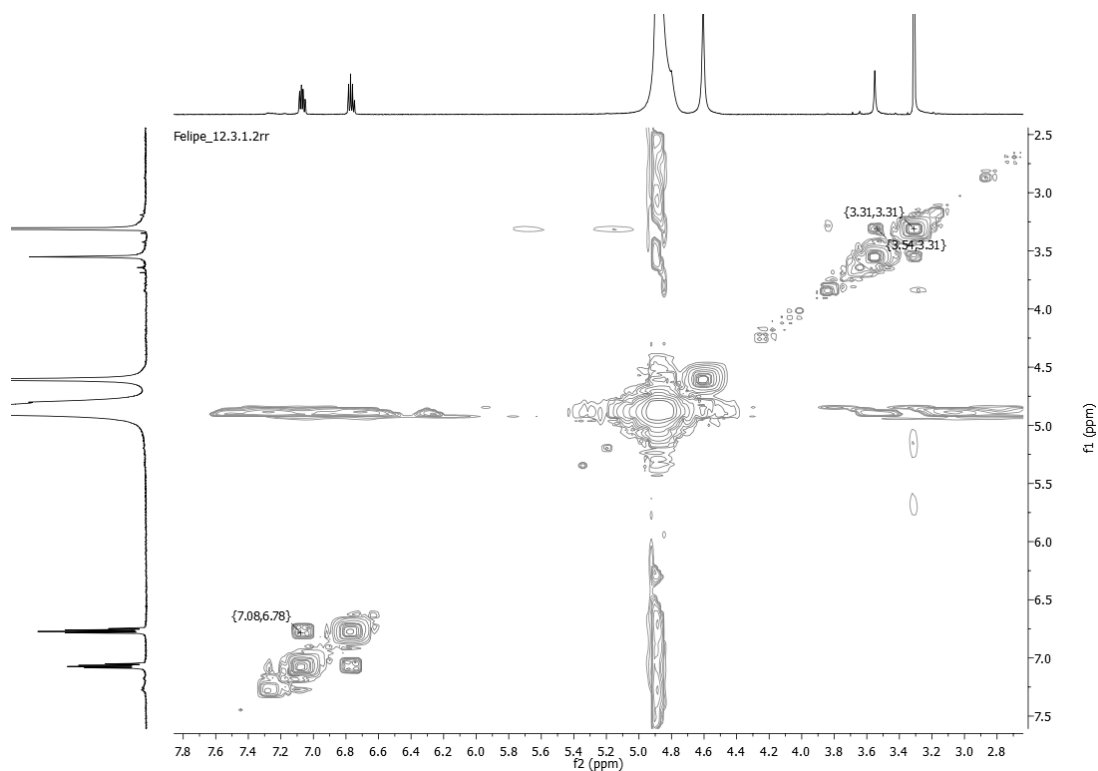


Figura 79C. Mapa de contorno g HSQC (CD_3OD) da substância **F12**

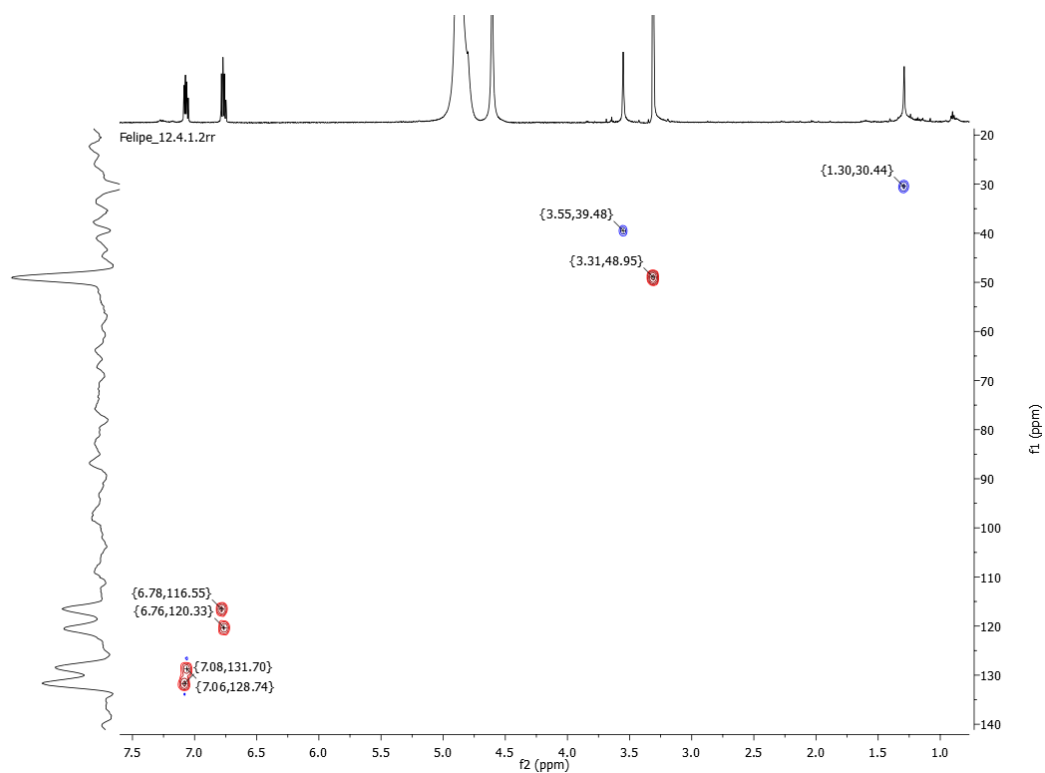


Figura 79D. Mapa de contorno *g*HMBC (CD₃OD) da substância **F12**

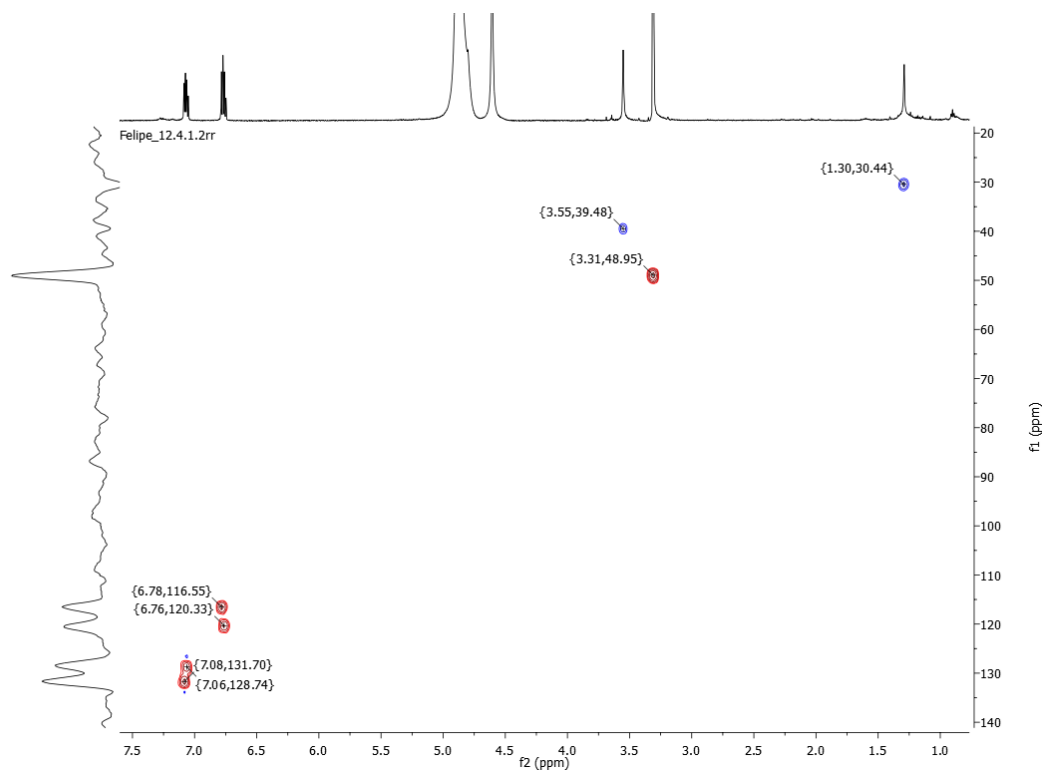
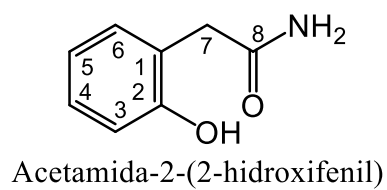


Figura 79E. Estrutura química da substância **F12**



6.8.8 Substância **F15**

O espectro de RMN de ^1H da substância **F15** (Tabela 24, Figura 80A) apresentou quatro sinais característicos de hidrogênios aromáticos com deslocamentos químicos em δ 7,91 (*d*, $J=7,5$ Hz) *orto*-acoplado com o hidrogênio δ 6,84 (*d*, $J=7,5$ Hz). Estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-2/H-6 e H-3/H-5, respectivamente. O deslocamento químico do hidrogênio do grupo metila foi observado em δ 2,53 (3H, *s*).

No experimento *g*COSY (Figura 80B) foram observadas as correlações entre os hidrogênios com deslocamento químico em δ 7,09 H-3/H-5 com o δ 6,73 H-2/H-6

Os experimentos *g*HSQC (Figura 80C) possibilitaram atribuir os hidrogênios a seus respectivos carbonos e estão demonstrados na Tabela 24.

No espectro de *g*HMBC (Figura 80D) pode-se observar sinais de carbonos referentes a carbonila da função cetona em δ 198,1 (C-8). Este deslocamento apresentou correlação a 3J com os hidrogênios em δ 2,53 (CH₃-7), possibilitando atribuí-lo na estrutura.

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **F15** foram comparados com os publicados na literatura (O'YCONNOR et al., 1987) e a molécula foi identificada como sendo 1-(4-hidroxifenil) etan-1-ona (Figura 80E), fórmula molecular C₈H₈O₂.

Tabela 24. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (CD₃OD) –mono e bidimensionais da substância **F15**

Posição	* δ ^{13}C	δ ^1H (<i>m</i> , <i>J</i> Hz)	<i>g</i> COSY	<i>g</i> HMBC
1	128,7 (Cq)	–	–	–
2	131,9 (CH)	7,91 (<i>d</i> , <i>J</i> 7,5Hz)	6,84	131,9; 163,0
3	116,5 (CH)	6,84 (<i>d</i> , <i>J</i> 7,5Hz)	7,91	–
4	163,0 (Cq)	–	–	–
5	116,5 (CH)	6,84 (<i>d</i> , <i>J</i> 7,5Hz)	–	128,7
6	131,9 (CH)	7,91 (<i>d</i> , <i>J</i> 7,5Hz)	6,84	128,7; 39,5
7	198,1 (C=O)	–	–	–
8	26,1 (CH ₃)	2,53 (<i>s</i>)	–	198,1

* Sinais atribuídos pela análise *g*HSQC e *g*HMBC

Figura 80A. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) da substância **F15**

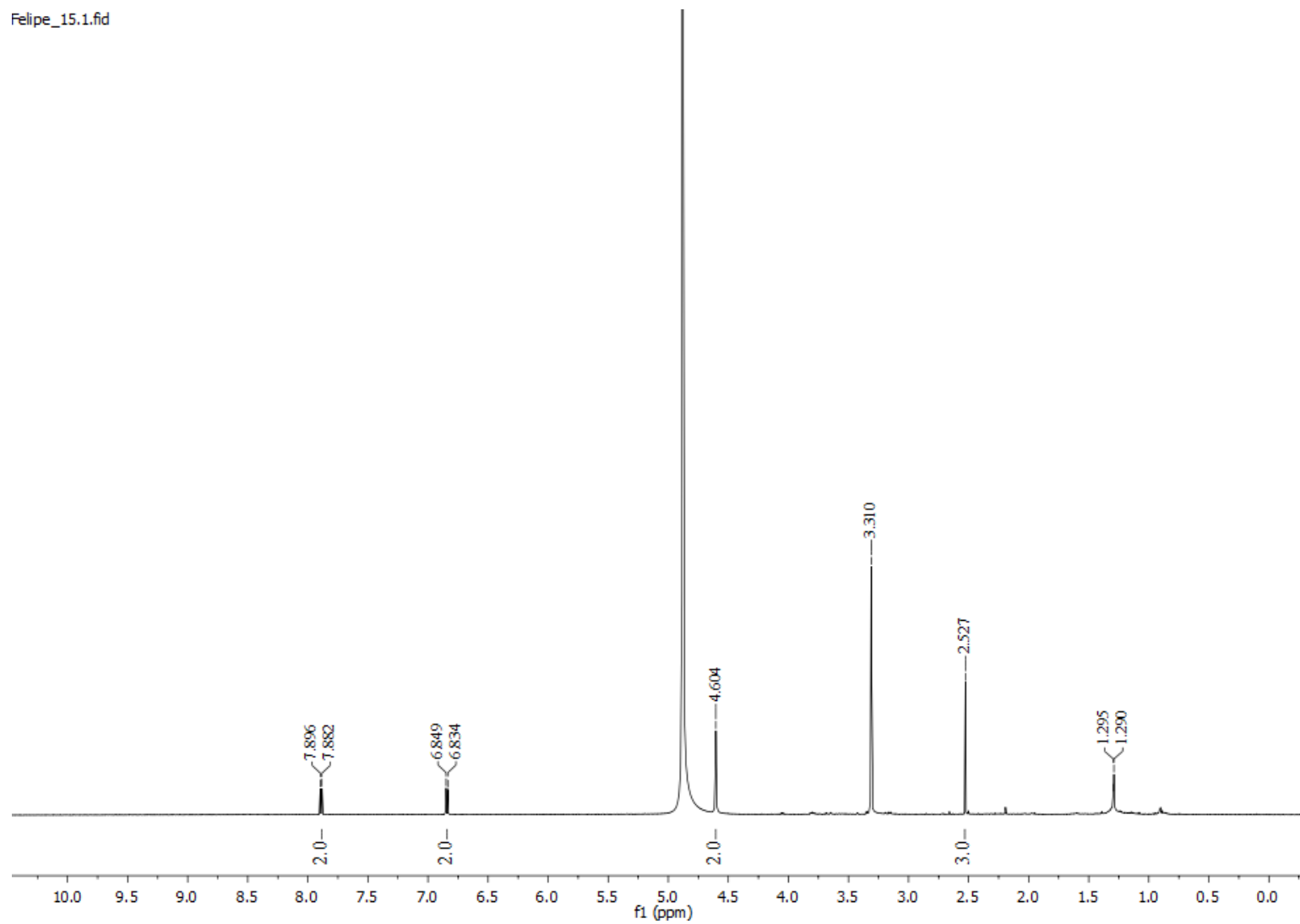


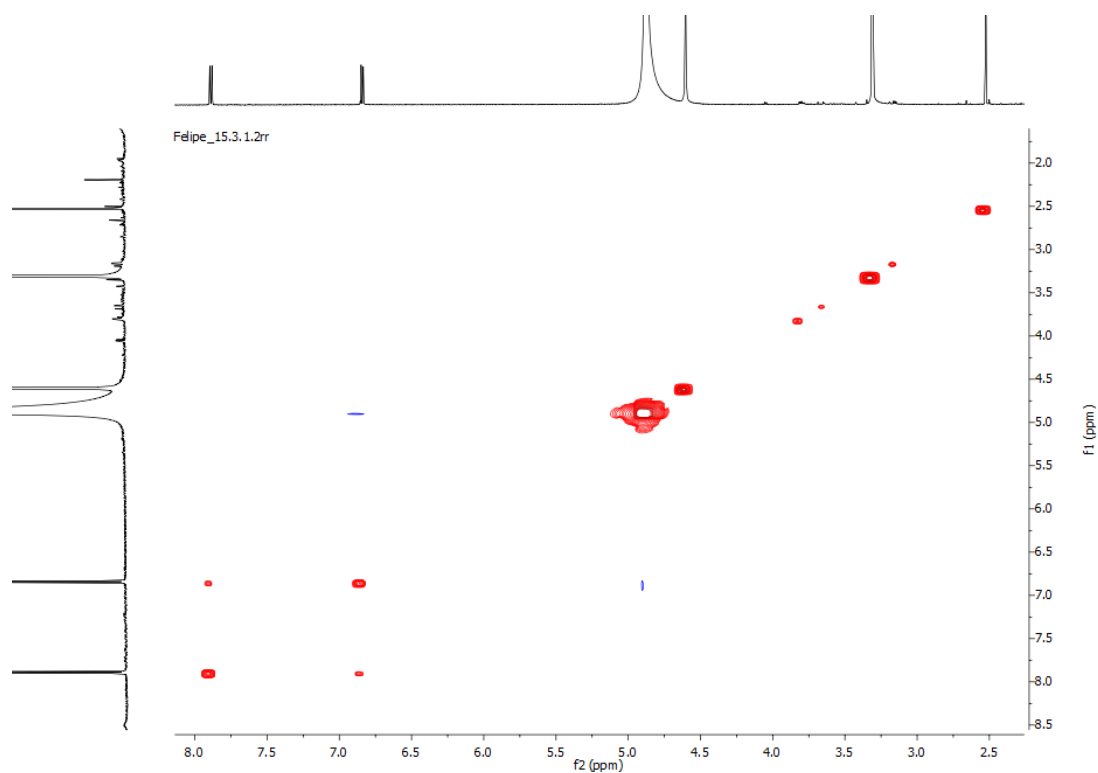
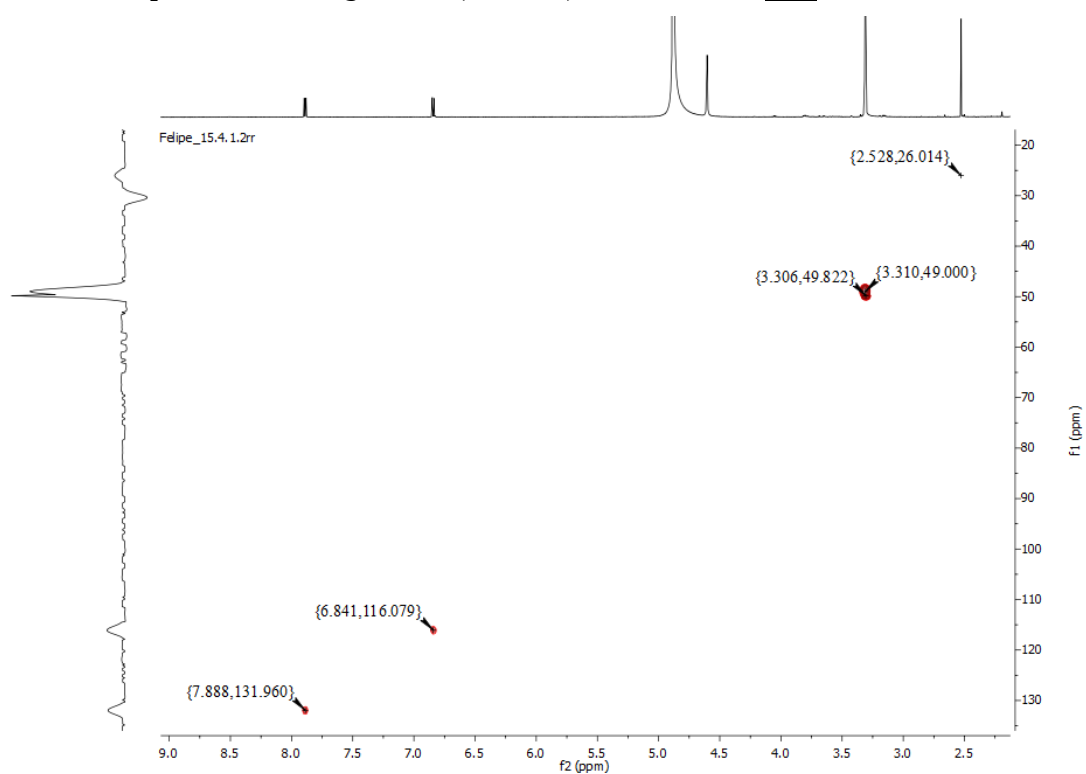
Figura 80B. Espectro de RMN de *g*COSY (600 MHz, CD₃OD) da substância **F15****Figura 80C.** Mapa de contorno *g*HSQC (CD₃OD) da substância **F15**

Figura 80D. Mapa de contorno *g*HMBC (CD₃OD) da substância **F15**

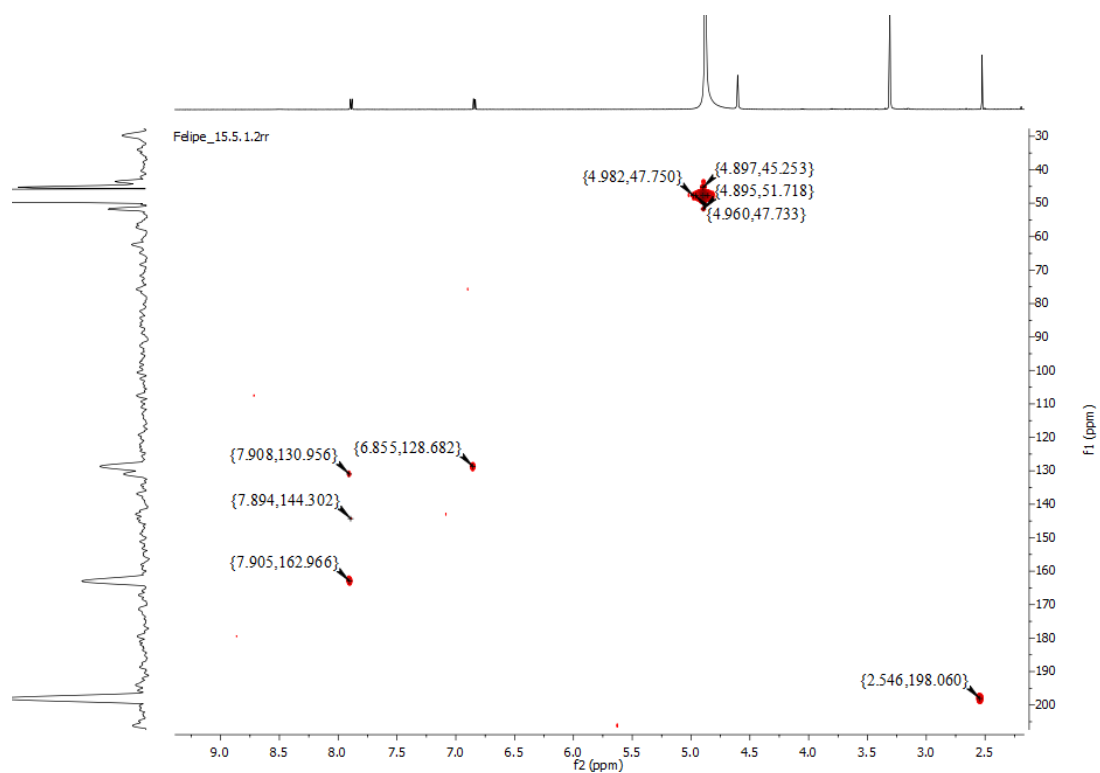
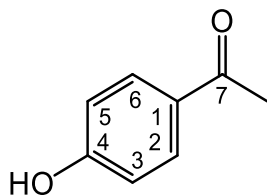


Figura 80E. Estrutura química da substância **F15**



1-(4-hidroxifenil)etan-1-ona

6.8.9 Substância **F18**

O espectro de RMN de ^1H da substância **F18** (Tabela 25, Figura 81A) apresentou sinais característicos de hidrogênios aromáticos com deslocamentos químicos em δ 7,09 (*d*, $J=8,5$ Hz) *orto*-acoplado com o hidrogênio δ 6,73 (*d*, $J=8,5$ Hz). Estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-2/H-6 e H-3/H-5, respectivamente. O deslocamento químico do hidrogênio metilênico foi observado em δ 3,51 (2H, *s*).

No experimento *g*COSY (Figura 81B) foram observadas as correlações entre os hidrogênios com deslocamento químico em δ 7,09 H-3/H-5 com o δ 6,73 H-2/H-6

Os experimentos *g*HSQC (Figura 81C) possibilitaram atribuir os hidrogênios a seus respectivos carbonos e estão demonstrados na Tabela 25.

No espectro de *g*HMBC (Figura 81D) pode-se observar sinais de carbonos referentes a carbonila da função ácido carboxílico em δ 174,3 (C-8). Este deslocamento apresentou correlação a 3J com o hidrogênio em δ 3,51 (CH₂-7), possibilitando atribuí-lo na estrutura. As correlações dos hidrogênios aromáticos foram observados respectivamente entre δ 7,09 (H-2/H-6) com os carbonos δ 131,0 (C-2 ou C-6), δ 156,9 (C-4) e δ 41,0 (C-7), e entre δ 6,73 (H-3/H-5) com os carbonos δ 115,8 (C-3 ou C-5) e δ 126,6 (C-1) e δ 156,9 (C-4).

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **F18** foram comparados com os publicados na literatura (SCOTT, 1972) e a molécula foi identificada como sendo ácido 4-hidroxibenzóico (Figura 81E), fórmula molecular C₈H₈O₂.

Tabela 25. Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (CD₃OD) –mono e bidimensionais da substância **F18**

Posição	* δ ^{13}C	δ ^1H (<i>m</i> , <i>J</i> Hz)	<i>g</i> COSY	<i>g</i> HMBC
1	123,2 (Cq)	–	–	–
2	156,9 (Cq)	–	–	–
3	115,7 (CH)	6,78 (<i>m</i>)	7,10	120,2
4	128,8 (CH)	7,10 (<i>m</i>)	6,78	131,8; 156,9
5	120,2 (CH)	6,77 (<i>m</i>)	–	128,6
6	131,8 (CH)	7,10 (<i>m</i>)	6,77	115,7; 123,2
7	36,8 (CH ₂)	3,55 (<i>s</i>)	–	123,2, 131,8; 176,7
8	176,7 (C=O)	–	–	–

* Sinais atribuídos pela análise *g*HSQC e *g*HMBC

Figura 81A. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) da substância **F18**

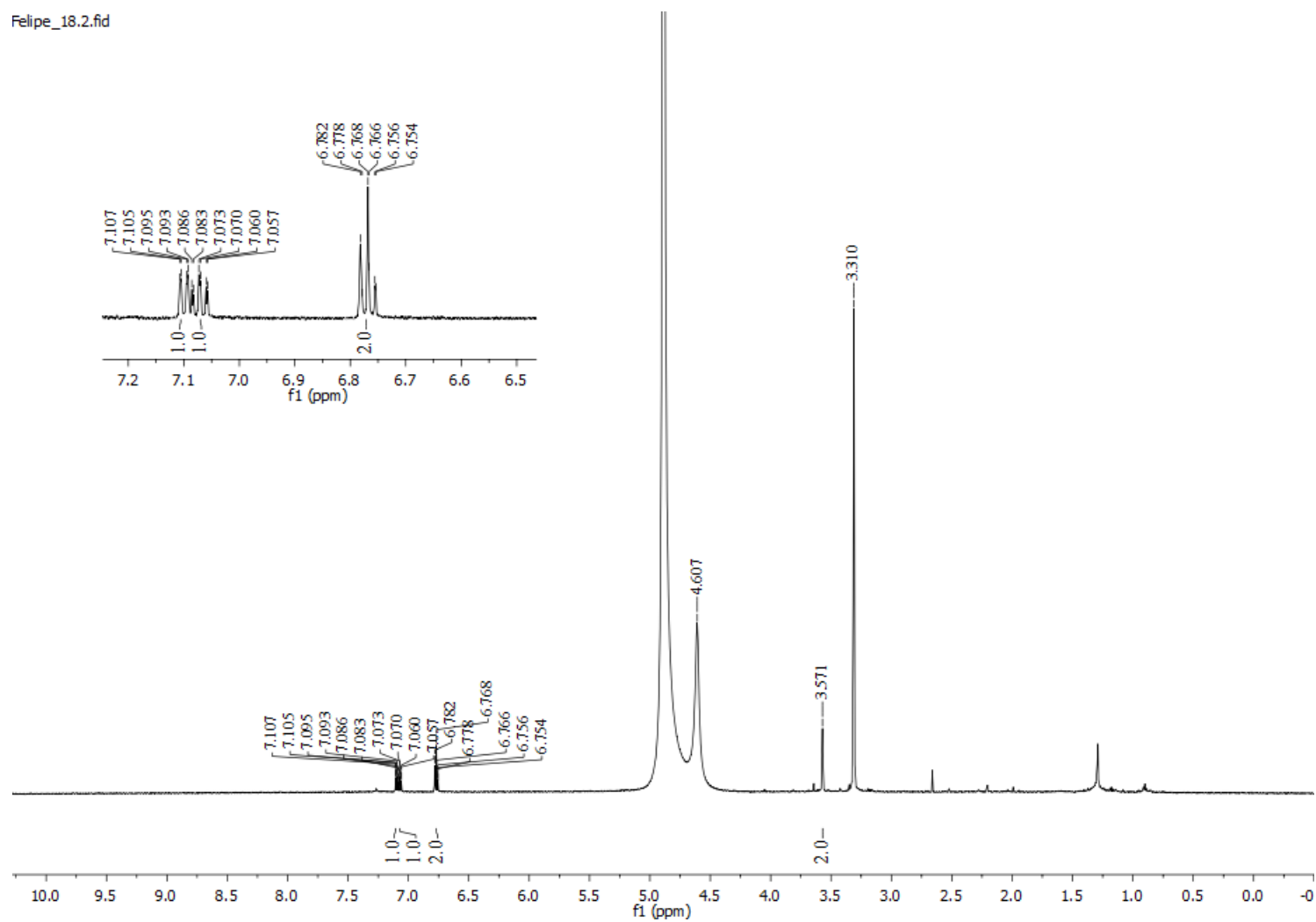


Figura 81B. Espectro de RMN de *g*COSY (600 MHz, CD₃OD) da substância **F18**

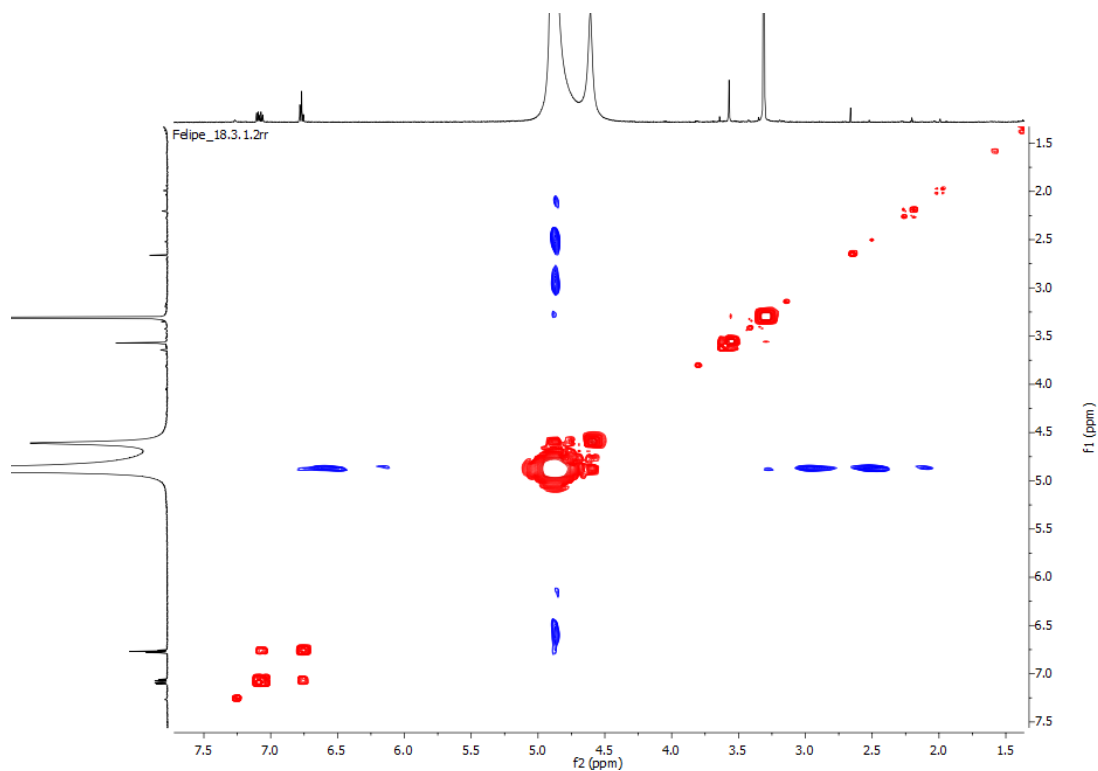


Figura 81C. Mapa de contorno *g*HSQC (CD₃OD) da substância **F18**

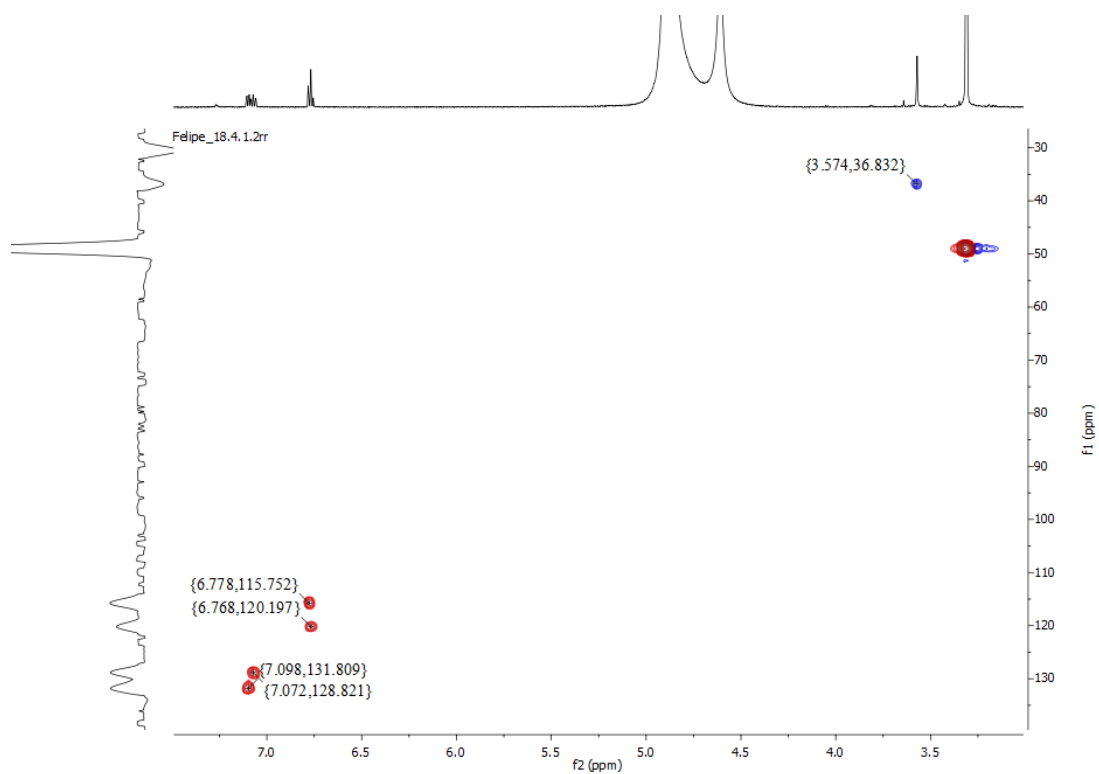


Figura 81D. Mapa de contorno g HMBC (CD_3OD) da substância **F18**

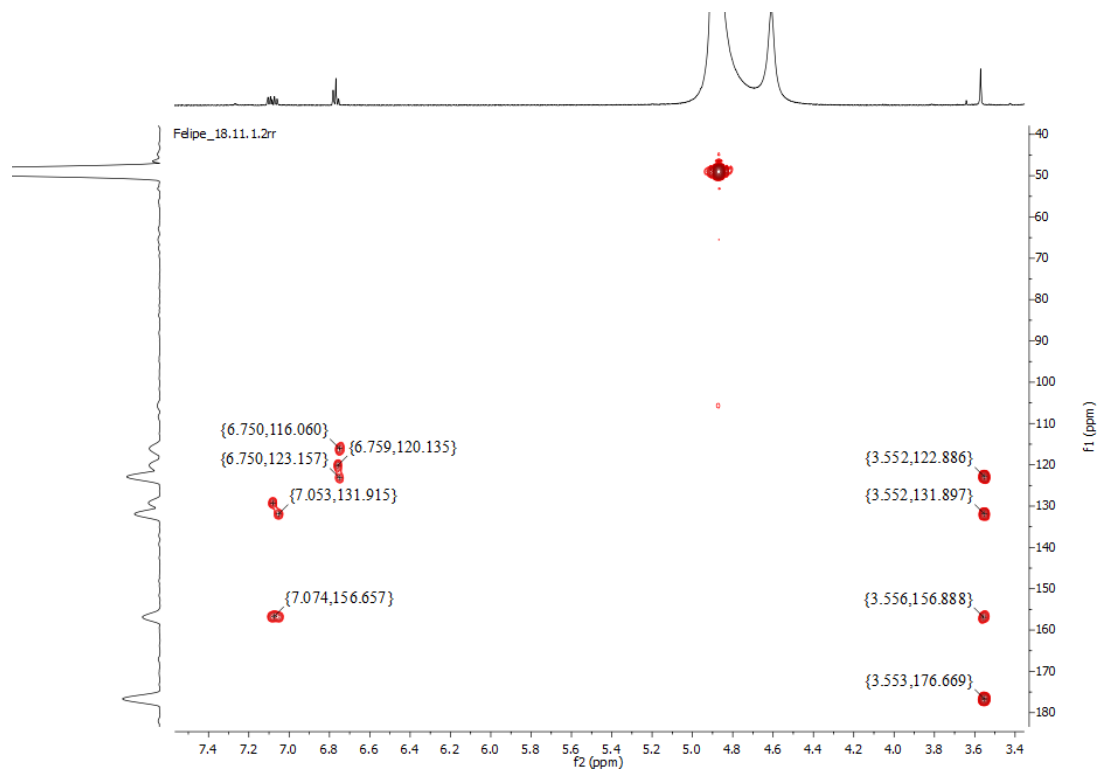
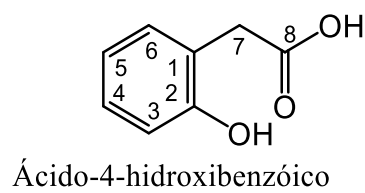


Figura 81E. Estrutura química da substância **F18**



6.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana e a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram testadas contra nove micro-organismos, sendo seis cepas de leveduras: *C. albicans*, *C. albicans* resistente ao fluconazol, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*; e outras três cepas de bactérias: *S. aureus* (Gram-positiva), *Salmonella* sp. e *E. coli* (Gram-negativas), Tabela 26.

Considerando os valores de CIM para extratos discutidos na literatura (WEBSTER et al., 2008; ALIGIANNIS et al., 2001), os extratos AcOEt testados apresentaram baixa atividade antimicrobiana contra os nove micro-organismos avaliados com exceção do controle (PDB) que apresentou atividade antifúngica para as leveduras *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* com CIM de 500 µg/mL e o extrato preparado da incorporação de Mg²⁺ com uma CIM de 250 µg/mL para *C. albicans*. Foram os únicos que tiveram alguma atividade antibacteriana para *E. coli* e *Salmonella* sp. e CIM de 1000 µg/mL.

Os compostos isolados e identificados como **F2**, **F3** e **F4** foram os que apresentaram os melhores valores de CIM para todas as leveduras do gênero *Cândida* avaliadas. O composto **F2** apresentou o valor de CIM de 31,25 µg/mL para *C. krusei* e de 62,5 µg/mL para as demais cinco cepas de leveduras testadas. O composto **F3** apresentou valor de CIM de 7,8 µg/mL para todas as seis cepas de leveduras testadas, apresentando o melhor resultado obtido na avaliação da atividade antifúngica frente as seis cepas de leveduras testadas.

A Tabela 26 apresenta os resultados da CIM, CFM e CBM obtidos na avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica das dezesseis amostras testadas, após a adição do revelador resazurina e TTC, respectivamente. As CBM e CFM foram analisadas apenas para os poços que apresentaram atividade frente à CIM, ou seja, apenas foi realizado o subcultivo dos poços das microplacas que não houveram crescimento em placas de Petri preparadas com AMH (bactérias) ou ASD (levedura).

A substância **F2** é fungicida para todas as leveduras não *albicans* e apresentou o valor de CFM encontrada foi de 31,25 µg/mL. A substância **F3** é fungicida para a maioria das leveduras a faixa de valores de CFM encontrada foi de 31,25-7,8 µg/mL, porém não apresentou atividade antifúngica contra as leveduras *C. albicans* testadas.

No geral, os extratos AcOEt e os compostos apresentaram valores de CIM variados e de baixa a boa atividade contra os quatro microrganismos testados. A CIM foi de 1000-62,5 µg/mL contra as cepas bacterianas testadas, mas não houve atividade contra a levedura *C. albicans*

resistente ao fluconazol. O metabólito secundário **F2** apresentaram CIM de 62,5 µg/mL para *E. coli*, demonstrando que são bons agentes antimicrobianos naturais contra essa bactéria.

Por outro lado, os compostos **F8** e **F9** apresentaram CIM superior às concentrações de amostra testadas. O extrato AcOEt apresentou baixa atividade antimicrobiana de 1000 µg/mL contra *E. coli* e *S. aureus*. Além disso, os resultados das concentrações bactericidas mínimas (MBC) para o extrato AcOEt e para os compostos isolados não mostraram atividade bactericida, demonstrando o comportamento bacteriostático dos compostos em relação às três cepas bacterianas testadas (Tabela 26).

Os extratos de AcOEt mostraram boa atividade antifúngica, com valor de CIM de 500 µg/ml contra *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. albicans* resistentes ao fluconazol. Além disso, não mostrou atividade para *C. krusei*.

A concentração fungicida mínima (CFM) para o extrato AcOEt foi de 500 µg/mL para *C. albicans* e *C. tropicalis*, mostrando comportamento fungistático para *C. glabrata*.

Portanto, o extrato AcOEt teve relevante atividade antifúngica para espécies de leveduras de *C. albicans* e não *albicans*.

Tabela 26. Atividade antimicrobiana dos Extratos AcOEt das condições avaliadas e compostos isolados do cultivo com Mg²⁺

Amostra	CIM (CFM) ^a						CIM (CBM) ^a		
	<i>C. albicans</i> * ATCC 10231	<i>C. albicans</i> ATCC 18804	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	<i>S. aureus</i> ATCC 25922	<i>Salmonella sp.</i> ATCC 19196	<i>E. coli</i> ATCC 25923
PDB	–	500 (–)	–	500 (–)	500 (–)	–	500 (–)	1000 (–)	1000 (–)
PDB + Mg ²⁺	–	250 (–)	–	–	–	–	–	–	1000 (–)
PDB +Cu ²⁺	–	–	–	–	–	–	–	–	500 (–)
PDB +AZA	–	–	–	–	–	–	–	–	–
PDB +SAHA	–	–	–	–	–	–	1000 (–)	1000 (–)	1000 (–)
PDB +AA	–	–	–	–	–	–	–	–	1000 (–)
2	62,5 (–)	62,5 (–)	62,5 (62,5)	31,25 (62,5)	62,5 (62,5)	62,5 (62,5)	–	–	–
3	7,8 (7,8)	7,8 (15,6)	7,8 (31,5)	7,8 (7,8)	7,8 (–)	7,8 (31,5)	–	15,6 (–)	–
4	250 (–)	250 (–)	250 (250)	125 (125)	250 (250)	250 (250)	–	500 (–)	–
8	–	–	–	–	–	–	–	–	–
9	–	–	–	–	–	–	–	–	–
11	–	–	–	250 (250)	–	–	–	–	–
12	–	–	–	–	–	–	–	–	–
15	–	–	–	–	–	–	–	–	–
17	–	–	–	–	–	–	–	–	–
18	–	–	–	–	–	–	–	–	–
(+) ^{b1}	0,03	0,06	0,12	0,12	0,06	0,12	NA	NA	NA
(+) ^{b2}	R (64)	2,0	8,0	32	4,0	32	NA	NA	NA
(+) ^{b3}	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,30	25,0	12,5

^avalores em µg/mL; ^{b1} anfotericina B e ^{b2} fluconazol para leveduras; e ^{b3}ampicilina para bactérias; (–) CIM/CFM/CBM > 1000 µg/mL; NA: não aplicável; R: resistente; *resistente ao Fluconazol;

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO: *Aspergillus arcuoverdensis*

7.1 Isolamento dos metabólitos ativos de *Aspergillus arcuoverdensis*:

Todo o trabalho de pesquisa feito para preparar os extratos brutos assim como o pré-fracionamento realizado em duas etapas em coluna cromatográfica à vácuo, sendo o primeiro em sílica e então em resina Diaion HP20ss, foram realizados em conformidade com o procedimento operacional padrão (POP) do *Natural Products Discovery Group* (NPDG) da University of Oklahoma, para a realização do pré-fracionamento de extratos preparados em escala ampliada em *Cheerios*. Além disso, este POP descreve a metodologia padronizada para o preparo e de amostras para a realização de bioensaios e submissão para a biblioteca de produtos naturais provenientes de fungos do NPDG.

O extrato AcOEt foi fracionado em quatro frações obtidas a partir da coluna cromatográfica em sílica gel, eluída com quatro sistemas de eluição: hexano/DCM (1:1, v/v), 100% DCM, DCM/MeOH (10:1, v/v) e 100% MeOH. A fração 151FH05B (100% DCM) foi fracionada em coluna cromatográfica em resina de HP20ss, fornecendo seis frações (09E-J) (Figura 82).

A purificação das frações resultantes da CLV em HP20ss A subfração 09I (100% MeOH) foi purificada em CLAE semi-preparativo (Biphenyl 5 μ m, C18, 110 Å, 250 $\times$ 10.0 mm, modo gradiente 55-100% ACN:H₂O em 20 min, 4.0 mL/min), resultou no isolamento de três metabólitos: 48A (0.8 mg), 48B (0.9 mg), 48C (1.8 mg), Figura 82. Em modo isocrático (70% de ACN em H₂O) resultou no isolamento de 49A (0.9 mg).

Os cromatogramas estão apresentados na Figura 83 e 84. Os dados de RMN de ¹H e ¹³C, MS e UV apresentaram similaridade com os dados obtidos para o alcaloide verruculogena (48A), fumitremorgina A (48C), viriditoxina (49A). O verruculogena (49A) apresentou interessante atividade anti-*T. vaginalis*. Os espectros de RMN de ¹H são apresentados nas Figuras 85 e 86. Cromatogramas das substâncias isoladas estão apresentados na Figura 87.

Figura 82. Cromatograma do fracionamento e purificação da subfração 09I por métodos cromatográficos

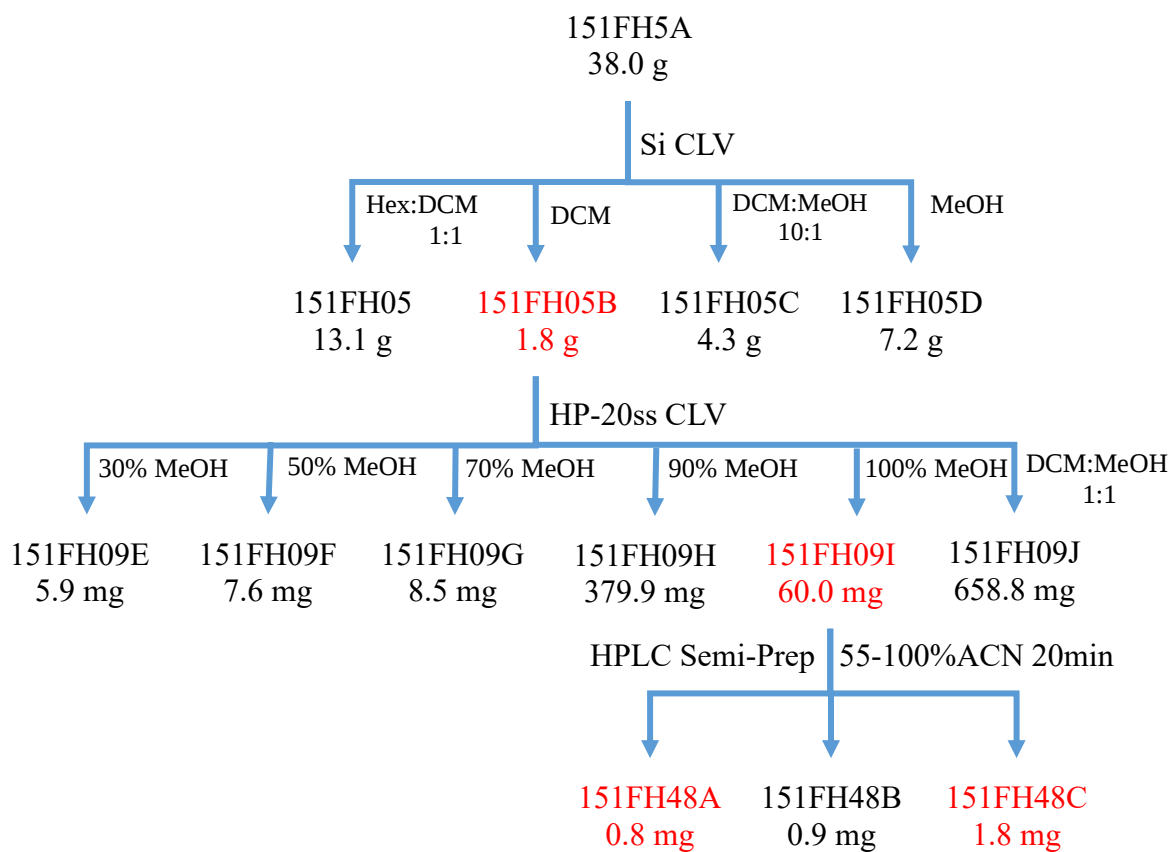


Figura 83. Cromatograma por UCLAE-DAD representando os perfis do extrato AcOEt (05A) e Frações 05B-D obtidas do pré-fracionamento por CLV utilizando sílica como FE, [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 μ m; Solvente A: H₂O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min⁻¹; Max Plot λ 200-600 nm]

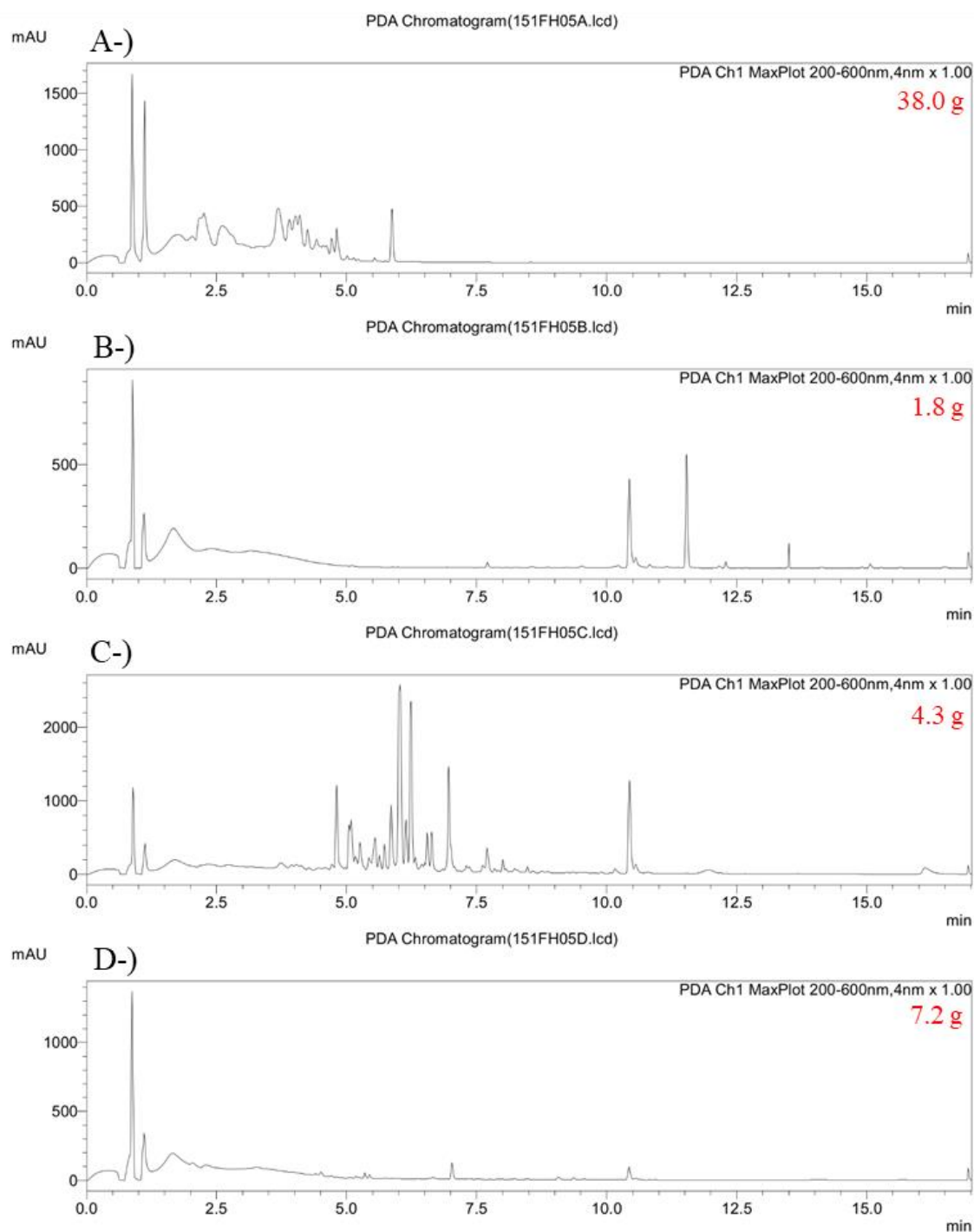


Figura 84. Cromatograma por UCLAE-DAD representando os perfis químicos das Frações 05E-I obtidas do pré-fracionamento por CLV utilizando a resina HP20ss como FE [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 μ m; Solvente A: H₂O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min⁻¹; Max Plot λ 200-600 nm]

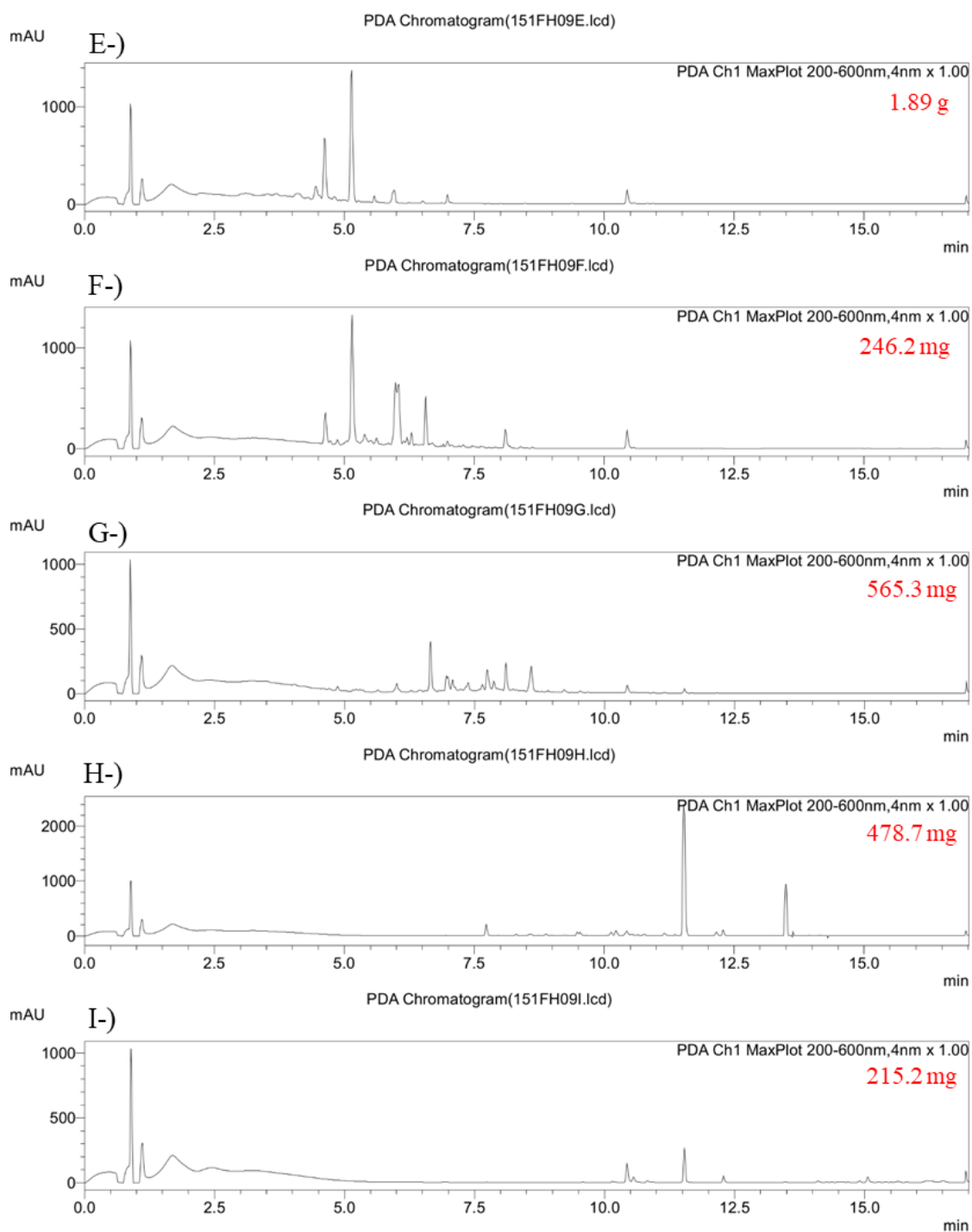
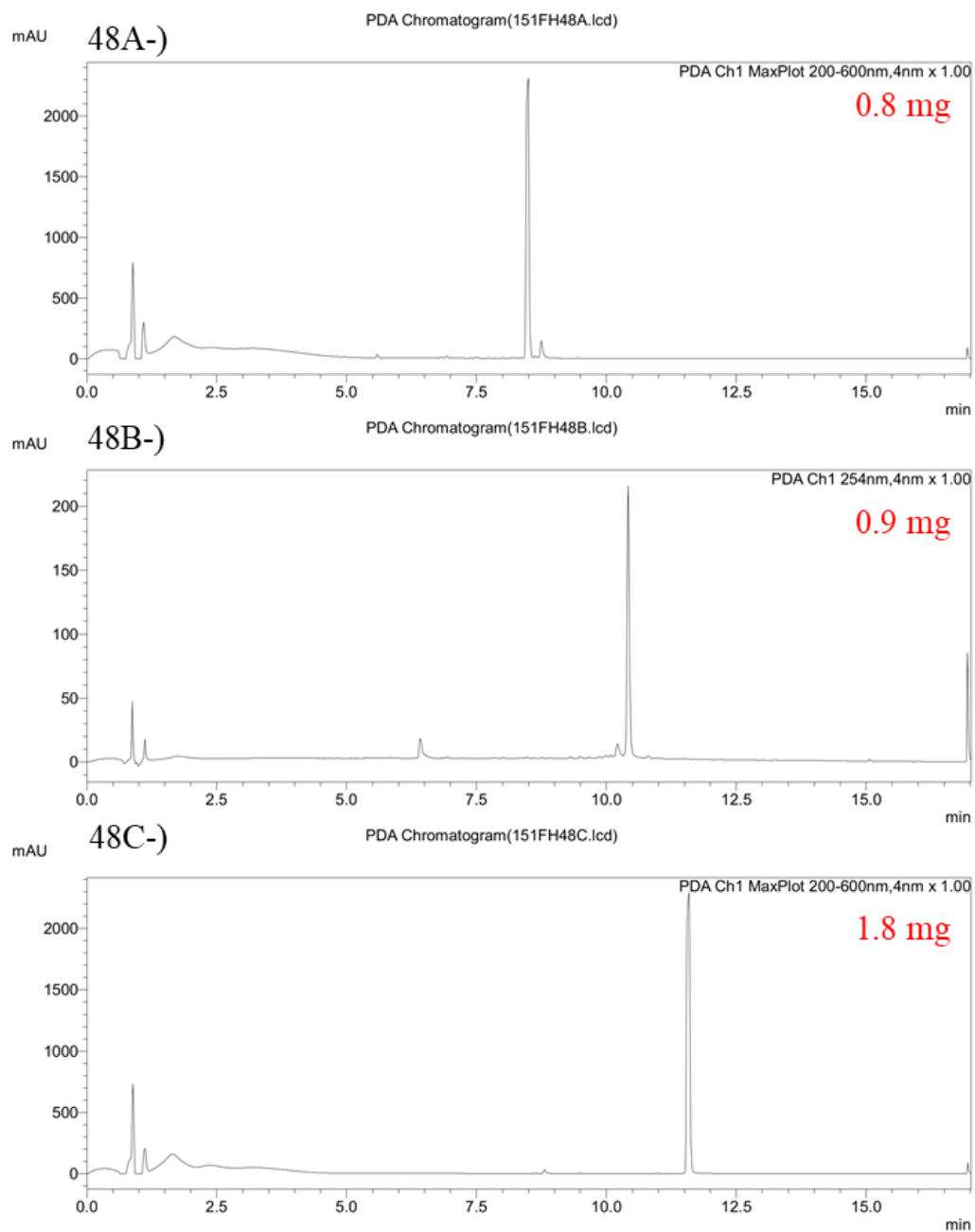


Figura 85. Cromatograma por UCLAE-DAD das substâncias isoladas 48A-C obtidas por CLAE-DAD semi-preparativo [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 μm ; Solvente A: H_2O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min^{-1} ; Max Plot λ 200-600 nm]



7.2 Avaliação da atividade Anti-*Trichomonas vaginalis*:

O extrato AcOEt e as frações obtidas do pré-fracionamento em CLV em sílica e HP20ss foram avaliadas na atividade anti-*T. vaginalis* e potencial tricomonicida. A maioria das amostras apresentaram atividade anti- *T. vaginalis* na concentração de 10 µg/mL, evidenciando potencial na inibição do crescimento do parasita quando comparado com o metronidazol 25 µM (Figura 86). A subfração 09I apresentou promissora atividade anti- *T. vaginalis* e foi escolhida para o isolamento por CLAE-DAD.

O ensaio anti-*Trichomonas vaginalis* apresentado neste trabalho foi realizado pelo Dr Jarrod King, pesquisador associado ao NPDG-OU.

Figura 86. Avaliação da atividade Anti-*Trichomonas vaginalis*

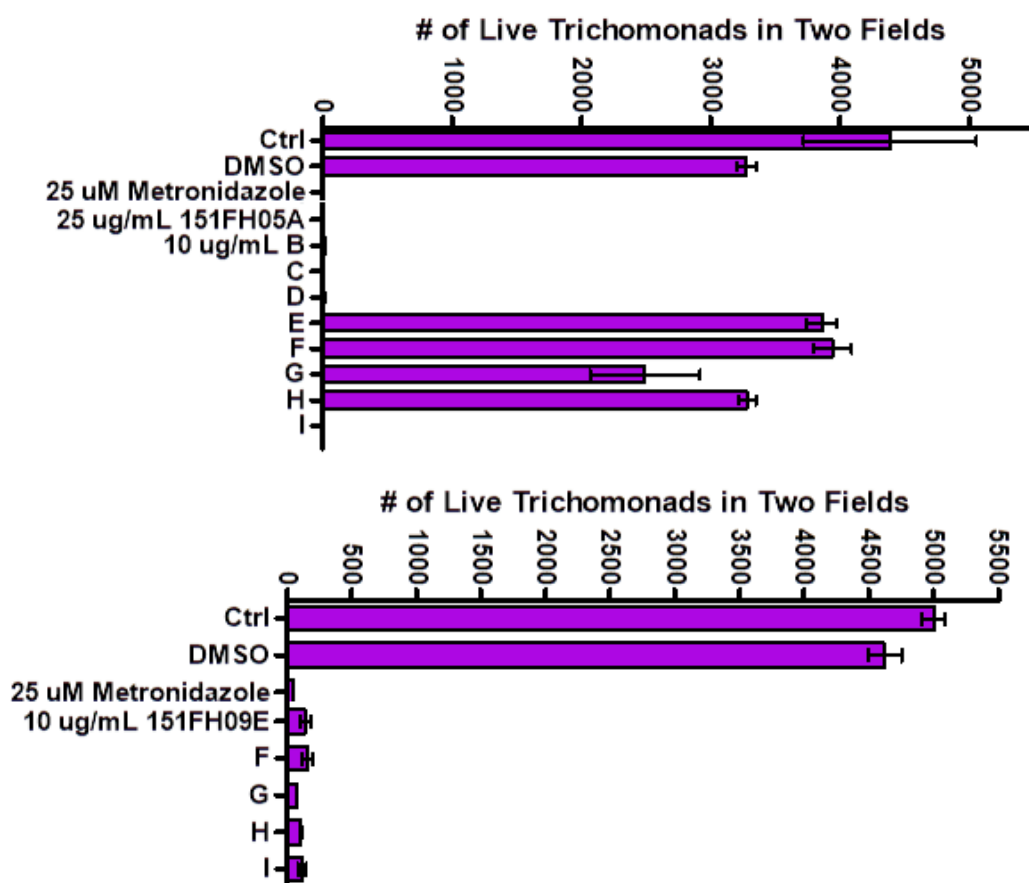


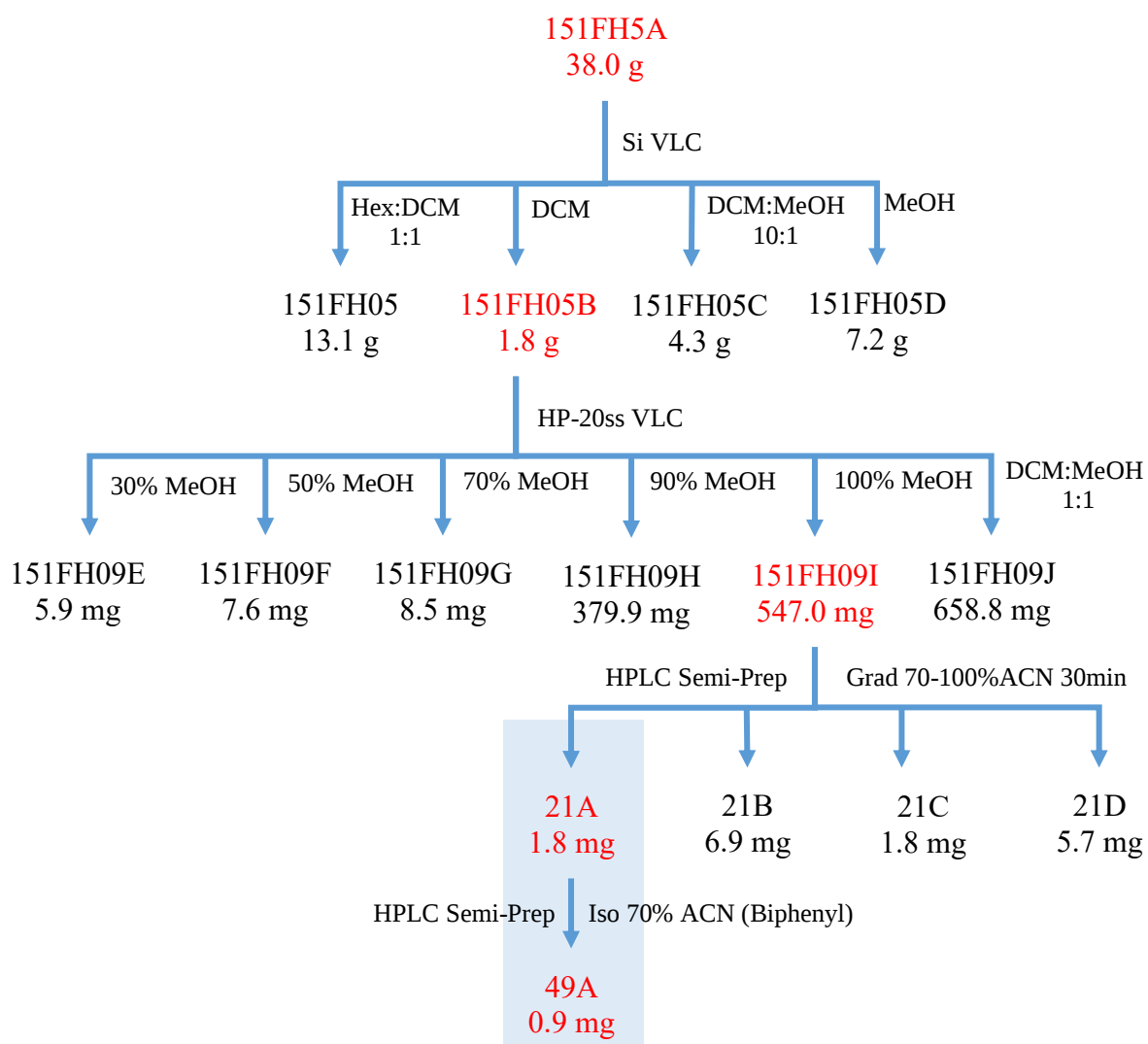
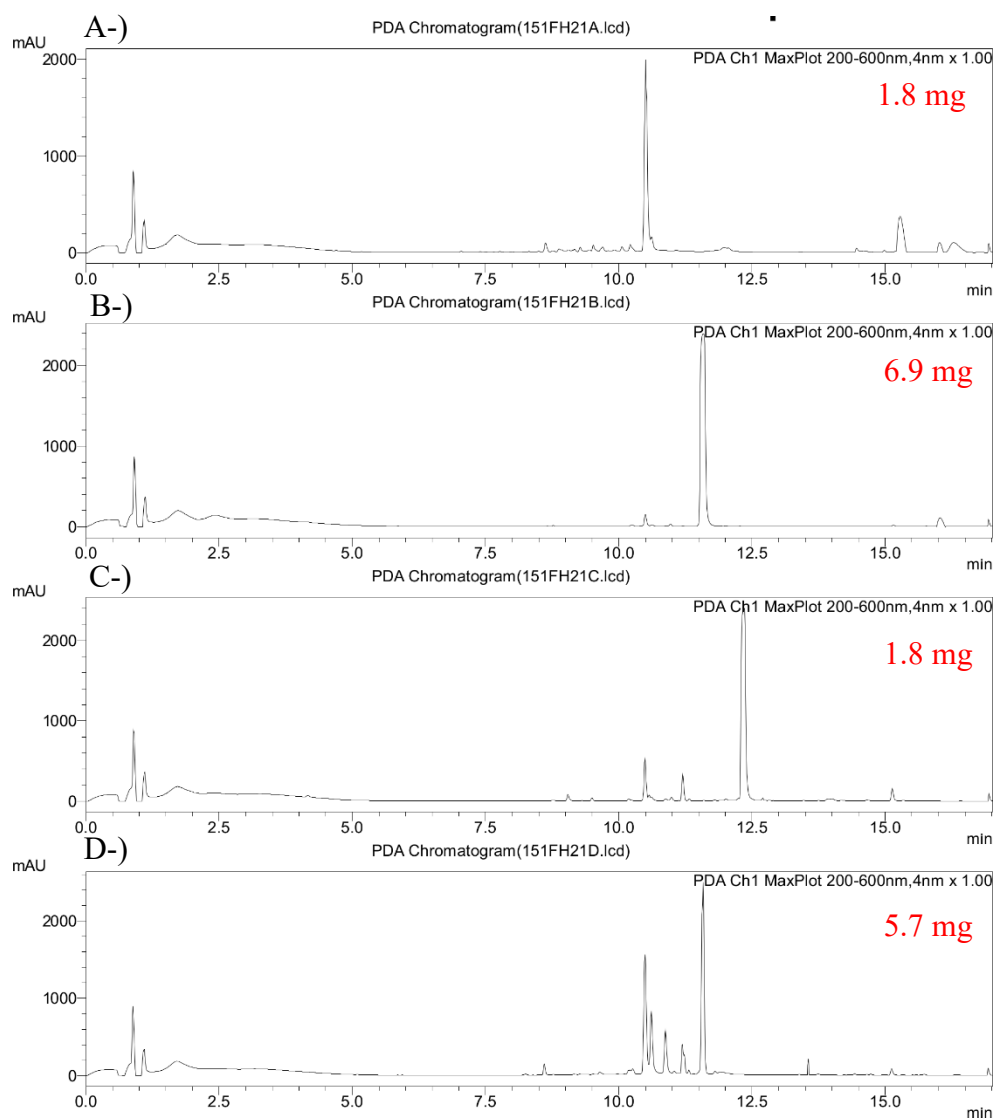
Figura 87. Isolamento de 49A por CLAE- DAD no modo semi-preparativo

Figura 88. Cromatograma por UCLAE-DAD das frações 21 A-D obtidas por CLAE-DAD semi-preparativo [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 μm ; Solvente A: H_2O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min^{-1} ; Max Plot λ 200-600 nm]



7.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

7.3.1 151FH48A & 151FH48C:

Os espectros de RMN de ^1H das substâncias 151FH48A e 151FH48C, isoladas de *A. arcoverdensis*, foram comparados com os dados publicados por Yamazaki et al. (1980) e Suzuki et al (1990), sendo então confirmada a estrutura química dos compostos como sendo verruculogena e fumitremorgina A, respectivamente (Tabela 27, Figuras 89-90).

O primeiro relato da verruculogena, metabólito produzido por *Penicillium verruculosum*, foi realizado por (FAYOS et al., 1974), enquanto que o a fumitremorgina A foi isolado pela primeira vez do fungo *Aspergillus fumigatus* (YAMAZAKI M, FUJIMOTO H, 1980). Ambas são micotoxinas que atuam no sistema nervoso central causando tremores, convulsões e até mesmo óbito em animais (COLE et al., 1975; FAYOS et al., 1974; YAMAZAKI M, FUJIMOTO H, 1980). Controversamente, os metabólitos secundários verruculogena e fumitremorgina A também são reportados como alcaloides bioativos (FENG et al., 2015).

O metabólito secundário verruculogena é o produto final do cluster de genes biossintéticos para alcaloides do tipo fumitremorginas em *Aspergillus fumigatus* e *Neosartorya fischeri* (MUNDT et al., 2012). Quando comparada à verruculogena a fumitremorgina A possui um grupo adicional prenila em sua estrutura química (MA et al., 2016).

Em nossos esforços para encontrar compostos de *A. arcoverdensis* com atividade anti-*Trichomonas vaginalis*, a subfração mais promissora foi a 09I (HP20ss, 100% MeOH), resultando no isolamento das substâncias 48A-C. O ferruculogena (48) é inativo contra o parasita *Trichomonas vaginalis*.

Tabela 27. RMN de ^1H (500 MHz) de 48A e 48C: comparação com a literatura^a

Posição	^{a,c} Verruculogena ^1H , m (J) CDCl_3	^b 151FH48A ^1H , m (J) CD_3OD	^{b,c} Fumitrenorgina A ^1H , m (J) CDCl_3	^b 151FH48C ^1H , m (J) CD_3OD
1-N				
2				
3	6,05, <i>d</i> (10,0)	6,09, <i>dd</i> (2,0, 9,5)	6,13, <i>br, d</i>	6,18, <i>d</i> (10,5)
4-N				
5				
6	4,48, <i>m</i>	4,43, <i>m</i>	5,06, <i>t</i>	4,67, <i>m</i>
7	1,65 – 2,55, <i>m</i>	2,47, <i>m</i> 2,12, <i>m</i>	2,40, <i>m</i> 1,60 – 2,20, <i>m</i>	2,43, <i>m</i> 2,12, <i>m</i>
8	1,65 – 2,55, <i>m</i>	2,08, <i>m</i> 2,03, <i>m</i>	1,60 – 2,20, <i>m</i>	2,09, <i>m</i> 1,98, <i>m</i>
9	3,63, <i>t</i>	3,62 – 3,71, <i>m</i>	3,63, <i>m</i>	3,55 – 3,60, <i>m</i>
10-N				
11				
12				
13	5,65, <i>Ls</i>	5,56, <i>s</i>	5,50, <i>s</i>	5,30, <i>s</i>
14				
15				
16	7,90, <i>d</i> (8,7)	7,55, <i>d</i> (8,5)	7,68, <i>d</i>	7,67, <i>d</i> (9,0)
17	6,83, <i>dd</i> (2,2, 8,7)	6,82, <i>dd</i> (2,5, 8,5)	6,82, <i>dd</i>	6,75, <i>dd</i> (9,0,2,0)
18				
19	6,59, <i>d</i> (2,2)	6,68, <i>d</i> (2,5)	6,59, <i>d</i>	6,64, <i>s</i>
20				
21	6,64, <i>d</i> (8,0)	6,75, <i>d</i> (8,0)	6,62, <i>d</i>	6,71, <i>d</i> (7,5)
22	5,05 (8,0)	5,13, <i>ddd</i> (1,5, 8,0)	5,02, <i>Ld</i> ,	5,08, <i>d</i> (8,5)
23				
24	1,74, <i>d</i> (1,2)	1,78, <i>d</i> (1,5)	1,71, <i>s</i>	1,77, <i>s</i>
25	2,0, <i>d</i> (1,2)	2,05, <i>d</i> (1,5)	1,81, <i>s</i>	2,03, <i>s</i>
26	1,65 – 2,55, <i>m</i>	2,13 – 2,17, <i>m</i>	1,60 – 2,20, <i>m</i>	1,86, <i>d</i> 1,70, <i>d</i>
27				
28	1,01, <i>s</i>	1,02, <i>s</i>	0,99, <i>s</i>	1,01, <i>s</i>
29	1,72, <i>s</i>	1,69, <i>s</i>	2,00, <i>s</i>	1,64, <i>s</i>
30			4,71, ,	5,01, <i>m</i> 4,71, <i>m</i>
31			5,60, <i>t</i> ,	5,64, <i>t</i> (7,5)
32				
33			1,71, <i>s</i>	1,83, <i>s</i>
34			1,82, <i>s</i>	1,83, <i>s</i>
18-OMe	3,82, <i>s</i>	3,82, <i>s</i>	3,84, <i>s</i>	3,81, <i>s</i>

^aAfiyatullo, Sh. Sh. et al. *Chem. Nat. Compd.*, **2004**, 40 (6), 615-617 (Verruculogena)^bYamazaki, M. et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **1980**, 28, 245- 254 (Fumitremorgina A)^c δ in ppm, *J* in Hz

Figura 89. Espectro de RMN de ^1H (500MHz) em CD_3OD da verruculogena isolada de *Aspergillus Arcoverdensis*

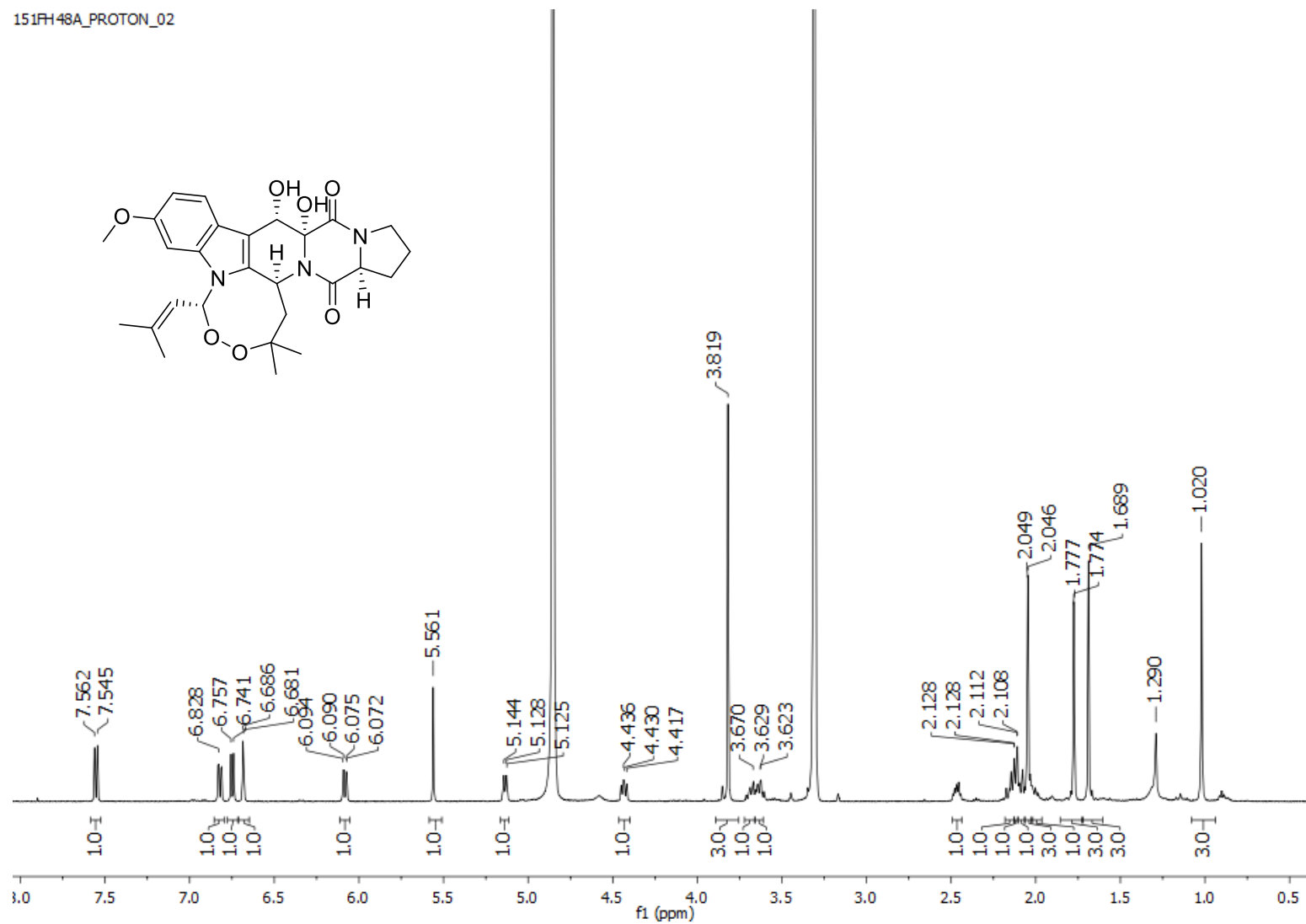
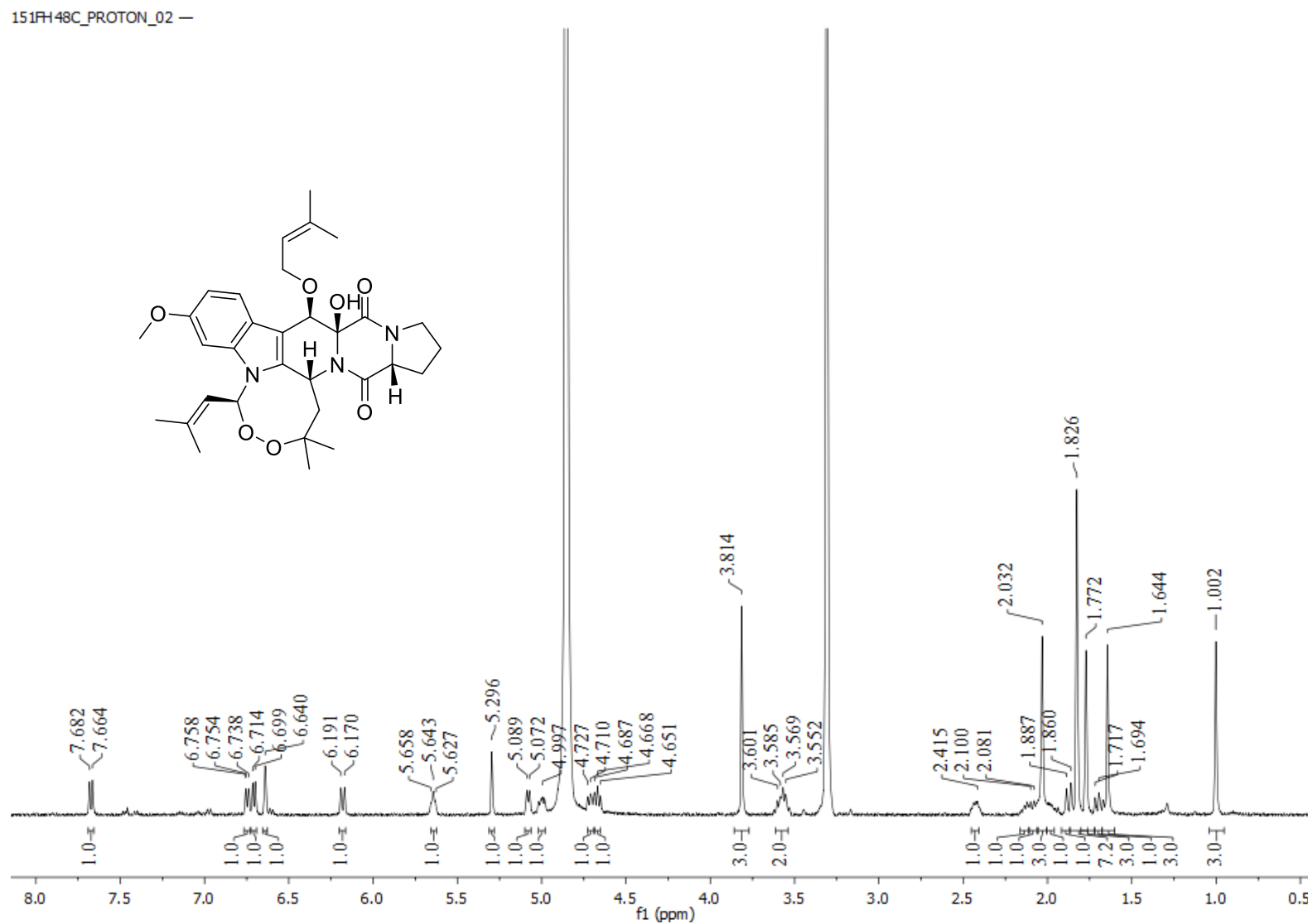


Figura 90. Espectro de RMN de ^1H (500MHz) em CD_3OD da fumitremorgina A isolada de *Aspergillus Arcoverdensis*



7.3.2 151FH49A:

A substância 49A, produzida por *A. arcoverdensis*, foi isolada como um sólido amarelo. Os espectros de RMN de ^1H (Figura 92, Tabela 28) e ESI-MS e UV (Figura 93) foram registrados e seus dados comparados com os da literatura, podendo ser confirmada a estrutura química da substância 49A como sendo a viriditoxina (SUZUKI et al., 1990).

A viriditoxina (Figura 94) é dímero da semiviriditoxina, sendo formado por duas unidades nafto- α -pirona ligadas nas posições C-6/C-6' do anel naftalênico (GOMEZ et al., 2018). Apresentou no espectro de ESI-MS, modo positivo, o íon m/z 663 $[\text{M}+\text{H}]^+$ fórmula $\text{C}_{34}\text{H}_{31}\text{O}_{14}$.

Tabela 28. Dados de RMN de ^1H da viriditoxina e comparação com os da literatura

Posição	151FH49A (CDCl_3)	Suzuki et al, 1990
	$\delta^1\text{H}$, m [ppm] 500MHz	$\delta^1\text{H}$, m [ppm] 400MHz
4	2,85, m	2,67, m
5	6,16, s	6,23, s
8	6,85, s	6,80, s
1'	2,78, m	2,78, m
3'	3,62, s	3,70, s
7-OMe	3,70, s	3,77, s
9-OH	10,04, br	9,76, br
10-OH	13,35, br	13,76 br

A viriditoxina foi isolada pela primeira vez de *Aspergillus viridi-nutans* (WEISLEDER; LILLEHOJ, 1971), sendo isolada também de outras espécies do gênero *Aspergillus* incluindo *A. brevipes* e *A. fumigatus* (GOMEZ et al., 2018). E neste trabalho como metabólito isolado de *A. arcoverdensis*.

A viriditoxina possui amplo espectro de atividade antibacteriana principalmente para bactérias Gram-positivos importantes na clínica médica, como o *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina e *Enterococos* resistentes à vancomicina, não é citotóxica em linhagem celular eucarionte (WANG et al., 2003).

O mecanismo de ação responsável pela atividade antibacteriana da viriditoxina é pela inibição da FtsZ, proteína análoga à tubulina eucarionte. FtsZ é fundamental para que possa ocorrer a divisão celular bacteriana (ANDERSON et al., 2012)

O potencial inseticida da viriditoxina, isolada do fungo *Paecilomyces varioti*, foi avaliado contra a mosca-varejeira da espécie *Lucilia cuprina*, responsável por considerável parte dos casos de miíases em animais, infecção também conhecida como bicheira. Foi

observada a atividade inseticida da viriditoxina contra as moscas em ovelhas, oferecendo proteção por meses não sendo observado quaisquer efeitos adversos nos animais estudados (GREEN et al., 1989).

Figura 91. Estruturas químicas: verruculogena e fumitremorgina A

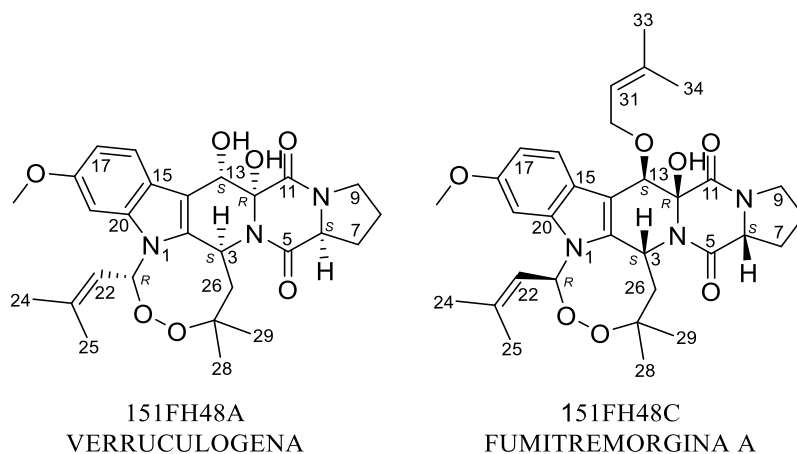


Figura 92. RMN de ^1H (500MHz) em CDCl_3 da viriditoxina (49A) isolada de *Aspergillus Arcoverdensis*

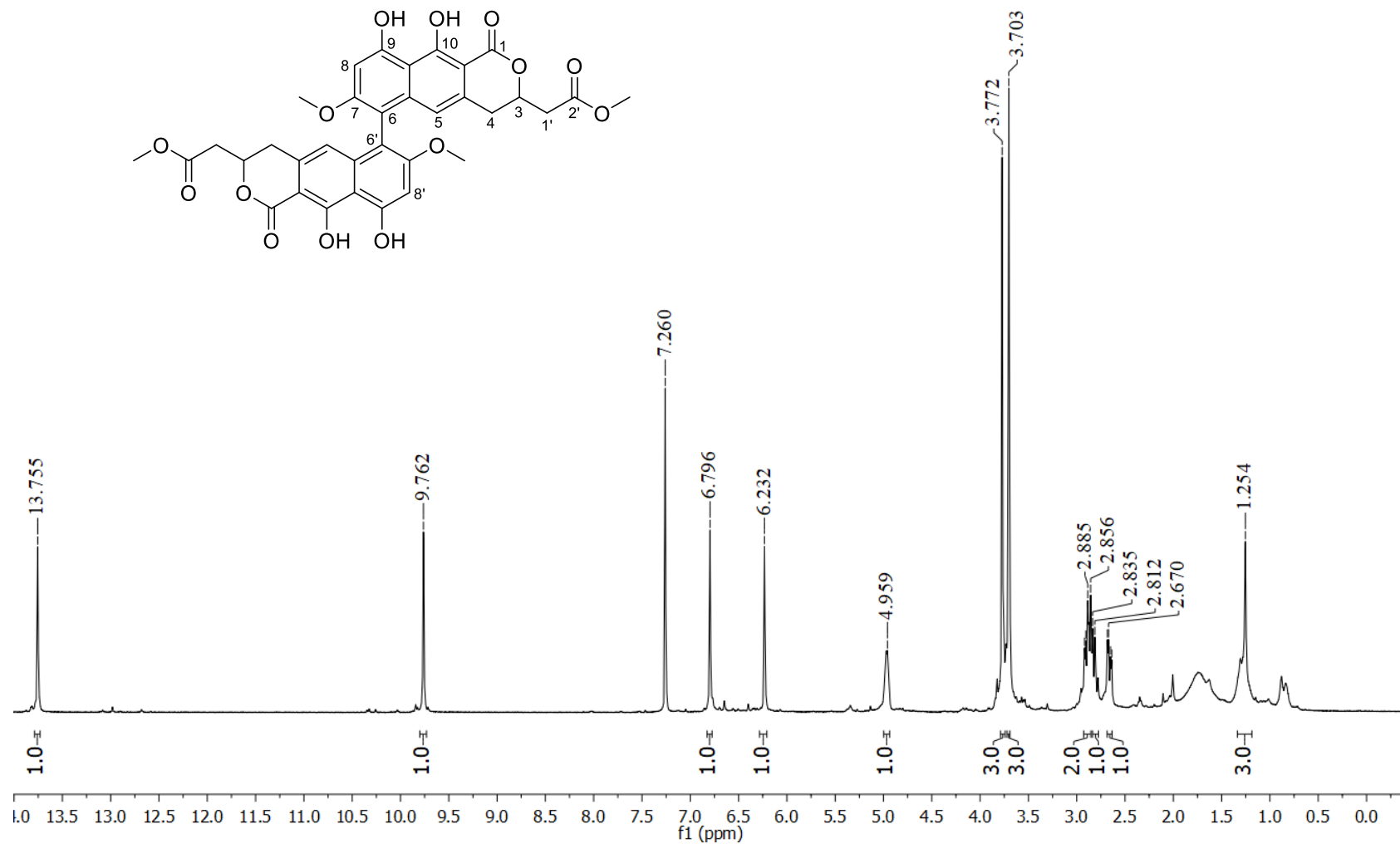


Figura 93. Cromatograma e espectros de UV e EM obtidos por UCLAE-DAD-MS da viriditoxina

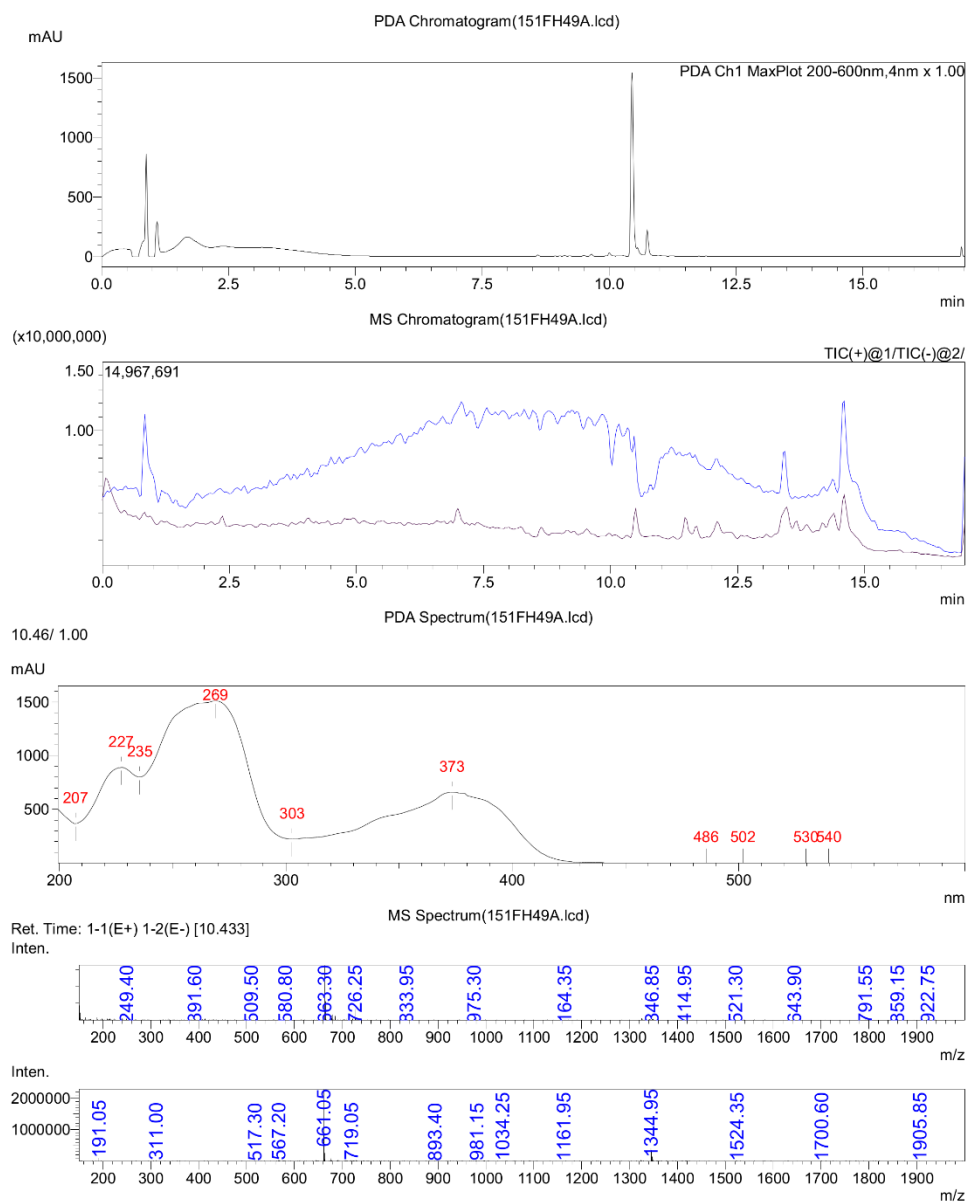
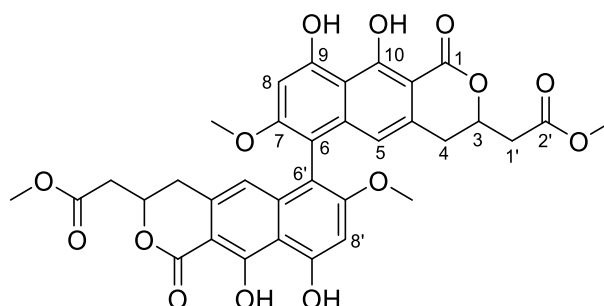


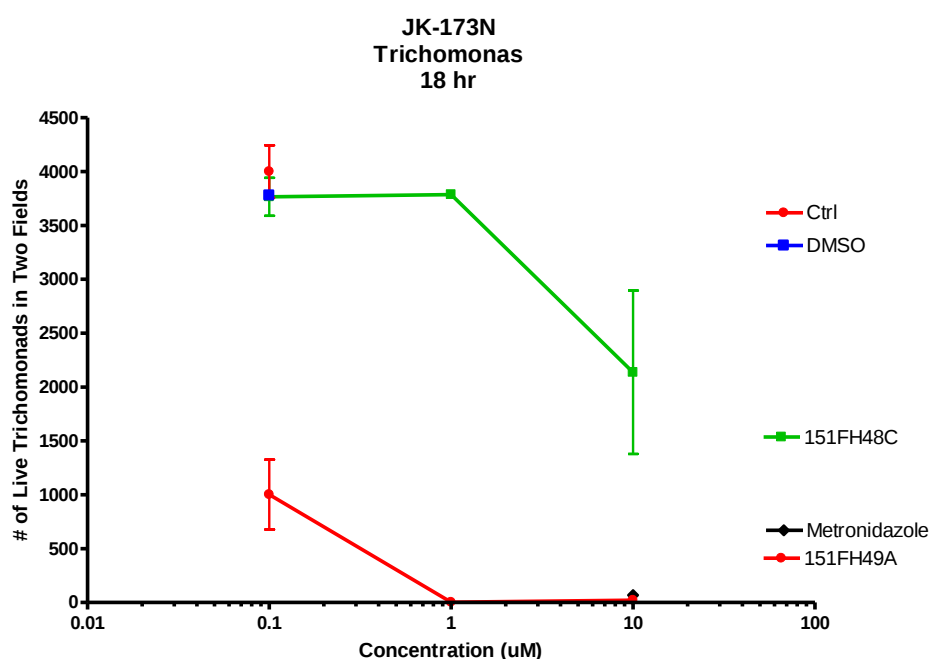
Figura 94. Estrutura química da viriditoxina (49A)



7.4 Avaliação da atividade Anti-*Trichomonas vaginalis*:

A avaliação da atividade antiprotozoária contra *T. vaginalis* dos metabólitos isolados de *A. arcoverdensis* por estudos bioguiados, evidenciou que a fumitremorgina A (48C) não exibiu atividade contra *T. vaginalis*, sendo, portanto, esse composto atóxico aos trofozoítos a 10 μM , Figura 95.

Figura 95. Avaliação da atividade anti-*Trichomonas vaginalis* de 48C e 49A



Em contra partida, a viriditoxina (49A), outro metabólito secundário isolada da espécie fúngica estudada, exibiu potente atividade tricomonicida, com valores de atividade semelhante à do metronidazol (10 μM), esses resultados estão apresentados na Figura 95. Tanto o controle positivo metronidazol quanto a viriditoxina inibiram a viabilidade do parasita em 1,0 μM .

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO: *Cylindrocarpon pauciseptatum*

8.1 Isolamento dos compostos ativos de *Cylindrocarpon pauciseptatum*:

O extrato AcOEt preparado do cultivo em escala ampliada foi submetido ao pré-fracionamento em duas etapas cromatográficas conforme descrito no POP do NPDG-OU: pré-fracionamento de extratos preparados em escala ampliada em Cheerios.

O extrato AcOEt (07A) apresentou rendimento de 62,5 g após a remoção do solvente em evaporador rotativo, então submetido à cromatografia líquida à vácuo (CLV), em coluna de sílica gel, eluída com solventes em ordem crescente de polaridades, hexano/DCM (1:1, v/v), DCM (100%), DCM/MeOH (10:1, v/v) e MeOH (100%), fornecendo quatro subfrações: 07B-D, respectivamente (Figura 96).

A subfração 07C (DCM/MeOH; 10:1, v/v) resultante do pré-fracionamento por CLV em sílica gel foi novamente submetida à VLC, utilizando como FE a resina Diaion HP20ss, eluída com MeOH:H₂O 30%, 50%, 70%, 90%, 100% MeOH, DCM:MeOH (1:1, v/v), resultando em seis subfrações (07E-J), Figura 97.

A subfração 07G (70% MeOH:H₂O, 60mg) foi purificada em CLAE semi-preparativo (F5 5 µm, C18, 110 Å, 250 × 10,0 mm, modo gradiente 30-100% ACN em H₂O em 30 min 4,0 mL/min), fornecendo as subfrações 36 A-H.

A subfração 36D foi então repurificada em CLAE semi-preparativo (Isocrático 55% ACN:H₂O) resultando no isolamento de 42A (3,7 mg), Figura 98.

Amostras do extrato AcOEt (07A) e das subfrações 07B-D (DCM 100%, DCM:MeOH, 10:1 e MeOH 100%) e 07E-I (30%, 50%, 70%, 90%, e 100% MeOH), foram preparadas e encaminhadas para avaliar a atividade anti-tuberculose, e submetidas para compor o acervo da biblioteca de produtos naturais provenientes de fungos do NPDG.

As amostras foram dissolvidas em DMSO (100%), o extrato AcOEt foi preparado na concentração de 5,0 mg/mL, enquanto que as subfrações obtidas dos pré-fracionamentos em CLV de sílica e HP20ss, na concentração de 2,0 mg/mL. Conforme descrito no POP do NPDG-OU: pré-fracionamento de extratos preparados em escala ampliada em Cheerios.

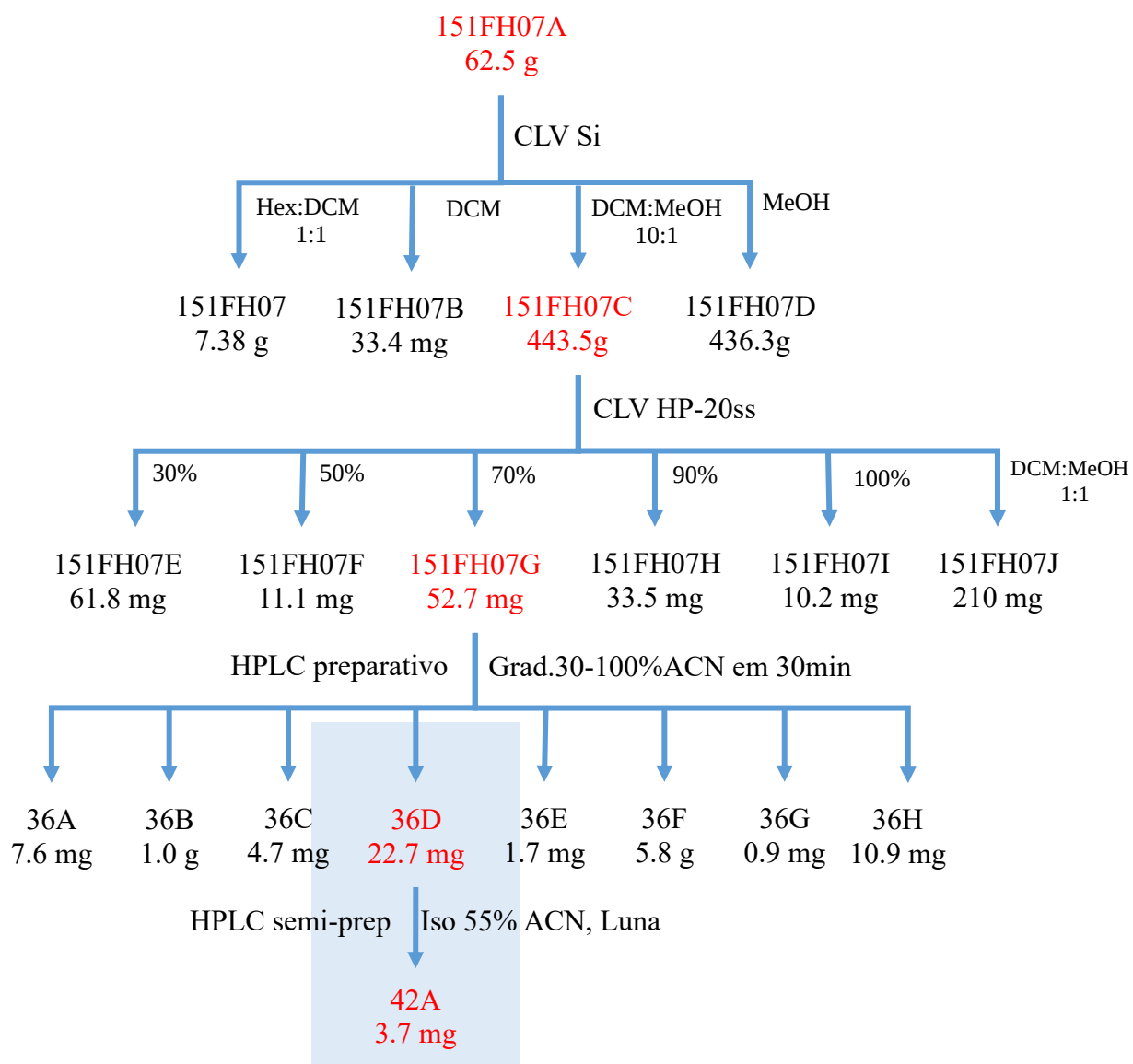
Figura 96. Cromatograma do fracionamento e isolamento de 42A por métodos cromatográficos

Figura 97. Cromatograma por UCLAE-DAD do extrato AcOEt (07A) e das frações 07B-D obtidas do pré-fracionamento por CLV utilizando sílica como FE, [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 μ m; Solvente A: H₂O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min⁻¹; Max Plot λ 200-600 nm]

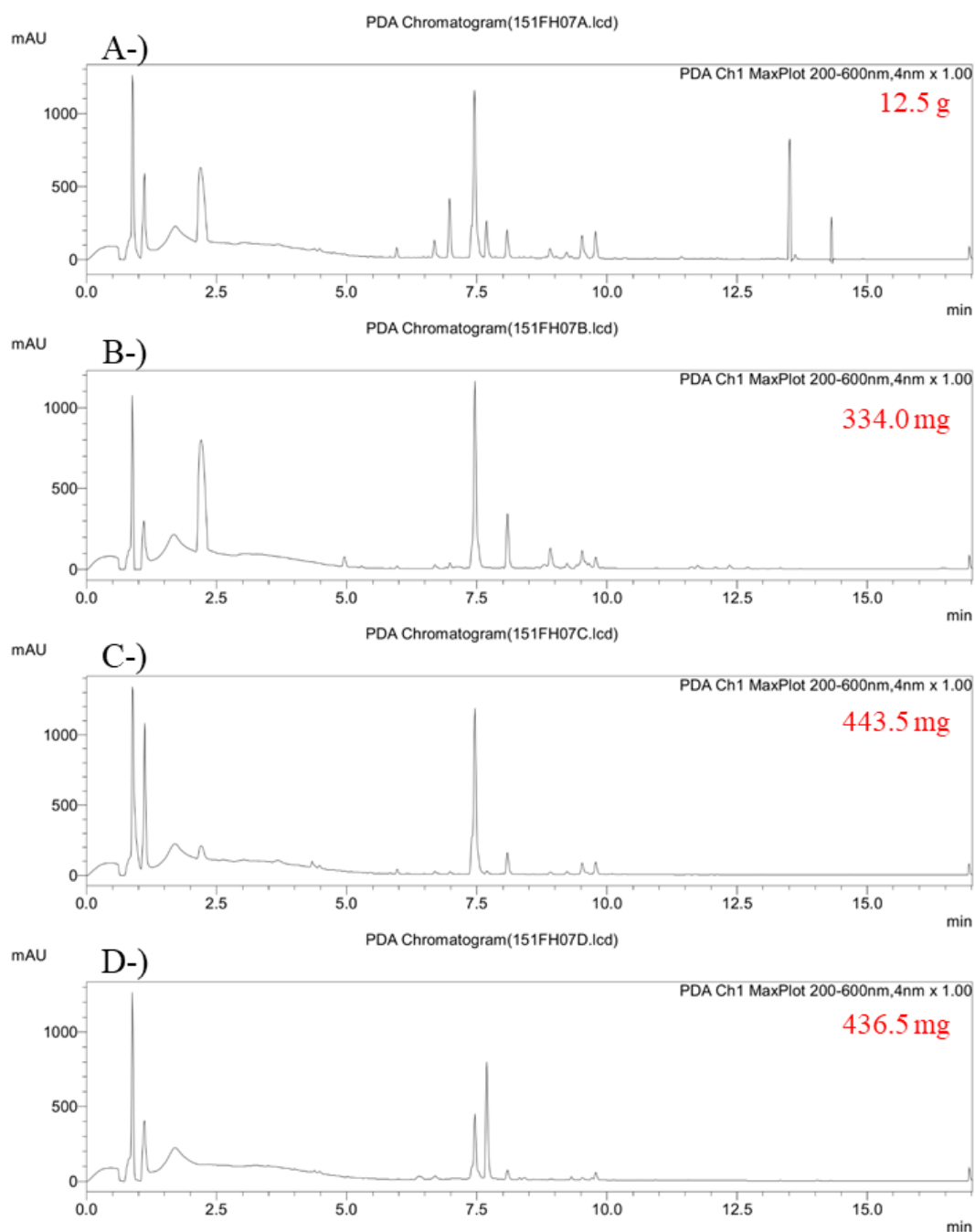
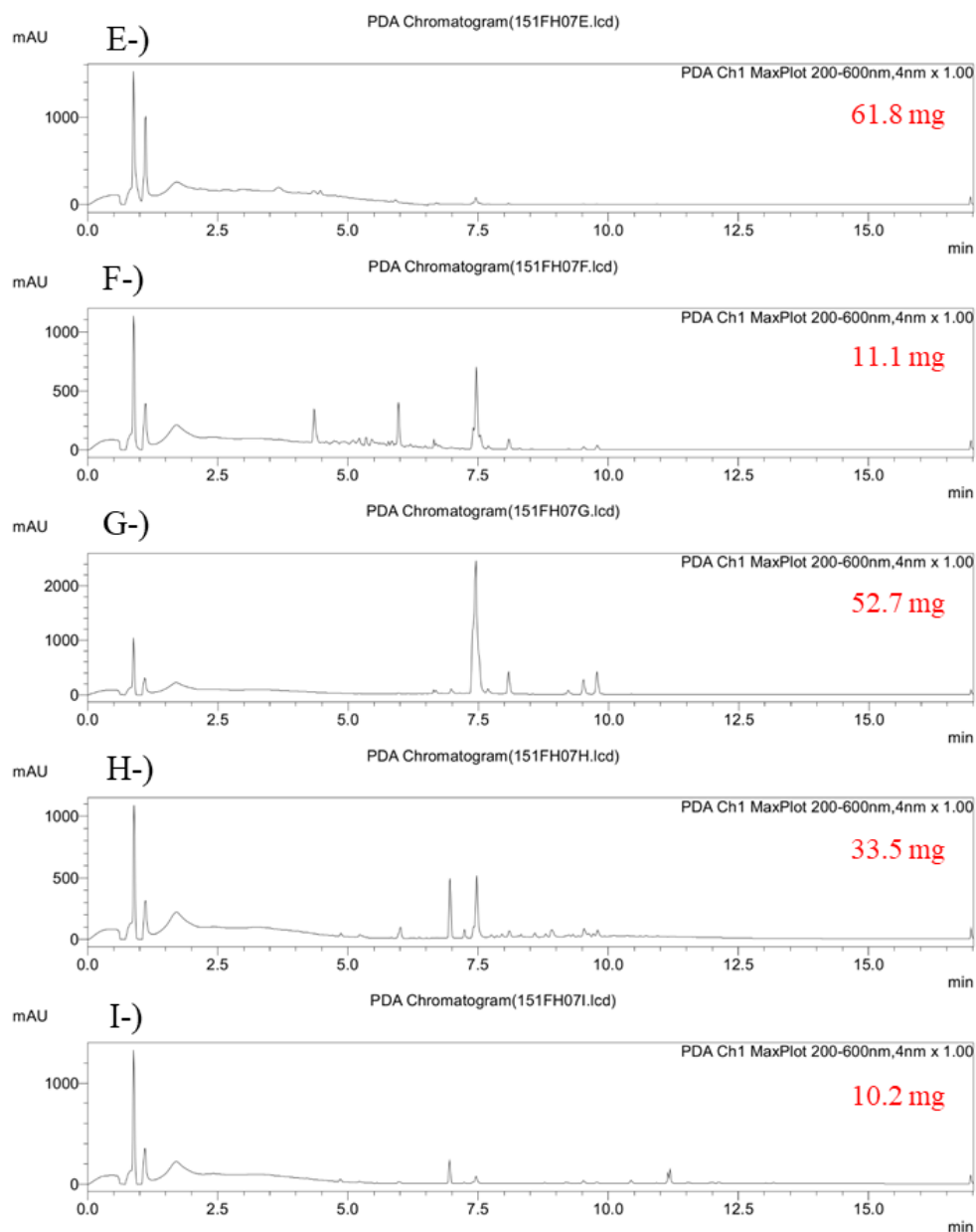


Figura 98. Cromatograma por UCLAE-DAD representando os perfis das Frações 07E-I obtidas do pré-fracionamento por CLV utilizando HP20ss como FE, [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 μ m; Solvente A: H₂O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min⁻¹; Max Plot λ 200-600 nm]



8.2 Avaliação da atividade antimicobacteriana:

A avaliação da atividade antimicobacteriana do extrato AcOEt (07A), das subfrações 07B-D (DCM 100%, DCM:MeOH, 10:1 e MeOH 100%) e 07E-I (30%, 50%, 70%, 90% e 100% MeOH) foram avaliadas frente cepas latente e replicante de *Mycobacterium tuberculosis*.

A maioria das subfrações apresentaram atividade antimicobacteriana para a forma latente, sendo que a única inativa foi a 07E, com valores de CIM entre 5 e 20 µg/mL.

Além disso, foi avaliado o potencial de citotoxicidade in vitro de 07A-I em células de macrófagos murinho J774, e verificou-se que, para uma concentração de 2 µg/mL, o extrato bruto de acetato de etila (07A) e as subfrações 07D-I não foram tóxicas para as células utilizadas (Tabela 29). Enquanto que 07B-C interferiu na viabilidade celular entre 68-75%.

Tabela 29. Avaliação da atividade anti-TB de 07A-I

Amostra	Mtb-replicante	Mtb-latente µg/mL	J774 % viabilidade
151FH07A	-	10	100
151FH07B	-	10	75%
151FH07C	-	10	68%
151FH07D	-	20	100
151FH07E	-	-	100
151FH07F	-	5	100
151FH07G	-	5	100
151FH07H	-	10	100
151FH07I	-	10	100

8.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

8.3.1 151FH42A

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 151FH49A (Figuras 99 e 100, respectivamente), isolada de *Cylindrocarpon pauciseptatum*, foram comparados com os dados publicados na literatura (VON BARGEN et al., 2015), sendo confirmada a estrutura química da fujikurina B (Figura 102, Tabela 30). Os dados do UCLAE-DAD-ESI/MS estão aprestados na figura 101.

Tabela 30. Dados de RMN de ^1H da fujikurina B e comparação com os da literatura

Posição	151FH42A	Von Bargaen et al, 2015
	$\delta^1\text{H}$, <i>m</i> (J) CD_3OD	$\delta^1\text{H}$, <i>m</i> (J) CDCl_3
1		
2		
3		
4	2,59 <i>dq</i> (10,5, 6,2)	2,44 <i>dq</i> (10,3, 6,9)
5	4,24 <i>dq</i> (10,5, 6,2)	4,27 <i>dq</i> (10,3, 6,3)
6		
7	3,80 <i>m</i>	4,00–3,94 <i>m</i>
8	1,74 <i>m</i>	1,81–1,61 <i>m</i>
	1,49 <i>m</i>	1,51–1,45 <i>m</i>
9	0,91 <i>t</i> (7,4)	0,95 <i>t</i> (7,4)
10	1,22 <i>d</i> (6,7)	1,27–1,13 <i>m</i>
11	4,58 <i>m</i>	1,27–1,13 <i>m</i>
	3,86 <i>m</i>	
12	1,53 <i>d</i> (6,2)	1,59 <i>d</i> (6,5)

$^\circ\delta$ in ppm, *J* in Hz

A fujikurina A foi isolada pela primeira vez em 2000, e descrita como o composto CR377, exibindo atividade antifúngica contra *Cândida albicans* (BRADY; CLARDY, 2000).

A estrutura química da fujikurina B quando comparada com a fujikurina A, há a adição de água à dupla ligação entre C-11 e C-4 da fujikurina A, resultando no padrão típico de 1,3-oxigenação típico de policetídeos (VON BARGEN et al., 2015).

Figura 99. Espectro de RMN de ^1H (500MHz) in CD_3OD da fujikurina B isolada de *Cylindrocarpon pauciseptatum*

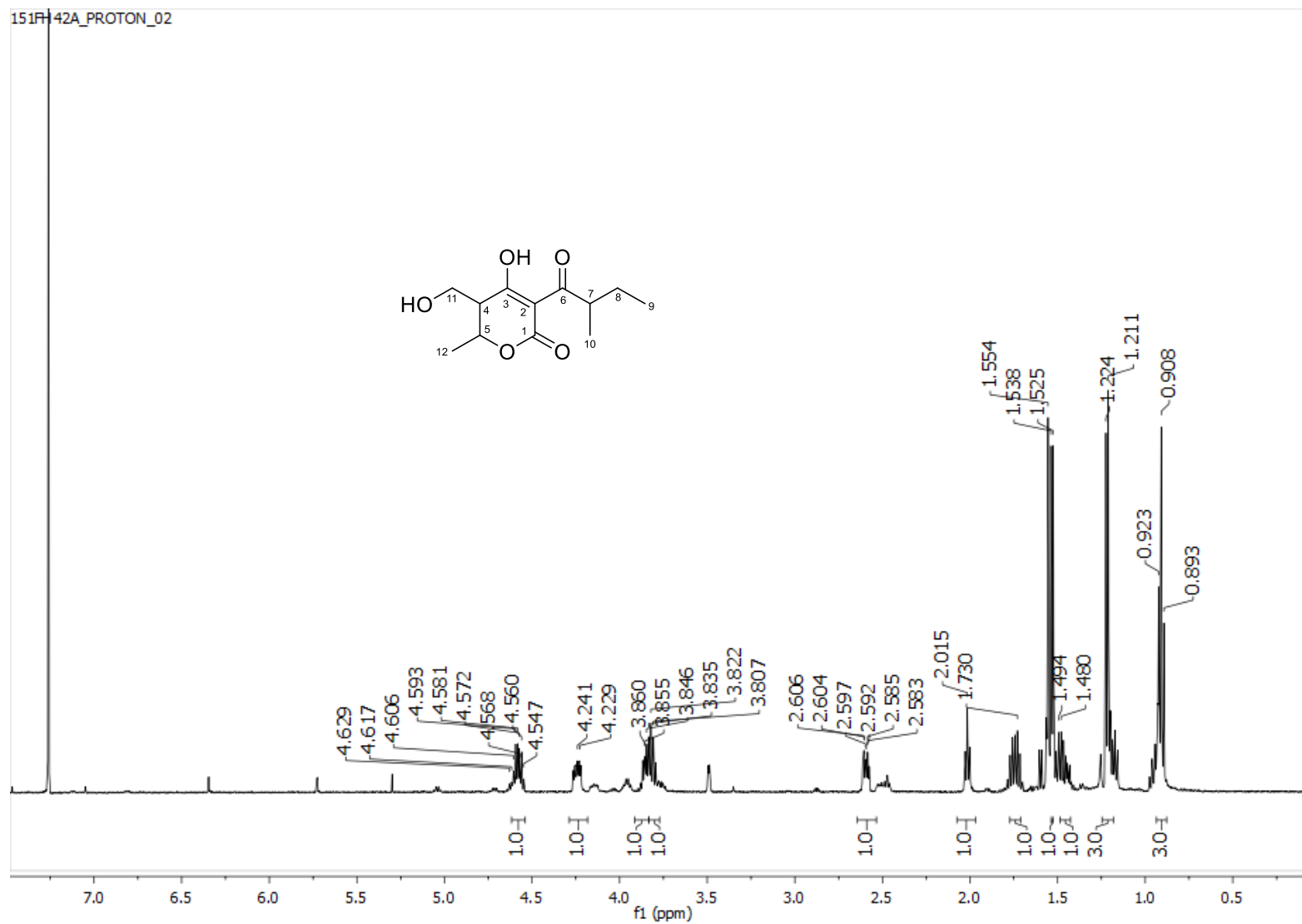


Figura 100. Espetro de RMN de ^{13}C (125MHz) em CD_3OD da Fujikurina B isolada de *Cylindrocarpon pauciseptatum*

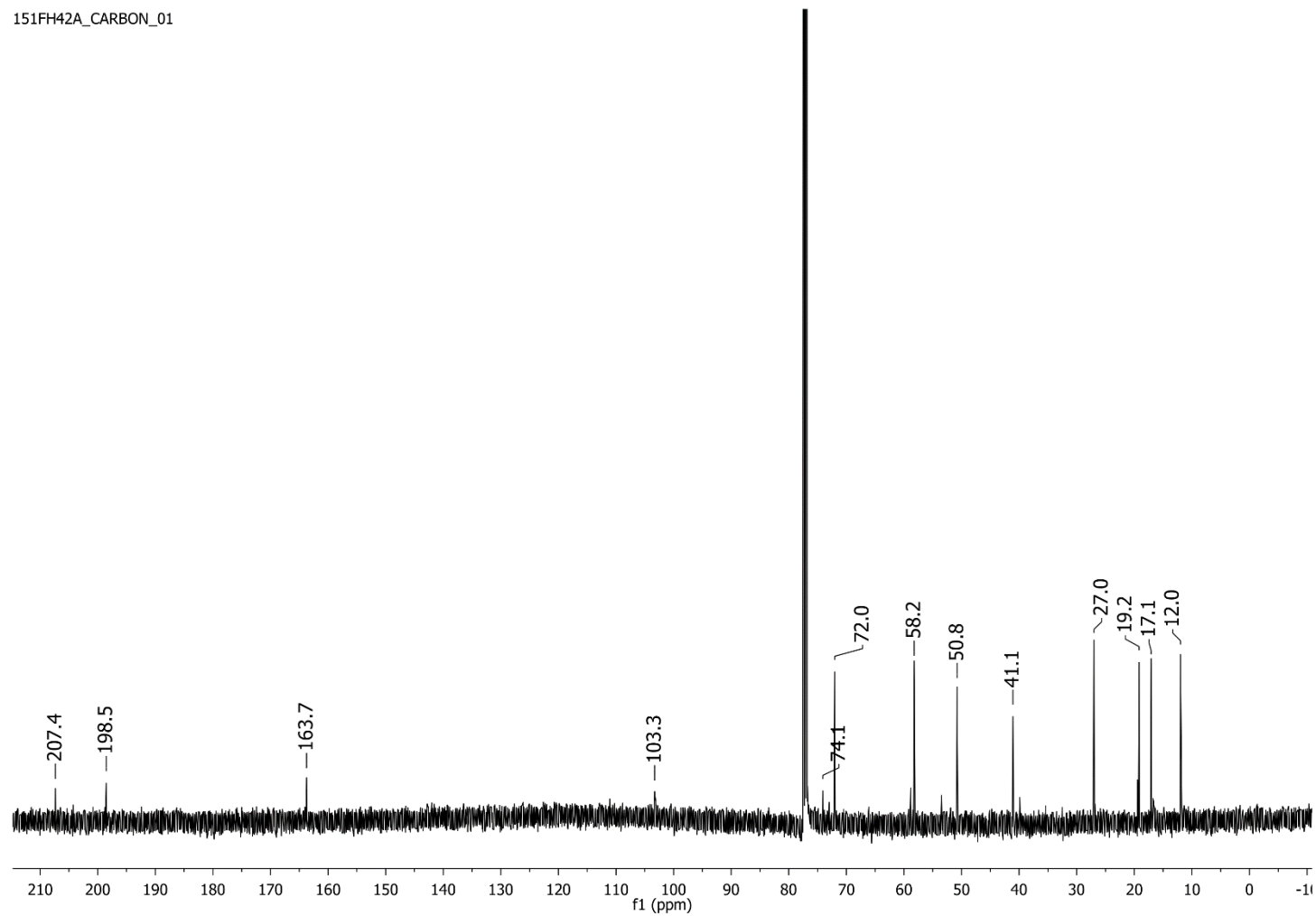
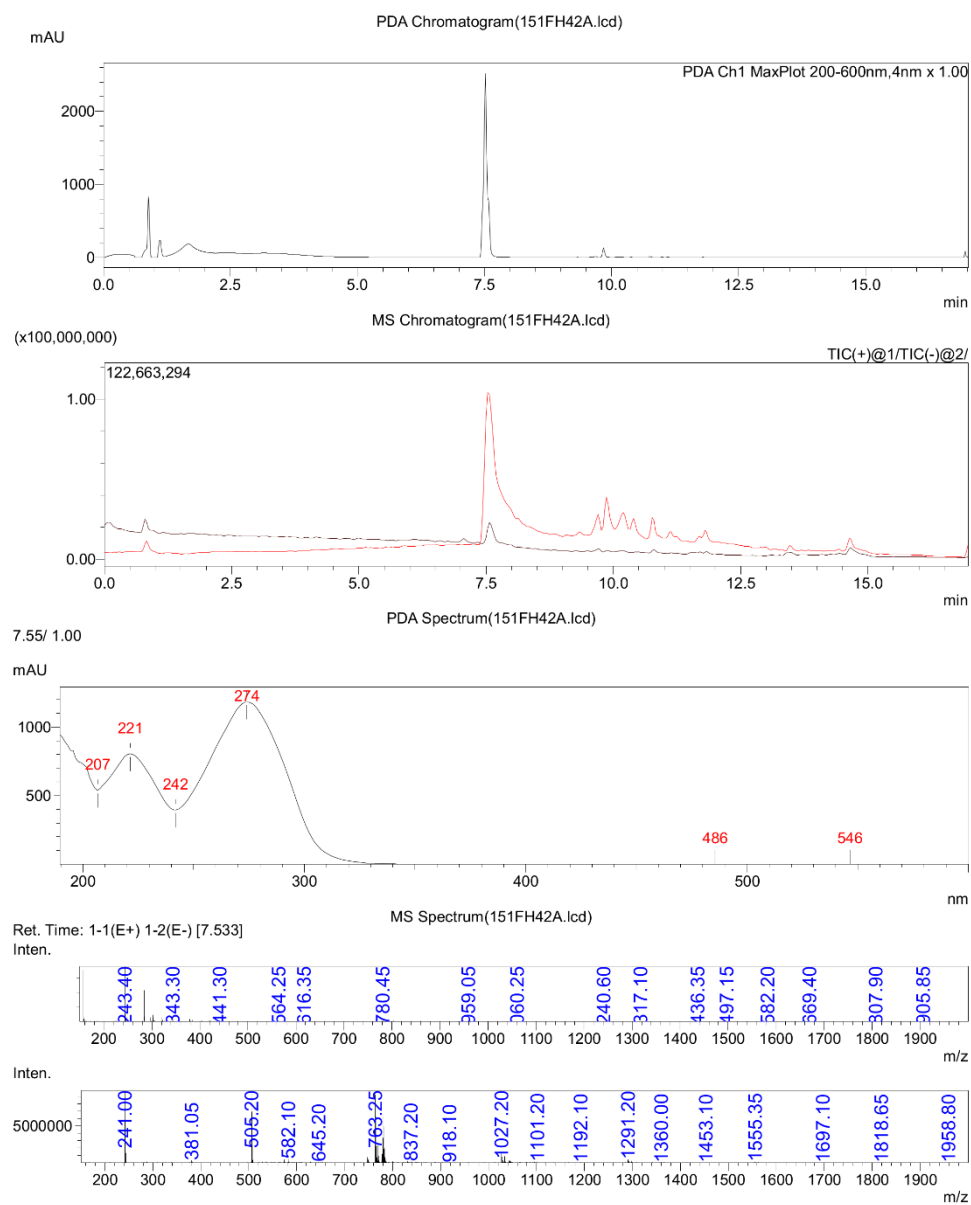
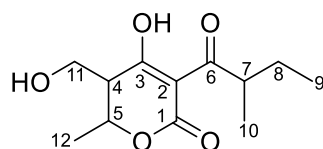


Figura 101. Perfil químico por UCLAE-DAD-ESI/MS: Fujikurina B**Figura 102.** Estrutura química da fujikurina B

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO: *Talaromyces verruculosus*

9.1. Isolamento dos compostos ativos de *Talaromyces verruculosus*:

Assim como os outros dois fungos estudados e descritos anteriormente, o extrato AcOEt preparado a partir do cultivo em escala ampliada de *T. verruculosus* em Cherrios, também foi submetido ao pré-fracionamento, realizado em duas etapas cromatográficas conforme descrito no POP do NPDG-OU: pré-fracionamento de extratos preparados em escala ampliada em Cherrios.

O extrato AcOEt 22A (62,5g) foi submetido à cromatografia líquida à vácuo (CLV), em coluna de sílica gel, eluída com solventes em ordem crescente de polaridades, hexano/DCM (1:1, v/v), DCM (100%), DCM/MeOH (10:1, v/v) e MeOH (100%), resultando em quatro subfrações.

A fração resultante da eluição do primeiro sistema de solvente (Hexano/DCM; 1:1, v/v), não foi investigada nesse estudo por conter majoritariamente compostos bastante apolares, além dos componentes graxos do Cherrios extraídos por esse sistema de solvente. Sendo estudadas as frações 22B-D, obtidas da eluição dos outros três eluentes empregados, respectivamente (Figura 103). Cromatogramas 104 e 105.

Figura 103. Cromatograma do fracionamento de 22A por métodos cromatográficos

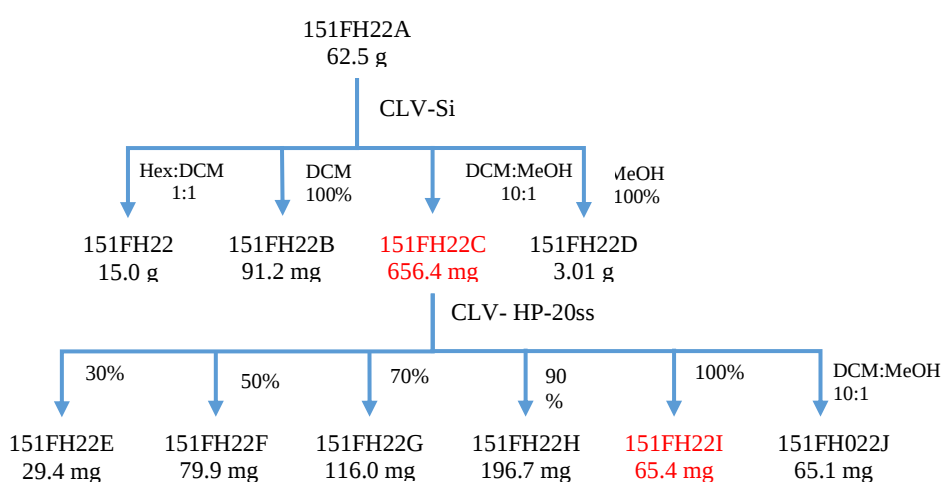


Figura 104. Cromatograma por UCLAE-DAD representando os perfis químicos das frações 22A-D obtidas do pré-fracionamento por CLV utilizando sílica como FE, [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 μ m; Solvente A: H₂O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min⁻¹; Max Plot λ 200-600 nm]

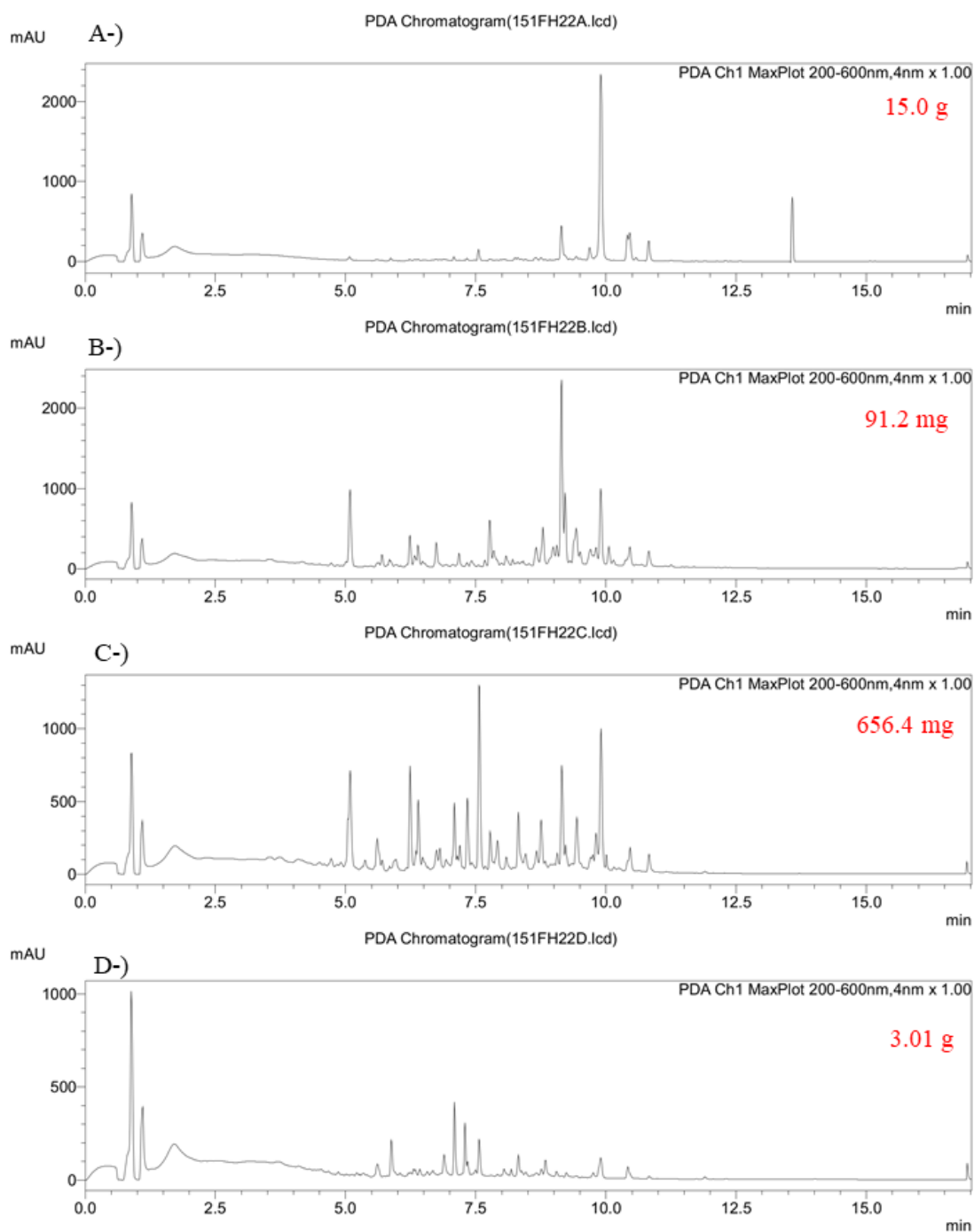
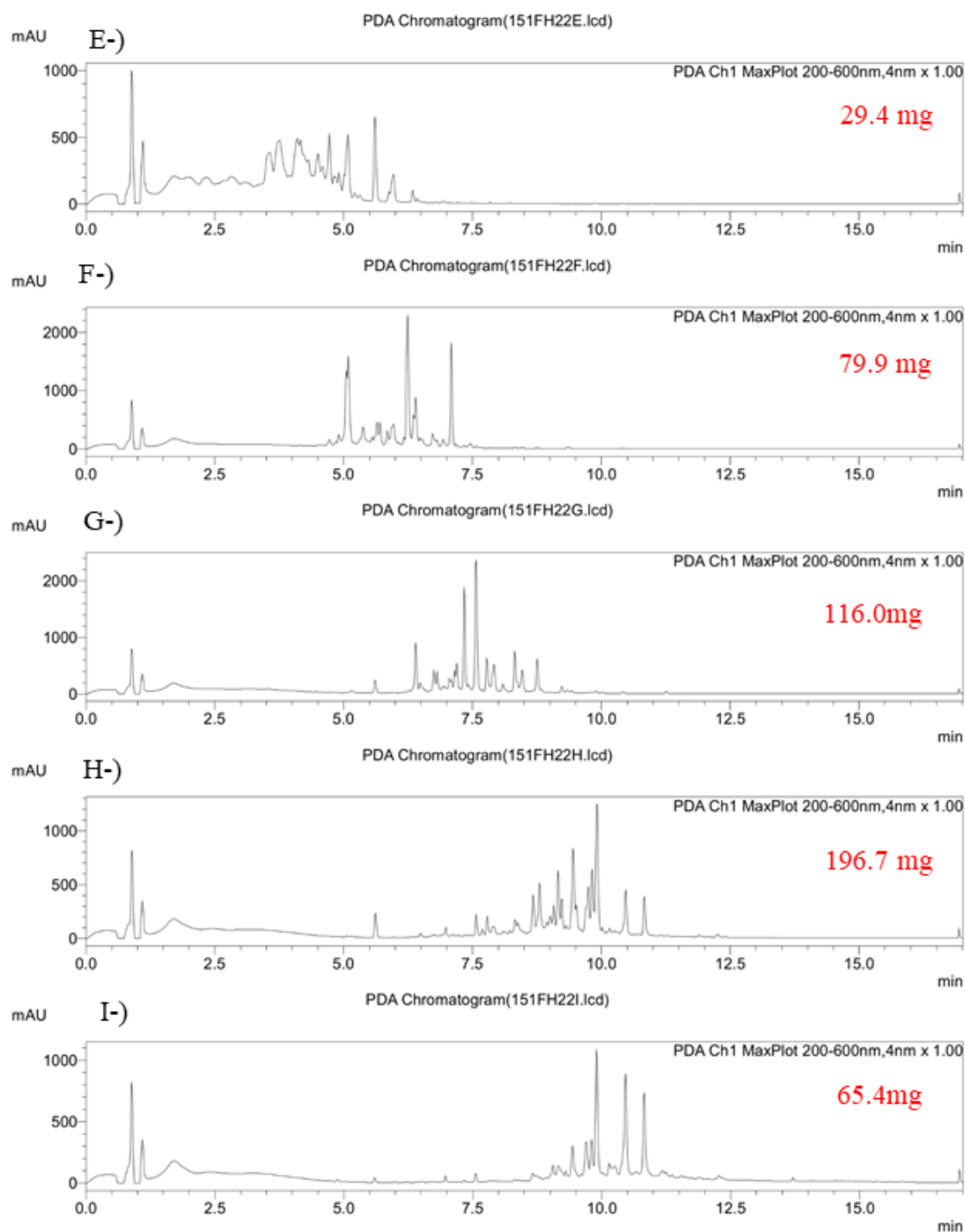


Figura 105. Cromatograma por UCLAE-DAD representando os perfis químicos das Frações 22E-I obtidas do pré-fracionamento por CLV utilizando HP20ss como FE, [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 μ m; Solvente A: H₂O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min⁻¹; Max Plot λ 200-600 nm]



9.2 Avaliação da atividade antituberculose de 22A-I

A avaliação da atividade antituberculose contra o *M. tuberculosis* (latente e replicante), assim como a investigação da citotoxicidade em linhagem de células Hep-G2 e J774 foram feitos em colaboração com o Prof. Dr. Kyle Rohde, pesquisador da University of Central Florida, Burnett School of Biomedical Sciences, Flórida, Estados Unidos.

Tabela 31 Avaliação da atividade anti-TB (22A-I)

Amostra	Dormente cdc-lux lumi 10/12/18				Mtb cdc-lux lumi 10/8/18			
	20 µg/ml	10 µg/ml	5 µg/ml	2.5 µg/ml	20 µg/ml	10 µg/ml	5 µg/ml	2.5 µg/ml
151FH22A	100,8	89,5	86,2	30,1	0,0	42,8	14,9	36,3
151FH22B	68,5	62,3	7,7	0,0	0,0	0,0	2,4	14,2
151FH22C	81,5	58,2	21,3	0,0	0,0	9,1	0,0	0,0
151FH22D	41,3	7,9	0,0	0,0	0,0	9,7	14,6	13,2
151FH22E	30,3	0,0	0,0	0,0	0,0	3,8	0,0	3,5
151FH22F	92,3	40,1	0,8	0,0	83,8	55,1	0,0	0,0
151FH22G	83,2	59,9	41,9	0,0	11,9	42,8	20,1	16,8
151FH22H	83,2	72,5	59,1	29,6	10,0	8,8	14,1	7,1
151FH22I	82,2	56,3	34,8	0,0	66,3	7,0	0,0	0,0

O extrato AcOEt preparado a partir do cultivo em escala ampliada de *T. verruculosus* (22A) apresentou valor de CIM de 5,0 µg/mL o *M. tuberculosis* na forma latente, esse resultado evidenciou que no Ex AcOEt existem compostos promissores com atividade antituberculose com seletividade para a forma latente do *M. tuberculosis*.

Além disto, as subfrações que apresentaram atividades promissoras contra o *M. tuberculosis* na forma latente foram 22C e as subfrações 22F-I, obtidas do fracionamento da 22C feito em CLV utilizando HP20ss como FE.

As subfrações 22F-I apresentaram CIM de 20,0 µg/mL, exibindo 80% de inibição do *M. tuberculosis*. Enquanto que as subfrações 22G-I exibiram 50% de inibição desse microrganismo, com valor de CIM de 10,0 µg/mL (Tabela 31).

9.3 Avaliação da citotoxicidade de 22A-I

O ensaio de citotoxicidade do extrato AcOEt (22A) preparado a partir do cultivo em escala ampliada em *Cherrios* de *T. verruculosis*, e também das frações resultantes do fracionamento em CLV em sílica (22B-D) e do subsequente fracionamento de 22C em CLV feito em resina de HP20ss foi determinado *in vitro* utilizando as linhagens celulares J774 (células de macrófagos) e HepG2 (células de carcinoma hepatocelular humano), a fim de investigar o potencial citotóxico das amostras que exibiram promissoras atividade antituberculose frente à cepa de *M. tuberculosis* latente e replicante.

Tabela 32. Avaliação da citotoxicidade (22A-I)

Amostra	% células sobreviventes	
	J774	HepG2
151FH22A	100,0	100,0
151FH22B	100,0	100,0
151FH22C	100,0	100,0
151FH22D	100,0	100,0
151FH22E	100,0	83,1
151FH22F	100,0	78,6
151FH22G	100,0	82,7
151FH22H	100,0	81,8
151FH22I	100,0	100,0

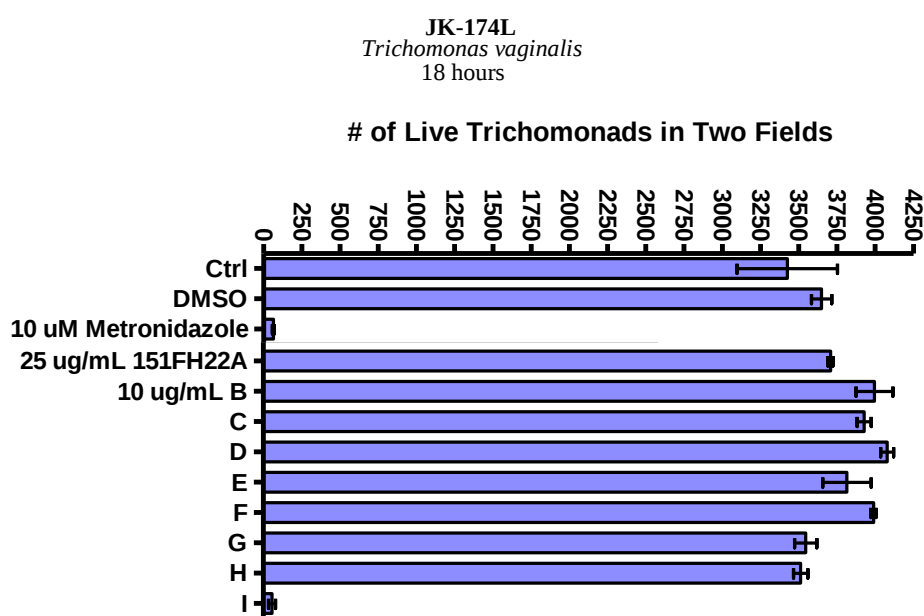
Observa-se que, de forma geral, as amostras 22A-I não apresentaram citotoxicidade para as células J744, além disso exibiram 100% de viabilidade para a célula J774 (Tabela 32). Sendo esse resultado relevante na avaliação da atividade anti- *M. tuberculosis* intracelular.

As amostras 22A-D e 22I não exibiram citotoxicidade em célula HepG2 (Tabela 32), todavia a porcentagem de sobrevivência foi reduzida em 80% para as amostras 22E-H. Como essa linhagem celular é usada como modelo para estudos de metabolismo de e citotoxicidade hepática, pode-se supor que, as amostras após a metabolização pelas enzimas hepáticas existentes nas células GepG2, os produtos gerados da metabolização resultaram em diminuição da viabilidade celular e, portanto, a citotoxicidade exibida nesse ensaio

9.4 Avaliação da atividade tricomonocida contra *T. vaginalis* de 22A-I

O extrato AcOEt (22A) e as frações obtidas do pré-fracionamento em CLV em sílica (22B-D) e em HP20ss (22E-I) foram avaliados na atividade frente ao parasita *Trichomonas vaginalis* e na determinação do potencial tricomonocida.

Figura 106. Avaliação da atividade contra *Trichomonas vaginalis* de 22A-I



A fração 22I foi a única amostra que apresentou contra *T. vaginalis* na concentração de 10 µg/mL (Figura 106). Portanto a fração 22I foi a biologicamente promissora para o parasita testado e foi escolhida para os estudos químicos e bioguiados até a obtenção dos metabólitos secundários ativos responsáveis pela atividade dessa fração.

9.5 Avaliação da atividade antifúngica e antibiofilme de 22A-I

O extrato AcOEt e as frações obtidas dos fracionamentos em CLV com as fases estacionárias sílica (22C-D) e com a resina HP20ss (22E-I) foram submetidos para a Dra Jianlan You para avaliação da atividade antifúngica frente aos fungos *A. fumigatus* e *C. albicans*, sendo também avaliadas no ensaio antibiofilme de *C. albicans*. Nenhuma das amostras (22A-I) foram capazes de inibir a viabilidade celular de *A. fumigatus* e de *C. albicans* na concentração de 20 μ M (CIM > 20 μ g/mL). Por outro lado, todas o extrato AcOEt (22A) e as subfrações 22H-I foram as mais promissoras em inibir a formação de biofilme de *C. albicans*, apresentando mais de 90% de inibição na concentração de 20 μ g/mL, Tabela 33.

Tabela 33. Avaliação da atividade antifúngica e antibiofilme de 22 A-I

Amostra/ % inibição	Crescimento (20 μ g/ml)		Biofilme (20 μ g/ml)
	<i>A. niger</i> A732	<i>C. albicans</i> SC5314	
22A	7,58	13,19	96,37
22B	13,25	0,80	16,21
22C	7,30	14,10	80,89
22D	6,38	23,69	40,63
22E	18,86	15,81	67,58
22F	7,55	24,22	68,84
22G	27,89	23,84	71,53
22H	8,01	11,68	90,84
22I	14,58	13,61	100,0

Como descrito anteriormente, a subfração 22I exibiu interessante atividade frente as cepas de *M. tuberculosis* latente, *T. vaginalis* e não apresentou atividade citotóxica para as linhagens celulares J774 e HepG2. Apresentando também atividade antibiofilme de *C. albicans*,

Como a fração 22I apresentou diversas atividades biológicas e foi escolhida para os estudos químicos de isolamento e determinação estrutural dos compostos responsáveis pelas atividades biológicas vistas nos diversos bioensaios realizados no estudo químico bio guiado de *T. verruculosis*.

9.6 Isolamento dos metabólitos ativos da subfração 22I por CLAE-DAD

A subfração 22I (100% MeOH) resultante do fracionamento por CLV feito usando resina Diaion HP20ss como FE foi purificada por CLAE-DAD semipreparativo (Kinetex F5 5 μ m, C18, 100 Å, 250 $\times$ 4.6 mm, modo gradiente 40-100% ACN:H₂O em 20 min, 4.0 mL/min) fornecendo o isolamento da substância 73D (2.6 mg), o Cromatograma de isolamento está apresentado na Figura 107 e os cromatogramas de 73A-G podem ser vistos na Figura 108.

Foram necessárias duas etapas de purificações para obter as substâncias isoladas 73E2 (1,5 mg) e 73F2 (1,3 mg) a partir de 73E e 73F, respectivamente. Ambas foram submetidas a uma segunda etapa de purificadas por CLAE-DAD semipreparativo em modo isocrático à vazão de 4.0 mL/min com 64% de ACN em H₂O + 0.1% AF (Kinetex F5 5 μ m, C18, 100 Å, 250 $\times$ 4.6 mm), como pode ser visto no cromatograma ilustrado na Figura 109.

Figura 107. Isolamento das substâncias 73D, 73E2 e 73F2 por CLAE-DAD

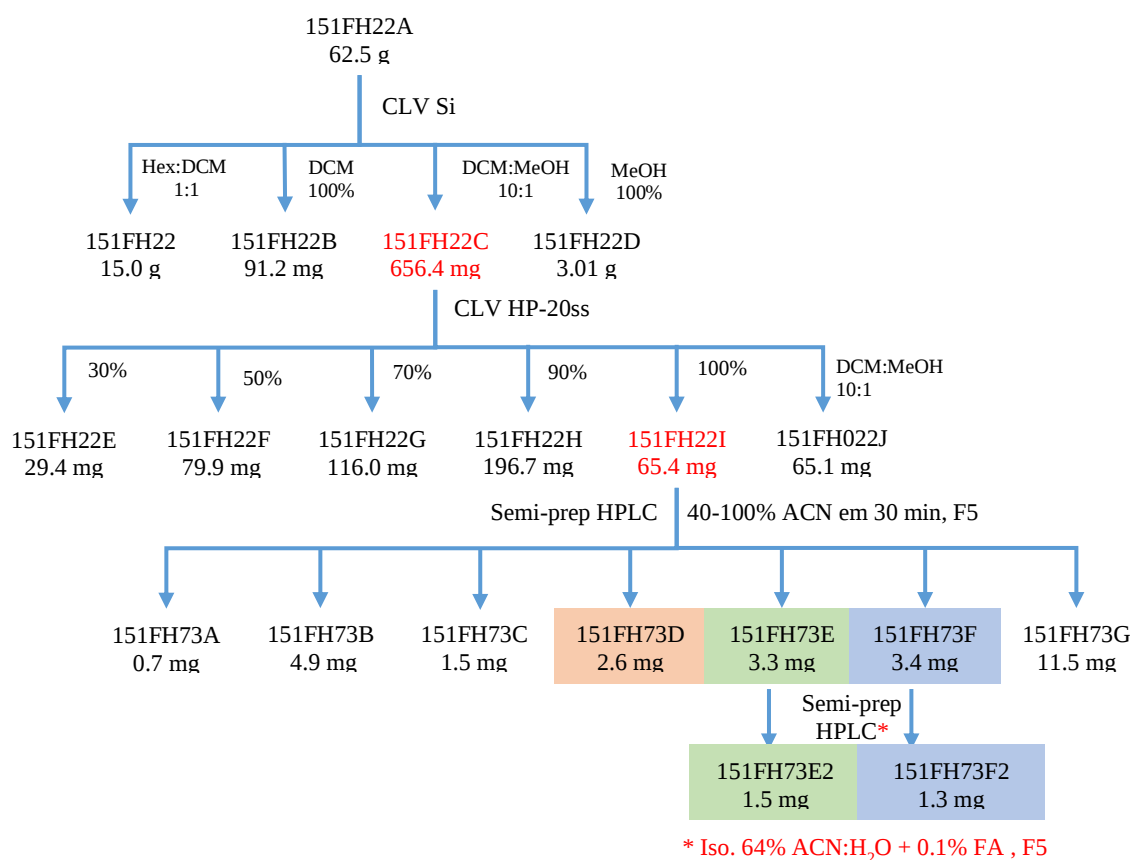
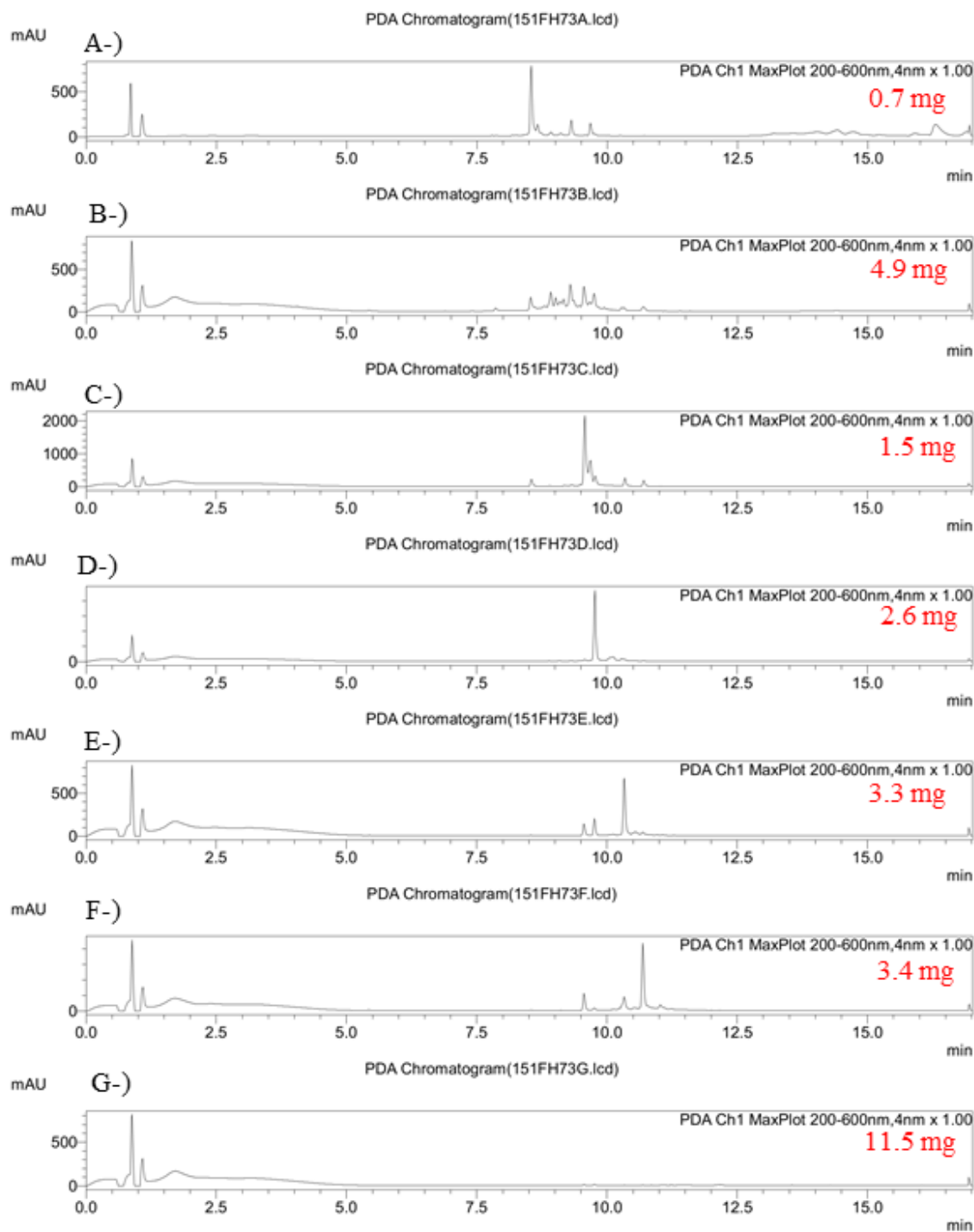


Figura 108. Cromatograma por UCLAE-DAD representando os perfis das Frações 73A-G obtidas por CLAE-DAD, [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 μ m; Solvente A: H₂O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min⁻¹; Max Plot λ 200-600 nm]



9.7 Atividades anti-*Trichomonas vaginalis* e antifúngica: 73A-G

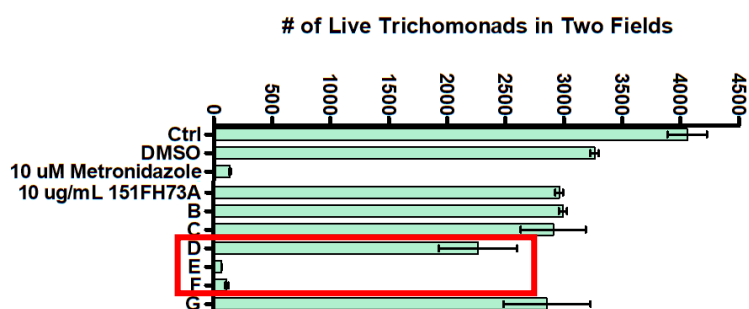
O fracionamento por CLAE-DAD da fração 22I resultou nas subfrações 73A-G que tiveram suas atividades biológicas avaliadas nos ensaios antifúngico frente aos fungos *A. fumigatus* e *C. albicans*, sendo também avaliadas no ensaio antibiofilme de *C. albicans*. Nenhuma das sete frações testadas (A-G) foram capazes de inibir a viabilidade celular de *A. fumigatus* e *C. albicans* na concentração de 20 μ M (CIM > 20 μ g/mL). Por outro lado, todas as frações (73A-G) apresentaram atividade no ensaio de inibição de biofilme com valores de CIM entre 20 e 10 μ g/mL, Tabela 34.

Tabela 34. Atividades antifúngica e antibiofilme de 73A-G

CIM80 μ g/ml	<i>C. albicans</i>		<i>A. fumigatus</i>
	crescimento	biofilme	Crescimento
73A	>20	>20	20
73B	>20	>20	10
73C	>20	>20	20
73D	>20	>20	10
73E	>20	>20	20
73F	>20	>20	10
73G	>20	>20	10

Além disso, as subfrações 73 E-F tiveram atividade contra *Trichomonas vaginalis* (Figura 109). Por apresentarem atividades antibiofilme e anti- *T. vaginalis*, as subfrações 73D-F foram escolhidas para o estudo químico no isolamento e determinação estrutural dos metabólitos ativos.

Figura 109. Avaliação da atividade anti- *Trichomonas vaginalis* de 73A-G



9.8 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

Os dados de RMN de ^1H dos isolados 73D, 73E1 e 73F2 (Figuras 113, 114 e 115, respectivamente), foram comparados com os dados descritos no trabalho de Shibata et al (2015) e Zang et al., (2016), sendo então confirmadas suas estruturas químicas como idênticos à Duclauxina, Bacillisporina F e 1-*epi*-Bacillisporina F (Figura 103). Além disso, a determinação da configuração absoluta para 73D-F2 foi feita pelas análises dos espectros obtidos por ECD (Figura 95) e pela comparação dos dados experimentais com os da literatura, (SHIBATA et al., 1965; ZANG et al., 2016). Os valores da rotação óptica são mostrados na Tabela 36. Cromatogramas e espectros, Figuras 111 a 112, respectivos 73D-F2.

9.8.1. 151FH73D:

Duclauxina foi isolada como um sólido branco, com $[\alpha]_D^{30}$ de +20.0 (MeOH, *c* 0.5). A fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ foi deduzida do íon protonado em m/z 547.12 $[\text{M} + \text{H}]^+$ no ESIMS. Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 74D em CDCl_3 estão apresentados na Tabela 35.

Análise dos dados de RMN de ^1H (Figure 112) do composto 72D possibilitou identificar as diferenças estruturais quando comparado aos compostos 72E-F. No anel F do composto 72D há uma dupla ligação entre C-11 e C-12. Uma segunda diferença é vista no composto 72D é a presença adicional de uma carbonila de cetona em C-9.

Duclauxinas são uma família de produtos naturais, e são oxafenalenonas diméricas com diversas atividades biológicas (GAO et al., 2018). As diferentes variações estruturais entre duclauxinas são decorrentes dos diferentes monômeros oxafenalenonas e também da conectividade dessas unidades (GAO et al., 2018).

A duclauxina foi isolada pela primeira vez do fungo *Penicillium duclauxi* (SHIBATA et al., 1965). Sendo produzida também por *P. herquei* (ATCC 34665), um agente antitumoral (BRYANT; CUTLER; JACYNO, 1993). Existem publicados mais de 10 trabalhos reportando análogos da família produzidos por diversas espécies de *Penicillium* (CAO et al., 2015).

Talaromyces é outro gênero importante produtor de duclauxinas (YILMAZ et al., 2016). O composto é conhecido por sua ação anticancerígena (BRYANT et al., 1993; STIERLE et al., 2006; CAO et al., 2015).

9.8.2 151FH73E2:

Bacillisporina F foi isolada como um sólido cristalino incolor, com $[\alpha]_D^{30}$ de +66.0 (MeOH, *c* 1.0). A fórmula molecular $C_{29}H_{22}O_{11}$ foi deduzida do íon protonado em *m/z* 547.1255 $[M + H]^+$ no ESIMS. Os dados de RMN de 1H e ^{13}C de 74E em $CDCl_3$ (Tabela 35) indicou três grupos metila, um grupo metoxila em δ_H 3.47 (3H, s), um metileno, três metinas, outras duas oxigenadas em δ_H 6.99 (1H, s, H-1). The espectro de RMN de ^{13}C evidenciou 18 carbonos quaternários sp^2 , incluindo sete oxigenados sp^2 assim como um carbono quaternário. Esses dados relevaram que a estrutura de 74E é bastante similar da bacillisporina A, exceto pela presença de um grupo metoxila adicional para a estrutura 74E (ZANG et al., 2016). A correlação observada no HMBC de OCH_3 para C-1 evidenciou a posição da metoxila ser no C-1 (Figure 116).

9.8.3 51FH73F2:

1-*epi*-bacillisporina F (74F) foi também isolada como um sólido cristalino incolor, com $[\alpha]_D^{30}$ de +26.0 (MeOH, *c* 0.5). A fórmula molecular $C_{29}H_{22}O_{11}$ foi deduzida do íon protonado em *m/z* 547.1255 $[M + H]^+$ no ESIMS. O dado de RMN de 1H revelou que as diferenças entre os compostos 74E e 74F foram no deslocamento químico dos grupos metoxilas em $CDCl_3$ (δ_H 3.80 para 74F verso δ_H 3.74 para 74E) assim como o metina H-1 (δ_H 6.57 para 74F verso δ_H 6.55 para 74E), sugerindo que 74E e 74F são epímeros em C-1. (ZANG et al., 2016)

Tabela 35. Dados de RMN de ^1H dos compostos 73D-F isolados de *T. verruculosus* e comparação com os da literatura

Posição	$^1\text{Duclauxina}$	151FH73D (CDCl_3) 500MHz	$^2\text{Bacillisporina F}$ (CD_3OD) 500MHz	151FH73E (CDCl_3) 500MHz	$^2\text{1-epi-Bacillisporina F}$ (CD_3OD)	151FH73F (CDCl_3) 500MHz
	$^1\text{H}, \delta, m (J \text{ in Hz})$	$^1\text{H}, \delta, m (J \text{ in Hz})$	$^1\text{H}, \delta, m (J \text{ in Hz})$	$^1\text{H}, \delta, m (J \text{ in Hz})$	$^1\text{H}, \delta, m (J \text{ in Hz})$	$^1\text{H}, \delta, m (J \text{ in Hz})$
1	5,10, <i>d</i> (12,0) 4,83, <i>d</i> (12,0)	5,08, <i>d</i> (12,5) 4,79, <i>d</i> (12,5)	5,11, <i>d</i> (12,4) 5,03, <i>d</i> (12,4)	5,05, <i>d</i> (12,0) 4,95, <i>d</i> (12,0)	5,19, <i>d</i> (12,5) 5,07, <i>d</i> (12,5)	5,09, <i>d</i> (12,0) 4,96, <i>d</i> (12,0)
4-OH	11,79, <i>s</i>	11,70, <i>s</i>	-	11,59	-	11,60, <i>s</i>
5	6,85, <i>s</i>	6,91, <i>s</i>	6,89, <i>s</i>	6,83, <i>s</i>	6,80, <i>s</i>	6,82, <i>s</i>
6	2,75, <i>s</i>	2,74, <i>s</i>	2,50, <i>s</i>	2,60, <i>s</i>	2,55, <i>s</i>	2,59, <i>s</i>
8	4,17, <i>s</i>	4,14, <i>s</i>	5,01, <i>s</i>	5,06, <i>s</i>	5,14, <i>s</i>	5,07, <i>s</i>
9	5,22, <i>s</i>	5,20, <i>s</i>	5,80, <i>s</i>	5,79, <i>s</i>	5,84, <i>s</i>	5,80, <i>s</i>
9-CH ₃	2,12, <i>s</i>	2,12, <i>s</i>	1,97, <i>s</i>	2,04, <i>s</i>	2,05, <i>s</i>	2,05, <i>s</i>
1'	7,77, <i>s</i>	7,74, <i>s</i>	6,55, <i>s</i>	6,58, <i>s</i>	6,57, <i>s</i>	6,50, <i>s</i>
1'-OMe	-	-	3,58, <i>s</i>	3,74, <i>s</i>	3,66, <i>s</i>	3,80, <i>s</i>
4'	10,75, <i>s</i>	10,67, <i>s</i>	-	11,88, <i>s</i>	-	11,87, <i>s</i>
5'	6,95, <i>s</i>	6,91, <i>s</i>	6,99, <i>s</i>	6,95, <i>s</i>	6,94, <i>s</i>	6,94, <i>s</i>
6'	2,21, <i>s</i>	2,21, <i>s</i>	2,95, <i>s</i>	3,01, <i>s</i>	3,01, <i>s</i>	3,00, <i>s</i>
7'-OMe	3,00, <i>s</i>	2,97, <i>s</i>	-	-	-	-
8'	4,0, <i>s</i>	3,98, <i>s</i>	-	-	-	-

¹Shibata, S. et al., *Tetrahedron Lett.*, **1965**, 6, 1287.²Zang, Yi, et al., *J. Nat. Prod.* **2016**, 79, 2991.

Figura 110. Cromatograma e espectro por UCLAE-DAD-ESI/MS da substância isolada 73D por CLAE-DAD semipreparativo [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 μ m; Solvente A: H₂O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min⁻¹; Max Plot λ 200-600].

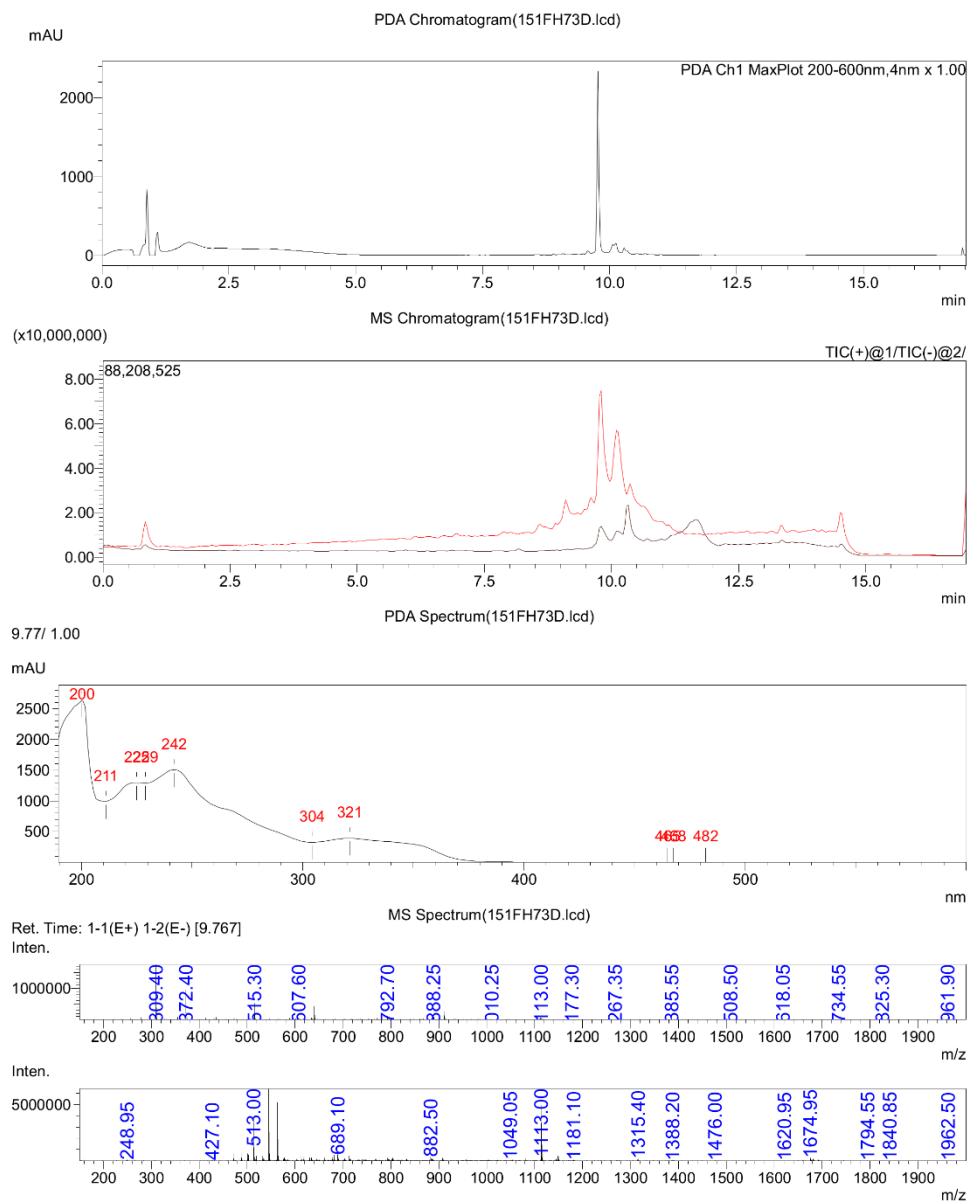


Figura 111. Cromatograma e espectro por UCLAE-DAD-ESI/MS da substância isolada 73E2 por CLAE-DAD semipreparativo [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 μm ; Solvente A: H_2O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min^{-1} ; Max Plot λ 200-600

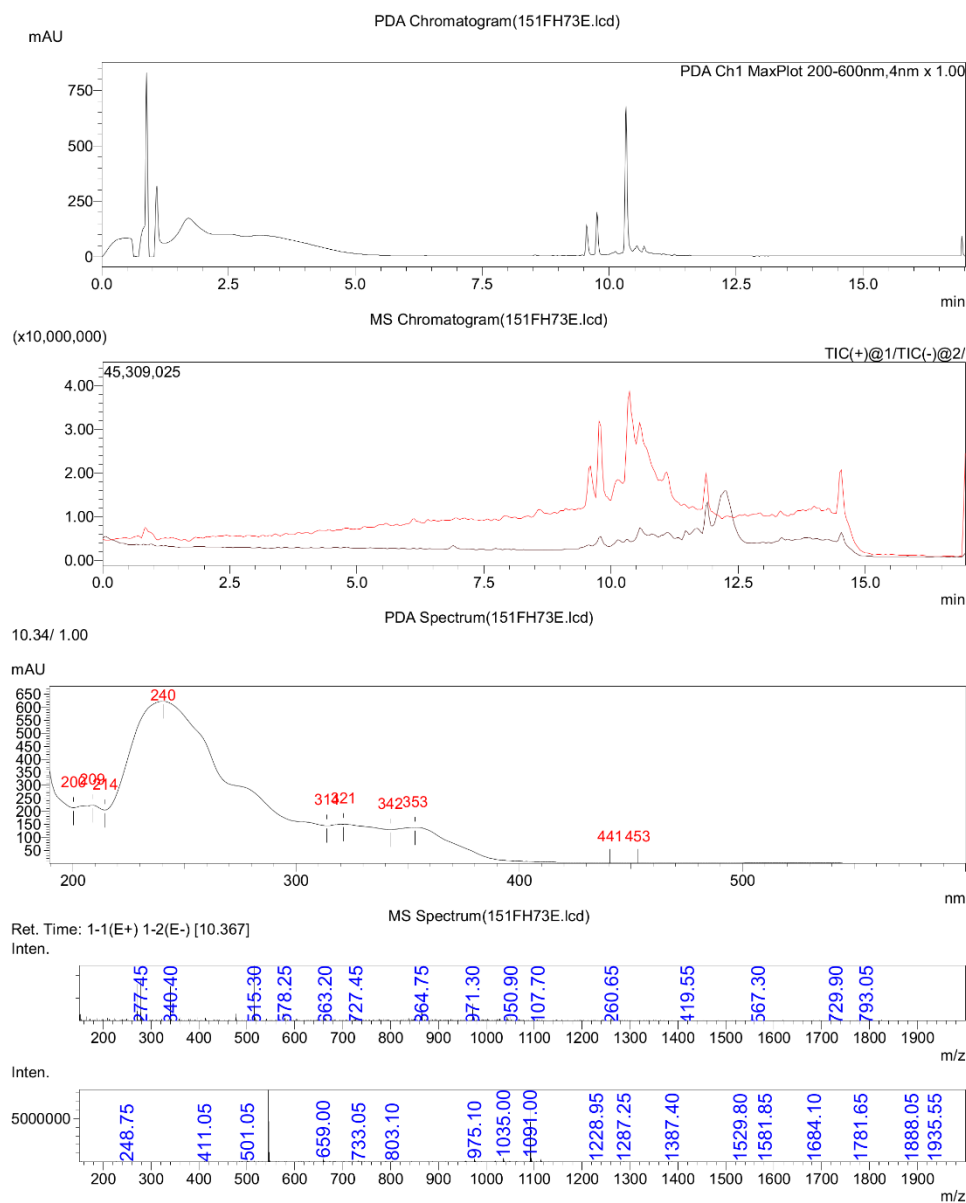


Figura 112. Cromatograma por UCLAE-DAD-ESI/MS da substância isolada 73F2 por CLAE-DAD semipreparativo [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 μ m; Solvente A: H₂O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min⁻¹; Max Plot λ 200-600

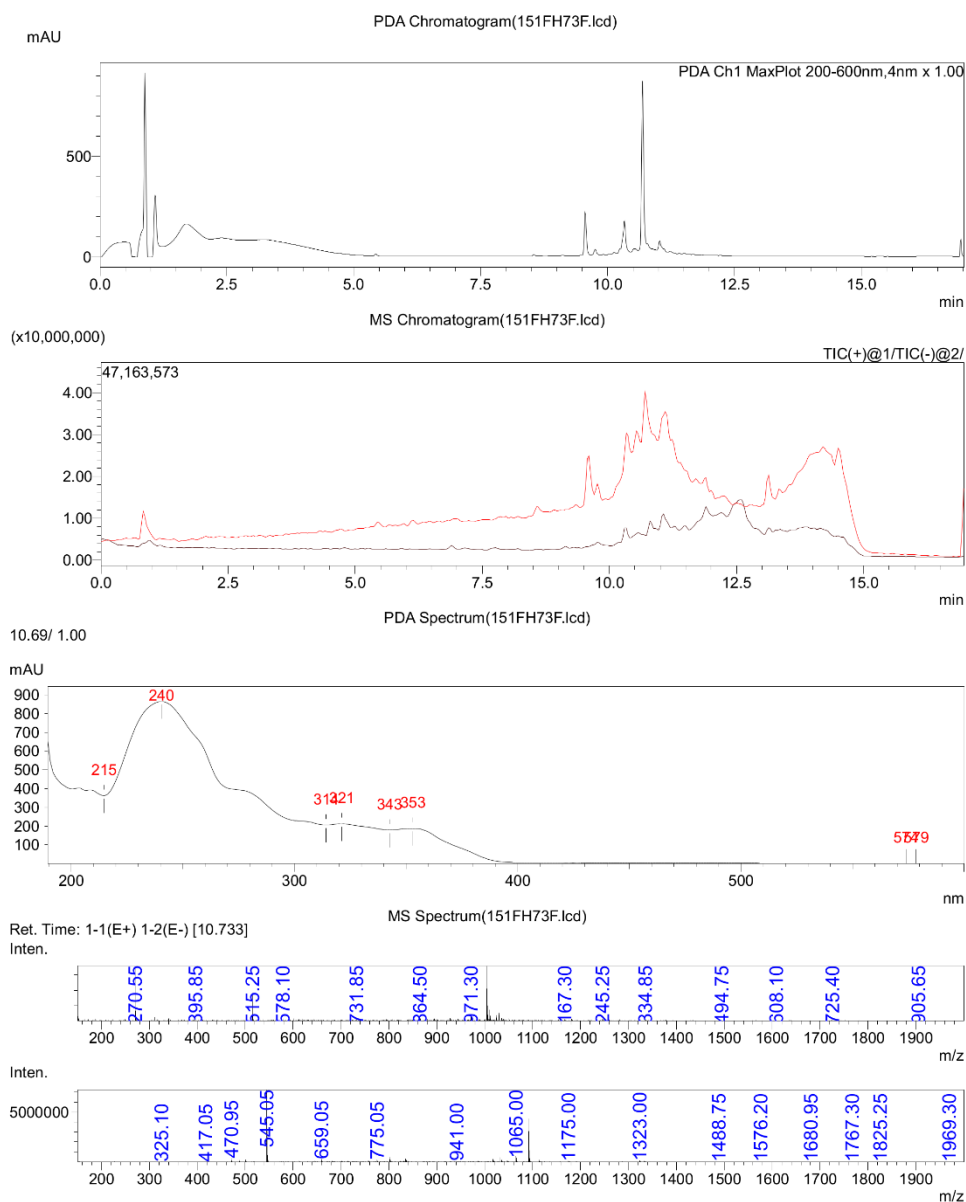


Figura 113. Dado de RMN de ^1H (500MHz) em CDCl_3 da duclauxina isolada de *Talaromyces verruculosus*

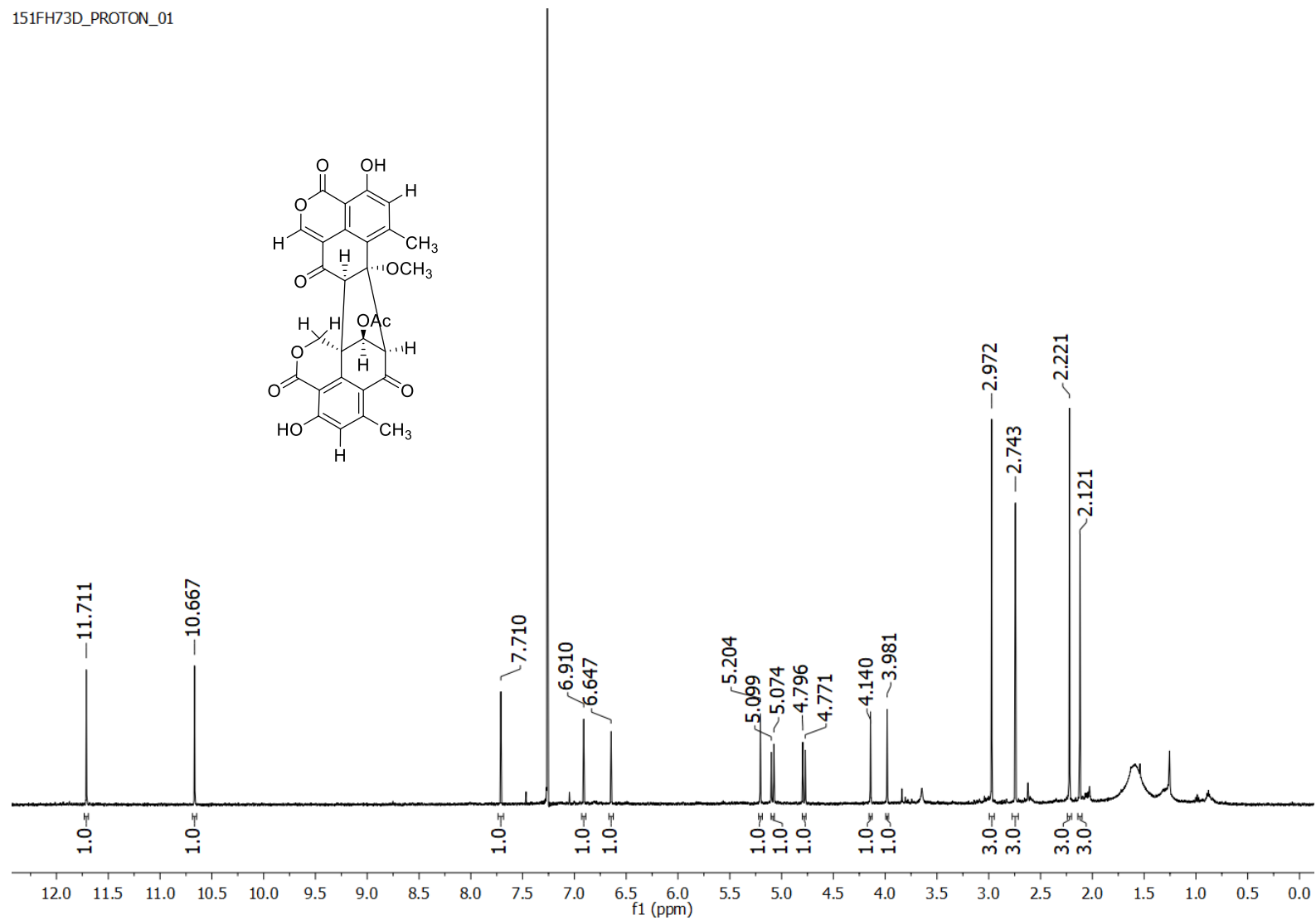


Figura 114. Dado de RMN de ^1H (500MHz) em CDCl_3 da bacillisporina F isolada de *Talaromyces verruculosus*

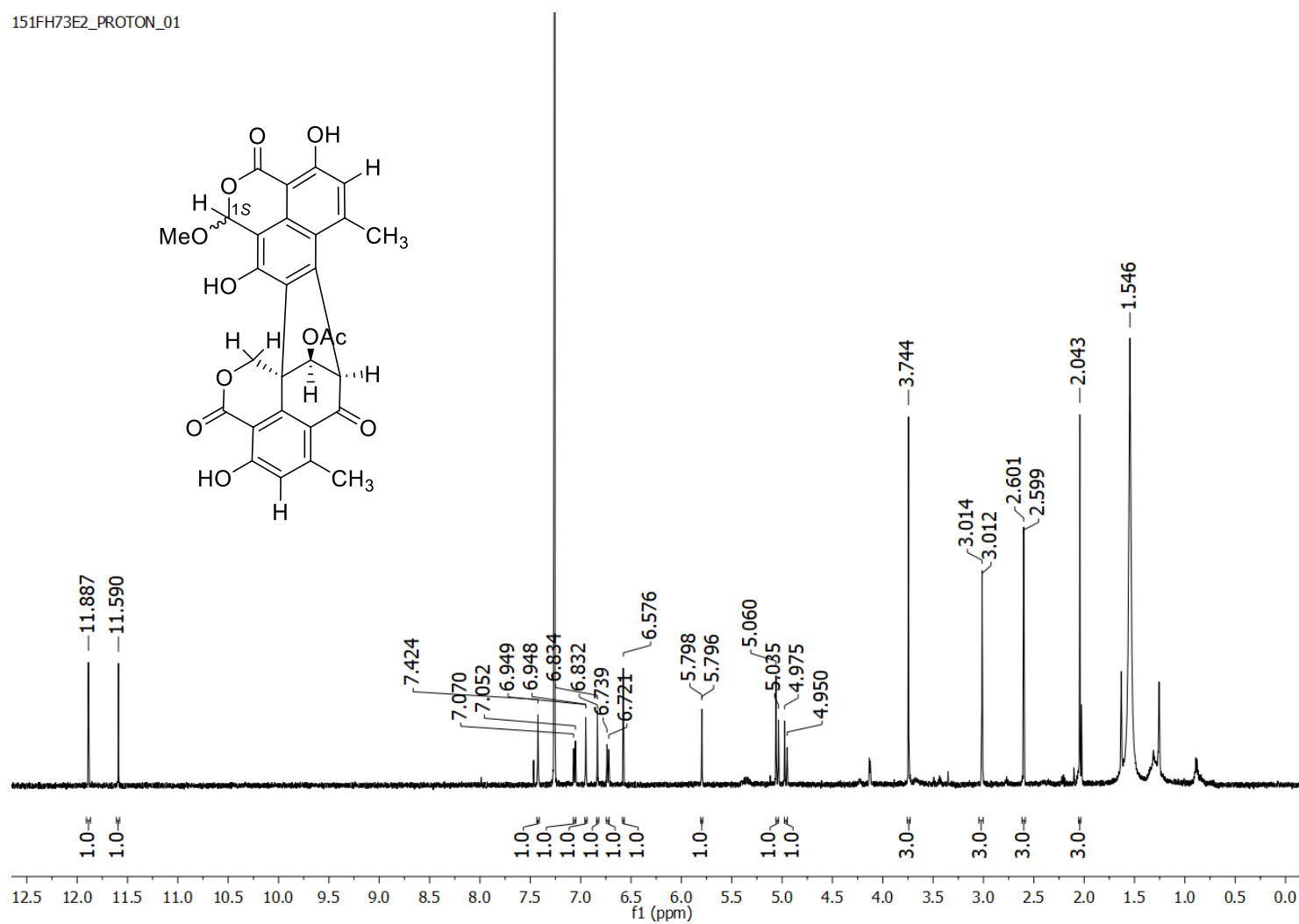
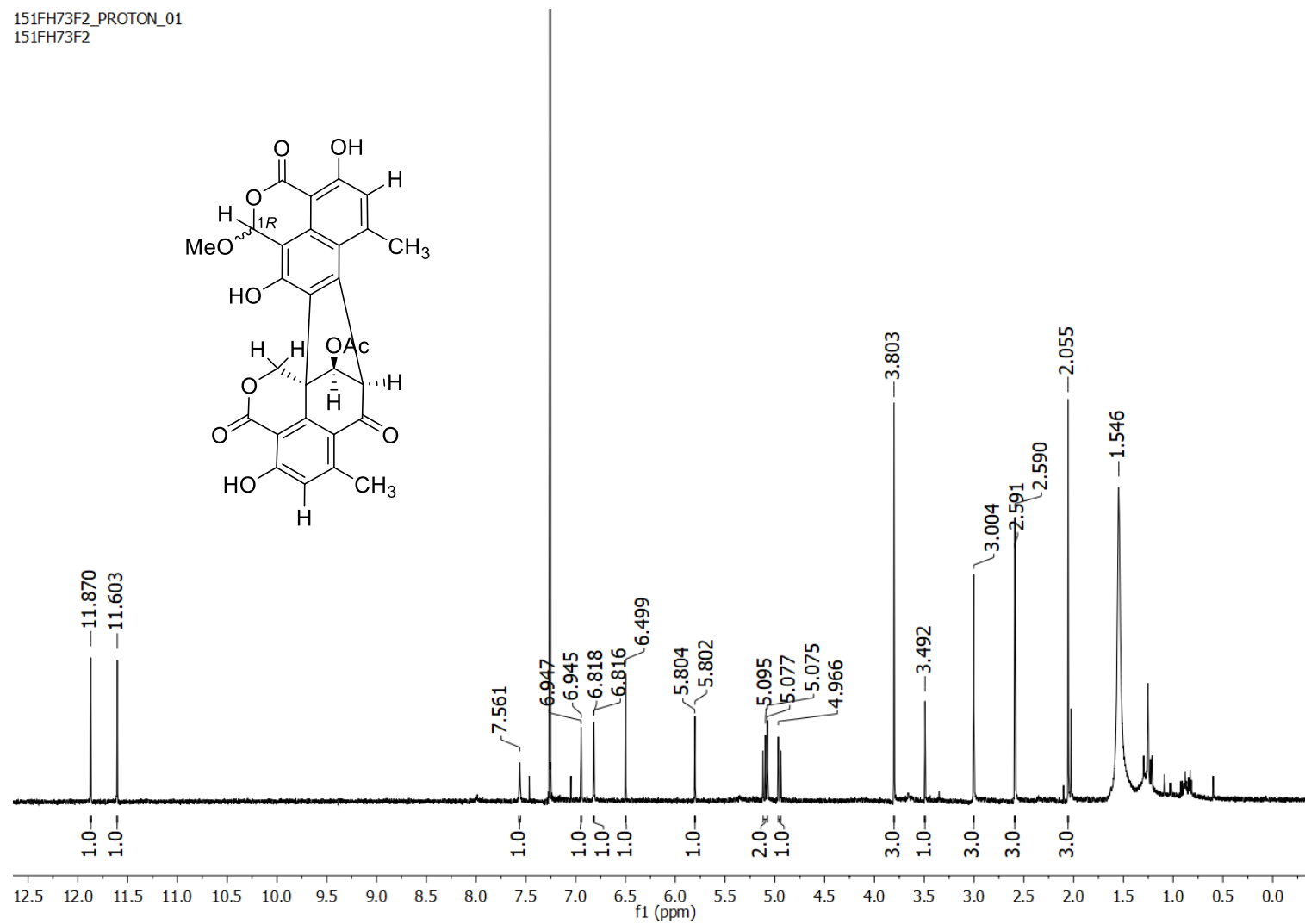


Figura 115. Dado de RMN de ^1H NMR (500MHz) em CDCl_3 da 1-*epi*-bacillisporina F isolada de *T. verruculosus*



9.7 Avaliação da atividade antibiofilme de 73D, 73E2 e 73F2:

As substâncias isoladas duclauxina (73D), bacillisporina F (73E2) e 1-*epi*-bacillisporina (73F2) foram testadas quanto à sua capacidade de inibir a formação de biofilme de *C. albicans*.

Como descrito na página 209 e apresentado na Tabela 35, nenhuma dessas três substâncias exibiram atividade antifúngica frente as cepas de *A. fumigatus* e *C. albicans* na concentração de 20 μ M (CIM > 20 μ g/mL). Por outro lado, todas as três substâncias apresentaram atividade biológica em inibir a formação do biofilme de *C. albicans* com valores de CIM entre 20 e 10 μ g/mL (Tabela 34, página 209).

Nenhum dos três metabólitos isolados de *T. verruculosus* inibiu a viabilidade celular de *C. albicans* em concentrações de até 20 μ M. Por outro lado, os três compostos apresentaram atividade no ensaio de inibição de biofilme com valores de IC₅₀ de 15,8 $\pm$ 0,8 μ M para a duclauxina, IC₅₀ de 1,4 $\pm$ 0,2 μ M para a bacillisporina F, IC₅₀ de 20,13 $\pm$ 0,8 μ M, e IC₅₀ de 9,53 $\pm$ 0,8 μ M para a 1-*epi*-bacillisporina F (73F2) (Figura 119, Tabela 36).

Tabela 36. Valores de IC₅₀ de 73E2-F2 contra o biofilme de *C. albicans* SC5314

Concentração μ M	% de inibição		
	73D	73E2	73F2
40	110,00	112,11	111,51
20	91,67	60,69	112,26
10	28,03	2,84	74,14
5	24,55	26,91	19,43
2,5	2,39	2,39	18,39

O efeito na formação de hifas de *C. albicans* pela duclauxina foi avaliado por microscopia de contraste de fase. A formação de hifas é um passo importante na virulência de *C. albicans* que marca a transição da colonização inicial da superfície para a crescimento invasivo na matriz subjacente. A duclauxina não foi capaz de inibir a formação de hifas de *C. albicans* (Figura 118).

Figura 118. Efeito de diferentes concentrações de 73D em hifas de *C. albicans* SC5314

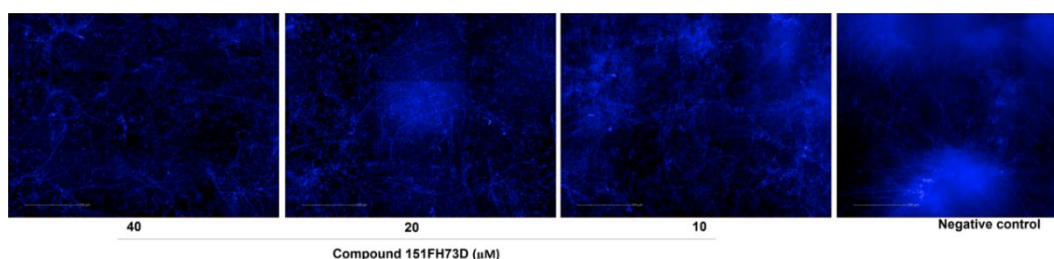
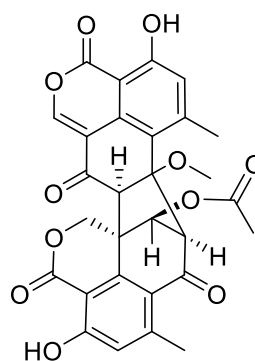
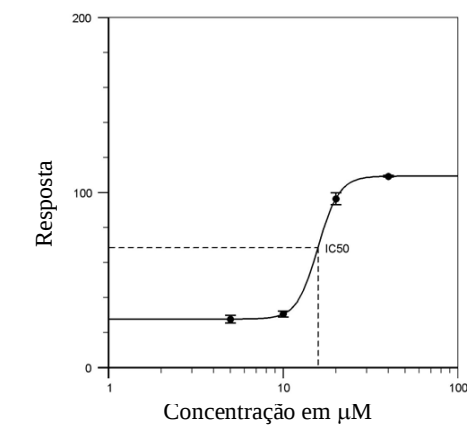
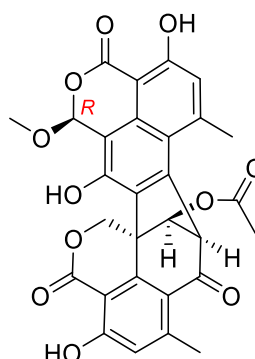
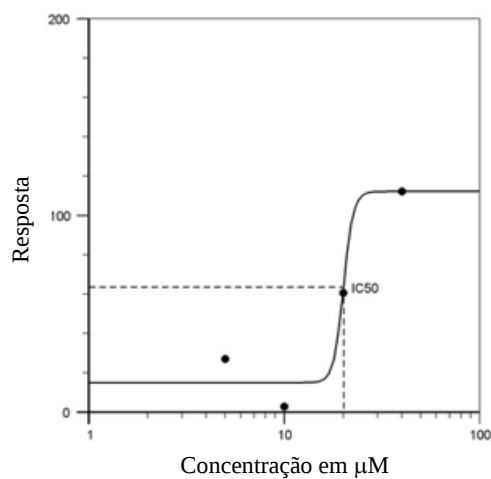


Figura 119. Curvas Concentração-Resposta para determinação dos valores de IC_{50} dos compostos 73D, E2-F2 contra o biofilme de *C. albicans* SC5314



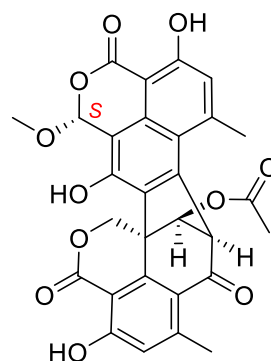
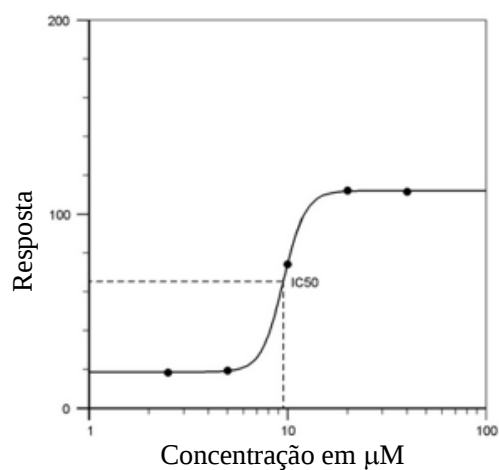
Duclauxina (73D)

IC_{50}
 $15,8 \pm 0,8 \mu M$



Bacillisporina F (73E2)

IC_{50}
 $20,13 \mu M$



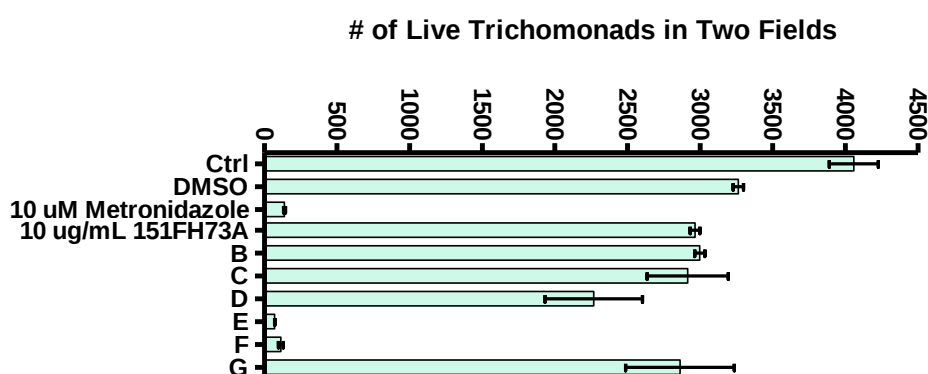
1-*epi*-Bacillisporina F (73F2)

IC_{50}
 $9,53 \mu M$

9.11 Avaliação da atividade anti-*Trichomonas vaginalis* dos compostos (73D-E2)

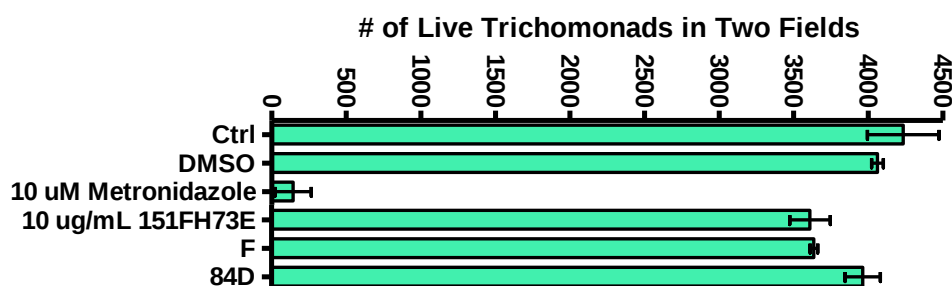
A duclauxina (73D) não inibiu o crescimento do parasita *T. vaginalis* em 10 $\mu\text{g/mL}$. Todavia, os compostos 73E2 (Bacillisporina F) e 73F2 (1-*epi*-Bacillisporina F) apresentaram atividade anti- *T. vaginalis* na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 120). Metronidazol em 10 μM foi utilizado como controle positivo, DMSO foi o solvente utilizado para preparar as amostras foi testado como controle também, Figura 121.

Figura 120. Atividade anti-*Trichomonas vaginalis* de 73D-F



Novamente as substâncias isoladas duclauxina (73D), Bacillisporina F (73E2) e 1-*epi*-Bacillisporina F (73F2) foram testadas no ensaio anti-*T-vaginalis* na concentração de 10 μM , mesma concentração do controle positivo utilizado no ensaio biológico, que foi o metronidazol (Figura 121). Na concentração de 10 μM para os três compostos avaliados no ensaio antiparasitário, não foram capazes de inibirem o crescimento de *T. vaginalis* e, portanto, não foram interessantes para prosseguirem nos estudos químicos e biológicos.

Figura 121. Atividade anti-*Trichomonas vaginalis* de 84D (10 μM)



9.12 Isolamento dos metabólitos ativos da 81D por CLAE-DAD

A subfração 22G (70% MeOH) obtida do fracionamento em CLV em HP20ss foi submetida ao isolamento por CLAE-DAD semi-preparativo (Kinetex F5 5 μ m, C18, 100 Å, 250 $\times$ 4.6 mm, modo isocrático 40% ACN em H₂O, 4.0 mL/min), possibilitou o isolamento do composto 84D (1.4 mg). O Cromatograma e o perfil químico de 81A-H estão apresentados nas Figuras 122 e 123, respectivamente. Atividade anti-*Trichomonas vaginalis* de 84D (Figura 123)

Figura 122. Isolamento da 84D por métodos cromatográficos

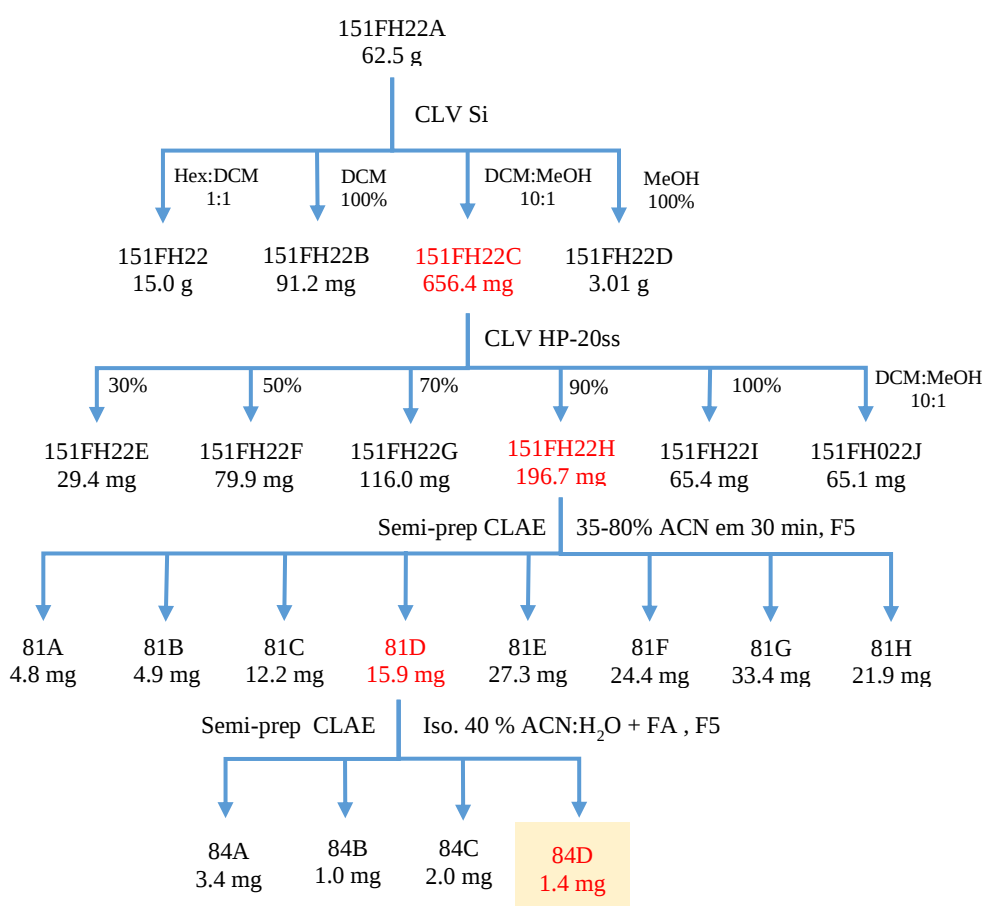
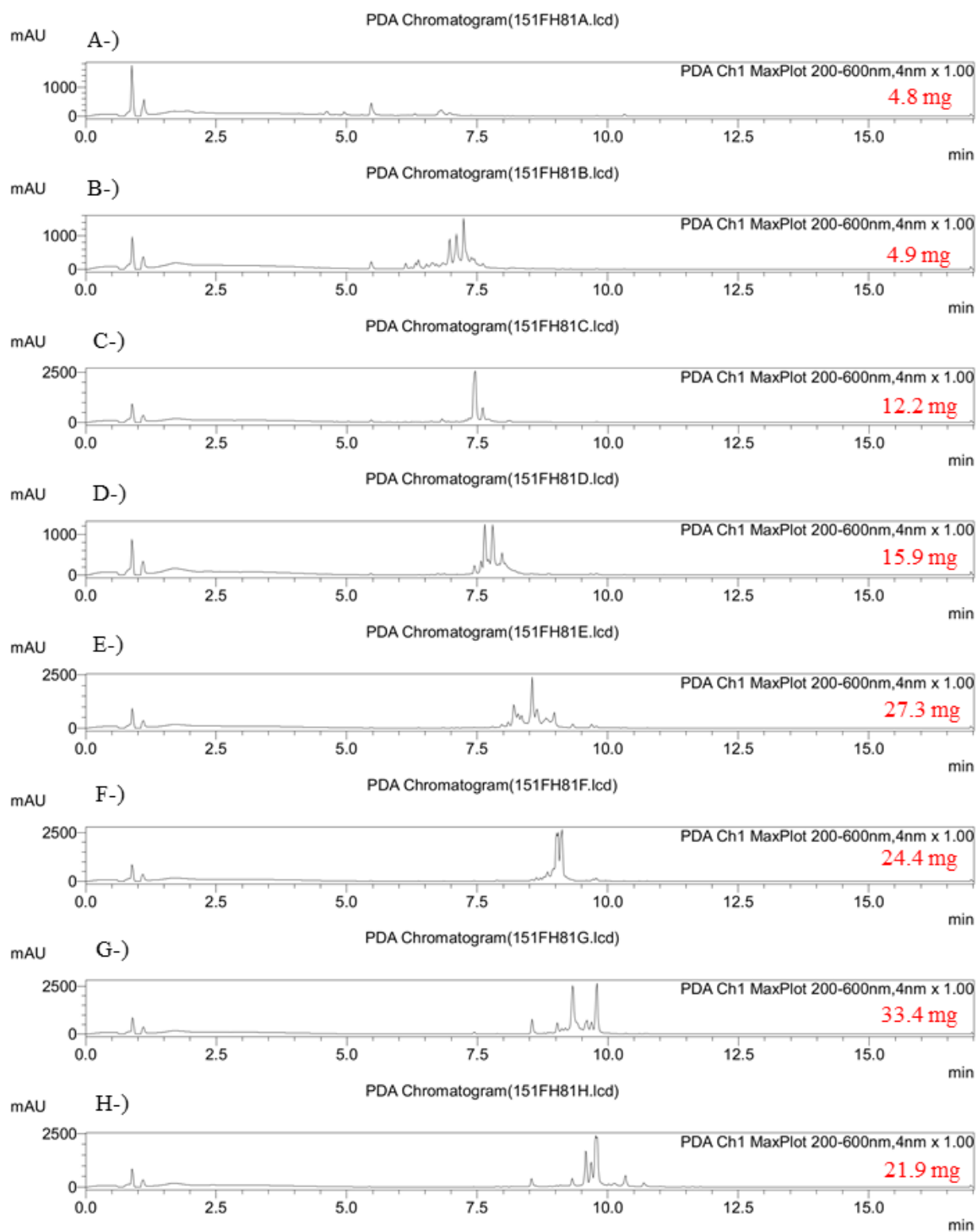


Figura 123. Cromatogramas por UCLAE-DAD as frações 81A-H obtidas por CLAE-DAD semipreparativo, [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 μm ; Solvente A: H_2O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min^{-1} ; Max Plot λ 200-600 nm]



9.13 Avaliação da atividade antifúngica das amostras 81A-H

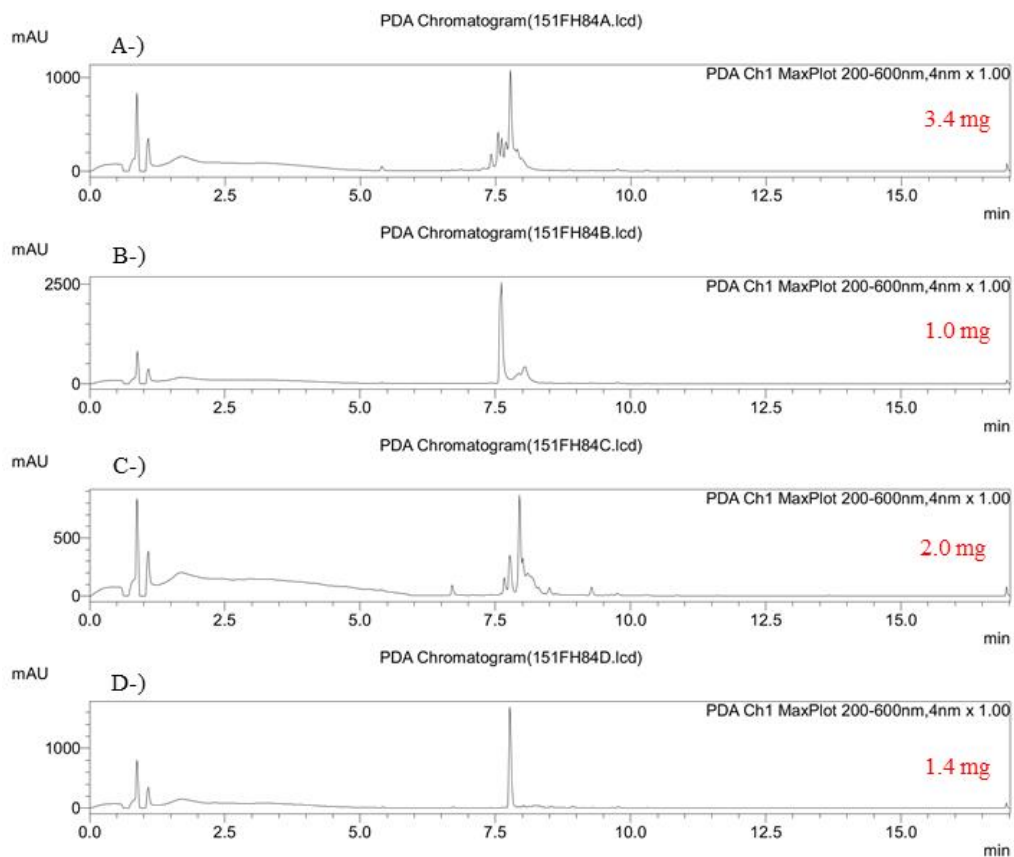
As frações 81 A-H do fracionamento por CLAE-DAD foram avaliadas contra células planctônicas de *Aspergillus fumigatus* e *Cândida albicans*, sendo avaliado também a formação do biofilme dessa levedura. As frações 81 A-H não exibiram atividade antifúngica nas células planctônicas de ambas as linhagens fúngicas analisadas, porém, todas as frações (81A-H) apresentaram atividade antibiofilme de *C. albicans* (Tabela 37).

Tabela 37. Atividade antifúngica e antibiofilme de 81A-H

CIM80 µg/ml	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. albicans</i>	
	crescimento		biofilme
81A	>20	>20	20
81B	>20	>20	20
81C	>20	>20	20
81D	>20	>20	20
81E	>20	>20	20
81F	>20	>20	20
81G	>20	>20	20
81H	>20	>20	20

Uma segunda etapa de purificação por CLAE-DAD semipreparativo foi necessária para obter a substância 84D (1,4 mg) a partir de 81D, 64% de ACN em H₂O + 0.1% AF (Kinetex F5 5 µm, C18, 100 Å, 250 × 4.6 mm, cromatograma ilustrado na Figura 124.

Figura 124. Cromatogramas por UCLAE-DAD das frações 84A-D obtidas por CLAE-DAD semipreparativo, [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 μ m; Solvente A: H₂O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min⁻¹; Max Plot λ 200-600 nm]



9.15 Elucidação estrutural da 84D:

Os dados de RMN de ^1H da 84D (Figura 127) foram comparados com os da literatura, sendo possível confirmar a estrutura química da oxafenalenona SF 226 (Figura 125). Esta substância é monômero das duclauxinas (GAO et al., 2018). Oxafenalenonas são uma importante classe de fenólicos, exibem várias bioatividades e são isoladas tanto de fungos quanto de plantas (LI et al., 2016), Tabela 39.

Tabela 39. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) de 84D e dos da literatura

	Literatura acetona d6	Isolada 84D CD_3OD
No.	δ_{H} m (J em Hz)	δ_{H} m (J em Hz)
1	—	—
2	—	—
3	6,65 q (0,8)	6,39 s
4	—	—
4a	—	—
5	—	—
6	6,57 s	6,59 s
7	—	—
8	—	—
8 ^a	—	—
9	—	—
10	5,62 2H, s	5,59 2H, s
11	2,82 3H d (0,8)	2,81 3H s
12	—	—
13	—	—
2-OH	11,99 s	—
5-OH	9,23 brs	—
7-OH	9,13 brs	—

Figura 125. Estrutura química da oxafenalenona (84D)

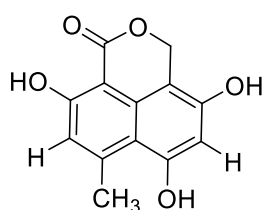


Figura 126. Cromatograma e espectros por UCLAE-DAD-ESI/MS da substância 84D isolada por CLAE-DAD semipreparativo [Coluna Analítica Phenomenex Kinetex C18 75 x 3,0 mm d.i. x 2,6 µm; Solvente A: H₂O + 0,05% AF; Solvente B: ACN. Gradiente de 20-100 % de B em 20 min; vazão de 0,4 mL min⁻¹; Max Plot λ 200-600].

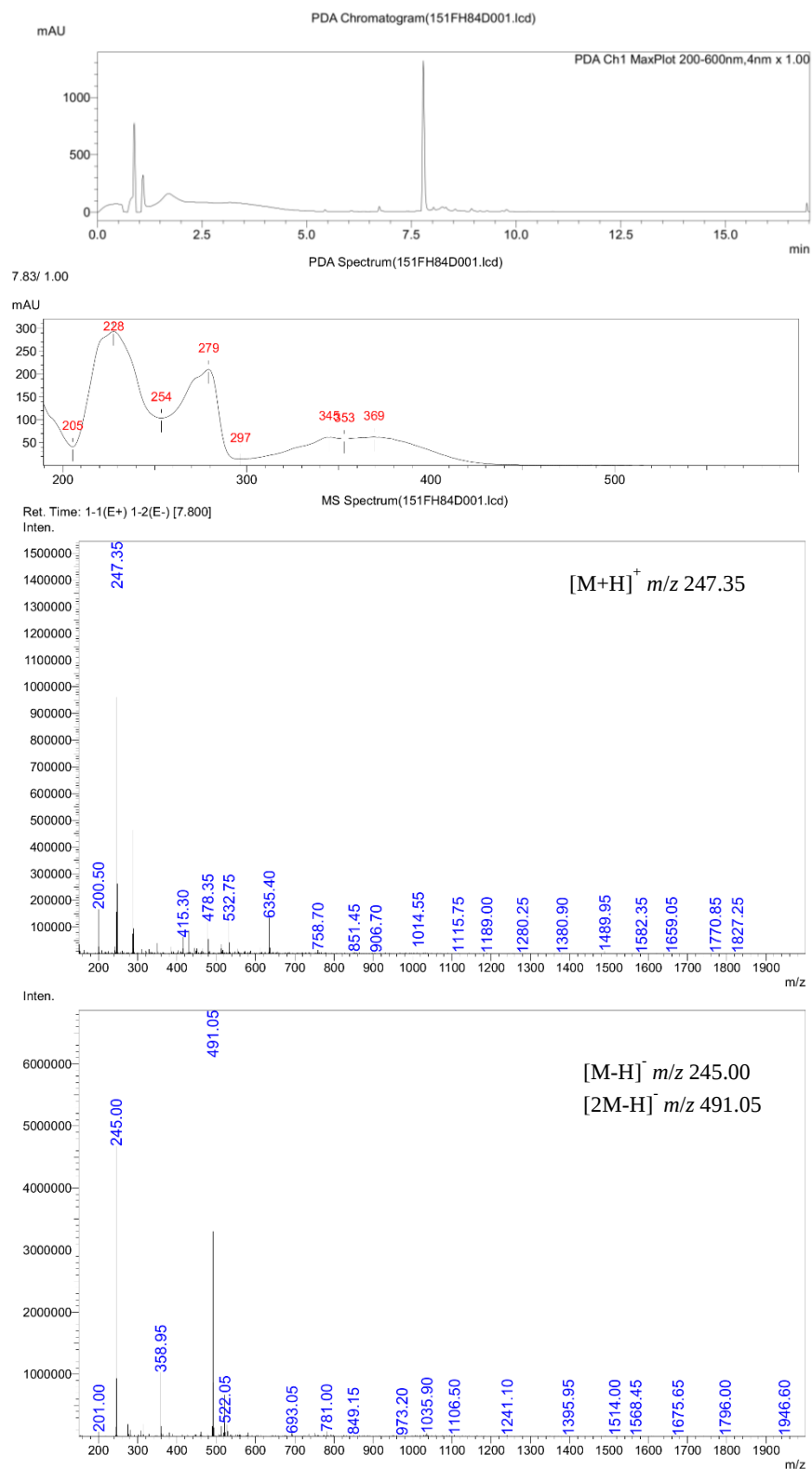
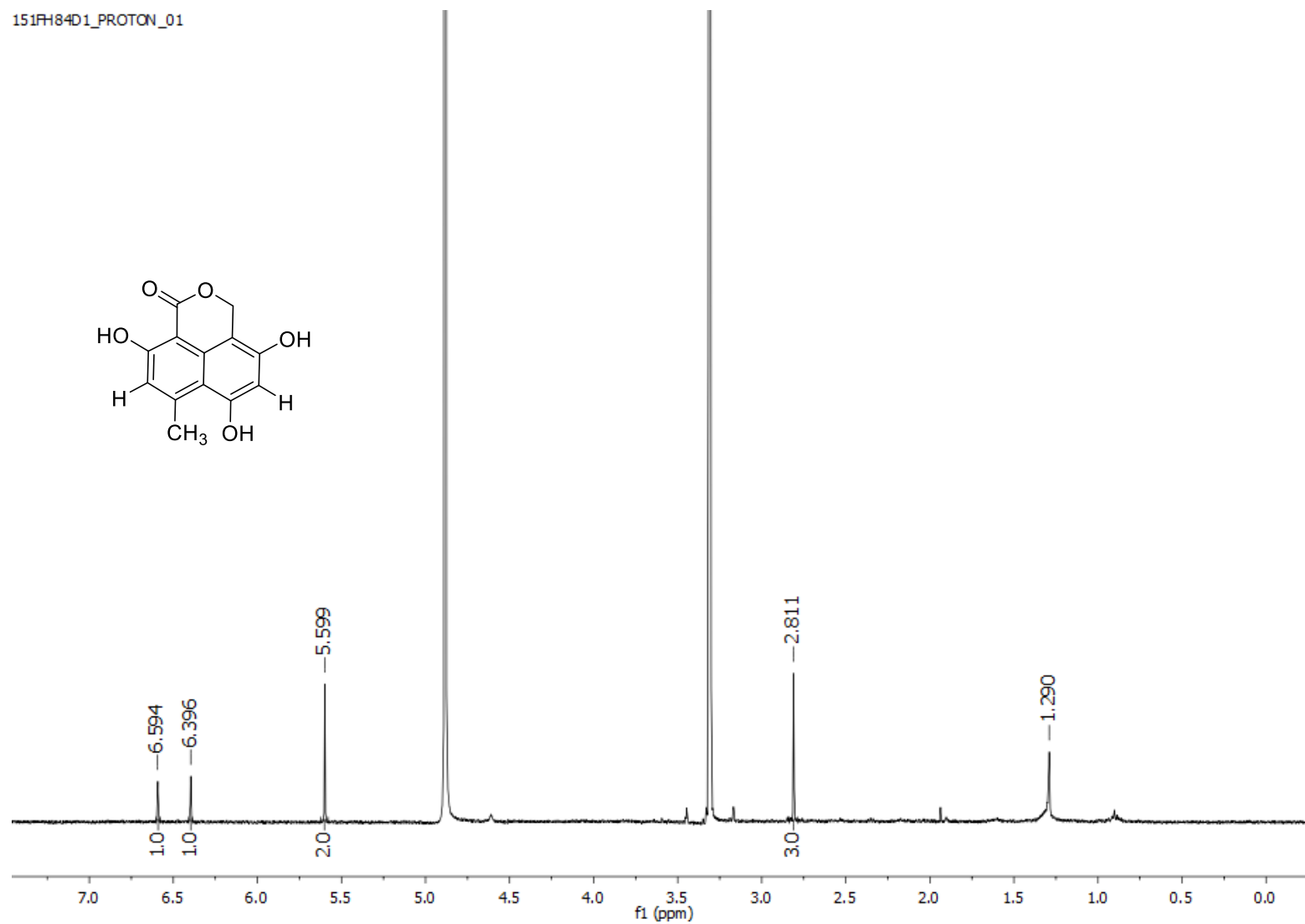


Figura 127. Espectro de RMN de ^1H (500MHz) em CD_3OD da oxafenalenona SF 226 isolada de *Talaromyces verruculosus*



CONSIDERAÇÕES FINAIS

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Neste trabalho foi realizado a investigação dos efeitos da adição de modificadores epigenéticos e eliciadores metálicos nos cultivos dos fungos *C. lunata* e *F. fujikuroi*. Essa abordagem de manipulação química possibilita o acesso de vias metabólicas não expressas em condições de cultivos usuais.

O estudo epigenético empregado em culturas de *C. lunata* não teve resultados expressivos quanto a diversificação química, entretanto, o cultivo em escala ampliada em PDB com a suplementação de Mg^{2+} forneceu o isolamento de duas novas γ -lactamas espirocíclicas (**C3** e **C4**), e de outros cinco compostos conhecidos, dentre os quais destacam as triticonas E (**C1**) e F (**C2**) que apresentaram atividade antibacteriana para *E. coli*, com CIM de 62,5 μ g/mL.

A presença de íons magnésio no cultivo de *F. fujikuroi* não apenas promoveu maior rendimento em massa como também induziu a produção de metabólitos ausentes nos demais cultivos. Fornecendo a produção das auxinas nitrogenadas **F4**, **F8** e **F17**, derivadas do ácido indolacético (**F3**), e de outras derivadas do ácido fenilacético, **F2**, **F6**, **F11**, **F12**, **F15** e **F18**. Os compostos **F2**, **F3** e **F4** apresentaram atividade antifúngica para diversas leveduras do gênero *Cândida*.

A avaliação quantitativa por CLAE-DAD indicou que o teor de ácido fusárico não teve alterações significativas, estando presente em todas as amostras em quantidades próximas. Diferentemente, a presença de SAHA e íons de cobre no meio de cultivo PDB levaram a um aumento na produção de AIA de quase 50%.

O alcaloide ácido acético-2-(4-butilpicolinamida) foi possível ser quantificado apenas em PDB + Mg^{2+} , e que portando a presença íons de magnésio no meio de cultivo favorece por algum mecanismo não conhecido a sua produção.

O sesquiterpeno terpestacina é o metabólito majoritário presente em todos os extratos AcOEt estudados, obedecendo faixa de concentração entre $257,83 \pm 2,07$ (PDB + Cu^{2+}) e $885,84 \pm 9,53$ (PDB + SAHA).

O estudo bioguiado de *Aspergillus arcoverdensis* possibilitou o isolamento dos metabólitos verruculogena, fumitremogina A, e viriditoxina que apresentou potente atividade contra *T. vaginalis*.

Os estudos químicos e antimicrobianos de *Cylindrocarpon pauciseptatum* resultaram no isolamento e identificação da fujikurina B, sendo o principal metabólito produzido e responsável pelas atividades antituberculose e tricomonicida.

O cultivo em escala ampliada de *Talaromyces verruculosus* forneceu o extrato acetato de etila e diversas frações que exibiram atividades contra *T. vaginalis*, *M. tuberculosis* latente e formação de biofilme de *C. albicans*. O estudo bioguiado forneceu o isolamento da duclauxina, bacilisorina F e 1-*epi*-bacilisorina F que exibiram promissora inibição na formação de biofilme de *C. albicans* SC5314.

Frente aos resultados apresentados, podemos concluir que todas as cepas fúngicas estudadas são interessantes para o estudo químico e biológico. Além disso, a abordagem epigenética, a eliciação química, e os estudos bioguiados são ferramentas importantes para explorar e obter metabólitos bioativos com características únicas.

REFERÊNCIAS

11. REFERÊNCIAS

- ABDELKHALEK, A. A. et al. Derivatives of Cucurbitacin-E-glucoside produced by *Curvularia lunata* NRRL 2178: Anti-inflammatory, antipyretic, antitumor activities, and effect on biochemical parameters. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 124–130, 2017.
- AFIYATULLOV, SH. SH. et al. Fumitremorgins from the marine isolate of the fungus *Aspergillus fumigatus*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 40, n. 6, p. 615–617, 2004.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012**: Dispõe sobre os pré-requisitos para avaliação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2012. 10 p. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0027_17_05_2012.pdf/c6edeb56-200d-4482-8a19-99fa11c33fd3>. Acesso em: 08 abr. 2020.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC RE nº 899, de 29 de maio de 2003**: guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003. 15 p. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/349509/Consolidado%2Bde%2Bnormas%2BCOBIO.pdf/3122249b-48cb-47aa-be78-76f3129a62ba>>. Acesso em: 3 abr. 2018.
- AKONE, S. H. et al. Epigenetic modification, co-culture and genomic methods for natural product discovery. **Physical Sciences Reviews**, v. 4, n. 4, p. 1–13, 2019.
- ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168–4170, 2001.
- ALLEN, C. L.; BUREL, C.; WILLIAMS, J. M. J. Cost efficient synthesis of amides from oximes with indium or zinc catalysts. **Tetrahedron Letters**, v. 51, n. 20, p. 2724–2726, 2010.
- ALMEIDA, T. T. et al. Curvulin and spirostaphylotrichins R and U from extracts produced by two endophytic *Bipolaris* sp. associated to aquatic *macrophytes* with antileishmanial activity. **Natural Product Research**, v. 32, n. 23, p. 2783–2790, 2018.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes - Secret producers of bioactive plant metabolites. **Pharmazie**, v. 68, n. 7, p. 499–505, 2013. não está no texto
- AMEND, A. et al. Fungi in the marine environment: Open questions and unsolved problems. **mBio**, v. 10, n. 2, p. 1–15, 2019.
- ANDERSON, D. E. et al. Comparison of small molecule inhibitors of the bacterial cell division protein FtsZ and identification of a reliable cross-species inhibitor NIH Public Access. v. 7, n. 11, p. 1918–1928, 2013.
- ANDRINO, C. O.; COSTA, F. N.; SANO, P. T. O gênero *Paepalanthus* Mart. (Eriocaulaceae) no Parque Estadual do Biribiri, Diamantina, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 2, p. 393–419, jun. 2015.

ANTONIASSI, N. A. B. et al. Feohifomicose cutânea causada por *Curvularia* sp. em um equino. **Pathology**, v. 38, p. 73–76, 2010. não esta no texto

ARNDT, B. et al. Genetic engineering, high resolution mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy elucidate the bikaverin biosynthetic pathway in *Fusarium fujikuroi*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 84, p. 26–36, 2015.

AUCKLOO, B. N. et al. Stress-driven discovery of novel cryptic antibiotics from a marine fungus *Penicillium* sp. BB1122. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. AUG, p. 1–17, 2017.

BARONE, V and COSSI, M. A new definition of cavities for the computation of solvation free energies by the polarizable continuum model. **The Journal of Chemical Physics**, v. 107, p. 3210-3221, 1997.

BEAU, J. et al. Epigenetic tailoring for the production of anti-infective cytosporones from the marine fungus *Leucostoma persoonii*. **Marine Drugs**, v. 10, n. 4, p. 762–774, 2012.

BECKE, A. D. A new mixing of Hartree–Fock and local density-functional theories. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, p. 1372-1377, 1993.

BILLS, G. F.; GLOER, J. B. Biologically Active secondary metabolites from the fungi. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 6, 2016.

BOLLER, A. et al. Welkstoffe und antibiotika mitteilung diaporthin, ein welketoxin aus kulturen von *Endothia parasitica* (Murr.) And. **Helvetica Chimica Acta**, v. 40, n. 3, p. 875–880, 1957.

BONDI, A. van der Waals Volumes and radii of metals in covalent compounds. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 68, p. 441-451, 1964.

BONIFÁCIO, B. V. **Atividade antimicrobiana in vitro de extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados**. 2014. 140 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2014.

BRADY, S. F.; CLARDY, J. CR377, a new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 10, p. 1447–1448, 2000.

BROCK, N. L. et al. Genetic dissection of sesquiterpene biosynthesis by *Fusarium fujikuroi*. **ChemBioChem**, v. 14, n. 3, p. 311–315, 2013.

BRYANT, F. O.; CUTLER, H. G.; JACYNO, J. M. Properties and cost effective method for production of the antitumor agent duclauxin from sporulating *Penicillium herquei*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, n. 12, p. 1214–1217, 1993.

CALIGIORNE, R. B. et al. Fungos dematiáceos: fungos negros que afetam animais, plantas e o homem. **Biotecnologia e Ciência e Desenvolvimento**, v. 2, n. 11, p. 22-25, 1999.

CAO, P. et al. New duclauxamide from *Penicillium manginii* YIM PH30375 and structure revision of the duclauxin family. **Organic Letters**, v. 17, n. 5, p. 1146–1149, 2015.

CHAGAS, F. O. **Cultura mista, manipulação química e genética de micro-organismos: estratégias para a diversificação do metabolismo secundário**. 2014. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

CHAN, C. C. Principles and Practices of Analytical Method Validation: Validation of Analytical Methods is Time-consuming but Essential. **The Quality Assurance Journal**, v. 14, n. 3–4, p. 61–64, 2011.

CHERBLANC, F. L. et al. in chemical biology and medicine. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 5, p. 595–754, 2013.

CHIMATADAR, S. A.; BASAVARAJ, T.; NANDIBEWOOR, S. T. A study of the kinetics and mechanism of oxidation of *L*-tryptophan by diperiodatonickelate(IV) in aqueous alkaline medium. **Russian Journal of Physical Chemistry A**, v. 81, n. 7, p. 1046–1053, 2007.

CHUNG, Y. et al. Suberoylanilide Hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, induces the production of anti-inflammatory cyclodepsipeptides from *Beauveria felina*. **Journal of Natural Products**, v.76, n. 7, p. 1260–1266, 2013.

CICHEWICZ, R. H. Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 1, p. 11–22, 2010.

CLAYDON, N.; ELGERSMA, D. M.; GROVE, J. F. The phytotoxicity of some phenolic metabolic products of *Ophiostoma ulmi* to *Ulmus* sp. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 86, p. 0–6, 1980.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute document M7-A6. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard**, 6th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA., 2006.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A3. **Methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts; approved standard**. 3rd ed. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA., 2008.

COLE, R. J. et al. Structure of the tremor-producing indole, TR-2. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 1015–1018, 1975.

COOMBE, B. R. G.; JACOBS, J. J.; WATSOW, T. R. *Curvularia*. **Austrian Journal Chemistry**, p. 783–788, 1968.

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

DA CUNHA, K. C. et al. Diversity of *Bipolaris* species in clinical samples in the United States and their antifungal susceptibility profiles. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 12, p. 4061–6, 2012.

DAI, J. et al. Curvularin-type metabolites from the fungus *Curvularia* sp. isolated from a marine alga. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 36, p. 6928–6937, 2010.

Dassault Systemes BIOVIA, **Discovery Studio Visualizer**, V.17.0.2.1076, (2017).

DE HOFFMANN, C. C. et al. Infecções causadas por fungos demácios e suas correlações anátomo-clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 1, p. 138–141, 2011.

DEMARQUE, D. P.; CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Products Report**, v. 33, p. 432–455, 2016.

DITCHFIELD, R. Self-consistent perturbation theory of diamagnetism. **Molecular Physics**, v. 27, p. 789–807, 1974

DUARTE, M. C. T. et al. anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305–311, 2005.

DU, L.; KING, J. B.; CICHEWICZ, R. H. Chlorinated polyketide obtained from a *Daldinia* sp. treated with the epigenetic modifier suberoylanilide hydroxamic acid. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 11, p. 2454–2458, 2014.

EVIDENTE, A.; SURICO, G. Isolation of indole-3-aldehyde from *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 5, p. 938–939, 1986.

FAYOS, J. et al. Structure of Verruculogen, a tremor producing peroxide from *Penicillium verruculosum*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 96, n. 21, p. 6785–6787, 1974.

FELIX, C. R. et al. Selective killing of dormant *Mycobacterium tuberculosis* by marine natural products. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 8. 2017.

FENG, Y. et al. Total synthesis of verruculogen and fumitremorgin a enabled by ligand-controlled C-H borylation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 32, p. 10160–10163, 2015.

FISCH, K. M. et al. Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 9, p. 1199–1213, 2009.

FUKUSHIMA, T. et al. Transcriptional, functional and cytochemical analyses of the veg gene in *Bacillus subtilis*. **Journal of Biochemistry**, v. 133, n. 4, p. 475–83, 2003.

GAO, S. S. et al. Biosynthesis of Heptacyclic Duclauxins Requires Extensive Redox Modifications of the Phenalenone Aromatic Polyketide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 140, n. 22, p. 6991–6997, 2018.

Gaussian 09, Revision D.01, FRISCH, M. J. et al., Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2013.

GOMEZ, I. J. et al. Nitrogen-doped Carbon Nanodots for bioimaging and delivery of paclitaxel. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 6, n. 35, 2018.

- GREEN, P. et al. Identification and preliminary evaluation of viriditoxin, a metabolite of *Paecilomyces varioti*, as an insecticide for sheep blowfly, *Lucilia cuprina* (Wied.). **General and applied entomology**, v. 21, p. 33–37, 1989.
- GROVE, J. F.; POPLE, M. The Synthesis and Reactions of Some Derivatives of C-Acetylorsellinic Acid. **Journal of the Chemical Society**, n. 2, p. 1972–1999, 1979.
- GUARATINI, T. et al. Mechanism for the elimination of aromatic molecules from polyenes in tandem mass spectrometry. **Chemical Communication**, v. 36, p. 4110–4112, 2006
- GUO, D. LE et al. Three new α -pyrone derivatives induced by chemical epigenetic manipulation of *Penicillium herquei*, an endophytic fungus isolated from *Cordyceps sinensis*. **Natural Product Research**, v. 34, n. 7, p. 958–964, 2018.
- HALLOCK, Y. F.; LU, H. S. M.; CLARDY, J. *Drechslera tritici-repentis*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 5, p. 747–754, 1993.
- HAN, W. B. et al. Curindolizine, an Anti-Inflammatory Agent Assembled via Michael Addition of Pyrrole Alkaloids Inside Fungal Cells. **Organic Letters**, v. 18, n. 8, p. 1816–1819, 2016.
- HARDEGGER, E. et al. Wilting agents and antibiotics. XXXV. Structure of diaporthin and the synthesis of diaporthinic acid. **Helvetica Chimica Acta**, v. 49, p. 1283–90, 1966.
- HILARIO, F. et al. Antimicrobial Screening of Endophytic Fungi Isolated from the Aerial Parts of *Paepalanthus chiquitensis* **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 8, p. 1389–1395, 2017.
- HILARIO, F. et al. Spirocyclic lactams and curvulinic acid derivatives from the endophytic fungus *Curvularia lunata* and their antibacterial and antifungal activities. **Fitoterapia**, v. 141, p. 104466, 2020.
- INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. IUPAC Technical Report: harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.
- KHARWAR, R. N. et al. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: Their importance and future challenges. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 7, p. 1208–1228, 2011.
- KING, J. B. et al. Design and Application of a High-Throughput, High-Content Screening System for Natural Product Inhibitors of the Human Parasite *Trichomonas vaginalis*. **ACS Infectious Diseases**, v. 5, n. 8, p. 1456–1470, 2019.
- KRIZSÁN, K. et al. Clinical Importance of the Genus *Curvularia*. **Medical Mycology**, n. March 2016, p. 147–204, 2015.
- LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical Review B**, v. 37, p. 785–789, 1988.
- LI, C. W. et al. A novel oxaphenalenone, penicimutalidine: Activated production of oxaphenalenones by the diethyl sulphate mutagenesis of marine-derived fungus *Penicillium purpurogenum* G59. **RSC Advances**, v. 6, n. 85, p. 82277–82281, 2016.

- LIU, D.-Z. et al. Induced production of new diterpenoids in the fungus *Penicillium funiculosum*. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 5, p. 12–13, 2014.
- LIU, Y.; JUNG, J. H.; ZHANG, S. Indole alkaloids from a sponge *Sarcotragus* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, n. 5, p. 453–456, 2006.
- LODEWYK, M. W.; SIEBERT, M. R.; TANTILLO, D. J. Computational prediction of ^1H and ^{13}C chemical shifts: a useful tool for natural product, mechanistic and synthetic organic chemistry. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 1839–1862, 2011.
- LONDON, F. Théorie quantique des courants interatomiques dans les combinaisons aromatiques. **Journal de Physique et Le Radium**, v. 8, p. 397–409, 1937.
- MA, Y. M. et al. Structural diversity and biological activities of indole diketopiperazine alkaloids from fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 35, p. 6659–6671, 2016.
- MACRAE, C. F. et al. Mercury CSD 2.0 - New features for the visualization and investigation of crystal structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 41, p. 466–470, 2008.
- MCMILLAN, J. Principles of Analytical Validation. In: CIBOROWSKI, P.; SILBERRING, J. (Editor). **Proteomic Profiling and Analytical Chemistry: The Crossroads**. 2nd. ed. Omaha, NE: Elsevier, 2016. Charpt 13, p. 239–251.
- MADRID, H. et al. Novel *Curvularia* species from clinical specimens. **Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 33, p. 48–60, 2014.
- MAFEZOLI, J. et al. 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.; CAI, L.; MCKENZIE, E. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris-Cochliobolus-Curvularia* complex. **Fungal Diversity**, v. 56, p. 131–144, 2012.
- MANAMGODA, D. S. et al. The genus *Bipolaris*. **Studies in Mycology**, v. 79, n. 1, p. 221–288, 2014.
- MARTINEZ-KLIMOVA, E.; RODRÍGUEZ-PEÑA, K.; SÁNCHEZ, S. Endophytes as sources of antibiotics. **Biochemical Pharmacology**, v. 134, p. 1–17, 2017.
- MASI, M. et al. Spirostaphylotrichin W, a spirocyclic γ -lactam isolated from liquid culture of *Pyrenophora semeniperda*, a potential mycoherbicide for cheatgrass (*Bromus tectorum*) biocontrol. **Tetrahedron**, v. 70, n. 7, p. 1497–1501, 2014.
- MENNUCCI, B. and TOMASI, J. Continuum solvation models: A new approach to the problem of solute's charge distribution and cavity boundaries. **The Journal of Chemical Physics**, v. 106, p. 5151–5158, 1997a.

- MENNUCCI, B.; CANCEÈ, E.; TOMASI, J. Evaluation of Solvent effects in isotropic and anisotropic dielectrics and in ionic solutions with a unified integral equation method: theoretical bases, computational implementation, and numerical applications. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 101, p. 10506-10517, 1997b
- MILNE, J. E. et al. Iodide-catalyzed reductions: Development of a synthesis of phenylacetic acids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 76, n. 22, p. 9519–9524, 2011.
- MONDOL, M. A. M. et al. Metabolites from the endophytic fungus *Curvularia* sp. M12 Act as motility inhibitors against *Phytophthora capsici* Zoospores. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 2, p. 347–355, 2017.
- MUNDT, K. et al. Identification of the Verruculogen prenyltransferase FtmPT3 by a combination of chemical, bioinformatic and biochemical approaches. **ChemBioChem**, v. 13, n. 17, p. 2583–2592, 2012.
- 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.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Plant endophytes and epiphytes: burgeoning sources of known and “unknown” cytotoxic and antibiotic agents? **Planta Medica**, 2020a.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, 2020b.
- CONNOR, C. et al. Substituent Effects on the N.M.R. Spectra of Carboxylic Acid Derivatives. IV. ¹³C N.M.R. Spectra of para-Substituted Phenols, Phenylureas and Phenyl Propionates. **Australian Journal of Chemistry**, v. 40, n. 4, p. 677, 1987.
- PALLASTRELLI, M. B. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos enantiosseletivos para separação e determinação do esmolol e sotalol**. 2013. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- PARANAGAMA, P. A.; WIJERATNE, E. M. K.; GUNATILAKA, A. A. L. Uncovering biosynthetic potential of plant-associated fungi : effect of culture conditions on metabolite production by *Paraphaeosphaeria quadrisepata* and *Chaetomium chiwersii*. **Journal of Natural Products**, v. 21, n. Table 1, p. 1939–1945, 2007.
- PETERSSON, G. A.; BENNETT, A.; TENSFELDT, T. G.; AL-LAHAM, M. A.; SHIRLEY, W. A. A complete basis set model chemistry. I. The total energies of closed-shell atoms and hydrides of the first-row elements. **The Journal of Chemical Physics**, v. 89, p. 2193-2218, 1988.
- PETERSSON, G. A. and AL-LAHAM, M. A. A complete basis set model chemistry II. Open-shell systems and the total energies of the first-row atoms. **The Journal of Chemical Physics**, v. 94, p. 6081-6090, 1991.
- PETTIT, R. K. Minireview Small-molecule elicitation of microbial secondary metabolites. **Microbial Biotechnology**, v. 4, p. 471–478, 2011.

- RAWLINSON, C. et al. The identification and deletion of the polyketide synthase-nonribosomal peptide synthase gene responsible for the production of the phytotoxic triticone A/B in the wheat fungal pathogen *Pyrenophora tritici-repentis*. **Environmental Microbiology**, v. 21, n. 12, p. 4875-4886, 2019.
- REVANKAR, S. G. et al. Disseminated phaeohyphomycosis. **Review of an Emerging Mycosis**, v. 34, p. 467-476, 2002.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- SCOTT, K. N. NMR parameters of biologically important aromatic acids. 2. Phenylacetic acid and derivatives. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 6, n. 1, p. 55-73, 1972.
- SHARMA, V. K. et al. Induction of Cryptic metabolite production through epigenetic tailoring in colletotrichum gloeosporioides isolated from *Syzygium cumini*. In: **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 169-184.
- SHIBATA, S. et al. Duclauxin, a metabolite of *Penicillium duclauxi* (delacroix). **Tetrahedron Letters**, v. 6, n. 18, p. 1287-1288, 1965.
- STEPHENS, P. J.; DEVLIN, F. J.; CHABALOWSKI, C. F.; FRISCH, M. J. Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields. **Journal of Physical Chemistry**, v. 98, p. 11623-11627, 1994.
- STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific Yew. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214-216, 1993.
- STROBEL, G. The emergence of endophytic microbes and their biological promise. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 2, 2018.
- STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 535-544, 2003.
- SUGAWARA, F.; TAKAHASHI, N.; STROBEL, G. A.; SCOTT A.; STROBEL, S. A.; LU, H. S. M.; CLARDY, J. Triticones A and B, Novel Phytotoxins from the Plant Pathogenic Fungus *Drechslera tritici-repentis*. **Journal American Chemical Society**, v. 110, p. 4086-4087, 1988.
- SUN, D. D. et al. 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, 2010.
- SUZUKI, K. et al. Structure revision of mycotoxin, viriditoxin, and its derivatives. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 38, n. 11, p. 3180-3181, 1990.
- TOMASI, J.; MENNUCCI, B.; CANCÈS, E. The IEF version of the PCM solvation method: an overview of a new method addressed to study molecular solutes at the QM ab initio level. **The Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 464, p. 211-226, 1999.

TROVÓ, M.; SANO, P. T. Taxonomic survey of *Paepalanthus* section *Diphyomene* (Eriocaulaceae). **Phytotaxa**, v. 14, p. 49–55, 2010.

TROVÓ, M.; SANO, P. T. Atualização das espécies de *Paepalanthus* (Eriocaulaceae) na flora fanerogâmica do estado de São Paulo, Brasil. **Rodriguesia**, v. 67, n. 3, p. 849–853, 2016.

VARMA, G. B. et al. Production of phenylacetic acid derivatives and 4-epiradicinol in culture by *Curvularia lunata*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 17, p. 1925–1930, 2006.

VON BARGEN, K. W. et al. Isolation and structure elucidation of fujikurins a-d: products of the PKS19 gene cluster in *Fusarium fujikuroi*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 8, p. 1809–1815, 2015.

VOSKO, S. H.; WILK, L.; NUSAIR, M. Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis. **Canadian Journal of Physics**, v. 58, p. 1200–1211, 1980.

WALSER-VOLKEN, P.; TAMM, C. **The spirostaphylotrichins and related microbial metabolites**. In: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Springer, Vienna, 1996. p. 125–165.

WANG, C.; PAN, Y.; WU, A. InCl₃/Al mediated pinacol coupling reactions of aldehydes and ketones in aqueous media. **Tetrahedron**, v. 63, n. 2, p. 429–434, 2007.

WANG, J. et al. Discovery of a small molecule that inhibits cell division by blocking FtsZ, a novel therapeutic target of antibiotics. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 45, p. 44424–44428, 2003.

WEBSTER, D. et al. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 140–146, 2008.

WEISLEDER, D.; LILLEHOJ, E. B. Structure of viriditoxin, a toxic metabolite of *Aspergillus viridi-nutans*. **Tetrahedron Letters**, v. 12, n. 48, p. 4705–4706, 1971.

WIITALA, K. W.; CRAMER, C. J.; HOYE, T. R. Comparison of various density functional methods for distinguishing stereoisomers based on computed ¹H or ¹³C NMR chemical shifts using diastereomeric penam β -lactams as a test set. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 45, n. 10, p. 819–829, 2007.

WIJERATNE, E. M. K. et al. Thievalides A–E, nor-spiro-azaphilones, and a bis-spiro-azaphilone from *Thielavia* sp. PA0001, an endophytic fungus isolated from aeroponically grown *Physalis alkekengi*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 6, p. 1467–1472, 2014.

WILLIAMS, R. B. et al. Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 6, n. 11, p. 1857–2020, 2008.

WILLOUGHBY, P. H.; JANSMA, M. J.; HOYE, T. R. A guide to small-molecule structure assignment through computation of (¹H and ¹³C) NMR chemical shifts. **Nature Protocols**, v. 9, n. 3, p. 643–660, 2014.

WOLINSKI, K.; HINTON, J. F.; PULAY, P. Efficient Implementation of the Gauge-Independent Atomic Orbital Method for NMR Chemical Shift Calculations. **The Journal of the American Chemical Society**, v. 112, p. 8251-8260, 1990.

YAMAZAKI, M.; FUJIMOTO, H.; KAWAZAKI, H. Chemistry of tremorogenic metabolites. I. fumitremorgin A from *Aspergillus fumigatus*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 1, p. 245–254, 1980.

YANG, S. W.; CORDELL, G. A. Metabolism studies of indole derivatives using a staurosporine producer, *Streptomyces staurosporeus*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 1, p. 44–48, 1997.

YILMAZ, N. et al. Four novel *Talaromyces* species isolated from leaf litter from Colombian Amazon rain forests. **Mycological Progress**, v. 15, n. 10–11, p. 1041–1056, 22 out. 2016.

ZANG, Y. et al. Antimicrobial oligophenalenone dimers from the soil fungus *Talaromyces stipitatus*. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 12, p. 2991–2996, 2016.

ZHANG, S. et al. Antimicrobial metabolites produced by *Penicillium mallochii* CCH01 isolated from the gut of *Ectropis oblique*, cultivated in the presence of a histone deacetylase inhibitor. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–8, 2019.

ZHANG, Z. et al. Aniline-tetramic acids from the deep-sea-derived fungus *Cladosporium sphaerospermum* L3P3 cultured with the HDAC inhibitor SAHA. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 7, p. 1651–1657, 2018.

ZHAO, Y. and TRUHLAR, D. G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 120, p. 215-241, 2008.

ZHOU, G. BIN; ZHANG, P. F.; PAN, Y. J. A novel method for synthesis of arylacetic acids from aldehydes, N-(2,3,4,6-tetra-*O*-pivaloylated-*D*-glucopyranosyl)amine and trimethylsilylcyanide. **Tetrahedron**, v. 61, n. 23, p. 5671–5677, 2005.

ZUTZ, C. et al. Valproic acid induces antimicrobial compound production in *Doratomyces microspores*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–12, 2016.