## UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE RONDONÓPOLIS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GESTÃO E TECNOLOGIA AMBIENTAL

# "PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS ESPECIAIS COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO PRODUZIDOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À GRAMÍNEA AXONOPUS LEPTOSTACHYUS (FLÜGGÉ) HITCHC (POACEAE)"

RICARDO APARECIDO RODIGUES NEPONUCENO Dissertação de Mestrado

Rondonópolis-MT: Março/2020.

## UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE RONDONÓPOLIS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GESTÃO E TECNOLOGIA AMBIENTAL

## "PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS ESPECIAIS COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO PRODUZIDOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À GRAMÍNEA A*XONOPUS LEPTOSTACHYUS (FLÜGGÉ) HITCHC* (POACEAE)"

RICARDO APARECIDO RODRIGUES NEPONUCENO

Orientador: Prof. Dr. HELDER LOPES TELES

Dissertação de Mestrado

Rondonópolis-MT: Março/2020.

## UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE RONDONÓPOLIS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GESTÃO E TECNOLOGIA AMBIENTAL

# "PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS ESPECIAIS COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO PRODUZIDOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À GRAMÍNEA AXONOPUS LEPTOSTACHYUS (FLÜGGÉ) HITCHC (POACEAE)"

### RICARDO APARECIDO RODRIGUES NEPONUCENO

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Gestão e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal de Mato Grosso, como parte dos requisitos necessários a obtenção do Grau de Mestre em Gestão e Tecnologia Ambiental, área de concentração Gestão e Tecnologias Ambientais, opção Acadêmica. Aprovado por:

> Prof. Dr. Helder Lopes Teles UFMT/ICEN/CUR (Orientador)

Profa. Dr<sup>a</sup>. Tereza Auxiliadora Nascimento Ribeiro UFMT/Dep. Química/ Campus Cuiabá (Examinador Externo)

> Profa. Dr<sup>a</sup>. Camila Martins de Oliveira UFMT/ICEN/CUR (Examinador Externo)

Rondonópolis-MT, 31 de Março de 2020.

### FICHA CATALOGRAFICA

### NEPONUCENO, RICARDO APARECIDO RODRIGUES NEPONUCENO.

Prospecção de metabólitos especiais potencial antimicrobiano produzidos por fungos endofiticos associados a gramínea *Axonopus Leptostachyus (FLÜGGÉ) HITCHC* (POACEAE). p. 175, 297mm, (UFMT-CDS, Mestre, Gestão e Tecnologia Ambiental, 2020). Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Mato Grosso – Campus de Rondonópolis.

 Produtos naturais 2. Metabólitos secundários 3. Fungos endofiticos 4. Atividade antimicrobiana 5. Axonopus leptostachyus (*FLÜGGÉ*) *HITCHC* (POACEAE) I. UFMT-CDS II. Título (série)

É concedida à Universidade Federal de Mato Grosso para reproduzir cópias desta dissertação e emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

#### RICARDO APARECIDO RODRIGUES NEPONUCENO

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus todo poderoso (Pai, Filho e Espirito santo) por ter me concedido o dom da ciência, motor que faz os homens buscar a compreensão do conhecimento que esta oculto na natureza, obras de suas mãos.

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus (Pai, Filho e Espirito Santo) por ter me concedido os dons, a força e as graças que me foram necessárias para bem concluir este trabalho. Á a minha venerável Maria santíssima por ter muitas vezes ouvido minhas preces e ter advogado por minhas necessidades junto a Deus, nosso Senhor.

Às minhas amadas, mãe Anaide Rodrigues Neponuceno e esposa Keilla da Silva, mulheres de fibra, força e coragem que nos momentos mais difíceis que enfrentei neste projeto de vida, deram-me muito suporte, apoio e aconselhamento. Ao meu irmão e demais familiares pela torcida.

Agradeço a Universidade Federal de Rondonópolis (UFR), pela sua estrutura e seu corpo de profissionais, por ter proporcionado as condições necessárias para o desenvolvimento desse projeto. A todos os docentes e profissionais envolvidos da pósgraduação em Gestão e Tecnologias Ambiental por terem fomentado o meu aprimoramento profissional e acadêmico.

À meu orientador Dr. Helder Lopes Teles pelo seu modelo de pessoa e profissional acadêmico que estimo, assim como por articular e permitir a execução deste projeto de pesquisa. Minha sincera gratidão por ter me acolhido e dado a oportunidade para engajar na carreira acadêmica desde o início da minha graduação junto a equipe de pesquisa do NUPEC (Núcleo de Pesquisa do Cerrado), como também por ter acreditado no meu potencial, pelos ensinamentos acadêmico e profissional, e sobre tudo, pelos puxões de orelha e correções nos momentos adequados.

Agradeço também ao grupo de pesquisa do NUPEC e aos alunos de graduação do curso de ciências biológicas/bacharelado da UFR, Emanuel Victor S. Nunes e Luscas Fernando Vieira, por terem permitido dar continuidade aos trabalhos de prospecção com os fungos endofíticos que estavam trabalhando.

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) por ter cedido sua estrutura e aos seus profissionais técnicos pelo auxilio na realização das análises espectrométricas.

Meu profundo agradecimento também, à Profa. Dra. Ângela Regina Araújo, coordenadora do Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UNESP (Campus Araraquara) e associada ao grupo de pesquisa do NUBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofiosiologia de produtos naturais), por permitir junto ao

meu orientador, o intercambio no instituto de Química da UNESP (Campus Araraquara). Pelas conversas, ensinamentos e sua importante contribuição nas interpretações das análises de ressonância magnética nuclear (RMN).

À doutoranda em química na UNESP (Campus Araraquara) Julia Deitsche Monfardine pelas conversas e pelos ensinamentos sobre cromatografia liquida de alta eficiência, em camada delgada e em coluna aberta.

Agradeço intimamente aos meus amigos Dhonatan Diego Pessi e Nayara Luanna Nogueira, pelos inúmeros diálogos que tivemos ao longo desta pós-graduação, assim como pelas trocas de experiência acadêmica e nossa amizade sincera.

Por fim, agradeço profundamente à Profa. Dr<sup>a</sup>. Camila Martins de Oliveira (UFR/ICEN/CUR), à Profa. Dr<sup>a</sup>. Helen Cristina Fávero Lisboa (UFR/Enfermagem/ ICEN/ CUR) e à Profa. Dr<sup>a</sup>. Tereza Auxiliadora Nascimento Ribeiro (UFMT/Dep. Química/ Campus Cuiabá) pelas análises, e contribuição para melhoramento do texto nas etapas de qualificação e defesa desse mestrado.

"Dignáre me laudáre te, Virgo sacráta. Da mihi virtutem contra hostes tusos"

(Luís Maria de Grignion de Monfort)

#### **RESUMO**

Os fungos endofíticos contribuem consideravelmente para a produção de metabólitos bioativos de grande valor econômico e com diversas aplicações, principalmente como a antibiótica e agroquímica. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou realizar o isolamento, purificação e elucidação estrutural de metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos endofíticos associados a Axonopus leptostachyus, visando à busca de substâncias com ação antimicrobiana em potêncial. Desta forma, 64 endófitos isolados de A. leptostachyus, foram submetidos aos ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana, contra 5 bactérias e 5 cândidas patogênicas de humanos, semiquantificados e classificados em grupos de alta (AIA), média (MAI) e baixa (BAI) atividade inibitória. Alguns endófitos também foram avaliados para a detecção de possíveis antagonistas do fitopatógeno Corynespora cassicola. Os resultados dos bioensaios somados à análise multivariada permitiram a seleção dos fungos endofíticos com melhor potencial para a obtenção dos metabólitos bioativos, sendo Cladosporum flabelliforme (P5), Microsphaeropsis arundinis (P21) apresentou ótima atividade frente a todos os testes, enquanto para os fungos Talaromyces varreculosus (P24) e Gongronella butleri (P48), Neocosmospora strita (P28) e Penicillium javanicum (P70), Fusarium succisae (P59) e Fusarium oxysporum (P61). Os endófitos foram ativados da preservação no meio BDA (Batata Dextrose Agar), repicados e inoculados para os meios BDA e mínimo em escala reduzida e ampliada. No meio BDA, os endófitos se desenvolveram em 100 mL de meio (5 placas de Petri) sob incubação a 37°C por 15 a 23 dias. Pedaços com BDA e micélios foram cortados randomicamente e macerados por 24 h com 150 mL de acetato de etila (AcOEt). A fase AcOEt foi filtrada à vácuo, concentrada em evaporador rotatório e seca em jato de ar, obtendo-se os extratos brutos AcOEt. No meio mínimo, os fungos cresceram em duplicata de 200 mL sob incubação e agitação orbital por 20 dias. Depois, a suspensão micelar foi filtrada, particionada com AcOEt, e seca para a obtenção dos extratos brutos. Em sequência, os extratos das etapas de triagem e de crescimento em maior escala foram solubilizados e analisados através de CLAE-DAD (Cromatografia Liquida de Alta Eficiência - Detector de Arranjo de Diodo) e RMN <sup>1</sup>H (Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio). Após as análises, foram escolhidos os endófitos P5, P21 e P28 para o fracionamento cromatográfico de seus extratos, visando o isolamento dos compostos responsáveis pelas atividades

detectadas. As substâncias isoladas foram analisadas através de espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, *g*COSY, *g*HMBC e *g*HSQC para a identificação ou elucidação de suas estruturas. O fracionamento do extrato AcOEt de *C. flabelliforme* (P5) resultou no isolamento de um composto em Tr 26 min., ainda não identificado. O estudo de *M. arundinis* (P21) permitiu a identificação de um dímero benzolactonico (1), com estrutura molecular inédita para o gênero *Microsphaeropsis*. Para o fungo *N. striata* (P28) foram isoladas duas substâncias, sendo uma extraída do meio BDA e identificada como um derivado da classe das neocomosinas (2) e a outra extraída do meio mínimo, ainda sob estudo para a identificação estrutural (3).

Palavra-chave: Axonopus leptostachyus, Fungos endofiticos, Bioprospecção, Antifúngicos.

#### ABSTRACT

Endophytic fungi contribute considerably to the production of bioactive metabolites of great economic value and with several applications, mainly as antibiotics and agrochemistry. In this context, the present work aimed to perform the isolation, purification and structural elucidation of secondary bioactive metabolites produced by endophytic fungi associated with Axonopus leptostachyus, aiming to search for compounds with potential antimicrobial action. In this way, 64 endophytes isolated from A. leptostachyus, were subjected to assays to evaluate antimicrobial activity, against 5 bacteria and 5 pathogenic candida from humans, semi-quantified and classified into groups of high (AIA), medium (MAI) and low (BAI) inhibitory activity. Some endophytes were also evaluated for the detection of possible antagonists of the phytopathogen Corynespora cassicola. The results of the bioassays added to the multivariate analysis allowed the selection of endophytic fungi with the best potential for obtaining the bioactive metabolites, with *Cladosporum flabelliforme* (P5), Microsphaeropsis arundinis (P21) showing excellent activity compared to all tests, while for the fungi Talaromyces varreculosus (P24), Gongronella butleri (P48), Neocosmospora strita (P28), Penicillium javanicum (P70), Fusarium succisae (P59) and Fusarium oxysporum (P61). The endophytes were activated from preservation in the BDA medium (Potato Dextrose Agar), peaked and inoculated for the BDA and minimum medium in a reduced and enlarged scale. In the BDA medium, the endophytes were grown in 100 mL of medium (5 Petri dishes) under incubation at 37 ° C for 15 to 23 days. Pieces with BDA and mycelia were randomly cut and macerated for 24 h with 150 mL of ethyl acetate (AcOEt). The AcOEt phase was vacuum filtered, concentrated on a rotary evaporator and dried in an air jet, obtaining the crude extracts AcOEt. In the minimal environment, the fungi grew in duplicate of 200 mL under incubation and orbital shaking for 20 days. Then, the micellar suspension was filtered, partitioned with AcOEt, and dried to obtain the crude extracts. In sequence, the extracts from the screening and growth stages on a larger scale were solubilized and analyzed using HPLC-DAD (High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector) and <sup>1</sup>H NMR (Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance). After analysis, the **P5**, **P21** and **P28** endophytes were chosen for the chromatographic fractionation of their extracts, aiming at the isolation of the compounds responsible for the detected activities. The isolated substances were analyzed using <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy, gCOSY, gHMBC and gHSQC for the identification or elucidation of their structures. The fractionation of the AcOEt extract of *C. flabelliforme* (**P5**) resulted in the isolation of a compound in Tr 26 min., Not yet identified. The study of *M. arundinis* (**P21**) allowed the identification of a benzolactonic dimer (**1**), with an unprecedented molecular structure for the genus *Microsphaeropsis*. For the fungus *N. striata* (**P28**), two substances were isolated, one extracted from the BDA medium and identified as a derivative of the neocomos class (**2**) and the other extracted from the minimal medium, still under study for structural identification (**3**).

Keyword: Axonopus leptostachyus, Endophytic fungi, Bioprospecting, Antifungals.

# SUMÁRIO

Capítulo I	15
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Produtos naturais: uma visão geral	16
1.2 A espécie vegetal Axonopus leptostachyus (Flüggé) Hitchc (Poaceae)	18
1.2.1 Breve estudo fitoquímico de Axonopus spp	20
1.3 Fungos endofíticos	25
1.3.1 Estudo químico de Neocosmospora striata	30
1.3.2 Estudo químico de Microsphaeropsis arundinis.	32
Capítulo II	35
2. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL	35
2.1 Solventes e reagentes:	35
2.2 Especificação dos materiais, instrumentos e técnicas utilizadas	36
2.2.1 Cromatografia em coluna aberta (CC)	36
2.2.2 Cromatografia em camada delgada (CCDC)	36
2.2.3 Cromatografia de alta eficiência (CLAE-DAD)	36
2.2.4 Ressonância magnética nuclear (RMN)	37
2.3 Seleção, coleta e classificação do material vegetal	37
2.4 Isolamento, purificação, classificação e preservação dos fungos endofiticos	37
2.5 Reativação dos fungos em placas de Petri	39
2.6 Triagem biológica: Detecção da atividade antimicrobiana	39
2.6.1 Método do bloco de gelose: antibiose contra patógenos humanos	39
2.6.2 Analise multivariada	41
2.6.3 Método de cultura pareada: antibiose contra fitopatógenos	42
2.7 Critérios de seleção dos endófitos para o cultivo e obtenção dos extratos bru	tos 43
2.8 Cultivo dos fungos endofíticos e obtenção dos extratos brutos	43
2.8.1 Cultivo dos endófitos e obtenção dos extratos brutos em meio BDA	43
2.8.2 Cultivo dos endófitos e obtenção dos extratos fúngicos em meio mínim	o44
2.9 Massas dos extratos brutos	44
2.10 Triagem química	45
2.10.1 Preparo das amostras para análise em CLAE	45

2.10.2 Análises cromatográficas via CLAE-DAD46
2.10.3 Análises cromatográficas via CCDC46
2.10.4 Ressonância Magnética Nuclear - RMN
2.11 Critérios de seleção dos endófitos para exploração dos compostos bioativos 47
2.12 Fracionamento cromatográfico dos extratos fúngicos
2.12.1 Fracionamento do extrato AcOEt de Cladosporium flabelliforme (P5),
obtido em BDA e meio mínimo51
2.12.2 Fracionamento do extrato AcOEt de Microsphaeropsis arundinis (P21),
obtido em BDA56
2.12.3 Fracionamento dos extratos AcOEt de Neocosmospora striata (P28) 59
Capítulo III
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES
3.1 Triagem biológica66
3.1.1 Detecção da atividade antimicrobiana contra patógenos humanos66
3.1.2 Analise estatística
3.1.2.1 Análise de agrupamento68
3.1.2.2 Análise de correlação entre as variáveis
3.1.2.3 Análise discriminante das variáveis74
3.1.2.4 Analise de componente principal76
3.2 Detecção da atividade antimicrobiana contra os fitopatógenos
3.3 Determinação estrutural das substâncias isoladas
3.3.1 Substância 01: isolada do endófito Microsphaeropsis arundinis (P21) 80
3.3.2 Substância 02: isolada do endófito Neocosmospora striata Udagawa (P28)

Capitulo IV	93
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	95

### LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Exsicata de Axonopus leptostachyus (Flüggé) Hitchc
FIGURA 2 - Estrutura molecular de $\beta$ -sitosterol (1) produzido por Axonopus
compressus
FIGURA 3 - Estrutura química de Paclitaxel (2), Podofilotoxina (3), Camptotecina (4),
Vimblastina (5), alcalóide indol prenilado (6), e Belfredina A (7)29
FIGURA 4 - Estruturas de alguns compostos obtidos Neocosmospora vasinfecta E.F.
Smith
FIGURA 5 - Estruturas de alguns compostos obtidos no fungo endofítico
Microsphaeropsis arundinis
FIGURA 6 - Cromatogramas obtidos na etapa de triagem e maior escala de C.
flabelliforme (P5)
FIGURA 7 - Cromatograma de FR1.16-17 do extrato AcOEt em meio Mínimo de C.
flabelliforme
FIGURA 8 - Cromatograma obtido das frações de FR1.16-17 em meio Mínimo de C.
flabelliforme
FIGURA 9 - Cromatograma do extrato bruto AcOEt de M. arundinis (P21)56
FIGURA 10 - CCDC em sílica fase normal do extrato bruto AcOEt de M. arundinis
(P21)
FIGURA 11 - Cromatograma obtido dos extratos AcOEt de N. striata (P28)60
FIGURA 12 - Demonstração percentual das ocorrências antimicrobiana frente aos
patógenos humanos67
FIGURA 13 - Dendrograma com análise de agrupamento hierárquico formando os
grupos de fungos endófitos que apresentaram ação antimicrobiana frente as bactérias
patogênicas (BAI; MAI e AAI)69
FIGURA 14 - Dendrograma com análise de agrupamento hierárquico formando os
grupos de fungos endófitos que apresentaram ação antimicrobiana frente as cândidas
patogênicas (BAI; MAI e AAI)70
FIGURA 15 - Corrplot da matriz de correlação entre as múltiplas variáveis para as
bactérias patogênicas72
FIGURA 16 - Corrplot da matriz de correlação entre as múltiplas variáveis para as
cândidas patogênicas

FIGURA 17 - Plot das densidades empíricas estimadas para as duas variáveis
estratificadas dos 3 grupos de fungos formados com ação antimicrobiana contra as
bactérias patogênicas75
FIGURA 18 - Plot das densidades empíricas estimadas para as duas variáveis
estratificadas dos 3 grupos de fungos formados com ação antimicrobiana contra as
cândidas patogênicas75
FIGURA 19 - Biplot demonstrando a análise de componente principal com as múltiplas
variáveis para os 3 diferentes grupos categorizados de fungos endofíticos contra as
bactérias patogênicas
FIGURA 20 - Biplot demonstrando a análise de componente principal com as múltiplas
variáveis para os 3 diferentes grupos categorizados de fungos endofíticos contra as
cândidas patogênicas
FIGURA 21 - Ilustração dos testes da atividade antimicrobiana frente ao fitopatógeno 79
FIGURA 22 - Proposta para a estrutura molecular da Substância 1
FIGURA 23 - Correlações em Noesy 1D (CD <sub>3</sub> OD) para a proposta da Substância 1 82
FIGURA 24 - Principais correlações observada em RMN – 2D para substância 1 84
FIGURA 25 - Proposta para as fragmentações observadas no espectro de massas da
substância 1
FIGURA 26 - Proposta para a estrutura molecular da Substância 2
FIGURA 27 - Principais correlações observada em RMN – 1 e 2D para substância 291
FIGURA 28 - Interpretação para as medições de halos de inibição e crescimento
micelial no bioensaio
FIGURA 29 - (A) Demonstração dos bioensaios em método adaptado do bloco de
gelose (exemplo: fungo endofítico P28 frente a Candida krusei). (B) Demonstração dos
ensaios biológicos com técnica da cultura pareada (exemplo: fungo endofítico P21
frente ao fitopatógeno Corinespora cassicola)
FIGURA 30 - Cromatogramas obtido dos meios BDA e Mínimo
FIGURA 31 - Cromatogramas obtido dos fungos endofiticos P9, P48, P59 e P61 129
FIGURA 32 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (600 MHz/CD <sub>3</sub> OD) do extrato bruto AcOt de P21-
BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 2,8 mg em tubo de 5 mm
FIGURA 33 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (600 MHz/CD3OD) do extrato bruto AcOt de P21-

FIGURA 34 - (A) Espectro de RMN 1H (600 MHz//Pyr-D5) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 6,2 mg em tubo de 5 mm. ..... 133 FIGURA 35 - (B) Espectro de RMN <sup>1</sup>H (600 MHz//Pyr-D5) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 6,2 mg em tubo de 5 mm. ..... 134 FIGURA 36 - DEPT-135 (150 MHz/CD<sub>3</sub>OD) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-FIGURA 37 - DEPT-135 (150 MHz/Pyr-D5) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-FIGURA 38 - gHSQC (600 MHz/CD3OD) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-FIGURA 39 - Ampliação em gHSQC (600 MHz/CD3OD) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 9.2 mg em tubo de 5 mm. ..... 136 FIGURA 40 - gHSQC (600 MHz/Pyr-D5) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. FIGURA 41 - Ampliação em gHSQC (600 MHz/Pyr-D5) do extrato bruto AcOt de P21-FIGURA 42 - gHMBC (600 MHz/CD3OD) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-FIGURA 43 - Ampliação em gHMBC (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 7,6 mg em tubo de 5 mm. ..... 138 FIGURA 44 - gHMBC (600 MHz/Pyr-D5) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-FIGURA 45 - Ampliação 1 gHMBC (600 MHz/Pyr-D5) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 6,2 mg em tubo de 5 mm. ...... 139 FIGURA 46 - Ampliação 2 gHMBC (600 MHz/Pyr-D5) do extrato bruto AcOt de P21-FIGURA 47 - Ampliação 3 gHMBC (600 MHz/Pyr-D5) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 6,2 mg em tubo de 5 mm. ...... 140 FIGURA 48 - gCOSY (600 MHz/Pyr-D5) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 6,2 mg em tubo de 5 mm......141 FIGURA 49 - Ampliação 1 em gCOSY (600 MHz/Pyr-D5) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 6,2 mg em tubo de 5 mm. ..... 141

FIGURA 50 - Ampliação 2 em gCOSY (600 MHz/Pyr-D5) do extrato bruto AcOt de
P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 6,2 mg em tubo de 5 mm 142
FIGURA 51 - NOESY 1D em 2,11; 2,18; 2,23 e 2,30 ppm (600 MHz/CD <sub>3</sub> OD) do
extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 2,8 mg em tubo
de 5 mm
FIGURA 52 - NOESY 1D em 1,96; 2,03 e 2,30 ppm (600 MHz/Pyr-D5) do extrato
bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 2,8 mg em tubo de 5
mm
FIGURA 53 - TOCSY 1D em 1,96, 2,28 e 2,30 ppm (600 MHz/Pyr-D5) do extrato
bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 6,2 mg em tubo de 5
mm
FIGURA 54 - Espectro de massas (EM-ES +70V) do banco (ACN de HPLC) em modo
negativo
FIGURA 55 - Espectro de massas (EM-ES +70V) do extrato bruto AcOEt de P21-
BDA-Triagem (Substância 1) em modo negativo146
FIGURA 56 - Espectro de massas (EM-ES +70V) do extrato bruto AcOEt de P21-
BDA-Triagem (Substância 1) em modo positivo
FIGURA 57 - Espectro de massas (EM-ES +70V) do MS2 de m/z 207,1027 em modo
positivo de AcOEt de P21-BDA-Triagem (Substância 1) em modo positivo147
FIGURA 58 - Espectro de RMN 1H (600 MHz/CD3OD) da fração FR4.meio (4) de
P28-BDA- Crescimento maior escala. (Substância 2). Obtido com 2,6 mg em tubo de 3
mm
FIGURA 59 - DEPT-135 (150 MHz/CD <sub>3</sub> OD) da fração FR.4.Meio (4) de P28-BDA-
Crescimento maior escala. (Substância 2). Obtido com 2,4 mg em tubo de 5 mm 150
FIGURA 60 - gHSQC (150 MHz/CD3OD) da fração FR.4.meio (4) de P28-BDA-
Crescimento maior escala. (Substância 2). Obtido com 2,6 mg em tubo de 3 mm 150
FIGURA 61 - Ampliação 1 gHSQC (150 MHz/CD3OD) da fração FR.4.meio (4) de
P28-BDA-Crescimento maior escala. (Substância 2). Obtido com 2,6 mg em tubo de 3
mm
FIGURA 62 - Ampliação 2 gHSQC (150 MHz/CD <sub>3</sub> OD) da fração FR.4.meio (4) de
P28-BDA-Crescimento maior escala. (Substância 2). Obtido com 2,6 mg em tubo de 3
mm

```
FIGURA 63 - gHMBC (150 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR.4.meio (4) de P28-BDA-
Crescimento maior escala. (Substância 2). Obtido com 2,6 mg em tubo de 3 mm. ..... 152
FIGURA 64 - Ampliação 1 gHMBC (150 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR.4.meio (4) de
P28-BDA-Crescimento maior escala. (Substância 2). Obtido com 2,6 mg em tubo de 3
FIGURA 65 - Ampliação 2 gHMBC (150 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR.4.meio (4) de
P28-BDA-Crescimento maior escala. (Substância 2). Obtido com 2,6 mg em tubo de 3
FIGURA 66 - gCOSY (600 MHz/CD3OD) da fração FR.4.meio de P28-BDA-
Crescimento maior escala. (Substância 2). Obtido com 2,4 mg em tubo de 5 mm. .... 153
FIGURA 67 - Ampliação 1 gCOSY (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR.4.meio de P28-
BDA-Crescimento maior escala. (Substância 2). Obtido com 2,4 mg em tubo de 5 mm.
FIGURA 68 - Ampliação 2 gCOSY (600 MHz/CD3OD) da fração FR.4.meio de P28-
BDA-Crescimento maior escala. (Substância 2). Obtido com 2,4 mg em tubo de 5 mm.
FIGURA 69 - TOCSY 1D em 4,13, 5,36 e 6,22 ppm (600 MHz CD<sub>3</sub>OD) da fração
FR.4.meio (4) de P28-BDA-Crescimento maior escala. (Substância 2). Obtido com 2,6
mg em tubo de 3 mm......155
FIGURA 70 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD) de FR2.m (2-3) do extrato
bruto AcOEt de P28-Meio mínimo-Crescimento maior escala. (Substância 3). Obtido
FIGURA 71 - NOESY 1D em 2,49; 2,50; 2,51, 2,52 e 3,61 ppm (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da
fração FR2.meio de P28-Meio mínimo-Crescimento maior escala. (Substância 3).
FIGURA 72 - TOCSY 1D em 3,32 ppm (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR2.meio do
extrato bruto AcOEt de P28-Meio mínimo-Crescimento maior escala. (Substância 3).
Obtido com 2,2 mg em tubo de 5 mm......159
FIGURA 73 - HOMODEC 1D em 3,34 ppm (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR2.meio de
P28-Meio mínimo-Crescimento maior escala. (Substância 3). Obtido com 2,2 mg em
```

FIGURA 74 - Espectro gHSQC (150 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR2.meio do extrato bruto AcOEt de P28-Meio mínimo-Crescimento maior escala. (Substância 3). Obtido FIGURA 75 - Ampliação 1 do bidimensional gHSQC (150 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR2.meio de P28-Meio mínimo-Crescimento maior escala. (Substância 3). Obtido com FIGURA 76 - Ampliação 2 do bidimensional gHSQC (150 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR2.meio de P28-Meio mínimo-Crescimento maior escala. (Substância 3). Obtido com FIGURA 77 - Espectro gHMBC (150 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR2.meio do extrato bruto AcOEt de P28-Meio mínimo-Crescimento maior escala. (Substância 3). Obtido FIGURA 78 - Ampliação 1 do bidimensional gHMBC (150 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR2.meio de P28-Meio mínimo-Crescimento maior escala. (Substância 3). Obtido com FIGURA 79 - Ampliação 2 do bidimensional gHMBC (150 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR2.meio de P28-Meio mínimo-Crescimento maior escala. (Substância 3). Obtido com FIGURA 80 - Espectro gCOSY (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR2.meio de P28-Meio mínimo-Crescimento maior escala. (Substância 3). Obtido com 2,2 mg em tubo de 5 FIGURA 81 - Ampliação 1 do bidimensional gCOSY (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR2.meio de P28-Meio mínimo-Crescimento maior escala. (Substância 3). Obtido com FIGURA 82 - Ampliação 2 do bidimensional gCOSY (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR2.meio de P28-Meio mínimo-Crescimento maior escala. (Substância 3). Obtido com FIGURA 83 - Espectro DEPT-135 (150 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR2.meio de P28-Meio mínimo-Crescimento maior escala. (Substância 3). Obtido com 2,2 mg em tubo de 

### LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Relação de compostos isolados de algumas espécies de gramíneas
pertencentes a família Poaceae
TABELA 2 - Metabólitos secundários identificados em espécies de Neocosmospora
spp
TABELA 3 - Metabólitos secundários identificados em Microsphaeropsis arundinis 33
TABELA 4 - Relação de fungos endofíticos extraídos de A. Leptostachyus
TABELA 5 - Relação das massas obtidas nas etapas de extração dos metabólitos45
TABELA 6 - Dados espectroscópicos de RMN obtidos para a substância 1 do extrato
bruto do endófito P21- BDA-Triagem em CD3OD/600 Hz
TABELA 7 - Dados espectrométricos de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (CD3OD/600 Hz) obtidos para
a substancia 1 do endófito P21-BDA-Triagem em Pyr-d6
TABELA 8 - Dados espectrométricos de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (CD3OD/600 Hz) obtidos para
a substância 2 do endófito N. striata (P28)92
TABELA 9 - Atividades antimicrobianas dos fungos endofíticos frente aos
microrganismos patogênicos humano
TABELA 10 - Classificação da atividade antimicrobiana proposta por MATSUURA*,
2004
TABELA 11 - Proposta para a semiquantificação da atividade antimicrobiana
apresentada pelos fungos endofíticos124
TABELA 12 - Semiquantificações das atividades antibióticas apresentadas pelos fungos
endofíticos extraídos das folhas de A. leptostachyus

## LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1 - Fracionamento das frações FR2 de N. striata (P28) em meio mínimo.48
ESQUEMA 2 - Processo de obtenção do extrato AcOEt de M. arundinis (P21) 49
ESQUEMA 3 - Processo para a obtenção dos extratos AcOEt de N. striata (P28) 50
ESQUEMA 4 - Fracionamento do extrato fúngico e das subfrações reunidas de <i>C. flabelliforme</i> (P5)
ESQUEMA 5 - Fracionamento das subfrações reunidas FR 1-2 de M. arundinis (P21)58
ESQUEMA 6 - Fracionamento do extrato AcOEt do meio BDA de N. striata (P28) 61
ESQUEMA 7 - Fracionamento das Frações de FR4 de N. striata em meio BDA 62
ESQUEMA 8 - Fracionamento da Fração FR6 de N. striata em meio BDA63
ESQUEMA 9 - Fracionamento do extrato de N. striata (P28) em meio mínimo 64
ESQUEMA 10 - Fracionamento das frações FR2 de N. striata (P28) em meio mínimo65

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAI: Alta Atividade Antimicrobiana.

AcOEt: Acetato de Etila.

ATCC: American Type Culture Collection.

**BDA:** Batata Dextros Agar.

BAI: Baixa Atividade Antimicrobiana.

C18: Silica gel de fase reversa tipo octadecil silano.

CCDC: Cromatografia em Camada Delgada Comparativa.

CD<sub>3</sub>OD: Metanol deuterado.

CI: Condição inicial.

CIM: Concentração Inibitória Mínima.

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

**DAD:** Detector de Arranjo de Diodos.

DI: Diâmetro do halo de Inibição.

**DEPTD:** Distortionless Enhancement by Polarization Transfer.

DM: Diâmetro do crescimento Micelial.

DMSO-d<sub>6</sub>: Dimetilsulfóxido deuterado.

EI: Evolução da Inibição.

EM: Espectrometria de Massas.

FR: Fração parcial do extrato bruto AcOEt.

gCOSY: gradient Correlation Spectroscopy - Espectroscopia de correlação (<sup>1</sup>H x <sup>1</sup>H).

**gHMBC:** gradient Heteronuclear Single Quantum Coherence – Correlação Heteronuclear de Múltiplas Ligações (<sup>1</sup>H x <sup>13</sup>C).

**gHSQC:** gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlation – Correlação Heteronuclear a uma Ligação (<sup>1</sup>H x <sup>13</sup>C).

**HOMODEC-1D:** Homonuclear Decoupling - Desacoplamento Homonuclear (H-H) em uma Dimensão.

MAI: Média Atividade Antimicrobiana.

MeOH: Metanol.

NOESY-1D: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy - Espectroscopia de Efeito

Nuclear Overhauser em uma Dimensão.

PCA: Analise de Componente Principal.

**RMN:** Ressonância Magnética Nuclear.

RMN de <sup>13</sup>C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono isótopo 13.

**RMN de <sup>1</sup>H:** Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio isótopo 1.

rpm: Rotação por minuto.

SubFR: Subfração da fração parcial do extrato bruto AcOEt.

**TOCSY-1D:** Total Correlation Spectroscopy - Espectroscopia de Correlação Total em uma Dimensão.

TR: Tempo de retenção.

UFLC-DAD: Ultra-Fast Liquid Cromatography.

UV: Ultravioleta.

V. inj.: Volume de injeção.

### LISTA DE SÍMBOLOS

Ø: Diâmetro.
λ: Comprimento de onda.
°C: Graus Celsius.
µL: Microlitro.
µm: Micrometro.
Â: Angstrom.
mg: Miligrama.
min.: Minutos.
mL: Mililitro.
mm: Milímetro.
MHz: Mega-hertz.
ppm: Partes por milhão.
[Amostras]: Concentração comum dado em mg.mL<sup>-1</sup>.
(V/V): Solubilização volume por volume.
δ: deslocamento químico (expresso em ppm).

# Capítulo I

### 1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, o homem tem utilizado plantas no tratamento de doenças, principalmente, em países subdesenvolvidos, onde para a maioria da população pobre, esta é a única terapia disponível.

É assim que ao longo de várias décadas, o estudo de plantas medicinais e mais recentemente, o de seus microrganismos associados, expõem a descoberta de centenas de moléculas com potencial para diversas aplicações.

No Brasil, as abundâncias de espécies vegetais com grande capacidade terapêutica, juntamente com sua comunidade microbiana, proporcionam a investigação de novas substâncias bioativas, apresentando-se como um recurso promissor e eficaz no combate de enfermidades e no controle de vetores e pragas de diversas áreas agricultáveis do país, uma vez que os fármacos e os produtos agroquímicos disponíveis no mercado veem apresentando eficiência limitada devido à resistência dos microrganismos patogênicos.

Assim, este problema se estende para a agricultura, pois o aumento da resistência de fitopatógenos aos defensivos agrícolas se mostra uma causa de enorme prejuízo em grandes culturas como a soja, o milho e o algodão. Contudo, as pesquisas em química de produtos naturais se apresentam como uma solução bem sucedida para a descoberta de novos princípios ativos.

Diante da variedade de espécies vegetais encontradas no Brasil, o grupo das gramíneas do Cerrado também se destaca. Estas plantas possuem diversos microrganismos associados aos seus tecidos que podem reduzir o ataque de insetos, patógenos e herbívoros domésticos, podendo tornar essas plantas mais vigorosas, e consequentemente, menos vulneráveis às doenças.

Neste nicho de microrganismos endofiticos, destacam-se os fungos endofíticos, que vivem no interior dos órgãos e tecidos das plantas, possuem um papel de proteção do hospedeiro, e também são fontes relevantes para a produção de metabólitos especiais bioativos, com amplas possibilidades de aplicação na indústria farmacêutica e na agroquímica.

Esses endófitos vêm se destacando nas últimas décadas na produção de fármacos como antibióticos, antifúngicos, antitumorais e promovem o crescimento da planta. Muitos destes são compostos oriundos do metabolismo secundário dos fungos endófiticos, e pertencem a diversas classes de compostos químicos como alcaloides, policetídeos, esteróis, fenóis, flavonoides, peptídeos, quinonas, terpenos, etc, podendo apresentar propriedades antibacterianas, antifúngicas, citotóxicas, citolíticas, entre outras.

Eles também são utilizados em pesquisas de biotecnologia envolvendo testes antimicrobianos contra vários patógenos humanos, e de biocontrole a inúmeros fitopatógenos com o intuito de identificar substancias de interesse a vários setores econômicos, sobre tudo o farmacêutico e o agroquímico.

Assim, é sob esse olhar, que nas últimas décadas o metabolismo secundário de fungos endofíticos passou a ser estudado, permitindo a descoberta de inéditos compostos com atividades antimicrobianas contra patógenos humanos e fitopatógenos de monoculturas do país.

Neste contexto, evidencia-se a importância do estudo químico destas substâncias para o posterior desenvolvimento de novos fármacos e protótipos para defensivos agrícolas com baixo impacto ambiental.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo obter metabólitos secundários bioativos produzidos pelos fungos endofíticos associados à gramínea *Axonopus leptostachyus (Flüggé) Hitchc (Poaceae)*, visando encontrar substâncias antimicrobianas em potencial contra patógenos humanos e fitopatógenos de *Glycine max* (L.) Merril (soja) e *Gossypium hirsutum L.* (algodão).

#### 1.1 Produtos naturais: uma visão geral

Os produtos naturais podem ser encontrados a partir da origem pré-biotica ou obtidos de microrganismos, plantas e animais, sendo não apenas convenientes da natureza, mas também uma expressão natural do aumento da complexidade dos organismos (SIMÕES, 2018). Podem produzir diversas classes de compostos, como terpenos, esteróides, policetídeos, alcalóides, flavonóides, cumarinas, peptídeos, proteínas, carboidratos, lipídeos, entre outros (SPAINHOUR, 2005). Esses compostos são utilizados pela humanidade há muito tempo através do uso de ervas e folhas para a cura e o alívio de doenças (SAHAR et al., 2015; INACIO, 2018). No entanto, desde 1940, com a descoberta da penicilina, a área de produtos naturais de origem microbiana tem se destacado como uma das mais importantes fontes de pesquisas visando o descobrimento de compostos com potenciais bioativos, que incluem desde agentes antibacterianos (penicilina e cefalosporina), imunossupressores (cicloporinas), redutores de colesterol (mevastatina), anti-helmínticos (ivermectinas), entre outros (NEWMAN; CRAGG, 2016; HUANG; LIN, 2017).

Embora existam outras fontes para a descoberta de fármacos e, consequentemente muita concorrência na busca das substancias bioativas, os produtos naturais ainda conseguem fornecer uma parcela significativa de novos medicamentos.

Segundo Inácio (2018), esses compostos bioativos são produzidos em um estágio específico de desenvolvimento dos organismos vivos, o qual é intrinsicamente dependente das condições do ambiente e da disponibilidade de nutrientes.

Por isso, Chandra (2012) esclarece que diferentes estratégias têm sido utilizadas para aumentar a produção de metabólitos bioativos nos variados organismos, como exemplo, a triagem e a seleção de linhagens celulares com alto desempenho, otimização dos meios de cultura para o crescimento e a produção, cultura de órgão e de células imobilizadas, disponibilização de precursores biosintéticos e produção em escala ampliada.

Nesse contexto, Junior & Bolzani (2012) ressaltam que os avanços da biotecnologia em conjunto ao emprego de técnicas modernas de fracionamento químico, elucidação estrutural e "screening" na busca de novos protótipos bioativos, têm revelado o enorme potencial de microrganismos em fornecer substâncias bioativas com uma ampla gama de aplicações, podendo ser utilizados, por exemplo, como agroquímicos, antibióticos, antiparasitários e como anticancerígenos.

Sobre essa temática, embora considerando a enorme diversidade de microrganismos, apenas um pequeno conjunto de bactérias e fungos foi estudado até o presente momento, a fim de se determinar a produção de metabólitos secundários potencialmente úteis para a humanidade (SPAINHOUR, 2005).

Nestes casos, a área de produtos naturais destaca-se por ser um campo com alto potencial na produção de metabólitos secundários provindo dos microrganismos, considerando a possibilidade do manuseio de diferentes substratos em diversas condições de cultivo. Por isso, é que em diversos programas de triagem de produtos naturais, constatou-se que os fungos endofíticos constituem o grupo mais produtivo quimicamente entre os fungos filamentosos, apresentando uma produção metabólica 73% superior a outros fungos. Como essa produção metabólica é dependente do nicho ecológico no qual está inserido e das interações bióticas e abióticas, recomenda-se que a seleção do endófito a ser estudado, seja realizada com espécies vegetais de diferentes biotas, principalmente as que enfrentam frequentes e intensas interações no ambiente, como plantas de regiões áridas e florestas tropicais (CHAPLA et al., 2014).

Portanto, ressalta-se que é um campo ainda muito pouco explorado frente aos microrganismos vivos que ainda não foram estudados, e cujo potencial de produção de metabolitos ativos são encontrados nos diferentes ambientes ainda são desconhecidos (CAFÊU et al., 2005; JOSEPH; PRIYA, 2011; HUANG; LIN, 2017).

#### 1.2 A espécie vegetal Axonopus leptostachyus (Flüggé) Hitchc (Poaceae)

No Brasil há uma diversidade incrível de gramíneas, incluindo bambus, contando aproximadamente com 210 gêneros e 1.428 espécies, que se dispersam pela Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (BURMAN; FILGUEIRAS, 1993; FILGUEIRAS et al., 2012; FILGUEIRAS et al., 2015). O conhecimento sobre gramíneas nos estados brasileiros é muito heterogêneo, sendo necessário ampliar as pesquisas, sobre tudo aos representantes da família *Poaceae Barnhart* e a cobertura das floras agrostológicas de cada região do país (GUGLIERI-CAPORAL et al., 2017).

A família *Poaceae Barnhart* é composta de plantas cosmopolitas com mais de 700 gêneros e 11.000 espécies distribuídas em ambos os hemisférios (CLAYTON et al., 2006; SOUZA; LORENZI, 2008; THE PLANT LIST, 2010; STEVENS, 2001).

Conforme a lista de espécies de plantas e fungos do Brasil, o estado do Mato grosso possui 424 espécies da família *Poaceae Barnhart* descritas, o que retrata o volume e a importância das coletas realizadas e sua representatividade em herbários acessíveis (*Poaceae in* Flora do Brasil 2020 em construção, 2019). Ela está dividida em 12 subfamílias, sendo a subfamília *Panicoideae* a maior, com cerca de 220 gêneros e aproximadamente 3.300 espécies, distribuídas em 12 tribos (BOLDRINI et al., 2008; VIANA; FILGUEIRAS, 2008). *Panicoideae* possui muitas espécies de expressiva importância econômica e ecológica, especialmente sob o gênero *Axonopus* e *Paspalum* (SKERMAN; RIVEROS, 1992), sendo que o seu centro de diversidade e talvez de origem, está na região central do Brasil (HICKENBICK et al. 1975).

Essa família também é reconhecida por sua importância econômica na produção de grãos e cerais (milho, arroz, trigo, aveia, centeio), biocombustíveis (canade-açúcar), na construção civil (bambus), potencial ornamental para jardins, gramados para campos desportivos ou até mesmo para pastagens, entre outras aplicações. Nos campos associados à floresta com Araucária constituem a principal fonte de forragem para a pecuária (BOLDRINI, 1997; GIRALDO-CANÃS, 2010; LONGHI-WAGNER, 2012).

O gênero *Axonopus* é um dos componentes importantes da diversidade da vegetação campestre brasileira. As espécies deste gênero são comuns nas savanas naturais, campos, áreas perturbadas e sobre afloramentos rochosos de escudos précambrianos da América do Sul (GIRALDO-CAÑAS, 2007; 2010; 2014).

*Axonopus* reside na subfamília *Panicoideae* e inclui três seções e 110 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais (CLAYTON; RENVOIZE, 1986). No Brasil, o gênero está representado por 75 espécies, que apresentam a raque glabra ou pubescente (ROCHA; SECCO, 2004).

Nesse aspecto, a espécie *Axonopus leptostachyus* (Flüggé) Hitchc. é caracterizada por ser uma planta perene, cespitosa, até 1,5 m de altura, glabra; geralmente 2 inflorescências por colmo, pedúnculo até 75 cm de comprimento, eixo até 15 cm de comprimento, até 20 racemos, de 10 a 30 cm de comprimento (FIG. 1).

Os exemplares de *A. leptostachyus* possuem também uma raque triquetra com margem escabrosa, e é levemente pilosa na base, com espigueta de 2,8 a 3 mm de comprimento e 0,7 a 0,8 mm de largura, geralmente com 2 enervações. Possui ainda, o lema e a pálea férteis em cor amarelo-pálidos com 2/3 do comprimento da espigueta, e ápices pubescentes (ROCHA; SECCO, 2004; ANTON, 1986).



FIGURA 1 - Exsicata de Axonopus leptostachyus (Flüggé) Hitchc

Fonte: Allen & Vieira, 2019.

Por fim, o gênero *Axonopus* se faz merecedor de estudos intensivos, primeiramente, pelo importante papel que pode desempenhar na agronomia, dado o grande valor forrageiro de muitas das suas espécies, depois, pelo fato de apresentar até os dias atuais uma taxonomia extremamente confusa (DEDECCA, 1956), e por último, por possuir poucos relatos e informações sobre o estudos fitoquímicos do seu grupo de espécies.

#### **1.2.1 Breve estudo fitoquímico de** Axonopus spp.

Sobre a família *Poaceae Barnhart*, foram realizados várias trabalhos de análises fitoquímicas para diferentes espécies, como a exemplo dos extratos de capim santo (Poaceae) que identificaram a presença de taninos, alcaloides e flavonóides, bem como flavonas e flavonóis (GOMES et al., 2011). Outro estudo com cerca de 31 amostras preliminares das folhas de espécies de Poaceae, demonstrou a presença de flavonoides, saponinas, cumarinas e traços de heterosídeos cardioativos (BARBOSA, 2007).

Nesse contexto, podem-se citar também outras espécies de gramíneas pertencentes a esta família (veja a Tabela 1, p. 22), produtoras de substancias bioativas, tais como Andropogon nodosum, Chloris gayana, Cynodon dactylon, Digitaria decumbens. Panicum maximum, Setaria sphacelata, Setaria verticillata (CHAU; YOUNG, 1975, ABDULLAH et al., 2012; SHIVAKOTI et al., 2015), Anthoxanthum odoratum (YAMAMOTO; FUGII, 1997) e Arundo donax (KHUZHAEV, 2004).

Outras espécies relatadas foram a *Brachiaria brizantha* (KATO-NOGUCHI et al., 2014), a *Cenchrus ciliaris* (KANNAN; PRIYAL, 2015), *Dactylis glomerata* (SCOGNAMIGLIO et al., 2012), *Festuca arundinacea, Festuca paniculata e Festuca rubra* (BERTOLDI et al., 2012; MOLDE, 2005; BOSTAN et al., 2013), *Hemarthria altissima* (TANG; YOUNG, 1982) e *Hordeum vulgare* (HOULT; LOVETT, 1993; KREMER; BEN-HAMMOUDA, 2009).

Estudos fitoquímicos são relatados também para *Imperata cylindrica* (HAGAN et al., 2013; XUAN et al., 2009; EUSSEN; NIEMANN, 1981), *Melinis minutiflora* (MBUTHIA, 1997), *Merostachys riedelian* (TORRES et al., 2014), *Miscanthus sinensis, Miscanthus sacchariflorus Miscanthus transmorrisonensis e Miscanthus transmorrisonensis* (PARVEEN et al., 2013; CHOU; LEE, 1991), *Oryza sativa* (CHUNG et al., 2015; CHUNG et al., 2006), *Spartina alterniflora* (ZHENG et al., 2011), *Sporobolus pyramidalis* (RASMUSSEN; RICE, 1971) e *Vulpia myuros* (AN et al., 2001).

Nesse aspecto, existem inúmeros estudos fitoquimicos e de bioprospecção sobre a família Poaceae, relatando as principais classes de compostos e sua importância para o uso no cotidiano humano. Sobre isso, o estudo fitoquimico para o gênero *Axonopus* spp. tem se demonstrado muito baixo, uma vez que a maior parte das informações relatadas, se concentra na espécie vegetal *Axonopus compressus* (BARTHOLOMEW et al., 2013; OGIE-ODIA et al., 2010).

Nessa espécie, há vários relatos etnomédicos, sobre tudo na região sul da Nigéria, no qual se tem relatos para o uso contra hemorróidas (SOLADOYE et al., 2010), antimalárico (BUSIA, 2007; LOWE, 1989) e antidiabético (IBEH et al., 2011). Também é relatado como fonte de proteína digerível e alto teor de amido (GOHL, 1975), e no Brasil, é amplamente considerado um alimento útil para o ganho de peso de novilhos zebuínos (ROCHA et al., 1962).

Espécies de vegetais	Compostos isolados	Referências
Andropogon nodosum	Ácidos sirínico, vanílico, <i>o</i> -hidroxifenilacético, ferúlico, trans- <i>p</i> -cumarico, cis- <i>p</i> -cumarico e <i>o</i> -cumarico	CHOU; YOUNG, 1975.
Anthoxanthum odoratum	Coumarinas	YAMAMOTO; FUGII, 1997.
Arundo donax	Donaxina, donaxaridina, arundinina	KHUZHAEV, 2004.
Brachiaria brizantha	(6R,9R)-3-Oxo-α-ionol, (6R,9S)-3-oxo-α-ionol, 4-cetopinoresinol	KATO-NOGUCHI et al.; 2014.
Cenchrus ciliaris	Fenóis, flavonóides, saponinas, alcalóides	KANNAN; PRIYAL, 2015.
Chloris gayana	Ácidos ferúlico, <i>p</i> -cumarico, ácido sérico, vanilico, <i>o</i> -hidroxifenilactico, <i>p</i> -hidroxifenilacético, trans- <i>p</i> -coumarico e cis- <i>p</i> -coumarico	CHOU; YOUNG, 1975.
Cynodon dactylon	ácidos <i>p</i> -coumarico, ácido sérico, vanílico, <i>o</i> -hidroxifenilacético, <i>p</i> -hidroxifenilacético, trans- <i>p</i> - coumarico e cis- <i>p</i> -coumarico; alcalóides; terpenóides; saponinas; flavonóides; taninos	ABDULLAH et al. 2012.
Dactylis glomerata	Poligonocinol, 5-aquilresorcinol, 5-alquil-2-metilresorcinol, 5-alquilresorcinol-3-éteres metílicos, 5- eicosanoíl-2-metilresorcinol	SCOGNAMIGLIO et al., 2012.
Digitaria decumbens	Ácidos ferúlico, ácido sérico, vanílico, p-hidroxifenilcético, trans-p-coumarico e cis-p-coumarico	CHOU; YOUNG, 1975.
	E / Z-tesinina-O-40- $\alpha$ -ramnosídeo, E / Z-tesinina, quercetina-3-O-xilosilglucósido, isoramnetina 3-	
Festuca arundinacea	rutinosídeo	BERTOLDI et al., 2012.
Festuca paniculata	Ácidos cafeicos e ferúlicos	MOLD, 2005.
Festuca rubra	N-formil-colina, N-acetil-colina, ergovalina	BOSTAN et al., 2013.
Hemarthria altissima	Ácidos benzóico, fenilacético, hidroxicinâmico, cinâmico, ácido sérico, ferúlico e sináptico	TANG; YOUNG, 1982.
Hordeum vulgare	Ácidos gramínicos, hordenina, benzóico, cafeico, clorogênico, m-cumarico, o-cumarico, p- cumarico, ferúlico, sináptico, cinâmico, vanílico e gentísico, cumarina, apigenina, lutonarina, catequina, saponarina, cianadina, isovitexina, heterodendrina, epovadina, sutherlandina, osmaronina, hordatina, DIBOA, butironitrila	HOUT; LOVETT, 1993; KREMER; BEN-HAMMOUDA, 2009.
Imperata cylindrica	Ácidos gálico, cafeico, salicílico, sináptico, benzóico, cinâmico, ferúlico, clorogênico, linoléico, vanílico, <i>p</i> -cumarico, <i>p</i> -cumarico, <i>o</i> -cumarico, gentisico e <i>p</i> -hidroxibenzóico; emodina; resorcinol; 4-acetil-2-metoxifenol	HAGAN et al., 2013; XUAN et al., 2009; EUSSEN; NIEMANN, 1981.

TABELA 1 Relação de com	postos isolados de algumas espé	écies de gramíneas	pertencentes a família Poaceae
		A contraction of the second	

Fonte: Adaptado de FAVARETTO et al., 2018.

Espécies de vegetais	Compostos isolados	Referências
Melinis minutiflora	1,8-cineol, limoneno, α-pineno	MBUTHIA, 1997.
	<i>p</i> -hidroxibenzóico, benzóico, benzenoacético, 3,4-metilenodioximandélico, salicílico, <i>p</i> -hidroxifenilacético, isovanílico, <i>m</i> -anísico, <i>p</i> -cumarico, protocatecuico, seringal, gálico, ferúlico,	
Merostachys riedeliana a	<i>m</i> -cármico, moleilmandélico e 4-metilenóico; isovitexina	TORRES et al., 2014.
Miscanthus sinensis	Ácidos cafeico, <i>p</i> -cumarico e ferúlico	PARVEEN et al., 2013.
Miscanthus sacchariflorus	Ácidos sirínico, p-cumarico, ferúlico, di-hidroxibenzóico e vanílico	PARVEEN et al., 2013.
Miscanthus transmorrisonensis	Ácidos cafeico, gálico, p-hidroxibenzóico, ferúlico, m-hidroxibenzóico e o-hidroxibenzóico; floridzine	CHOU; LEE, 1991.
Orvza sativa	Ácidos salicílico, <i>p</i> -cumarico, <i>o</i> -hidroxifenilacético, ácido sérico, ferúlico, benzóico, <i>p</i> -hidroxibenzóico, octacosanóico, m-cumarico e o-cumarico; hentriacontano; 1-tetratriacontano]; <i>p</i> -sitosterol; momilactona A; momilactona B; tricina; Benzoato de 3,7-dimetil-n-octan-1-ilo; <i>p</i> -sitosterol-3-O- <i>p</i> -D-glucósido; n-tritriacont-4,12-dieno; n-pentacosano; estigmastanol-3beta- <i>p</i> -gliceroxi-hidrocoumaroato; estigmastanol-3beta-p-butanoxi-hidrocoumaroato; lanast-7; 9 (11) - dien-3a, 15a-diol-3a-D-glucofuranosídeo; 1-fenil-2-hidroxi-3,7-dimetil-11-alde-dictetradecano-2-β-D-glucopiranósido	CHUNG et al., 2015; CHUNG et al., 2006.
Panicum maximum	Ácidos <i>p</i> -hidroxifenilacético, trans- <i>p</i> -coumarico e cis- <i>p</i> -coumarico	CHOU; YOUNG, 1975.
Setaria sphacelata	Ácidos ferúlico, <i>p</i> -cumarico, ácido sérico, vanilico, <i>o</i> -hidroxifenilactico e <i>o</i> -cumarico	CHOU; YOUNG, 1975.
Setaria verticilllata	Alcalóides, flavonóides, saponinas, taninos, terpenóides, fenóis	SHIVAKOTI et al., 2015.
Spartina alterniflora	Ácido adípico, éster isohexilmetílico, hexadecanóico, dibutil ftalato e octadecanóico	ZHENG et al., 2011.
Sporobolus pyramidalis	Ácidos ferúlicos e <i>p</i> -cumaricos	RASMUSSEN; RICE 1971.
Vulpia myuros	Ácidos salicílico, benzóico, protocatecuico, succínico, 3,4-detoxetoxifenol, ácido sérico, hidrocafárico, <i>p</i> -hidroxibenzóico, vanílico, <i>p</i> -hidroxifenilacético, gentísico, <i>p</i> -cumarico, ferúlico e hidrocâmico; álcool coniferílico; hidroquinona; catecol	AN et al., 2001.

TABELA 1 – Relação de compostos isolados de algumas espécies de gramíneas pertencentes a família Poaceae (Continuação)

Fonte: Adaptado de FAVARETTO et al., 2018.

Os estudos fitoquímicos com *A. compressus* revelaram a presença de alcalóides, flavonóides, polifenóis, saponinas, inulinas, celulose e taninos (OGIE-ODIA et al., 2010; IBEH et al., 2013). No entanto, um único composto foi isolado desta espécie, o  $\beta$ -sitosterol (1) (FIG. 2), substância com ação antioxidante e antimicrobiana (RAHMAN et al., 2015).



FIGURA 2 - Estrutura molecular de β-sitosterol (1) produzido por Axonopus compressus

Fonte: Adaptado de RAHMAN et al., 2015.

Devido à pouca informação sobre estudos fitoquimicos, bem como o seu potêncial para o meio ambiente, pecuária e produção de fármacos, o gênero *Axonopus*, principalmente a espécie *Axonopus leptostachyus* (Flüggé) Hitchc., deveria ser melhor investigada. Entretanto, são relatados na literatura, alguns trabalhos voltados para a bioprospecção de compostos bioativos produzidos pelo metabolismo secundário de microrganismos endofíticos, associados na espécie *A. leptostachyus* (NEPONUCENO et al., 2016; NEPONUCENO et al., 2017, NEPONUCENO et al.; 2018; GUBIANI et al, 2019; NUNES et al., 2018, NUNES et al., 2019, VIEIRA; TELES, 2018).

Assim, para esses compostos de origem microbiana endofítica, a indústria agroquímica tem investido na descoberta e aplicação para o controle de pragas e doenças de plantas, devido à biodegradabilidade e baixa toxicidade destas substância (DAYAN et al., 2009). Por isso, os microrganismos endofíticos, como os da família Poaceae, são uma excelente fonte para a exploração de metabólitos secundários com potencial biotecnológico, pois estão diretamente relacionados à planta hospedeira. O seu

isolamento e uso nos bioensaios são uma alternativa na busca por produtos naturais bioativos para o controle biológico e produção de fármacos (AZEVEDO et al., 2000).

#### 1.3 Fungos endofíticos

Os fungos endofíticos são organismos que habitam os espaços inter e intracelulares de espécies vegetais durante parte ou todo o ciclo de vida da planta sem causar danos aparentes ao ser vivo (RAJAMANIKYAM et al., 2017; GOUDA et al., 2016). Eles podem colonizar algas, árvores, gramíneas e plantas herbáceas, sendo encontrados nas sementes, óvulos, frutos, hastes florais, raízes, tubérculos, gomos, xilema e casca das espécies de vegetais (RAJAMANIKYAM et al., 2017; ZHANG et al., 2006).

As espécies vegetais podem hospedar uma ou mais espécies de fungos endofíticos, mas observa-se em diversas plantas a predominância de algumas espécies, evidenciando certa especificidade entre o hospedeiro e o endófito, a qual é influenciada pelas condições ambientais em que a planta está submetida. Essas condições passam por muitas variações, pois os fungos endofíticos colonizam em todo o território terrestre, como exemplo, no ártico, antártica, solos geotérmicos, desertos, oceanos, florestas tropicais, mangues e florestas costeiras (VERZIGNASSI et al., 1996; AZEVEDO, 1998; PEIXOTO et al., 2002; PEIXOTO et al, 2004; SOUZA et al., 2004; ASSUMPÇÃO et al., 2009; CHAPLA, 2013).

Os endófitos estabelecem uma relação simbiótica com a espécie hospedeira a partir da qual podem desempenhar funções relevantes para a sanidade vegetal, pois produzem compostos que podem diminuir a ação de herbívoria sobre os tecidos vegetais, conferir resistência contra fitopatógenos e produzir fitoreguladores que podem aumentar o desenvolvimento da planta (PEIXOTO NETO, 2002). A exemplo disso podemos observar que em espécies vegetais tolerantes à seca, os microrganimos endofiticos ajudam provocar alterações nas características das folhas dessas plantas para reduzir as perdas por transpiração. Na presença de metais pesados protegem as plantas limitando o transporte desses metais assim como o acumulo nos tecidos dos vegetais (ZHANG et al., 2006).

Esta interação entre o fungo endofítico e a espécie hospedeira é controlada pelos genes de ambos os organismos e modulada pelo ambiente, envolvendo um
conjunto complexo de etapas de desenvolvimento em que os genes de ambos os parceiros são ativados ou desativados por sinais específicos. Estes sinais são efetivos em um determinado estágio de desenvolvimento e inativos em outros, podendo ser influenciados pelas condições ambientais. No entanto, o mecanismo como ocorre essa interação ainda é desconhecido (JALGAONWALA et al., 2011; MAYER, 1989).

Kasuri et al (2012) explica que os fungos endofíticos possuem também muitos mecanismos de interação com as estruturas teciduais dos vegetais hospedeiros, que por outro lado são combatidos pelos mecanismos de defesa das plantas. Assim, se as interações fúngicas e a defesa das plantas estão equilibradas, a associação permanece aparentemente assintomática. Todavia, se a planta sucumbe a ação de virulência do fungo, estes passam a ser patogênicos latentes e seu metabolismo secundário torna-se prejudicial ao hospedeiro, seja pelo consumo de seus elementos vitais, ou pela biossíntese de substâncias tóxicas as plantas. Para isso, essas alterações na relação dependem de fatores intrínsecos ou ambientais a que estão envolvidos.

Há aproximadamente 300 mil espécies de plantas, onde cada uma hospeda pelo menos uma espécie de fungo endofítico. Desta forma, considerando o grande potencial desses microrganismos em fornecer metabólitos com atividades biológicas, tornam-se necessários esforços para seus estudos. (BORGES, 2008; WENZEL et al., 2012; INACIO, 2018). Muitos destes compostos, oriundos do metabolismo secundário dos endófitos, pertencem a diversas classes químicas, como alcaloides, policetídeos, esteróis, fenóis, flavonoides, peptídeos, quinonas, terpenos, etc, e podem apresentar propriedades antibacterianas, antifúngicas, citotóxicas, citolíticas, entre outras (CARBUNGCO et al., 2017).

Esses micro-organismos endofíticos são também potencialmente importantes na indústria, especialmente na alimentícia e farmacêutica, e na agricultura através da descoberta de novas moléculas candidatas a agentes agroquímicos de defesa, e através de sua aplicação como vetor genético para o aumento da resistência de culturas vegetais (VERZIGNASSI et al., 1996; SOUZA et al., 2004).

Dessa forma, os fungos endofíticos podem alternativamente ser fontes de fármacos e produtos agroquímicos, considerando-se as vantagens da produção por via biotecnológica (PAMPHILLE et al., 2017. Eles também são utilizados em vários trabalhos de biotecnologia envolvendo testes antimicrobianos contra variados patógenos humanos, e de biocontrole a inúmeros fitopatógenos com o intuito de identificarem

substâncias de interesse a vários setores econômicos, sobre tudo a agroquímica (SOUZA, et al., 2018, GOULART, 2019).

Sob esse contexto, fungos endofíticos associados aos tecidos de vegetais demonstram a habilidade em inibir ou diminuir o desenvolvimento de diversas doenças que afetam culturas de interesse agrícola, a exemplos da murcha do tomateiro, causada pelo fungo *Ralstonia solanacearum* (NAWANGSIH et al., 2011); tombamento nas plantas de algodão, ocasionada pelo fungo *Rhizoctonia solani* (SELIM et al., 2017); brusone no arroz, causada pelo fungo *Pyricularia oryzae* (WIDIANTINI et al., 2017); ferrugem do café, produzida pelo fungo *Hemileia vastatrix* (SHIOMI et al., 2006); podridão vermelha da cana de açúcar, causada pelo fungo *Colletotrichum falcatum* (VISWANATHAN et al., 2003).

Nos casos voltados para a produção de fármacos, podemos citar o exemplo de fungos endofiticos produtores de compostos bioativos antimicrobianos como *Metarhizium anisopliae*, extraído de *Taxus chinensis* que produziu o Paclitaxel (2), *Phialocephala fortinii* obtido de *Sinopodophyllum peltatum* produzindo Podofilotoxina (3), *Entrophospora infrequens* isolado da planta hospedeira *Nothapodytes foetida* com produção de Camptotecina (4) e *Alternaria* sp., extraída de *Catharanthus roseus* com produção de Vimblastina (5), conforme FIG. 3 (CANUTO et al., 2012; PAMPHILLE et al., 2017; SOUZA, et al., 2018, GOULART, 2019).

É sobre esse olhar que nas últimas décadas, trabalhos de bioprospecção do metabolismo secundário de fungos endofíticos passaram a ser estudados com resultados concretos de aplicação, como exemplo do fungo endofítico *Phomopsis cassiae*, isolado das folhas de *Bauhinia variegata*, que produz sesquiterpenos da classe dos calamenos, além de policetídeo, que são inéditos com atividades contra fungos fitopatógenos (MESQUITA, 2012).

Outro exemplo citado é o fungo endofítico *Aspergillus terreus* isolado das folhas de *Axonopus leptostachyus (Poaceae)*, que produziu um alcalóide indol prenilado, como se vê na molécula **6** da FIG. 3 (GUBIANI et al, 2019). Sob esse aspecto, verificou-se também alguns trabalhos de bioprospecção voltados para a obtenção de compostos com atividades antimicrobianas a partir dos metábolitos secundários produzidos pelos fungos endofiticos associados as folhas de *A. leptostachyus*, entre os quais pode-se citar os endófitos *Cladosporum flabeliforme, Fusarium proliferatum, Periconia macrospinosa, Neosatorya pseudofisher,* 

*Neocosmospora striata, Fusarium succisae* e *Fusarium oxysporum* (NEPONUCENO et al., 2016; NEPONUCENO et al., 2018; VIEIRA; TELES, 2019).

Podemos ainda citar o exemplo da forte evidência de associação entre os fungos produtores de Brefeldina A (7) (FIG. 3) e seus hospedeiros, tal como *Aspergillus clavatus* obtido de *Taxus mairei*. Brefeldina A é um macrolídio que protege a planta contra infecções bacterianas, ataques de insetos e de animais (GUNATILAKA, 2006).

O estudo químico dos metabólitos secundários dos fungos endofiticos, destaca-se pela sua importância na descoberta de novas substâncias candidatas a ensaios clínicos para novos fármacos, e protótipos para defensivos agrícolas com baixo impacto ambiental (SANTOS et al., 2013).

Portando, os fungos endofiticos *Microsphaeropsis arundinis* e *Neocosmospora striata*, extraídos das folhas de *Axonopus leptostachyus (Poaceae)* podem permitir a obtenção novas substâncias com ação antimicrobiana com aplicações na saúde humana e na agricultura.



FIGURA 3 - Estrutura química de Paclitaxel (2), Podofilotoxina (3), Camptotecina (4), Vimblastina (5), alcalóide indol prenilado (6), e Belfredina A (7).

Fonte: Adaptado de CANUTO et al, 2012; GUBIANI et al, 2019.

#### 1.3.1 Estudo químico de Neocosmospora striata.

Os metabólitos secundários isolados de fungos pertencentes ao gênero Neocosmospora, se concentram unicamente na espécie *Neocosmospora vasinfecta* E.F. Smith. Essa espécie é um patógeno que causa apodrecimento das raízes, frutos e o amortecimento de plântulas das famílias Malvaceae, Leguminosae, Piperaceae e Cucurbitaceae, incluindo alguns vegetais como a pimenta, amendoim, soja, feijão, coco, Albizziac e outros (DOMSCH et al., 1980; NAKAJIMA et al., 1987).

Foram relatados vários compostos e seus derivados de *N. vasinfecta*, destacando-se ciclosporinas, neocosmosinas, neovasifuranonas, neovasipironas e vasinfectinas, conforme a tabela abaixo e FIG. 4 na página 29.

Substâncias	Compostos químicos	Referências bibliográficas		
8 e 9	Ciclosporinas A e C	NAKAJIMA et al., 1988; NAKAJIMA et al., 1989.		
10	N-Acetyl "C9-Amino Acid" e derivados	NAKAJIMA et al., 1988; NAKAJIMA et al., 1989.		
11	Monorden (radicicol)	McCAPRA; SCOTT, 1964.		
12	Monocilina IV	AHMAD et al., 2004.		
13	Neocosmosin A	PROISY et al., 2006. FURUMOTO et al., 1998.		
14	Neocosmosin B	AYER et al, 1981.		
15	Neocosmosin C	HELLWIG et al., 2003.		
16	Monocilina II	GAO et al., 2013; HARRISON et al, 2003.		
17	Radicicol	GAO et al., 2013; GLASS et al, 1995.		
18	Neovasinona e derivados	FURUMOTO et al, 1989; NAKAJIMA et al., 1987; NAKAJIMA et al, 1989.		
19	Vasinfectinas A e B	FURUMOTO et al., 1997.		

TABELA 2 - - Metabólitos secundários identificados em espécies de Neocosmospora spp.

Fonte: Adaptado pelo próprio auto, 2020.

Assim, como não foram encontradas informações para sustâncias isoladas de *Neocosmospora striata*, o presente levantamento bibliográfico serve para dar suporte na identificação de prováveis compostos obtidos nesse trabalho acadêmico.



FIGURA 4 - Estruturas de alguns compostos obtidos Neocosmospora vasinfecta E.F. Smith.

Fonte: Adaptado pelo próprio auto, 2020.

#### 1.3.2 Estudo químico de Microsphaeropsis arundinis.

As espécies do gênero *Microsphaeropsis* podem ser encontradas e isoladas de esponjas marinhas, plantas, e sedimentos de lagos (HÖLLER et al., 1999; BRAUERS et al., 2000; WANG et al., 2002; HORMAZABALA et al., 2005; GUNATILAKA, 2006; DAI et al., 2007; YOGANATHAN et al., 2008; LUO et al., 2013). Esse gênero é uma rica fonte de compostos bioativos, como os sesquiterpenóides arundinois A–C (20, 21 e 22, FIG. 5) (LUO et al., 2013) e os microsfaeroftalídios A e G, com atividades antifúngicas (31 a 38, FIG. 5) (SOMMART et al., 2012), a antibacteriana microesferina D (YOGANATHAN et al., 2008), as citotóxicas preussomerinas E e I, 30-O-desmetilpreussomerina I (SEEPHONKAI et al., 2002) e os antibióticos TAN-1496s A, C e E. (FUNABASH et al., 1994).

Nesse cenário, *Microsphaeropsis arundinis* é um fungo dematiáceo amplamente distribuído no mundo, emergindo em muitos casos como um patógeno que causa infecções de tecidos moles em hospedeiros imunocomprometidos, com relatos encontrados em seres humanos e gatos domésticos (PENDLE et al., 2004; KROCKENBERGER et al., 2010; HALL et al., 2013; CRAWFORD et al., 2015; ASAHINA et al., 2015; HANASHIRO et al., 2018).

Nesse contexto, o levantamento bibliográfico sobre a constituição química da espécie *M. arundinis* evidenciou a ocorrências de várias classes de produtos naturais, conforme é possível ser observada na tabela 3 da página 31 e FIG. 05, p. 29.

Substâncias	Compostos químicos isolados	Referências bibliográficas		
20 a 22	Arundinois A–C	LUO et al., 2013.		
23	Isocromano-1-ona (arundinona A)	LUO et al., 2013.		
24	Benzofuran-3-(2H)-ona (arundinona B)	YOGANATHAN et al., 2008; LUO et al., 2013.		
25	β-hidroxi-α-ciperon	SANZ et al., 1990; LUO et al., 2013		
-	Microsphaeropsisina	HÖLLER et al., 1999; BRAUERS et al., 2000; WANG et al., 2002.		
-	Microsphaerinas A–D	YOGANATHAN et al., 2008		
-	Palmarumicinas M1 e M2	HORMAZABALA et al., 2005; GUNATILAKA, 2006; DAI et al., 2007.		
26	Eritro-2-metil-5-hidroxifenilpropano-7,8-diol	QIN et al., 2017.		
27	(4S)-4,8-di-hidroxi-3,4-di-hidro-1-(2H)-naftalen-1-ona	SVIRIDOV et al., 1991; QIN et al., 2017.		
28	(4S)-4,6,8-tri-hidroxi3,4-di-hidro-1-(2H)-naftalen-1-ona	SOMMART et al., 2012; QIN et al., 2017.		
29	Crisogesida D	PENG et al., 2011; QIN et al., 2017.		
-	Microsphaeroftalides A e F	SOMMART et al., 2012;		
-	Microsphaerina D	YOGANATHAN et al., 2008		
-	Preussomerinas E e I, e 3'-O-desmetilpreussomerina I	SEEPHONKAI et al., 2002.		
-	Antibiótico TAN-1496s A, C, e E	FUNABASHI et al., 1994.		
30	Microsphaerodiolina	SOMMART et al., 2012;		
31 a 37	Microsphaeroftalides A e G	SOMMART et al., 2012;		
-	Ácido 4-hidroxibenzóico	CHO et al., 1998.		
38	Modiolina	TSUDA et al., 2003.		
39	Ácido desoxiciclopaldico	SHIMADA et al., 2001.		
40	5,7-di-hidroxi-4,6-dimetil-1-(3H)-isobenzofuranona	ACHENBACH et al., 1985.		
41	5-hidroxi-7-metoxi-4-(metoximetil)-6-metilisobenzofuran-1-(3H)-ona	ACHENBACH et al., 1985.		
42	5-hidroxi-7-metoxi-4,6-dimetilftaleto	YU et al., 2006.		
43	7-metoxi-3,4,5,6-tetrametilftalida	KUBOTA et al, 1966.		
44	Esclerina	NATSUME et al., 1988.		
45	6-hidroxi-2-metil-4-cromanona	BHILABUTRA et al., 2007.		
46	Modiolideo B	CHO et al., 1998.		
47	Esclerotinina A	SASSA et al., 1968.		
48	1-(2.5-di-hidroxifenil)-2-buten-1-ona1-(2.5-dihidroxifenil)-2-buten-1-ona	KRAUS: KIRIHARA, 1992.		

TABELA 3 - - Metabólitos secundários identificados em Microsphaeropsis arundinis

**Fonte:** Adaptado pelo próprio auto, 2020.



FIGURA 5 - Estruturas de alguns compostos obtidos no fungo endofítico Microsphaeropsis arundinis

Fonte: Adaptado pelo próprio auto, 2020.

# Capítulo II

#### 2. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

#### 2.1 Solventes e reagentes:

- Meio BDA: Sigma-Aldrich<sup>®</sup> e Acumédia<sup>®</sup>.
- Meio mínimo: é constituído a base de água destilada ultra purificada, sais solúveis de macro e micronutrientes (sulfato de cobre pentahidratado (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) a 98% (m/m), marca Lafan<sup>®</sup>; sulfato de zinco heptahidratado (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) de 99,0-102,0% (m/m), marca Synth<sup>®</sup>; sulfato ferroso heptahidratado (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) a 99% (m/m), marca Vetec<sup>®</sup>; glicose anídrica (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), marca Lofan<sup>®</sup>; sulfato de magnésio monohidratado (MgSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) a 99,5%, marca CRQ<sup>®</sup>, nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>) a 99,0% (m/m), marca Eciba<sup>®</sup>; mobiliado de sódio bihidratado (NaMoO.2H<sub>2</sub>O) a 99,5% (m/m), marca Eciba<sup>®</sup>; cloreto de potássio (KCl) marca Proquimios<sup>®</sup>; borato de sódio decahidratado (Na<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.10H<sub>2</sub>O), e fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a 99,0% (m/m), marca Eciba<sup>®</sup>, marca Eciba<sup>®</sup>, dextrose e nitrato de sódio. Todos os reagentes com grau de pureza P.A.
- Reagentes Deuterado: Clorofórmio-D + folha de prata, (D, 99,8%), 100g, (Tedia Brazil); Dimetil sulfóxido-D6 (D, 99,9%), 100g, SIGMA-ALDRICH<sup>®</sup>; Metanol-D4 (D, ≥ 99,8%), 25g, SIGMA-ALDRICH<sup>®</sup>.
- Reagentes orgânicos: foram utilizados o acetato de etila (AcOEt marcas Dinâmica e QHEMIS<sup>®</sup> a 99,5%); clorofórmio (CHCl<sub>3</sub> marca VETEC<sup>®</sup> e Synth<sup>®</sup> a 99,8%); diclorometano (DCM marca QHEMIS<sup>®</sup> a 99,5%); o álcool metílico (MeOH marcas QHEMIS<sup>®</sup>), ácido acético glacial (marca NEON<sup>®</sup> a 99,8%), álcool etílico absoluto (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) a 99,5% (V/V), marcas CRQ<sup>®</sup> e QHEMIS<sup>®</sup> a 99,5%, formaldeído (marca Synth<sup>®</sup> a 36,5%). (Todos os reagentes com grau de pureza P.A).
- Solvente: Água destila ultrapura
- **Reagentes CLAE-DAD:** metanol grau HPLC (Merck<sup>®</sup> e J. T. Baker<sup>®</sup>); acetonitrila grau HPLC (Merck<sup>®</sup> e J. T. Baker<sup>®</sup>).

# 2.2 Especificação dos materiais, instrumentos e técnicas utilizadas

# 2.2.1 Cromatografia em coluna aberta (CC)

Nas separações cromatográficas em coluna aberta sob baixa pressão foi utilizada a seguinte fase estacionária:

- Sílica C-18 (Polygrupop<sup>®</sup>), espessura de 60-50 Â da marca MACHEREY-NAGEL.
- Sílica fase normal (Silica Flash<sup>®</sup> F60), espessura de 40-63 μm (230-400 mesh) da marca SILICYCLE.

# 2.2.2 Cromatografia em camada delgada (CCDC)

As análises por CCDC foram realizadas em cromatoplacas de 20 X 20 cm, com base de alumínio, sob as fases estacionárias:

- Sílica C-18 (TLC PLATES), espessura de 150 μm, suporte para w/UV da marca Sorbent Tecnologies.
- Sílica gel (MERCK), espessura de 0,2 mm, sem indicador florescente, modelo DC-Alufolien Kieselgel 60 (ohne Fluoreszenzindikator).
- Sílica gel (Whatman<sup>®</sup>), espessura de 250 µm, fluorescência em 254.

# 2.2.3 Cromatografia de alta eficiência (CLAE-DAD)

As análises, separações e purificações dos compostos de interesse foram realizadas por Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, em modo analítico e semipreparativo. Para isso, empregou-se:

**UFLC-DAD 01:** Shimadzu analítico/preparativo, Bombas: LC-20AD, Degasser: CTO-20AC, Autosampler: SIL-20AC, Detector: SPD-M20A, Controladora: CBM-20A e Software: LC-Solution<sup>®</sup>.

**HPLC-DAD 02:** Shimadzu analítico/preparativo, Bombas: LC-6AD, Degasser: DGU-20A5R, Autosampler: SIL-10AF, Injetor manual: Reodyne 7725i, Detector: SPD-M20A, Controladora: CBM-20A e Software: LC-Solution<sup>®</sup>.

**HPLC-DAD 03:** Shimadzu analítico, Bombas: LC-10AD, Degasser: DGU-20A3R, Autosampler: SIL-10AF, Detector: SPD-M10A VP, Controladora: CBM-20A e Software: LC-Solution<sup>®</sup>.

- Coluna analítica (Luna<sup>®</sup>), sílica C18 fase Reversa Phenomenex<sup>®</sup>, 5μ (100 Â) com dimensão de 250 mm X 4,6 mm.
- Coluna Semipreparativa (Luna<sup>®</sup>), sílica C18 fase Reversa Phenomenex<sup>®</sup>, 5μ (100 Â) com dimensão de 250 mm X 10 mm.

#### 2.2.4 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, bem como os experimentos uni e bidimensionais foram registrados em espectrômetro Bruker Avance III 600, operando a 600 MHZ para o núcleo de <sup>1</sup>H e 150 MHz para o de <sup>13</sup>C.

#### 2.3 Seleção, coleta e classificação do material vegetal

A seleção, a coleta e a classificação do material vegetal foram realizadas pelo grupo do Prof. Dr. Marcos Antônio Soares – ICBS/UFMT, a partir dos exemplares de *Axonopus leptostachyus*, uma espécie existente no Pantanal de Mato Grosso, no município de Poconé em Abril de 2012. O material vegetal foi herborizado sendo as exsicatas enviadas para classificação e deposito no herbário da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT/Campus Cuiabá) sob o número 40.492 (OLIVEIRA, 2016).

# 2.4 Isolamento, purificação, classificação e preservação dos fungos endofiticos

Os procedimentos de isolamento, purificação, preservação e classificação dos fungos endofíticos foram realizados pelo grupo do Prof. Dr. Marcos Antônio Soares – ICBS/UFMT, fornecendo 82 linhagens com 58 endófitos diferentes (Tabela 4) (BIZ et al., 2017). Após a classificação dos endófitos, as linhagens purificadas foram preservadas em frascos (tipo penicilina) de vidro transparentes, adicionados a 4 mL de meio BDA e água destilada estéril, seguido de armazenamento a temperatura de aproximadamente 4 °C. As cepas desses endófitos estão depositados na micoteca do Laboratório de Biotecnologia e Ecologia Microbiana (UFMT) e no laboratório de bioprospecção do Núcleo de Pesquisa e Estudo do Cerrado (NUPEC) da Universidade Federal de Rondonópolis (UFR).

Código	Espécies	Código	Espécies		
P1	Neosartorya pseudofischeri	P34	Penicillium janthinellum		
P2	Trichoderma gamsii	P35	Periconia macrospinosa		
P3	Trichoderma erinaceum	P36	Talaromyces verruculosus		
P4	*	P37	Pleosporales sp.		
P5	Cladosporium flabelliforme	P39	Aspergillus viridinutans		
P6	Trichoderma erinaceum	P40	Fusarium proliferatum		
P7	Aspergillus terreus	P41	Penicillium citrinum		
P9	Fusarium proliferatum	P42	Magnaporthales sp.		
P10	Talaromyces verruculosus	P43	Periconia macrospinosa		
P11	Paecilomyces sp.	P44	Fusarium oxysporum		
P13	Fusarium succisae	P45	Magnaporthales sp.11		
P14	Penicillium janthinellum	P46	Aspergillus niger		
P15	Fusarium proliferatum	P47	Fusarium oxysporum		
P16	Microsphaeropsis arundinis	P48	Gongronella butleri		
P17	Cladosporium flabelliforme	P49	Corynespora sp.		
P18	Penicillium solitum	P50	Fusarium succisae		
P19	Penicillium ochrochloron	P51	Nectria sp.		
P20	Aspergillus terreus	P52	Fusarium oxysporum		
P21	Microsphaeropsis arundinis	P53	Lepiotaceae sp.		
P22	Microsphaeropsis arundinis	P55	Trichoderma strigosellum		
P23	Penicillium citrinum	P56	Lentithecium arundinaceum		
P24	Talaromyces verruculosus	P57	Fusarium oxysporum		
P25	Periconia macrospinosa	P58	Corynespora olivacea		
P26	Periconia macrospinosa	P59	Fusarium succisae		
P27	Magnaporthales sp.1	P60	Acremonium sp.		
P28	Neocosmospora striata	P61	Fusarium oxysporum		
P30	Chaetomium bostrychodes	P63	Aspergillus terreus		
P31	Penicillium simplicissimum	P64	Nectria sp.		
P32	Penicillium chermesinum	P65	Magnaporthales sp.5		
P33	Fusarium solani	P66	Magnaporthales sp.2		

TABELA 4 - Relação de fungos endofíticos extraídos de A. Leptostachyus

(\*) fungos endofíticos não identificados.

Fonte: Adaptado de BIZ et al., 2017.

Código	Espécies	Código	Espécies		
P67	Magnaporthales sp.12	P80 Cladosporium flabelliforme			
P68	Magnaporthales sp.7	P81	Cladosporium perangustum		
P69	Magnaporthales sp.8	P82	Fusarium oxysporum		
P70	Penicillium javanicum	P83	Cladosporium flabelliforme		
P71	Magnaporthales sp.3	P85	Pleosporales sp.		
P72	Aspergillus aculeatus	P86	Trichoderma harzianum		
P73	Magnaporthales sp.13	P87	Aspergillus niger		
P75	Lophiostoma cynaroidis	P88	Periconia macrospinosa		
P77	Thielavia terrestris	P89	Talaromyces verruculosus		
P78	Cochliobolus geniculatus	P90	Magnaporthales sp.9		
P79	Nectria sp.	P91	Magnaporthales sp.10		

TABELA 4 – Relação de fungos endofíticos extraídos de A. Leptostachyus (Continuação)

Fonte: Adaptado de BIZ et al., 2017.

# 2.5 Reativação dos fungos em placas de Petri

Os fungos endofíticos isolados de *A. leptostachyus*, que se demonstraram viáveis (64 endófitos), foram submetidos a um crescimento em duplicata em placas de Petri, visando reativar as linhagens preservadas. O meio de cultura BDA foi escolhido para a reativação das espécies. Desta forma, o material (placas e meio de cultura) foi esterilizado separadamente em autoclave por 20 minutos, seguido de inoculação dos endófitos em capela microbiológica. O crescimento dos fungos foi conduzido em estufa microbiológica a 35 °C, entre 7 a 15 dias, sendo utilizado como critério de padronização o crescimento micelar sobre a área total da placa.

# 2.6 Triagem biológica: Detecção da atividade antimicrobiana

#### 2.6.1 Método do bloco de gelose: antibiose contra patógenos humanos

Os ensaios de antibiose pelo método de bloco de gelose foram realizados em triplicata sob delineamento inteiramente casualizado com todas as 64 linhagens viáveis de fungos endofíticos.

Neste método adaptado, foram utilizados os meios de culturas agar Mueller-Hinton e agar Saboraud para a reativação dos patógenos humanos, assim como o meio batata dextrose agar (BDA) para reativação dos fungos endofiticos e a posterior realização dos testes antimicrobianos.

Para verificar a capacidade antagônica dos fungos endofíticos foram utilizadas 5 espécies de bactérias (*Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Enterococcus faecalis e Pseudonomas aeruginosa*) e 5 de fungos leveduriformes (*Candida albicans, Candida krusei, Candida tropicalis, Candida glabrata, e Candida parapsilosis*) patógenos humanos de interesse clínico.

Os fungos endofiticos foram reativados e incubados em um período de 7 dias a 35°C. Em sequência os patógenos humanos foram reativados entre 28 a 35°C com um período de 24 e 48 horas para as bactérias e cândidas, respectivamente.

Após a reativação os patógenos foram inoculados em BDA para crescimento, a partir de culturas recentes, e suas colônias foram raspadas para o preparo de suspensões aquosas padronizadas pela escala 0,5 e 1,0 de MacFarland, para as cândidas e bactérias patogênicas, respectivamente (KONNEMAN et al., 2007). As suspensões ajustadas foram semeadas (100  $\mu$ L) com *swab* estéril em placas de Petri com meio BDA, para cada microrganismo.

Após a semeadura dos patógenos, um disco (8,0 mm diâmetro) do meio BDA contendo o micélio do fungo endofítico foi introduzido no centro da placa, e esta foi submetida à refrigeração a 4 °C por 4 horas. Posteriormente, as placas foram armazenadas em estufa microbiológica a 35 °C para as bactérias e 30 °C para as leveduras, sendo medido o halo de inibição após 24 e 48 horas, respectivamente (FIG. 28 e 29.A do Anexo), seguindo uma adaptação ao método de Matsuura (2004).

Como controle negativo foi inserido um disco nas mesmas proporções somente com meio BDA sem fungo endofítico. Como controle positivo foi utilizado um disco de BDA com gentamicina 20 µg/disco para *S. aureus* e *K. pneumoniae*, ciprofloxacino 5 µg/disco para *E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. faecaelis*, e tioconazol 150 µg/disco para as linhagens de *Candidas*. Os controles foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos para os fungos endofíticos. Os resultados foram obtidos através da medida do diâmetro dos halos de inibição formados ao redor dos discos, utilizando uma modificação da escala sugerida por Matsuura (2004).

#### 2.6.2 Analise multivariada

Após a obtenção dos resultados antimicrobianos, os dados obtidos foram submetidos às análises de Componente Principal (PCA), Descriminantes e Cluster para resumir, classificar e formar grupos hierárquicos, visando apontar os melhores fungos endofíticos para prosseguir em etapas posteriores de prospecção dos compostos bioativos.

Nesse sentido, a análise de PCA, preocupou-se em resumir as variáveis DI (Diâmetro do halo de inibição), DM (Diâmetro do crescimento micelar) e EI (Evolução da inibição) de cada patógeno coletadas sem perda de informação, permitindo explicar através de um grupo seleto de variáveis quais grupos de fungos endofíticos caracterizavam-se pela melhor zona de inibição. Nesse caso, analisou-se a correlação que cada variável teve entre si, sob as demais variáveis e sob o conjunto de dados, que foram submetidos aos cálculos de correlações, gerando uma de matriz de similaridades, que demonstra o percentual de correlações entre variáveis, sendo visualizado por um gráfico a uma matriz de similaridades e dissimilaridades das correlações com limites de escala entre -1 a 1.

Nesta etapa, com o intuito de se obter o melhor desempenho da relação entre as variáveis e a definição na formação dos grupos, realizou-se a analise descriminante sobre os dados a partir de uma matriz de confusão, obtendo-se através da correlação entre as variáveis, o formato para os diferentes grupos, subestimando o erro de classificação, baseando-se nas funções lineares discriminantes de Fisher. Após a análise descriminante, aplicou-se o índice Kappa, com o intuito de checar a confiabilidade e reprodutibilidade dos dados informados.

Já a análise de Cluster, empregou as variáveis vetorizadas do teste de PCA que melhor explicaram a formação dos grupos para aplicar o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*) no qual utilizou o distanciamento euclidiano para agrupar os fungos endofíticos nas categorias de Baixa (BAI), Moderada (MAI) e Alta atividade antimicrobiana (AAI). Nesta análise, optou-se pela adoção de um algoritmo automático baseado na média para o conjunto multivariavel de dados, valores estes que foram calculados a partir do somatório entre os valores de cada variável sob cada fungo endofítico testado, processo que permitiu realizar a separação, caracterização e definição do número de grupos que apresentaram atividade antimicrobiana, estimando-se em três grupos distintos.

Por fim, esses testes multivariados foram realizados pelo software R Studio (2018), versão i386 3.5.2 com os pacotes: "caret"; "cluster", "factoextra", "ggplot2", "corrgram", "lattice", "psych", "GPArotation", "corrplot", "vegan", "ade4", "MASS", "lda", "klaR" (BERNAARDS; JENNRICH, 2005; BOUGEARDE; DRAY, 2018; CHANG, 2015; OKSANEN et al., 2017; KASSAMBARA; MUNDT, 2017; KUHN, 2018; SARKAR, 2008; REVELLE, 2018; VENABLES; RIPLEY, 2002; WEI; SIMKO, 2017; WEILS et al., 2005; WICKHAM, 2016; WRIGHT, 2018).

# 2.6.3 Método de cultura pareada: antibiose contra fitopatógenos

Os fungos endofíticos selecionados e o fitopatógeno *Corynespora cassicola* foram reativados e incubados separadamente a 35°C entre 7 a 10 dias, em placas de Petri com meio BDA (ROMEIRO, 2007).

Após o crescimento e desenvolvimento dos fungos, discos de 8 mm do micélio do fitopatógeno *Corynespora cassicola* e dos endófitos, foram transferidos a cada par (1 fitopatógeno + 1 endófito) para placas de Petri contendo BDA, introduzidos em lados opostos, distanciados por 3 cm (FIG. 29.B do Anexo).

Para o controle negativo, os discos dos endófitos e dos fitopatógenos foram incubados separadamente em placas de Petri, com o objetivo de acompanhar o crescimento na ausência do provável antagonista. O crescimento das colônias foi acompanhado diretamente para cada tratamento, até que o controle negativo alcançasse a borda da placa. Posteriormente foram medidos os halos de inibição, e comparados com o controle negativo, em triplicata, sendo calculada a redução do diâmetro da colônia através da formula:

Diâmetro do fitopatógeno com o antagonista (fungo endofítico) x 100

Diâmetro do fitopatógeno sozinho (controle)

Os resultados adquiridos foram subtraídos de 100 (FILIPPI et al., 2011).

#### 2.7 Critérios de seleção dos endófitos para o cultivo e obtenção dos extratos brutos

Para o cultivo e obtenção dos extratos brutos foram utilizados como critérios os melhores resultados nos ensaios biológicos, corroborados pela análise estatística. A partir dessas analises, foram selecionadas 7 espécies de endófitos extraídas das folhas de *A. leptostachyus* para o cultivo, obtenção de extrato, fracionamento cromatográfico e isolamento dos compostos possivelmente bioativos, sendo elas os fungos P5 (*Cladosporium flabelliforme*), P9 (*Fusarium proliferatum*), P21 (*Microsphaeropsis arundinis*), P28 (*Neocosmospora striata*), P48 (*Gongronella butleri*), P59 (*Fusarium succisae*) e P61 (*Fusarium oxysporum*).

#### 2.8 Cultivo dos fungos endofíticos e obtenção dos extratos brutos

Os endófitos selecionados (P5, P9, P21, P28, P48, P59 e P61) foram submetidos às técnicas de cultivo, extração e obtenção dos extratos brutos, tanto para o crescimento em pequena escala (etapa de triagem química, para todos), quanto para o crescimento em maior escala (etapa de isolamento dos compostos bioativos, após triagem química, apenas para P5, P21 e P28). Após 20 dias de cultivo, tanto em meio BDA quanto em meio mínimo, os extratos brutos AcOEt foram obtidos, conforme os esquemas 1, 2 e 3 (pg, 48, 49, e 50, respectivamente). Nota-se que nesses são apresentados os procedimentos experimentais desenvolvidos somente para os fungos P5, P21 e P28, pois foram selecionados para a continuidade da pesquisa. Os demais endófitos (P9, P48, P59 e P61) apresentam suas massas de extrato bruto na tabela 5, porém não foram submetidos ao fracionamento cromatográfico, conforme justificativa do item 2.11.

#### 2.8.1 Cultivo dos endófitos e obtenção dos extratos brutos em meio BDA

Após o processo de reativação dos fungos endofíticos, pedaços do meio com os fungos crescidos foram recortados assepticamente e inseridos em cinco placas de Petri (Ø= 90 e 120 mm) contendo 20 mL cada do mesmo meio BDA e incubados a 35°C por 15 dias.

Ao final do período de crescimento, o meio de cultura com pedaços micelares foi cortado randomicamente e transferido para frascos de 500 mL contendo

150 mL de acetato de etila. Após 24 h de extração em mesa giratória orbital a 150 rpm, a fase líquida foi filtrada e concentrada em evaporador rotatório à vácuo e ar seco, obtendo-se o extrato bruto em acetato de etila (AcOEt). Para a obtenção dos extratos brutos em maior escala (crescimento em 50 placas de Petri) foram realizados os mesmo procedimentos, bem como para o controle negativo, que é o meio de cultura sem os microrganismos (SANTIAGO et al., 2012).

#### 2.8.2 Cultivo dos endófitos e obtenção dos extratos fúngicos em meio mínimo

Os mesmos endófitos selecionados anteriormente na triagem biológica também foram reativados em BDA e incubados por 15 dias. Em sequência, o meio de cultura juntamente ao micélio foi cortado (1 x 1 cm) e inoculados em 200 mL de Meio Mínimo constituído a base de água destilada, sais solúveis, dextrose e nitrato de sódio, sendo o pH ajustado para 6,8, esterilizados a 121°C por 20 min., e crescidos sob agitação orbital de 150 rpm a 29 °C, por quinze a vinte e três dias (PASTRE et al., 2007).

Após o crescimento, as culturas foram filtradas a vácuo, e a fase aquosa foi submetida à tripla partição com o AcOEt na proporção 2:1 V/V (H<sub>2</sub>O:AcOEt), obtendose a fase orgânica, que posteriormente foi concentrada em rotaevaporador à vácuo e ar seco, obtendo-se o extrato bruto AcOEt (meio mínimo). Foram utilizados como controles negativos dois erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL do meio de cultura sem o fungo endofítico.

Quando necessário, os microrganismos foram novamente cultivados em maior escala (15 erlenmeyers de 500 mL com 200 mL de meio) nas mesmas condições anteriores, para a obtenção de extratos brutos AcOEt em maiores quantidades.

#### 2.9 Massas dos extratos brutos

Após o crescimento dos fungos endofíticos selecionados na etapa de triagem [100 mL de meio BDA (5 placas de Petri) e 400 mL de meio mínimo (2 erlenmeyers de 500 mL)], e etapa de maior escala [1 L de meio BDA (50 placas de Petri) e 3 L de meio mínimo (15 erlenmayer de 500 mL)], foram obtidas as seguintes massas dos extratos brutos AcOEt, conforme a tabela 5, pg. 45.

	Meio BDA		Meio Mínimo	
Microrganismos	M.1 (mg)	M.2 (mg)	M.1 (mg)	M.2 (mg)
Controles	16,80	-	1,9666	-
Cladosporium flabeliforme (P5)	66,70	-	10,80	392,20
Fusarium proliferatum (P9)	38,80	261,00	-	-
Microsphaeropsis arundinis (P21)	81,30	-	-	-
Neocosmopora striata (P28)	70,90	216,10	11,40	168,63
Gongronela butleri (P48)	20,00	-	10,30	53,10
Fusarium succisae (P59)	33,10	136,00	_	-
Fusarium oxysporium (P61)	32,30	172,50	-	-

TABELA 5 - Relação das massas obtidas nas etapas de extração dos metabólitos

(M.1) massas obtidas na etapa de triagem; (M.2) Massas obtidas na etapa em maior escala;

Fonte: Adaptado pelo próprio autor, 2020.

#### 2.10 Triagem química

Os extratos brutos AcOEt dos fungos endofíticos selecionados P5 (*Cladosporium flabelliforme*), P9 (*Fusarium proliferatum*), P21 (*Microsphaeropsis arundinis*), P28 (*Neocosmospora striata*), P48 (*Gongronella butleri*), P59 (*Fusarium succisae*) e P61 (*Fusarium oxysporum*) foram submetidos às etapas de triagem química descritas abaixo:

# 2.10.1 Preparo das amostras para análise em CLAE

Para a análise cromatográfica, uma alíquota de 1 mL cada amostra foi solubilizada em solução hidrometanólica H<sub>2</sub>O:MeOH (5:95 V/V) à 10 mg/mL, e submetida ao processo de "clean-up" (extração em fase sólida) utilizando um cartucho "Sep-Pak" de 6 mL, contendo 1 g de sílica gel (C18) como fase estacionária.

Os cartuchos foram limpos com diclorometano e clorofórmio, e ativados com MeOH. A passagem das amostras pelo cartucho foi auxiliada por ar comprimido e 1 mL de H<sub>2</sub>O:MeOH (5:95 V/V).

Desta forma, considerando que a retenção dos analitos no cartucho é uma variável para cada amostra, ressalta-se que a concentração final pode ser diferente da inicial informada.

#### 2.10.2 Análises cromatográficas via CLAE-DAD

As amostras foram analisadas via CLAE-DAD, em sistema analítico e isocrático, nas seguintes condições:

a) Volume de injeção: 1 a 20 µL.

b) Concentração: aproximadamente 10 mg/mL, porém, variável para cada extrato.

c) Comprimentos de onda: 190 a 800 nm.

d) Coluna: C18.

e) Fluxo: 1 mL/min (Padrão), ou 0,75 mL/min.

f) Sistemas de eluição:

- Gradiente exploratório

1) H<sub>2</sub>O:MeOH (95:5) a (0:100) em 40 min. (Padrão);

2) H<sub>2</sub>O:ACN (95:5) a (0:100) em 40 min;

- Sistemas isocráticos: composições variadas.

O critério de separação adotado foi a obtenção de picos simétricos, apresentando resolução adequada para a separação em escala preparativa. Para a pureza dos compostos, adotou-se a obtenção de um único pico simétrico, mesmo após variação das condições de análise.

# 2.10.3 Análises cromatográficas via CCDC

Os extratos brutos AcOEt foram solubilizados em MeOH e submetidos a testes de cromatografia de camada delgada (CCDC).

Para isso, as cromatofolhas foram cortadas em tamanhos variados conforme o número de análises, entre 2 x 10 cm, 3 x 10 cm e 20 x 10 cm. Em sequência, aproximadamente 5  $\mu$ L dos extratos foram aplicados e eluídos com as misturas de solventes (MeOH:CHCl<sub>3</sub> (10:90 V/V), MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20:80 V/V), MeOH:Et<sub>2</sub>O:Hex (10:40:50 V/V), MeOH:AcOEt (15:85 V/V), MeOH:AcOEt:Hex (15:35:50 V/V), MeOH:CHCl<sub>3</sub>:Hex (15:35:50 V/V), MeOH:CHCl<sub>3</sub>:AcOEt:Hex (20:30:25:25 V/V) e soluções hidrometanólica. Todas as separações cromatográficas foram reveladas e analisadas em câmara escura com luz ultravioleta a 254 e 365 nm, e quando necessário, solução de anisaldeído (EtOH 200 mL +  $H_2SO_4$  10 mL + *p*-anisaldeído 10 mL) sob aquecimento de 110 °C por 15 min.

Por fim, o critério de pureza adotado foi a obtenção de uma única mancha após análise em CCDC, utilizando os diferentes sistemas eluentes.

#### 2.10.4 Ressonância Magnética Nuclear - RMN

Os extratos brutos, frações e subfrações foram solubilizados em solventes específicos à base de deutério e submetidos aos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) junto ao Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBe) da Universidade Estadual Paulista "Julho de Mesquita Filho" (Unesp/Instituto de Química - Campus Araraquara), sob supervisão da Profa. Dra. Ângela Regina Araújo. As substâncias isoladas foram identificadas por RMN uni e bidimensionais, para o núcleo de Hidrogênio (<sup>1</sup>H) e Carbono (<sup>13</sup>C). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz. Todos os espectros foram analisados pelos softwares Bruker TopSpin (versão 3.6.1) e MestreNova® (versão 6.0.2).

### 2.11 Critérios de seleção dos endófitos para exploração dos compostos bioativos

Para a seleção dos fungos endofíticos cujos extratos brutos foram submetidos ao fracionamento cromatográfico e isolamento dos metabólitos secundários, foram utilizados os seguintes critérios: 1) maiores massas de extrato bruto produzidas no crescimento em pequena escala; 2) cromatogramas em CLAE-DAD com melhores resoluções e picos de maior absorção; 3) cromatoplacas de CCDC com o maior número de "spots" (manchas); 4) espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) com sinais mais promissores. A partir dessas analises foram selecionados os extratos dos seguintes fungos: *Cladosporium flabeliforme* (P5) crescido em meio mínimo (Esquema 1); *Microsphaeropsis arundinis* (P21) crescido em meio BDA (Esquema 2); *Neocosmopora Striata* (P28) crescido em meio BDA e em meio mínimo (Esquema 3). A partir dos mesmos critérios os fungos endofíticos P9, P48, P59

e P61, não foram desenvolvidos na etapa de isolamento dos compostos, e cujos cromatogramas são apresentados nas figuras 30 e 31 do Anexo.



ESQUEMA 1 - Fracionamento das frações FR2 de N. striata (P28) em meio mínimo



ESQUEMA 2 - Processo de obtenção do extrato AcOEt de M. arundinis (P21)

Fonte: Ilustração criada pelo autor, 2020.



ESQUEMA 3 - Processo para a obtenção dos extratos AcOEt de N. striata (P28)

Fonte: Ilustração criada pelo autor, 2020.

#### 2.12 Fracionamento cromatográfico dos extratos fúngicos

Os extratos brutos selecionados foram submetidos a diversos métodos de cromatografia em coluna aberta (CC), CLAE-DAD, CLAE-UV em sistemas semipreparativos, e assim fracionados e subfracionados até o isolamento dos compostos de interesse.

# 2.12.1 Fracionamento do extrato AcOEt de *Cladosporium flabelliforme* (P5), obtido em BDA e meio mínimo

Os extratos de P5 após cultivo em menor e maior escala nos meios BDA e Mínimo, respectivamente, foram analisados em CCDC, CLAE-DAD e RMN <sup>1</sup>H para o isolamento dos compostos de interesse (Esquema 1, p. 48).

As análises dos cromatogramas em CLAE-DAD para os extratos do endófito P5 em meio mínimo, revelaram dois picos de baixa absortividade, sendo um em Tr 22 min e outro em Tr 26 min, conforme a FIG. 6.

O extrato bruto AcOEt, crescido em maior escala em meio mínimo, foi submetido ao fracionamento cromatográfico em coluna aberta com sílica C18 e sistemas eluentes com MeOH:H<sub>2</sub>O em gradiente (de 52 a 100% MeOH), fornecendo 4 frações. As frações foram analisadas em CLAE-DAD e RMN de <sup>1</sup>H sendo verificado a presença dos compostos Tr 22 min. e Tr 26 min. na fração 1 (FR1) (Esquema 4, p. 55).



FIGURA 6 - Cromatogramas obtidos na etapa de triagem e maior escala de C. flabelliforme (P5)

Cromatogramas: λ= 216 nm (preto), 220 nm (Rosa), 254 nm (Azul) e 366 nm (vermelho). Condição: Gradiente exploratório [Coluna C18 analítica (250 x 4,6 mm, 5µm, MeOH:H<sub>2</sub>O [(5:95) 40 min. (100:0) 10 min. (100:0) 5 mim. (5:95) 10 min.]; Vazão de 1 mL.min<sup>-1</sup>; V. inj.: 10 µL; **Fonte:** Ilustração elaborada pelo autor, 2020.

Desta forma, FR1 foi fracionada em coluna aberta com C18 em gradiente MeOH:H<sub>2</sub>O, resultando em 19 subfrações.

Após análises em CCDC e CLAE-DAD, as frações foram reagrupadas, com destaque para (FR1.16-17) que continham os compostos majoritários em Tr 22 e Tr 26 min., e um novo pico em Tr 16 min. (Veja Esquema 4, p. 55 e FIG. 7).

FIGURA 7 - Cromatograma de FR1.16-17 do extrato AcOEt em meio Mínimo de C. flabelliforme



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.

Com o intuito de isolar os compostos em Tr 16, Tr 22 e Tr 26 min., optou-se em fracionar FR1.16-17 em coluna aberta com fase estacionária C18 em gradiente MeOH:H<sub>2</sub>O (de 20 a 100% de MeOH), resultando em 8 subfrações. (ESQUEMA 05, p. 53). Após análise em CLAE-DAD destas subfrações, FR1.16-17 (3 meio) e FR1.16-17 (3 fim) se destacaram, pois apresentaram os compostos Tr 22 min. e Tr 26 min., sendo Tr 26 majoritário em FR1.16-17 (3 fim) (FIG. 8). Todavia, o isolamento e caracterização dos compostos alvos passa a ser objeto de futuras pesquisas para o fungo endofítico *Cladosporium flabelliforme* (P5), em virtude de dificuldades experimentais.



FIGURA 8 - Cromatograma obtido das frações de FR1.16-17 em meio Mínimo de C. flabelliforme

Cromatogramas: λ= 210 nm (Azul), 220 nm (Rosa), 254 nm (Roxo) e 366 nm (vermelho). Condição: Gradiente exploratório [Coluna C18 analítica (250 x 4,6 mm, 5µm, MeOH:H<sub>2</sub>O [(5:95) 40 min. (100:0) 10 min. (100:0) 5 mim. (5:95) 10 min.]; Vazão de 1 mL.min<sup>-1</sup>; V. inj.: 10 µL; **Fonte:** Ilustração elaborada pelo autor, 2020.



ESQUEMA 4 - Fracionamento do extrato fúngico e das subfrações reunidas de C. flabelliforme (P5)

Fonte: Ilustração criada pelo autor, 2020.

# 2.12.2 Fracionamento do extrato AcOEt de *Microsphaeropsis arundinis* (P21), obtido em BDA

O extrato AcOEt foi analisado por CLAE-DAD, RMN uni e bidimensional (FIG. 38 a 56 do Anexo) e EM de Alta Resolução sob infusão direta, e revelou a presença de um dímero benzolactônico majoritário (**Substância 1**).

A análise do cromatograma em CLAE-DAD do extrato bruto (FIG. 9) revelou a presença de vários picos cromatográficos, destacando Tr 26 min., sobre o qual poderia ser correlacionado à substância 1.



FIGURA 9 - Cromatograma do extrato bruto AcOEt de M. arundinis (P21)

Condição: Gradiente exploratório [Coluna C18 analítica (250 x 4,6 mm, 5μm, ACN:H<sub>2</sub>O [(5:95) 40 min. (100:0) 10 min. (100:0) 5 mim. (5:95) 10 min.]; Vazão de 1 mL.min<sup>-1</sup>; V. inj.: 10 μL; **Fonte:** Ilustração elaborada pelo autor, 2020.

O extrato foi analisado em CCDC com sílica de fase normal em diferentes sistemas eluentes, destacando MeOH:CHCl<sub>3</sub>:Hex (15:35:50 V/V), que revelou várias manchas (FIG. 10), e direcionou a separação para cromatografia em coluna aberta, com sílica gel de fase normal, no mesmo sistema eluente, sobre o qual se obteve 8 frações (Esquema 2, p. 49).



FIGURA 10 - CCDC em sílica fase normal do extrato bruto AcOEt de M. arundinis (P21)

A) revelado em 254 nm; B) em 365 nm; Eluentes: 1) MeOH:CHCl<sub>3</sub> (10:90 V/V); 2) MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20:80 V/V); 3) MeOH:Et<sub>2</sub>O:Hex (10:40:50 V/V); 4) MeOH:AcOEt (15:85 V/V); 5) MeOH:AcOEt:Hex (15:35:50 V/V); 6) MeOH:CHCl<sub>3</sub>:Hex (15:35:50 V/V); 7) MeOH:CHCl<sub>3</sub>:AcOEt:Hex (20:30:25:25 V/V). **Fonte:** Ilustração criada pelo autor, 2020.

Após análise das 8 frações em CLAE-DAD, verificou-se que a substância de interesse estava presente nas frações 1 a 6, sob Tr 24 min. Desta forma, as frações mais purificadas (FR1 e FR2) foram reunidas e subfracionadas em coluna cromatográfica aberta, usando sílica de fase reversa C18 e sistema gradiente MeOH:H<sub>2</sub>O (30 a 100% MeOH V/V), resultando em 9 subfrações (Esquema 5, p. 58).

As subfrações foram analisadas posteriormente em CLAE-DAD, sendo verificando que a subfração FR 1-2 (5) apresentou o provável dímero benzolactônico (substância 1).



ESQUEMA 5 - Fracionamento das subfrações reunidas FR 1-2 de M. arundinis (P21)

Fonte: Ilustração criada pelo autor, 2020.

#### **2.12.3 Fracionamento dos extratos AcOEt de** Neocosmospora striata (P28)

Os extratos brutos de *N. striata* (P28), cultivados em BDA e meio mínimo nas etapas de triagem e crescimento em maior escala (Esquema 3, p. 50), foram analisados em CLAE-DAD, e os cromatogramas revelaram a presença de diversos picos, destacando Tr 26, 27, 28, 30, 31, 39, 40, 42 e 43 min. para o extrato do meio BDA e os picos em Tr 8, 13, 26 e 34, 39, 40 e 41 min. para o meio mínimo (FIG. 11).

O extrato bruto do meio BDA, após sucessivas análises cromatográficas em CCDC, CLAE-DAD e RMN <sup>1</sup>H, foi fracionado via CLAE-UV utilizando uma coluna semi-preparativa C18 em sistema isocrático MeOH:H<sub>2</sub>O (60:40 V/V) sob vazão de 4 mL.min<sup>-1</sup>, gerando 8 frações, sendo a FR4 coletada em três partes (início, meio e fim do pico cromatográfico em Tr 28 min.). Todas essas foram analisadas em método de gradiente exploratório em CLAE-DAD, e RMN, sendo selecionadas a FR4 e FR6 para continuidade devido a melhor pureza e maior massa (Esquema 6, p. 61).

Na sequência, as três frações de FR4 foram purificadas em coluna cromatográfica aberta, utilizando sílica de fase normal e eluente MeOH:CHCl<sub>3</sub>:Hex (15:35:50 V/V). Nesse processo, foram obtidas 7 subfrações para cada uma das frações do início, meio e fim de FR4 (Esquema 7, p. 62).

A análise de RMN <sup>1</sup>H de todas subfrações permitiu identificar um derivado de neocomosina (Substância 2) em FR4.meio.2 e FR4.meio.4, além de outro composto ainda sob elucidação estrutural em FR4.fim.4.

Para FR6, as análises cromatográficas em CLAE-DAD e CCDC sugeriram um fracionamento em coluna cromatográfica aberta com sistema eluente MeOH:CHCl<sub>3</sub>:Hex (15:35:50 V/V), em sílica de fase normal, obtendo-se 9 subfrações.

Essas subfrações foram reavaliados em CLAE-DAD e espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H, o que permitiu revelar as frações FR 6.1, FR 6.3 e FR 6.5 como diferentes compostos isolados sob o tempo de retenção Tr 32 min. (Esquema 8, p. 63). A elucidação das estruturas ainda se encontra sob estudo.



FIGURA 11 - Cromatograma obtido dos extratos AcOEt de N. striata (P28)

Cromatogramas: λ= 2,12, 216 e 2,44 nn (preto), 210 nm (azul e vermelho), 220 nm (marron, rosa e verde), 254 nm (azul e vermelho) e 366 nm (marron, verde e vermelho). Condição: Gradiente exploratório [Coluna C18 analítica (250 x 4,6 mm, 5µm, MeOH:H<sub>2</sub>O [(5:95) 40 min. (100:0) 10 min. (100:0) 15 mim. (5:95) 10 min.]; Vazão de 1 mL.min<sup>-1</sup>; V. inj.: 10 µL;
Fonte: Ilustração criada pelo autor, 2020.



ESQUEMA 6 - Fracionamento do extrato AcOEt do meio BDA de N. striata (P28)

Fonte: Ilustração criada pelo autor, 2020.


ESQUEMA 7 - Fracionamento das Frações de FR4 de N. striata em meio BDA

Fonte: Ilustração criada pelo autor, 2020.



ESQUEMA 8 - Fracionamento da Fração FR6 de N. striata em meio BDA

Fonte: Ilustração criada pelo autor, 2020.

No extrato AcOEt do meio mínimo, optou-se pelo fracionamento em CLAE-UV utilizando uma coluna semi-preparativa em sistema isocrático MeOH:H<sub>2</sub>O (60:40 V/V) sob vazão de 4 mL.min<sup>-1</sup>, resultando em 4 frações, sendo FR2 coletada em três partes (início, meio e fim do pico cromatográfico) (Esquema 9, p. 64).

A análise de todas as frações em CLAE-DAD permitiu observar uma substância majoritária em Tr 26 min., para as três partes de FR2. Assim, FR2.(inicio), FR2.(meio) e FR2.(fim) foram submetidas à fracionamento em coluna aberta utilizando sílica de fase normal, eluida com MeOH:CHCl<sub>3</sub>:Hex (15:35:50 V/V) (Esquema 10, p.65). Posteriormente, suas subfrações foram purificadas em CLAE-DAD sob sistema isocrático MeOH:H<sub>2</sub>O (60:40 V/V), coluna semi-preparativa com vazão de 3 mL.min<sup>-1</sup>, permitindo isolar a substância em Tr 26 min. nas três frações, e identifica-las como **substância 3**. As subfrações contendo a substância 3 foram reunidas e submetidas as análises espectroscópicas de RMN (FIG. 70 ao 83 do Anexo).



ESQUEMA 9 - Fracionamento do extrato de N. striata (P28) em meio mínimo

Fonte: Ilustração criada pelo autor, 2020.



ESQUEMA 10 - Fracionamento das frações FR2 de N. striata (P28) em meio mínimo

Fonte: Ilustração criada pelo autor, 2020.

# Capítulo III

# **3. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

## 3.1 Triagem biológica

### 3.1.1 Detecção da atividade antimicrobiana contra patógenos humanos

Após a interpretação da metodologia de Matsuura (2004) e da execução de uma nova metodologia adaptada, verificou-se que dos 58 fungos endofíticos diferentes, 14 não foram viáveis na etapa de reativação (Tabelas de 9 a 12 - Anexo). Assim, 44 (100%) foram avaliados quanto aos seus respectivos halos de inibição e suas correspondentes semi-quantificações, e destes, 36 (81,8%) apresentaram inibição frente a um ou mais patógenos, conforme se vê na figura 12.

Nesta avaliação, foram observadas as ocorrências e frequências das atividades antimicrobianas entre fungos endofiticos e patógenos humanos. Assim, foram obtidos os seguintes resultados para as bactérias patogênicas: 61,4% de inibição frente a *Estaphylococcus aureus*, sendo 6,8% categorizada com baixa inibição, 11,4% com moderada e 43,2% alta inibição.

Para *Escherichia coli*, 25,0% de inibição, sendo 9,1% baixa, 4,5% moderada e 11,4% alta ação antimicrobiana. Já para *Klebsiella pneumoniae*, verificou-se como a de menor porcentual de inibição, com apenas 15,9%, categorizado com 9,1% baixa, 4,5%, moderada e 2,3% alta.

*Pseudonomas aeruginosa*, se destacou com 45,5% dos fungos, onde 6,8% apresentaram baixa inibição, 11,4% moderada e 27,3% alta. Por fim, o maior porcentual de inibição foi encontrado para *Enterococcus faecalis* com 63,6%. Destes, 15,9% apresentou baixa, 22,7% moderada e 25,0% alta capacidade inibitória.



FIGURA 12 - Demonstração percentual das ocorrências antimicrobiana frente aos patógenos humanos

(A) patógeno Staphylococcus aureus; (B) patógeno Escherichia coli; (C) patógeno Klebsiella pneumoniae; (D) patógeno Pseudonomas aeruginosa; (E) patógeno Enterococcus faecalis; (F) patógeno Candida albicans; (G) patógeno Candida glabrata; (H) patógeno Candida krusei; (I) patógeno Candida tropicalis; (J) patógeno Candida parapsilosis; (+) Diâmetro do halo de inibição entre 7 a 10 mm; (++) Diâmetro do halo de inibição superior a 14 mm; (+++) Diâmetro do halo de inibição superior a 14 mm; Fonte: Adaptado pelo próprio autor, 2020.

Quanto às leveduras avaliadas, *Candida albicans e C. tropicalis* foram inibidas por 25,0% dos fungos endofíticos, cada uma. Destes, 11,4% e 13,6% com baixa inibição, 6,8% moderada, e 6,8% e 4,6%, alta atividade inibitória, respectivamente.

Já *Candida glabrata e C, krusei*, apresentaram os mesmo porcentuais de inibição, com 27,3% cada. Dentre estes, 13,6% e 15,9% de baixa inibição, 4,5% moderada, e 9,1% e 6,8%, alta inibição, respectivamente. Por fim, 34,1% dos fungos inibiram *Candida parapsilosis*, sendo 15,4% com baixo poder inibitório, 2,3% moderado, e 20,5% alto.

Nesse sentido, embora os dados obtidos tenham gerado bons resultados para a categorização da inibição, o método de avaliação e caracterização aplicado por Matsuura (2004) precisou ser complementado com analises multivariadas para a seleção dos endófitos mais promissores, devido à grande quantidade de microrganismos testados pela técnica.

#### 3.1.2 Analise estatística

#### 3.1.2.1 Análise de agrupamento

Com o objetivo de simplificar a escolha dos melhores endófitos para a bioprospecção, os dados obtidos na Tabela 9 do Anexo foram submetidos à análise multivariada de componentes principal (PCA), discriminantes e de cluster, a fim de compreender quais grupos de variáveis contribuíram para a formação dos grupos de fungos endofiticos e suas categorias de atividade antimicrobiana.

As categorias foram estabelecidas como aquelas que possuem: alta área inibitória (AAI), moderada área inibitória (MAI) e baixa área inibitória (BAI). Ainda sobre essas analises, os dados obtidos para as bactérias e cândidas foram tabulados separadamente, excluindo-se 10 (22,72%) e 28 (63,64%) fungos endofíticos para as análises contra bactérias e cândidas patogênicas, respectivamente. Tais exclusões ocorreram para permitir maior precisão na formação dos grupos, uma vez que esses endófitos não apresentaram atividade antimicrobiana para um ou outro patógeno humano testado, conforme os critérios estabelecidos pelas Tabelas 8 a 11 do Anexo.

O primeiro grupo (Alta Área de Inibição - AAI), o segundo (Média Área de Inibição - MAI) e o terceiro (Baixa Área Inibitória - BAI), geraram conjuntos com 3 (6,8%), 10 (22,7%) e 21 (47,7%) endófitos frente as bactérias patogênicas, respectivamente (FIG. 13).

Sob essa análise, calculou-se para as variáveis das bactérias patogênicas um percentual da linha de corte de aproximadamente 70%, bem como, as similaridades entre as variáveis sob um coeficiente acumulado de 69,45% contendo os valores da análise descritiva das similaridades de 5,79 mm, 24,38 mm, 39,51 mm, 41,02 mm, 52,48 mm e 97,78 mm para o mínimo, primeiro quartil, mediana, média, terceiro quartil e máximo, respectivamente.

A partir dessas análises, pode-se verificar que os fungos endofiticos *Microsphaeropsis arundinis* (P21), *Talaromyces varreculosus* (P24) e *Gongronella butleri* (P48) apresentaram as melhores atividades antibacterianas potenciais, frente aos patógenos avaliados.





Cluster Dendrogram



Fonte: Adaptado pelo próprio autor, 2020.

Frente as cândidas patogênicas, foram obtidos os seguintes agrupamentos de fungos endofíticos: 5 com AAI (11,4%) 1 com MAI (2,3%) e 10 com BAI (22,7%), (FIG. 14).

Para as variáveis das cândidas patogênicas, o cálculo de similaridade revelou uma linha de corte próximo de 65%, coeficiente acumulado de 62,55%, além de uma análise descritiva demonstrando os valores para um mínimo de 12,36 mm, primeiro quartil com 21,63 mm, mediana de 41,45 mm, média 40,37 mm, terceiro quartil com 50,48 mm e valor máximo de 85,25 mm.

Sob esse aspecto, observou-se que os endófitos *Microsphaeropsis arundinis* (P21), *Neocosmospora strita* (P28), *Penicillim javanicum* (P70), *Cladosporium flabeliforme* (P5) e o fungo não identificado (P4) promoveram os melhores resultados antifúngicos contra os fungos leveduriformes patogênicos.





Cluster Dendrogram



As similaridades entre os grupos de fungos endofiticos para o plano cartesiano do dendograma de Cluster, se deram pela relação entre as maiores e menores médias, sendo calculadas as variaveis dos tratamentos para demonstração dos eixos horizontais (fungos endofiticos) e verticais (distância Euclidiana). O eixo horizontal demonstra uma dinâmica seguindo da maior para a menor média das variáveis entre os fungos, sob o sentido contrário ao eixo, ou seja, do lado direito para o esquerdo. Já no eixo vertical, essa dinâmica segue da menor para a maior das médias dos fungos endofiticos, no sentido de cima para baixo.

Portanto, foi possível com esta analise separar os grupos de fungos endofiticos em categorias e em ordem de importância, bem como identificar os mais promissores para a prospecção de seus metábolitos secundários.

# 3.1.2.2 Análise de correlação entre as variáveis

Após a tabulação dos dados, a análise de correlação entre as variáveis, tanto para as bactérias quanto para as cândidas, revelou uma alta percentagem de correlação positiva (acima de 60%), isso demonstra a intensidade nas similaridades entre as correlações DI (Diâmetro do halo de inibição), DM (Diâmetro do crescimento micelial) e EI (Evolução da inibição) para os fungos endofíticos avaliados.

Nesse sentido, observou-se que as melhores correlações positivas encontradas entre as variáveis das bactérias patogênicas (FIG. 15), foram adquiridas entre as correlações de EA\_DM versus PA\_DI (51,07%) e PA\_DM (60,91%). De EC\_DI contra KP\_DI (52%) e KP\_EI (64,08%), além das correlações em EC\_DM versus KP\_DM (62,12%), KP\_EI (59,45%) e PA\_DM (60,77%). Outras correlações positivas foram identificadas entre EC\_EI, KP\_DI (50,45%) e KP\_EI (63,01%). Para as correlações negativas destacaram-se apenas as correlações em EF\_DI x EA\_EI (-10,13%) e EF\_DM x EA\_EI. (15,98%).

Sobre essa análise, verifica-se também que todas as variáveis obtidas para as bactérias patogênicas apresentaram uma moderada (60%) correlação entre si, isso demonstra que as similaridades entre os valores escalonados antimicrobianos, a partir da intersecção entre suas variáveis, aponta para um maior grau de aproximação entre os fungos endófitos e os grupos formados por eles nos agrupamentos bacterianos patogênicos.

Por outro lado, quando analisadas as correlações entre as variáveis para as cândidas patogênicas (FIG. 16), as maiores correlações positivas foram encontradas entre as variáveis CA\_DI versus CG\_DM (69,76%), CK\_DM (77,75%), CK\_EI (68,38%), CT\_DI (93,29%), CT\_DM (84,24), CT\_EI (80,61%), CT\_EI (80,61%), CP\_DI (60%) e CP\_DM (80,27%). Outras variáveis correlacionadas foram entre CA\_DM frente a CG\_DM (85,59%), CK\_DI (87,99%), CK\_DM (91,33%), CK\_EI (65,31%), CT\_DI (84,19%), CT\_DM (97,86%) e CP\_DM (96,53), além das correlações de CA-EI versus CT\_DI (85,01%), CT\_DM (60,49%) e CT\_EI (89,45%).

Foram observadas também as correlações da variável CK\_DI contra CT\_DI (68,21), CT\_DM (83,85%) e CP\_DM (80,68%), enquanto que na variável CK\_DM as correlações positivas ocorreram em CT\_DI (60,81%), CT\_DM (86,50%) e CP\_DM (62,71%).

EA DI EA DM EA DI E S EA\_DM õ Ш EA\_EI EC\_DM EC\_DI ū EC\_DM ЗĽ 0 Q EC\_EI ð KP\_DI ê Ц Ш KP\_DM PADI KP\_EI PA\_DM PA\_DI PAB PA\_DM ō, PA\_EI Ь M EF\_DI ь ū EF\_DM ٠ Ь EF\_EI -1 -0.9 -0.8 -0.7 -0.6 -0.5 -0.4 -0.3 -0.2 -0.1 0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 1

FIGURA 15 - Corrplot da matriz de correlação entre as múltiplas variáveis para as bactérias patogênicas

(DI) Diâmetro do halo de inibição; (DM) Diâmetro do crescimento micelial; e (EI) Evolução da inibição;
 (EA) patógeno Staphylococcus aureus; (EC) patógeno Escherichia coli; (KP) patógeno Klebsiella pneumoniae; (PA) patógeno Pseudonomas aeruginosa; (EF) patógeno Enterococcus faecalis;
 Fonte: Adaptado pelo próprio autor, 2020.



FIGURA 16 - Corrplot da matriz de correlação entre as múltiplas variáveis para as cândidas patogênicas

(DI) Diâmetro do halo de inibição; (DM) Diâmetro do crescimento micelial; e (EI) Evolução da inibição;
(CA) patógeno Candida albicans; (CG) patógeno Candida glabrata; (CK) patógeno Candida krusei;
(CT) patógeno Candida tropicalis; (CP) patógeno Candida parapsilosis;
Fonte: Adaptado pelo próprio autor, 2020.

Cândidas patogenicas

Por último, observaram-se também as correlações positivas de CT\_DI a CP\_DI (63,49%) e a CT\_DM (79,41%), além das correlações de CK\_EI *versus* CT\_DM (62,71%) e CT\_DM *versus* CP\_DM (95,76%). Em contra partida, foi observada uma baixa correlação negativa entre as variáveis CG\_EI *versus* CT\_EI (-6,15%) e CP\_EI contra CG\_EI (6,14%) e CK\_DM (-9,86%).

Essa análise revelou que uma parte significativa das variáveis das leveduras apresenta ótimas correlações entre si. Isso demonstra que a similaridade entre estas é alta, evidenciando a consistência na formação dos grupos de fungos endofiticos gerados no teste agrupamento hierárquico.

Por fim, as similaridades baixas obtidas a partir das correlações negativas em ambos os casos, permitiram observar quais variáveis não estão intimamente correlacionadas na formação dos grupos de endófitos. Além disso, as análises de correlações sugerem que todas as variáveis em seus respectivos dados antimicrobianos, estão amplamente relacionadas, pois evidenciam como a disposição e a organização dos fungos endofiticos são estabelecidos no sistema de agrupamento hierarquizado.

## 3.1.2.3 Análise discriminante das variáveis

Na análise discriminante realizada frente as bactérias e fungos leveduriformes, foi possível determinar a acurácia do método como sendo 1 e 0,9375, respectivamente, ou seja, a probabilidade da precisão dos resultados foi altamente significativa, uma vez que o P-valor foi de 0,00002882 e 0,005746, entre bactérias e cândidas, respectivamente. Esses resultados indicam a presença de diferença significativa entre as variáveis que proporcionam a formação dos grupos de endófitos que apresentaram atividade antimicrobiana. O índice Kappa foi também considerável com valores de 1,00 (bactérias) e 0,8849 (cândidas). Nesse caso, como são 3 grupos com 15 variáveis, têm-se então, 2 variáveis estratificadas, sendo revelado LD1 (61,58%), LD2 (38,42%) para bactérias e LD1 (91,47%), LD2 (8,53%) para cândidas, conforme se observa nas figuras 17 e 18.





(LD1) Primeira discriminante linear; (LD2) Segunda discriminante linear; (AAI) Alta Área de Inibição;
 (MAI) Média Área de Inibição; (BAI) Baixa Área Inibitória.
 Fonte: Adaptado pelo próprio autor, 2020.

FIGURA 18 - Plot das densidades empíricas estimadas para as duas variáveis estratificadas dos 3 grupos de fungos formados com ação antimicrobiana contra as cândidas patogênicas



(LD1) Primeira discriminante linear; (LD2) Segunda discriminante linear; (AAI) Alta Área de Inibição;
 (MAI) Média Área de Inibição; (BAI) Baixa Área Inibitória.

Fonte: Adaptado pelo próprio autor, 2020.

Sobre esse aspecto, a influência das variáveis para os patógenos pode ser compreendida melhor através de um gráfico de dispersão conjuntamente com as correlações entre as variáveis originais que são representadas por vetores categorizados, conforme sua contribuição em um eixo adicional.

Nessas situações, as categorias AIA, MAI e BAI estão distribuídas no plano cartesiano do gráfico, formando agrupamentos separados no espaço por critérios estatísticos que permitem averiguar o grau de reprodutibilidades dos dados antimicrobianos.

# **3.1.2.4** Analise de componente principal

Neste caso, é possível observar que as variáveis vetorizadas estão agrupadas no primeiro e segundo quadrante, onde, no plano bidimensional, se verifica a presença dos grupos AAI e MAI localizados na direção das variáveis com vetores de média maiores entre o primeiro e o segundo quadrante. Já no grupo BAI verifica-se a sua dispersão sobre todos os quadrantes.

Para tal efeito, observaram-se entre as variáveis das bactérias patogênicas, os autovalores percentuais para as dimensões Dim1 (43,2%) e Dim2 (16,9%), com a relação dos vetores e sua contribuição para as variáveis resumidas mais significativas, sendo nesse caso, a formação do componente principal 1 (EC\_DI; EC\_DM; EC\_EI; KP\_DI; KP\_DM; KP\_EI; PA\_DI; PA\_DM e PA\_EI) e o componente principal 2 (EF\_DI; EF\_DM; e EF\_EI).

As análises das PCA's revelaram que as variáveis descriminadas acima, indicam que os dados obtidos para os patógenos *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae, Pseudonomas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* contribuíram consideravelmente para a composição, formação e distribuição dos grupos categorizados em AIA, BAI e MAI, conforme a FIG. 19.



FIGURA 19 - Biplot demonstrando a análise de componente principal com as múltiplas variáveis para os 3 diferentes grupos categorizados de fungos endofíticos contra as bactérias patogênicas

(Dim1) Primeira dimensão; (Dim2) Segunda dimensão; (DI) Diâmetro do halo de inibição; (DM)
Diâmetro do crescimento micelial; e (EI) Evolução da inibição; (EA) patógeno *Staphylococcus aureus*;
(EC) patógeno *Escherichia coli*; (KP) patógeno Klebsiella pneumoniae; (PA) patógeno Pseudonomas aeruginosa; (EF) patógeno Enterococcus faecalis;
Fonte: Adaptado pelo próprio autor, 2020.

Entretanto, ao se avaliar a influência das variáveis para as Cândidas, observou-se que as variáveis vetorizadas na análise estão dispostas também entre o primeiro e o segundo quadrante, no qual observa-se majoritariamente o grupo AAI. O grupo MAI se concentra somente no quarto quadrante, enquanto o grupo BAI, nos quadrantes terceiro e quarto do plano bidimensional da PCA. Neste caso, observaram-se autovalores percentuais para as dimensões Dim1 (59,9%) e Dim2 (16,3%) com a relação dos vetores e sua contribuição para as variáveis resumidas mais significativas para a formação do componente principal 1 (CA\_DI; CA\_DM; CA\_EI; CG\_DM; CK\_DI; CK\_DM; CK\_EI; CT\_DI; CT\_DM e CP\_DM) e o componente principal 2 (CP\_EI; CP\_DI; CT\_EI; CG\_EI e CG\_DI).

Nesse aspecto, as PCA's identificaram nas variáveis das cândidass, aquelas que mais contribuíram para a composição, formação e distribuição dos grupos categorizados em AIA, BAI e MAI, conforme a FIG. 20.



FIGURA 20 - Biplot demonstrando a análise de componente principal com as múltiplas variáveis para os 3 diferentes grupos categorizados de fungos endofíticos contra as cândidas patogênicas

(DI) Diâmetro do halo de inibição; (DM) Diâmetro do crescimento micelial; e (EI) Evolução da inibição;
 (CA) patógeno Candida albicans; (CG) patógeno Candida glabrata; (CK) patógeno Candida krusei;
 (CT) patógeno Candida tropicalis; (CP) patógeno Candida parapsilosis;
 Fonte: Adaptado pelo próprio autor, 2020.

Após as análises estatísticas, foi possível identificar através das similaridades entre as variáveis e das componentes geradas, os fungos endofíticos mais promissores para a prospecção dos compostos com atividades antibacterianas e antifúngicas. Assim, destacaram-se os endófitos *Cladosporium flabeliforme* (P5), *Microsphaeropsis arundinis* (P21), *Talaromyces varreculosus* (P24), *Neocosmospora strita* (P28), *Gongronella butleri* (P48) e *Penicillim javanicum* (P70), com os melhores resultados na ação antimicrobiana frente aos 10 patógenos humanos.

Todavia, para a continuidade do trabalho, foi possível selecionar apenas os endófitos P5, P21, P28 e P48, uma vez que os fungos P24 e P70 apresentaram problemas de crescimento na etapa de reativação. Desta forma, em substituição, três outros fungos P9 (*Fusarium proliferatum*), P59 (*Fusarium succisae*) e P61 (*Fusarium oxysporum*) foram também selecionados para a continuidade da pesquisa, mesmo não apresentando os melhores resultados de ação inibitória nas análises estatísticas.

# 3.2 Detecção da atividade antimicrobiana contra os fitopatógenos

Foram realizados os testes de atividade antimicrobiana de cultura pareada, de forma qualitativa, confrontando os fungos endofíticos selecionados contra o fitopatógeno *Corynespora cassicola*, para identificar os endófitos com produção de possíveis compostos bioativos, e posteriormente proceder o isolamento e caracterização destas substâncias (FIG. 21).



FIGURA 21 - Ilustração dos testes da atividade antimicrobiana frente ao fitopatógeno

Cc: Fitopatógeno Corynespora cassicola; P5: endófito Cladosporium flabelliforme; P9: endófito Fusarium proliferatum; P21: endófito Microsphaeropsis arundinis; P28: endófito Neocosmospora striata; P59: endófito Fusarium succisae e P61: endófito Fusarium oxysporum. Fonte: Ilustração criada pelo autor, 2019.

Nesse teste inicial, todos os 6 endófitos selecionados apresentaram atividade antimicrobiana contra *Corynespora cassicola*, quando colocados sob competição após 20 dias de crescimento, destacando-se os fungos endofiticos P5, P21, P59 e P61.

### 3.3 Determinação estrutural das substâncias isoladas

## 3.3.1 Substância 01: isolada do endófito Microsphaeropsis arundinis (P21)

A análise do espectro RMN <sup>1</sup>H (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD, FIG. 32 - Anexo) do extrato bruto AcOEt apresentou um composto majoritário, evidenciado por 2 sinais em  $\delta 1,50$  (d, <sup>3</sup>J = 6,84 Hz, 3H) e  $\delta 1,51$  (d, <sup>3</sup>J = 6,25 Hz, 3H) na região de hidrogênios alifáticos, acoplados em <sup>3</sup>J aos sinais em  $\delta 4,45$  (ql, <sup>3</sup>J = 7,02 Hz, 1H) e  $\delta 4,23$  (ql, <sup>3</sup>J = 7,44 Hz, 1H), respectivamente. O espectro também evidenciou 6 singletos metílicos, com integral proporcional, em  $\delta 2,11$  (s, 3H),  $\delta 2,18$  (s, 3H),  $\delta 2,20$  (s, 3H),  $\delta 2,22$  (s, 3H),  $\delta 2,23$  (s, 3H) e  $\delta 2,30$  (s, 3H), associados a sistemas aromáticos (Tabela 6, p. 87). No entanto, a realização do segundo experimento de RMN <sup>1</sup>H com maior massa de extrato, no mesmo solvente (FIG. 33, Anexo), evidenciou apenas três metilas aromáticas com a mesma proporção, em  $\delta 2,11$  (s, 3H),  $\delta 2,20$  (s, 3H) e  $\delta 2,23$  (s, 3H), e um único dubleto em  $\delta 1,51$  (d, <sup>3</sup>J = 6,25 Hz, 3H). Esta evidência, somada aos experimentos complementares descritos abaixo, permitiu a sugestão de um sistema dimérico com duas benzolactonas (FIG. 22).

#### FIGURA 22 - Proposta para a estrutura molecular da Substância 1



Fonte: Ilustração criada pelo autor, 2020.

No espectro de RMN DEPT-135 (150 MHz/CD<sub>3</sub>OD, FIG. 36 - Anexo), foram registrados 10 sinais de carbonos, sendo dois quaternários ( $\delta$ 122,99 e  $\delta$ 126,13), quatro metílicos ( $\delta$ 10,96,  $\delta$ 15,00,  $\delta$ 15,96 e  $\delta$ 16,05), um sp<sup>3</sup> ( $\delta$ 41,87) e três oxigenados ( $\delta$ 137,33,  $\delta$ 142,06 e  $\delta$ 173,02), atribuídos às posições conforme Tabela 6.

A análise do mapa de contorno gHSQC revelou 7 carbonos em  $\delta 10,96$ ,  $\delta 15,00$ ,  $\delta 15,70$   $\delta 15,96$ ,  $\delta 16,05$ ,  $\delta 16,20$ , e  $\delta 41,87$  correlacionados diretamente aos hidrogênios  $\delta 2,18$ ,  $\delta 2,11$ ,  $\delta 2,23$ ,  $\delta 2,20$ ,  $\delta 1,51$ ,  $\delta 1,50$  e  $\delta 4,45$ , respectivamente (FIG. 38 e 39).

Na análise em *g*HMBC foi possível visualizar a relação entre os hidrogênios e seus respectivos carbonos a <sup>3</sup>*J*, sendo H9' ( $\delta$ 1,50) com  $\delta$ 41,87,  $\delta$ 137,33 e  $\delta$ 173,02 ppm; H10' ( $\delta$ 2,11) com  $\delta$ 126,60;  $\delta$ 137,40 e  $\delta$ 142,40 ppm; H12' ( $\delta$ 2,23) com  $\delta$ 122,90,  $\delta$ 136,60 e  $\delta$ 142,20 ppm; e H11 ( $\delta$ 2,18) com  $\delta$ 122,90,  $\delta$ 136,60,  $\delta$ 142,20 e  $\delta$ 156,90 ppm; (FIG. 42 e 43).

Com o intuito de determinar a posição dos hidrogênios metílicos, foram feitas análises utilizando a técnica NOESY 1D, com irradiação seletiva nos hidrogênios  $\delta 2,11$ ,  $\delta 2,18$ ,  $\delta 2,23$  e  $\delta 2,30$ . A irradiação em H10' ( $\delta 2,11$ ) revelou suas correlações espaciais com os hidrogênios H9' ( $\delta 1,50$ ) e H2' ( $\delta 4,45$ ), enquanto que de H12' ( $\delta 2,23$ ) evidenciou com H9' ( $\delta 1,50$ ) e H10' ( $\delta 2,11$ ). Já os hidrogênios H11 ( $\delta 2,18$ ) e H12 ( $\delta 2,30$ ) não apresentaram efeito NOE visível para esse experimento (FIG. 23 e 51).



FIGURA 23 - Correlações em Noesy 1D (CD3OD) para a proposta da Substância 1

Noesy 1D em 2,11 ppmNoesy 1D em 2,23 ppm

Fonte: Ilustração criada pelo autor, 2020.

Entretanto, a freqüente atenuação e intensificação dos sinais dos singletos metílicos, em H11 ( $\delta$ 2,18), H11' ( $\delta$ 2,20) e H12 ( $\delta$ 2,30) (Tabela 6, FIG. 32 e 33 - Anexo), bem como em H10' ( $\delta$ 1,94), H11' ( $\delta$ 2,16), H10 ( $\delta$ 2,02) e H9 ( $\delta$ 1,42 ppm) observados a cada novo espectro RMN <sup>1</sup>H obtido (Tabela 7, FIG 34 e 35 – Anexo), sugeriu a estrutura do dímero com anéis benzolactônicos, onde a rotação entre as ligações C-5 e C-5', possa ter causado um provável efeito anisotrópico, fazendo com que as metilas apresentassem um comportamento diferenciado sob ação do campo magnético.

Outro fator ainda não esclarecido na rotação das ligações se refere à influência da presença ou ausência de um oxigênio entre C5 e C5', que poderia causar a mudança de ângulo e distância entre os anéis. Todavia, as análises uni e bidimensionais de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C não elucidaram essas duas hipóteses, uma vez que não evidenciaram os sinais de deslocamentos químicos para estes carbonos.

No intuito de corroborar com a evidência anisotrópica da substância 1, o mesmo extrato bruto AcOET foi analisado em piridina deuterada, utilizando os mesmos parâmetros espectroscópicos anteriores, cujos dados são observados na Tabela 7.

Neste caso, o espectro RMN <sup>1</sup>H (600 MHz/Pyr-D5, FIG. 34) evidenciou 2 sinais em  $\delta 1,42$  (d, <sup>3</sup>*J* =7,38 Hz, 3H) e  $\delta 1,96$  (d, <sup>3</sup>*J* = 7,02 Hz, 3H) na região de hidrogênios alifáticos, acoplados em *g*COSY (FIG. 48) aos sinais  $\delta 4,29$  (q, <sup>3</sup>*J* = 7,44 Hz, 1H) e  $\delta 4,35$  (q, <sup>3</sup>*J* = 7,02 Hz, 1H), respectivamente. O espectro também evidenciou os singletos metílicos integrados para 3 Hs e também associados aos anéis aromáticas em  $\delta 1,96$  (s),  $\delta 2,02$  (s),  $\delta 2,03$  (s),  $\delta 2,16$  (s),  $\delta 2,28$  (s) e  $\delta 2,30$  (s) (Tabela 7, p. 88). Já no espectro da FIG. 35, é possível observar a redução do número de sinais das metilas, assim como ocorreu com os experimentos realizados em CD<sub>3</sub>OD.

Nesse sentido, nas análises de RMN <sup>1</sup>H (600 MHz/Pyr-D5), verificou-se o mesmo fenômeno de intensificação e diminuição dos singletos metílicos, em  $\delta$ 1,96 (H9'),  $\delta$ 2,02 (H11') e  $\delta$ 2,16 (H10) ppm, reforçando a hipótese da ocorrência do efeito anisotrópico provocado pela rotação entre as ligações dos carbonos C-5 e C-5'.

O bidimensional *g*COSY apresentou as correlações entre os hidrogênios H2' ( $\delta$ 4,35) e H9 ( $\delta$ 1,42 ppm); H11 ( $\delta$ 2,28) e H12 ( $\delta$ 2,03 ppm); H2' ( $\delta$ 4,29) com H9' ( $\delta$ 1,96 ppm) e H10' ( $\delta$ 1,94); e H10' ( $\delta$ 1,94) com H2' ( $\delta$ 4,29) e H11' ( $\delta$ 2,28 ppm) (FIG. 24, e 48 a 50 - Anexo).

O experimento DEPT-135 (150 MHz/Pyr-D5) revelou 17 sinais, sendo 3 carbonos metílicos ( $\delta$ 11,62;  $\delta$ 12,42;  $\delta$ 13,98;  $\delta$ 16,42;  $\delta$ 16,90 e  $\delta$ 17,65 ppm), 2 metínicos ( $\delta$ 38,69 e  $\delta$ 42,69 ppm), um quaternário ( $\delta$ 126,91 ppm), 5 oxigenados ( $\delta$ 139,34,  $\delta$ 141,49,  $\delta$ 157,97,  $\delta$ 175,84 e  $\delta$ 177,55 ppm) e dois carbonos não pertencente a molécula (FIG. 37).

Em gHSQC foram revelados 9 carbonos hidrogenados a  ${}^{1}J$ , sendo: H9 ( $\delta$ 1,42) com  $\delta$ 38,60 ppm, H11' ( $\delta$ 2,02) com  $\delta$ 13,98 ppm, H11 ( $\delta$ 2,28) com  $\delta$ 17,16 ppm, H2 ( $\delta$ 5,35) com  $\delta$ 38,69 ppm, H9' ( $\delta$ 1,96) com  $\delta$ 15,65 ppm, H10' ( $\delta$ 1,94) com  $\delta$ 11,62 ppm, H10 ( $\delta$ 2,16) com  $\delta$ 16,42 ppm e H12' ( $\delta$ 2,30) com 12,42 ppm (FIG. 40 e 41).

Na análise em gHMBC, foram visualizadas as relações entre os hidrogênios e seus carbonos a <sup>3</sup>*J*, sendo H9 ( $\delta$ 1,42) com  $\delta$ 38,08 e  $\delta$ 135,80 ppm, H10' ( $\delta$ 1,94) com  $\delta$ 124,10 e  $\delta$ 135,80 ppm; H9' ( $\delta$ 1,96) com  $\delta$ 42,69,  $\delta$ 139,34 e  $\delta$ 175,84 ppm; H12 ( $\delta$ 2,03) com  $\delta$ 115,80,  $\delta$ 122,70,  $\delta$ 126,21 e  $\delta$ 141,49 ppm; H10 ( $\delta$ 2,16) com  $\delta$ 123,60 e  $\delta$ 157,97 ppm; H11 ( $\delta$ 2,28) com  $\delta$ 126,21 e  $\delta$ 139,34 ppm; e H12' ( $\delta$ 2,30) com  $\delta$ 109,30,  $\delta$ 115,8,  $\delta$ 122,90,  $\delta$ 141,49,  $\delta$ 157,97 e  $\delta$ 175,84 ppm (FIG. 44 a 47).

Nesse sentido, para averiguar a posição espacial dos hidrogênios metílicos, foram realizadas as técnicas NOESY e TOCSY 1D com irradiações seletivas (FIG. 24).

Os experimentos de NOESY 1D (FIG. 52) revelaram a interação espacial de  $\delta$ 1,96 (H9') com os hidrogênios  $\delta$ 2,30 (H12') e  $\delta$ 2,03 (H11), entre  $\delta$ 2,28 (H11) com  $\delta$ 2,30 (H12') e  $\delta$ 2,03 (H12), e entre  $\delta$ 2,30 (H12') com  $\delta$ 1,96 (H9') e  $\delta$ 2,28 (H11).

O experimento TOCSY 1D (FIG. 53 – Anexo) possibilitou a identificação do mesmo sistema de spins entre  $\delta$ 1,96 (H9') e  $\delta$ 1,94 (H10'),  $\delta$ 2,28 (H11) e  $\delta$ 2,30 (H12').

FIGURA 24 - Principais correlações observada em RMN - 2D para substância 1



Fonte: Ilustração criada pelo autor, 2020.

A análise de massas de alta resolução sob infusão direta nos modos positivo e negativo com a técnica EM-ES MS/MS a 70 V para o extrato bruto AcOEt, apresentou vários picos, destacando-se os picos bases em m/z 265,1078 (100%) e m/z 221,1132 (100%) para os modos positivos e negativos, respectivamente (FIG. 54 a 57).

Os espectros iniciais (MS1) não revelaram os sinais dos possíveis íons *quasi*-moleculares para as duas prováveis propostas para a substância 01, m/z 394 (molécula com ligações C5-O-C5') e m/z 378 (molécula com ligações C5-C5'). No entanto, o espectro em modo positivo (FIG. 56) evidenciou a formação do adulto

 $[M+Na]^+$ , acrescido de duas protonações em m/z 419,1551 (8%) ou 419,6537(5%), além de outras fragmentações relevantes em m/z 207,1027 (46%) e 189,0911 (23%).

Após extensiva análise dos fragmentos gerados no espectro em modo positivo, verificou-se que o sinal m/z 207,1027 melhor explicava a relação de fragmentações entre os íons encontrados em MS1. Desta forma, prosseguiu-se com a análise MS-MS para o fragmento m/z 207,1027 (MS2, FIG. 57).

A análise do espectro MS2 em modo positivo gerado a partir de m/z 207,1027, revelou 11 fragmentos principais, destacando-se m/z 143,8070 (100%), m/z 161,0957 (80%), m/z 165,1139 (70%), m/z 128,0621 (60%) e m/z 189,0911 (40%), cujas propostas estruturas estão representadas na FIG 25.

Nesse sentido, as propostas de fragmentações com base nos espectros MS1 e MS2 sugerem a presença de um oxigênio entre C5 e C5'.



FIGURA 25 - Proposta para as fragmentações observadas no espectro de massas da substância 1

Fonte: Ilustração criada pelo autor, 2020.

D	<b>DEPT-135</b>	<sup>1</sup> H	NOESY 1D	gHSQC	gHMBC	
Posição	$(^{13}C)(\delta)$	(δ)	(δ)	(δ)	(δ)	
1	173,02 (CO)	-	-	-	-	
2	-	4,23 (ql, <sup>3</sup> <i>J</i> =7,44 Hz, 1H)	-	-	-	
3	122,99 (C)	-	-	-	-	
4	142,06 (CO)	-	-	-	-	
5	-	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	-	
7	-	-	-	-	-	
8	-	-	-	-	-	
9	16,05 (CH <sub>3</sub> )	1,51 (d, <sup>3</sup> <i>J</i> = 6,25 Hz, 3H)	-	16,05	-	
10	-	2,22 (s, 3H)	-	-	-	
11	10,96 (CH <sub>3</sub> )	2,18 (s, 3H)	-	10,96	122,99; 136,60; 142,06; 156,90	
12	-	2,30 (s, 3H)	-	-	-	
1'	-	-	-	-	-	
2'	41,87 (CH)	4,45 (ql, ${}^{3}J=$ 6,96 Hz, 1H)	-	41,87	-	
3'	126,13 (C)	-	-	-	-	
4'	137,33 (CO)	-	-	-	-	
5'	-	-	-	-	-	
6'	-	-	-	-	-	
7'	-	-	-	-	-	
8'	-	-	-	-	-	
9'		1,50 (d, ${}^{3}J=$ 6,84 Hz, 3H)	-	16,20	41,87; 137,33; 173,02	
10'	15,00 (CH <sub>3</sub> )	2,11 (s, 3H)	1,50; 4,45	15,00	126,13; 137,33; 142,06	
11'	15,96 (CH <sub>3</sub> )	2,20 (s, 3H)	-	15,96	-	
12'	-	2,23 (s, 3H)	1,50; 2,11	15,70	122,99; 136,60; 142,06	

**TABELA 6 -** Dados espectroscópicos de RMN obtidos para a substância 1 do extrato bruto do endófitoP21- BDA-Triagem em CD3OD/600 Hz.

d (dubleto); ql (quarteto largo); s (singleto); <sup>3</sup>J (constante de acoplamento a três ligações; (-) (ausência de

deslocamento químico). A relação de sinais informados são dados em ppm.

Fonte: Adaptado pelo próprio autor, 2020.

Docição	<b>DEPT-135</b>	$^{1}\mathrm{H}$	gCosy	NOESY 1D	TOCSY 1D	gHSQC	gHMBC
rosição	$(^{13}C)(\delta)$	(δ)	(δ)	(δ)	(δ)	(δ)	(δ)
1	177,55 (CO)	-	-	-	-	-	-
2	42,69 (CH)	4,35 (ql, <sup>3</sup> <i>J</i> =7,02 Hz, 1H)	1,42	-	-	38,69	-
3	-	-	-	-	-	-	-
4	141,49 (CO)	-	-	-	-	-	-
5	139,34 (CO)	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-
9	-	$1,42 (d, {}^{3}J=7,38 \text{ Hz}, 3\text{H})$	4,35	-	-	38,60	38,69; 135,80
10	16,42 (CH <sub>3</sub> )	2,16 (s, 3H)	-	-	-	16,42	123,60; 157,97
11	-	2,28 (s, 3H)	2,03	-	2,30	17,16	126,21;139,34
12	16,90 (CH <sub>3</sub> )	2,03 (s, 3H)	2,28	2,28; 2,30	-	16,90	115,80; 122,70 126,21; 141,49
1'	175,84 (CO)	-	-	-	-	-	-
2'	38,69 (CH)	4,29 (ql, ${}^{3}J=$ 7,44 Hz, 3H)	1,94; 1,96	-	-	-	-
3'	126,21 (C)	-	-	-	-	-	-
4'	157,97 (CO)	-	-	-	-	-	-
5'	-	-	-	-	-	-	-
6'	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-
8'	-	-	-	-	-	-	-
9'	17,65 (CH <sub>3</sub> )	$1,96 (d, {}^{3}J=7,02 \text{ Hz}, 3\text{H})$	4,29	2,28; 2,30	1,94	17,65	42,69; 139,34; 175,84
10'	11,62 (CH <sub>3</sub> )	1,94 (s, 3H)	4,29; 2,30	-	-	11,62	124,10; 135,80
11'	13,98 (CH <sub>3</sub> )	2,02 (s, 3H)	-	-	-	13,98	-
12'	12,42 (CH <sub>3</sub> )	2,30 (s, 3H)	1,94	1,96; 2,03	2,28	12,42	109,30; 115,80; 122,90; 141,49; 157,97; 175,84

TABELA 7 - Dados espectrométricos de RMN 1H e 13C (CD3OD/600 Hz) obtidos para a substancia 1 do endófito P21-BDA-Triagem em Pyr-d6

d = Dubleto; ql = Quarteto largo; s = Singleto;  ${}^{3}J$  = Constante de acoplamento a três ligações; (-) = não encontrado os sinais com deslocamento químico. A relação de sinais

informados são dados em ppm. Fonte: Adaptado pelo próprio autor, 2020.

#### 3.3.2 Substância 02: isolada do endófito Neocosmospora striata Udagawa (P28)

Na análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD, FIG. 58 - Anexo) da fração FR4.meio (4), foram identificados sinais de deslocamentos químicos de hidrogênios sob carbonos sp<sup>2</sup> em  $\delta$ 7,58 (dd, *J* = 9,5 e 16,0 Hz, 1H),  $\delta$ 6,07 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H),  $\delta$ 6,22 (dd, *J* = 9,9 e 9,9 Hz, 1H),  $\delta$ 5,76 (dd, *J* = 4,0 e 10,0 Hz, 1H) e  $\delta$ 6,46 (s, 1H), sendo o último pertencente a anel benzênico pentasubstituído, e os demais a um sitema dienílico, cujas constantes de acoplamento confirmam a proposta. Observaramse também os deslocamentos em,  $\delta$ 5,37 (m, 1H) *O*-carboxila, e os carbinólicos de epóxido em  $\delta$ 3,32 (m, 1H) e  $\delta$ 3,05 (dt, *J* = 3,0 e 8,0 Hz, 1H). O espectro também permitiu a observação de dois grupos de hidrogênios diastereotópicos em  $\delta$ 2,41 (dt, *J* = 3,0 e 14,0 Hz, 1H) e  $\delta$ 1,70 (ddd, *J* = 4,0, 8,0 e 14,0 Hz, 1H), e em  $\delta$ 4,13 (d, *J*=16,0 Hz, 1H) e  $\delta$ 3,91 (d, *J*=16,5 Hz, 1H), além de uma metila em  $\delta$ 1,50 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H) (FIG. 26).

Os dados obtidos pelo experimento gHSQC (FIG. 60 a 62 - Anexo) permitiram a correlação <sup>1</sup>J de todos os hidrogênios descritos acima. A análise gCOSY (FIG. 27, e 66 a 68 - Anexo) evidenciou o sistema de hidrogênios vizinhos entre H1 a H9, corroborado pelo experimento TOCSY 1D (FIG. 69 - Anexo), que estabeleceu o mesmo sistema de spins entre os hidrogênios H1/H2/H3/H4 e entre H5/H6/H7/H8/H9 (Tabela 8, p. 92 e FIG. 26, 27 e 58). A aproximação espacial dos hidrogênios entre as posições H1 a H9 também pôde ser confirmada através das correlações em NOESY 1D.

O espectro gHMBC (FIG. 63 a 65 – Anexo) possibilitou confirmar as principais posições dos hidrogênios, destacando as correlações do singleto H15 aos carbonos benzênicos, e dos diastereotópicos H11 à posição  $\alpha$ -benzocarbonilica. O experimento também possibilitou identificar o deslocamento químico de <sup>13</sup>C para algumas posições não observadas no espectro DEPT-135 (FIG 59 – Anexo).

Sendo assim, a análise dos dados obtidos somada a comparação de informações da literatura, evidenciam a substância 2 como o composto radicicol (monorden) (HELLWING, et al., 2003; GAO, et al., 2013).

FIGURA 26 - Proposta para a estrutura molecular da Substância 2



Fonte: Ilustração criada pelo autor, 2020.

O primeiro relato de isolamento do monorden foi associado ao fungo *Monosporium bonorden*, demonstrando propriedades antibióticas (DELMOTTE; DELMOTTE-PLAQUEE, 1953; McCAPRA, et al., 1964). O composto também foi extraído dos fungos endofiticos *Nectria radicicola* Gerlach & Nilsson, com propriedades fungiostáticas (MIRRINGTON, et al., 1966), e de *Penicillium luteo-aurantium* Smith, apresentando atividade antifúngica (NOZAWA, et al., 1979). Os relatos se estendem ao fungo *Pochonia chlamydosporia* var. catenulata e ao gênero *Neocosmospora* sp., que avaliaram o potencial desta substância como agente antimalárico, antiviral, anticancerígeno e anti-inflamatório (HELLWING, et al., 2003; GAO, et al. 2013).

Sob esse aspecto, embora o monorden tenha sido extraído de espécies desconhecidas do gênero Neocosmospora sp., é a primeira vez que esse composto é relatado para a espécie *Neocosmospa striata* Udagawa.



FIGURA 27 - Principais correlações observada em RMN – 1 e 2D para substância 2

Fonte: Ilustração criada pelo autor, 2020.

Posição	DEPT-135 <sup>13</sup> C (δ)	<sup>1</sup> Η (δ)	gCosy (δ)	TOCSY 1D (δ)	gHSQC (δ)	gHMBC (δ)	Referência bibliografica <sup>1</sup>
1	16,69 (CH <sub>3</sub> )	1,50 (d, <i>J</i> = 6,6 Hz, 3H)	5,37	-	16,69	36,01, 70,10	18,62
2	70,10 (CH)	5,37 (m, 1H)	2,41; 1,50	3,05; 2,41; 1,70; 1,50	70,10	-	69,82
3	36,01 (CH <sub>2</sub> )	1,70 (ddd, <i>J</i> = 4,0, 8,0 e 14,6 Hz, 1H); 2,41 (dt, <i>J</i> = 3,0 e 8,0 Hz, 1H)	1,70; 2,41; 3,05; 5,37	-	36,01	16,69; 54,47; 54,83; 70,10	36,46
4	54,83 (CH)	3,05 (dt, J = 3,0 e 8,0 Hz, 1H)	2,41; 1,70	-	54,83	36,01	55,08
5	54,47 (CH)	3,32 (m, 1H)	5,76	-	54,47	135,05	55,08
6	135,05 (CH)	5,76 (dd, <i>J</i> = 4,0 e 10,0 Hz, 1H)	6,22; 3,32	-	135,05	138,70	136,13
7	128,87 (CH)	6,22 (dd, <i>J</i> = 9,9 e 9,9 Hz, 1H)	7,58; 5,76	7,58; 6,07; 5,76 3,32	128,87	54,83; 130,20; 138,70	129,78
8	138,70 (CH)	7,58 (dd, <i>J</i> = 9,5 e 16,0 Hz, 1H)	6,07; 6,22	-	138,70	135,05; 198,40	138,02
9	129,52 (CH)	6,07 (d, <i>J</i> =16 Hz, 1H)	7,58	-	129,52	44,46; 129,52; 198,40	130,67
10	198,40 (C)*	-	-	-	-	-	195,92
11	44,46 (CH <sub>2</sub> )	3,91 (d, <i>J</i> = 16,5 Hz, 1H); 4,13 (d, <i>J</i> = 16,0 Hz, 1H)	-	3,91	44,46	113,40; 133,05; 198,40	45,11
12	133,05 (C)	-	-	-	-	-	131,93
13	113,00 (C)*	-	-	-	-	-	115,43
14	155,91 (CO)	-	-	-	-	-	155,19
15	101,76 (CH)	6,46 (s, 1H)	-	-	101,76	113,40; 155,91	102,85
16	155,91 (CO)	-	-	-	-	-	155,19
17	113,40 (C)*	-	-	-	-	-	111,98
18	168,04 (CO)	-	-	-	-	-	166,91

TABELA 8 - Dados espectrométricos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (CD3OD/600 Hz) obtidos para a substância 2 do endófito *N. striata* (P28)

d = dubleto; dd = duplo dubleto, ddd = triplo dubleto, dt = duplo tripleto m = multipleto; s = singleto; J = Constante de acoplamento; (<sup>1</sup>) = Refere-se aos sinais de <sup>13</sup>C RMN [125 MHz/DMSO] do composto monorden (HELLWIG, et al., 2003). (-) = não encontrado os sinais com deslocamento químico. As relações de sinais são em ppm. \*Sinais atribuídos pelo gHBMC

Fonte: Adaptado pelo próprio autor, 2020.

# Capitulo IV

### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ensaios biológicos realizados entre os fungos endofiticos e os microrganismos patogênicos humanos, revelaram resultados promissores que nortearam a seleção dos melhores fungos endofiticos para a bioprospecção dos compostos responsáveis pelas atividades antimicrobianas.

Nesse sentido, a análise multivariada dos resultados dos bioensaios, permitiu separar e agrupar as atividades antimicrobianas, identificando os melhores endófitos contra as bactérias (P21, P24 e P48) e cândidas (P5, P21, P28 e P70) patogenicas.

Os ensaios de cultura pareada de P5, P9, P21, P28, P48, P59 e P61 frente ao fitopatógeno *Corynespora cassicola*, revelaram resultados antimicrobianos potenciais para os endófitos *Cladosporium flabelliforme* (P5), *Microsphaeropsis arundinis* (P21), *Fusarium succisae* (P59) e *Fusarium oxysporum* (P61).

A prospecção de substâncias antimicrobianas a partir do estudo químico dos fungos selecionados possibilitou o isolamento de vários compostos, sendo identificados dois até o presente momento, e os demais reservados para estudos futuros.

Nesse aspecto, o extrato bruto de *Microsphaeropsis arundinis* (P21), permitiu identificar a substância 1, um dímero benzolactônico inédito para o endófito. Já os extratos de *Neocosmospora striata* (P28) permitiram isolar duas substâncias, sendo um novo composto da classe das neocomosinas (substancia 2), extraída do meio BDA, e outra ainda não identificada isolada do meio mínimo. Nas demais frações obtidas, como exemplo FR4.fim.4, FR6.1, FR6.3, FR6.5 e FR1.precipitado, poderá ser possível a purificação e a identificação estrutural de outras substâncias após novas análises.

Desta forma, considera-se também que os objetivos desse trabalho foram alcançados. A bioprospecção envolvendo os fungos endofíticos de *Axonopus leptostachyus* é altamente promissora, porém, existem fatores limitantes relacionados com a massa reduzida de extratos, frações e substâncias isoladas, afetando de forma direta tanto a elucidação, quanto a realização de bioensaios.

Assim, torna-se importante criar estratégias que possam otimizar o metabolismo dos fungos, variando o tempo de cultivo, o meio de cultura, a temperatura, a luminosidade, entre outras condições, visando a diversificação e o aumento da produção metabólica. Por isso, é necessária a parceria com a área biotecnológica para a compreensão dos mecanismos de produção dos metabólitos especiais.

# 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABDULLAH, S.; GOBILIK, J.; CHOANG, K. P. Estudo fitoquímico preliminar e atividade antimicrobiana de vários extratos de Cynodon dactylon (L.) Pers. (bermudas) contra patógenos selecionados. Int J Pharm Pharm Sci: v. 4 (5), p. 227–230, 2012.

ACHENBACH, H.; MUEHLENFELD, A.; BRILLINGER, G. U. Liebigs Ann. Chem. v. 8, p. 1596-1628, 1985.

AHAMAD, S.; DRAY, A. Curr. Opin. Investig. Drugs 2004, 5, 67-70.

ANTON, A. M. Contribucion al conocimiento de la anatomia foliar del genero Axonopus (POACEAE). DARWINIANA, 27 (1-4): 157-168, Diciembre 1986.

AN, N.; PRATLEY, J. E.; HAIG, T. Fitotoxicidade de resíduos de Vulpia: III. Atividade biológica de aleloquímicos identificados de Vulpia myuros. J Chem Ecol, v. 27 (2), p. 383–394, 2001.

ASAHINA, A.; KOBAYASHI, M.; NAKANO, K. et al. Deep cutaneous infection with Microsphaeropsis arundinis: report of two Japanese cases. Acta Derm Venereol, v. 95, p. 855–857, 2015.

AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S. "Microrganismos endofíticos." Ecologia microbiana. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente (1998): 117-137.

AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? Revista brasileira de Botânica, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 225-229, 1999.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. Electronic Journal of Biotechnology, Chile, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000. AZEVEDO, J. L. et al. Endophytic Microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. Electronic Journal of Biotechnology, v.3, n.1, p.40-65, 2000.

AYER, W. A.; PENA-RODRIGUEZ, L.; VEDERAS, J. C.; CAN. J. Microbiol. v. 27, p. 846–847, 1981.

BARBOSA, F. G.; PILLAR, V. D.; PALMER, A. R.; MELO, A. S. Predicting the current distribution and potential spread of the exotic grass Eragrostis plana Nees in South America and identifying a bioclimatic niche shift during invasion. Austral Ecology, v. 38, p. 260–267, 2013.

BARTHOLOMEW, O. I.; MAXWELL, E.; BITRUS, H. J. Composições fitoquímicas e capacidade antioxidante in vitro do extrato metanólico de folhas de *Axonopus compressus* (P. Beauv.) Eur J Med Plant, v. 3 (2), p. 254–265, 2013.

BERNAADS, C. A.; JENNRICH, R. I. Gradient Projection Algorithms and Software for Arbitrary Rotation Criteria in Factor Analysis, Educational and PsychologicalMeasurement: 65, 676-696, 2005.

BERTOLDI, C., De L. M.; ERCOLI, L.; BRACA, A. Perfil químico do extrato de Festuca arundinacea mostrando atividade aleloquímica. Chemoecology, v. 22, p. 13–21, 2012.

BHILABUTRA, W.; TECHOWISAN, T.; PEBERDY, J. F.; LUMYONG, S. Res. J. Microbiol. v. 2, p. 749-755, 2007.

BIZ, A. R. ; MENDONCA, E. A. F. ; ALMEIDA, E. G. ; SOARES, M. A.. Endophytic fungal diversity associated with the roots of cohabiting plants in the Pantanal wetland. In: Marcos Antônio Soares; Mário Augusto Gonçalves Jardim. (Org.). Natural resources in wetlands: from Pantanal to Amazonia. 1 ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, v. 1, p. 37-70, 2017.

BORGES, W. S. Estudo de fungos endofíticos associados a plantas da família Asteraceae como fontes de metabólitos secundários e em processos de biotransformações. 2008. 350f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

BOLDRINI, I. Campos do Rio Grande do Sul: caracterização fisionômica e problemática ocupacional. Boletim do Instituto de Biociências, v. 56, p. 1-39. 1997.

BOLDRINI, I.; LONGHI-WAGNER, H; BOECHAT, S. Morfologia e Taxonomia de Gramíneas Sul-Rio- Grandenses. Editora UFRGS, Porto Alegre, 2008. 87p.

BOSTAN, C.; BUTNARIU, M.; BUTU, M; ORTAN, A., BUTU, A., RODINO, S., PARVU, C. Efeito alelopático de Festuca rubra em gramíneas perenes. Rom Biotechl Lett: v. 18 (2), p. 8190–8196, 2013.

BURMAN, A. G.; FILGUEIRAS, T. S. A review of the Woody bamboo genera of Brazil (Gramineae: Bambusoideae: Bambuseae). Thaiszia, v. 3, p. 53-88, 1993.

BOURGEARD, S.; DRAY, S. "Supervised Multiblock Analysis in R with the ade4 Package." Journal of Statistical Software, v. 86 (1), p. 1-17. 2018.

BRAUERS, G.; EDRADA, R.; EBEL, R.; PROKSCH, P.; WRAY, V.; BERG, A.; GRAFE, U.; SCHA CHTELE, C.; TOTZKE, F.; FINKENZELLER, G.; MARME, D.; KRAUS, J.; MÜ NCHBACH, M.; MICHEL, M.; BRINGMANN, G.; SCHAUMANN, K. J. Nat. Prod. v. 63, p. 739–745, 2000.

BUSIA, K. Herbal pharmacopoeia: Science and Technology Policy Research Institute Council for Scientific and Industrial Research, Quality PC Limited, Accra North, Ghana. p. 30-133, 2007.

CANUTO, K. M.; RODRIGUES, T. H. S.; OLIVEIRA, F. S. A. de; GONÇALVES, J. T. Fungos endofíticos: perspectiva de descoberta e aplicação de compostos bioativos na agricultura. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012.
CARBUNGCO, E. S.; PEDROCHE, N. B.; PANES, V. A.; DE LA CRUZ, T. E. Identification and characterization of endophytic fungi associated with the leaves of Moringa oleifera Lam. Acta Hortic., v. 42, p. 373-380, 2017.

CAFÊU, M. C., SILVA, G. H., TELES, H. L., BOLZANI, V. da S., ARAÚJO, Â. R., YOUNG, M. C. M., & PFENNING, L. H.. Substâncias antifúngicas de Xylaria sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). Química Nova, v. 28(6), p. 991–995, 2005.

CHANDRA. S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. Applied Microbiol Biotechology, v. 95, p. 47-59, July 2012.

CHANG, J. (2015). lda: Collapsed Gibbs Sampling Methods for Topic Models. R package version 1.4.2.

CHAPLA, V. M. Bioprospecção dos fungos endofiticos associados à espécie vegetal Eugenia jambolana e utilização de modificador epigenético no cultivo do fungo Lecythopora sp. 2014. 251 f. Tese (Doutorado em Quimica) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R. ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos uma nova fonte nexplorada e sustentavel de novos bioativos produtos naturais. Revista Virtual Química. v. 5, n. 3, p. 421-437, Nov. 2013.

CHAO, C. H. Pesquisa alelopática de vegetação subtropical em Taiwan. IV Natureza fitotóxica comparada de lixiviados de quatro gramíneas subtropicais. J Chem Ecol, v. 15 (7), p. 2149-2159, 1989.

CHO, J. Y.; MOON, J. H.; SEONG, K. Y.; PARK, K. H. Biosci. Biotechnol. Biochem. v. 62, p. 2273-2276, 1998.

CHOU, C. H.; LEE H. F. Dominância alelopática de Miscanthus transmorrisonensis em uma comunidade de pastagem alpina em Taiwan. J Chem Ecol, v. 17 (11), p. 2267-2281, 1991.

CHOU, C. H.; YOUNG C. C. Substâncias fitotóxicas em doze gramíneas subtropicais. J Chem Ecol, v. 1 (2), p. 183–193, 1975.

CHUNG, I. M.; ALI, M.; AHMAD, A; LIM, J. D.; YU, C. Y.; KIM, J. S. Constituintes químicos de arroz (Oryza sativa) Hulls e sua atividade herbicida contra lentilha (Lemna paucicostata Hegelm 381). Phytochem Anal, v. 17, p. 36–45, 2006.

CHUNG, I. M.; AHN, J. K., YUNG S. J. Identificação de compostos alelopáticos da palha de arroz (Oryza sativa L.) e sua atividade biológica. Can J Plant Sci, v. 58, p. 815–821, 2015.

CLAYTON, W. D.; VORONTSOVA, M. S.; HARMAN, K.T.; WILLIAMSON, H. (2006). GrassBase - The Online World Grass Flora.

CRAWFORD, S. J.; CHEN, S. C.; HALLIDAY, C. RANGAN, G. K.; GOTTLIEB, T.; REID, A. B. Microsphaeropsis arundinis skin and soft tissue infection in renal transplant recipients: three case reports and a review of the literature. Transpl Infect Dis: v. 17, p. 915–920, 2015.

DAI, J.; KROHN, K.; ELASSER, B.; FLORKE, U.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; PESCITELLI, G.; SALVADORI, P.; ANTUS, S.; KURTAN, T. Eur. J. Org. Chem. 2007, p. 4845–4854.

DAYAN, F. E. CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Natural products in crop protection. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 17, p. 4022-4034, 2009.

DEDECCA, D. M. As espécies brasileiras do gênero Axonopus (Gramineae). Bragantia: v. 15 (19), p. 251-296, 1956. DELMOTTE, P., DELMOTTE-PLAQUEE, J. A New Antifungal Substance of Fungal Origin. Nature, v. 171 (4347), p. 344–344, 1953.

DOMSCH, K. M.; GRAMS, ANDERSON, T.-H. "Compendium of Soil Fungi," Vols. I e 2, Academic Press, London, 1980, pp. 859 e 405.

EUSSEN, J. H. H.; NIEMANN, G, J. Substâncias inibidoras de crescimento de folhas de Imperata cylindrica (L.) Beauv. Z Pflanz, v. 102 (3), p. 263–266, 1981.

FAVARETTO, A.; SCHEFFER-BASSO, S. M.; PEREZ, N. B. Allelopathy in Poaceae species present in Brazil. A review. Agronomy For Sustainable Development, [s.l.], v. 38, n. 2, p.22-38, abr. 2018. Springer Nature.

FILGUEIRAS, T.S., CANTO-DOROW, T.S., CARVALHO, M.L.S., DÓREA, M.C., FERREIRA, F.M., MOTA, A.C., OLIVEIRA, R.C., OLIVEIRA, R.P., REIS, P.A., RPDRIGUES, R.S., LONGHI-WAGNER, H.M., SANTOS-GONÇALVES, A.P., SHIRASUNA, R.T., SILVA, A.S., SILVA, C., VALLS, J.F.M., VIANA, P.L., WELKER, C.A.D. & ZANIN, A. Poaceae. In Lista de Espécies da Flora do Brasil, 2017.

FILGUEIRAS, T. S.; LONGHI-WAGNER, H. M.; VIANA, P. L.; ZANIN, A.; GUGLIERI, A.; OLIVEIRA, R. C.; CANTO-DOROW, T. S.; SHIRASUNA, R.T.; VALLS, J. F. M.; OLIVEIRA, R. P.; RODRIGUES, R. S.; SANTOS-GONÇALVES; A. P.; WELKER, C. A. D. Poaceae. In R. C. Forzza et al. (ed.) Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012.

FILIPPI, M. C. C.; DA SILVA, G. B.; SILVA-LOBO, V.L.; MORAES, A.J.G.; PRABHU, A. S. Leaf Blast (Magnaporthe oryzae) suppression and growth promotion by rhozobacteia on aerobic rice in Brazil. Biological control, v.58, p. 160-166, 2011.

FURAMOTO, T.; HAMASKI, T.; NAKAJIMA, H. Biosynthesis of phytotoxin neovasinin and its related metabolites, neovasipyrones A and B and neovasifuranones A

and B, in the phytopathogenic fungus Neocosmospora vasinfecta. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1999, p. 131–135

FURAMOTO, T.; HAMASKI, T.; NAKAJIMA, H. Vasinfectins A and B: New Phytotoxins from Neocosmospora vasinfecta.Tetrahedron Letters, Vol. 38, No. 31, pp. 5523-5524, 1997.

FURUMOTO, T.; FUKUYAMA, K.; HAMASAKI, T.; NAKAJIMA, H. NEOVASIPYRONES AND NEOVASIFURANONES: FOUR NEW METABOLITES RELATED TO NEOVASININ, A PHYTOTOXIN OF THE FUNGUS, NEOCOSMOSPORA VASINFECTA. Phytochemistry, Vol. 40, No. 3, pp. 745-751, 1995

FUNABASHI, Y.; HORIGUCHI, T.; IINUMA, S.; TANIDA, S.; HARABADA, S. J. Antibiot. 1994, v. 47, p. 1202-1218.

GAO, J.; MOHAMED, M.; RADWAN, F. L; DALE. O. R.; HUSNI, A. S.; WU, Y.; LUPIEN, S.; WANG, X.; MANLY, S. P.; HILL, A. R.; M. DUGAN, F. M. ; CUTTLER, H. G.; CUTLER, S. J. Neocosmospora sp. Derived Resorcylic Acid Lactones with in Vitro Binding Affinity for Human Opioid and Cannabinoid Receptors. J. Nat. Prod. 2013, v. 76, p. 824–828.

GIRALDO-CAÑAS, D. Novedades taxonómicas en Axonopus (Poaceae, Panicoideae, Paniceae) para Brasil. Rodriguésia, v. 61, p. 137-142, 2010.

GIRALDO-CAÑAS, D. Las especies del género Axonopus (Poaceae:Panicoideae: Paspaleae) en Brasil. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, v. 36 (140), p. 317-364, 2012.

GIRALDO-CANÃS, D. Una nueva especie de Axonopus (Poaceae: Panicoideae:Paniceae) de la Guayana de Colombia y Venezuela. Caldasia: v. 21, p. 132–140, 1999.

GOHL, B. Tropical feeds information summeries and nutritive values. Food and Agricultural Organization (FAO); Agricultural Studies No. 96, United Nations, Rome, Italy, pp. 148-149, 1975.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Appl. Environ. Microbiol. v. 61, p. 1323–1330, 1995.

GOMES, R. V. R. De S.; VILELA, V. L. R.; GOMES, E. Da N.; MAIA, A. J.; ATHAYDE, A. C. R.. Análise Fitoquímica de Extratos Botânicos Utilizados no Tratamento de Helmintoses Gastrintestinais de Pequenos Ruminantes. Revista Caatinga, Mossoró, v. 24, n. 4, p. 172-177, 2011.

GOUDA, S.; DAS, G.; SEN, K.; SHIN, H. S.; PATRA, J. K. Endophytes: A Treasure House of Bioative Compounds of Medicinal Importance. Frontiers in Microbiology, v. 7, p. 1-8, Sep. 2016.

GOULART, M. C. Análise da diversidade e prospecção do potencial biotecnológico de bactérias endofíticas associadas às plantas de maracujá (Passiflora incarnata): Diversity analysis and prospecting of biotechnological potential of endophytic bacteria associated with passionflower plants (Passiflora incarnata). 2019. 1 recurso online (102 p.). Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP.

GUBIANI, J. R.; OLIVEIRA, M. C. S.; NEPONUCENO, R. A. R.; CAMARGO, M. J. C.; GARCEZ; W. S.; Biz; A. R.; SOARES, M. A.; ARAUJO, A. R.; BOLZANI, da S.; LISBOA, H. C. F.; SOUZA Jr, P. T de.; VASCONCELOS, L. G de.; RIBEIRO, T. A. N.; OLIVEIRA, J. M. de; BANZOTO, T. P.; LIMA; C. A.; LONGATO, G. B.; BATISTA Jr, J. M.; TELES, H. L. Cytotoxic prenylated indole alkaloid produced by the endophytic fungus Aspergillus terreus P63. Phytochemistrry Letters. v. 32, p. 162-167, 2019.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribuition, strutural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. Journal of natural products, v. 69, p. 509-526, Mar, 2006.

HAGAN D. L., JOSE, S., LIN, C. H. Exsudatos alopáticos de cogongrass (Imperata cylindrica): implicações para o desempenho de espécies de plantas de savana de pinus nativas no sudeste dos EUA. J Chem Ecol 39: 312-322, 2013.

HALL, M. R.; BRUMBLE, L. M.; MAYES, M. A.; SNOW, J. L.; KEELING, J. H. Cutaneous Microsphaeropsis arundinis infection initially interpreted as squamous cell carcinoma. Int J Dermatol: v. 52, p. 84-86, 2013.

HANASHIRO, F.; YAMAGUCHI, S.; AWAZAWA, SANO, A.; TAKAHASHI, K. Cutaneous phaeohyphomycosis caused by Microsphaeropsis arundinis in a Japanese patient with cardiac sarcoidosis. Japanese Dermatological Association: p. 170-173, 2018.

HARRISON, C.; TRAYNOR, J. R. Life Sci. v. 74, p. 489-508, 2003.

HELLWIG, V.; MAYER-BARTSCHMID, A.; MULLER, H.; GREIF, G.; KLEYMANN, G.; ZITZMANN, W.; TICHY, H. V.; STADLER, M. J. Nat. Prod. v. 66, p. 829–837, 2003.

HORMAZABALA, E.; SCHMEDA-HIRSCHMANNA, G.; Astudilloa, L.; Rodriguez, J.; Theoduloz, C. Z. Naturforsch., v. 60C, p. 11–21, 2005.

HOULT, A. H. C.; LOVETT, J. V. Metabólitos secundários biologicamente ativos da cevada: um método para identificação e quantificação de hordenina e gramina na cevada por cromatografia líquida de alta eficiência. J Chem Ecol: v. 19 (10), p. 2245-2254. 1993.

HÖLLER, U.; KÖNIG, G.; WRIGHT, A. J. Nat. Prod., v. 62, p. 114–118, 1999.

HUANG, T.; LIN, S. Microbial Natural Products: A Promissing Source for Drug Discovery. Journal of Applied Microbiology and Biochemistry, v. 1, n. 2, p. 3-5, 2017.

IBEH, B. O.; EZEJA, M. Preliminary Study of Antidiabetic Activity of the Methanolic Leaf Extract of Axonopus Compressus (P.Beauv) In Alloxan-Induced Diabetic Rats. J Ethnopharmacol. v. 138 (3), p. 713-716, 2011.

IBEH, B. O.; MAXWELL, E.; BITRUS, H. J. 2013. Phytochemical compositions and in vitro antioxidant capacity of methanolic leaf extract of *Axonopus compressus* (P.Beauv.), Euro. J. Med. Plants. 2013.

INÁCIO, F. Bioprospecção de Pseudofusiccoccum stromaticum em monoculta e em cocultura com Botryosphaeria parva.Trabalho de conclusão de curso, Universidade Estadual Paulista, f. 99, Araraquara, 2018.

ISWANATHAN, R., RAJITHA, R., SUNDAR, A. R., RAMAMOORTHY, V. Isolation and identification of endophytic bacterial strains from sugarcane stalks and theirin vitro antagonism against the red rot pathogen. Sugar Tech, v. 5, p. 25-29, 2003.

JALGAONWALA, R. E.; MOHITE, B. V.; MAHAJAM, R. T. A review: natural products from plant associated endophytic fungi. Journal of Microbiology and Phytoch., v. 1, n.2, p. 21-32, 2011.

JOSEPH, B.; PRIYA, M. Bioactive compounds from Endophytes and their Potential in Phamaceutical Effect: a Review. American Journal of Biochemistry and Molecular Biology, v. 1, p. 291-309, 2011.

JR, C. V.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a quimica medicinal moderna. Química Nova. v. 29, n. 2, 326-337, Mar. 2012.

KANNAN, D.; PRIYAL, S. B. Estudo fitoquímico em três ecótipos selecionados de gramíneas Cenchrus ciliaris L. Int J Multidiscip Res: v. 1 (1). p. 56–59, 2015.

KATO-NOGUCHI, H.; KOBAYAXHI, A.; OHNO, O., KIMURA, F.; FUJII, Y., SUENAGA, K. Substâncias fitotóxicas com atividade alelopática podem ser centrais

para o forte potencial invasivo de Brachiaria brizantha. J Plant Physiol: v. 171, p. 525-530, 2014.

KASSAMBARA, A.; MUNDT, F. (2017). factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.5.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. Micologia médica, 2 ed. São Paulo: Premier, 1999.

KHUZHAEV V. U. Alcalóides de Arundo donax. XVIII. Bases nitrogenadas em flores de cultivares. Chem Nat Compd: v. 40 (5), p. 516-517, 2004.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. - Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido. 5. ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2007.

KRAUS, G. A.; KIRIHARA, M. J. Org. Chem. v. 57, p. 3256-3257, 1992.

KREMER J. R.; BEN-HAMMOUDA, M. Plantas alelopáticas. 19. Cevada (Hordeum vulgare L). Allelopath J: v. 24 (2), p. 225–242, 2009.

KROCKENBERGER, M. B.; MARTIN, P.; HALLIDAY, C.; ROTHWELL, T. L. W.; CLARKE, K.; MALIK, R. Localised Microsphaeropsis Arundinis Infection of the Subcutis of a Cat. Journal of Feline Medicine and Surgery, v. 12 (3), p. 231–236, 2010.

KUBOTA, T.; TOKOROYAMA, T.; KAMIKAWA, T.; SATOMURA, Y. Tetrahedron Lett. v. 42, p. 5205-5210, 1966.

KUHN, M. Contribruições de WING, J.; WESTON, S., WILLIAMS, A.; KEEFER, C.; ENGELHARDT, A.; COOPER, T.; MAYER, Z.; Brenton KENKEL, B. e R Core Team, BENESTY, M.; LESCARBEAU, R.; ZIEM, A.; SCRUCCA, L.; Yuan TANG, Y.; CANDAN, C.; HUNT, T. (2018). caret: Classification and Regression Training. R package version 6.0-81. KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: orrigens of secondary metabolites. Chemistry & Biology, v. 19, n. 7, p. 792-798, july 2012.

LACAP, D. C.; HYDE, K. D.; LIEW, E. C. Y. An evaluation of the fungal 'morphotype'concept based on ribosomal DNA sequences. Fungal Diversity, v. 12, p. 53-66, 2003.

LOWE, J. 1989. The Flora of Nigeria grasses. Ibadan University Press, Ibadan, Nigeria

LUO, J.; LIU, X.; LI, E.; GUO, L.; CHE, Y. (2013). Arundinols A–C and Arundinones A and B from the Plant Endophytic Fungus *Microsphaeropsis arundinis*. Journal of Natural Products, v. 76(1), p. 107–112.

MAECHLER, M.; ROUSSEEUW, P.; STRUYF, A.; HUBERT, M.; HORNIK, K. (2018). Cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions. R package version 2.0.7-1.

MATSUURA, T. Caracterização taxonômica de actinomicetos endofíticos produtores de antibióticos isolados de cupuaçuzeiro (Theobromagrandiflorum schum). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2004.

MAYER, A. M. Plant-fungal intereactions: a plant physiologyst's viewpoint. Phystoch. v. 28, n. 2, p. 311-317, Feb. 1989.

MBUTHIA, K. S. Análise do fitoquímico volátil para planta selvagem não hospedeira, Melinis minutiflora P. Beav., E planta hospedeira selvagem Pennisetum purpureum (K) sihumach de Chilo portellus (swinhoe). Dissertação, Universidade de Kenyatta, 1997.

McCAPRA, F.; SCOTT, A. Tetrahedron Lett., 1964, 869;

MIRRINGTON, R. N.; RITCHIE, E.; SHOPPEE, C. W.; STERNHELL, S.; TAYLOR, W. C.; AUST. J. Chem. 1966, 19, 1265-1284.

MESQUITA, P. G. Bioprospecção de fungos endofíticos de Bauhinia variegata: busca por substâncias agonistas da isoforma gama do receptor ativado por proliferadores peroxissomais e por substancias antioxidantes. 2012, 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Faculdade de Ciências da Saúde, universidade de Brasília, Brasília, 2013.

MOLD, R. (2005). Testing the allelopathic effect of *Festuca paniculata* in Sub-Alpine Grasslands. La Station Alpine Joseph Fourier. Disponivel em: <a href="http://www.jardinalpindulautaret.fr/sites/sajf/files/pdf/stage2005MOLD.pdf">http://www.jardinalpindulautaret.fr/sites/sajf/files/pdf</a>/stage2005MOLD.pdf.>

NAKAJIMA, H.; HAMASAKI, T.; NISHIMURA, K.; KONDO, T.; Y. KIMURA, Y.; UDAGAWA, S.; SATO, S. Agric. Bioi. Chern., v. 52, p. 1621, 1988.

NAKAJIMA, H; HAMASAKI, T.; TANAKA, K.; KIMURA, Y.; Shun-ichi UDAGAWA, S.; HORIE, Y. Agric. Bioi. Chem., v. 53 (8), p. 2291-2292, 1989.

NAKAJIMA, H.; NISHIMURA, K.; HAMASAKI, T.; KIMURA, Y.; TAKAO YOKOTA, T. Structure of Neovasinone, a New a-Pyrone Plant Growth Regulator Produced by the Fungus, Neocosmospora vasinfecta E. F. Smith. Agric. Biol. Chem., v. 51 (4), p. 1221-1224, 1987.

NAWANGSIH, A. A., DAMAYANTI, I., WIYONO, S.; KARTIKA, J. G. Selection and characterization of endophytic bacteria as biocontro. 2011.

NATSUME, M.; TAKAHASHI, Y.; MARUMO, S. Agric. Biol. Chem. v. 52, p. 307-312, 1988.

NEPONUCENO, R. A. R.; TELES, H. L. ; SOARES, M. A. ; GOULART, L. S. ; LISBOA, H. C. F. ISOLAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ESPECIAIS A PARTIR DOS FUNGOS ENDOFITICOS DE Paspalum wrightii Hitchc. & Chase.. In: XXIV Seminário de Iniciação Científica, 2016, Rondonópolis. XXIV Seminário de Iniciação Científica. Cuiabá: PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, 2016. p. 462-462. NEPONUCENO, R. A. R.; TELES, H. L.; NUNES, E. V. S.; LISBOA, H. C. F.; GOULART, L. S.; SOARES, M. A. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FUNGOS ENDOFITICOS EXTRAÍDOS DE Paspalum wrightii Hitchc. & Chase ATRAVÉS DA ADAPTAÇÃO DO MÉTODO DO BLOCO DE GELOSE. In: XXV Seminário de Iniciação Científica, 2017, Rondonópolis. XXV Seminário de Iniciação Científica, 2017.

NEPONUCENO, R. A. R.; TELES, H. L.; SOARES, M. A.; GOULART, L. S.; LISBOA, H. C. F. INVESTIGAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS PRODUZIDOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS ÀS FOLHAS DE AXONOPUS LEPTOSTACHYUS (FLÜGGÉ) HITCHC (POACEAE). In: II Simpósio de Iniciação Científica do IFMT. Rondonópolis: Anais do II Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão do IFMT, 2018. p. 13.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. Journal of Natural Products, v. 17, n. 3, p. 629-661, 2016.

NOZAWA, K.; NAKAJIMA, S. J. Nat. Prod., v. 42, p. 374-377, 1979.

NUNES, E. V. S.; NEPONUCENO, R. A. R.; SOARES, M. A.; GOULART, L. S.; LISBOA, H. C. F.; TELES, H. L. CHARACTERIZATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM Axonopus leptostachyus (Flüggé) Hitchc (Poaceae). In: 9th Symposium on Applied Microbiology, 2019, Rio Claro - SP. Annals of the Applied Microbiology Symposium 9 th Edition. Rio Claro - SP: Biblioteca da Unesp, 2019.

NUNES, E. V. S.; TELES, H. L.; NEPONUCENO, R. A. R.; VIEIRA, L. F.; COSTA, I. F. D. Investigação dos Metabólitos Secundários Potencialmente Responsáveis por Atividades Antimicrobianas apresentadas em Ensaios de Antibiose entre Microrganismos Patogênicos Humanos e os Fungos Endofíticos P21 (Microsphaeropsis arundinis), P32 (Penicillium chermesinum), P36 (Talaromyces verruculosus), P37 (Pleosporales sp.) E P48 (Gongronella butleri) Associados às Folhas da Gramínea

Paspalum wrightii. In: XXVI Seminário de Iniciação científic, Rondonópolis. XXVI Seminário de Iniciação científica, 2018.

OGIE-ODIA, E. A.; ESEIGBE, D., ILECHIE, M. N.; ERHABOR, J.; OGBEBOR, E. Estudos epidérmicos e fitoquímicos foliares das gramíneas Cymbopogon citratus (Stapf.), Axonopus compressus (P. Beauv.) E Eragrostis tremula (SW Beauv.) em Ekpoma, estado de Edo, Nigéria. Sci World J. v. 5 (1), p. 20–24, 2010.

OLIVEIRA, M. C. S. Bioprospecção de Metabólitos Especiais Produzidos por Fungos Endofíticos Associados à Espécie Vegetal Axonopus leptostachyus (Poaceae). Tese (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Mato Grosso, 2016.

OKSANEN, J., BLANCHET, F. G.; FRIENDLY, M.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; McGLINN, D.; MINDCHIN, P. R.; O'HARA, R. B.; SIMPSON, G. L.; SOLYMOS, P.; PAMPHILE, J. A. Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: o caso do Colletotrichum sp. REVISTA UNINGÁ, [S.1.], v. 53, n. 1, 2017.

PARVEEN, I.; WILSON, T.; DONNISON, I. S.; COOKSON, A. R.; HAUCK, B.; THREADGILL, M. D. As fontes potenciais de produtos químicos de alto valor de folhas, caules e flores de Miscanthus sinensis 'Goliath' e sacchariflorus Miscanthus . Phytochemistry, v. 92, p. 160-167, 2013.

PASTRE, R.; MARINHO, A. M. R.; RODRIGUES-FILHO, E.; SOUZA, A. Q. L.; PEREIRA, J. O. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de Penicillium isoladas de Melia azedarach e Murraya paniculata. Química Nova, v. 30, n. 8, p. 1867-1871, 2007.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.; Microrganismos endofiticos: interação com plantas e potencial biotecnológicos. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v. 5, p. 21-32, 2011.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Brasília, v. 29, p. 62-77, 2002.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. Boletin Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, Santiago, v. 3, n. 4, p. 69-72, 2004.

PENDLE, S.; WEEKS, K.; PRIEST, M.; et al. Phaeohyphomycotic soft tissue infections caused by the coelomycetous fungus Microsphaeropsis arundinis. J Clin Microbiol, v. 42, p. 5315–5319, 2004.

PENG, X. P.; WANG, Y.; SUN, K. L.; LIU, P. P.; X. YIN, X.; ZHU, W. M. J. Nat. Prod. v. 74, p. 1298, 2011.

PEREIRA, L.O. Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais. Tese de Doutorado, ESALQ. Piracicaba, São Paulo, p. 104, 1993.

POACEAE in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <a href="http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB193">http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB193</a>. Acesso em: 27 Jun. 2019

PROISY, N.; SHARP, S. Y.; BOXALL, K.; CONNELLY, S.; ROE, S. M.; PRODROMOU, C.; SLAWIN, A. M.; PEARL, L. H.; WORKAMAN, P.; MOODY, C. J. Chem. Biol., v. 13, p. 1203–1215, 2006.

QUIN, S. H.; ZHAO, L. X.; YANG, Y. B.; HU, M.; DING, Z. T. A New Isochroman Derivative from the Endophytic *Microsphaeropsis arundinis*. Chemistry of Natural Compounds, v. 53 (5), p. 877–879, 2017.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018.

RAJAMANIKYAM, M.; VADLAPUDI, V.; AMANCHY, R. UPADHYAYULA, S. M. Endophytic fungi as Novel Resources of natural Therapeutics. Brazilian Archives of Biology and Techology, v. 60, p. 1-26, 2017.

RAHMAN, F. M.; KABIR, F.; NURMABI, M.; CHOWDHURY, A. M.; SARWARDDIN; SIKDER, M.; Al, A. Chemical and Biological Investigations of *Axonopus compressus* (Sw.) P. Beauv. Bangladesh Pharmaceutical Journal. 17, 2015. 10.3329/bpj.v17i1.22345.

RASMUSSEN, J. A.; RICE, E. L. Efeito alelopático de Sporobolus pyramidatus no padrão vegetacional. Am Midl Nat, v. 86, p. 309–326, 1971.

REVELLE, W. psych: Procedures for Personality and Psychological Research, Northwestern University, Evanston, Illinois, USA, 2018. Diponivem em <https://CRAN.R-project.org/package=psych Version = 1.8.12>.

ROCHA, A. E. S. da; SECCO, R. de S. Contribuição à taxonomia de Axonopus P. Beauv. (Poaceae) no Estado do Pará, Brasil. Acta bot. bras. v. 18(2), p. 295-304. 2004.

ROCHA, G.L., MARTINELLI, D.; CORREA, A.; TUNDISI, A. G. A., LIMA, F. P.; KALIL, E. B. Comparative value of grasses for meat production. Bolet. da Inds. Animal. v. 20, p. 289-296, 1962.

ROMEIRO, R. S. Prospecção da potencialidade antagonística de possíveis agentes de biocontrole. In: ROMEIRO, R. S. Controle biológico de doenças de plantas: procedimentos. Viçosa: UFV, 2007. p. 95-122.

SAHAR, M. K.; KAFI, S. K; HAITHAM, E. The antimicrobial activity and Phytochemical Characteristic of Moringa Oleifera Seeds, Leaves, and Flowers. World Journal of Pharmaceutical Research. Viçosa: v. 4, p. 258-271, 2015.

SANTIAGO, I. F.; ALVES, M. A. T.; RABELLO, A.; SALES, J. P. A.; ROMANHA, J. A.; ZANI, C. L. Leishimanicidal and antitumoral activeties of endophitic fungi

associated with the Antarctic angiosperms Deschampsia Antarctica Desv. And Colobanthus quitensis (Kunth) Bartl. Extremophiles, v. 16, p. 95-103, 2012.

SANTOS, M. S.; SILVA, M. C.; ALMEIDA, T.; FELBER A.; RODHEN, S. AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Identificação Molecular baseana no sequenciamento de rDNA de fungos endofíticos foliares de Passiflora spp. BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports, v. 2, p. 134-137, 2013.

SANZ, J.; MARCO, J. Phytochemistry 1990, v. 29, p. 2913–2917, 1990.

SARKAR, D. Lattice: Multivariate Data Visualization with R. Springer, New York. 2008. ISBN 978-0-387-75968-5

SASSA, T.; AOKI, H.; NAMIKI, M.; MUNAKATA, K. Agric. Biol. Chem. v. 32, p. 1432-1439, 1968.

SCOGNAMIGLIO, M.; FIUMANO, V.; D'ABROSCA, B.; PACIFICO, S.; MESSERE, A.; ESPOSITO, A.; FIORENTINO, A. Allelopathic potential of alkylphenols from *Dactylis glomerata* subsp. *hispanica* (Roth) Nyman. Phytochem Lett, v. 5, p. 206–210, 2012.

SELIM, H. M. M.; GOMAA, N. M.; ESSA A. M. M. Application of endophytic bacteria for the biocontrol of Rhizoctonia solani (Cantharellales: ceratobasidiaceae) damping-off disease in cotton seedlings. Biocontrol Science and Technology, v. 27, p. 81-95, 2017.

SEEPHONKAI, P.; ISAKA, M.; KITTAKOOP, P.; PALITTAPONGARNPIM, P.; KAMCHONWONGPAISAN, S.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Planta Med., v. 68, p. 45-48, 2002.

SERPELONI, J. M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A.; CÓLUS, I. M. S. Avaliação in vivo da anticlastogenicidade de extratos de plantas medicinais do gênero miconia

através do teste de micronucleo. Semima. Ciências Biológicas/Saúd, v. 29, p. 47-56, 2008.

SIMÕES, L. V. Exploração do potencial quimico e de biotransformação do fungo Rhinocladiella similis na busca por compostos de interesse biológico. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Estadual Paulista. f. 103, Araraquara, 2018.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2º Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 704 p. Shirasuna, R. T. 2012. Glaziophytonin In R.C. Forzza et al. (ed.) Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2008.

SOUZA L. Q. A.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. M. I.; PEREIR, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: Palicourea longiflora (aubl.) rich e Strychnos cogens bentham. Acta amazônica v. 34, n.2, p.185 – 195, 2004.

SOUZA, B. dos S.; OLIVEIRA, D. R. de; ROCHA, F. V. R. da; CANTO, E. S. M.; OLIVEIRA, D. P. de; DOS SANTOS, T. T. Fungos endofíticos associados à planta medicinal corama (Kalanchoe pinnata [LAM.] PERS.). DESAFIOS - Revista Interdisciplinar Da Universidade Federal Do Tocantins, v. 5(3), p. 30-45, 2018.

SOUZA FILHO, A. P. S. Potencialidades alelopáticas envolvendo gramíneas e leguminosas forrageiras e plantas invasoras de pastagens. Tese, Universidade Estadual de São Paulo, 1995.

SOLADOYE, M.O.; ADETAYO, M. O.; CHUKWUMA, E. C. C.; ADETUNJI, A. N. Ethnobotanical survey of plants used in the treatment of haemorrhoids in South-Western Nigeria, J. Adv. Dev. Res. 2, 100-111, 2010.

SOMMART, U.; RUKACHAISIRIKUL, V.; TADPETCH, K.; SUKPONDMA, Y.; PHONGPAICHIT, S.; HUTADILOK-TOWATANA, N.; SAKAYAROJ, J. Tetrahedron, v. 68, p. 10005, 2012.

SHIMADA, A.; NAKAYA, K.; TAKEUCHI, S.; KIMURA, Y. Z. Naturforschi., B: Chem. Sci. v. 56, p. 449-451, 2001.

SHIOMI, H. F.; SILVA, H. S. A.; MELO, I. S. D.; NUNES, F. V.; BETTIOL, W. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. Scientia Agrícola, v. 63, p. 32-39, 2006.

SHIVAKOTI, C.; RAMANJANEYELU, K.; RAMESH, A. Triagem fitoquímica preliminar de Setaria verticillata . Indo Am J Pharm Res 5 (6): 2425–2429, 2015.

SKERMAN, P.; RIVEROS, F. Gramíneas tropicales. FAO, Rma. 576p. 1992.

SPAINHOR, C. B. Natural products, In: GAD, S. C. Drug discovery handbook. New York: Wiley-Interscience, Cap. 1, p. 12-72, 2005.

SVIRIDOV, S. I. Chem. Nat. Compd., v. 27, p. 410, 1991.

STEVENS, P. F. (2001). Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2012. Disponível em: http://www.mobot.org/MOBOT/ research/APweb/. Acessado em 01.04.2019.

STEVENS, M. H. H.; SZOECS, E.; WAGNER H. (2019). vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-4.

TANG, C. S.; YOUNG, C. C. Coleta e identificação de compostos alelopáticos do sistema radicular não perturbado do limpograss Bigalta (Hemarthria altissima). Plant Physiol 69: 155–160, 1982.

TORRES, R.; JOSE, C.; SHIRASUNA, R.; GROMBONE-GUARATINI M. D. Ácidos fenólicos e flavonóides de glicosídeo C em Merostachys riedeliana (bambu). Planta Med, v. 80, p. 33–34, 2014.

TSUDA, M.; MUGISHIMA, T.; KOMATSU, K.; SONE, T.; TANAKA, M.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. J. Nat. Prod. v. 66, p. 412-415, 2003.

VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. Modern Applied Statistics with S. Fourth Edition. Springer, New York. 2002. Disponivel em <a href="http://www.stats.ox.ac.uk/pub/MASS4">http://www.stats.ox.ac.uk/pub/MASS4</a>>.

VERZIGNASSI, J. R.; HOMECHIN, M.; VIDA, J. B. Microrganismos endofíticos. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 17, n. 1, p. 93-98, 1996.

VIANA, P.; FILGUEIRAS, T. Inventário e distribuição geográfica das gramíneas (Poaceae) na cadeia do Espinhaço, Brasil. Megadiversidade v. 4, p. 72-88, 2008.

VIEIRA, L. F.; TELES, H. L. Investigação dos Metabólitos Secundários Potencialmente Responsáveis por Atividades Antimicrobianas Apresentadas em Ensaios de antibiose entre microrganismos patogênicos humanos e os fungos endofiticos (P9 (Fusarium proliferatum), P25 (Periconia macrospinosa), P28 (Neocosmospora striata), P59 (Fusarium succisae) e P61 (Fusarium oxysporum) Associados às Folhas da Gramínea Paspalum wrightii Hitchc.. In: XXVI Seminário de Iniciação científic, 2018. Rondonópolis. XXVI Seminário de Iniciação científica, 2018.

XUANG, T. D.; TOYAMA, T.; FUKUTA, M.; KHANH, T. D.; TAWATA, S. Interação química na invasividade do capim-cogon (Imperata cylindrica (L.) Beauv.) J Agric Food Chem, v. 57, p. 9448–9453, 2009.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes, Natural Product Report, v. 23, p. 753-771, Oct. 2016.

ZHENG, H., HE, C. Q.; XU QY, et al. Interferência da alelopatia sobre Spartina alterniflora no mariqueter Scirpus pelos efeitos do carvão ativado no solo. Procedia Environ Sci, v. 10, p. 1835–1840, 2011.

WANG, C.; WANG, B.; BRAUERS, G.; GUAN, H.; PROKSCH, P.; EBEL, R. J. Nat. Prod. 2002, 65, 772–775.

WEIHS, C.; LIGGES, U.; LUEBKE, K.; RAABE, N. klaR Analyzing German Business Cycles. In Baier, D., Decker, R. and Schmidt-Thieme, L. (eds.). Data Analysis and Decision Support, p. 335-343, Springer-Verlag, Berlin, 2005.

WENZEL, J. B "Isolamento e atividade antagonística de fungos endofíticos de soja" (Glycine max (L.) Merrill)." SaBios-Revista de Saúde e Biologia. 2012.

WICKHAM, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, 2016.

WRIGHT, K. (2018). corrgram: Plot a Correlogram. R package version 1.13.

WEI, T.; SIMKO, V. (2017). R package "corrplot": Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.84).

YAMAMOTO, Y.; FUGII, Y. Exsudação de composto alelopático de raízes de plantas de capim-vernal doce (Anthoxanthum odoratum). J Weed Sci Technol, v. 42 (1), p. 31–35, 1997.

YOGANATHAN, K.; CAO, S.; CRASTA, S. C.; AITIPAMULA, S.; WHETTON, S. R.; NG, S.; BUSS, A. D.; BUTLER, M. S. Tetrahedron 2008, 64, 10181–10187.

YU, Z.; WANG, G.; BIANBA, C.; LIN, R. Zhongguo Zhongyao Zazhi, v. 31, p. 656-658, 2006. Anexo

TRIAGEM BIOLÓGICA



FIGURA 28 - Interpretação para as medições de halos de inibição e crescimento micelial no bioensaio

Fonte: Ilustrado pelo próprio autor, 2020.

FIGURA 29 - (A) Demonstração dos bioensaios em método adaptado do bloco de gelose (exemplo: fungo endofítico P28 frente a *Candida krusei*). (B) Demonstração dos ensaios biológicos com técnica da cultura pareada (exemplo: fungo endofítico P21 frente ao fitopatógeno *Corinespora cassicola*)



DI: Diâmetro do halo de inibição (mm);

**DM:** Diâmetro do crescimento micelar (mm);

**EI:** Evolução da inibição (EI= DI – DM);



Fonte: Ilustrado pelo próprio autor, 2020.

	Medições dos halos (mm) e da inibição calculada																													
Micror-	<i>E</i> .	aure	us.	1	E. col	i	K	. pne	u.	P.	aeru	ıg.	E	E. fae	с.	(	C. alb	•	0	. glał	<i>b</i> .	0	. krus	s.	0	. trop	).	С.	para	p.
ganismos	DI	DM	EI	DI	DM	EI	DI	DM	EI	DI	DM	EI	DI	DM	EI	DI	DM	EI	DI	DM	EI	DI	DM	EI	DI	DM	EI	DI	DM	EI
C (-)		-			-			-			-			-			-			-			-			-			-	
P1	31,5	16,5	15,0		-			-		22,5	14,5	8,0	47,5	37,5	20,0		-			-			-			-			-	
P4	50,0	30,0	20,0		-			-			-			-		35,0	25,0	10,0	30,0	20,0	10,0	35,0	25,0	10,0	35,0	25,0	10,0	35,0	25,0	10,0
P5		-			-			-			-			-		32,0	22,0	10,0	32,0	22,0	10,0	25,0	19,0	06,0	26,0	20,0	6,0	31,0	21,0	10,0
P9	65,3	25,6	39,7		-			-		40,0	20,0	20,0		-			-			-			-			-			-	
P13		-			-			-			-	•		-			-			-			-			-			-	
P19		-			-			-			-			-			-			-			-			-			-	
P21	35,0	17,0	18,0	30,0	20,0	10,0	40,0	20,0	20,0	45,0	15,0	30,0	30,0	20,0	10,0	62,9	22,7	40,2	30,0	20,0	10,0	40,0	20,0	20,0	35,0	17,0	18,0	30,0	20,0	10,0
P22		-			-			-			-			-			-			-			-			-			-	
P24	53,0	23,0	30,0	47,0	28,0	19,0	54,5	32,5	22,0	55,0	30,0	25,0	55,0	25,0	30,0		-			-			-			-			-	
P25	44,0	9,0	35,0		-			-			-			-		44,0	9,0	35,0		-			-		46,5	11,5	35,0	44,0	9,0	35,0
P28		-			-			-			-			-		55,0	25,0	30,0	40,0	22,0	18,0	58,0	18,0	40,0	45,0	25,0	20,0	45,0	19,0	26,0
P30		-			-			-			-			-			-			-			-			-			-	
P31	28,0	6,5*	21,5		-			-		11,7	2,4*	9,3	21,5	8,5	13,0		-			-			-			-			-	
P32	90,0	10,0	80,0	25,0	15,0	10,0		-		40,0	10,0	30,0	15,0	9,0	6,0		-			-			-			-			-	
P33	63,5	12,5	51,0	15,0	7,0*	8,0		-		47,0	15,0	32,0	38,0	13,0	25,0		-			-			-			-			-	
P34	67.0 17.0 50.0 -			_		-		12,5	7,5*	5,0	_			-		-			-			-								
P36	62.5	10.0	52.5	36.0	10.0	26.0	30.0	15.0	15.0	8.0	5.0*	3.0	13.0	10.0	3.0	25.0	7.0*	18.0	35.0	17.0	18.0	30.0	12.0	18.0	22.0	12.0	10.0	30.0	10.0	20.0

TABELA 9 - Atividades antimicrobianas dos fungos endofíticos frente aos microrganismos patogênicos humano

E. aureus (Estaphylococcus aureus); E. coli (Escherichia coli); K. pneu. (Klebsiella pneumoniae); P. aerug. (Pseudonomas aeruginosa); E. faec. (Enterococcus faecalis); C. alb. (Candida albicans); C. glab. (Candida glabrata); C. krus. (Candida krusei); C. trop. (Candida tropicalis); C. parap. (Candida parapsilosis); DI (Diâmetro do halo de inibição); DM (Diâmetro do crescimento micelar); EI (Evolução da inibição: EI = DI - DM); C (-) (Controle negativo); \*valores reduzidos pela média: deverão ser refeitos. Fonte: Adaptado pelo próprio autor, 2020.

	Medições dos halos (mm) e da inibição calculada																											
Micror-	Е.	aure	us.	j	E. coli			. pne	и.	P.	aeru	ıg.	Ŀ	E. fae	с.	C. alb		C. glal	<i>b</i> .	C. krus.		s.	0	C. trop	).	С.	para	ıp.
ganismos	DI	DM	EI	DI	DM	EI	DI	DM	EI	DI	DM	EI	DI	DM	EI	DI DM	EI	DI DM	EI	DI	DM	EI	DI	DM	EI	DI	DM	EI
C (-)		-			-			-			-			-		-		-			-			-			-	
P37	42,5	2,5*	40,0		-			-			-			-		-		-			-			-			-	
P40	24,0	4,0*	20,0		-			-		25,0	7,0*	18,0	25,0	7,0*	18,0	-		-			-			-			-	
P41	23,7	15,0	8,7		-			-		22,0	16,0	6,0	18,3	9,6	8,7	-		-			-			-			-	
P42	10,0	3,3*	6,7		-			-			-		6,7	3,4*	3,3	-		-			-			-			-	
P44	52,0	8,0	44,0	20,0	10,0	10,0		-		28,0	14,0	14,0		-		-		-			-			-			-	
P46		-			-			-			-			-		-		-			-			-			-	
P48	45,0	15,0	30,0	50,0	10,0	40,0	35,0	7,0*	28,0	45,0	15,0	30,0	50,0	25,0	25,0	-		-			-			-			-	
P50	22,5	9,5	13,0	10,0	8,0	2,0	24,5	15,5	9,0	27,0	16,0	11,0	20,5	15,5	5,0	-		44,0 10,0	34,0		-			-			-	
P52		-			-			-			-			-		-		-			-			-			-	
P56	5,0	3,0*	2,0		-		11,7	7,7*	4,0		-		11,3	6,6*	4,7	-		-		9,0	5,0*	4,0		-		29,2	5,7*	23,5
P57	7,0	4,0*	3,0		-			-			-			-		-		-			-			-		31,0	3,0*	28,0
P59		-		29,5	9,5	20,0		-		25,0	7,0*	18,0	20,0	10,0	10,0	-		-			-			-			-	
P60	66,3	13,0	53,3		-			-		39,0	9,0	30,0	35,5	9,5	26,0	-		-			-			-		20,0	5,0*	15,0
P61	25,0	8,3	16,7		-			-		45,0	13,0	32,0	23,0	8,0	15,0	-		26,5 5,5*	21,0		-			-		29,3	2,6*	26,7
P63	32,5	17,5	15,0		-			-		44,5	16,5	28,0	45,0	19,0	26,0	-		-			-			-			-	
P65		-			-			-			-		44,0	11,0	33,0	12,5 4,5*	8,0	15,0 5,0*	10,0	11,5	3,5*	8,0	15,0	6,0*	9,0	23,5	9,5	14,0
P66	42,5	15,5	27,0	30,0	10,0	20,0		-		45,0	22,0	23,0	45,0	23,0	22,0	-		-			-			-			-	

TABELA 9 - Atividades antimicrobianas dos fungos endofíticos frente aos microrganismos patogênicos humanos (Continuação)

*E. aureus* (*Estaphylococcus aureus*); *E. coli* (*Escherichia coli*); *K. pneu.* (*Klebsiella pneumoniae*); *P. aerug.* (*Pseudonomas aeruginosa*); *E. faec.* (*Enterococcus faecalis*); *C. alb.* (*Candida albicans*); *C. glab.* (*Candida glabrata*); *C. krus.* (*Candida krusei*); *C. trop.* (*Candida tropicalis*); *C. parap.* (*Candida parapsilosis*); **DI** (Diâmetro do halo de inibição); **DM** (Diâmetro do crescimento micelar); **EI** (Evolução da inibição: EI = DI - DM); C (-) (Controle negativo); \*valores reduzidos pela média: deverão ser refeitos. Fonte: Adaptado pelo próprio autor, 2020.

	Medições dos halos (mm) e da inibição calculada																													
Micro-	<i>E</i> .	E. aureus.			E. coli		K	. pneu	ι.	P.	aeru	ıg.	Ŀ	E. fae	с.	C	C. alb		C. glab.		<b>b</b> .	C. krus.		s.	0	C. trop	).	C.	para	ıp.
organismos	DI	DM	EI	DI	DM	EI	DI	DM	EI	DI	DM	EI	DI	DM	EI	DI	DM	EI	DI	DM	EI	DI	DM	EI	DI	DM	EI	DI	DM	EI
C (-)				-			-		-			-		-		-		-		-										
P70	_		-			_			-		31,0	18,0	13,0	33,5	18,5	15,0	32,5	19,5	13,0	25,5	21,5	4,0	26,0	18,0	8,0	59,5	19,5	40,0		
P72	22,5	4,5*	18,0	22,5	2,5*	20,0		-			-		32,0	8,0	24,0		-			-			-			-			-	
P73				-		-			-			-			-		-			-										
P77	30,0	11,0	19,0	46,5	23,5	23,0		-		29,0	14,0	15,0	56,0	23,0	33,0	17,5	14,5	3,0	15,0	12,0	3,0	17,5	12,5	5,0	21,0	16,0	5,0	20,0	15,0	5,0
P79	45,0	5,0*	40,0		-			-		35,0	9,0	26,0	70,0	13,0	57,0	23,0	11,0	12,0	12,5	4,5*	8,0	19,0	13,0	6,0	10,0	7,0*	3,0	20,0	10,0	10,0
P80				_		-		27,5	13,5	14,0	-			-			-			_			-							
P81					-			-		-		_			_				-			-								
P82	12,5 4,5* 8,0 -				-		15,0	5,0*	10,0	27,5	10,5	17,0		-			-			-			-			_				
P87				16,0	16,0 13,0 3,0		-			17,5	14,5	3,0	14,5 11,5 3,0		3,0	-			19,0	13,0	6,0	15,0	10,0	5,0	14,5	11,5	3,0			
P90	-		-		-		-		55,0	15,0	40,0		-		-			12,5 7,5* 5,0		5,0	-			-						

TABELA 9 - Atividades antimicrobianas dos fungos endofíticos frente aos microrganismos patogênicos humanos (Continuação)

E. aureus (Estaphylococcus aureus); E. coli (Escherichia coli); K. pneu. (Klebsiella pneumoniae); P. aerug. (Pseudonomas aeruginosa); E. faec. (Enterococcus faecalis); C. alb. (Candida albicans); C. glab. (Candida glabrata); C. krus. (Candida krusei); C. trop. (Candida tropicalis); C. parap. (Candida parapsilosis); DI (Diâmetro do halo de inibição); DM (Diâmetro do crescimento micelar); EI (Evolução da inibição: EI = DI - DM); C (-) (Controle negativo); \*valores reduzidos pela média: deverão ser refeitos. Fonte: Adaptado pelo próprio autor, 2020.

TABELA 10 - Classificação da atividade antimicrobiana proposta por MATSUURA\*, 2004.

Inerte (-)	Ausência de halo de inibição;
Baixa (+)	Diâmetro do halo de inibição entre 7 a 10 mm;
Moderada (++):	Diâmetro do halo de inibição entre 11 a 14 mm;
Alta (+++):	Diâmetro do halo de inibição superior a 14 mm;

\*MATSUURA, T. Caracterização taxonômica de actinomicetos endofíticos produtores de antibióticos isolados de cupuaçuzeiro (*Theobromagrandiflorum schum*).

Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2004.

Fonte: Adaptado pelo próprio autor, 2020.

TABELA 11 - Proposta para a semiquantificação da atividade antimicrobiana apresentada pelos fungos endofíticos

Ausente: <17%	(-)
Baixa: De 17% a 67%	(+)
Moderada: De 68% a 133%	(++)
Alta: > 133%	(+++)

Fonte: Adaptado pelo próprio autor, 2020.

Formula proposta para o cálculo e obtenção da semiquantificação da atividade antimicrobiana:

 $X\% = (DI \times 100) / DM) - 100$ 

Sendo:

X%: porcentagem de evolução da área de inibição;

DI: Diâmetro do halo de inibição;

**DM:** Diâmetro do crescimento micelar

Fonte: Adaptado pelo próprio autor, 2020.

					Atividad	e antimicrol	oiana			
Microrganismos	E. aureus.	E. coli	K. pneu.	P. aerug.	E. faec.	C. alb.	C. glab.	C. krus.	C. trop.	C. parap.
P1	++	-	-	+	+	-	-	-	-	-
P4	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
P5	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
P9	+++	-	-	++	-	-	-	-	-	-
P21	++	+	++	+++	+	+++	+	++	++	+
P24	++	+	+	++	++	-	-	-	-	-
P25	+++	-	-	-	-	+++	-	-	+++	+++
P28	-	-	-	-	-	++	++	+++	++	+++
P31	+++	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-
P32	+++	+	-	+++	+	-	-	-	-	-
P33	+++	++	-	+++	+++	-	-	-	-	-
P34	+++	-	-		+	-	-	-	-	-
P36	+++	+++	++	+	+	+	++	+++	++	+++
P37	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P40	+++	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-
P41	+	-	-	+	++	-	-	-	-	-
P42	+++	-	-	-	++	-	-	-	-	-
P48	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-

TABELA 12 - Semiquantificações das atividades antibióticas apresentadas pelos fungos endofíticos extraídos das folhas de A. leptostachyus

*E. aureus* (*Estaphylococcus aureus*); *E. coli* (*Escherichia coli*); *K. pneu*. (*Klebsiella pneumoniae*); *P. aerug*. (*Pseudonomas aeruginosa*); *E. faec*. (*Enterococcus faecalis*); *C. alb*. (*Candida albicans*); *C. glab*. (*Candida glabrata*); *C. krus*. (*Candida krusei*); *C. trop*. (*Candida tropicalis*); *C. parap*. (*Candida parapsilosis*); (-) inerte, ausência de halo de inibição (<17%); (+) baixa, diâmetro do halo de inibição entre 17 a 67%; (++) moderada, diâmetro do halo de inibição entre 68 e 133%; (+++) alta, diâmetro do halo de

inibição >133%;

Fonte: Adaptado pelo próprio autor, 2020.

	Atividade antimicrobiana													
Microrganismos	E. aureus.	E. coli	K. pneu.	P. aerug.	E. faec.	C. alb.	C. glab.	C. krus.	C. trop.	C. parap.				
P50	+++	+	+	++	+	-	+++	-	-	-				
P56	+	-	+	-	++	-	-	++	-	+++				
P57	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+++				
P59	-	+++	-	+++	++	-	-	-	-	-				
P60	+++	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++				
P61	+++	-	-	+++	+++	-	+++	-	-	+++				
P63	++	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-				
P65	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++				
P66	+++	+++	-	++	++	-	-	-	-	_				
P70	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+++				
P72	+++	+++	-	-	+++	-	-	-	-	_				
P77	+++	++	-	++	++	+	+	+	+	+				
P79	+++	-	-	+++	+++	++	+++	+	+	++				
P80	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-				
P82	+++	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-				
P87	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+				
P90	-	-	-	-	+++	-	-	+	-	-				

TABELA 12 - Semiquantificações das atividades antibióticas apresentadas pelos fungos endofíticos extraídos das folhas de A. leptostachyus (Continuação)

E. aureus (Estaphylococcus aureus); E. coli (Escherichia coli); K. pneu. (Klebsiella pneumoniae); P. aerug. (Pseudonomas aeruginosa); E. faec. (Enterococcus faecalis); C. alb. (Candida albicans); C. glab. (Candida glabrata); C. krus. (Candida krusei); C. trop. (Candida tropicalis); C. parap. (Candida parapsilosis); (-) inerte, ausência de halo de inibição (<17%); (+) baixa, diâmetro do halo de inibição entre 17 a 67%; (++) moderada, diâmetro do halo de inibição entre 68 e 133%; (+++) alta, diâmetro do halo de inibição >133%;

Fonte: Adaptado pelo próprio autor, 2020.

CROMATOGRAMAS: ETAPA DE TRIAGEM



FIGURA 30 - Cromatogramas obtido dos meios BDA e Mínimo

Cromatogramas:  $\lambda$ = 216 e 200 nm (preto), 210 nm (rosa), 220 nm (rosa e azul), 254 nm (azul e vermelho) e 366 nm (verde e vermelho). Condição: Gradiente exploratório [Coluna C18 analítica (250 x 4,6 mm, 5µm, MeOH:H<sub>2</sub>O [(5:95) 40 min. (100:0) 10 min. (100:0) 5 mim. (5:95) 10 min.]; Vazão de 1 mL.min<sup>-1</sup>; V. inj.: 10 µL;

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.



FIGURA 31 - Cromatogramas obtido dos fungos endofíticos P9, P48, P59 e P61

Cromatogramas: λ= 211 e 216 nm (preto), 220 nm (rosa), 254 nm (azul) e 366 nm (vermelho). Condição: Gradiente exploratório [Coluna C18 analítica (250 x 4,6 mm, 5µm, MeOH:H<sub>2</sub>O [(5:95) 40 min. (100:0) 10 min. (100:0) 5 mim. (5:95) 10 min.]; Vazão de 1 mL.min<sup>-1</sup>; V. inj.: 10 µL; **Fonte:** Ilustração elaborada pelo autor, 2020.

ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL: ESPECTROS SUBSTÂNCIA 1



FIGURA 32 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 2,8 mg em tubo de 5 mm.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.



FIGURA 33 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 9,2 mg em tubo de 5 mm.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.



FIGURA 34 - (A) Espectro de RMN 1H (600 MHz//Pyr-D5) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 6,2 mg em tubo de 5 mm.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.


FIGURA 35 - (B) Espectro de RMN <sup>1</sup>H (600 MHz//Pyr-D5) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 6,2 mg em tubo de 5 mm.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.



FIGURA 36 - DEPT-135 (150 MHz/CD<sub>3</sub>OD) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 2,8 mg em tubo de 5 mm.

FIGURA 37 - DEPT-135 (150 MHz/Pyr-D5) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 6,2 mg em tubo de 5 mm.



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.



FIGURA 38 - gHSQC (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 9.2 mg em tubo de 5 mm.

FIGURA 39 - Ampliação em gHSQC (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 9.2 mg em tubo de 5 mm.







FIGURA 40 - gHSQC (600 MHz/Pyr-D5) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 6,2 mg em tubo de 5 mm.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.

FIGURA 41 - Ampliação em gHSQC (600 MHz/Pyr-D5) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 6,2 mg em tubo de 5 mm.







FIGURA 43 - Ampliação em gHMBC (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 7,6 mg em tubo de 5 mm.



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.



FIGURA 44 - gHMBC (600 MHz/Pyr-D5) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 6,2 mg em tubo de 5 mm.

FIGURA 45 - Ampliação 1 gHMBC (600 MHz/Pyr-D5) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 6,2 mg em tubo de 5 mm.



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.



FIGURA 46 - Ampliação 2 gHMBC (600 MHz/Pyr-D5) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 6,2 mg em tubo de 5 mm.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.

FIGURA 47 - Ampliação 3 gHMBC (600 MHz/Pyr-D5) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 6,2 mg em tubo de 5 mm.



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.



FIGURA 49 - Ampliação 1 em *g*COSY (600 MHz/Pyr-D5) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 6,2 mg em tubo de 5 mm.



FIGURA 48 - gCOSY (600 MHz/Pyr-D5) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 6,2 mg em tubo de 5 mm.

FIGURA 50 - Ampliação 2 em gCOSY (600 MHz/Pyr-D5) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 6,2 mg em tubo de 5 mm.



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.



FIGURA 51 - NOESY 1D em 2,11; 2,18; 2,23 e 2,30 ppm (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 2,8 mg em tubo de 5 mm.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.



FIGURA 52 - NOESY 1D em 1,96; 2,03 e 2,30 ppm (600 MHz/Pyr-D5) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 2,8 mg em tubo de 5 mm.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.



FIGURA 53 - TOCSY 1D em 1,96, 2,28 e 2,30 ppm (600 MHz/Pyr-D5) do extrato bruto AcOt de P21-BDA-Triagem. (Substância 1). Obtido com 6,2 mg em tubo de 5 mm.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.







FIGURA 54 - Espectro de massas (EM-ES +70V) do banco (ACN de HPLC) em modo negativo

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.



FIGURA 56 - Espectro de massas (EM-ES +70V) do extrato bruto AcOEt de P21-BDA-Triagem (Substância 1) em modo positivo

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.





ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL: ESPECTROS SUBSTÂNCIA 2



**FIGURA 58 -** Espectro de RMN 1H (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR4.meio (4) de P28-BDA-Crescimento maior escala. (**Substância 2**). Obtido com 2,6 mg em tubo de 3 mm.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.



FIGURA 59 - DEPT-135 (150 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR.4.Meio (4) de P28-BDA-Crescimento maior escala. (Substância 2). Obtido com 2,4 mg em tubo de 5 mm.

FIGURA 60 - gHSQC (150 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR.4.meio (4) de P28-BDA-Crescimento maior escala. (Substância 2). Obtido com 2,6 mg em tubo de 3 mm.



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.



**FIGURA 61 -** Ampliação 1 *g*HSQC (150 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR.4.meio (4) de P28-BDA-Crescimento maior escala. (**Substância 2**). Obtido com 2,6 mg em tubo de 3 mm.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.

FIGURA 62 - Ampliação 2 gHSQC (150 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR.4.meio (4) de P28-BDA-Crescimento maior escala. (Substância 2). Obtido com 2,6 mg em tubo de 3 mm.



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.



FIGURA 63 - gHMBC (150 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR.4.meio (4) de P28-BDA-Crescimento maior escala. (Substância 2). Obtido com 2,6 mg em tubo de 3 mm.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.

**FIGURA 64 -** Ampliação 1 *g*HMBC (150 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR.4.meio (4) de P28-BDA-Crescimento maior escala. (**Substância 2**). Obtido com 2,6 mg em tubo de 3 mm.







**FIGURA 65 -** Ampliação 2 *g*HMBC (150 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR.4.meio (4) de P28-BDA-Crescimento maior escala. (**Substância 2**). Obtido com 2,6 mg em tubo de 3 mm.

FIGURA 66 - gCOSY (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR.4.meio de P28-BDA-Crescimento maior escala. (Substância 2). Obtido com 2,4 mg em tubo de 5 mm.



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.

FIGURA 67 - Ampliação 1 gCOSY (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR.4.meio de P28-BDA-Crescimento maior escala. (Substância 2). Obtido com 2,4 mg em tubo de 5 mm.



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.

FIGURA 68 - Ampliação 2 gCOSY (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR.4.meio de P28-BDA-Crescimento maior escala. (Substância 2). Obtido com 2,4 mg em tubo de 5 mm.



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.



FIGURA 69 - TOCSY 1D em 4,13, 5,36 e 6,22 ppm (600 MHz CD<sub>3</sub>OD) da fração FR.4.meio (4) de P28-BDA-Crescimento maior escala. (Substância 2). Obtido com 2,6 mg em tubo de 3 mm.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.

ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL: ESPECTROS SUBSTÂNCIA 3



**FIGURA 70** - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD) de FR2.m (2-3) do extrato bruto AcOEt de P28-Meio mínimo-Crescimento maior escala. (**Substância 3**). Obtido com 2,6 mg em tubo de 3 mm.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.



**FIGURA 71 -** NOESY 1D em 2,49; 2,50; 2,51, 2,52 e 3,61 ppm (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR2.meio de P28-Meio mínimo-Crescimento maior escala. (**Substância 3**). Obtido com 2,2 mg em tubo de 5 mm.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.



**FIGURA 72 -** TOCSY 1D em 3,32 ppm (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR2.meio do extrato bruto AcOEt de P28-Meio mínimo-Crescimento maior escala. (Substância 3). Obtido com 2,2 mg em tubo de 5 mm.

FIGURA 73 - HOMODEC 1D em 3,34 ppm (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR2.meio de P28-Meio mínimo-Crescimento maior escala. (Substância 3). Obtido com 2,2 mg em tubo de 5 mm.



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.

**FIGURA 74 -** Espectro *g*HSQC (150 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR2.meio do extrato bruto AcOEt de P28-Meio mínimo-Crescimento maior escala. (**Substância 3**). Obtido com 2,2 mg em tubo de 5 mm.



**FIGURA 75 -** Ampliação 1 do bidimensional gHSQC (150 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR2.meio de P28-Meio mínimo-Crescimento maior escala. (**Substância 3**). Obtido com 2,2 mg em tubo de 5 mm.



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.





Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.







FIGURA 78 - Ampliação 1 do bidimensional gHMBC (150 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR2.meio de P28-Meio mínimo-Crescimento maior escala. (Substância 3). Obtido com 2,2 mg em tubo de 5 mm.



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.

**FIGURA 79 -** Ampliação 2 do bidimensional *g*HMBC (150 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR2.meio de P28-Meio mínimo-Crescimento maior escala. (**Substância 3**). Obtido com 2,2 mg em tubo de 5 mm.



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.

FIGURA 80 - Espectro gCOSY (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR2.meio de P28-Meio mínimo-Crescimento maior escala. (Substância 3). Obtido com 2,2 mg em tubo de 5 mm.



**FIGURA 81 -** Ampliação 1 do bidimensional *g*COSY (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR2.meio de P28-Meio mínimo-Crescimento maior escala. (**Substância 3**). Obtido com 2,2 mg em tubo de 5 mm.



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.

**FIGURA 82 -** Ampliação 2 do bidimensional *g*COSY (600 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR2.meio de P28-Meio mínimo-Crescimento maior escala. (**Substância 3**). Obtido com 2,2 mg em tubo de 5 mm.



FIGURA 83 - Espectro DEPT-135 (150 MHz/CD<sub>3</sub>OD) da fração FR2.meio de P28-Meio mínimo-Crescimento maior escala. (Substância 3). Obtido com 2,2 mg em tubo de 5 mm.



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.