

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

OMAR CABEZAS GÓMEZ

Identificação de metabólitos secundários com potencial antimicrobiano produzidos pelo fungo endofítico *Lasiodiplodia* sp. isolado do Ipê rosa (*Handroanthus impetiginosus*)

Alfenas/MG

2022

OMAR CABEZAS GÓMEZ

Identificação de metabólitos secundários com potencial antimicrobiano produzidos pelo fungo endofítico *Lasiodiplodia* sp. isolado do Ipê rosa (*Handroanthus impetiginosus*)

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Jaine Honorata Hortolan Luiz

Alfenas/MG

2022

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Gómez, Omar Cabezas

G633i Identificação de metabólitos secundários com potencial antimicrobiano produzidos pelo fungo endofítico *Lasiodiplodia* sp. isolado do Ipê rosa (*Handroanthus impetiginosus*) / Omar Cabezas Gómez – Alfenas, MG, 2022.

170 f.: il. –

Orientadora: Jaine Honorata Hortolan Luiz.

Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Alfenas, 2021.

Bibliografia.

1. Fungos endofíticos. 2. *Lasiodiplodia* sp. 3. Fermentação. 4. Atividade antimicrobiana. 5. RMN. 6. Espectrometria de Massas. 7. Compostos aromáticos bioativos. I. Luiz, Jaine Honorata Hortolan. II. Título.

CDD- 547

Ficha Catalográfica elaborada por Marlom Cesar da Silva
Bibliotecário-Documentalista CRB6/2735

OMAR CABEZAS GÓMEZ

Identificação de metabólitos secundários com potencial antimicrobiano produzidos pelo fungo endófito *Lasiodiplodia* sp. isolado do Ipê rosa (*Handroanthus impetiginosus*)

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovado em: 20 de janeiro de 2022.

Profa. Dra. Jaine Honorata Hortolan Luiz
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Yohandra Reyes Torres
Instituição: Universidade Estadual do Centro-Oeste

Prof. Dr. Jan Schripsema
Instituição: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darci Ribeiro

Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Cecília Verônica Nunes
Instituição: Instituto Nacional de Pesquisas de Amazônia (INPA)



Documento assinado eletronicamente por Jaine Honorata Hortolan Luiz, Professor do Magistério Superior, em 21/01/2022, às 10:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Marcelo Aparecido da Silva, Professor do Magistério Superior, em 21/01/2022, às 13:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Yohandra Reyes Torres, Usuário Externo, em 21/01/2022, às 14:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Jan Schripsema, Usuário Externo, em 21/01/2022, às 14:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por CECILIA VERONICA NUNEZ, Usuário Externo, em 23/01/2022, às 20:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?action=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0665599 e o código CRC 5BBADB90.

Ao meu pai, cujo pensamento e espírito emanava a ciência tal qual uma fonte inesgotável. Minha eterna gratidão pelo legado!!

AGRADECIMENTOS

Após mais de quatro anos de estudo e pesquisa, chega o momento de agradecer pessoas importantes que fizeram parte dessa trajetória tão enriquecedora para conclusão de meu Doutorado em Química. São muitas as pessoas e variados e até difíceis os eventos que aconteceram e igualmente me conduziram até o presente, no entanto, inicialmente gostaria de agradecer imensamente a Deus pela proteção e pela oportunidade, eis a origem de tudo...

O doutorado me presenteou com uma competente orientadora, a Professora Jaíne H.H. Luiz, que conseqüentemente virou mais uma amiga: excelente orientadora, pessoa simples e descontraída, referência para meu trabalho, exemplo de ser humano do bem, a quem devo grande parte do meu crescimento pessoal e profissional. A ela meus eternos agradecimentos!

Agradeço a minha família pelo constante apoio: minha linda e amada mãe, meu pai (pura inspiração cujo trabalho eu dedico), meu irmão mais velho Luben, exemplo de resiliência e constância, sempre lutando e desbravando os caminhos para todos nós, meus queridos irmãos Ivan e Loidel, minhas queridas irmãs da vida Isara e Marliete e o Marcello que felizmente hoje me acompanha. Todos seres abençoados e luzes da minha vida.

A todos meus amigos, os de perto e de longe: Marcio (e suas filhas), Raquel, Dajara, Paula, Amanda, Raira, Gustavo, Alain, Mariley, Adonis, meus amigos de estudos em Cuba. Falando em amigos, não posso deixar de mencionar os colegas e professores do Laboratório de Bioprocessos da UNIFAL, onde desenvolvi a maior parte do meu trabalho e onde me sentia como se estivesse em “casa”. Muito Obrigado a todos e Muito Obrigado ao Brasil, terra linda que me acolheu, cheia de pessoas amáveis, anfitriãs e inesquecíveis!

Agradeço com antecipação à banca examinadora pelo aceite para participar da defesa e pelos aportes, sugestões e ensinamentos que com certeza irão me fornecer durante a apresentação da tese.

Às instituições e profissionais que fizeram possível a obtenção dos resultados da pesquisa: a Dra. Patricia Lunardelli do Laboratório de Microbiologia de Alimentos/FCF/UNIFAL com quem aprendi fazer os testes de atividade antimicrobiana (MIC), o Professor Giba do Departamento de Química da UFSCar pelos testes de RMN e pelos grandes ensinamentos nesta área, o professor Rudi Bonfilio do NCQ/FCF/UNIFAL pelo apoio e a disponibilização do HPLC, a professora Mariane Gonçalves Santos pela assessoria durante o trabalho com CG-EM no LATF/FCF, à Dra. Silmara França Buchviser do IQ/USP de São Carlos pela realização dos testes de massas de alta resolução.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Química da UNIFAL, bem como seus funcionários pelo apoio incondicional e eficiente em cada semestre que cursei no doutorado. À Pro-Reitoria de Pesquisa e Pósgraduação pelo apoio com a solicitação da prorrogação junto à CAPES. Ao programa PEC-PG da CAPES pela oportunidade para vir ao Brasil para desenvolver esta pesquisa na área de produtos naturais.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Templo da Ciência apresenta-se como um edifício de mil formas. Os homens que o frequentam, bem como as motivações morais que para ali os levam, revelam-se bem diferentes. Um se entrega à Ciência com o sentimento de felicidade que a potência intelectual superior lhe causa. Para ele, a Ciência é o esporte adequado, a vida transbordante de energia, a realização de todas as ambições. Assim deve ela se manifestar! Muitos outros, porém, estão igualmente neste Templo exclusivamente por uma razão utilitária e não oferecem em troca a não ser sua substância cerebral!

(EINSTEIN, A., 1934, p. 59)

RESUMO

A resistência de patógenos aos medicamentos disponíveis tem se tornado um problema de grandes dimensões que afeta a qualidade de vida da população mundial. A descoberta de produtos naturais que possam resolver esta situação constitui uma vertente muito promissora. Os endófitos, que estão sendo amplamente estudados, produzem um grande número de substâncias bioativas com variadas potencialidades terapêuticas, dentre as quais se destaca a atividade antibiótica. No presente trabalho foram avaliados os produtos da fermentação do fungo endofítico *Lasiodilodia* sp., isolado das folhas de *Handroanthus impetiginosus*, com a finalidade de identificar substâncias que contribuam para a atividade antimicrobiana dos extratos estudados. Nesse sentido, foram obtidos cinco extratos orgânicos de diferentes polaridades a partir do caldo de fermentação (Ld-Hex, Ld-Clo, Ld-AE e Ld-AE⁺) e do micélio (Ld-AEm) que foram fracionados. Tanto os extratos brutos quanto as frações e subfrações foram avaliadas quanto a atividade antimicrobiana contra vários patógenos. A *Listeria monocytogenes* e a *Candida parapsilosis* foram os patógenos mais susceptíveis e os extratos brutos Ld-Clo e Ld-AEm exibiram o maior grau de inibição com valores de CIM entre 12,5-25 µg.mL⁻¹. As frações foram testadas contra *L. monocytogenes* e *Candida albicans* e aquelas que mostraram maior atividade foram subfracionadas. Constatou-se que o fracionamento aumentou a atividade antimicrobiana das frações, provavelmente devido a uma pré-concentração de compostos bioativos, no entanto, no caso das subfrações a atividade frente aos mesmos patógenos foi variável, mostrando a importância das misturas de compostos orgânicos para desenvolver uma atividade antimicrobiana mais potente. As frações do extrato bruto Ld-Clo foram avaliadas por CG-EM e foi possível identificar quatro compostos conhecidos com atividade antimicrobiana reconhecida: (Z) -docos-13-enamida, (Z) -octadec-9-enoato de metila, (Z) -octadec-9-enamida e dodecanamida, que provavelmente se relacionam com a atividade antimicrobiana observada para estas frações. A partir da fração LdAEm-9, foi isolado o ácido indol-3-carboxílico, após purificação por CLAE e elucidação estrutural por RMN. Por outro lado, as subfrações AEm68-C e AEm68-E foram estudadas por RMN/HRESIMS e foi possível identificar quatro compostos aromáticos conhecidos: o ácido 4-hidroxibenzóico, o ácido indol-3-carboxílico, a 4-hidroximeleína e a 4-hidroxifenilacetamida. A identificação de compostos orgânicos em misturas complexas constitui um diferencial do presente trabalho. Conclui-se que,

nas condições do estudo, o endófito *Lasiodiplodia* sp. é capaz de produzir substâncias com atividade antimicrobiana, o que foi constatado durante todo o fracionamento realizado e através do isolamento e da identificação de compostos aromáticos bioativos conhecidos.

Palavras-chave: Fungos endofíticos; *Lasiodiplodia* sp.; Fermentação; Atividade antimicrobiana; RMN; Espectrometria de Massas; Compostos aromáticos bioativos.

ABSTRACT

The antimicrobial resistance of pathogens has become a problem of huge dimensions that affects the quality of life of the worldwide population. The discovery of natural products that could overcome this situation is a very promising feature. Endophytes have been widely studied, as they can produce many bioactive substances with therapeutic potentials, such as antimicrobial activity. The present work aims to identify secondary metabolites that contribute to the antimicrobial activity of the fermentation products obtained from the endophytic fungus *Lasiodiplodia* sp., isolated from *Handroanthus impetiginosus* leaves. To achieve this goal, five crude extracts with different polarity were obtained from the fermentation broth (Ld-Hex, Ld-Chlo, Ld-EA, and Ld-EA+) and from the mycelium (Ld-EAm), which were fractionated. Crude extracts, fractions, and sub-fractions were tested for their antimicrobial activity against pathogens. *Listeria monocytogenes* and *Candida parapsilosis* were the most sensitive pathogens, the crude extracts Ld-Chlo and Ld-AEm exhibited the highest inhibition values: MIC of 12.5-25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The fractions were tested against *Listeria monocytogenes* and *Candida albicans* and those who showed higher activity were sub-fractionated. Antimicrobial activity improved after fractionation, probably due to a pre-concentration of bioactive compounds; however, the subfractions activities varied, showing the importance of organic compounds mixtures to develop a better antimicrobial activity. The fractions derived from Ld-Chlo extract were evaluated by GC-MS identifying four known compounds with recognized antimicrobial activity: (Z) -docos-13-enamide, (Z) -octadec-9-methyl enoate, (Z) -octadec-9-enamide, and dodecanamide, which is probably related to these fractions antimicrobial activity. In another fraction, LdAEm-9, indole-3-carboxylic acid was purified by HPLC, elucidating its chemical structure by NMR. There are several biological activities described for this metabolite, and it may be responsible for the antimicrobial activity of this fraction. On the other hand, the analysis of AEm68-C and AEm68-E sub-fractions by NMR spectroscopy and HRESIMS allowed identifying four known aromatic compounds: 4-hydroxybenzoic acid, indole-3-carboxylic acid, 4-hydroxymellein, and 4-hydroxyphenylacetamide. The identification of organic compounds in mixtures through the analysis of 1D and 2D NMR spectra is a relevant outcome of the present work. The conclusions stand out that *Lasiodiplodia* sp. endophyte is capable of producing compounds with antimicrobial activity, observed throughout the fractionation carried

out and through the isolation and NMR/HRESIMS-based identification of known bioactive aromatic compounds.

Keywords: Endophytic fungi; *Lasiodiplodia* sp.; Fermentation; Antimicrobial activity; NMR; Mass Spectrometry; Aromatic bioactive compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas de compostos isolados de <i>Tabebuia/ Handroanthus</i>	34
Figura 2 - Funções gerais dos fungos endofíticos.....	36
Figura 3 - Estrutura química dos metabólitos secundários bioativos isolados do gênero <i>Lasiodiplodia</i>	47
Figura 4 - Fotografia de uma placa de Petri (número 4) com 5 fragmentos de folha. As cinco fotos na parte inferior da figura mostram os crescimentos dos fragmentos (a, b, c, d, e) originariamente cultivados na placa 4 (foto na parte superior da figura).....	51
Figura 5 - Fluxograma da extração líquido-líquido para obter os extratos brutos a partir do caldo de fermentação..	53
Figura 6 - Fluxograma da extração por maceração para obter o extrato bruto a partir do micélio.....	54
Figura 7 - Representação do fracionamento dos extratos brutos e frações bioativas.....	55
Figura 8 - Isolamento do ácido indol-3-carboxílico a partir da fração LdAEm-9.....	59
Figura 9 - Comparação da atividade antimicrobiana entre os extratos brutos Ld-Clo, Ld-AEm e suas frações: a) e b) atividade contra <i>Listeria monocytogenes</i> , c) e d) atividade contra <i>Candida albicans</i>	71
Figura 10 - Comparação da atividade antimicrobiana entre os extratos brutos Ld-AE, Ld-AE ⁺ e suas frações: a) e b) atividade contra <i>Listeria monocytogenes</i> , c) e d) atividade contra <i>Candida albicans</i>	72
Figura 11 - Comparação da atividade antimicrobiana entre as frações selecionadas e as subfrações mais bioativas: A) fração LdAE-3 e subfrações, B) fração LdAE ⁺ -2 e subfrações, C) fração LdAE ⁺ -3 e subfrações, D) fração LdAEm-3 e subfrações e D) fração LdAEm-68 e subfrações.....	77

Figura 12 -	Fotografia de placas de cultura de 96 poços revelados com resazurina, para a avaliação da atividade contra <i>Listeria monocytogenes</i> , em destaque as subfrações AEm68-A e AEm68-F.....	78
Figura 13 -	Compostos identificados por CG-EM nas frações do extrato bruto Ld-Clo com atividade antimicrobiana conhecida.....	84
Figura 14 -	Fotografia da CCD obtida para as frações do extrato bruto Ld-AEm. Revelado sob a luz UV em 245 nm. Eluição: acetato de etila:metanol (9:1, v:v).....	86
Figura 15 -	Sinais de interesse no espectro de ¹ H (região entre 8,15 – 7,05 ppm) da subfração AEm9-C em CD ₃ OD, 7,05 T a 25 °C.....	88
Figura 16 -	Ampliação dos multipletos observados no espectro de ¹ H da subfração AEm9-C em CD ₃ OD, 7,05 T a 25 °C. (a) : região de 8,11 a 8,00 ppm; (b) : região de 7,46 a 7,38 ppm; (c) : região de C 7,23 a 7,11 ppm....	88
Figura 17 -	Sinais de interesse no espectro de DEPT-135 (região entre 139,0 – 112,5 ppm) da subfração AEm9-C em CD ₃ OD, 7,05 T a 25 °C.....	89
Figura 18 -	Correlações detectadas no espectro de HSQC da subfração AEm9-C em CD ₃ OD, 7,05 T a 25 °C.....	90
Figura 19 -	Correlações detectadas no espectro de HMBC da subfração AEm9-C em CD ₃ OD, 7,05 T a 25 °C.....	90
Figura 20 -	Trechos estruturais prováveis do composto isolado.	91
Figura 21 -	Correlações detectadas no espectro de COSY da subfração AEm9-C em CD ₃ OD, 7,05 T a 25 °C.....	92
Figura 22 -	Representação do ácido indol-3-carboxílico: a) Estrutura química; b) Correlações observadas no espectro de COSY (linha contínua) e HMBC (linha descontínua).....	92

Figura 23 -	Sinais identificados para o ácido-4-hidroxibenzoico no espectro de ^1H (região entre 7,92 – 6,75 ppm) da fração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C.....	96
Figura 24 -	Correlações observadas para o ácido 4-hidroxibenzoico no espectro de COSY da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C.....	97
Figura 25 -	Constantes de acoplamento (J) dos hidrogênios aromáticos do ácido-4-hidroxibenzoico detectadas no espectro J -resolved da fração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C.....	98
Figura 26 -	Sinais identificados para o ácido 4-hidroxibenzoico no espectro de HSQC da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C.....	98
Figura 27 -	Sinais identificados para o ácido 4-hidroxibenzoico no espectro de HMBC da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C.....	99
Figura 28 -	Representação do ácido 4-hidroxibenzoico: a) Estrutura química; b) Correlações observadas nos espectros de COSY (linha contínua) e HMBC (linha descontínua).....	99
Figura 29 -	Espectro de massas ESI (+) - MS/MS do íon m/z 139.....	100
Figura 30 -	Prováveis fragmentações do ácido-4-hidroxibenzoico.....	101
Figura 31 -	Sinais identificados para o ácido indol-3-carboxílico no espectro de ^1H (região entre 8,15 – 7,09 ppm) da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C .	102
Figura 32 -	Espectro de massas ESI (+) - MS/MS do íon m/z 162.....	103
Figura 33 -	Prováveis fragmentações do ácido indol-3-carboxílico.....	103

Figura 34 -	Sinais identificados para os H5, 6, e 7 no espectro de ^1H (região entre 7,68 – 6,85 ppm) da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C.....	104
Figura 35 -	Sinal ampliado e constante de acoplamento (J) para o H5 no espectro de ^1H (região entre 7,08 - 7,06 ppm) da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T, lb: -1,5, gb: 0,2 a 25 °C.....	105
Figura 36 -	Sinal ampliado e constante de acoplamento (J) para o H6 no espectro de ^1H (região entre 7,59 – 7,53 ppm) da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T, lb: -1,5, gb: 0,2 a 25 °C.....	105
Figura 37 -	Sinal ampliado e constante de acoplamento (J) para o H7 no espectro de ^1H (região entre 6,94 – 6,91 ppm) da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T, lb: -1, gb: 0,2 a 25 °C.....	106
Figura 38 -	Correlações observadas para a parte aromática do composto em análise no espectro de COSY da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C.....	107
Figura 39 -	Correlações observadas para a parte aromática do composto em análise no espectro de HSQC da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C.....	107
Figura 40 -	Correlações observadas para a parte aromática do composto em análise no espectro de HMBC da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C.....	108
Figura 41 -	Sinais e correlações identificadas para o hidrogênio da hidroxila fenólica (C8) do composto em análise da subfração AEm68-C em CDCl_3 , 14,1 T a 25 °C: (a) Região entre 11,00 – 10,85 ppm do espectro de ^1H ; (b) Espectro de HMBC.....	109
Figura 42 -	Sinais identificados para os H4 e 9 no espectro de ^1H (4,81 – 1,20 ppm) da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C.....	111

Figura 43 -	Correlações observadas para a porção lactônica do composto em análise no espectro de COSY da subfração AEm68-C em CD ₃ OD, 14,1 T a 25 °C.....	111
Figura 44 -	Correlações observadas para a porção lactônica do composto em análise no espectro de HSQC da subfração AEm68-C em CD ₃ OD, 14,1 T a 25 °C.....	112
Figura 45 -	Correlações observadas para a porção lactônica do composto em análise no espectro de HMBC da subfração AEm68-C em CD ₃ OD, 14,1 T a 25 °C.....	112
Figura 46 -	Estrutura da 4-hidroximeleína: a) Estrutura química; b) Correlações observadas nos espectros de COSY (linha contínua) e HMBC (linha descontínua).....	116
Figura 47 -	Sinais identificados para os hidrogênios H5, H6, e H7 do isômero II no espectro de ¹ H (região entre 7,61 – 6,74 ppm) da subfração AEm68-C em CD ₃ OD, 14,1 T a 25 °C.....	118
Figura 48 -	Sinais ampliados para os hidrogênios H5, H6 e H7 da isômero II no espectro de ¹ H da subfração AEm68-C em CD ₃ OD, 14,1 T, lb: -1, gb: 0,2 a 25 °C..	119
Figura 49 -	Correlações observadas para a parte aromática do isômero II composto em análise no espectro de COSY da subfração AEm68-C em CD ₃ OD, 14,1 T a 25 °C.....	120
Figura 50 -	Correlações observadas para a parte aromática do isômero II no espectro de HMBC da subfração AEm68-C em CD ₃ OD, 14,1 T a 25 °C.....	121
Figura 51 -	Espectro de massas ESI (+) - MS/MS do íon <i>m/z</i> 195.....	122
Figura 52 -	Prováveis fragmentações da 4-hidroximeleína para perda de H ₂ O e CO.....	122
Figura 53 -	Prováveis fragmentações da 4-hidroximeleína para ocorrência da reação RDA.....	123

Figura 54 -	Sinais de hidrogênios aromáticos identificados no espectro de RMN- ¹ H (8,18 – 6,69 ppm) pertencentes a compostos específicos presentes na amostra AEm68-C em CD ₃ OD, 14,1 T a 25 °C.....	125
Figura 55 -	Sinais identificados para a 4-hidroxifenilacetamida no espectro de ¹ H (região entre 7,3 – 3,2 ppm) da subfração AEm68-E em CD ₃ OD, 14,1 T a 25 °C.....	127
Figura 56 -	Correlações observadas para a 4-hidroxifenilacetamida no espectro de HSQC da subfração AEm68-E em CD ₃ OD, 14,1 T a 25 °C.....	128
Figura 57 -	Correlações observadas para a 4-hidroxiacetilfenilacetamida no espectro de HMBC da subfração AEm68-E em CD ₃ OD, 14,1 T a 25 °C.....	128
Figura 58 -	Correlações observadas para a 4-hidroxifenilacetamida no espectro de HMBC da subfração AEm68-E em CD ₃ OD, 14,1 T a 25 °C.....	129
Figura 59 -	Representação da 4-hidroxifenilacetamida: a) Estrutura química; b) Correlações observadas nos espectros de COSY (linha contínua) e HMBC (linha descontínua).....	129
Figura 60 -	Espectro de massas ESI (+) - MS/MS do íon <i>m/z</i> 152.....	130
Figura 61 -	Provável fragmentação da 4-hidroxifenilacetamida..	131
Figura 62 -	Sinais identificados no espectro de ¹ H da subfração AEm9-C em CD ₃ OD, 7,05 T a 25 °C.....	150
Figura 63 -	Sinais identificados no espectro de DEPT da subfração AEm9-C em CD ₃ OD, 7,05 T a 25 °C.....	151
Figura 64 -	Correlações observadas no espectro de COSY da subfração AEm9-C em CD ₃ OD, 7,05 T a 25 °C.....	152
Figura 65 -	Correlações observadas no espectro de HSQC da subfração AEm9-C em CD ₃ OD, 7,05 T a 25 °C.....	153
Figura 66 -	Correlações observadas no espectro de HMBC da subfração AEm9-C em CD ₃ OD, 7,05 T a 25 °C.....	154

Figura 67 -	Sinais identificados no espectro de ^1H da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C.....	155
Figura 68 -	Sinais identificados no espectro de ^1H da subfração AEm68-C após supressão do sinal da água em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C.....	156
Figura 69 -	Correlações observadas no espectro de COSY da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C.....	157
Figura 70 -	Correlações observadas no espectro de HSQC da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C.....	158
Figura 71 -	Correlações observadas no espectro de HMBC da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C.....	159
Figura 72 -	Correlações observadas no espectro <i>J</i> -resolved da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C.....	160
Figura 73 -	Sinais identificados no espectro de ^1H da subfração AEm68-C em CDCl_3 , 14,1 T a 25 °C.....	161
Figura 74 -	Sinais identificados no espectro de HMBC da subfração AEm68-C em CDCl_3 , 14,1 T a 25 °C.....	162
Figura 75 -	Sinais identificados no espectro de ^1H da subfração AEm68-E em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C.....	163
Figura 76 -	Correlações observadas no espectro de COSY da subfração AEm68-E em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C.....	164
Figura 77 -	Correlações observadas no espectro de HSQC da subfração AEm68-E em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C.....	165
Figura 78 -	Correlações observadas no espectro de HMBC da subfração AEm68-E em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C.....	166

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Metabólitos secundários com atividade biológica comprovada isolados do gênero <i>Lasiodiplodia</i>	42
Tabela 2 -	Massas de extratos brutos e frações obtidas após fermentação fúngica e etapa cromatográfica.....	63
Tabela 3 -	Massas das subfrações obtidas a partir das frações mais bioativas.....	64
Tabela 4 -	Resultados positivos do teste ágar em bloco para os fungos isolados do Ipê.....	65
Tabela 5 -	Atividade antimicrobiana dos extratos brutos.....	67
Tabela 6 -	Atividade antimicrobiana das frações obtidas a partir dos extratos brutos.....	68
Tabela 7 -	Atividade antimicrobiana das subfrações obtidas a partir das frações LdAE-3, LdAE ⁺ -2, LdAE ⁺ -3.....	73
Tabela 8 -	Atividade antimicrobiana das subfrações obtidas a partir das frações LdAEm-3, LdAEm-68.....	75
Tabela 9 -	Compostos detectados por CG-EM nas frações obtidas a partir do extrato bruto Ld-Clo.....	82
Tabela 10 -	Compostos não identificados por CG-MS nas frações derivadas do extrato Ld-Clo que apresentaram valores importante de porcentagem da área do pico.....	85
Tabela 11 -	Deslocamentos químicos δ (ppm) e constantes de acoplamento J (Hz) para o ácido indol-3-carboxílico em CD ₃ OD, 7,05 T a 25 °C.....	87
Tabela 12 -	Deslocamento químico δ (ppm) e constante de acoplamento J (Hz) para o ácido-4-hidroxibenzóico em CD ₃ OD, 14,1 T a 25 °C.....	95
Tabela 13 -	Comparação dos deslocamentos químicos (ppm) de ¹ H e ¹³ C, constante de acoplamento (J) e multiplicidade da 4-hidroximeleína reportada na literatura com os dados do composto em análise.....	114

Tabela 14 - Deslocamento químico δ (ppm) e constante de acoplamento J (Hz) para a 4-hidroximeleína em CD ₃ OD, 14,1 T a 25 °C.....	115
Tabela 15 - Deslocamento químico δ (ppm) e constante de acoplamento J (Hz) para a parte aromática do isômero II em CD ₃ OD, 14,1 T a 25 °C.....	120
Tabela 16 - Atividade biológica da 4-hidroximeleína.....	124
Tabela 17 - Deslocamento químico δ (ppm) e constante de acoplamento J (Hz) para a 4-hidroxifenilacetamida em CD ₃ OD, 14,1 T a 25 °C.....	126
Tabela 18 - Fungos endofíticos isolados de amostras de folhas, ramos e casca do Ipê.....	149
Tabela 19 - Valores de massa (m/z) e intensidade dos fragmentos derivados do íon m/z 152, amostra AEm68-E.....	167
Tabela 20 - Valores de massa (m/z) e intensidade dos fragmentos derivados do íon m/z 152, amostra AEm68-E.....	169

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

3-ICA	- do inglês, <i>índole-3-carboxylic acid</i>
3T3	- Células primárias de fibroblastos embrionários de camundongo
A549	- Linhagem celular humana de carcinoma pulmonar
AE	- Extrato bruto de acetato de etila
AE⁺	- Extrato bruto de acetato de etila após acidificar o caldo
AEm	- Extrato bruto de acetato de etila proveniente do micélio
ATCC	- do inglês, <i>American Type Culture Collection</i>
CCD	- Cromatografia de Camada Delgada
CDC	- do inglês, <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CFPAC-1	- Linhagem celular humano de adenocarcinoma pancreático
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CMM	- Concentração Microbicida Mínima
CNA	- <i>Candida não albicans</i>
Clo	- Extrato bruto de clorofórmio
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	- do inglês, <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
COSY	- do inglês, <i>¹H-¹H Correlation Spectroscopy</i>
DNA	- do inglês, <i>Desoxyribonucleic acid</i>
EUA	- Estados Unidos de América
EM	- Espectrometria de Massas
FDA	- do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
GC-MS	- do inglês, <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
GH3	- Linhagem celular de câncer pituitário
HCT-116	- Linhagem celular de carcinoma de cólon humano
HeLa	- Linhagem celular de câncer cervical humano
HepG2	- Linhagem celular de carcinoma hepático humano
Hex	- Extrato bruto de hexano
HMBC	- do inglês, <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HL-60	- Linhagem celular humano de leucemia
HPLC	- do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRESIMS	- do inglês, <i>High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>

HSQC	- do inglês, <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy</i>
IC₅₀	- do inglês, <i>half maximal inhibitory concentration</i>
IHH4	- Linhagem celular humano de carcinoma papilar de tireoide
KB	- Linhagem celular humano de carcinoma epidermóide de boca
L5178Y	- Linhagem celular de linfoma de rato
MCF-7	- do inglês, <i>Michigan Cancer Foundation-7</i> (linhagem celular de câncer de mama)
MDA-MB-435	- Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano
MMQ	- Linhagem celular de câncer pituitário
NCI-H460	- Linhagem celular de carcinoma humano
NF-κB	- Factor nuclear <i>kappa B</i>
NIST	- do inglês, <i>National Institute of Standards and Technology</i>
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PC3	- Linhagem celular humano de câncer de próstata
PDA	- do inglês, <i>Potato Dextrose Agar</i>
ppm	- Partes por milhão
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
SI	- Similaridade
SiHa	- Linhagem celular humano de carcinoma cervical
THP-1	- Linhagem celular de leucemia monocítica
UFC	- Unidades Formadoras de Colônias
UTI	- Unidade de Cuidados Intensivos
UV	- Ultravioleta
Vero	- Linhagem celular de rim de macaco verde africano
v/v	- volume/volume
δ	- Deslocamento químico (ppm)
λ	- Comprimento de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
2	OBJETIVOS	29
2.1	OBJETIVO GERAL	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3	REFERENCIAL TEÓRICO	30
3.1	PRODUTOS NATURAIS DERIVADOS DO IPÊ	30
3.2	FUNGOS ENDOFÍTICOS E PRODUTOS NATURAIS	36
3.2.1	O gênero <i>Lasiodiplodia</i> (L.) como fonte de metabólitos secundários bioativos	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1	ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO IPÊ	50
4.1.1	Coleta da amostra vegetal e isolamento dos fungos endofíticos	50
4.2	OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DOS PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO DO <i>LASIODIPLODIA</i> SP.	52
4.2.1	Fermentação e obtenção dos extratos brutos.....	52
4.2.2	Fracionamento	54
4.3	DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	56
4.3.1	Teste de difusão em ágar para fungos endofíticos isolados do Ipê	56
4.3.2	Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) para produtos da fermentação do <i>Lasiodiplodia</i> sp.	57
4.4	ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-MS)	58
4.5	ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	58
4.6	TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS E ESPECTROMÉTRICAS.....	59

5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	62
5.1	OBTENÇÃO DE EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E SUBFRAÇÕES A PARTIR DOS PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO DO <i>Lasiodiplodia</i> sp.	62
5.2	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	65
5.2.1	Teste de ágar em bloco para os fungos endofíticos isolados do Ipê	65
5.2.2	CIM e CMM de extratos brutos e frações. Influência do fracionamento na atividade antimicrobiana	66
5.3	ANALISE DE FRAÇÕES E SUBFRAÇÕES A TRAVÉS DE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROSCÓPICAS	81
5.3.1	Processamento das frações obtidas do extrato bruto Ld-Clo a traves de CG-EM.....	81
5.3.2	Purificação da fração LdAEm-9 por CLAE e elucidação estrutural do composto isolado por RMN	86
5.3.3	Identificação de compostos presentes em subfrações através de RMN e EM.....	94
5.3.3.1	<i>Análise da mistura de compostos presentes na subfração AEm68-C</i>	95
5.3.3.2	<i>Análise da mistura de compostos presentes na subfração AEm68-E</i>	125
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	133
	REFERÊNCIAS	135
	APÊNDICES	149

1 INTRODUÇÃO

A necessidade da descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos eficazes tem chamado a atenção de muitos pesquisadores e laboratórios, a fim de mitigar a resistência de patógenos a medicamentos (POGUE *et al.*, 2015; WHO, 2017) e melhorar o tratamento de algumas doenças infecciosas negligenciadas (AKHOUNDI *et al.*, 2016; DEBROY *et al.*, 2017). Não apenas os seres humanos, mas também os animais e o meio ambiente são seriamente afetados e ameaçados pelos microrganismos multirresistentes, cujas causas incluem o uso excessivo de antibióticos em animais e humanos, a venda de antibióticos sem receita, o aumento de viagens internacionais, a falta de saneamento/higiene e a liberação de antibióticos não metabolizados ou seus resíduos no meio ambiente através das excreções de humanos e animais (ASLAM *et al.*, 2018).

Algumas organizações importantes, como o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, pelas siglas em inglês), a Sociedade de Doenças Infecciosas da América, o Fórum Econômico Mundial e a Organização Mundial da Saúde (OMS) declararam que a resistência aos antibióticos é uma “preocupação global de saúde pública” (MICHAEL, 2014; SPELLBERG *et al.*, 2016). Mais recentemente, em apoio ao Plano de Ação Global para Resistência Antimicrobiana, a OMS, em colaboração com a iniciativa Drogas para Doenças Negligenciadas, lançou a Parceria Global de Pesquisa e Desenvolvimento de Antibióticos para desenvolver novos tratamentos com antibióticos destinados à erradicação da resistência antimicrobiana e promover o uso responsável desses tratamentos (TACCONELLI *et al.*, 2018).

Evidentemente, a alarmante situação relacionada com o uso e eficácia dos antimicrobianos, demanda soluções eficazes da ciência e nesse sentido a obtenção e produção de compostos naturais está se apresentando como uma das opções mais promissoras. Dentre outras fontes, os fungos endofíticos são hoje considerados por vários pesquisadores como elementos chave na obtenção de novas substâncias bioativas naturais de importância médica, muitas delas já utilizadas como agentes terapêuticos com ação anticâncer, antiviral, antibiótica, anti-inflamatória e antioxidante (DESHMUKH *et al.*, 2015; KHARWAR *et al.*, 2011; STROBEL *et al.*, 1993; TAN *et al.*, 2001; VENIERAKI *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2018).

A avaliação contínua das propriedades antimicrobianas de extratos e compostos orgânicos isolados e caracterizados a partir de uma ampla variedade de endófitos tem fornecido ótimos resultados que justificam novos estudos (HUANG *et al.*, 2019; MARTINEZ-KLIMOVA *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2018). Segundo Deshmukh *et al.* (2015), a descoberta do efeito antimicrobiano de um extrato bruto obtido a partir do caldo de cultura ou do micélio é a primeira das etapas necessárias para a descoberta de um novo antibiótico, o que necessariamente será sucedido por processos de purificação, identificação e elucidação da estrutura do metabólito mais potente da mistura. Estes são os processos essenciais envolvidos no desenvolvimento de novos compostos que seriam potencialmente usados na terapêutica.

A presente pesquisa permitiu desenvolver o estudo bioguiado de extratos orgânicos obtidos da fermentação do fungo endofítico *Lasiodiplodia* sp., isolado a partir de folhas da espécie vegetal *Handroanthus impetiginosus*, uma planta medicinal comumente conhecida como “Ipê” com reconhecidas propriedades curativas. Existe uma tendência ao isolamento e uso de fungos endofíticos de plantas medicinais para obtenção de compostos bioativos de importância terapêutica, considerando que cerca de 80% dos remédios naturais disponíveis são provenientes de plantas medicinais e de endófitos (SINGH; DUBEY, 2015).

O endófito *Lasiodiplodia* tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores, se constatando algumas atividades biológicas importantes nos metabolitos secundários isolados, tais como: atividade antimicrobiana, antitumoral, antiparasitária, anti-inflamatória, antioxidante, entre outras (CHEN *et al.*, 2016, 2017; JINU *et al.*, 2015; SALVATORE *et al.*, 2020; WEI *et al.*, 2014), o que aumenta o interesse na pesquisa sobre as atividades biológicas dos produtos da fermentação deste fungo. De acordo com estas evidências científicas, o presente trabalho visou estudar as propriedades antimicrobianas de extratos e frações obtidas a partir da fermentação deste fungo endofítico, constatando-se um perfil antimicrobiano promissor, contra patógenos causadores de diferentes tipos de doenças e que estão associados a processos de resistência antimicrobiana.

Por outro lado, as subfrações mais promissoras foram analisadas através de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), o que permitiu identificar alguns compostos produzidos pelo endófito. A identificação de compostos em misturas por

RMN constitui um importante diferencial deste trabalho, uma vez que nem sempre é possível conseguir a purificação de substâncias por uma questão de acesso à tecnologia requerida ou por não contar com as quantidades mínimas necessárias de amostra para isolar os compostos de interesse, além de ser um processo oneroso. O uso da RMN para identificação de compostos já conhecidos, sem que haja a necessidade de seu isolamento, faz com que o tempo para purificação seja otimizado e utilizado apenas quando necessário ou quando se tratar de substâncias inéditas.

Os espectros de RMN costumavam ser empregados principalmente como uma ferramenta para identificar compostos de amostras puras e não eram comumente aceitos como um meio apropriado para a identificação definitiva de metabólitos em misturas. No entanto, os métodos espectroscópicos de RMN também tem desempenhado um papel primordial na identificação de compostos anteriormente desconhecidos em misturas complexas de moléculas pequenas (OLEA; ROQUE, 1990; FORSETH; SCHROEDER, 2010). Por outro lado, o aumento na sensibilidade dos espectrômetros de RMN, os avanços no processamento de dados (MOLINSKI, 2010) e a implementação de metodologias de análise de metaboloma via RMN, podem ajudar a identificar pequenas moléculas de outra forma inacessíveis, por exemplo compostos que são propensos à decomposição química e, portanto, não podem ser isolados (SCHROEDER *et al.*, 2008)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar metabólitos secundários com potencial antimicrobiano produzidos em meio de fermentação pelo fungo endofítico *Lasiodiplodia* sp. isolado da espécie vegetal *Handroanthus impetiginosus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Fermentar o fungo endofítico *Lasiodiplodia* sp. em meio Czapek no modo estático;
- b) Obter extratos orgânicos a partir do caldo de fermentação e do micélio realizando extrações com solventes de diferentes polaridades (hexano, clorofórmio e acetato de etila);
- c) Fracionar os extratos orgânicos e suas frações em conformidade com a atividade antimicrobiana observada;
- d) Avaliar a atividade antimicrobiana de extratos brutos, frações, e subfrações;
- e) Identificar metabólitos secundários presentes em misturas de compostos nas subfrações com atividade antimicrobiana, através da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e da Espectrometria de Massas (EM);

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PRODUTOS NATURAIS DERIVADOS DO IPÊ

A família Bignoniaceae esta composta por cerca de 100 gêneros e 800 espécies de árvores ou arbustos. Os gêneros *Handroanthus* e *Tabebuia*, que contém várias espécies de Ipê, estão entre os membros mais importantes desta família devido às suas propriedades medicinais.

O gênero *Tabebuia* foi descrito pela primeira vez por Candolle em 1838 e foi definido como árvores bignoniaceicas com folhas simples; no entanto, seu conceito mudou devido a novos estudos sobre esse táxon (GROSE; OLMSTEAD, 2007; SANTOS *et al.*, 2017). Mattos (1970) descreveu o gênero *Handroanthus* com base em um grupo restrito de árvores brasileiros do gênero *Tabebuia*. Por outro lado, Gentry (1992), insistiu que *Handroanthus* era sinônimo de *Tabebuia*, embora estudos atuais tenham confirmado que *Tabebuia* é polifilético e restabelecido que esses dois gêneros estão aninhados em clades segregados (GROSE; OLMSTEAD, 2007; SANTOS *et al.*, 2017). Apesar de os estudos sistemáticos sobre *Tabebuia* terem avançado bastante, sua taxonomia não é fácil; portanto, novos parâmetros foram necessários.

A quimiotaxonomia poderia esclarecer as alterações genéticas que ocorreram durante a divisão desses gêneros, mas os dados químicos de *Handroanthus* não foram explorados adequadamente (TEIXEIRA *et al.*, 2014). Mais tarde, Santos *et al.* (2017) aplicaram abordagens metabolômicas e análises estatísticas multivariadas para demonstrar que os gêneros *Tabebuia* e *Handroanthus* são capazes de produzir diferentes metabólitos secundários. Os autores descreveram que este apresentou maior capacidade de armazenar verbascosídeo, enquanto aquele produz iridoides ligados a grupos fenilpropanóides.

Muitas propriedades farmacológicas de substâncias isoladas das espécies de *Tabebuia/Handroanthus*, relatadas há muitos anos através do conhecimento tradicional, estão sendo elucidadas por estudos científicos. As naftoquinonas lapachol e β -lapachona, isoladas de *Tabebuia*, têm sido muito citadas na literatura devido à sua ação antitumoral. O lapachol (**1**) apresentou potente propriedade antiproliferativa contra várias células tumorais e a β -lapachona (**2**) demonstrou ter uma forte atividade citotóxica *in vitro* contra linhagens de células de câncer humanas (MCF-7, NCI-H460,

HeLa e HepG2) (PIRES *et al.*, 2015). No entanto, foram detectados alguns efeitos colaterais sérios quando usados os compostos de forma isolada, os quais não foram observados em estudos com os extratos de planta. Sabe-se que o uso de *Tabebuia impetiginosus* como suplemento dietético em forma de chás foi considerado seguro pela FDA (Food and Drug Administration). Embora o lapachol tenha mostrado uma toxicidade similar à produzida pela vitamina K, o efeito sinérgico da mistura de compostos nos chás parece neutralizar essa toxicidade (CASTELLANOS *et al.*, 2009; PIRES *et al.*, 2015).

Apesar de terem sido descritos efeitos tóxicos para o lapachol, o mesmo continua sendo estudado. Um trabalho recente mostra um efeito promissor deste composto contra *Leishmania amazonenses* e *Leishmania infantum* *in vivo* e *in vitro* (ARAÚJO *et al.*, 2019). Foi comprovado que a substância não se mostrou tóxica para os macrófagos, pois, não foram observadas anormalidades morfológicas, mesmo quando tratadas com altas concentrações de lapachol. Esses resultados sugerem que a naftoquinona parece afetar com eficiência os parasitas intracelulares ao invés da célula hospedeira. Os efeitos do lapachol contra *Leishmania* se baseiam na indução da morte do parasita por apoptose (VINCENT *et al.*, 2013). Por outro lado, Mohammadi *et al.* (2020) apontam que o lapachol e a atovacuona (**3**), um derivado do lapachol com melhor biodisponibilidade, desenvolvem uma ação significativa no tratamento da malária e conseguem este efeito inibindo a cadeia transportadora de elétrons durante o processo de respiração celular no parasita.

A β -lapachona exibe um número considerável de ações farmacológicas, incluindo atividades antibacteriana, antifúngica, antimalárica, anti-tripanosômica, citotóxica e antineoplásica contra várias linhagens celulares de câncer humano. Algumas pesquisas sugerem que a β -lapachona atua como agente anti-inflamatório que inibe a ativação do NF- κ B (MOON *et al.*, 2007; SUO *et al.*, 2012). Além disso, a β -lapachona foi capaz de reduzir o edema pulmonar induzido por lipopolissacarídeos e a toxicidade letal em um modelo de sepse animal. Os autores sugeriram que a β -lapachona pode ser eficaz no tratamento de doenças inflamatórias como a esclerose múltipla (XU *et al.*, 2013).

Castellanos *et al.* (2009) relataram muitos constituintes isolados de espécies de *Tabebuia*, como lapachol, β -lapachona e compostos diversos como furanonaftoquinonas e antraquinonas (STEINERT *et al.*, 1995, 1996); compostos voláteis (PARK *et al.*, 2004; WAGNER *et al.*, 1989); beta-sitosterol, estigmasterol, isocumarinas e dialdeídos de ciclopenteno (KOYAMA *et al.*, 2000); glicosídeos iridoides, glicosídeos lignanos, glicosídeos isocumarínicos, glicosídeo feniletanoide e glicosídeos fenólicos (WARASHIMA *et al.*, 2004, 2005, 2006). Os autores também descreveram as propriedades anticâncer de *Tabebuia impetiginosa*, assim como outras importantes atividades farmacológicas relacionadas a essa espécie.

Algumas investigações científicas comprovaram a atividade anti-inflamatória dessas plantas. Suo *et al.* (2012) relataram o isolamento de cinco novos compostos do extrato aquoso de *Tabebuia avellanedae*: uma neolignana (**4**) e quatro apiosídeos benzílicos (**5-8**). Esses compostos apresentaram forte atividade inibitória na produção de citocinas inflamatórias, fator de necrose tumoral- α e interleucina-1 β em culturas de células THP-1 de mieloma humano, co-estimuladas com lipopolissacarídeos sem níveis significativos de citotoxicidade.

Ferraz-Filha *et al.* (2016) avaliaram o potencial farmacológico do extrato etanólico de folhas de *Tabebuia roseoalba* (Ridl.), usando modelos de artrite gotosa *in vivo*, além da sua atividade antioxidante. Os autores sugeriram que o extrato etanólico poderia ser usado no tratamento da inflamação, hiperuricemia e gota com bastante eficácia. Eles também declararam que compostos conhecidos, como rutina, ácido cafeico, estigmasterol, sitosterol, α e β -amirinas, poderiam atuar como agentes anti-inflamatórios.

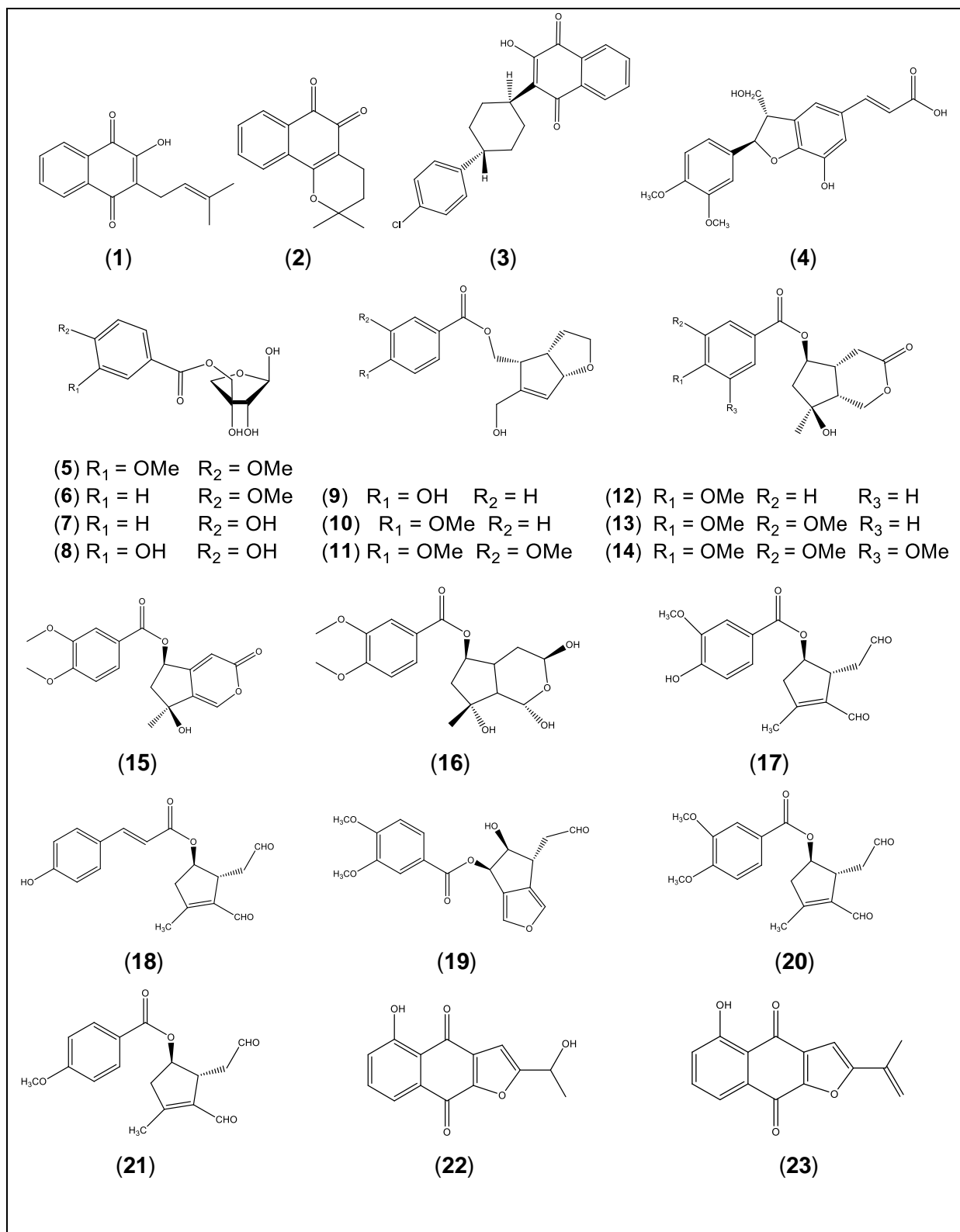
Zhang *et al.* (2017) descreveram o isolamento de oito novos ésteres iridoides denominados avelladoides A-H (**9-16**) da casca interna de *Tabebuia avellanedae*, que apresentaram atividades anti-inflamatórias. Os autores também observaram que existem poucos estudos sobre compostos anti-inflamatórios dessa espécie vegetal e descobriram que os iridoides do tipo ningpogenina (**9-11**) exibiram efeitos anti-inflamatórios mais fortes.

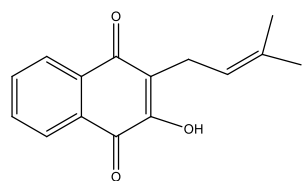
Sichaem *et al.* (2012) isolaram dois novos dialdeídos de ciclopenteno denominados tabebuialdeídos A e B (**17-18**), tabebuialdeído C (**19**) e outros dez compostos (**20-29**). Todos os compostos isolados foram avaliados quanto à citotoxicidade contra as linhagens celulares KB e HeLa. Zhang *et al.* (2015) avaliaram a atividade anticâncer de quatro furanonaftoquinonas (**22**, **30-32**) isoladas de *Tabebuia avellanadae*, sendo que o composto 2-(1,2-di-hidroxi-1-metil-etil)-5-hidroxi-naftol [2,3-b] furan-4,9-diona (**31**) foi isolado pela primeira vez. Os autores também descobriram que os compostos (**22**) e (**31**) mostraram citotoxicidade contra as linhagens celulares de câncer A549 (pulmão), SiHa (carcinoma cervical) e MCF-7 (mama). As naftoquinonas (**30** e **32**) foram previamente isoladas por Braga de Oliveira *et al.* (1993) e (**21**) por Rao; Kingston (1982).

Ferreira-Júnior *et al.* (2015) estudaram o efeito antinociceptivo de extratos de *Tabebuia roseoalba* e do icarisídeo E4 (**33**), um glicosídeo de lignina biossintetizado por esta planta. O conhecimento da etnobotânica indicou que a *Tabebuia roseoalba* mostrou propriedades antinociceptivas e os autores provaram que esta planta produz substâncias que podem aliviar a dor. Outros pesquisadores isolaram dois novos glicosídeos de lignina (**34-35**) e dois novos glicosídeos fenólicos (**36-37**), além de 15 compostos conhecidos dos ramos de *Tabebuia chrysotricha*. Os compostos (**34**) e (**35**) apresentaram atividades antioxidantes moderadas (TAKAHASHI *et al.*, 2015).

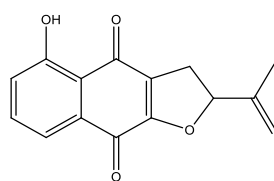
Sakhuja *et al.* (2014) isolaram 17 compostos de um extrato de metanol de flores de *Tabebuia palmeri*. Um deles o 6-(1-hidroxiundec-3-enil)-tetra-hidropirran-2-ona (**38**) foi uma substância inédita que mostrou inibição da oviposição em *Bruchus chinensis*, indicando uma atividade inseticida. Todos os compostos descritos são apresentados na **Figura 1**.

Figura 1 - Estruturas químicas de compostos isolados de *Tabebuia/Handroanthus*

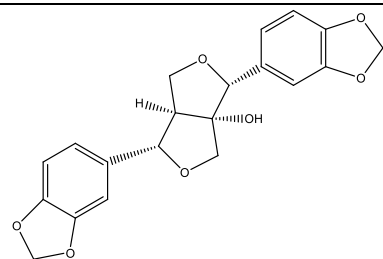




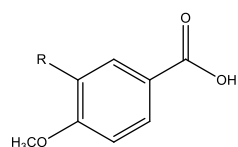
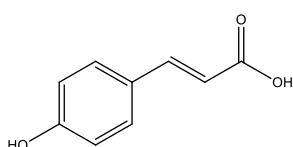
(24)



(25)

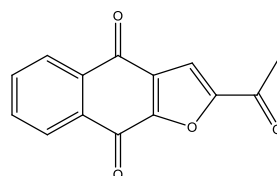


(26)

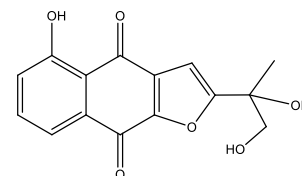
(27) R = OCH₃

(28) R = H

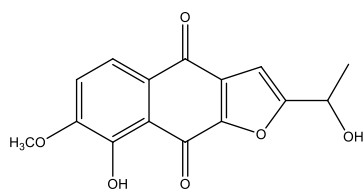
(29)



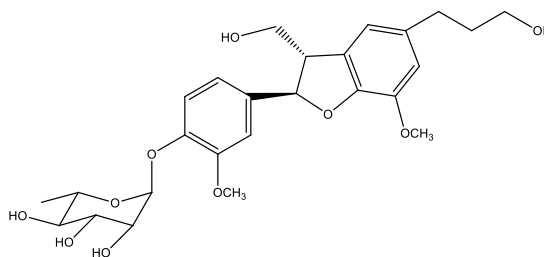
(30)



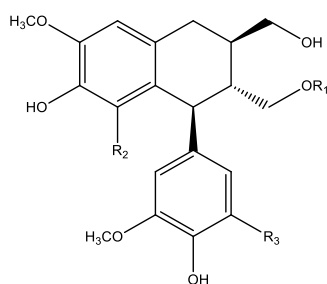
(31)



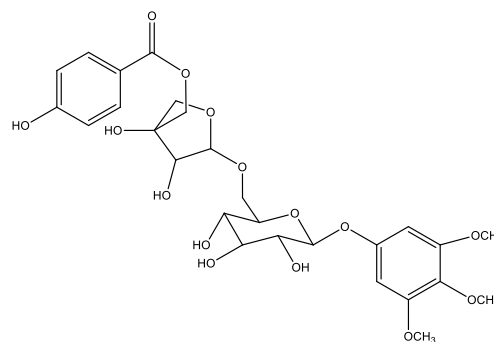
(32)



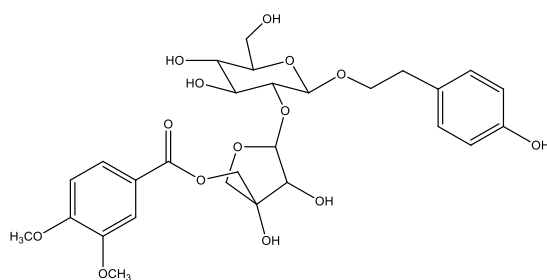
(33)

(34) R₁ = Api(1''2''')Glc R₂ = H R₃ = H(35) R₁ = Api(1''2''')Glc R₂ = H R₃ = OCH₃

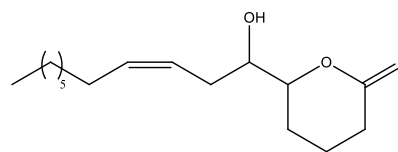
Api = beta-D-apiofuranosyl



(36)



(37)



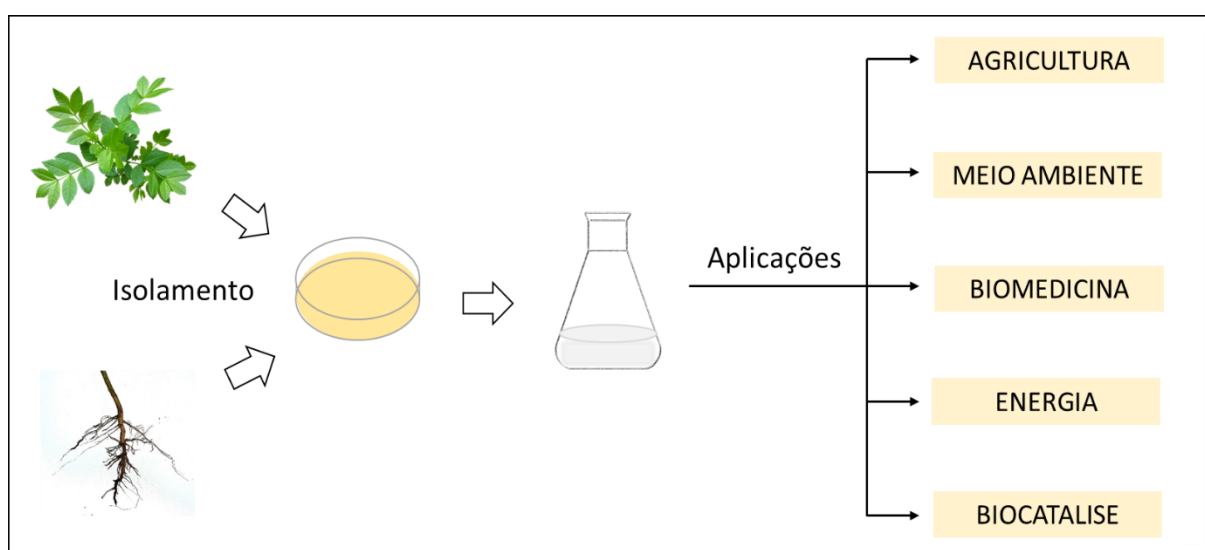
(38)

3.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS E PRODUTOS NATURAIS

A importância da biodiversidade como fonte de novos medicamentos vem aumentando recentemente. É crucial considerar plantas, microrganismos (bactérias e fungos), organismos marinhos, animais e insetos como fontes de produtos naturais estruturalmente diferentes que podem resultar em novos produtos farmacêuticos. Moléculas promissoras estão sendo encontradas devido às melhorias na tecnologia de triagem que investiga compostos bioativos (ASTUTI *et al.*, 2014; BRANDÃO *et al.*, 2010; YAN *et al.*, 2018).

A biotecnologia abriu novos horizontes para a indústria farmacêutica e para o progresso nessa área, associada aos avanços da química sintética e das ciências médicas, que levaram à descoberta de novos medicamentos nos últimos anos. Newman; Cragg (2016) afirmaram que os produtos naturais não são necessariamente o medicamento final, mas também podem ser fontes de novas moléculas para serem usadas na produção de medicamentos ou modelos semi-sintéticos para gerar produtos totalmente sintéticos. Por outro lado, Yan *et al.* (2018) enfatizaram a importância que deve ser dada aos microrganismos endofíticos como fontes promissoras de produtos naturais e esquematizaram adequadamente as distintas aplicações destes organismos (**Figura 2**).

Figura 2 - Funções gerais dos fungos endofíticos



Fonte: Do autor.

Os endófitos geralmente vivem de forma assintomática, coexistindo com seus hospedeiros e representando um grupo subutilizado de microrganismos para a descoberta de novos compostos. Estes microrganismos produzem metabólitos diversos e têm a capacidade de sintetizar compostos que são produzidos e isolados exclusivamente de plantas superiores (DESHMUKH *et al.*, 2018). Além disso, a natureza não patogênica da maioria dos endófitos em relação aos seres humanos indica que muitos de seus metabólitos bioativos provavelmente não são tóxicos para as células de mamíferos. Isso é corroborado pela observação de que compostos derivados de endófitos possuem atividades antimicrobianas sem afetar adversamente as células humanas (ANCHEEVA *et al.*, 2020). Em particular, os endófitos fúngicos têm sido o foco de muitos estudos por ser fonte promissora de metabólitos secundários com aplicações farmacológicas, agrícolas, industriais ou biotecnológicas (SAVI *et al.*, 2019)

A maioria dos trabalhos sobre metabólitos secundários de endófitos surgiu na década de 1980, e foram direcionados a substâncias tóxicas associadas a doenças em animais que apresentaram sintomas específicos após o consumo de algumas gramíneas (capim e *Festuca*), infectadas com *Neotyphodium* sp. Este fungo endofítico produzia substâncias tóxicas que causavam aborto e até morte em animais que consumiram estas espécies vegetais (LYONS *et al.*, 1986).

Na década dos anos 90 foi isolado o taxol (paclitaxel) a partir do fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, este potente anticancerígeno tinha sido isolado originariamente a partir da espécie vegetal *Taxus brevifolia* e esta nova descoberta despertou a atenção para os endófitos como fonte de novos medicamentos (STROBEL; STIERLE, 1993). Atualmente, existem pelo menos 19 gêneros de fungos endofíticos (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Botryodiplodia*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Ectostroma*, *Fusarium*, *Metarhizium*, *Monochaetia*, *Mucor*, *Ozônio*, *Papulaspora*, *Periconia*, *Pestalotia*, *Pestalotiopsis*, *Phyllosticcesta*, *Phyllosticcesta*, *Phyllosticcesta* e *Tubercularia*) isolados de diversas plantas, capazes de produzir paclitaxel e seus análogos, por exemplo, 10 desacetilbacatina III e bacatina III, entre outros (HU *et al.*, 2016; VENKATESAN *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2010).

Parece lógico que tais possibilidades existam na natureza assumindo-se que o endófito e a planta hospedeira estão vivendo em algum tipo de relação simbiótica e a troca horizontal de genes pode ocorrer entre os simbiontes. Assim, qualquer contribuição para a sobrevivência de uma planta tem o potencial de ser traduzida em produtos que também podem ser benéficos para a humanidade, desde que o isolamento do endófito possibilite a geração dos produtos biologicamente ativos nas novas condições (STROBEL, 2018).

Segundo Jha (2019) é possível prever que (i) alguns fungos endofíticos produzem os compostos de interesse em culturas *in vitro* sem dependência do hospedeiro, (ii) alguns endófitos precisam dos extratos ou substratos do tecido hospedeiro para produzir os compostos desejados, e (iii) alguns fungos produzem os compostos apenas em associação com os tecidos hospedeiros em cultura. Com relação à associação de fungos endofíticos com espécies hospedeiras, esse autor estabelece alguns aspectos críticos que exigem uma visão mais aprofundada, tais como:

- a) O papel do hospedeiro na regulação do metabolismo do endófito;
- b) O mecanismo genético que facilita o mutualismo entre o hospedeiro e o endófito;
- c) A estimulação de genes silenciosos responsáveis por produzir os metabólitos secundários;
- d) O papel do produto metabólico do endófito nas espécies hospedeiras;
- e) As condições precisas (fisiológicas e ecológicas) exigidas pelo endófito para produzir um metabólito específico;
- f) Aumentar a produção de metabólito endofítico de interesse à escala industrial;
- g) Testar o benefício de fungos endofíticos quando inoculados às espécies vegetais, semelhantes aos probióticos;
- h) Estabelecer um repositório para preservar os fungos endofíticos, juntamente com o tecido hospedeiro, para uso futuro.

Nesse contexto, o estudo de fungos endofíticos isolados de plantas medicinais, como as espécies de *Tabebuia/Handroanthus*, é de grande importância para a descoberta de novas moléculas e possivelmente novos fármacos. É óbvio que as plantas medicinais constituem uma fonte promissora de fungos endofíticos para a produção de produtos naturais bioativos, o que é uma estratégia bastante vantajosa, pois muitas dessas substâncias já possuem um histórico de uso e isolamento a partir das plantas e poderiam ser obtidas a partir de fungos endofíticos isolados das mesmas. Além disso, dois aspectos importantes devem ser considerados: (i) o potencial biotecnológico dos fungos endofíticos e (ii) a possibilidade de obter novas substâncias que nunca foram isoladas de tecidos vegetais (GOMEZ e LUIZ, 2018). Sabe-se que a fermentação desses microrganismos como sistemas de produção de compostos de interesse oferece benefícios essenciais durante a produção em larga escala: maior velocidade de crescimento, espaço reduzido e facilidade de modificação, expressando as vantagens biotecnológicas dos mesmos (PALEM *et al.*, 2015).

Os fungos endofíticos permitem substituir a produção de compostos bioativos diretamente do tecido da planta, o que é vantajoso pois muitas espécies encontram-se ameaçadas de extinção devido à sua exploração indiscriminada na busca por remédios para os problemas de saúde da humanidade. De acordo com a União Internacional para Conservação da Natureza e a World Wildlife Foundation, aproximadamente 15.000 das 50.000 a 80.000 espécies de plantas medicinais conhecidas estão à beira da extinção e, além disso, sofrem com a destruição de seu habitat natural (CHEN *et al.*, 2016). Assim, o conhecimento tradicional, o conhecimento científico sobre as propriedades terapêuticas da planta e o potencial biotecnológico dos fungos endofíticos podem ser usados para produzir compostos bioativos, evitando a destruição da flora.

Em correspondência com o descrito acima, Torres-Mendoza *et al.* (2020) descreveram que a exploração das plantas hospedeiras para o processo de extração de metabólitos também estão associados a impactos ambientais, e novas estratégias, como o uso de microrganismos endofíticos ao invés do próprio hospedeiro, ofereceram novos nichos que devem ser meticulosamente investigados e usados como base para a pesquisa e o desenvolvimento sustentável.

De forma geral, um grande número de metabólitos bioativos pertencentes a diversos grupos estruturais têm sido isolados e caracterizados a partir do cultivo de fungos endofíticos. Conseqüentemente, diversas atividades biológicas de grande valor para a medicina humana e veterinária têm sido testadas e determinadas por vários pesquisadores, dentre elas: atividade antibacteriana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena, anti-tripanosômica, antituberculose, anti-enzimática, etc (CHEN *et al.*, 2015; KAMAL *et al.*, 2016; MISHRA *et al.*, 2019).

A respeito da importância dos endófitos como fontes de antimicrobianos, Radić; Štrukelj (2012) referiram que uma grande parte da medicina moderna foi construída com base nos antimicrobianos, mas no percurso do tempo muitas das alternativas disponíveis tem diminuído a sua efetividade, razão pela qual existem cada vez mais iniciativas para aumentar a conscientização sobre este problema. Segundo estes autores, desde que o primeiro fungo endofítico foi identificado, muita atenção tem sido dada ao potencial de exploração desses organismos para a produção de novos antibióticos. E agregam que esse nicho deve ser meticulosamente investigado e usado como base para pesquisa e desenvolvimento sustentáveis de novas substâncias antibacterianas que possam responder à resistência antimicrobiana e antecipar a evolução desse fenômeno.

3.2.1 O gênero *Lasiodiplodia* (L.) como fonte de metabólitos secundários bioativos

Este gênero pertence à família Botryosphaeriaceae e compreende 31 espécies (DISSANAYAKE *et al.*, 2016). É bastante provável que algumas destas espécies sejam híbridas, por exemplo, *L. viticola*, *L. missouriana*, *L. laeliocattletae* e *L. brasiliense*, conforme sugerido por Cruywagen *et al.* (2016). Alguns gêneros de *Lasiodiplodia* são considerados patógenos para hospedeiros específicos, com grande relevância nos cultivos de videiras (CIMMINO *et al.*, 2017; RODRÍGUEZ-GÁLVEZ *et al.*, 2015) e nos cultivos de cacau onde a espécie *L. theobromae* tem sido considerada como uma ameaça emergente (ALI *et al.*, 2020).

O fungo *L. theobromae* também tem sido associado a infecções em seres humanos, agindo como oportunista e causando doenças em vários níveis de gravidade: lesão cutânea na perna de um paciente que evoluiu para úlcera

(SUMMERBELL *et al.*, 2004), pneumonia em paciente que faleceu 14 dias após transplante de fígado (WOO *et al.*, 2007), sinusites fúngica em paciente submetido a cirurgia endoscópica (KINDO *et al.*, 2010) e ceratite fúngica rara (SAHA *et al.*, 2012, 2013). Por outro lado, foi detectada certa patogenicidade, vinculada a mudanças de temperatura, de uma cepa *L. theobromae* isolada de uma paciente na Jamaica (FELIX *et al.*, 2018a). Recentemente foi publicado um caso de micose profunda, causada por esta espécie, em uma paciente imunocomprometida que havia sido submetida a um transplante de rim (CARLET *et al.*, 2019).

Apesar da patogenicidade deste endófito, algumas espécies de *Lasiodiplodia* mostraram-se adequadas para a produção de compostos bioativos de interesse farmacológico. Até mesmo o taxol, obtido pela fermentação de *L. theobromae* isolado da planta medicinal *Morinda citrifolia*, ativo contra linhagens celulares de câncer de mama, pode ser citado como um exemplo importante (PANDI *et al.*, 2011; SAH *et al.*, 2017). Além disso, este gênero é capaz de produzir muitas substâncias biotecnologicamente relevantes, como enzimas e metabólitos secundários bioativos (SALVATORE *et al.*, 2020). Muitos trabalhos científicos sobre metabólitos secundários produzidos pelo gênero *Lasiodiplodia* aumentaram nos últimos anos (FÉLIX *et al.*, 2018b; GOMEZ *et al.*, 2021b; SALVATORE *et al.*, 2020).

Na **Tabela 1** são descritas algumas substâncias isoladas de fungos do gênero *Lasiodiplodia* e suas atividades biológicas. Em seguida, na **Figura 3**, são apresentadas as estruturas químicas desses compostos.

De acordo com a **Tabela 1**, a maioria dos compostos bioativos, pertencentes a diferentes classes, como os jasmonatos, meleínas, lasiodiplodinas, furanonas, dicetopiperazinas e polissacarídeos, têm sido isolados da espécie *L. theobromae*, tipicamente encontrado em regiões tropicais e subtropicais e possui uma temperatura ideal de crescimento de 27 a 33 °C (PHILLIPS *et al.* 2013). Foi demonstrado que a temperatura modula o perfil enzimático extracelular de algumas linhagens de *L. theobromae* isoladas em países diferentes (Peru, Brasil, Jamaica), sugerindo uma adaptação a diferentes nichos ecológicos (FÉLIX *et al.* 2016, 2018a). A adaptabilidade deste fungo ao hospedeiro é resultado da capacidade de produzir diferentes metabólitos diretamente envolvidos nas interações hospedeiro-patógeno em diferentes condições ambientais (FÉLIX *et al.* 2018b).

Tabela 1 - Metabolitos secundários com atividade biológica comprovada isolados do gênero *Lasiodiplodia*

(continua)

Espécie	Compostos	Atividade biológica	Referência
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	ácido jasmônico. (39)	Fitotóxico	(ANDOLFI <i>et al.</i> , 2014)
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Etil-2,4-dihidroxi-6-(8-oxononil)-benzoato. (40) (R)-Zearalane.(41) 2,4-dihidroxi-6-nonil benzoato. (42) (R)-de-O-Metillasiodiplodina. (43)	Citotóxico (linhagens celulares de adenomas de rato MMQ e GH3)	(HUANG <i>et al.</i> , 2017)
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Etil-2,4-dihidroxi-6-(8-hidroxinonil)-benzoato. (44)	Citotóxico (linhagens celulares de câncer humano THP1, MDA-MB-435, A549, HepG2 e HCT-116)	(LI <i>et al.</i> , 2015)
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Derivados do ácido β -resorcílico. (45-47) Lasicicol. (48) Lasiodiplodina. (49) O-metillasiodiplodina. (43) (E)-9-eteno-lasiodiplodina. (50)	Inibidores de α -glucosidase	(CHEN <i>et al.</i> , 2015)

Tabela 1 - Metabolitos secundários com atividade biológica comprovada isolados do gênero *Lasiodiplodia*

(continuação)

Espécie	Compostos	Atividade biológica	Referência
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	α -endosulfan. (51) β -endosulfan. (52) Sulfato de endosulfan. (53)	Biodegradação de endosulfan	(ABRAHAM <i>et al.</i> , 2014)
<i>L. pseudotheobromae</i>	Palmarumicinas. (54-56)	Citotóxico (linhagens de câncer humano HL-60)	(LU <i>et al.</i> , 2014)
<i>L. theobromae</i>	Meleinas (57-59)	Fitotóxico	(LIM, 1998; SALVATORE <i>et al.</i> , 2020)
<i>L. theobromae</i>	(3S,4R)-3-carboxi-2-metileno-heptan-4-olide. (60)	Fitotóxico	(HE <i>et al.</i> , 2004)
<i>L. theobromae</i>	Ácido jasmônico. (39)	Fitotóxico	(CHANCLUD <i>et al.</i> , 2016)
<i>L. theobromae</i>	Paclitaxel. (61)	Anticancer	(PANDI <i>et al.</i> , 2011) (SAH <i>et al.</i> , 2017)
<i>L. theobromae</i>	Cladospirona B. (62) Desmetil-lasiodiplodina. (43)	Anti-trypanosoma	(KAMAL <i>et al.</i> , 2016)

Tabela 1 - Metabolitos secundários com atividade biológica comprovada isolados do gênero *Lasiodiplodia*

(continuação)

Espécie	Compostos	Atividade biológica	Referência
<i>L. theobromae</i>	Lasiodiplodina E. (63)	Antibacteriano (<i>Streptococcus</i> sp., <i>Bacteroides vulgates</i> , <i>Peptostreptococcus</i> sp. e <i>Veillonella parvula</i>)	(WEI <i>et al.</i> , 2014)
<i>L. theobromae</i>	Lasiodiplactona A. (64)	Anti-inflamatório	(CHEN <i>et al.</i> , 2017)
<i>L. theobromae</i>	Lasiodiplodan. (65)	Citotóxicos (linhagens celulares de câncer de mamas MCF-7)	(ALVES DA CUNHA <i>et al.</i> , 2012)
<i>L. theobromae</i>	Cloropreussomerinas A e B. (66, 67)	Citotóxicos (linhagens celulares de câncer humano A549 e MCF-7)	(CHEN <i>et al.</i> , 2016)
<i>L. theobromae</i>	Cloropreussomerinas A e B. (66, 67) Preussomerina A. (68) Preussomerina F. (69) Preussomerina G. (70) Preussomerina H. (71)	Antibacteriano (<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Bacillus subtilis</i>)	(CHEN <i>et al.</i> , 2016)

Tabela 1 - Metabolitos secundários com atividade biológica comprovada isolados do gênero *Lasiodiplodia*

(continuação)

Espécie	Compostos	Atividade biológica	Referência
<i>L. theobromae</i>	Ácido indol-3-carboxílico. (72) Ácido jasmônico. (39) Lasiodiplodina. (49) (3S,4S)-4-Acetil-3-metil-2-dihidrofurano. (73) (3R,4S)-4-Acetil-3-metil-2-dihidrofurano. (74)	Fitotóxicos	(FELIX <i>et al.</i> , 2018a)
<i>L. theobromae</i>	(3S,4R,5R)-4- hidroximetil-3,5-dimetildihidro-2-furano. (75) Botryosphaerialactona A. (76) Lasiodiplodina. (49) Ácido indol-3-carboxílico. (72)	Citotóxicos (linhagens celulares Vero e 3T3)	(FELIX <i>et al.</i> , 2018a)
<i>L. theobromae</i>	Glucósido de colestanol. (77)	Citotóxico (Linhagens celulares de câncer humano A549 PC3 e HepG2)	(VALAYIL <i>et al.</i> , 2016)
<i>L. theobromae</i>	Glucósido de colestanol. (77)	Antioxidante	(JINU <i>et al.</i> , 2015)

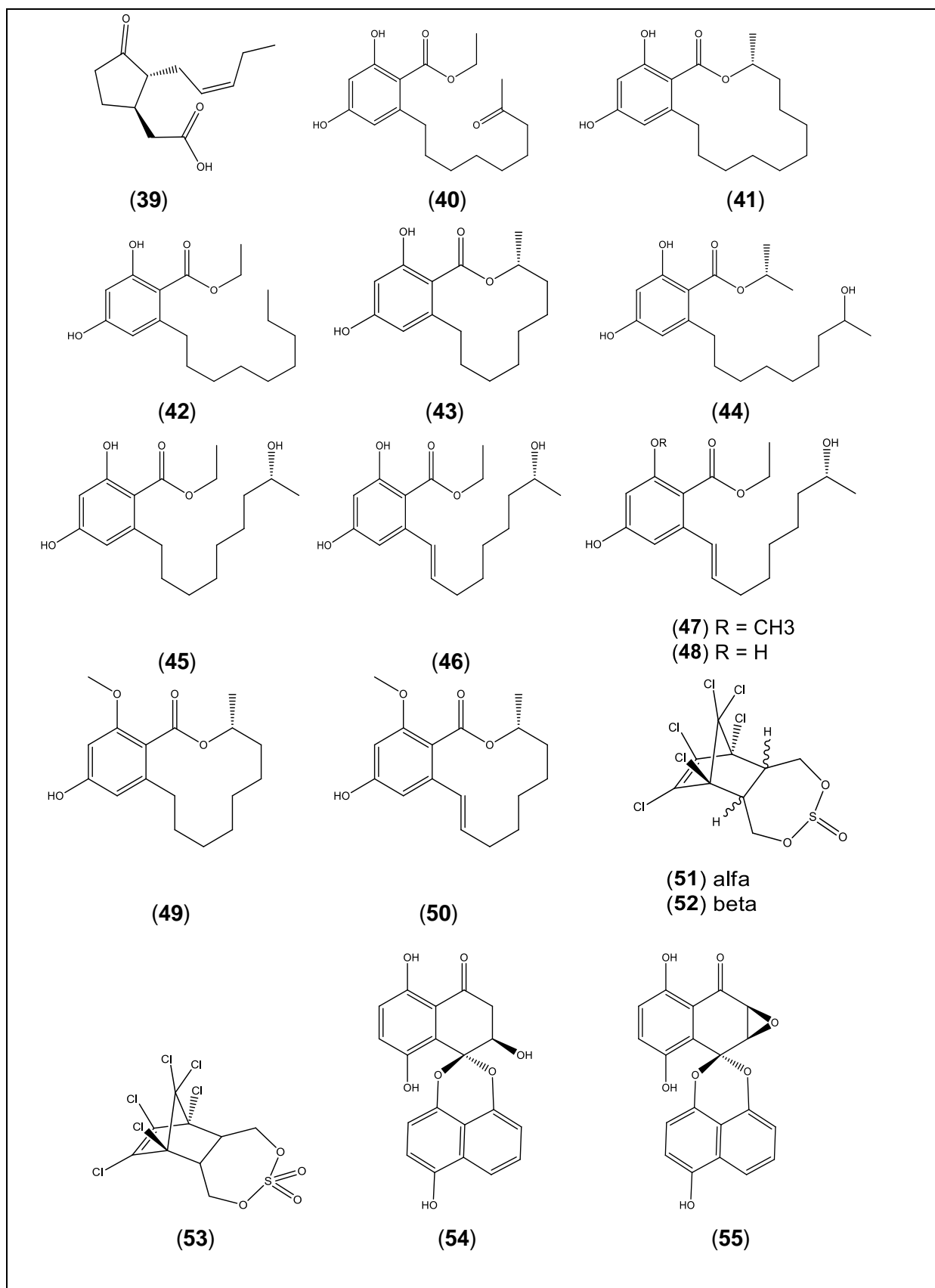
Tabela 1 - Metabolitos secundários com atividade biológica comprovada isolados do gênero *Lasiodiplodia*

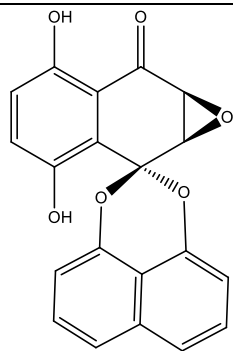
(conclusão)

Espécie	Compostos	Atividade biológica	Referência
<i>L. theobromae</i>	1H- Dibenzo[b,e] [1, 4]dioxepin-11-ona,3,8-dihidroxi-4-(metoxi- metil)-1,6-dimetil. (78)	Citotóxico (linhagem celular de linfoma de rato L5178Y)	(UMEOKOLI <i>et al.</i> , 2018)
<i>L. theobromae</i>	(+)-(R)-de-O-metil-lasiodiplodina. (43)	Antibacteriano (<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus faecium</i>)	(UMEOKOLI <i>et al.</i> , 2018)

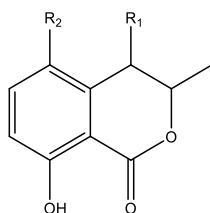
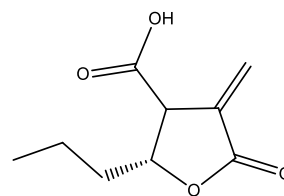
Fonte: do autor.

Figura 3 - Estrutura química dos metabólitos secundários bioativos isolados do gênero *Lasiodiplodia*

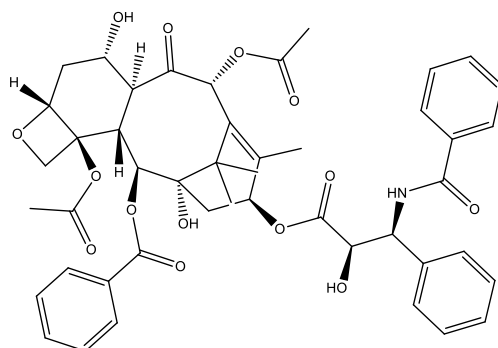




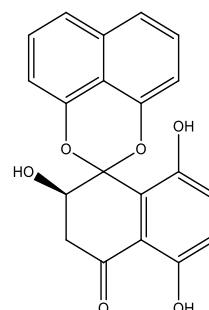
(56)

(57) $R_1=R_2=H$ (58) $R_1=H; R_2=OH$ (59) $R_1=OH; R_2=H$ 

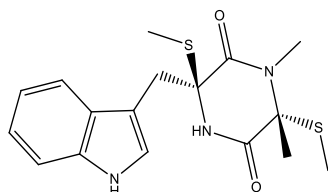
(60)



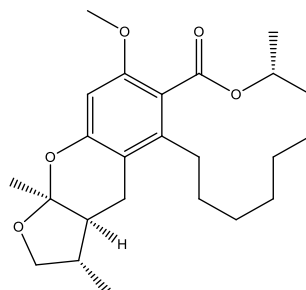
(61)



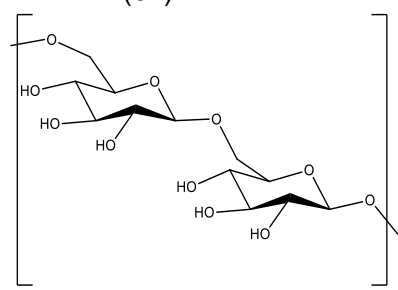
(62)



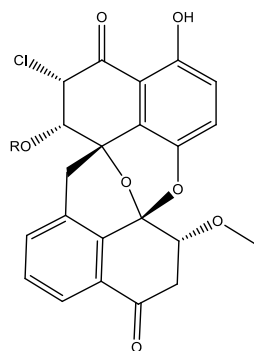
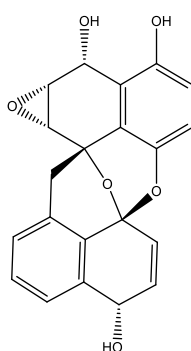
(63)



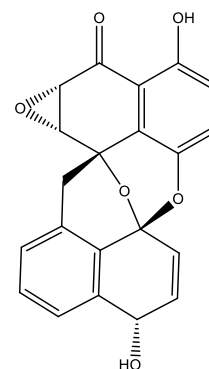
(64)



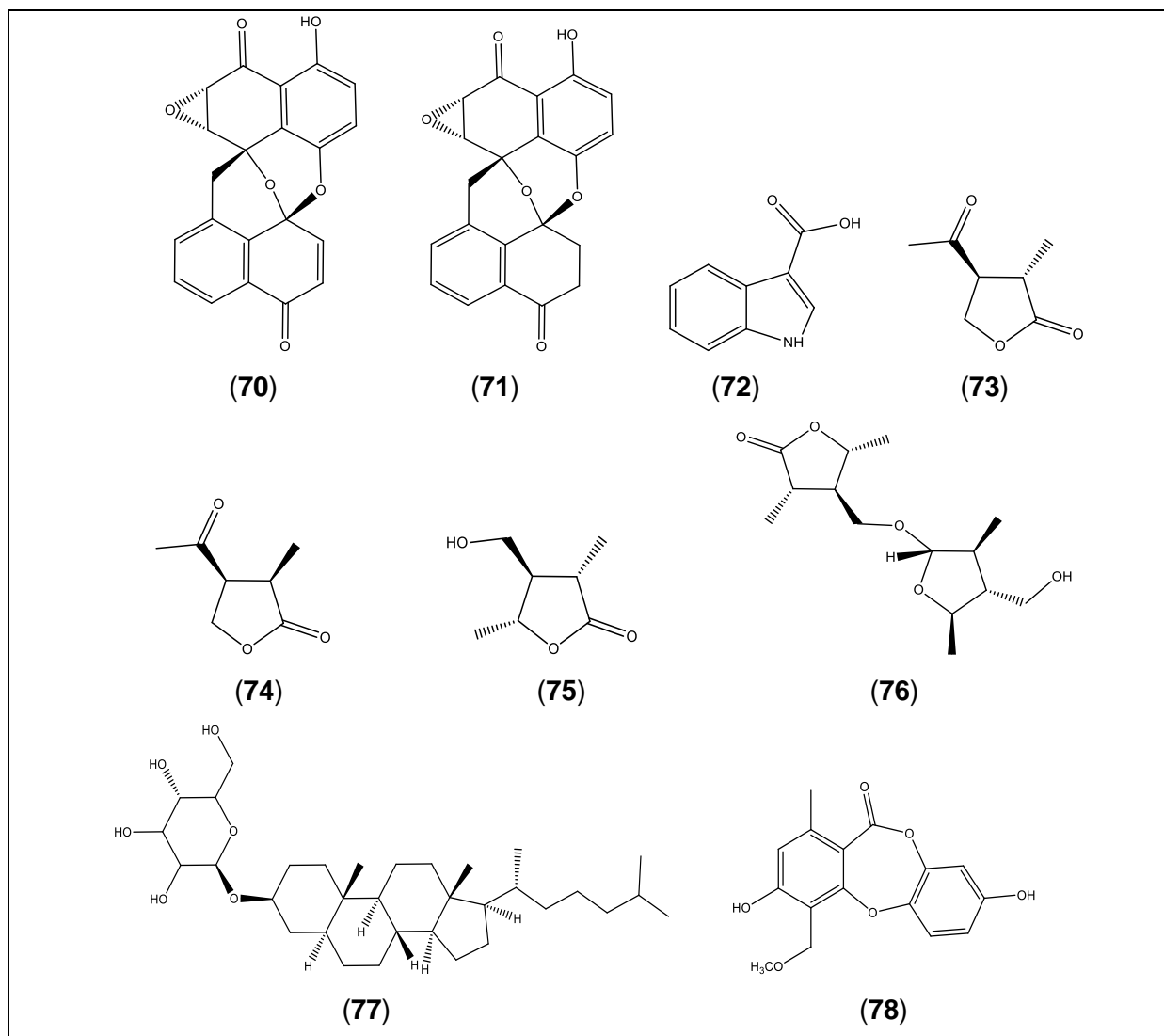
(65)

(66) $R = H$ (67) $R = CH_3$ 

(68)



(69)



Fonte: do autor.

As atividades biológicas observadas para os compostos isolados do gênero *Lasiodiplodia*, mostram as potencialidades destes endófitos para o controle e possível solução de problemas de saúde global. A Organização Mundial de Saúde (WHO, 2020) anunciou que na próxima década, o câncer será diagnosticado em cerca de 200 milhões de pessoas que necessitarão de cuidados específicos. Por outro lado, as infecções respiratórias inferiores foram relatadas como a quarta causa global de morte em 2018, mas em países de baixa renda foi declarada como a primeira causa de morte (WHO, 2018).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho experimental se dividiu em duas fases: a) Isolamento de fungos endofíticos para formar um banco de cepas no Laboratório de Bioprocessos, disponível para trabalhos de Iniciação Científica e Pós-Graduação e b) Identificação de compostos orgânicos em produtos da fermentação do fungo *Lasiodiplodia* sp., que já tinha sido objeto de estudo por outros alunos do grupo mostrando resultados promissores.

4.1 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO IPÊ

4.1.1 Coleta da amostra vegetal e isolamento dos fungos endofíticos

Foram coletadas amostras vegetais de *Handroanthus impetiginosus* (Mart ex DC.) Mattos, em meados de janeiro de 2018. Foram coletadas folhas e casca do exemplar localizado na área urbana Praça da APAE (S21°25'16.95", W45°57'05.15") no município de Alfenas–MG. A planta já tinha sido identificada com antecedência pela Profa. Dra. Lúcia G. Lohmann do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Já existiam exsiccatas dessa árvore depositadas no herbário da Universidade Federal de Alfenas, sob o número de registro 2536.

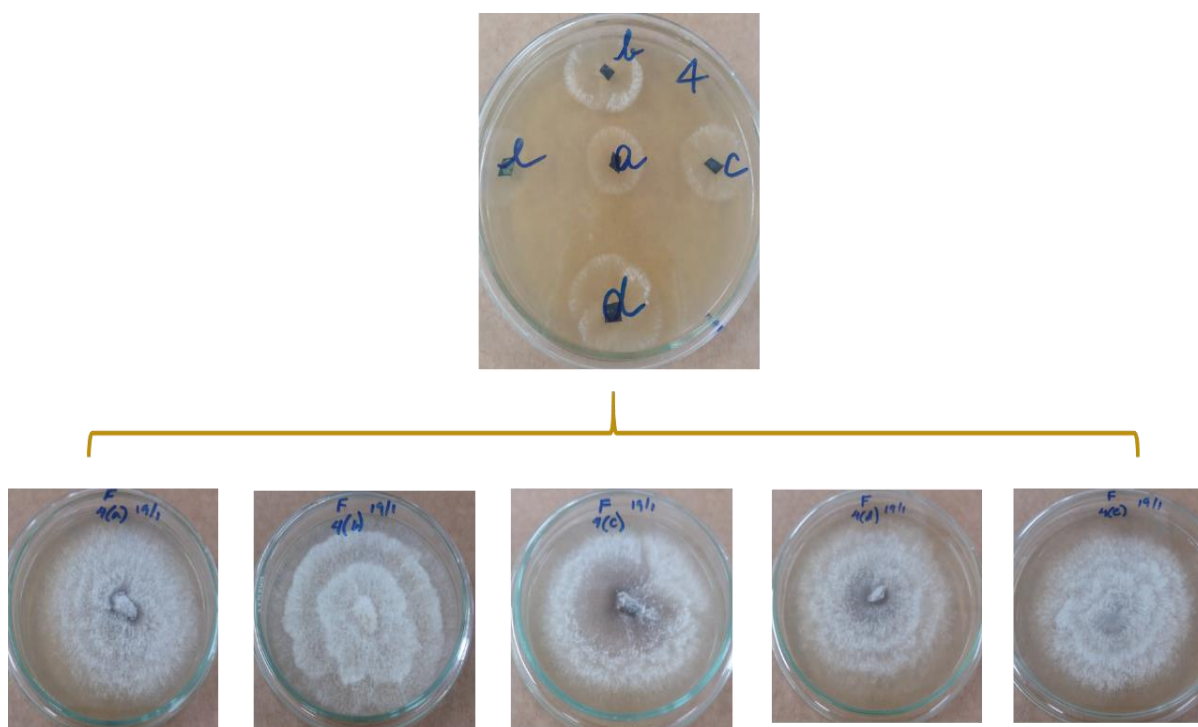
Durante a amostragem foram selecionadas folhas aparentemente saudáveis e não danificadas por insetos. As cascas foram retiradas de fragmentos do tronco (2 cm largura x 4 cm comprimento x 1 cm profundidade) e dos ramos (2 cm largura x 2 cm comprimento x 0,5 cm profundidade) da planta.

As amostras de folhas e cascas foram lavadas repetidas vezes em água corrente para retirar os resíduos da superfície. A esterilização das amostras foi feita segundo a metodologia de Marcellano *et al.* (2017) com algumas variações. As amostras da casca foram colocadas em uma solução de álcool 70% por 1 minuto, em seguida em uma solução de hipoclorito de sódio 4% por 4 minutos e finalmente em álcool 96% por 30 segundos. Para as amostras das folhas o tempo na solução de hipoclorito de sódio foi de 6 minutos e a última lavagem foi feita em álcool 70% durante 1 minutos. A água da lavagem final foi utilizada como controle da esterilidade do processo através do inóculo desta água em placa de Petri com meio ágar extrato de

malte (20 g de ágar, 20 g extrato de malte, 1000 mL de água).

Após a esterilização, as amostras de casca e folhas foram cortadas em fragmentos de 0,5 cm x 0,5 cm usando lâminas de corte estéreis e em seguida foram colocadas em placas de Petri com meio de cultura ágar extrato de malte, com cinco fragmentos por placa. As placas foram numeradas de 1 até 25 e nelas os fragmentos foram designados com as letras a, b, c, d, e (**Figura 4**).

Figura 4 – Fotografia de uma placa de Petri (número 4) com 5 fragmentos de folha. As cinco fotos na parte inferior da figura mostram os crescimentos dos fragmentos (a, b, c, d, e) originariamente cultivados na placa 4 (foto na parte superior da figura)



Fonte: Do autor.

As placas com os fragmentos foram mantidas a temperatura ambiente em isopor e o crescimento dos fungos foi acompanhado diariamente durante 21 dias. Durante esse tempo foi realizado o processo de purificação dos fungos endofíticos. As colônias que cresceram a partir dos fragmentos vegetais foram submetidas a repiques sucessivos em meio de cultura maltose-agar até a obtenção de colônias

puras (**Figura 4**). Após este processo os fungos foram estocados em água estéril segundo a metodologia de Castellani (DE CAPRILES, 1989). Os fungos isolados foram codificados considerando-se a parte de planta, o número da placa e o fragmento correspondente na placa. Por exemplo, o fungo F13d foi isolado da folha (F), da placa 13 e do fragmento d contido nesta placa. No total foram isolados 103 fungos que foram estocados no Laboratório de Bioprocessos da UNIFAL-MG (**Apêndice A**).

4.2 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DOS PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO DO *Lasiodiplodia* sp.

O fungo endofítico usado na segunda fase foi isolado e classificado em trabalhos anteriores, mostrando resultados promissores. O isolamento foi realizado a partir de folhas saudáveis de *Handroanthus impetiginosus*, segundo a metodologia específica para o isolamento deste tipo de microrganismos, preconizada por Araújo *et al.* (2010). A classificação do mesmo foi realizada por análise sequencial do DNA e inferência filogenética, resultando na identificação de *Lasiodiplodia* sp. com código Genbank: OK268021.1 (AGOSTINI, 2016).

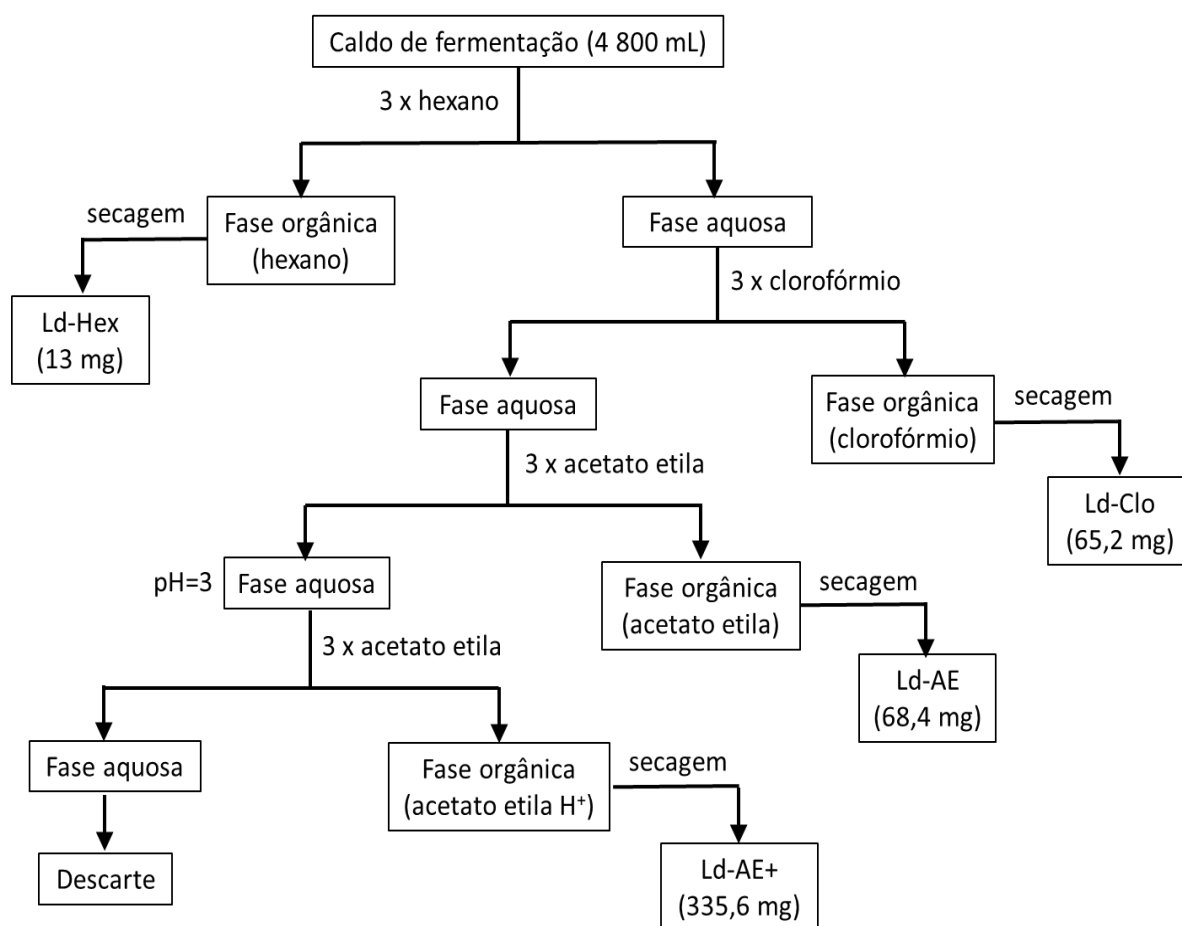
4.2.1 Fermentação e obtenção dos extratos brutos

O fungo foi repicado em ágar batata dextrose (ABD) e incubado durante sete dias em isopor a temperatura ambiente. Após o crescimento fúngico, foram cortados dois fragmentos do micélio para serem inoculados em cada um dos 8 erlenmeyers de 1 L contendo 150 mL de caldo Czapek como meio de fermentação (glicose 30,0 g, NaNO₃ 2,0 g, K₂HPO₄ 1,0 g, MgSO₄.7H₂O 0,5 g, KCl 0,5 g, FeSO₄.7H₂O 0,01 g, extrato de levedura 1,0 g colocados em 1000 mL de água destilada), que foram incubados à temperatura ambiente durante 21 dias de forma estática no escuro. Este processo foi realizado quatro vezes (quatro fermentações), com a finalidade de se obter massas suficiente para o desenvolvimento do trabalho.

Após o período de fermentação, o meio de cultura foi filtrado a vácuo para remoção do micélio. Em seguida, o caldo (volume total = 4 800 mL) foi submetido a extrações líquido-líquido usando diferentes solventes (3 extrações x 900 mL para cada solvente) com polaridade crescente (hexano (Hex), clorofórmio (Clo) e acetato de etila (AE)) para obter os extratos orgânicos brutos. Depois das extrações com acetato de etila, o pH do caldo foi modificado (pH = 3) adicionando-se uma solução de HCl (0,1112

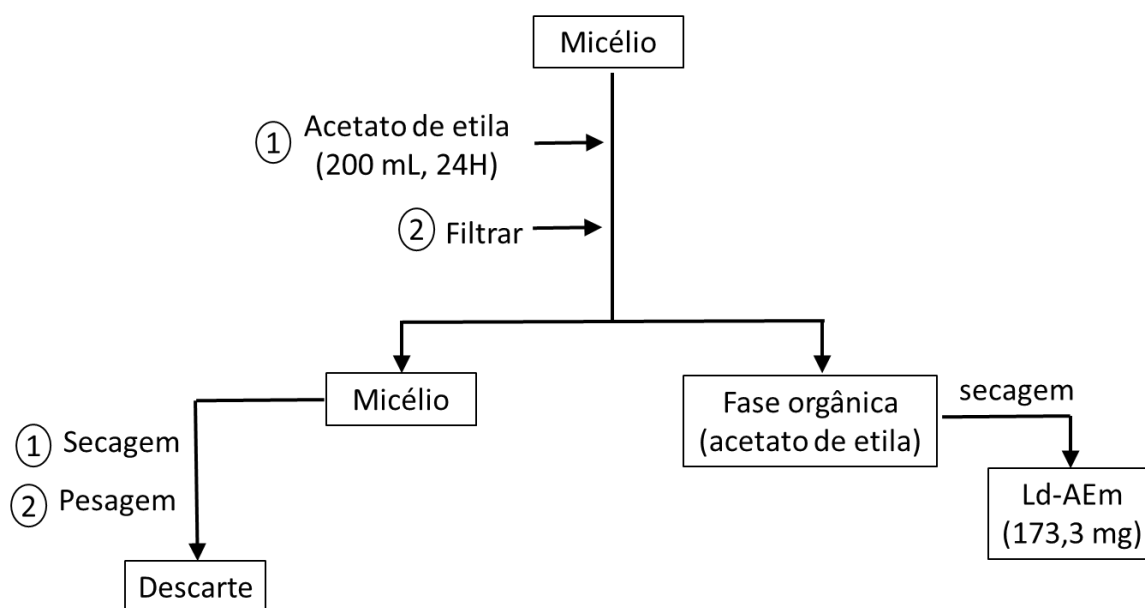
M) e uma nova extração com acetato de etila (AE⁺) foi realizada (3 x 900 mL), para favorecer a extração de compostos fenólicos e ácidos carboxílicos. Segundo a metodologia de Mir *et al.* (2015), com algumas modificações, o micélio separado durante a filtração foi macerado em acetato de etila (200 mL) por 24 horas à temperatura ambiente e depois filtrado (papel de 90 mm 80 G) produzindo outro extrato bruto de acetato de etila (AEm). A massa média do micélio seco após a maceração foi de 8,935 g (**Figuras 5 e 6**).

Figura 5 - Fluxograma da extração líquido-líquido para obter os extratos brutos a partir do caldo de fermentação



Fonte: do autor.

Figura 6 - Fluxograma da extração por maceração para obter o extrato bruto a partir do micélio



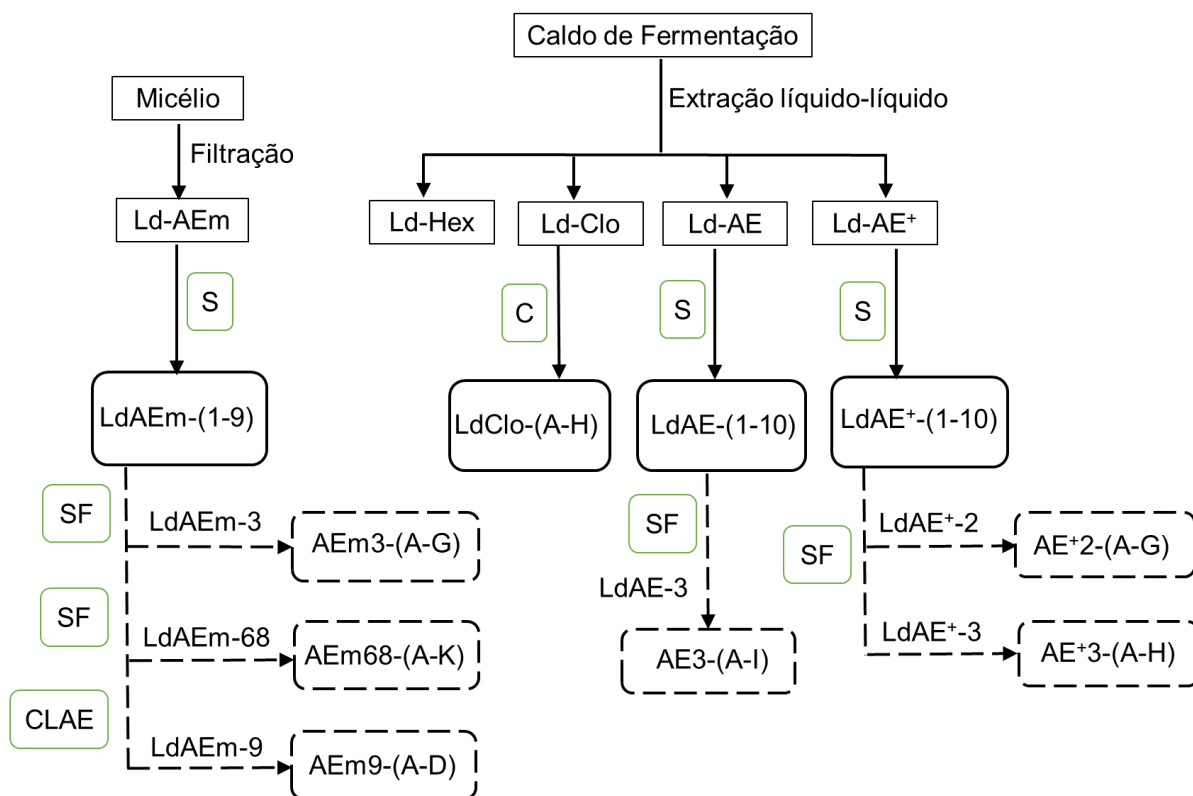
Fonte: do autor.

4.2.2 Fracionamento

O fracionamento (**Figura 7**) foi realizado para todos os extratos brutos, exceto o hexano (Hex). Os três extratos brutos de AE (AE, AE⁺ e AEm) foram fracionados em coluna de vidro preenchida com Sephadex LH 20 (40 cm x 2 cm), com o eluente a uma vazão de 2,9 mL.min⁻¹, usando acetato de etila:metanol (7:3, v:v) em modo isocrático. Para o extrato de clorofórmio (Clo), foi usado um cartucho da Waters Sep-Pak® Vac 20 cc Diol-5 g, sem aplicação de pressão, realizando-se uma eluição por gradiente da seguinte forma: hexano:clorofórmio (9:1, 8:2, v:v), clorofórmio (100%), clorofórmio:metanol (9:1, 8:2, 6:4, 4:6, v:v) e metanol (100%).

As frações com maior atividade antimicrobiana foram cromatografadas originando-se subfrações. Este processo foi realizado em coluna de vidro preenchida com 10 g de Sílica (CS608001-PG, 70-230 mesh), leito de 31 cm x 1 cm e fluxo de 0,8 mL.min⁻¹, também realizando-se uma eluição por gradiente: acetato de etila:hexano (1:1, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1), acetato de etila (100%), acetato de etila:metanol (8:2, 6:4, 4:6) e metanol (100%). As frações e subfrações foram agrupadas de acordo com a sua similaridade após avaliação por cromatografia em camada delgada (CCD). A fração LdAEm-9 foi submetida a um processo de purificação por CLAE.

Figura 7 – Representação do fracionamento dos extratos brutos e frações bioativas



Fonte: do autor.

Legenda: S: Sephadex LH-20; C: Cartucho Diol; SF: Sílica Flash; CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Resolução; Linhas descontínuas: subfracionamento

Para a realização da cromatografia em camada delgada (CCD) durante os processos de fracionamento foram usadas cromatofolhas 20 x 20 de sílica-gel (HPTLC Silica gel) sobre alumínio com indicador de ultravioleta F₂₅₄. As cromatoplasmas foram reveladas por exposição à radiação UV 254 nm. Seguem os eluentes usados para cada processamento:

- Ld-Clo: clorofórmio:acetona (9:1, v/v);
- Ld-AEm: acetato de etila:metanol (9:1, v/v);
- LdAEm-68: acetato de etila:hexano (7:3, v/v);
- LdAEm-3: acetato de etila:hexano (7:3, v/v), acetato de etila:metanol (8:2, v/v);
- Ld-AE⁺: acetato de etila 100%;

- f) LdAE⁺-2: acetato de etila:hexano (8:2, v/v), acetato de etila:metanol (9:1, v/v);
- g) LdAE⁺-3: acetato de etila:hexano (7:3, v/v), acetato de etila:metanol (8:2, v/v);
- h) Ld-AE: acetato de etila 100%.

4.3 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.3.1 Teste de difusão em ágar para fungos endofíticos isolados do Ipê

Os 103 fungos isolados foram submetidos a um screening através do teste do ágar em bloco para se detectar seu potencial antimicrobiano contra cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538-R3), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Candida albicans* (ATCC 10231).

Estes patógenos foram repicados em BHI (4 mL) e incubados durante 24 horas a 36 °C. Após a incubação, os inóculos foram preparados como uma suspensão padronizada em um espectrofotômetro a 660 nm e transmitância de 75%, correspondendo a $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ (unidades formadoras de colônias por mL) o que equivale ao valor de 0,5 na escala de Mac Farland (VALGAS *et al.*, 2007).

Os fungos a serem testados foram cultivados em meio BDA e incubados a temperatura ambiente durante sete dias. Após esse tempo foram transferidos fragmentos do micélio, com diâmetro de 1,4 cm, para meio sólido ágar Mueller Hinton (AMH) previamente semeado com 200 µL do patógeno padronizado. Em seguida, as placas contendo os fragmentos do fungo expostos ao patógeno foram incubadas na geladeira durante 20 min a 14 °C, para facilitar a difusão de metabólitos liberados pelo fungo no ágar, e logo depois foram incubadas durante 24 horas a 36 °C.

O surgimento de um halo de inibição ao redor do fragmento do fungo, onde é inibido o crescimento do patógeno descreve uma circunferência cujo diâmetro corresponde proporcionalmente a intensidade da atividade antimicrobiana dos metabólitos liberados ao meio pelo fungo.

4.3.2 Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) para produtos da fermentação do *Lasiodiplodia* sp.

A determinação da atividade antimicrobiana de extratos brutos, frações e subfrações foi baseada nos padrões CLSI (2008, 2015) para leveduras e bactérias, com algumas modificações. O teste foi realizado no meio Mueller Hinton (HIMEDIA, Índia) para atividade contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (ATCC 4555), *Salmonella typhimurium* (ATCC 4555) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) e no meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich) para atividade contra *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida tropicalis* (ATCC 750) e *Candida parapsilosis* (ATCC 2209). Os extratos foram testados contra todos esses patógenos; no entanto, as frações e subfrações foram testadas apenas contra *Listeria monocytogenes* e *Candida albicans*, devido à alta sensibilidade que apresentaram nos testes e a sua capacidade de crescimento nos meios de cultura.

As amostras foram dissolvidas em 125 μL de etanol absoluto até uma concentração final de 8 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ e colocadas em microplacas de 96 poços sob diluições seriadas (400-3,125 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$). O inóculo foi preparado como descrito acima para o ensaio de ágar em bloco (densidade de $1,5 \times 10^8$ UFC. mL^{-1}). Como controles positivos foram utilizadas a amoxicilina e estreptomicina (10 – 0.078 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente, e o fluconazol (80-0.625 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) para leveduras. Além disso, o meio de cultura e os patógenos foram também empregados como controles, sendo colocados de forma separada em poços específicos e sem a presença de amostra no meio. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 h. Uma solução aquosa de resazurina a 0,2% foi usada como revelador para determinar a viabilidade do inóculo, indicada pela mudança de cor de azul para rosa (SARKER *et al.*, 2007). O valor da CIM foi determinado como a menor concentração sem variação na cor do revelador. Todos os extratos e frações foram estudados em triplicata.

Para a determinação da CMM, uma alíquota de 25 μL foi removida dos poços que não apresentavam alteração de cor (para amostras e antimicrobianos) e aplicada na superfície de uma placa de Petri contendo ágar Mueller Hinton (HIMEDIA, Índia) para bactérias e ágar Sabouraud (HIMEDIA, Índia) para leveduras. Cada placa foi

incubada a 37°C por 24 h. O crescimento bacteriano ou fúngico na placa indica que o extrato exerceu uma ação bacteriostática. Caso contrário, a ausência de crescimento é um indicativo de ação bactericida/fungicida.

4.4 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC-MS)

Nas instalações do Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos (LATF) da UNIFAL-MG, foram analisadas as frações obtidas a partir do extrato bruto de clorofórmio (Ld-Clo) em Cromatógrafo Gasoso (GC-2010 Gas Chromatograph, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) acoplado a um Espectrômetro de Massa (MS-QP-5050A, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão).

Foi utilizada coluna capilar Rtx® Crossbond® 5% difenil 95% dimetilpolisiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Restek). Especificações do método GC: A temperatura do injetor foi mantida a 270 °C e a temperatura do detector foi de 240 °C. A temperatura da coluna foi programada entre 80 °C – 290 °C, como segue: 1) mantida a 80 °C por 2 min; 2) de 80 °C a 200 °C a uma taxa de 20 °C.min⁻¹; 3) de 200 °C a 280 °C a uma taxa de 10 °C.min⁻¹ e mantida a 280 °C por 10 min e 4) de 280 °C a 290 °C a uma taxa de 2 °C.min⁻¹ e mantida a 290 °C por 10 min. O gás de arraste foi o Hélio a 0,6 mL.min⁻¹. As amostras foram preparadas com acetato de etila grau CLAE e 1,0 µL de cada fração foi injetada no modo splitless. A aquisição dos espectros de massas foi feita no modo de ionização por impacto de elétrons (70 eV), mantendo as temperaturas da interface EM e da fonte de íons a 300 °C. O intervalo de varredura em massa utilizado foi de m/z 40-500 uma. A identificação dos constituintes foi realizada comparando seus espectros de massa com os espectros de massas dos padrões segundo a base de dados NIST (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, Departamento de Comércio dos EUA) e a base de dados Massbank.

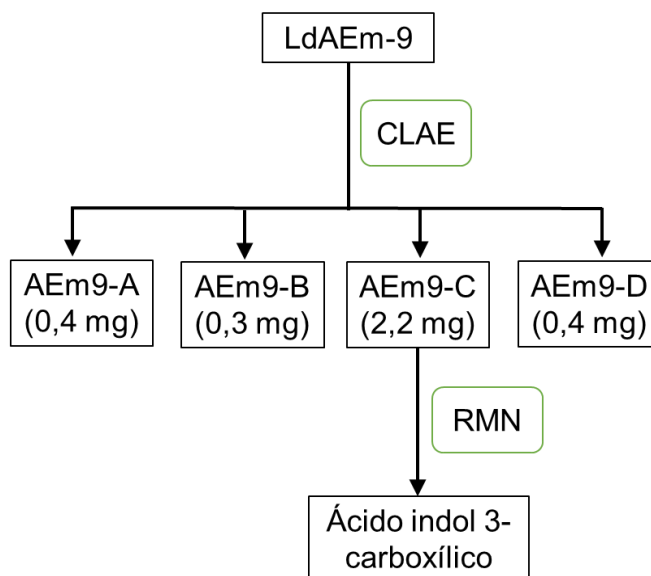
4.5 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A purificação do A fração LdEAm-9, obtida a partir do extrato bruto de acetato de etila Ld-EAm, foi realizada em HPLC Shimadzu® Class – VP (Tamboré, SP), equipado com uma coluna Shim Pack 100 Prep-ODS (25 cm x 20 mm x 15 µm), detector SPD-10A e software Shimadzu CLASS-UP. A eluição foi realizada em modo isocrático usando uma proporção de 8:2 (v:v) de acetonitrila: H₂O acidificada 0,1% v/v

(ácido fórmico), com uma vazão de $8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e a detecção realizada em comprimento de onda (λ) de 254 nm.

A **Figura 8** mostra um resumo dos procedimentos realizados durante a purificação.

Figura 8 – Isolamento do ácido indol-3-carboxílico a partir da fração LdAEm-9



Fonte: do autor.

4.6 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS E ESPECTROMÉTRICAS

No laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, localizado no Campus II da UNIFAL-MG foram obtidos os espectros de RMN 1D (^1H , ^{13}C) e 2D (COSY (COrrrelational SpectroscopY), HMBC (Heteronuclear MultipleBond Correlation) e HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy)) da subfração AEm9-C, registrados no equipamento da Bruker AC 300 (7,05 T) utilizando-se tetrametilsilano (TMS) como padrão interno e o CD_3OD foi usado como solvente a temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Seguem os detalhes mais importantes da aquisição dos dados para esta amostra:

- a) Espectro 1D ^1H (sequência de pulsos zg da Bruker): número de scans: 256; tempo de aquisição: 6 s; pulso de 90° de $13 \mu\text{s}$; largura espectral: 16 ppm e 65 K de dados;

- b) Espectro 1D DEPT 135 (sequência de pulsos deptsp135 da Bruker): número de scans: 16 K; tempo de aquisição: 1,8 s; pulso de 90° de 10,2 µs; largura espectral: 240 ppm e 65 K de dados;
- c) Espectro 2D COSY (sequência de pulsos cosygpprqf da Bruker): número de scans: 32; largura espectral: 9 ppm para F1 e F2; pulso de 90° de 13 µs; 2 K de dados em F2 e 256 em F1;
- d) Espectro 2D HSQC (sequência de pulsos hsqcetgp da Bruker) obtido no modo echo-antiecho sensível à fase com a seguinte configuração: número de scans: 32; largura espectral: 9/165 ppm nas dimensões de hidrogênio/carbono, respectivamente; pulso de 90° de 13 µs; 2 K de dados em F2 e 256 em F1;
- e) Espectro 2D HMBC (sequência de pulsos hmbcgplpndqf da Bruker): número de scans: 32; largura espectral: 9/222 ppm nas dimensões de hidrogênio/carbono, respectivamente; pulso de 90° de 13 µs; 2 K de dados em F2 e 256 em F1.

Por outro lado, no Departamento de Química da UFSCar, todos os experimentos (¹H, COSY, HSQC, HMBC e *J*-resolved) das subfrações AEm68-C e AEm68-E foram adquiridos em um equipamento de 14,1T, marca Bruker, modelo AVANCE III, equipado com uma sonda criogênica de 5 mm e mantida a temperatura de 25 °C em todos os experimentos, também usando o TMS como padrão interno. O CD₃OD e o CDCl₃ foram usados como solventes. Seguem os detalhes mais importantes da aquisição dos dados para estas amostras:

- a) Espectro 1D ¹H (sequência de pulsos noesypr1d da Bruker): número de scans: 16 (AEm68-C) e 8 (AEm68-E); tempo de aquisição: 4,6 s (AEm68-C) e 5,2 s (AEm68-E); tempo de relaxação: 2 s; pulso de 90° de 7,7 µs; largura espectral: 11 ppm (AEm68-C em CD₃-OD), 13 ppm (AEm68-C em CDCl₃) e 10 ppm (AEm68-E) e 65 K de dados;
- b) Espectro 2D COSY (sequência de pulsos cosygpprqf da Bruker): número de scans: 16 (AEm68-C) e 8 (AEm68-E); largura espectral: 11 ppm (AEm68-C) e 10 ppm (AEm68-E) para F1 e F2 respectivamente; pulso de 90° de 7,7

μ s; tempo de relaxação: 1 s; 4 K de dados em F2 e 256 em F1;

- c) Espectro 2D HSQC (sequência de pulsos `hsqcetgpprsisp2.2` da Bruker) obtido no modo echo-antiecho sensível à fase com a seguinte configuração: número de scans: 16 (AEm68-C) e 8 (AEm68-E); largura spectral: 11/238 ppm (AEm68-C) e 10/238 ppm (AEm68-E) nas dimensões de hidrogênio/carbono, respectivamente; pulso de 90° de 7,7 μ s; 4 K de dados em F2 e 256 em F1;
- d) Espectro 2D HMBC (sequência de pulsos `hmbcgpnpndprqf` da Bruker): número de scans: 128; largura spectral: 11/238 ppm (AEm68-C em CD₃-OD), 13/238 ppm (AEm68-C em CDCl₃) e 10/238 ppm (AEm68-E) nas dimensões de hidrogênio/carbono, respectivamente; pulso de 90° de 7,7 μ s; 4 K de dados em F2 e 256 em F1;
- e) Espectro 1D *J*-resolved (sequência de pulsos `jresgpprpf` da Bruker) para AEm68-C: número de scans: 32; largura spectral: 30/0,06 ppm nas dimensões de hidrogênio/carbono, respectivamente; pulso de 90° de 7,2 μ s; 4 K de dados em F2 e 256 em F1.

Para a leitura e análise de todos os espectros adquiridos foi usado o programa TopSpin 4.0.9 Copyright © 2020 Bruker BioSpin GmbH. Durante a análise dos espectros de ¹H as funções de apodização LB (Lorentzian broadening factor) e GB (Gaussian broadening factor) foram trabalhadas nas faixas de 0 até -3 e de 0 até 0,3 respectivamente, para melhorar a resolução e conseguir estabelecer uma multiplicidade mais exata derivada das correlações à curta e longa distância (*J*>3). Além disso, foram realizadas simulações usando os programas MestReNova 6.0.2-5475, ChemDraw Professional 16.0 e ACD.

As análises de massas das amostras AEm68-C e AEm68-E foram realizadas em um Espectrômetro de Massas de Alta Resolução, marca Thermo modelo LTQ Orbitrap Velos, com fonte de ionização de eletrospray (ESI, pelas siglas em inglês) operando em modo positivo, por infusão direta com fluxo de 10 μ L.min⁻¹. No capilar, utilizou-se um valor de potencial e de temperatura de 3,6 kV e 250 °C, respectivamente. A aquisição de dados foi realizada na região de *m/z* 60 a 1000 para os espectros full scan. A fragmentação dos picos correspondentes com os compostos

identificados por RMN ocorreu por colisão com hélio (CID, pelas siglas em inglês) gerando os espectros MS/MS (MS²). Seguem as condições usadas durante a fragmentação:

Amostra AEm68-C:

- a) *m/z* 139: RT: 0,68; AV: 1; NL: 3,49E3; FTMS + c ESI Full ms2
139.00@cid25.00 [50.00-300.00];
- b) *m/z* 162: RT: 0,68; AV: 1; NL: 2,07E4; FTMS + c ESI Full ms2
162.00@cid25.00 [50.00-300.00];
- c) *m/z* 195: RT: 0,56; AV: 1; NL: 1,48E4; FTMS + c ESI Full ms2
195.00@cid28.00 [50.00-300.00].

Amostra AEm68-E:

- a) *m/z* 152: RT: 0,56; AV: 1; NL: 1,71E2; FTMS + c ESI Full ms2
211.00@cid27.00 [50.00-300.00].

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 OBTENÇÃO DE EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E SUBFRAÇÕES A PARTIR DOS PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO DO *Lasiodiplodia* sp.

Após o processamento do caldo de fermentação e do micélio, foram obtidos cinco extratos brutos diferentes (**Tabela 2**). O uso de solventes de polaridades crescentes durante a extração líquido-líquido: 1) hexano (Hex); 2) clorofórmio (Clo) e 3) acetato de etila (AE), é importante para direcionar procedimentos posteriores de purificação e caracterização estrutural, pois fornece um conhecimento geral dos compostos contidos nesses extratos brutos em termos de polaridade. Na **Tabela 2** são mostradas as frações com suas respectivas massas, obtidas durante o processo de fracionamento dos extratos brutos.

Devido a atividade antimicrobiana mais acentuada de algumas frações (LdAE-3, LdAE⁺-2, LdAE⁺-3, LdAEm-3, 6, 7 e 8), decidiu-se dar continuidade ao processo de separação originando as subfrações respectivas, apresentadas na **Tabela 3**. As frações LdAEm-6, 7 e 8 foram reunidas pois apresentavam perfil cromatográfico (CCD) e de atividade antimicrobiana similares, dessa forma a fração foi denominada como LdAEm-68 (**Tabela 3**).

Tabela 2 - Massas de extratos brutos e frações obtidas após fermentação fúngica e etapa cromatográfica

Extratos brutos	Ld-Clo (65,2mg)	Ld-AE (68,4 mg)	Ld-AE⁺ (335,6 mg)	Ld-AEm (173,3 mg)
	LdClo-A (8,6 mg)	LdAE-1 (7 mg)	LdAE ⁺ -1 (11 mg)	LdAEm-1 (23,8 mg)
	LdClo-B (9,8 mg)	LdAE-2 (4,4 mg)	LdAE ⁺ -2 (21,8 mg)	LdAEm-2 (7 mg)
	LdClo-C (7,5 mg)	LdAE-3 (10,2 mg)	LdAE ⁺ -3 (82,8 mg)	LdAEm-3 (37,7 mg)
Frações	LdClo-D (5,1 mg)	LdAE-4 (5,1 mg)	LdAE ⁺ -4 (13,3 mg)	LdAEm-4 (18,8 mg)
	LdClo-E (8,8 mg)	LdAE-5 (7,4 mg)	LdAE ⁺ -5 (17,4 mg)	LdAEm-5 (20 mg)
	LdClo-F (7,1 mg)	LdAE-6 (5,3 mg)	LdAE ⁺ -6 (9,5 mg)	LdAEm-6 (11,7 mg)
	LdClo-G (5,2 mg)	LdAE-7 (4,2 mg)	LdAE ⁺ -7 (13,2 mg)	LdAEm-7 (10,2 mg)
	LdClo-H (6,8 mg)	LdAE-8 (6,4 mg)	LdAE ⁺ -8 (7,5 mg)	LdAEm-8 (6,6 mg)
		LdAE-9 (7,2 mg)	LdAE ⁺ -9 (10,9 mg)	LdAEm-9 (30,3mg)
		LdAE-10 (5,9 mg)	LdAE ⁺ -10 (76,6 mg)	

Fonte: do autor.

Nota: O extrato Ld-Hex (13 mg) não foi submetido ao processo de fracionamento.

Tabela 3 - Massas das subfrações obtidas a partir das frações mais bioativas

Frações	LdAE-3 (10,2mg)	LdAE⁺-2 (21,8 mg)	LdAE⁺-3 (82,8 mg)	LdAEm-3 (37,7 mg)	LdAEm-68 (28,5 mg)
	AE3-A (1,4mg)	AE ⁺ 2-A (4 mg)	AE ⁺ 3-A (20 mg)	AEm3-A (10,7)	AEm68-A (3,1 mg)
	AE3-B (1,2 mg)	AE ⁺ 2-B (3,8 mg)	AE ⁺ 3-B (7 mg)	AEm3-B (5,6)	AEm68-B (2,3 mg)
	AE3-C (1,2 mg)	AE ⁺ 2-C (4,4 mg)	AE ⁺ 3-C (12,7 mg)	AEm3-C (4,6)	AEm68-C (4,2 mg)
	AE3-D (1 mg)	AE ⁺ 2-D (2,3 mg)	AE ⁺ 3-D (15 mg)	AEm3-D (4,6)	AEm68-D (2,2 mg)
Subfrações	AE3-E (1,4 mg)	AE ⁺ 2-E (2,1 mg)	AE ⁺ 3-E (8,3 mg)	AEm3-E (4,1)	AEm68-E (2,4 mg)
	AE3-F (1,2 mg)	AE ⁺ 2-F (1,8 mg)	AE ⁺ 3-F (7 mg)	AEm3-F (5,3)	AEm68-F (3,6 mg)
	AE3-G (0,6 mg)	AE ⁺ 2-G (2 mg)	AE ⁺ 3-G (5,1 mg)	AEm3-G (1,3)	AEm68-G (2,6 mg)
	AE3-H (1 mg)		AE ⁺ 3-H (3,2 mg)		AEm68-H (1,3 mg)
	AE3-I (0,8 mg)				AEm68-I (2,5mg)
					AEm68-J (1,5mg)
					AEm68-K (1,7mg)

Fonte: do autor.

5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.2.1 Teste de ágar em bloco para os fungos endofíticos isolados do Ipê

Após a realização deste teste para os 103 fungos isolados, só 10 deles mostraram atividade antimicrobiana. A **Tabela 4** mostra estes resultados que sugerem um potencial antimicrobiano de algumas cepas de fungos endofíticos isoladas.

Tabela 4 - Resultados positivos do teste ágar em bloco para os fungos isolados do Ipê

Código do Fungo	Resposta <i>Staphylococcus aureus</i> (cm)	Resposta <i>Escherichia coli</i> (cm)	Resposta <i>Candida albicans</i> (cm)
F15d	3,2
CT22b	1,65
CT22c	1,7
CT22d	1,65	1,85
CT22e	1,67	2,15
CT24a	1,8	1,9
CT24b	1,5	1,5
CT24c	1,5	1,9
CT24d	1,6
CT24e	1,85

Fonte: do autor.

Observa-se um perfil antibacteriano contra patógenos Gram-positivos para todos os casos tabelados e contra leveduras (cepas CT22d, CT22e, CT24a, CT24b e CT24c). Estes resultados poderiam direcionar futuros trabalhos de pesquisa na procura por compostos com atividade antimicrobiana promissora, principalmente, das cepas que inibiram o crescimento tanto do *Staphylococcus aureus* como da *Candida albicans*.

5.2.2 CIM e CMM de extratos brutos e frações. Influência do fracionamento na atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana definida nos testes baseou-se nos critérios de Holetz *et al.* (2002), que estabelecem a ação antimicrobiana (CIM) como forte ($<100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), moderada ($100-500 \mu\text{g.mL}^{-1}$), fraca ($500-1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e inativa ($\geq 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Esses critérios são muito semelhantes aos estabelecidos por Kuete (2010) e ambos são bastante restritivos, o que constituiu um requisito para este trabalho em relação à avaliação da atividade antimicrobiana de extratos brutos, frações e subfrações.

Os extratos Ld-Clo e Ld-AEm apresentaram os melhores valores de CIM e CMM contra patógenos Gram-positivos (**Tabela 5**), diferindo dos extratos brutos Ld-Hex, Ld-AE e Ld-AE⁺, que não mostraram atividade nas concentrações máximas testadas ($\text{CIM} > 400 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Em relação aos testes com levedura, o extrato Ld-AE, juntamente com Ld-Clo e Ld-AEm mostraram valores notáveis de CIM e CMM, destacando-se a atividade contra a *Candida parapsilosis* (**Tabela 5**). Desta forma, o extrato Ld-Clo apresentou a maior atividade antimicrobiana, exibindo um efeito inibitório na faixa de concentração de $25-50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contra *Listeria monocytogenes* e efeito bactericida para esse patógeno e para o *Bacillus cereus* (CMM: $200-400 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Além disso, os valores de CIM para *Candida parapsilosis* foram de $12,5-25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com CMM de $100-200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (**Tabela 5**).

Os patógenos mais sensíveis aos extratos brutos foram *Listeria monocytogenes* e *Candida parapsilosis*, apresentando forte ação inibitória ($\text{CIM} < 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e maior ação bactericida com valores de CMM nas faixas de $200-400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $100-200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Nesse sentido, vislumbra-se um perfil antimicrobiano dos extratos brutos contra bactérias Gram-positivas e leveduras, uma vez que os resultados obtidos para os patógenos Gram-negativos não mostram atividade promissora ($\text{CIM} > 400 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Tabela 5 – Atividade antimicrobiana dos extratos brutos

Patógenos/ Extratos	Teste	Ld-Hex ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Ld-Clo ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Ld-AE ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Ld-AE ⁺ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Ld-AEm ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Antimicrobianos ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
<i>Staphylococcus aureus</i>	CIM	>400	100 -200	>400	>400	200 -400	0,078 -0,156
	CMM	>400	>400	>400	>400	>400	5-10
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CIM	>400	100 -200	>400	>400	200 -400	0,078 -0,156
	CMM	>400	>400	>400	>400	>400	5-10
<i>Bacillus cereus</i>	CIM	>400	100 -200	>400	>400	200 -400	2.5-5
	CMM	>400	200-400	>400	>400	>400	2.5-5
<i>Listeria monocytogenes</i>	CIM	>400	25-50	>400	>400	50-100	0,156-0,312
	CMM	>400	200-400	>400	>400	>400	>10
<i>Candida albicans</i>	CIM	200-400	100-200	200-400	200-400	200-400	3,125-6,25
	CMM	>400	>400	>400	>400	>400	20-40
<i>Candida tropicalis</i>	CIM	>400	50-100	100-200	200-400	200-400	3,125-6,25
	CMM	>400	>400	200-400	>400	>400	10-20
<i>Candida parapsilosis</i>	CIM	100-200	12.5-25	50-100	100-200	25-50	3,125-6,25
	CMM	>400	100-200	200-400	>400	>400	20-40
<i>Escherichia coli</i>	CIM	>400	>400	>400	>400	>400	0,156 -0,312
	CMM	>400	>400	>400	>400	>400	5-10
<i>Salmonella typhimurium</i>	CIM	>400	>400	>400	>400	>400	0,312 -0,624
	CMM	>400	>400	>400	>400	>400	>10

Fonte: do autor.

Finalmente, levando-se em consideração as variadas formas de se obter os extratos brutos, esses resultados sugerem que durante o cultivo do endófito *Lasiodiplodia* sp. diversos metabólitos secundários antimicrobianos de natureza polar moderada (extratos brutos obtidos a partir de acetato de etila) e apolar (extratos brutos obtidos a partir de clorofórmio) foram produzidos. Por outro lado, a atividade antimicrobiana observada para estes extratos derivados da fermentação do fungo *Lasiodiplodia* sp. é coerente com os resultados apresentados por outros autores. Wei *et al.* (2014) isolaram a lasiodiplodina E (61) de *Lasiodiplodia pseudotheobromae* e testaram sua atividade antibacteriana contra *Streptococcus* sp., *Bacteroides vulgatus*,

Peptostreptococcus sp. e cepas clínicas de *Veillonella parvula*, os autores obtiveram potentes efeitos antibióticos (CIM: 0,12-0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Umeokoli *et al.* (2018) também isolaram uma lasiodiplodina ((+)-(R)-de-O-metil-lasiodiplodina (**43**)) do endófito *Lasiodiplodia theobromae* com atividade antibacteriana (CIM: 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecium*.

Tabela 6 - Atividade antimicrobiana das frações obtidas a partir dos extratos brutos
(continua)

Amostras	<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Candida albicans</i>	
	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CMM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CMM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Ld-Clo	25-50	200-400	100-200	>400
LdClo-A	>400	>400	>400	>400
LdClo-B	>400	>400	100-200	200-400
LdClo-C	25-50	25-50	50-100	100-200
LdClo-D	50-100	200-400	200-400	200-400
LdClo-E	>400	>400	>400	>400
LdClo-F	>400	>400	200-400	200-400
LdClo-G	>400	>400	>400	>400
LdClo-H	1,562-3,125	>400	>400	>400
Ld-AEm	50-100	>400	200-400	>400
LdAEm-1	>400	>400	200-400	>400
LdAEm-2	>400	>400	>400	>400
LdAEm-3	>400	>400	25-50	50-100
LdAEm-4	>400	>400	200-400	>400
LdAEm-5	>400	>400	>400	>400
LdAEm-6	200-400	>400	>400	>400
LdAEm-7	12,5-25	>400	25-50	>400
LdAEm-8	6,250-12,5	>400	12,5-25	100-200
LdAEm-9	100-200	200-400	200-400	>400

Tabela 6 - Atividade antimicrobiana das frações obtidas a partir dos extratos brutos
(conclusão)

Amostras	<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Candida albicans</i>	
	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CMM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CMM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Ld-AE	>400	>400	200-400	>400
LdAE-1	200-400	>400	>400	>400
LdAE-2	200-400	>400	>400	>400
LdAE-3	200-400	>400	100-200	100-200
LdAE-4	>400	>400	>400	>400
LdAE-5	200-400	>400	>400	>400
LdAE-6	200-400	>400	200-400	200-400
LdAE-7	200-400	>400	200-400	200-400
LdAE-8	>400	>400	>400	>400
LdAE-9	>400	>400	200-400	200-400
LdAE-10	200-400	>400	200-400	200-400
Ld-AE⁺	>400	>400	200-400	>400
LdAE ⁺ -1	>400	>400	>400	>400
LdAE ⁺ -2	200-400	>400	50-100	50-100
LdAE ⁺ -3	200-400	>400	50-100	200-400
LdAE ⁺ -4	>400	>400	>400	>400
LdAE ⁺ -5	>400	>400	>400	>400
LdAE ⁺ -6	>400	>400	>400	>400
LdAE ⁺ -7	>400	>400	>400	>400
LdAE ⁺ -8	>400	>400	>400	>400
LdAE ⁺ -9	>400	>400	>400	>400
LdAE ⁺ -10	>400	>400	>400	>400
Amoxicillina	0,078- 0,156	0,312- 0,625	--	--
Fluconazol	--	--	0,312- 0,625	20-40

Fonte: do autor.

A avaliação da atividade antimicrobiana das frações (**Tabela 6**) mostrou claramente um aumento na atividade, gerando resultados superiores de CIM e CMM, quando comparados aos obtidos para os extratos brutos frente aos patógenos *Listeria monocytogenes* e *Candida albicans*.

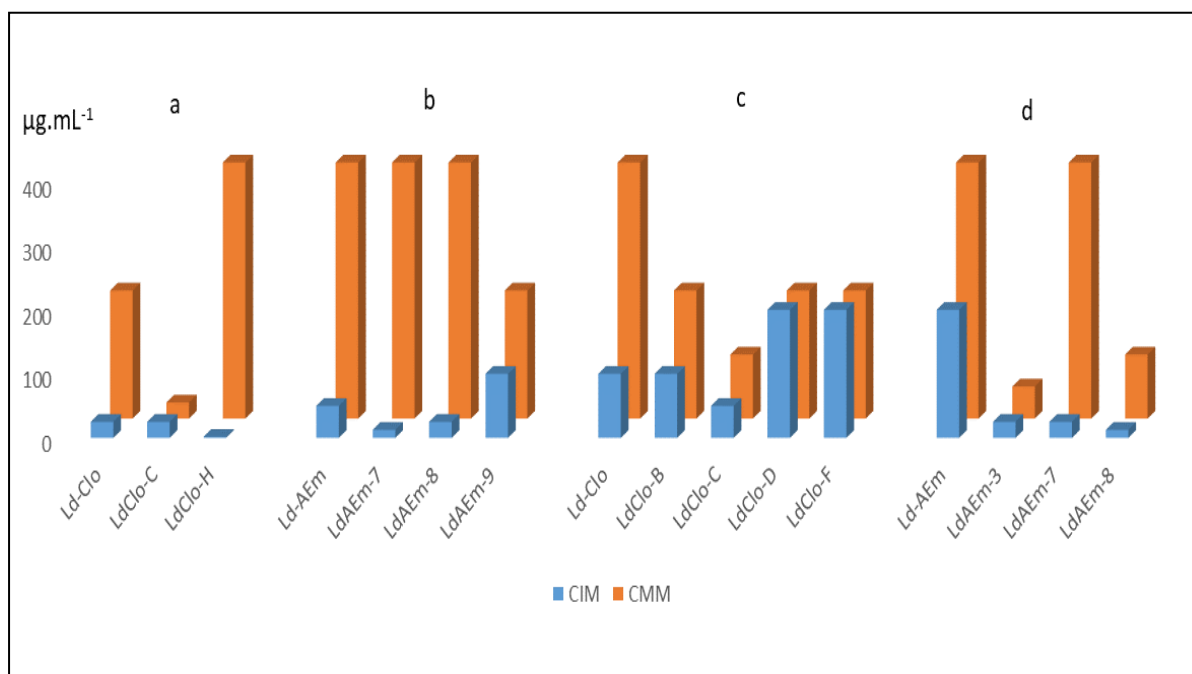
As **Figuras 9 e 10** representam a atividade antimicrobiana das frações que apresentaram os efeitos mais potentes em comparação com os extratos brutos para os testes de CIM e CMM. Para representar graficamente as faixas de CIM e CMM, foi estabelecida a seguinte escala a ser plotada no eixo Y: 0,781 = (0,781-1,562 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); 1,556 = (1,556-3,125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); 3,125 = (3,125-6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); 6,25 = (6,25-12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); 12,5 = (12,5-25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); 25 = (25-50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); 50 = (50-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); 100 = (100-200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); 200 = (200-400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e 400 = (> 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

A fração LdClo-H (CIM: 1,562-3,125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) exibiu uma inibição maior quando comparada ao extrato bruto Ld-Clo (CIM: 25-50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) contra *Listeria monocytogenes* (**Figura 9a**). Além disso, o efeito bactericida da fração LdClo-C (CMM: 25-50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi maior do que a CMM do extrato bruto Ld-Clo (200-400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). LdClo-C e Ld-Clo apresentaram forte inibição (CIM: 25-50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Algumas frações obtidas do extrato bruto Ld-AEm (**Figura 9b**) também causaram um aumento no grau de inibição contra *Listeria monocytogenes*. Nesse sentido, destacam-se as diferenças entre a inibição do extrato bruto (CIM: 50-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e das frações LdAEm-7 (CIM: 12,5-25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e LdAEm-8 (CIM: 6,25-12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), por outro lado a fração LdEAm-9 foi capaz de desenvolver um efeito bactericida (CMM: 200-400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), sendo mais efetiva para este patógeno.

A fração LdClo-C (CIM: 50-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) também superou a inibição contra *Candida albicans* produzida por Ld-Clo (CIM: 100-200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e apresentou efeito fungicida (CMM: 100-200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) que não foi observado para o extrato bruto. As frações LdClo-B, LdClo-D e LdClo-F também mostraram efeito fungicida em uma faixa de CMM de 200-400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (**Figura 9c**). Além disso, as frações LdAEm-7 (CIM: 25-50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e LdAEm-8 (CIM: 12,5-25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentaram uma inibição mais forte em comparação com o extrato bruto Ld-AEm (CIM: 200-400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Nesse caso, a fração LdAEm-3 (CIM: 25-50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e CMM: 50-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi a mais eficaz contra *Candida albicans* (**Figura 9d**).

Figura 9 - Comparação da atividade antimicrobiana entre os extratos brutos Ld-Clo, Ld-AEm e suas frações: **a)** e **b)** atividade contra *Listeria monocytogenes*, **c)** e **d)** atividade contra *Candida albicans*

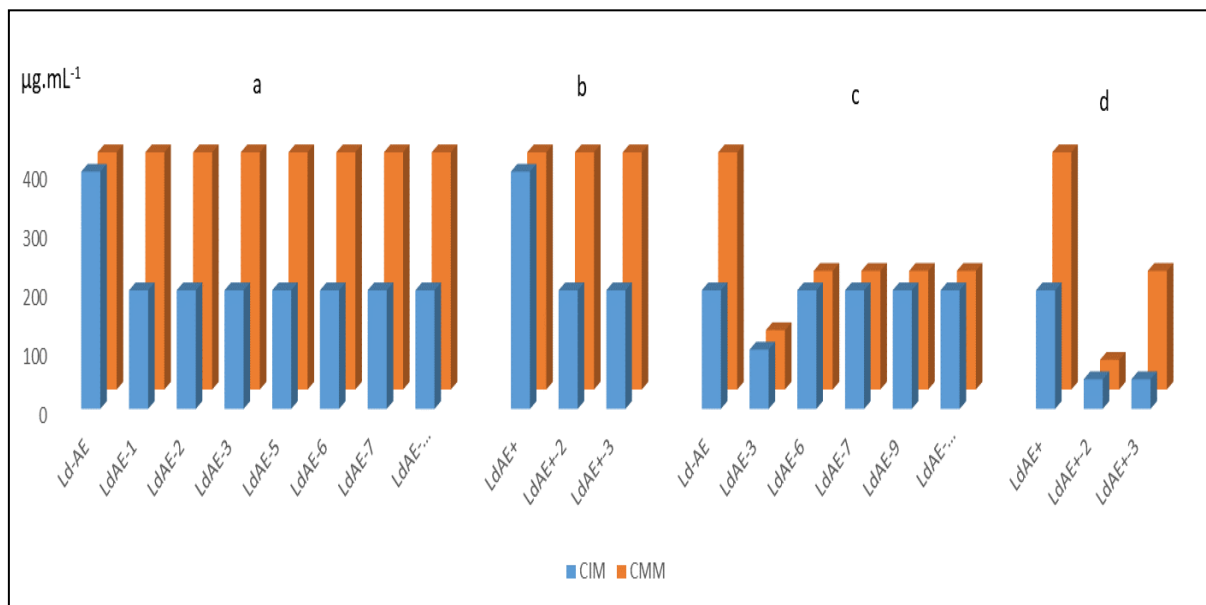


Fonte: do autor.

Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima, CMM: Concentração Microbicida Mínima

O efeito do fracionamento foi muito significativo para os extratos brutos Ld-AE e Ld-AE⁺ e foi particularmente relevante para as frações derivadas de Ld-AE, porque 7 das 10 frações testadas produziram uma inibição moderada contra *Listeria monocytogenes* (**Figura 10a**) e 5 frações mostraram uma inibição moderada (acompanhada de um efeito fungicida) contra *Candida albicans* (**Figura 10c**). Em relação às frações derivadas do extrato bruto Ld-AE⁺, apenas LdAE⁺-2 e LdAE⁺-3 apresentaram inibição moderada (CIM: 200-400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) frente a *Listeria monocytogenes* (**Figura 10b**), mas contra *Candida albicans* (**Figura 10d**) estas frações apresentaram forte inibição do crescimento (CIM < 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e ambas apresentaram efeito fungicida (CMM: 50-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e CMM: 200-400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente).

Figura 10 - Comparação da atividade antimicrobiana entre os extratos brutos Ld-AE, Ld-AE⁺ e suas frações: a) e b) atividade contra *Listeria monocytogenes*, c) e d) atividade contra *Candida albicans*



Fonte: do autor.

Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima, CMM: Concentração Microbicida Mínima

Como referido anteriormente, as subfrações que apresentaram uma atividade antimicrobiana maior (LdAE-3, LdAE⁺-2, LdAE⁺-3, LdAEm-3 e LdAEm68) foram também submetidas a um processo de fracionamento para serem testadas quanto à atividade contra *Listeria monocytogenes* e *Candida albicans* (**Tabelas 7 e 8**).

Tabela 7 - Atividade antimicrobiana das subfrações obtidas a partir das frações LdAE-3, LdAE⁺-2, LdAE⁺-3

(continua)

Amostras	<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Candida albicans</i>	
	CIM ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	CMM ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	CIM ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	CMM ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
LdAE-3	200-400	>400	100-200	100-200
AE3-A	>400	>400	>400	>400
AE3-B	>400	>400	>400	>400
AE3-C	>400	>400	>400	>400
AE3-D	>400	>400	>400	>400
AE3-E	>400	>400	>400	>400
AE3-F	>400	>400	>400	>400
AE3-G	>400	>400	>400	>400
AE3-H	200-400	>400	>400	>400
AE3-I	>400	>400	>400	>400
LdAE⁺-2	200-400	>400	50-100	50-100
AE ⁺ -2-A	200-400	>400	>400	>400
AE ⁺ -2-B	200-400	200-400	6,25-12,5	6,25-12,5
AE ⁺ -2-C	>400	>400	100-200	100-200
AE ⁺ -2-D	200-400	200-400	>400	>400
AE ⁺ -2-E	>400	>400	>400	>400
AE ⁺ -2-F	>400	>400	>400	>400
AE ⁺ -2-G	>400	>400	>400	>400

Tabela 7 - Atividade antimicrobiana das subfrações obtidas a partir das frações LdAE-3, LdAE⁺-2, LdAE⁺-3

(conclusão)

Amostras	<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Candida albicans</i>	
	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CMM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CMM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
LdAE⁺-3	200-400	>400	50-100	200-400
AE ⁺ -3-A	>400	>400	6,25-12,5	100-200
AE ⁺ -3-B	>400	>400	12,5-25	100-200
AE ⁺ -3-C	>400	>400	100-200	100-200
AE ⁺ -3-D	>400	>400	>400	>400
AE ⁺ -3-E	>400	>400	>400	>400
AE ⁺ -3-F	>400	>400	>400	>400
AE ⁺ -3-G	>400	>400	>400	>400
AE ⁺ -3-H	>400	>400	>400	>400
Amoxicillina	0,078-0,156	0,312-0,625	--	--
Fluconazol	--	--	0,625-1,25	20-40

Fonte: do autor.

Tabela 8 - Atividade antimicrobiana das subfrações obtidas a partir das frações LdAEm-3, LdAEm-68

Amostras	<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Candida albicans</i>	
	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CMM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CMM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
LdAEm-3	>400	>400	25-50	50-100
AEm3-A	200-400	>400	12,5-25	12,5-25
AEm3-B	>400	>400	100-200	200-400
AEm3-C	>400	>400	200-400	>400
AEm3-D	>400	>400	>400	>400
AEm3-E	>400	>400	>400	>400
AEm3-F	>400	>400	>400	>400
AEm3-G	>400	>400	>400	>400
LdAEm-68	6,250-12,5	>400	12,5-25	100-200
AEm68-A	12,5-25	25-50	12,5-25	25-50
AEm68-B	>400	>400	>400	>400
AEm68-C	200-400	>400	200-400	>400
AEm68-D	>400	>400	>400	>400
AEm68-E	100-200	100-200	200-400	200-400
AEm68-F	25-50	50-100	100-200	100-200
AEm68-G	100-200	200-400	200-400	200-400
AEm68-H	100-200	200-400	200-400	>400
AEm68-I	200-400	200-400	200-400	200-400
AEm68-J	200-400	>400	200-400	200-400
AEm68-K	>400	>400	>400	>400
Amoxiciclina	0,312-0,625	0,156-0,312	--	--
Fluconazol	--	--	0,312-0,625	20-40

Fonte: do autor.

A **Figura 11** apresenta resumidamente uma comparação quanto à atividade antibiótica entre frações e subfrações de acordo com os resultados mostrados nas **Tabelas 7 e 8**. A representação gráfica das faixas de CIM e CMM foi realizada da mesma forma como foi feito para as **Figuras 9 e 10**.

A análise das **Tabelas 7 e 8** e da **Figura 11** mostra que nem sempre o processo de fracionamento das frações é eficaz para a melhora da atividade antimicrobiana. No caso dos gráficos A, B e C (**Figura 11**) os valores de CIM e CMM das subfrações frente à *Listeria monocytogenes* foram iguais ou maiores (atividade menor) aos mostrados pelas frações LdAE-3, LdAE⁺-2 e LdAE⁺-3, com exceção da subfração AE⁺2-B (**Figura 11** - gráfico B) que mostrou efeito fungicida (CMM: 200-400 µg.mL⁻¹) se diferenciando do efeito fungistático obtido para a fração LdAE⁺-2 (CMM: >400 µg.mL⁻¹).

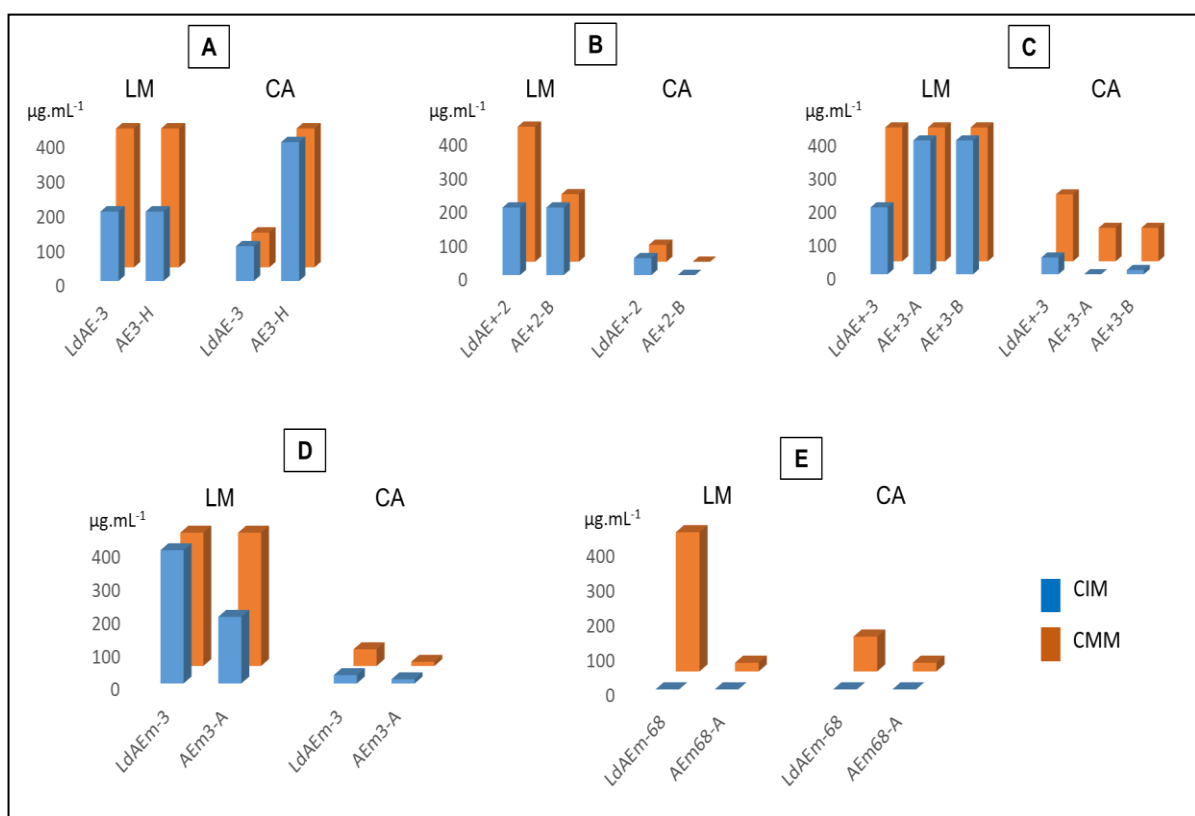
Também a respeito da atividade contra a *Listeria monocytogenes*, destacam-se as subfrações AEm3-A e AEm68-A (**Figura 11** - gráficos D e E) que mostraram valores importantes: AEm3-A (CIM: 200-400 µg.mL⁻¹) apresentou uma maior inibição do patógeno com relação à fração LdAEm-3 (>400 µg.mL⁻¹), enquanto que AEm68-A (CIM: 12,5-25 µg.mL⁻¹ e CMM: 25-50 µg.mL⁻¹) apresentou uma inibição forte e efeito bactericida, superiores aos apresentados pela fração LdAEm-68 (CIM: 6,250-12.5 µg.mL⁻¹ e CMM: >400 µg.mL⁻¹).

Ao se avaliar a atividade antifúngica frente a *Candida albicans* foi possível notar uma melhora apreciável da atividade após a etapa de fracionamento, como mostra a **Figura 11**, gráficos B-E.

- a) Gráfico B: a subfração AE⁺2-B (CIM: 6,25-12,5 µg.mL⁻¹ e CMM: 6,25-12,5 µg.mL⁻¹) superou à fração LdAE⁺-2 (CIM: 50-100 µg.mL⁻¹ e CMM: 50-100 µg.mL⁻¹);
- b) Gráfico C: as subfrações AE⁺3-A (CIM: 6,25-12,5 µg.mL⁻¹ e CMM: 100-200 µg.mL⁻¹) e AE⁺3-B (CIM: 12,5-25 µg.mL⁻¹ e CMM: 100-200 µg.mL⁻¹) superaram à fração LdAE⁺-3 (CIM: 50-100 µg.mL⁻¹ e CMM: 200-400 µg.mL⁻¹).

- c) Gráfico D: a subfração AEm3-A (CIM: 12,5-25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e CMM: 12,5-25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) superou à fração LdAEm-3 (CIM: 25-50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e CMM: 50-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).
- d) Gráfico E: a subfração AEm68-A (CIM: 12,5-25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e CMM: 12,5-25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) superou à fração LdAEm-68 (CIM: 12,5-25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e CMM: 100-200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) quanto ao efeito fungicida.
- e) No gráfico A não se observou uma melhora da atividade antifúngica das subfrações frente a *Candida albicans*.

Figura 11 - Comparação da atividade antimicrobiana entre as frações selecionadas e as subfrações mais bioativas: A) fração LdAE-3 e subfrações, B) fração LdAE⁺-2 e subfrações, C) fração LdAE⁺-3 e subfrações, D) fração LdAEm-3 e subfrações e E) fração LdAEm-68 e subfrações



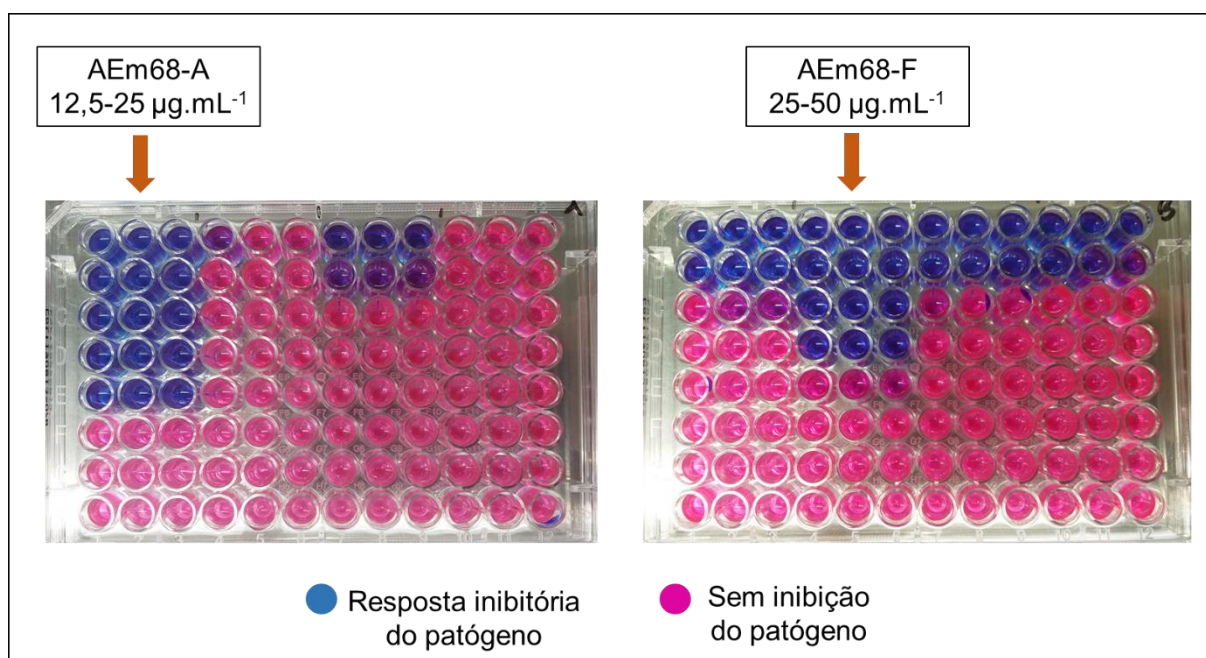
Fonte: do autor.

Legenda: LM: *Listeria monocytogenes*; CA: *Candida albicans*; CIM: Concentração inibitória mínima; CMM: Concentração microbicida mínima.

Independentemente dos aspectos comparativos acima descritos, vale destacar que a atividade antimicrobiana foi mantida durante os processos de fracionamento e que as subfrações obtidas a partir da fração AEm-68 mostraram melhores resultados de atividade antimicrobiana contra os patógenos usados nos testes. Das 11 subfrações testadas só três delas não mostraram atividade a concentrações menores de $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$, indicando a presença de substâncias bioativas nas subfrações.

A **Figura 12**, mostra uma fotografia com as respostas, em destaque, observadas para duas das subfrações (AEm68-A e AEm68-F) obtidas a partir de AEm-68, quando testadas, em triplicata, para determinar a CIM frente à bactéria *Listeria monocytogenes*. (**Tabela 8**).

Figura 12 – Fotografia de placas de cultura de 96 poços revelados com resazurina, para a avaliação da atividade contra *Listeria monocytogenes*, em destaque as subfrações AEm68-A e AEm68-F



Fonte: do autor.

Em relação à influência do fracionamento de extratos e frações, na atividade biológica, alguns autores descrevem resultados interessantes. Por exemplo, Etame *et al.* (2018, 2019) afirmaram que o aumento da concentração de compostos bioativos devido ao fracionamento causa uma melhora na bioatividade das frações, quando comparado aos extratos brutos. Isto foi evidenciado durante o fracionamento de todos

os extratos brutos e de algumas frações em relação à sua atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* (LdAE⁺-2, LdAEm-3 e LdAEm-68) e *Candida albicans* (LdAE⁺-2, LdAE⁺-3, LdAEm-3 e LdAEm-68).

Por outro lado, Voukeng *et al.* (2017) relataram o aumento da atividade antimicrobiana em alguns extratos devido ao efeito sinérgico estabelecido entre os compostos, o que também pode ser considerado neste trabalho, uma vez que algumas subfrações mostraram níveis inferiores de atividade antimicrobiana em comparação aos exibidos pelas frações correspondentes (**Figura-12**). Aparentemente, possui limites ótimos para que estas combinações de compostos possam mostrar um efeito sinérgico com relação a uma atividade biológica específica (GOMEZ *et al.*, 2021a), o que também foi evidenciado durante a purificação de algumas das frações (LdAE-3, LdAE⁺-2, LdAE⁺-3, LdAEm-3, LdAEm-68).

O patógeno mais susceptível foi a *Candida albicans*, que foi inibida por várias frações e subfrações quando comparada com a *Listeria monocytogenes* (**Tabelas 6-8**). Este é um resultado muito importante, uma vez que as espécies de *Candida* foram consideradas pela Rede Nacional de Segurança em Saúde dos EUA como o quarto grupo mais comum de patógenos em todos os tipos de infecções relacionadas à saúde e o segundo mais comum das infecções do trato urinário associadas ao cateter (WEINER *et al.*, 2016). Além disso, nota-se um aumento da resistência aos medicamentos da classe dos azóis, usados de forma profilática durante tratamentos prolongados com antibióticos, esteróides e quimioterapia, sendo bastante preocupante uma vez que os azóis são antifúngicos preferidos devido seu baixo custo, toxicidade limitada e possibilidade de serem administrados por via oral (PAUL *et al.*, 2019).

Em estudos de prevalência de candidemia (candidíase hematogênica), a levedura *Candida albicans* é considerada o agente mais frequente dessa infecção. No entanto, há consenso sobre o aumento da participação de infecções invasivas causadas por *Candida* não-*albicans* (CNA). Nesse cenário, os países da América do Norte e do norte da Europa geralmente apresentam *Candida glabrata*, como o principal patógeno entre as CNAs (PFALLER *et al.*, 2014). Por outro lado, na América Latina, incluindo Brasil e Ásia, há predominância de *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* (COLOMBO *et al.*, 2006; HINRICHSEN *et al.*, 2008; PFALLER *et al.*, 2014;

PINHATI *et al.*, 2016).

Nesse sentido, Pinhati *et al.*, (2016) descreveram pela primeira vez no Brasil um surto de candidemia causada por cepas de *Candida parapsilosis* resistentes ao fluconazol em pacientes internados na UTI. Eles registraram uma taxa de mortalidade de 42,9%, particularmente alta para esse tipo de patógeno, o que contradiz o consenso atual estabelecido por outros estudos que afirmam a maior taxa de mortalidade por infecções por *Candida albicans* e *Candida tropicalis* (PFALLER *et al.*, 2014).

Outros dados de grande interesse foram fornecidos pelos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, nas siglas em Inglês), por meio de seu relatório sobre as ameaças de resistência a antibióticos nos Estados Unidos, onde espécies resistentes de *Candida* foram classificadas entre as Ameaças Graves. Atenção especial foi dedicada à *Candida auris*, incluída entre os patógenos de Ameaça Urgente. O *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina, foi outro patógeno relatado como uma Ameaça Grave (CDC, 2019).

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, destaca-se o potencial antibacteriano promissor contra a bactéria *Listeria monocytogenes* uma vez que este patógeno é a principal causa de doenças em humanos, transmitidas por alimentos (SHAMLOO *et al.*, 2019). Embora a maioria dos indivíduos imunocompetentes supere o ataque inicial e elimine a bactéria pelas fezes, pessoas sensíveis ao microrganismo, incluindo os imunocomprometidos, neonatos, gestantes e idosos, podem ser afetadas pela forma agressiva da doença (BILLE *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Em estudos recentes realizados no Brasil, foi detectada a presença da *L. monocytogenes* em alguns alimentos altamente consumidos: Rodrigues *et al.* (2018) analisaram amostras de salsichas produzidas por empresas registradas no Serviço de Inspeção Federal e detectaram o patógeno em 8% das amostras. Nesse trabalho foi demonstrado que a contaminação ocorreu após o tratamento térmico e antes da embalagem das salsichas em algumas destas indústrias. Além disso, Iglesias *et al.* (2017) isolaram a *L. monocytogenes* de amostras de carcaças bovinas (6%), selecionadas em quatro etapas do processo de abate e demonstraram que uma das

cepas isoladas apresentou resistência contra vários antimicrobianos frequentemente usados na terapêutica de forma geral (kanamicina, gentamicina, eritromicina, sulfonamidas).

A descoberta de novas opções para o tratamento de infecções causadas por estas bactérias e leveduras é uma prioridade atual em muitos países e este trabalho mostra um potencial antibacteriano e antifúngico viável para os extratos brutos, frações e subfrações testadas. Estes resultados indicam potencialidades concretas do endófito *Lasioidilpodia* sp. em produzir metabólitos secundários com importância terapêutica.

5.3 ANÁLISE DE FRAÇÕES E SUBFRAÇÕES ATRAVÉS DE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROSCÓPICAS

5.3.1 Processamento das frações obtidas do extrato bruto Ld-Clo através de CG-EM

As frações de Ld-Clo foram analisadas por CG-EM. Os resultados são apresentados na **Tabela 9**. Os compostos apresentados cumprem com o critério de possuir uma porcentagem de similaridade (SI) maior ou igual que 90% com relação aos espectros de massas da base de dados NIST.

Através da análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) foram detectadas algumas substâncias com atividade antimicrobiana conhecida (**Figura 13**), que apresentaram alta porcentagem de similaridade e, em alguns casos, uma porcentagem da área do pico aceitável quando comparados aos demais compostos presentes em cada amostra. Isto poderia justificar, em parte, a atividade antimicrobiana encontrada para essas frações, principalmente para LdClo-C, LdClo-D e LdClo-H (**Tabela 8**). A fração LdClo-H foi ativa apenas contra *Listeria monocytogenes*, indicando seletividade contra esse patógeno Gram-positivo e mostrando uma alta atividade antibacteriana.

As frações LdClo-A, LdClo-B, LdClo-E e LdClo-G também apresentaram os compostos acima (**Tabela 9**), mas provavelmente a presença de outros compostos, que poderiam estar atuando de forma antagônica, com o antimicrobiano, resultou em valores de CIM e CMM mais discretos ou nulos.

Tabela 9 - Compostos detectados por CG-EM nas frações obtidas a partir do extrato bruto Ld-Clo

(continua)

Frações	Composto	% área do pico / SI	Fórmula molecular	Tempo de retenção (min)
LdClo-A	(6Z)-3,7,11-Trimetildodeca-1,6,10-trien-3-ol.	0,13 / 90%	C ₁₅ H ₂₆ O	9,161
	Pentadecano.	0,16 / 95%	C ₁₅ H ₃₂	9,357
	4,6-dimetildodecano.	0,16 / 90%	C ₁₄ H ₃₀	10,268
	Octadecano.	0,14 / 95%	C ₂₀ H ₄₂	10,932
	2,6,10,14-Tetrametilheptadecano.	0,80 / 92%	C ₂₁ H ₄₄	13,474
	(Z)-docos-13-enamida.	4,01 / 93%	C ₂₂ H ₄₃ NO	20,477
LdClo-B	4,6-dimetildodecano.	0,20 / 93%	C ₁₄ H ₃₀	8,606
	Hexadecano.	0,13 / 94%	C ₁₆ H ₃₄	9,356
	Tetradecanal.	0,17 / 90%	C ₁₄ H ₂₈ O	12,841
	(Z)-octadec-9-enamida.	2,30 / 91%	C ₁₈ H ₃₅ NO	20,470
LdClo-C	(Z)-docos-13-enamida.	5,30 / 94%	C ₂₂ H ₄₃ NO	20,469
LdClo-D	Metil (Z)-octadec-9-enoato.	0,48 / 95%	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	13,520
	(Z)-docos-13-enamida.	1,71 / 94%	C ₂₂ H ₄₃ NO	20,465
LdClo-E	2-pentyl-2,3-dihidropiran-6-ona.	0,05 / 90%	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	6,955
	(3,3,5-trimetilciclohexil) 2-Hidroxibenzoato.	0,02 / 93%	C ₁₆ H ₂₂ O ₃	11,938
	Octadecanal.	0,03 / 91%	C ₁₈ H ₃₆ O	12,824
	1-etenooctadecano.	0,05 / 91%	C ₂₀ H ₄₀ O	13,456
	Dodecanamida.	0,09 / 90%	C ₁₂ H ₂₅ NO	14,216
	(Z)-docos-13-enamida.	6,29 / 92%	C ₂₂ H ₄₃ NO	20,444

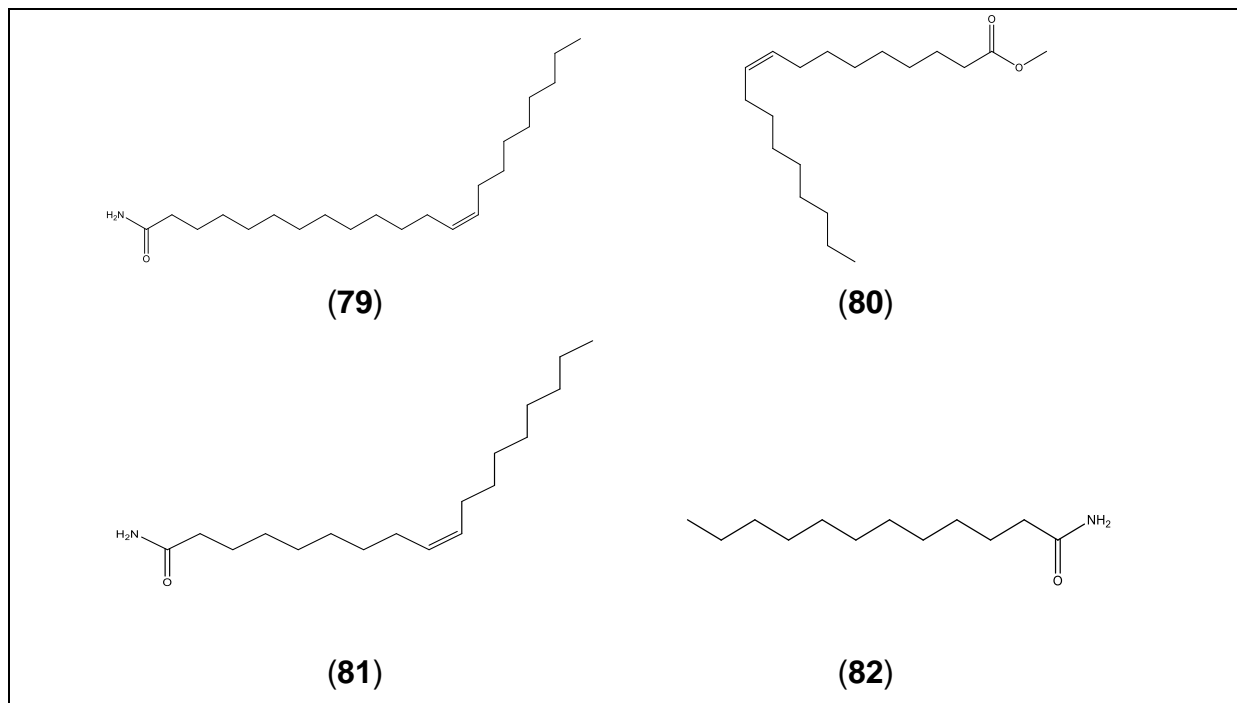
Tabela 9 - Compostos detectados por CG-EM nas frações obtidas a partir do extrato bruto Ld-Clo

(conclusão)

Frações	Composto	% área do pico / SI	Fórmula molecular	Tempo de retenção (min)
LdClo-F	(3,3,5-trimetilciclohexil) 2-hidroxi benzoato.	0,84 / 92%	C ₁₆ H ₂₂ O ₃	11,940
	Octadecanal.	0,19 / 92%	C ₁₈ H ₃₆ O	12,826
	Metil (Z)-octadec-9-enoato.	2,75 / 96%	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	13,509
	(Z)-docos-13-enamida.	17,53/92%	C ₂₂ H ₄₃ NO	20,451
	2,6,10,14,18,22-tetracosahexaene.	2,63 / 90%	C ₃₀ H ₅₀	21,232
LdClo-G	Metil hexadecanoato.	0,21 / 91%	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	11,975
	Metil (Z)-octadec-9-enoato	1,04 / 97%	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	13,512
	(Z)-docos-13-enamida.	1,97 / 90%	C ₂₂ H ₄₃ NO	20,457
LdClo-H	Homomentil salicilato.	0,19 / 93%	C ₁₆ H ₂₂ O ₃	11,943
	(Z)-docos-13-enamida.	3,95 / 94%	C ₂₂ H ₄₃ NO	20,458

Fonte: do autor.

Figura 13 - Compostos identificados por CG-EM nas frações do extrato bruto Ld-Clo com atividade antimicrobiana conhecida



Fonte: do autor.

O efeito antimicrobiano da (Z) -docos-13-enamida **(79)**, um dos constituintes detectados mais abundantes nas frações estudadas, também conhecida como erucamida, foi estudado por Adnam *et al.* (2019). Esses autores detectaram a formação de ligações de hidrogênio entre a erucamida e resíduos de aminoácidos da tubulina e glucosamina-6-P sintetase, o que poderia explicar suas ações anti-helmínticas e antibacterianas, respectivamente. Em outros estudos, foi atribuída atividade antibacteriana (MIC: 0,125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), antifúngica (MIC: 3,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e nematicida ao metil (Z) -octadec-9-enoato **(80)** (ALI *et al.*, 2017; CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2011) e atividade antibacteriana ao (Z)-octadec-9-enamida **(81)** (HUSSEIN *et al.*, 2016). Por outro lado, a dodecanamida **(82)** e alguns de seus derivados foram isolados de organismos marinhos e apresentam uma importante atividade antibacteriana (MIC: 0,11 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e antifúngica (MIC: 0,22 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (ABDALHA; MEKAWAY, 2013; JAYALAKSHMI *et al.*, 2018; MOJID; JAE, 2014).

Uma grande limitação da análise realizada para estas frações por CG-EM, se relaciona com a presença de outros compostos nas frações estudadas que também apresentaram uma alta porcentagem (inclusive maior do que os compostos identificados), mas que não foram identificados com base na comparação dos seus espectros de massas com os de compostos conhecidos presentes na base de dados NIST (**Tabela 10**). Estes fatos, poderiam indicar que o grau de atividade antimicrobiana observada para as frações derivadas do extrato Ld-Clo não se associa exclusivamente à presença dos compostos identificados e destacados na **Figura 13**.

Tabela 10 – Compostos não identificados por CG-MS nas frações derivadas do extrato Ld-Clo que apresentaram valores importantes de porcentagem da área do pico

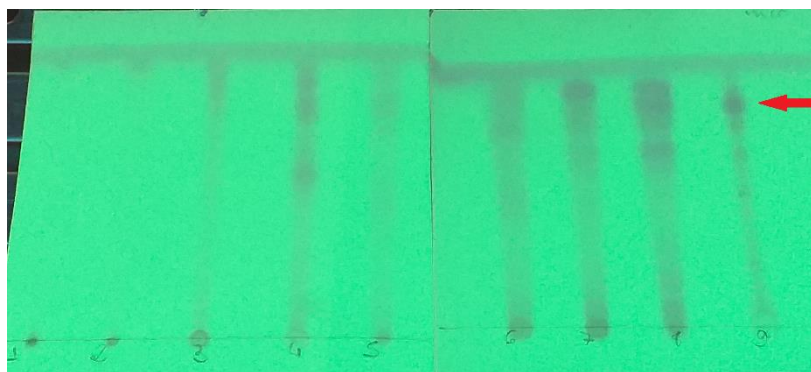
Fração	Tempo de retenção (min)	% área do pico	Fração	Tempo de retenção (min)	% área do pico
LdClo-A	31,391	3,35	LdClo-E	18,700	3,27
	35,748	7,13		20,065	3,33
LdClo-B	15,673	8,25		20,772	3,42
	15,807	5,10	LdClo-G	17,683	3,04
	16,011	7,02		19,630	3,42
LdClo-C	16,783	3,83	LdClo-H	16,016	3,21
	17,158	3,13		17,169	5,58
	17,242	4,84			
LdClo-D	15,999	3,75			

Fonte: do autor.

5.3.2 Purificação da fração LdAEm-9 por CLAE e elucidação estrutural do composto isolado por RMN

Considerando-se a atividade antimicrobiana exibida pela fração LdAEm-9 e seu perfil cromatográfico observado em CCD, aparentando apresentar uma substância majoritária observada sob a luz UV em 254 nm (**Figura 14**), submeteu-se a referida fração a uma etapa de purificação por CLAE que permitiu o isolamento e a identificação de um composto natural conhecido.

Figura 14 – Fotografia da CCD obtida para as frações do extrato bruto Ld-AEm. Revelado sob a luz UV em 245 nm. Eluição: acetato de etila:metanol (9:1, v:v)



Fonte: do autor.

A seta na **Figura 14** indica o possível composto majoritário presente nesta fração LdEAm-9, a qual foi submetida a um fracionamento por CLAE se obtendo as subfrações AEm9-(A-D). A análise dos espectros de RMN 1D e 2D (**Apendice B**) adquiridos para a subfração AEm9-C (2,2 mg) permitiu a identificação do ácido 3-indol carboxílico (**70**), além de serem comparados aos dados da literatura como apresentado na tabela abaixo (**Tabela 11**).

Tabela 11 – Deslocamentos químicos δ (ppm) e constantes de acoplamento J (Hz) para o ácido indol-3-carboxílico em CD₃OD, 7,05 T a 25 °C

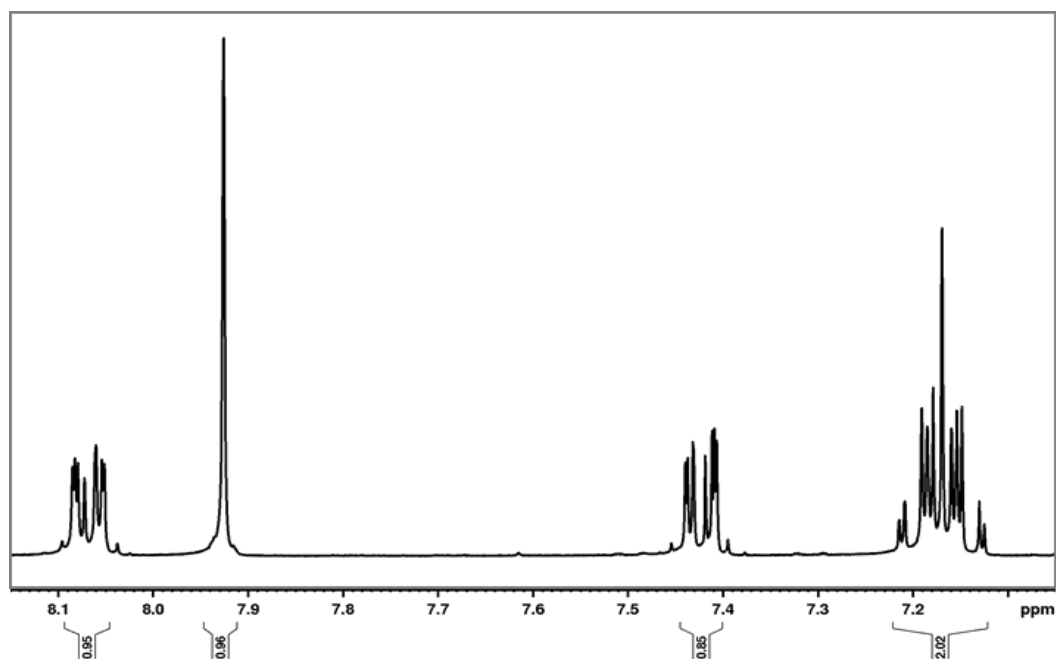
No.	¹ H	¹³ C	¹³ C (SUN <i>et al.</i> , 2014)	HMBC	COSY
1-NH	n.o.
2	7,95 (s; 1H)	131,8	133,5	107,8; 126,1; 136,8; 168,1
3	107,8	109,1
3a	126,1	127,6
4	8,06 (m; 1H)	120,6	122,1	107,8; 122,0 136,8	H5; H7
5, 6	7,21-7,12 (m; 2H)	122,0; 121,1	123,3; 122,6	111,3; 126,1 120,6; 136,8;	H4; H7
7	7,42 (m; 1H)	111,3	112,9	121,1	H4; H6
7a	136,8	138,3
8	168,1	168,3

Fonte: do autor.

Legenda: n.o.: Não observado

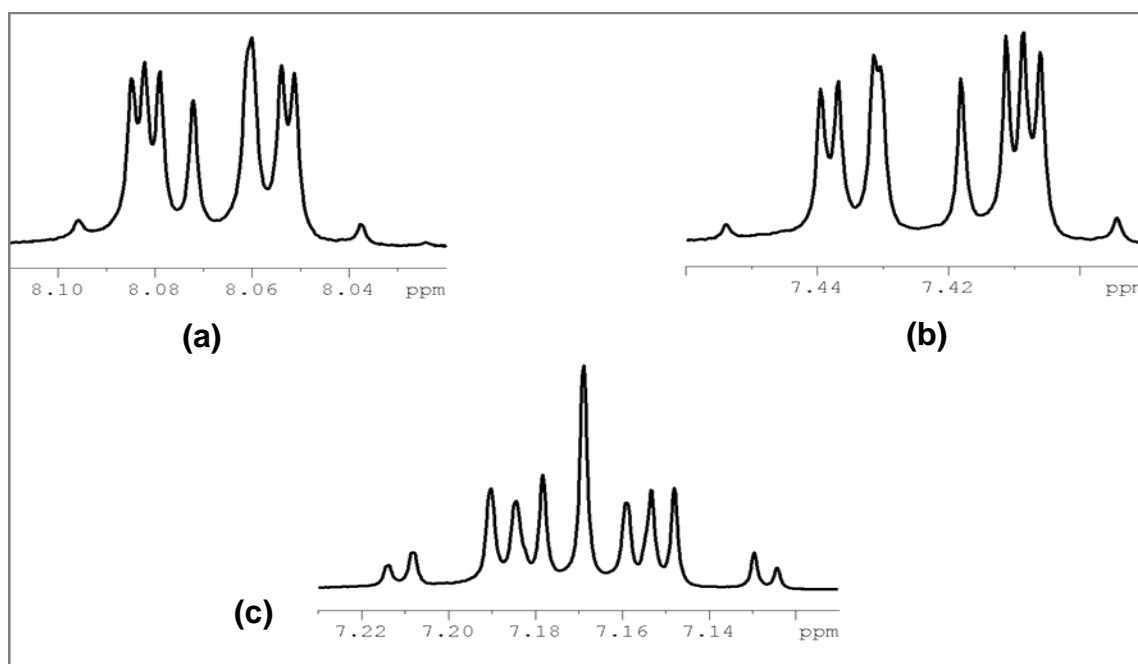
Segundo os dados espectrais, foram observados sinais de hidrogênios com multiplicidades complexas (**Figuras 15 e 16**) em δ 7,21-7,12 (m) integrando para dois hidrogênios e em δ 7,42 (m), 7,95 (s) e 8,06 (m) cada um integrando para um hidrogênio, indicando a presença de um sistema aromático. Com a análise do espectro DEPT-135 (**Figura 17**) foi possível observar 5 sinais de carbonos do tipo sp², com deslocamentos químicos em 111,3, 120,6, 121,1 e 122,0 ppm, e um outro carbono sp² mais desblindado em δ 131,8.

Figura 15 – Sinais de interesse no espectro de ^1H (região entre 8,15 – 7,05 ppm) da subfração AEm9-C em CD_3OD , 7,05 T a 25 °C



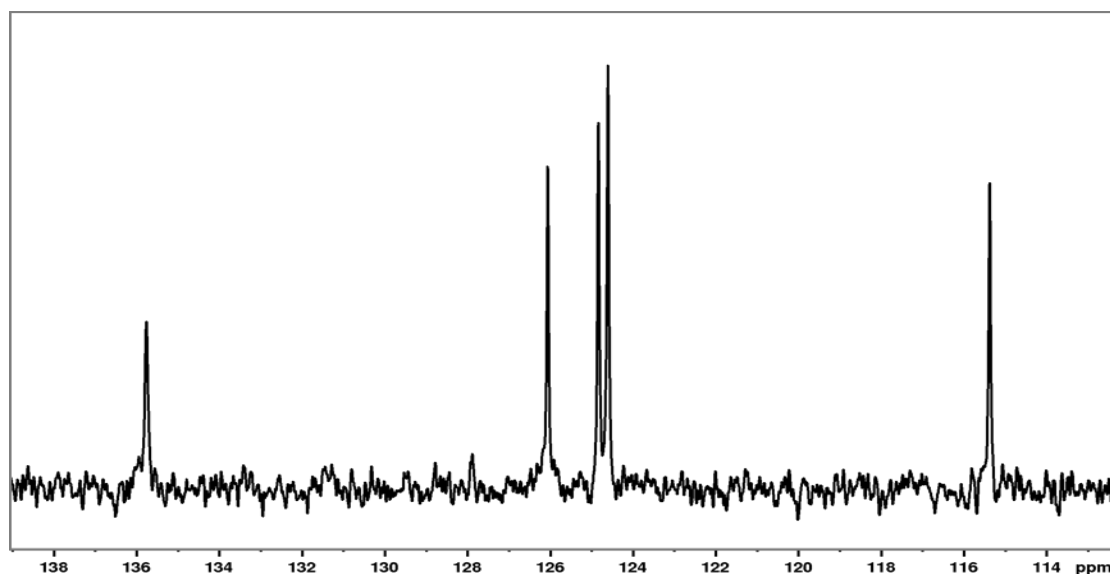
Fonte: do autor

Figura 16 – Ampliação dos multipletos observados no espectro de ^1H da subfração AEm9-C em CD_3OD , 7,05 T a 25 °C. **(a)**: região de 8,11 a 8,02 ppm; **(b)**: região de 7,46 a 7,39 ppm; **(c)**: região de 7,23 a 7,11 ppm



Fonte: do autor.

Figura 17 – Sinais de interesse no espectro de DEPT-135 (região entre 139,0 – 112,5 ppm) da subfração AEm9-C em CD₃OD, 7,05 T a 25 °C

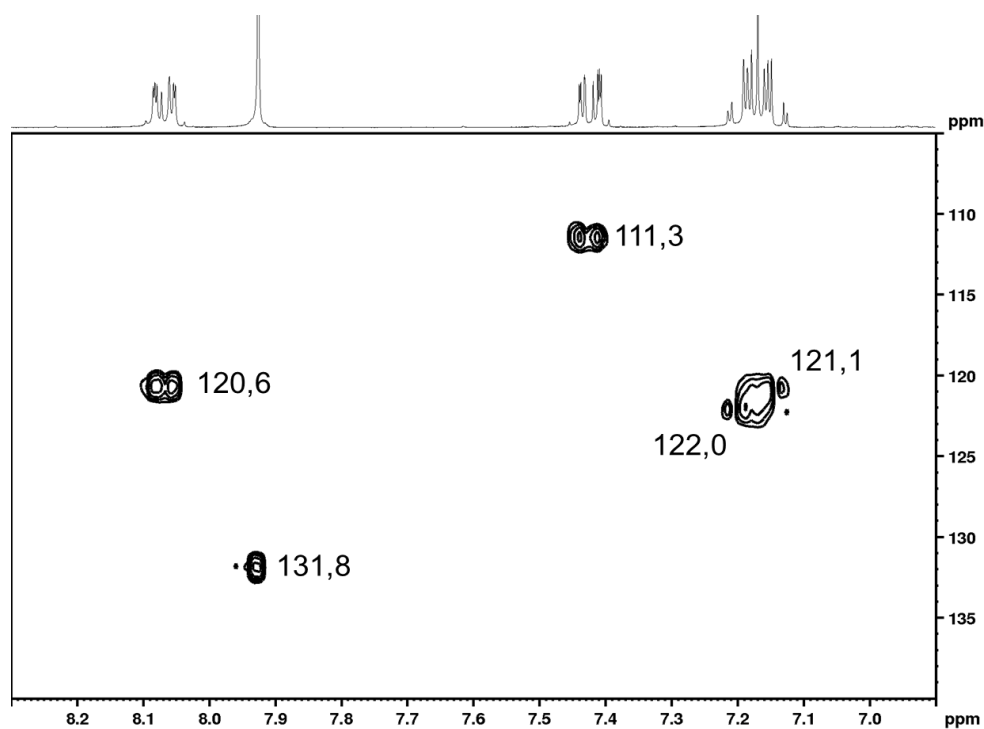


Fonte: do autor

Para que fosse possível realizar a elucidação da estrutura desta molécula foram adquiridos espectros de RMN bidimensionais: HMBC, HSQC e COSY. Pela análise do espectro HSQC (^{13}C - ^1H – J') (**Figura 18**), foi possível correlacionar os 5 carbonos sp^2 presentes na estrutura com os seus respectivos hidrogênios, segundo se estabeleceu na **Tabela 11**.

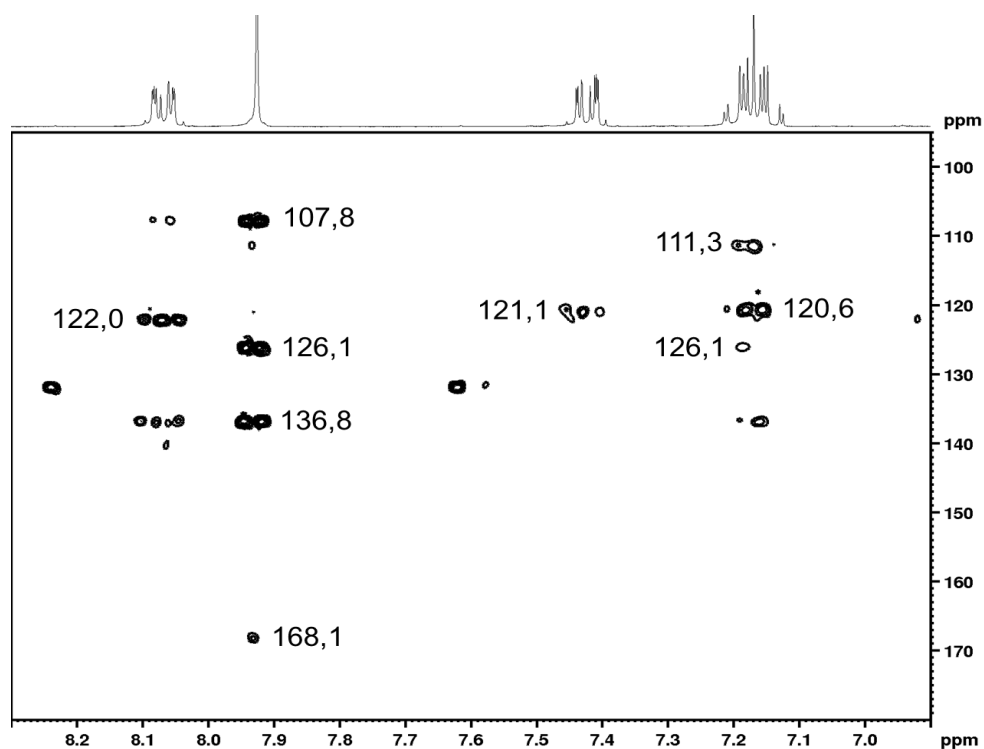
No espectro HMBC (^{13}C - ^1H) (**Figura 19**) observou-se um sinal de carbono em 168,1 ppm correspondente com um carbono sp^2 desblindado, característico de um grupo carboxila, acoplado a longa distância J^3 com o hidrogênio em δ 7,95 ligado ao carbono em δ 131,8. Esse fato sugeriu uma proximidade do grupo carboxila ao carbono sp^2 131,8 ppm. Além disso, três outros carbonos sp^2 não hidrogenados (107,8, 126,1 e 136,8 ppm) foram observados no espectro HMBC. O carbono em δ 126,1 acoplado com os hidrogênios em δ 7,21-7,12 e δ 7,95 e o carbono em δ 136,8 acoplado com os hidrogênios em δ 7,21-7,12, 7,95 e 8,06, sugerindo que são carbonos que pertencem a um sistema aromático. Já o carbono em δ 107,8 apresentou correlação com o hidrogênio em δ 7,95 e em δ 8,06. Foi possível identificar, portanto, 9 átomos de carbono na molécula. Outros acoplamentos também foram visualizados como mostram os espectros de HMBC e COSY.

Figura 18 – Correlações detectadas no espectro de HSQC da subfração AEm9-C em CD_3OD , 7,05 T a 25 °C



Fonte: do autor

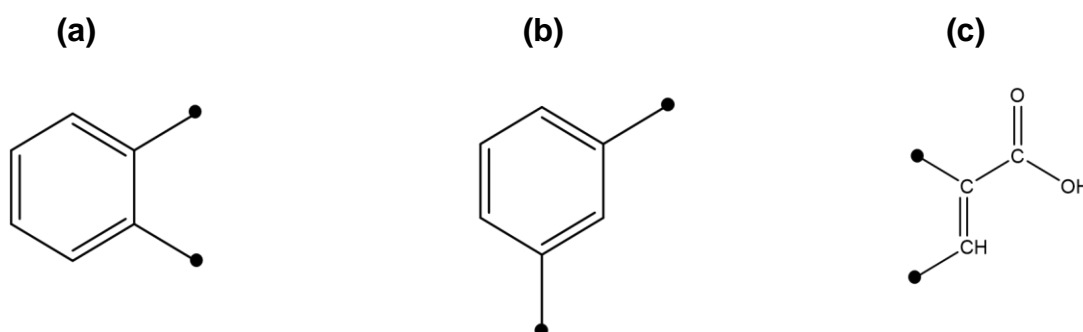
Figura 19 – Correlações detectadas no espectro de HMBC da subfração AEm9-C em CD_3OD , 7,05 T a 25 °C



Fonte: do autor

Além disso, o deslocamento químico dos carbonos em δ 131,8 e 136,8 (quaternário), sugerem a presença de um heteroátomo em sua proximidade, mais especificamente o nitrogênio. São observadas correlações entre 4 hidrogênios e carbonos pertencentes a um anel benzênico, porém, dois dos carbonos sendo não hidrogenados, o que indica a presença de duas substituições no anel. A **Figura 20** mostra os trechos estruturais condizentes com esta análise preliminar.

Figura 20 - Trechos estruturais prováveis do composto isolado

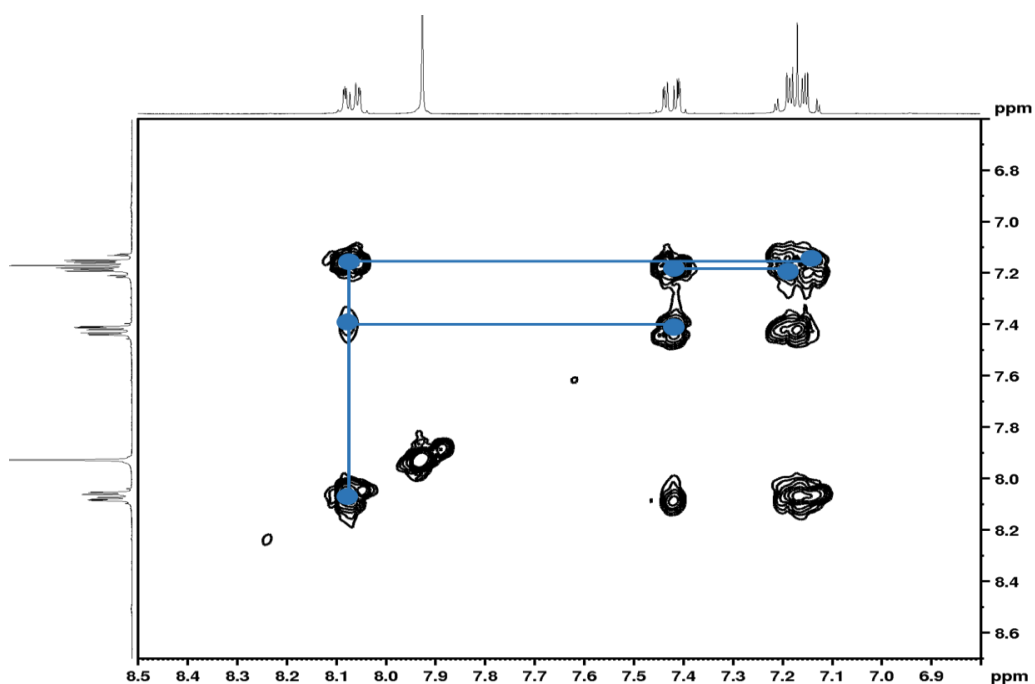


Fonte: do autor.

A análise do espectro COSY (**Figura 21**) mostrou acomplamentos entre os hidrogênios do anel aromático: o hidrogênio em δ 7,42 com hidrogênios em 7,21-7,12 e 8,06 ppm, e o hidrogênio em δ 7,21-7,12 com o hidrogênio em δ 8,06 e 7,42, sugerindo que o hidrogênio em δ 7,95 não fazia parte do anel benzênico e sim do seu substituinte. Além disso, detectou-se que os dois hidrogênios envolvidos no multipletto 7,21-7,12 se correlacionavam.

Como foi detectada a presença de um grupo carboxila δ 168,1 (COOH), como quatro dos átomos de carbonos do anel encontravam-se ligados a quatro átomos de hidrogênios, concluiu-se que um outro anel poderia estar ligado ao benzeno, através de um nitrogênio, restando apenas dois outros átomos de carbono, estando um deles ligado a um átomo de hidrogênio singlete H (7,95 ppm) – C (131,8 ppm) e o outro carbono, mais blindado (107,8 ppm), possivelmente ligado à carboxila desblindada. Dessa forma, concluiu-se que a dissstituição no anel benzênico seria em orto (**Figura 20a**).

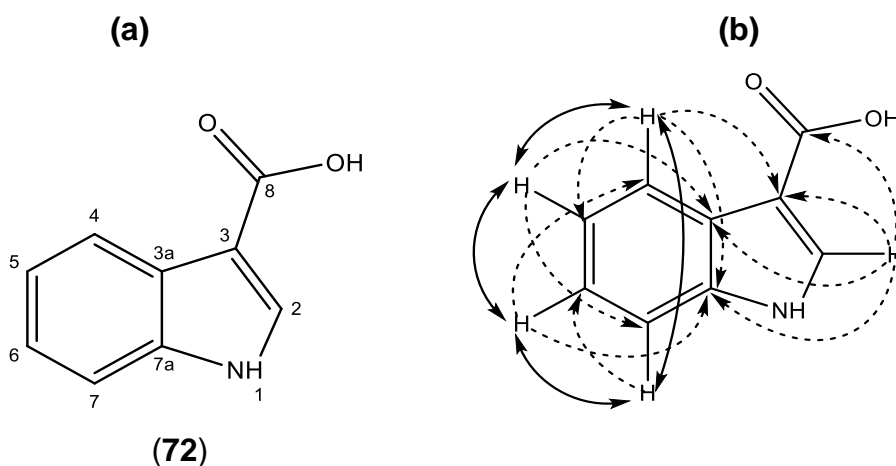
Figura 21 – Correlações detectadas no espectro de COSY da subfração AEm9-C em CD₃OD, 7,05 T a 25 °C



Fonte: do autor.

Foi possível, portanto, identificar o ácido indol-3-carboxílico (**70**), cuja estrutura foi comparada à da literatura (SUN *et al.*, 2014). A **Figura 22** ilustra algumas das correlações descritas e mostra a estrutura molecular definitiva da molécula identificada.

Figura 22 – Representação do ácido indol-3-carboxílico: a) Estrutura química; b) Correlações observadas no espectro de COSY (linha contínua) e HMBC (linha descontinua)



Fonte: do autor.

O ácido indol-3-carboxílico é comumente produzido por microrganismos e plantas, desempenhando funções relevantes na defesa das plantas contra o estresse biótico, sendo também identificado como um mediador da resistência induzida em *Arabidopsis* contra patógenos vegetais (FORCAT *et al.*, 2010). Além disso, este composto e outras auxinas estimulam o alongamento celular, resultando no início do crescimento radicular ou na melhora da absorção de elementos nutricionais pelos hospedeiros (MEENA *et al.*, 2017). Outros estudos mostraram algumas atividades biológicas relacionadas a um efeito citotóxico nas células Vero (células epiteliais de rim de macaco verde africano) e 3T3 (fibroblastos de camundongo) (FÉLIX *et al.*, 2018a) e uma atividade antitumoral discreta (ANDERTON *et al.*, 2004). Além disso, este composto é um precursor importante para compostos com ação terapêutica que requerem grupos indol (DUAN *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2014; HIMAJA *et al.*, 2010), mostrando grande valor para a indústria farmacêutica.

Dzoyem *et al.* (2017) testaram a atividade antimicrobiana do ácido indol-3-carboxílico isolado do fungo endofítico *Epicoccum nigrum* contra vários patógenos Gram positivos e Gram negativos. O composto mostrou respostas moderadas (MIC 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) frente a *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* e uma inibição forte do *Staphylococcus aureus* (MIC 6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e do *Enterococcus faecalis* (MIC 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A fração LdAEm-9 foi testada contra uma bactéria diferente às mencionadas no artigo supracitado, mas a atividade encontrada (moderada: MIC 100-200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra *Listeria monocytogenes*) corrobora com os resultados destes pesquisadores. Vale destacar que a referida fração também mostrou uma atividade moderada contra *Candida albicans* (MIC 100-200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e que os resultados negativos frente a *E. coli* (MIC > 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) poderiam ser provocados por uma ação antagonista devido à mistura.

Uma pesquisa recente mostrou uma atividade antioxidante discreta e uma atividade antibacteriana contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* para extratos aquosos e alcoólicos com altas concentrações do ácido indol-3-carboxílico obtidos a partir de *Catharanthus roseus* (SYEDA; RIAZUNNISA, 2020). Um ano antes, Duan *et al.* (2019) isolaram este composto e o indol-3-carboxaldeído de um extrato de acetato de etila obtido da fermentação do fungo endofítico *Irpex lacteus*. O extrato tinha sido testado para atividade antioxidante, antimicrobiana e antitumoral, mostrando uma atividade antioxidante superior ao do

ácido ascórbico, uma inibição significativa no crescimento de cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Penicillium*, *Aspergillus niger* e *Candida albicans* e um efeito antitumoral contra linhagens de células humanas IHH4 (carcinoma papilar de tireoide) e CFPAC-1 (adenocarcinoma pancreático).

Os fatos descritos acima são coerentes com os resultados obtidos para a fração LdAEm-9 da qual foi isolado seu composto maioritário, o ácido indol-3-carboxílico, sendo possível considerar que a atividade antimicrobiana observada para a fração LdEAm-9 seja devido à presença deste ácido. A produção dos compostos bioativos identificados obtidos do fungo endofítico *Lasiodiplodia* sp., assim como a atividade antimicrobiana observada para os extratos brutos e suas frações, é uma expressão do potencial da espécie *Handroanthus impetiginosus* para fornecer endófitos produtores de produtos naturais com importância médica já anunciada por Gómez e Luiz (2018).

5.3.3 Identificação de compostos presentes em subfrações através de RMN e EM

Considerando-se o perfil antimicrobiano das frações derivadas do extrato bruto LdAEm, algumas das subfrações obtidas foram analisadas por RMN e Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRESIMS) com o intuito de identificar os compostos presentes nas misturas. Especificamente, foram analisadas as subfrações AEm68-(A, B, C, D, E e H) e AEm3-(A-D), mas a identificação dos metabólitos secundários só foi possível ser realizada nas subfrações AEm68-C e AEm68-E, devido à complexidade dos espectros obtidos para as outras subfrações, bem como as pequenas quantidades dos constituintes das mesmas, sendo impossível a visualização dos sinais de carbonos, mesmo realizadas em equipamento de 14,1T. Nos **Apêndices C e D** poderão ser consultados os espectros de RMN 1D e 2D adquiridos para estas subfrações, onde foram identificados os compostos.

5.3.3.1 Análise da mistura de compostos presentes na amostra AEm68-C

No total foram identificados três compostos aromáticos conhecidos nesta amostra, dois deles foram totalmente caracterizados: o ácido-4-hidroxibenzoico e o ácido indol-3-carboxílico (previamente isolado da subfração AEm9-C). Além disso, baseado nas análises dos espectros de RMN e massas, se propõe a estrutura de outro composto identificado como a 4-hidroximeleína. Para cada substância os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C foram comparados aos da literatura e os valores de massas com cinco casas após a vírgula, obtidos por HRESIMS, foram comparados com as massas exatas segundo o SIS (Scientific Instrument Service, pelas siglas em inglês), <https://www.sisweb.com/referenc/tools/exactmass.htm>.

- **Ácido-4-hidroxibenzoico**

Tabela 12 - Deslocamento químico δ (ppm) e constante de acoplamento J (Hz) para o ácido-4-hidroxibenzoico em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C

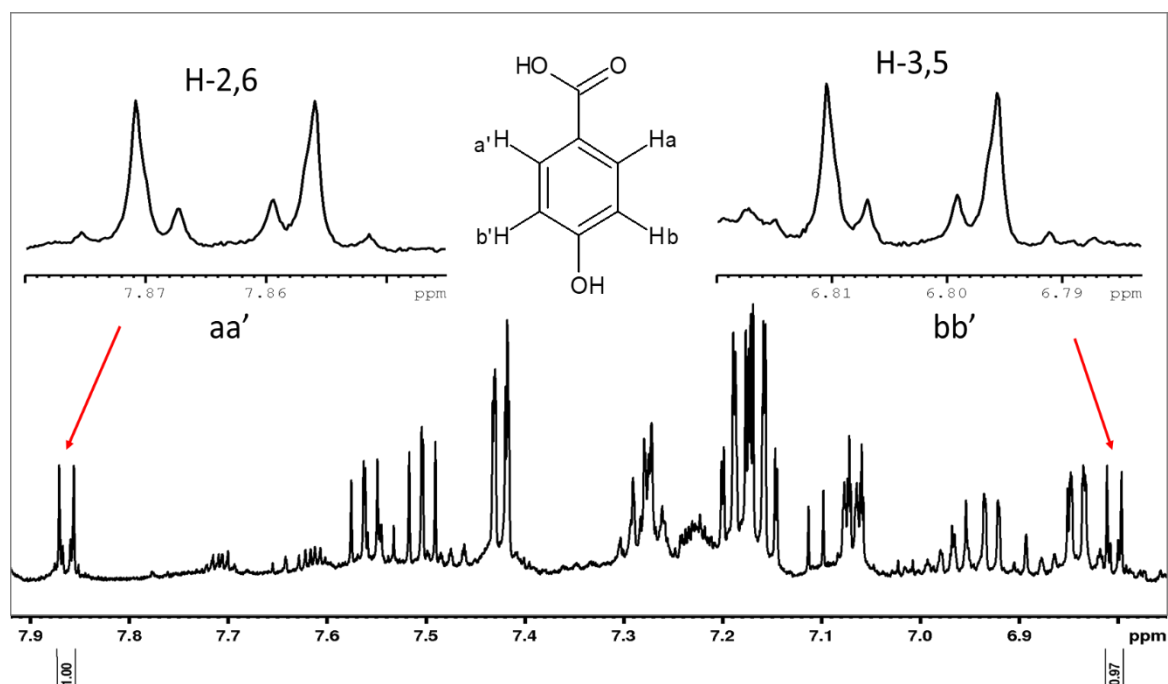
No.	^1H	^{13}C	^{13}C (KIM <i>et al.</i> , 2019)	HMBC	COSY
1	121,3	122,8
2,6	7,86 (dd; J=8,90, 2,13; 1H)	131,6	133,0	162,2; 168,5	H3; H5
3,5	6,80 (dd; J=8,90, 2,13; 1H)	114,6	116,0	121,3; 162,2	H2; H6
4	162,2	163,3
7	168,5	170,1
4-OH	n.o.
7-OH	n.o.

Fonte: do autor.

Legenda: n.o.: Não observado

As observações do espectro de RMN de ^1H mostraram sinais em δ 7,86 (H2,6) e 6,80 (H3,5) cada sinal integrando para dois H, indicando a provável presença de um sistema aromático para-dissubstituído. A multiplicidade encontrada para esses sinais (duplo dubleto) e os valores da constante de acoplamento (J) são condizentes com a presença de um sistema $aa'bb'$, característico deste tipo de substituição do anel benzênico (**Tabela 12**). A **Figura 23** mostra os sinais que pertencem a este composto no espectro de ^1H , onde também existem sinais produzidos por outros metabólitos secundários contidos na amostra estudada.

Figura 23 – Sinais identificados para o ácido-4-hidroxibenzoico no espectro de ^1H (região entre 7,92 – 6,75 ppm) da fração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C

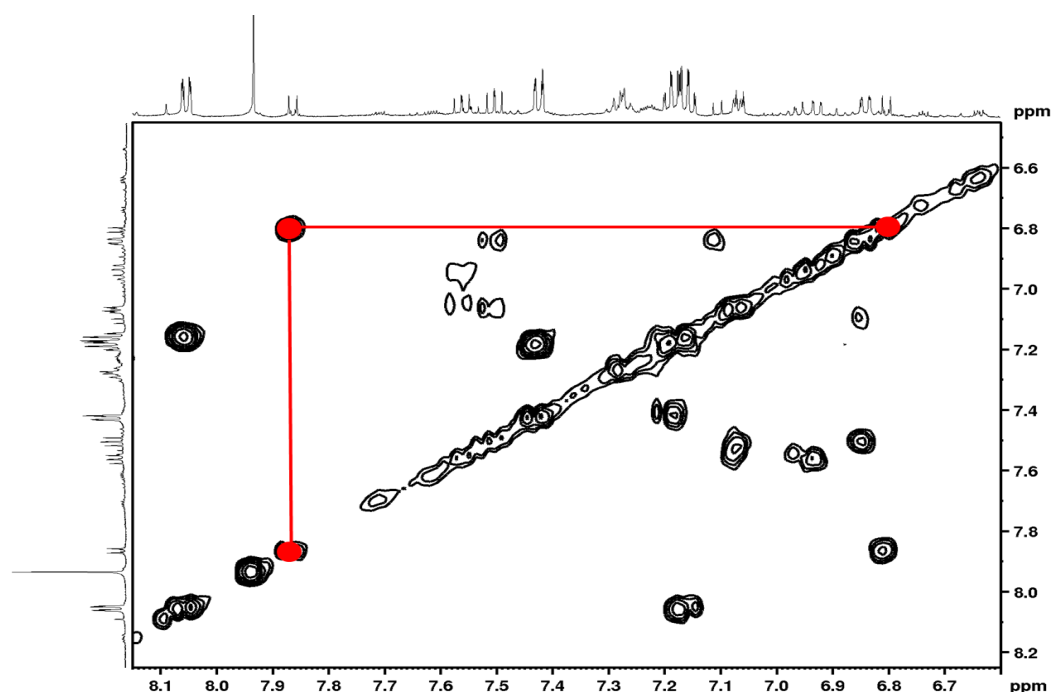


Fonte: do autor.

As correlações observadas no espectro de COSY (**Figura 24**) entre H2,6 – H3,5 corroboram a presença do anel benzênico p -substituído na estrutura. Por outro lado, o experimento J -resolved (**Figura 25**), possibilitou determinar com mais exatidão os valores das constantes de acoplamento (J) entre H2 – H6 ($J=8,90$ Hz) e H3 – H5 ($J=8,90$ Hz).

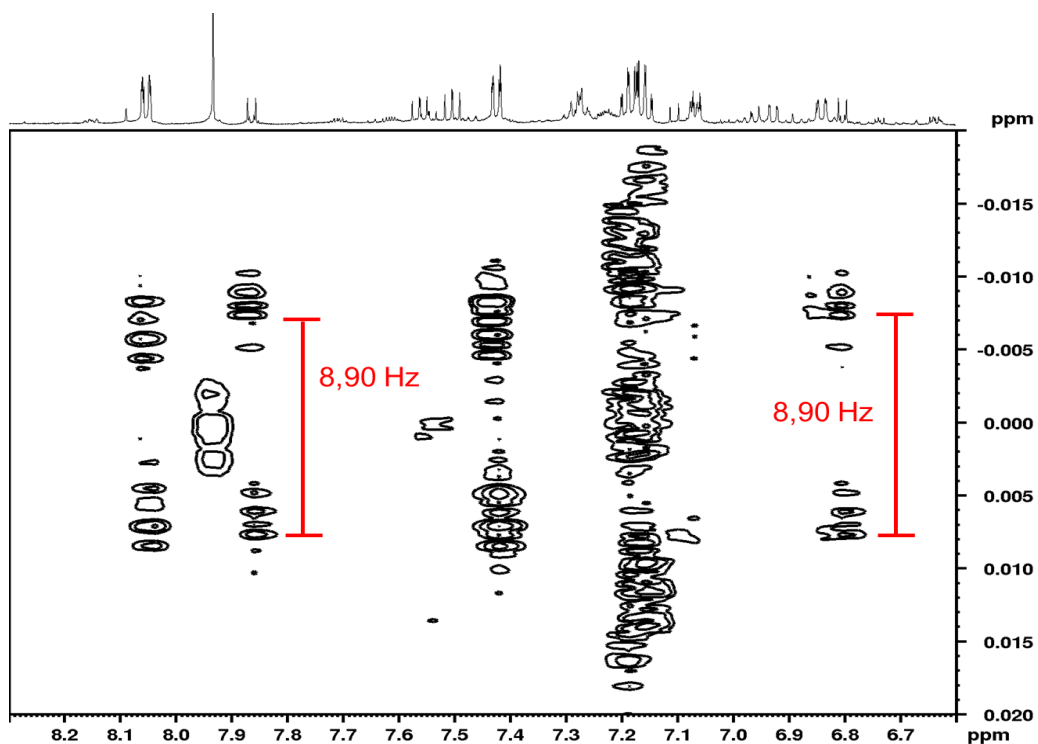
Na sequência estão os espectros de HSQC (**Figura 26**) e HMBC (**Figura 27**). Aquele permitiu determinar o deslocamento dos carbonos (C-H sp^2) do anel aromático: C2,6 (131,6 ppm) e C3,5 (114,6 ppm) e estas as correlações entre os H2,6 e H3,5 com os carbonos quaternários (Cq) do composto: C1 (121,3 ppm) e C4 (162,2 ppm) e com o carbono carbonílico pertencente a um grupo carboxila da posição 7 (168,5 ppm). O deslocamento químico de C4 em 162,2 ppm sugere a presença de grupo OH ligado a este carbono.

Figura 24 – Correlações observadas para o ácido 4-hidroxibenzoico no espectro de COSY da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C



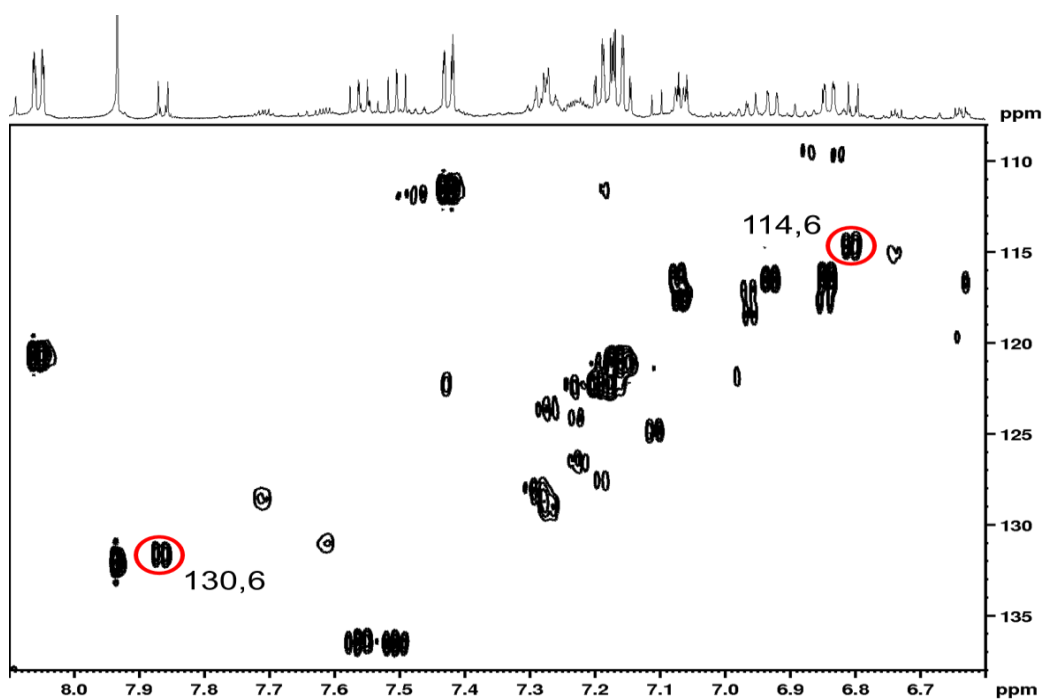
Fonte: do autor.

Figura 25 – Constantes de acoplamento (J) dos hidrogênios aromáticos do ácido-4-hidroxibenzoico detectadas no espectro J -resolved da fração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C



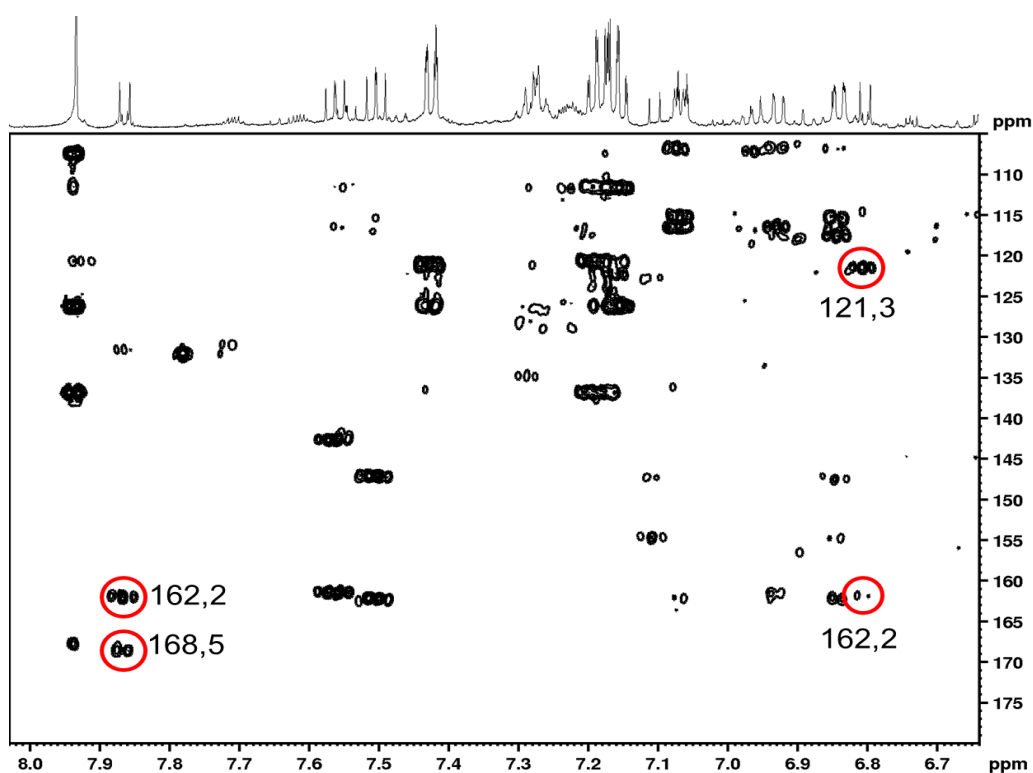
Fonte: do autor.

Figura 26 – Sinais identificados para o ácido 4-hidroxibenzoico no espectro de HSQC da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C



Fonte: do autor.

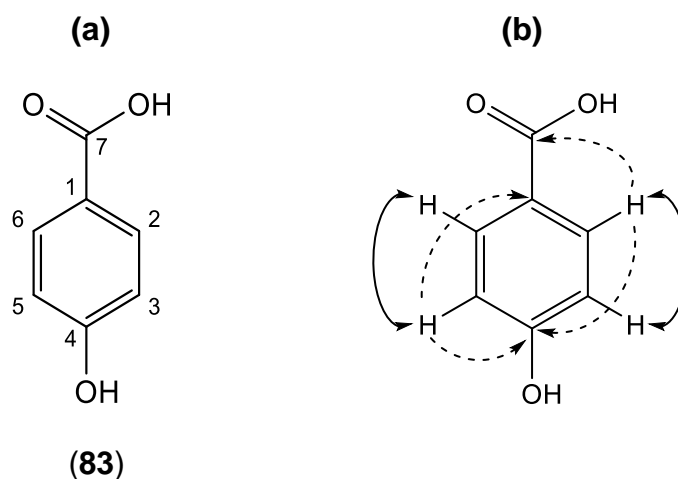
Figura 27 – Sinais identificados para o ácido 4-hidroxibenzoico no espectro de HMBC da subfração AEm68-C em CD₃OD, 14,1 T a 25 °C



Fonte: do autor.

A **Figura 28** representa a estrutura química do composto identificado e as correlações observadas nos espectros de COSY e HMBC.

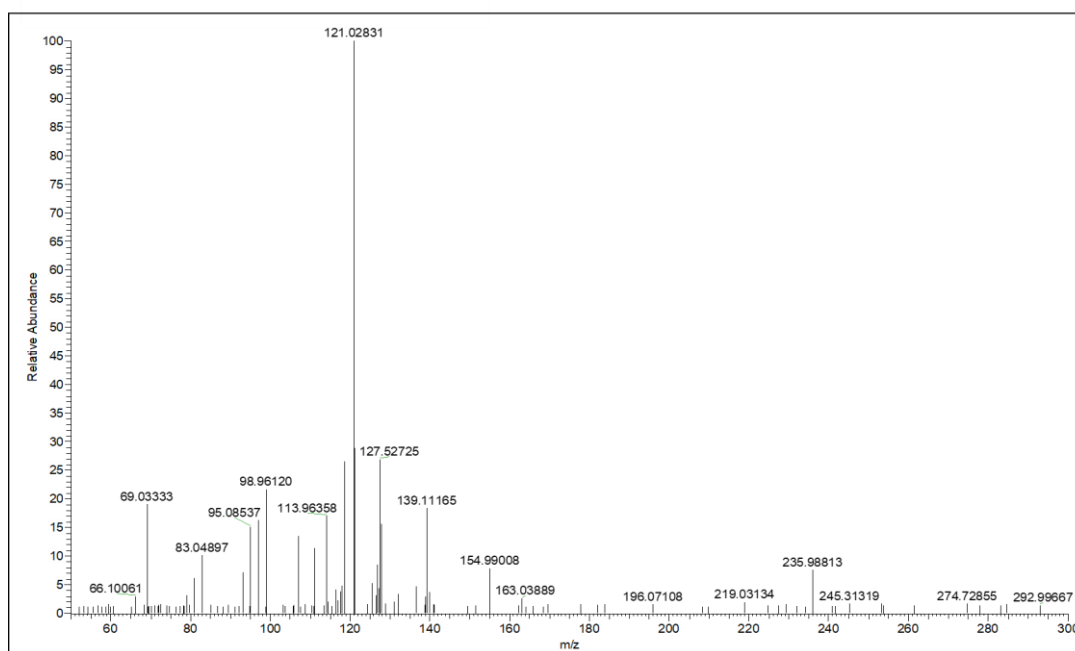
Figura 28 – Representação do ácido 4-hidroxibenzoico: a) Estrutura química; b) Correlações observadas nos espectros de COSY (linha contínua) e HMBC (linha descontinua)



Fonte: do autor.

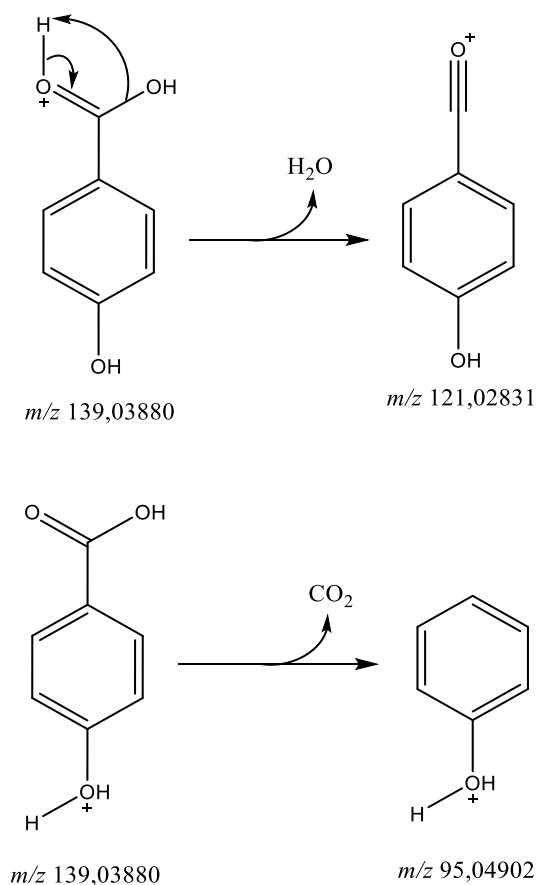
No espectro de massas MS/MS, que mostra a fragmentação dos compostos com m/z 139 desta amostra (**Figura 29**), observaram-se sinais coerentes com a estrutura do ácido-4-hidroxibenzoico. Detectou-se o pico do íon molecular $[M+H]^+$ em m/z 139,03880, sugerindo a fórmula molecular $C_7H_7O_3$ (massa exata: 139,039520 uma, $\Delta M_i = 5$ ppm), que corresponde à estrutura 83 em sua forma protonada. Também foram observados dois íons fragmentos em m/z 121,02831 (pico base) e m/z 95,04902 relacionados com a perda de água e com a saída do grupo carboxila da molécula, respectivamente (**Figura 30**). Vale destacar que a perda de água e dióxido de carbono é frequente de acontecer durante a fragmentação de ácidos carboxílicos por HRESIMS (STECKEL; SCHLOSSER 2019), o que também será observado no caso do ácido indol-3-carboxílico. Os picos não observados no espectro MS/MS (m/z 139,03880 e 95,0402) poderão ser consultados na **Tabela 19, Apêndice E**.

Figura 29 – Espectro de massas ESI(+)-MS/MS do íon m/z 139



Fonte: do autor.

Figura 30 – Prováveis fragmentações do ácido-4-hidroxibenzóico



Fonte: do autor.

O ácido-4-hidroxibenzóico tem sido isolado de vários fungos endofíticos, tais como *Camarops* sp. associado com *Adelphia macrophylla*, *Cytospora rhizophorae* presente na planta medicinal *Morinda officinalis* e *Colletotrichum* sp. associado com a espécie *Rubia pondantha* (CRUZ *et al.*, 2020).

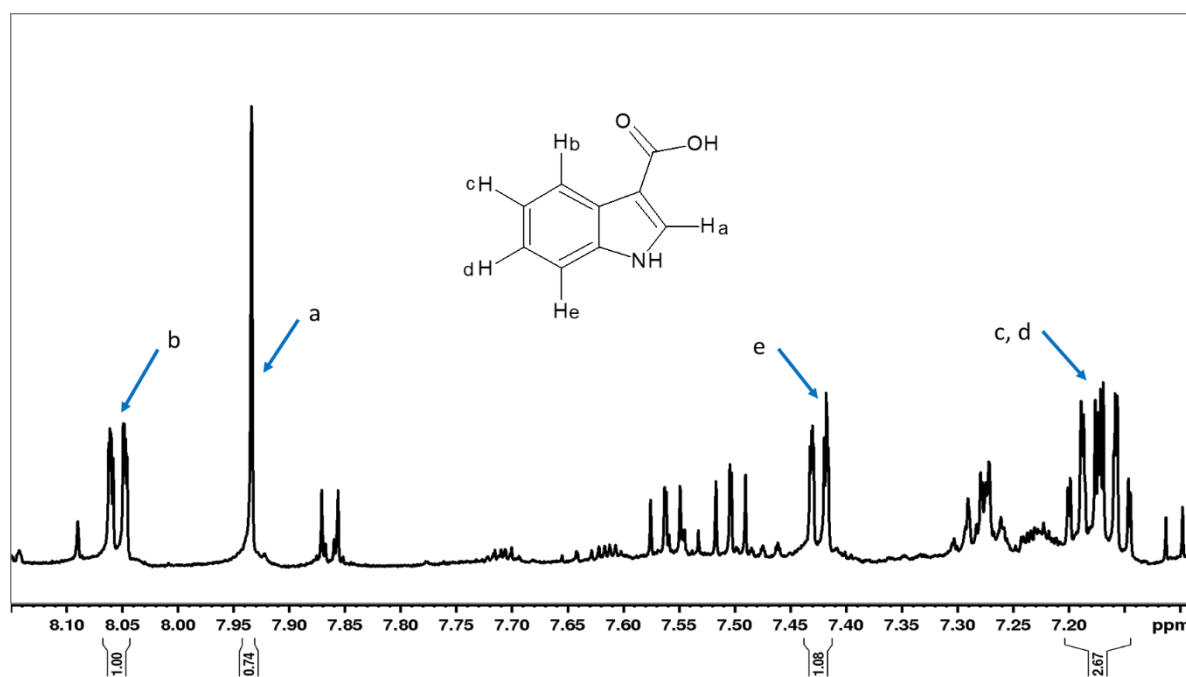
A atividade biológica deste composto já foi comprovada em alguns estudos: Cho *et al.* (1998) isolaram o ácido-4-hidroxibenzóico da casca do arroz e detectaram atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* através do teste do disco de difusão em concentrações de 200-400 µg.mL⁻¹, além disso, Ma *et al.* (2017) observaram uma atividade antimicrobiana importante para um derivado deste metabólito secundário, o ácido 4-(2'R,4'-dihidroxibutoxi)benzóico, isolado do endófito *Penicillium* sp. R22 frente aos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria alternata* e *Alternaria brassicae* (MIC de 31,2 µg.mL⁻¹).

- **Ácido indol-3-carboxílico**

A estrutura química deste composto já foi apresentada no presente trabalho (secção 5.3.2), mas considera-se importante resaltar a presença dele na mistura de compostos presentes na amostra AEm68-C, desde que os sinais observados nos espectros de RMN 1D e 2D analisados indicam que poderia ser um dos compostos maioritários da mistura. A **Figura 31** mostra os sinais pertencentes a esta substância no espectro de ^1H da amostra AEm68-C.

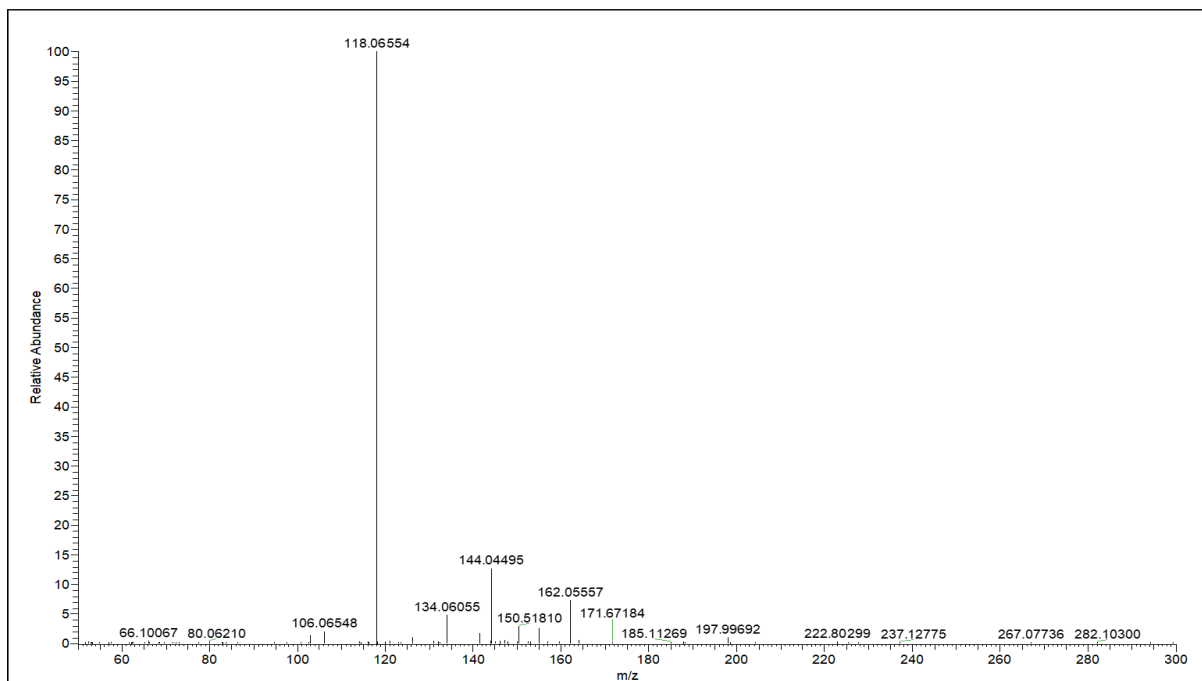
As fragmentações do íon m/z 162 também evidenciam a presença do ácido indol-3-carboxílico na mistura (**Figura 32**). O pico do íon molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 162,05557 (massa exata: 162,055503 uma, $\Delta M_i = -0,6$ ppm) é indicativo da fórmula molecular $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2\text{N}$, correspondendo com a forma protonada da molécula. Também foram observados íons em m/z 144,04495 (perda de água) e 118,06554 (pico base, saída de CO_2) que mostram possíveis fragmentações do ácido indol-3-carboxílico (**Figura 33**).

Figura 31 – Sinais identificados para o ácido indol-3-carboxílico no espectro de ^1H (região entre 8,15 – 7,09 ppm) da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C



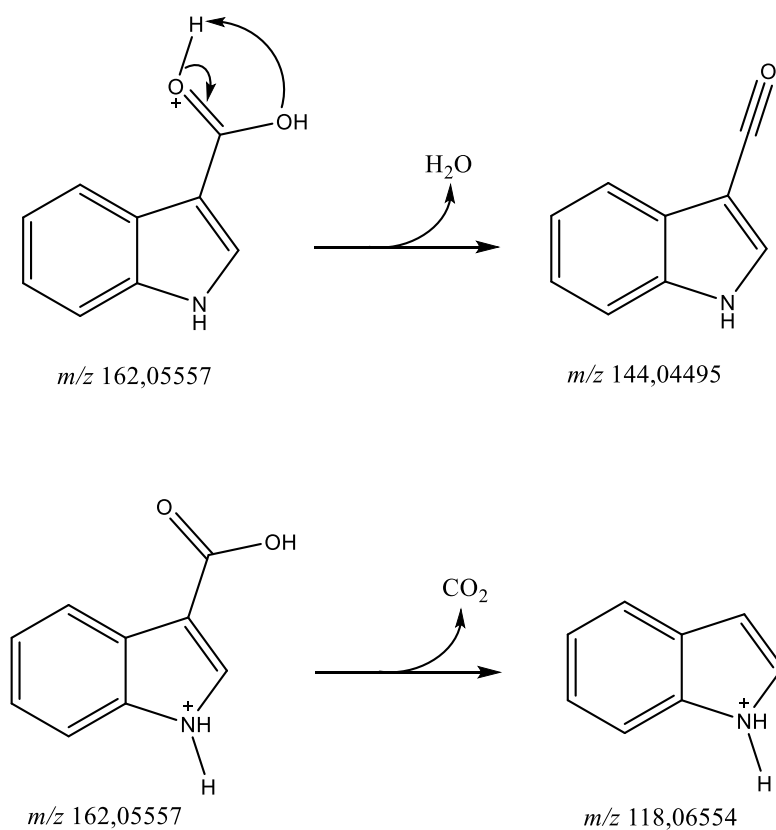
Fonte: do autor.

Figura 32 – Espectro de massas ESI(+)-MS/MS do íon m/z 162



Fonte: do autor.

Figura 33 – Prováveis fragmentações do ácido indol-3-carboxílico

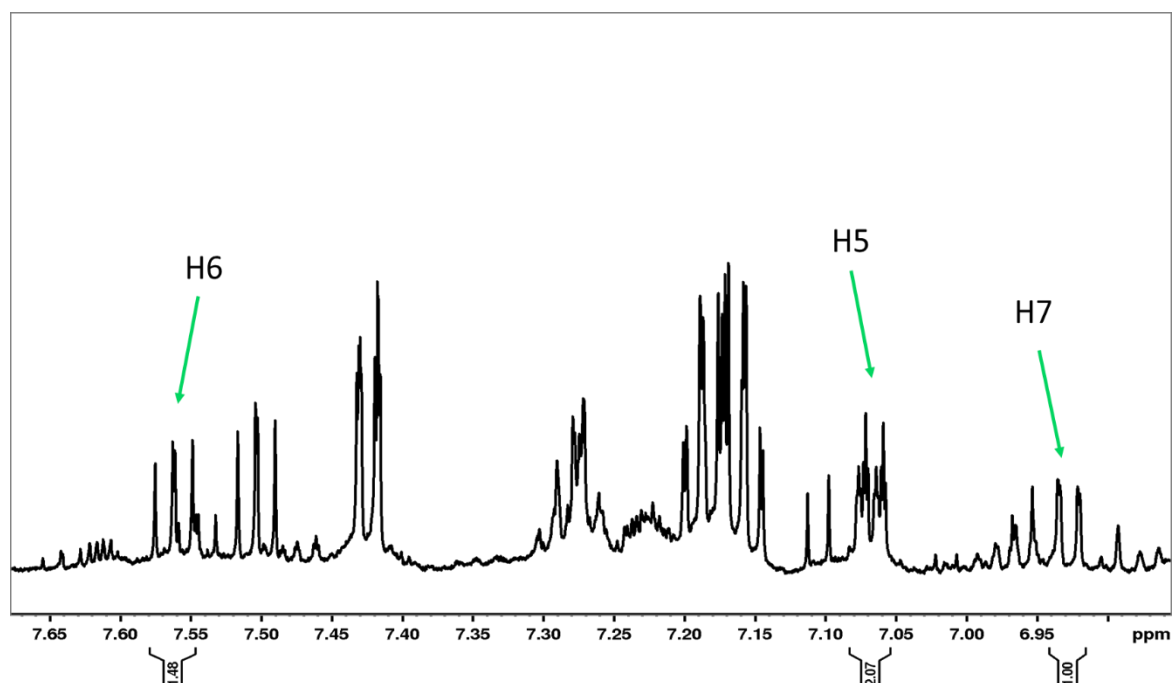


Fonte: do autor.

- **Proposta de estrutura: 4-hidroximeleína**

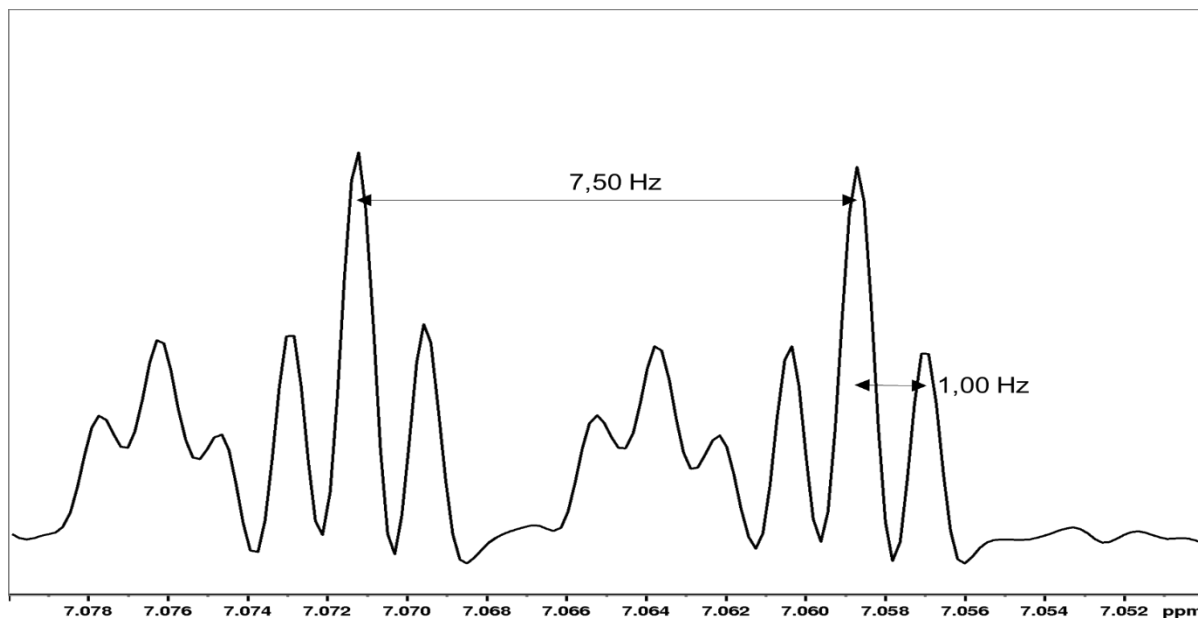
A análise do espectro de ^1H da amostra AEm68-C também permitiu observar outros sinais característicos de compostos aromáticos que foram designados como H5 (6,92 ppm), H6 (7,56 ppm) e H7 (7,07 ppm), de acordo com a estrutura química do composto proposta. A **Figura 34** representa estes sinais dentre outros adquiridos no espectro de ^1H , os quais foram ampliados (**Figuras 35-37**).

Figura 34 – Sinais identificados para os H5, 6, e 7 no espectro de ^1H (região entre 7,68 – 6,85 ppm) da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C



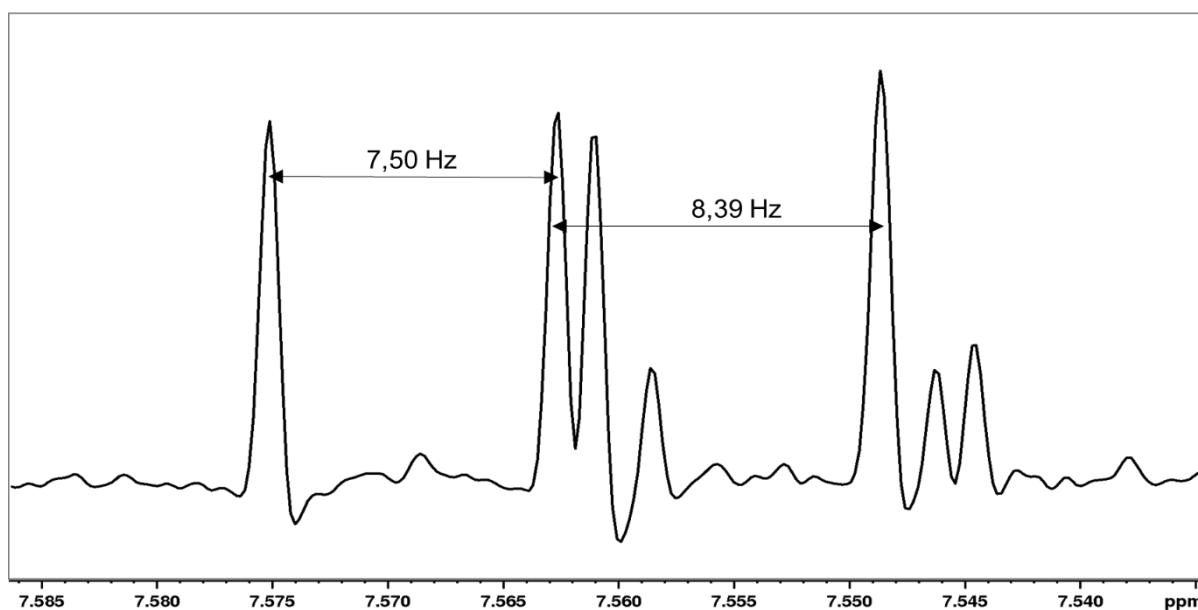
Fonte: do autor.

Figura 35 – Sinal ampliado e constante de acoplamento (J) para o H5 no espectro de ^1H (região entre 7,08 – 7,06 ppm) da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T, lb: -1,5, gb: 0,2 a 25 °C



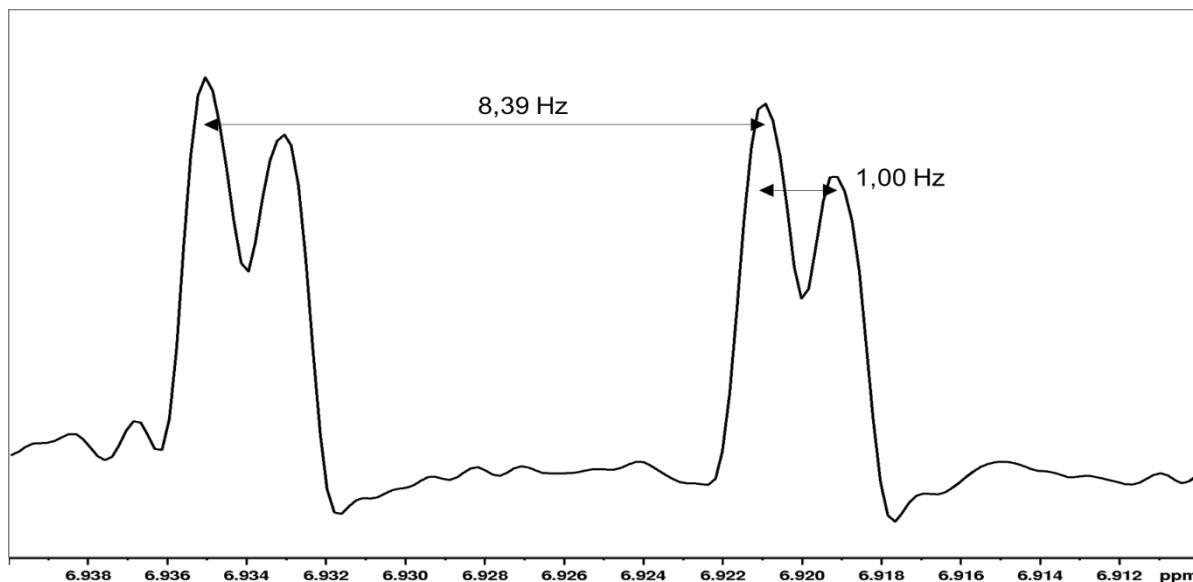
Fonte: do autor.

Figura 36 – Sinal ampliado e constante de acoplamento (J) para o H6 no espectro de ^1H (região entre 7,59 – 7,53 ppm) da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T, lb: -1,5, gb: 0,2 a 25 °C



Fonte: do autor.

Figura 37 – Sinal ampliado e constante de acoplamento (J) para o H7 no espectro de ^1H (região entre 6,94 – 6,91 ppm) da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T, lb: -1, gb: 0,2 a 25 °C

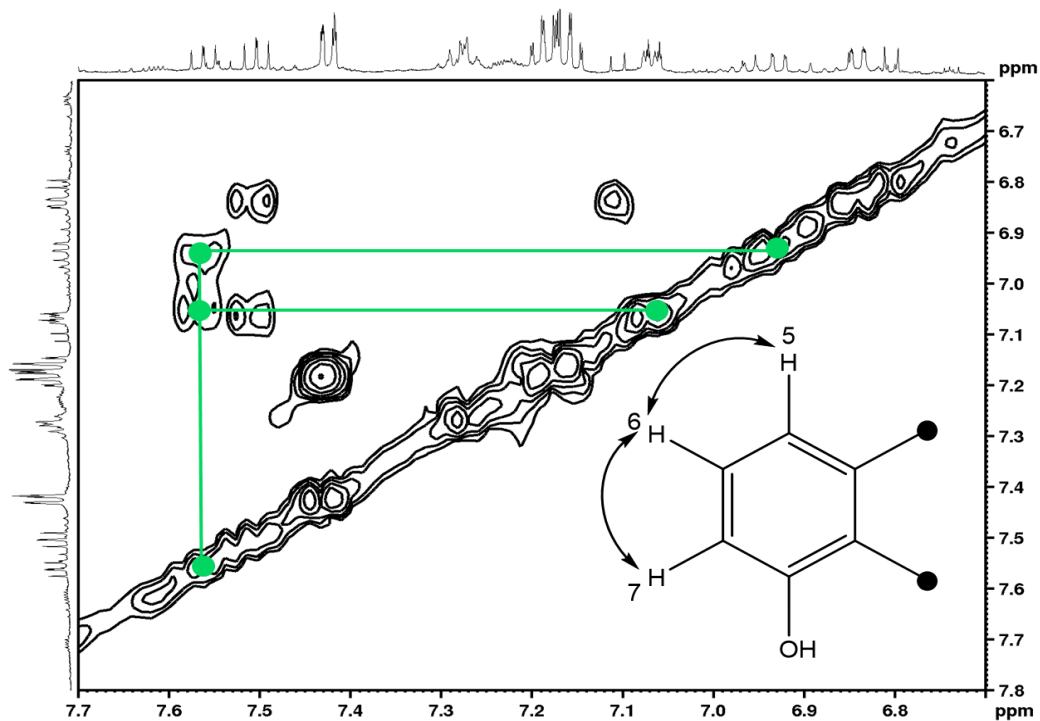


Fonte: do autor.

Ao analisar o espectro de COSY estes sinais mostraram as seguintes correlações: H5 (7,07 ppm) – H6 (7,56 ppm) e H6 – H7 (6,92 ppm) (**Figura 38**). Estes resultados, assim como a multiplicidade de cada sinal e as constantes de acoplamento (J) determinadas no espectro de ^1H sugerem uma estrutura com um anel benzênico trissubstituído.

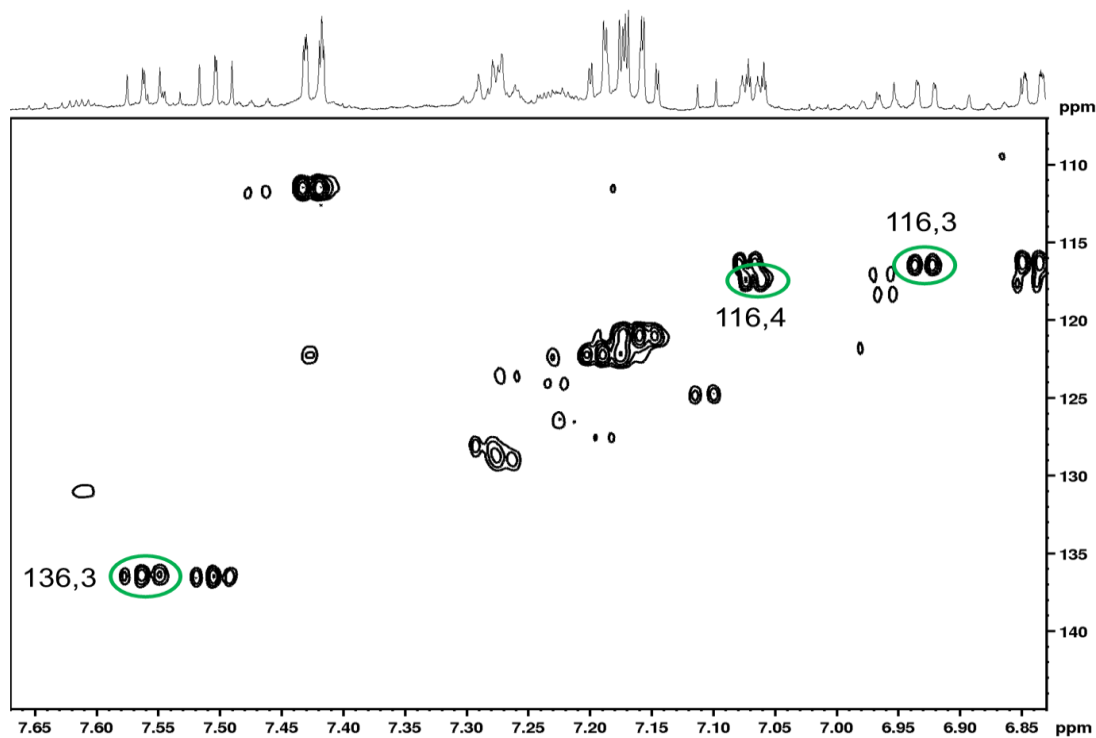
A leitura do espectro de HSQC (**Figura 39**) mostra os deslocamentos dos três carbonos (C-H sp^2) do anel aromático em 116,3 ppm (C5), 136,3 ppm (C6) e 116,4 ppm (C7). Por outro lado, as correlações observadas no espectro de HMBC (**Figura 40**) permitiram identificar os carbonos quaternários (Cq) do anel em δ 106,5 (C8a), 142,8 (C4a) e 161,5 (C8). Este último valor de δ sugere a presença de um heteroátomo ligado a este carbono, provavelmente um grupo hidroxila.

Figura 38 – Correlações observadas para a parte aromática do composto em análise no espectro de COSY da subfração AEm68-C em CD₃OD, 14,1 T a 25 °C



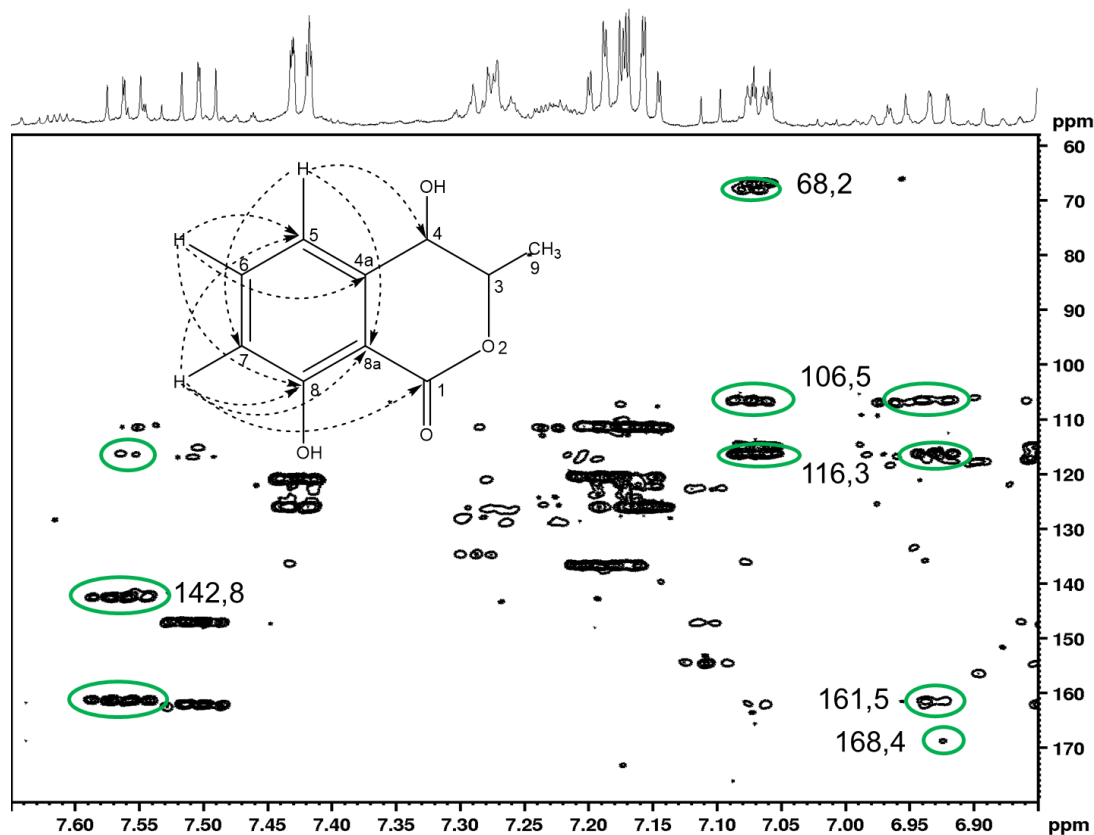
Fonte: do autor.

Figura 39 – Correlações observadas para a parte aromática do composto em análise no espectro de HSQC da subfração AEm68-C em CD₃OD, 14,1 T a 25 °C



Fonte: do autor.

Figura 40 – Correlações observadas para a parte aromática do composto em análise no espectro de HMBC da subfração AEm68-C em CD₃OD, 14,1 T a 25 °C



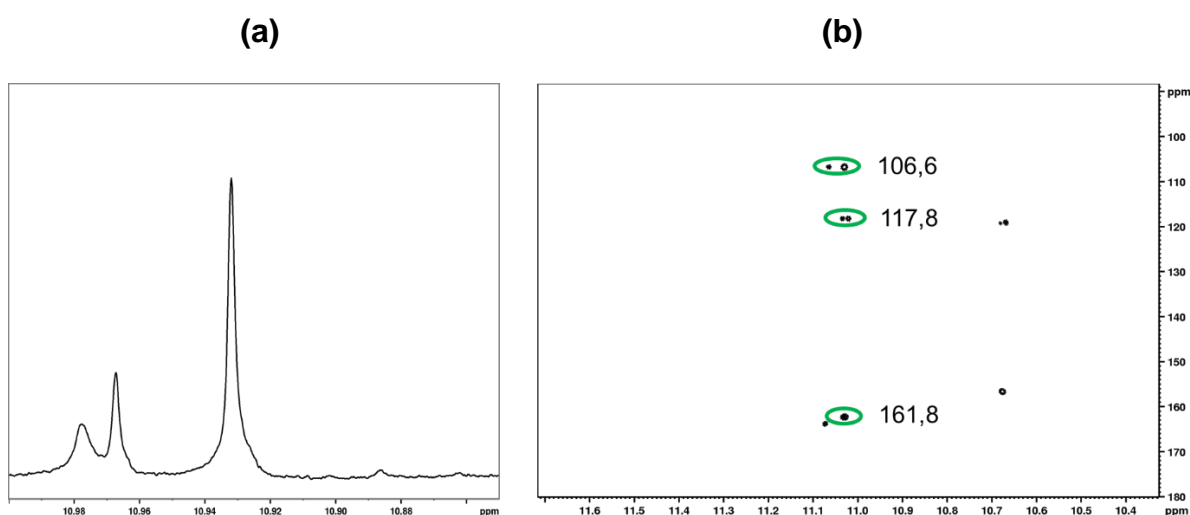
Fonte: do autor.

Na **Figura 40** também foram observadas correlações entre hidrogênios do anel com carbonos que não fazem parte deste sistema aromático. Neste sentido, o H5 (δ 7,07) apresentou correlação com um carbono sp^3 em δ 68,2 (C4), característico de um carbono carbinólico (ligado a um grupo OH) e que indicou a união do anel aromático com outra porção da molécula através do carbono quaternário C4a (δ 142,8).

Por outro lado, o H7 (δ 6,92) correlacionou com um carbono em δ 168,4, característico de carbono carbonílico (C1), sugerindo que este C1 se liga ao anel benzênico através do C8a, para, desta forma, se estabelecer uma correlação H7-C1 a quatro ligações (J^4). Esta posição da carbonila (C1) confirmou-se durante a análise dos espectros de ¹H e de HMBC da amostra AEm68-C adquiridos no clorofórmio deuterado, através da observação de um singlete em δ 10,93 (**Figura 41a** e **Apendice C, Figura 73**).

Este deslocamento químico próximo de 11 ppm é característico de um hidrogênio altamente desblindado envolvido em uma ligação intramolecular de hidrogênio entre o oxigênio da hidroxila e o da carbonila, quando apresentam a disposição acima descrita (CHACÓN-MORALES *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2009;). Em termos práticos, a observação deste sinal no espectro de ^1H constitui a forma mais frequentemente usada para atribuir a posição desta carbonila (C1) na 4-hidroximeleína.

Figura 41 – Sinais e correlações identificadas para o hidrogênio da hidroxila fenólica (C8) do composto em análise da subfração AEm68-C em CDCl_3 , 14,1 T a 25 °C: (a) Região entre 11,00 – 10,85 ppm do espectro de ^1H ; (b) Espectro de HMBC



Fonte: do autor.

As correlações observadas no espectro de HMBC (**Figura 41b**) mostram que, efetivamente, o sinal observado em δ 10,93 pertence à hidroxila ligada ao C8, pois estabelece correlações com três carbonos do anel benzênico: C8a em δ 106,6 (J^β); C8 em δ 161,8 (J^α) e provavelmente o C7 em δ 117,8 (J^β). Vale ressaltar que os deslocamentos destes carbonos do anel diferem levemente dos já discutidos nas **Figuras 39** e **40** pela mudança do solvente para a aquisição dos espectros (DRAČNSKÝ; BOUŘ, 2010)

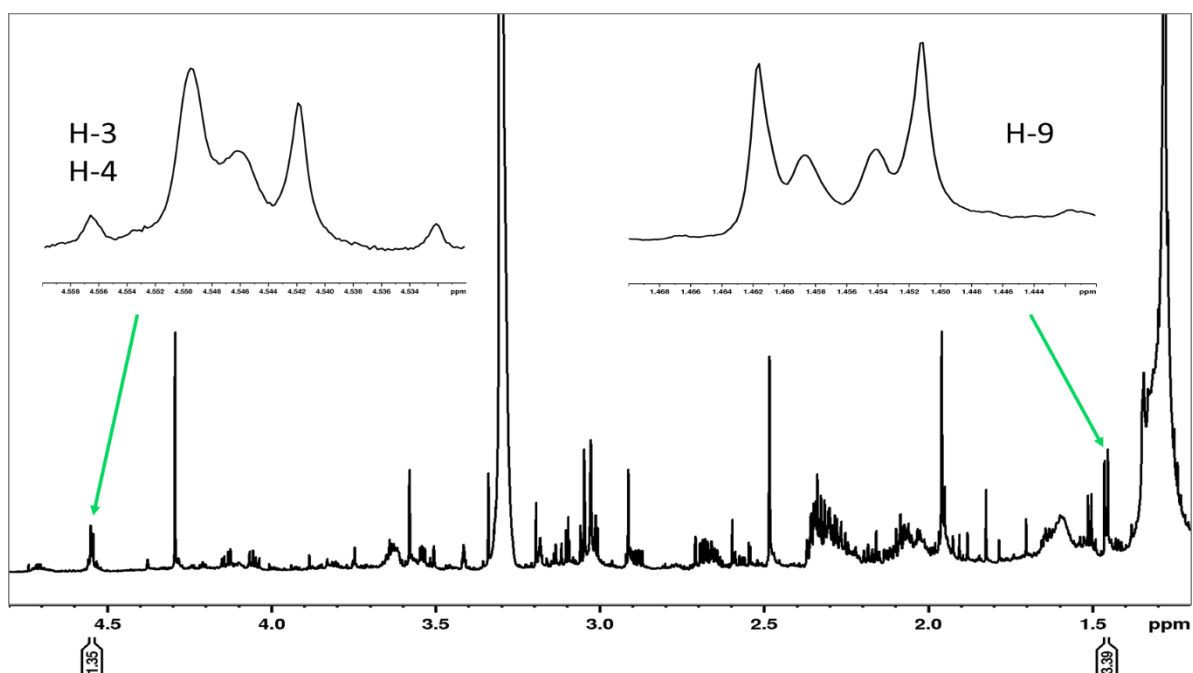
A parte não aromática da estrutura foi denominada como porção lactônica do composto e as demais análises estão representadas nas **Figuras 42 - 45**.

Os hidrogênios H3 e H4, ligados aos carbonos em δ 80,2 (C3) e δ 68,2 (C4) respectivamente, mostraram-se sobrepostos entre si e provavelmente com outros sinais no espectro de ^1H (**Figura 42**), o qual foi designado como um multipeto (m) em δ 4,55-4,53. As correlações H9-H3 e H9-H4 observadas no espectro de COSY (**Figura 43**) sugerem que o grupo metila (C9, δ 16,8) faz parte da porção lactônica da substância, o que foi confirmado com a análise dos espectros de HSQC e HMBC (**Figuras 44 e 45**), onde o H9 mostra correlações com os carbonos C3 (J^α), C4 (J^β) e C1 (J^A).

Ao serem analisados os valores de J determinados para H9 (dd, $J=6,27, 1,79$ Hz) pode-se inferir que, provavelmente, o valor de $J=6,27$ Hz deriva da correlação H9-H3 (J^β) e o valor de $J=1,79$ Hz da correlação H9-H4 (J^A) (**Figura 43**), corroborando com a estrutura da porção lactônica do composto, onde o carbono C3 (δ 80,2) está conectado aos carbonos C4 e C9 e se liga diretamente ao oxigênio da posição dois do anel lactônico, por este motivo seu sinal apresenta-se mais desblindado em relação ao C4. Em correspondência com esta análise, a leitura do espectro de HMBC revelou correlações dos hidrogênios H3 e H4 com os carbonos C4 e C3, respectivamente (**Figura 45**).

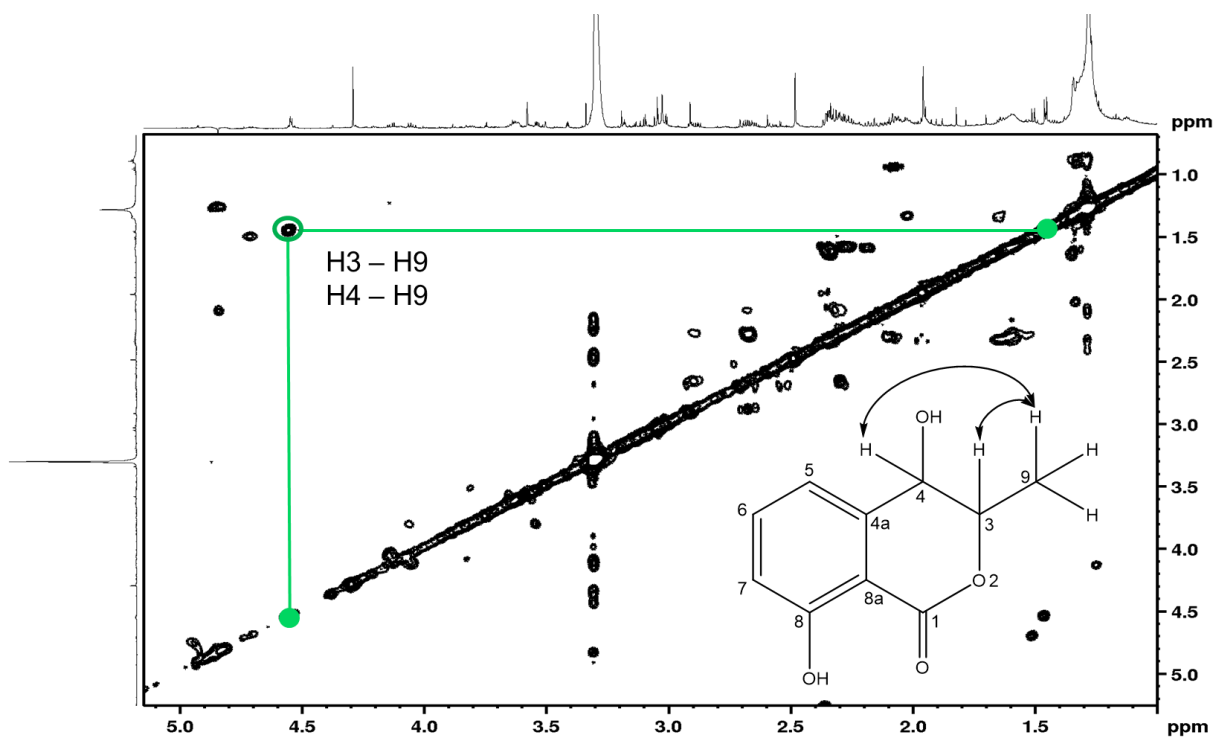
Outro elemento que evidencia a presença da porção lactônica na estrutura deriva das correlações observadas entre o H4 e os carbonos quaternários (Cq) do anel aromático (**Figura 45**): correlação H4-C4a (J^α) e correlação H4-C8a (J^β). Tendo em consideração que os hidrogênios H3 e H4 fazem parte do multipeto em δ 4,55-4,53, estas correlações foram atribuídas ao H4 pela sua proximidade com os Cq do anel benzênico quando comparado com o H3.

Figura 42 – Sinais identificados para os H4 e 9 no espectro de ^1H (4,81 – 1,20 ppm) da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C



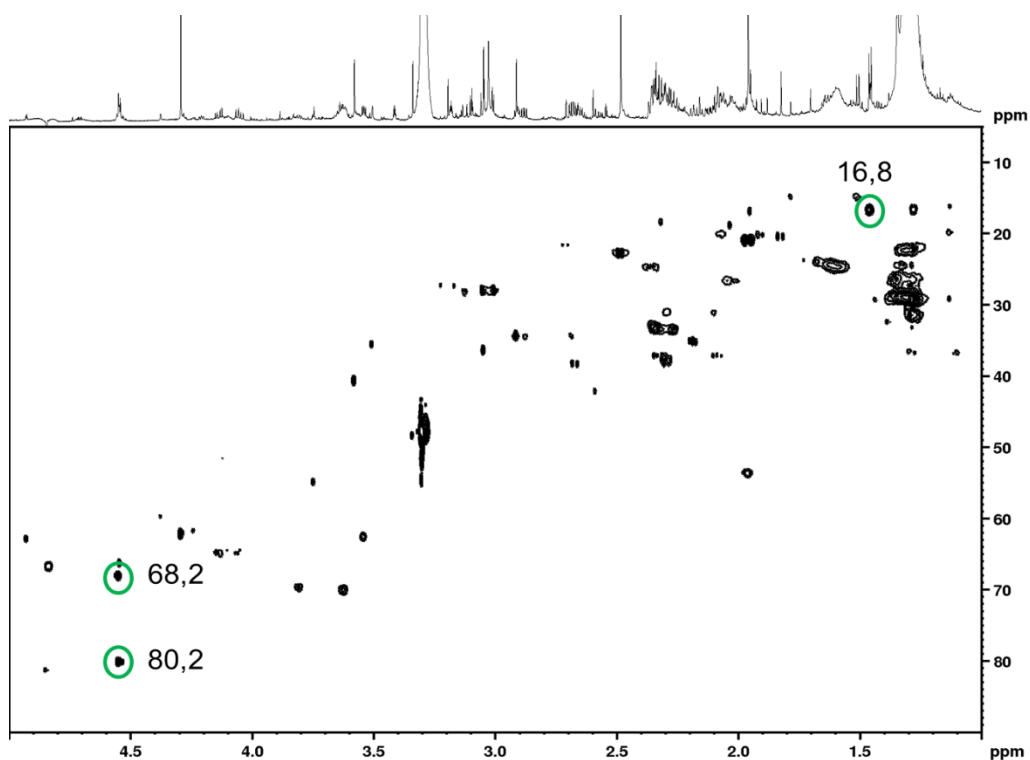
Fonte: do autor.

Figura 43 – Correlações observadas para a porção lactônica do composto em análise no espectro de COSY da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C



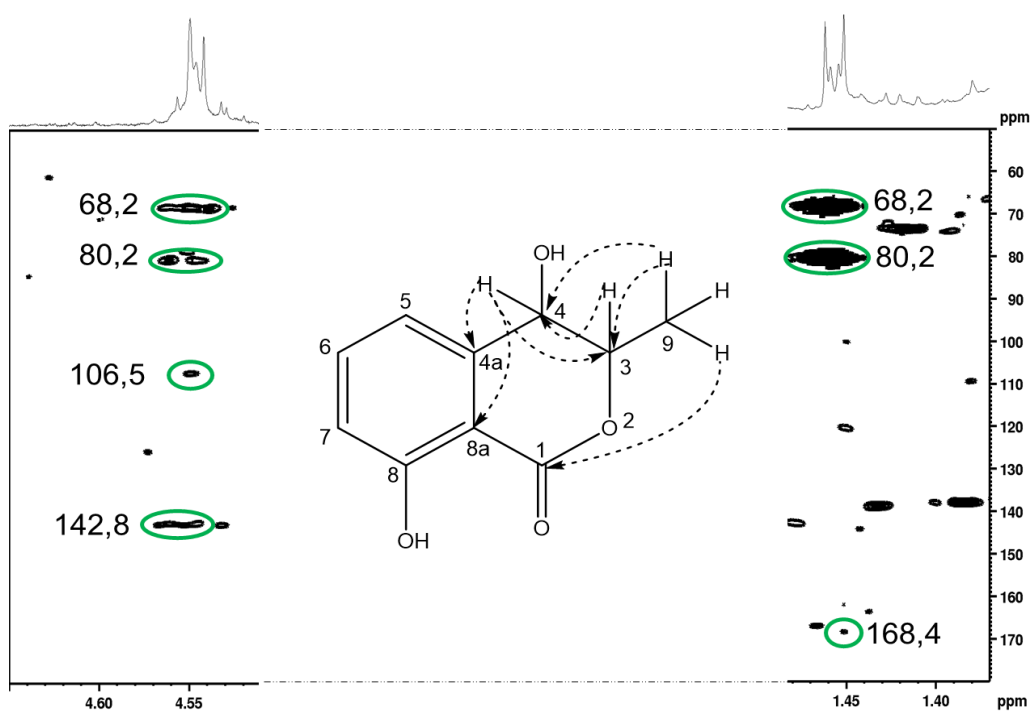
Fonte: do autor.

Figura 44 – Correlações observadas para a porção lactônica do composto em análise no espectro de HSQC da subfração AEm68-C em CD₃OD, 14,1 T a 25 °C



Fonte: do autor.

Figura 45 – Correlações observadas para a porção lactônica do composto em análise no espectro de HMBC da subfração AEm68-C em CD₃OD, 14,1 T a 25 °C



Fonte: do autor.

Além de tudo, o padrão de substituição observado para o anel benzênico, assim como os valores de deslocamentos de ^1H e ^{13}C similares já foram relatados por outros autores para alguns derivados isocumarínicos como a meleína ou 3,4-dihidroisocumarina (CHACÓN-MORALES *et al.*, 2013) e a 4-hidroximeleína (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Na **Tabela 13** se estabelece uma comparação dos dados de RMN obtidos para esta última substância e os dados derivados das **Figuras 34 – 45** com o intuito de propor a estrutura mais provável para a substância em análise.

As informações fornecidas na **Tabela 13** não só evidenciam uma similaridade entre os deslocamentos químicos observados para os hidrogênios e carbonos do anel aromático, como também mostram valores muito próximos das constantes de acoplamento entre os hidrogênios do anel e suas multiplicidades. Esta correspondência também se observa para deslocamentos químicos dos carbonos e os hidrogênios da porção lactônica da molécula. Estes resultados sugerem a presença da 4-hidroximeleína na amostra AEm68-C. Sendo assim, propõe-se que o composto em análise possui um anel benzênico hidroxilado no C8 e um anel lactônico metilado no C3 e hidroxilado no C4. Ambos os anéis se ligam através dos carbonos C4a e C8a.

Tabela 13 – Comparação dos deslocamentos químicos (ppm) de ^1H e ^{13}C , constante de acoplamento (J) e multiplicidade da 4-hidroximeleína relatada na literatura com os dados do composto em análise

No.	^1H (multiplicidade, J (Hz))		^{13}C	
	CA	4-OHM	CA	4-OHM
1	168,4	169,1
3	4,55-4,53 (m, 1H)	4,63 (dq, 6,5, 2,0)	80,2	78,1
4	4,55-4,53 (m, 1H)	4,50 (d, 2,0)	68,2	67,2
5	7,07 (dd, 7,50, 1,0, 1H)	6,86 (d, 7,5)	116,3	118,5
6	7,56 (dd 8,39, 7,50, 1H)	7,45 (dd, 7,5, 8,5)	136,3	136,7
7	6,92 (dd, 8,39, 1,0, 1H)	6,96 (d, 7,5)	116,4	118,2
8	161,5	162,1
4a	142,8	140,5
8a	106,5	106,8
9	1,45 (dd, 6,27, 1,79, 3H)	1,51 (d, 6,50)	16,8	16,0

Fonte: do autor.

Legenda: CA: Composto em análise (CD_3OD); 4-OHM: 4-hidroximeleína ($\text{DMSO}-d_6$)

Na **Tabela 14** são apresentados os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C e suas correlações observadas nos espectros bidimensionais da 4-hidroximeleína e a **Figura 46** representa a estrutura química deste metabólito bem como as correlações observadas (**Figuras 38-45**).

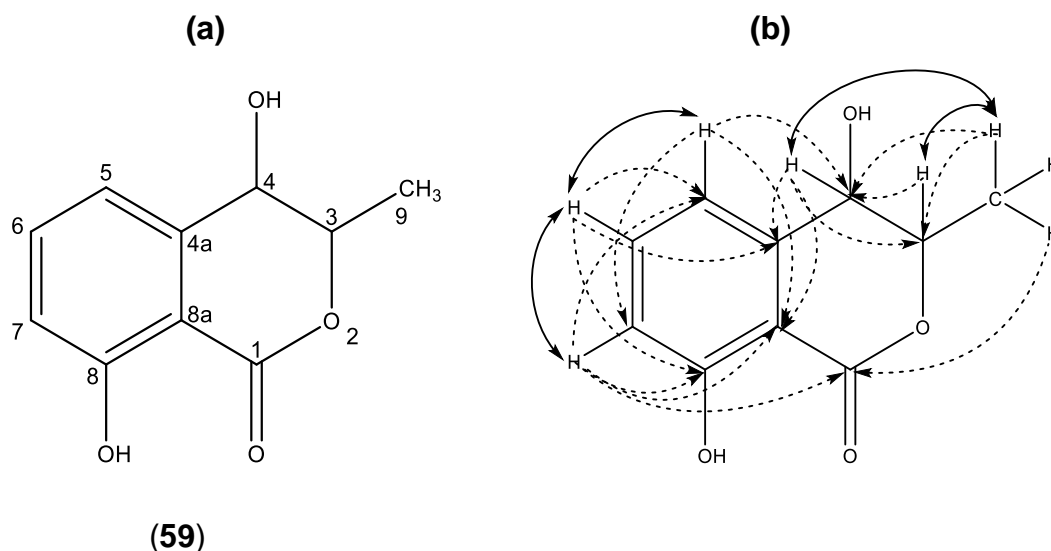
Tabela 14 - Deslocamento químico δ (ppm) e constante de acoplamento J (Hz) para a 4-hidroximeleína em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C

No.	^1H	^{13}C	HMBC	COSY
1	168,4
3	4,55-4,53 (m, 1H)	80,2	68,2	H9
4	4,55-4,53 (m, 1H)	68,2	80,2; 106,5; 142,8	H9
4a	142,8
5	7,07 (dd, 7,50, 1,0, 1H)	116,3	68,2; 106,5; 116,4	H6
6	7,56 (dd 8,39, 7,50, 1H)	136,3	116,3; 142,8; 161,5	H5; H7
7	6,92 (dd, 8,39, 1,0, 1H)	116,4	106,5; 116,3; 161,5; 168,4	H6
8	161,5
8a	106,5
9	1,45 (d, 4,50, 1,70, 3H)	16,8	68,2; 80,2; 168,4	H3; H4
8-OH**	10,93 (s)	106,6; 117,8; 161,8

Fonte: do autor.

Legenda: ** dados derivados dos espectros de ^1H e HMBC adquiridos em CDCl_3

Figura 46 – Estrutura da 4-hidroximeleína: a) Estrutura química; b) Correlações observadas nos espectros de COSY (linha contínua) e HMBC (linha descontinua)



Fonte: do autor.

Durante a elucidação estrutural da 4-hidroximeleína constaram-se três limitações, que não permitiram realizar uma elucidação estrutural mais apurada do composto. Dentre as limitações podem-se citar:

- a) A integral do sinal em 4,55-4,53 (H3 e H4) no valor de 1 não mostrou correspondência com a quantidade de hidrogênios contidos no sinal (2H) e nem com as integrais determinadas para os outros sinais da estrutura no espectro de hidrogênio (**Figura 42**).
- b) Não foi possível estabelecer a multiplicidade dos sinais dos H3 e H4 para determinar com precisão a constante de acoplamento envolvida na correlação observada entre estes hidrogênios e entre cada um deles com o H9 (**Figura 43**).
- c) Não foi possível determinar a configuração *cis* ou *trans* da 4-hidroximeleína identificada sustentado nas constantes de acoplamento entre H3 e H4, sendo que para a o isômero *cis* $J=1,5$ Hz e para o *trans* $J=4,5$ Hz (ASHA *et al.* 2004).

Considera-se que estas limitações foram causadas por vários aspectos, que vão desde as características intrínsecas da amostra estudada até alguns ajustes que foram necessários durante a aquisição dos espectros de RMN. Neste sentido, destacam-se:

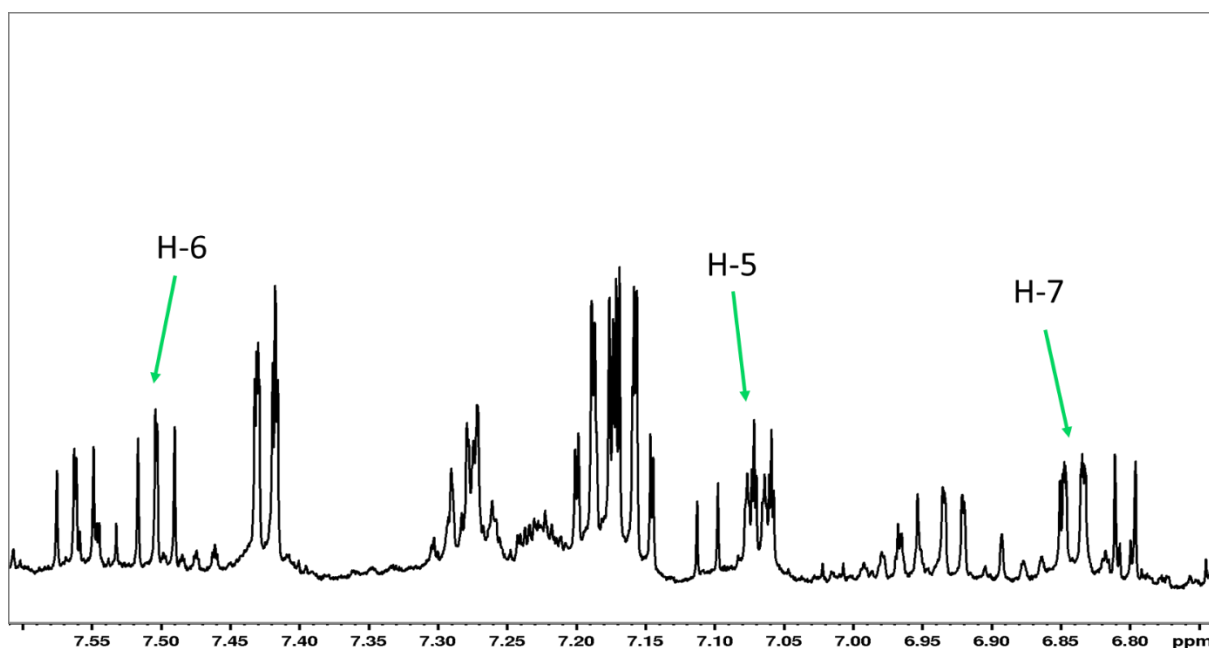
- a) A presença de uma mistura complexa na amostra AEm68-C que com frequência provocou a sobreposição de sinais, dificultando a leitura dos espectros. Este aspecto se evidenciou com particular ênfase durante a análise do sinal em 4,55-4,53 ppm (H3, H4).
- b) As baixas quantidades dos compostos alvo na mistura, o que não possibilitou adquirir espectros de ^{13}C que permitissem uma visualização mais clara dos sinais de interesse, proporcionando uma elucidação estrutural mais robusta.
- c) O intenso sinal da água que foi observado no primeiro espectro de ^1H adquirido para a amostra em estudo (**Apendice C, Figura 67**), onde foi necessário realizar a supressão deste sinal por meio de um experimento NOESY. É sabido que este procedimento possibilita recuperar os sinais dos metabólitos que se sobrepõem à ampla linha de base da forte ressonância da água (CHEN *et al.*, 2004; ADAMS *et al.*, 2013). No entanto, este ajuste pode produzir a perda de alguns sinais, e, em alguns casos, uma redução não uniforme dos sinais dos compostos da amostra (CHEN *et al.*, 2004). Considera-se que estes problemas, decorrentes do efeito NOE durante a irradiação do sinal da água, afetaram particularmente os sinais de H3 e H4 (4,55-4,53 ppm) pela proximidade do sinal da água (4,84 ppm), o que provavelmente intensificou as limitações acima descritas.

De acordo com dados fornecidos pela literatura (ASHA *et al.*, 2004; CIMMINO *et al.*, 2017; DEVYS *et al.*, 1992; PONGCHAROEN *et al.*, 2007) todos os sinais obtidos através de análise por RMN sugerem a estrutura da *trans*-4-hidroximeleína, além disso, de acordo com estas análises, possivelmente, a *cis*-4-hidroximeleína também esteja presente na amostra AEm68-C, o que pode ser observado através dos sinais que se apresentam nas **Figuras 47 e 48**. Segundo Devys *et al.* (1992) os isômeros *cis* e *trans* da 4-hidroximeleína são frequentemente encontrados como mistura racêmica porque

ambos são biosintetizados a partir da oxidação da meleína ou 3-metil-3,4-dihidrocumarina.

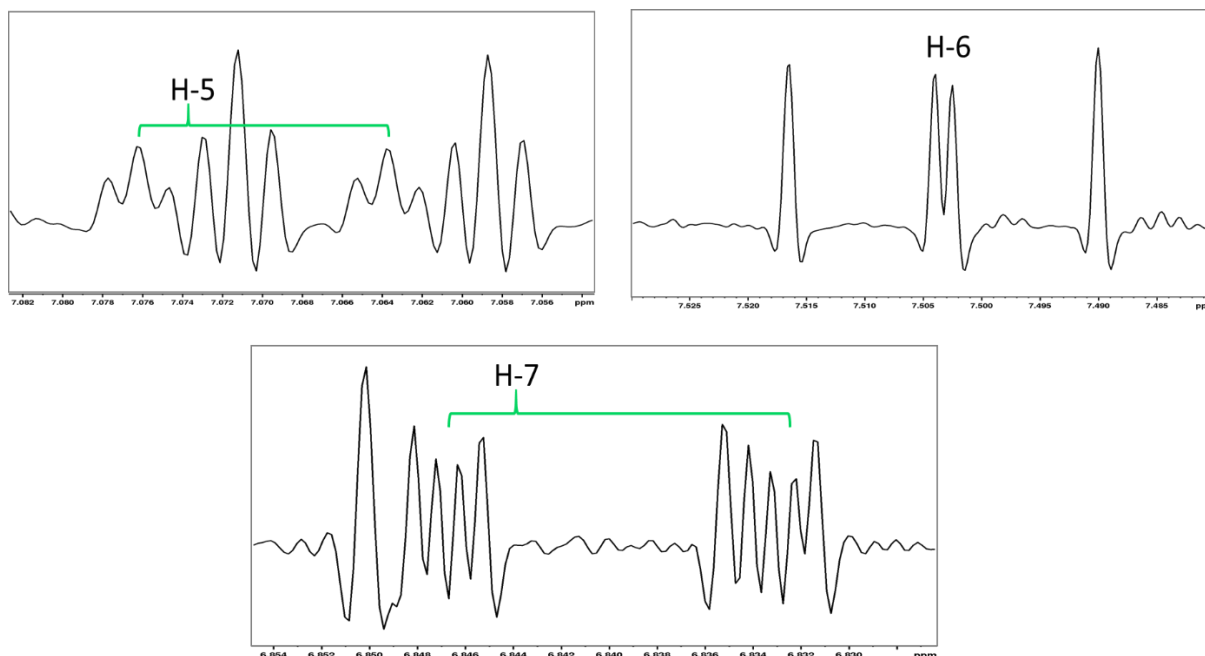
Considerando a incerteza a respeito da configuração *cis* ou *trans* dos isômeros identificados, os compostos serão denominados como isômero I (composto apresentado até a **Figura 46**) e isômero II, para facilitar a apresentação da informação. Conseqüentemente, as representações das estruturas não indicarão uma configuração espacial relativa dos grupos OH ligado ao carbono C4 e o grupo CH₃ (C9).

Figura 47 – Sinais identificados para os hidrogênios H5, H6, e H7 do isômero II no espectro de ¹H (região entre 7,61 – 6,74 ppm) da subfração AEm68-C em CD₃OD, 14,1 T a 25 °C



Fonte: do autor.

Figura 48 – Sinais ampliados para os hidrogênios H5, H6 e H7 da isômero II no espectro de ^1H da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T, lb: -1, gb: 0,2 a 25 °C



Fonte: do autor.

Como observado, os sinais H5, H6 e H7 do isômero II apresentam deslocamentos bem próximos aos determinados para o isômero I, bem como semelhanças na multiplicidade e constantes de acoplamento, o que corrobora com a presença do isômero II na mistura. Estas e outras informações obtidas a partir espectros de RMN 2D podem ser consultadas na **Tabela 15**. Em seguida, as correlações detectadas nos espectros 2D de COSY e HMBC foram representadas nas **Figuras 49 e 50** respectivamente.

As correlações no espectro de COSY (**Figura 49**) são praticamente uma réplica das observadas para o isômero I (Figura 38). Já no HMBC, observa-se que o H5 possui uma correlação com um carbono sp^3 em δ 66,4 (**Figura 50**), o que seria um deslocamento químico similar ao detectado para o carbono carbinólico C4 no isômero I. Devido às limitações e causas acima descritas, não foi possível elucidar a estrutura da porção lactônica para o isômero II, mas os resultados aqui apresentados, junto com os dados reportados pela literatura consultada, permitem sugerir que o isômero II referente à 4-hidroximeleína está presente na mistura da fração AEm68-C.

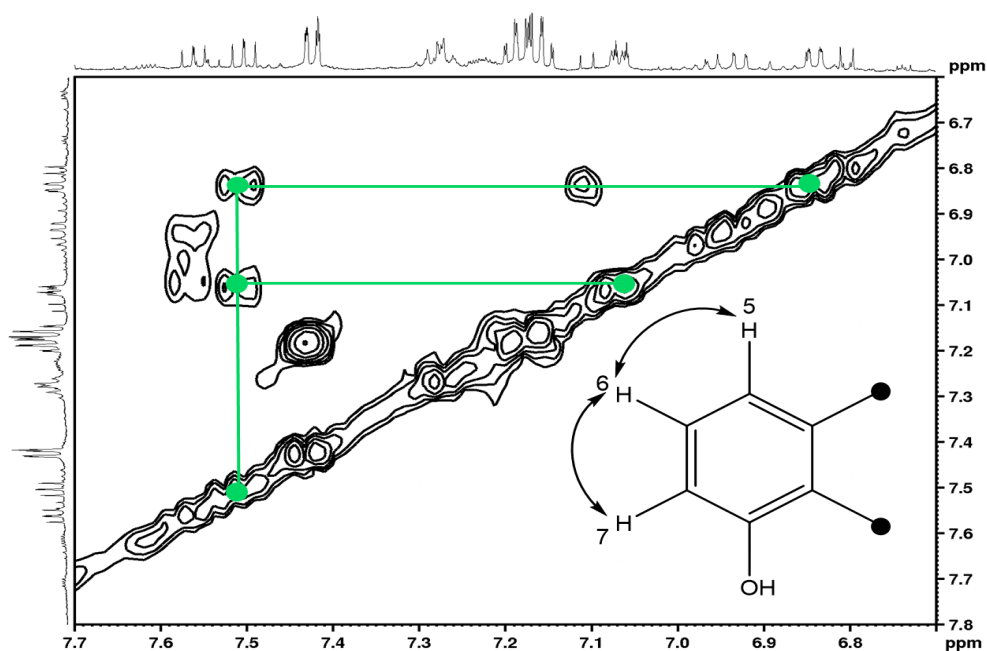
Tabela 15 - Deslocamento químico δ (ppm) e constante de acoplamento J (Hz) para a parte aromática do isômero II em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C

No.	^1H	^{13}C	HMBC	COSY
4a	147,1
5	7,07 (dd, 7,50, 1,0, 1H)	116,4	66,4; 115,0; 162,2	H6
6	7,50 (dd 8,39, 7,50, 1H)	136,3	115,0; 116,1; 147,1; 162,2	H5; H7
7	6,84 (dd, 8,39, 1,0, 1H)	116,1	115,0; 116,4; 147,1; 162,2	H6
8	162,2
8a	115,0
8-OH	n.o.

Fonte: do autor.

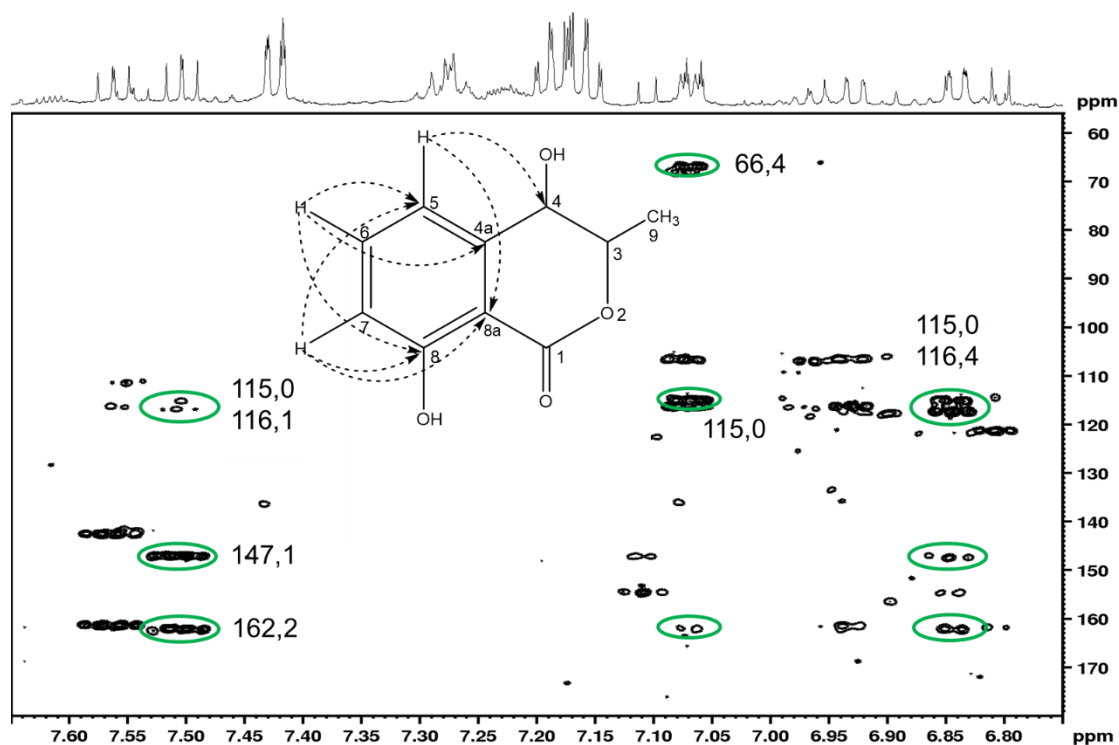
Legenda: n.o.: Não observado.

Figura 49 – Correlações observadas para a parte aromática do isômero II no espectro de COSY da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C



Fonte: do autor.

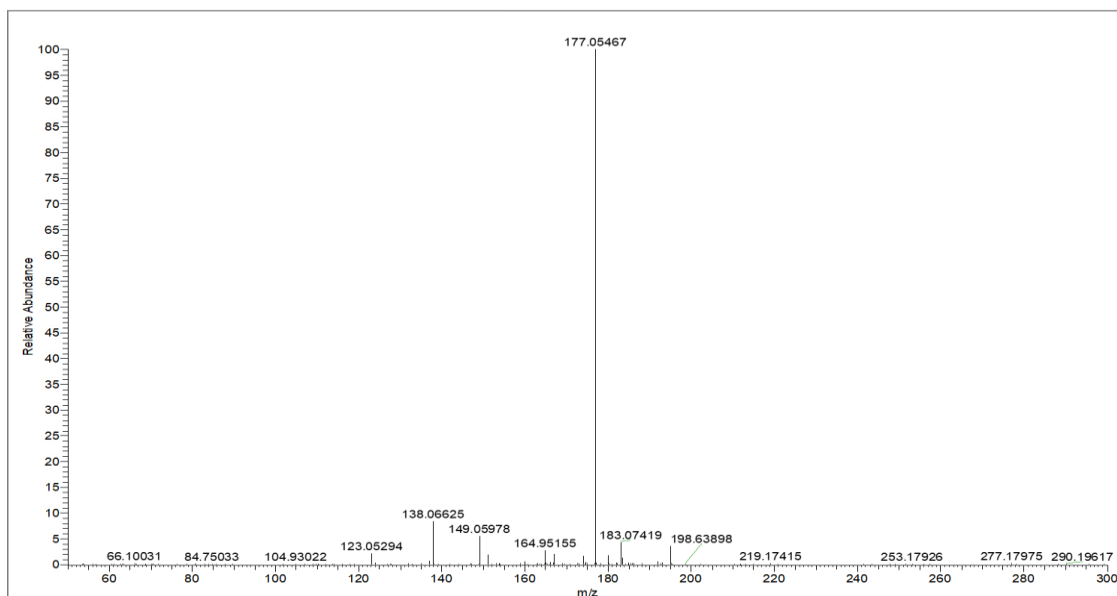
Figura 50 – Correlações observadas para a parte aromática do isômero II no espectro de HMBC da subfração AEm68-C em CD₃OD, 14,1 T a 25 °C



Fonte: do autor.

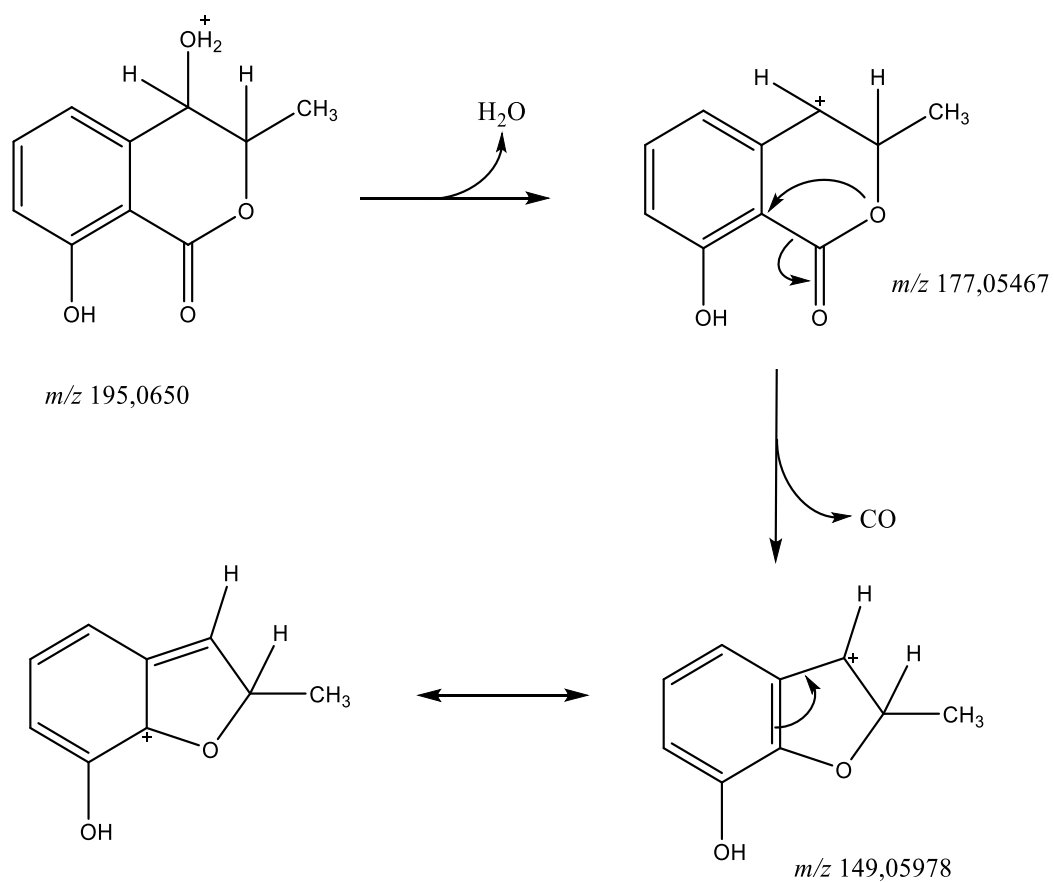
A espectrometria de massas (HRESIMS) forneceu dados precisos quanto à identificação da 4-hidroximeleína na amostra AEm68-C. A fragmentação dos compostos com m/z 195 (**Figura 51**) mostrou um pico em m/z 195,0650 que se corresponde com o pico do íon molecular $[M+H]^+$ da 4-hidroximeleína em sua forma protonada, sugerindo a fórmula molecular C₁₀H₁₁O₄ (massa exata: 195,065735 uma, $\Delta M_i = 3,7$ ppm). Além disso, foi detectado um íon com m/z 177,05467 (pico base) devido à perda de água e um outro íon fragmento com m/z 149,05978 formado pela saída do grupo CO (**Figura 52**). Por outro lado, considerando-se que a reação Retro Diels Alder (RDA) foi descrita para as meleínas (DJOUKENG *et al.*, 2009), a **Figura 53** mostra um mecanismo diferente para a perda de água que possibilita a RDA para a formação do íon fragmento em m/z 135,04150, também detectado durante as análises de massas.

Figura 51 – Espectro de massas ESI(+)-MS/MS do íon m/z 195



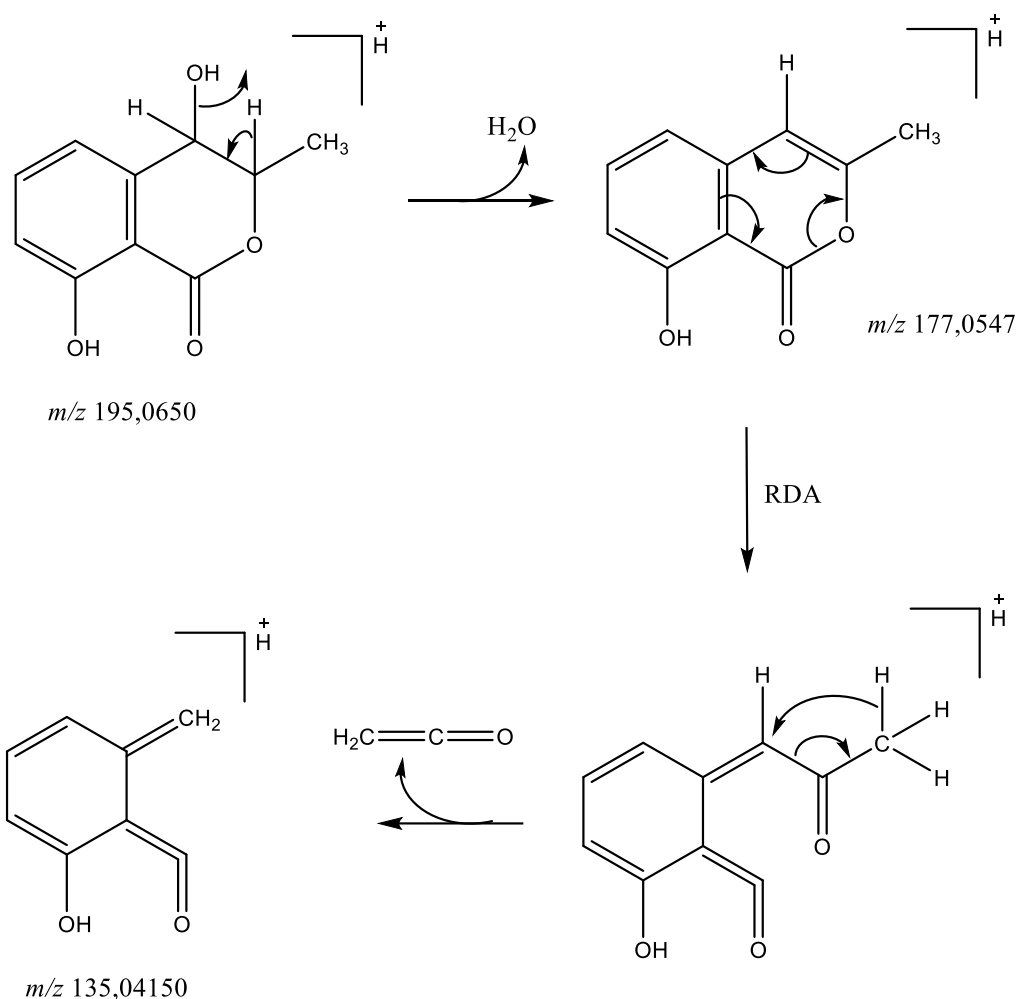
Fonte: do autor.

Figura 52 – Prováveis fragmentações da 4-hidroximeleína para perda de H_2O e CO



Fonte: do autor.

Figura 53 – Prováveis fragmentações da 4-hidroximeleína para ocorrência da reação RDA



Fonte: do autor.

Legenda: RDA: Reação Retro Diels Alder

Apesar das limitações apontadas durante as análises dos espectros de RMN, existe uma complementação acertada entre esta técnica e os resultados da EM que permitiu identificar a 4-hidroximeleína na amostra AEm68-C. Estes dados encontram respaldo em informações extraídas da literatura, que mostram que esta e outras meleínas já foram isoladas a partir do endófito *Lasiodiplodia theobromae* (Tabela 1) e de outros endófitos usando o meio de cultura Czapek (SALVATORE *et al.*, 2020). Outro aspecto interessante se constatou durante as análises dos espectros 1D e 2D adquiridos para esta amostra, onde foram detectados e estudados alguns sinais que denotam a presença de pelo menos mais duas meleínas na mistura, que devido à insuficiência de dados não foram inseridas no presente trabalho.

A atividade biológica das meleínas tem sido estudada e, em particular a 4-hidroximeleína, que em princípio era considerada como um potente fitotóxico (DJOUKENG *et al.*, 2009; TAWFIKE *et al.*, 2019), tem mostrado uma ampla gama de efeitos de importância farmacológica que a convertem em um antimicrobiano promissor. A **Tabela 16** apresenta um resumo das principais atividades biológicas encontradas para este composto.

Tabela 16 – Atividade biológica da 4-hidroximeleína

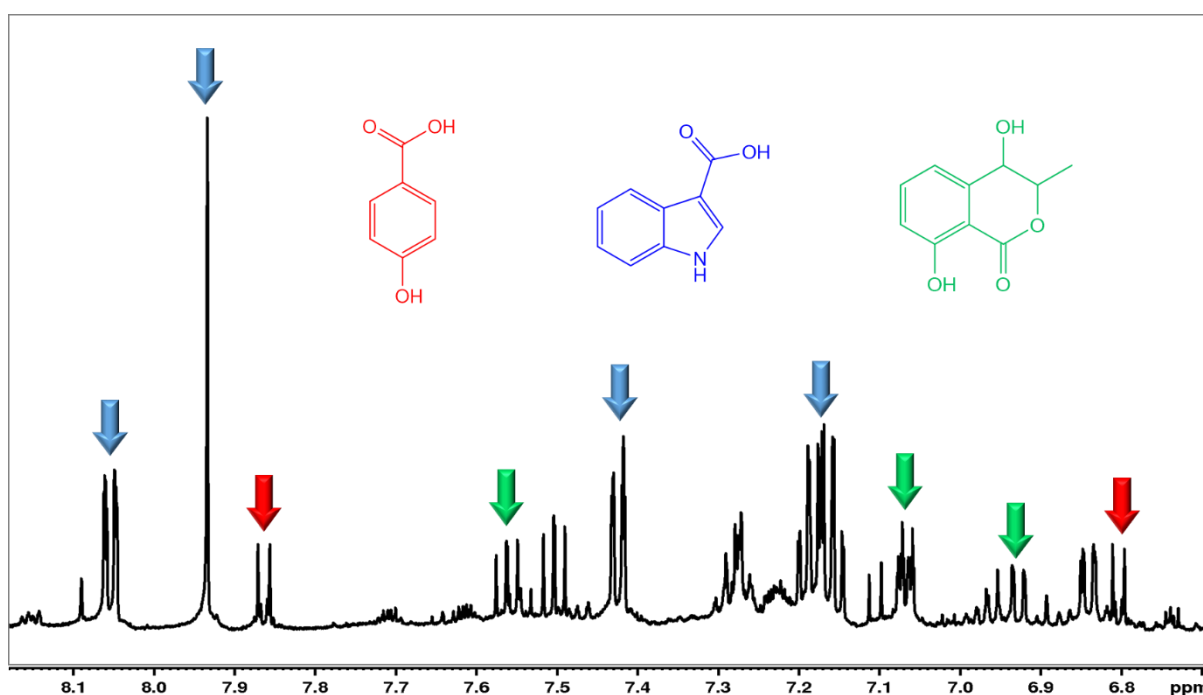
Fonte vegetal	Endófito	Atividade biológica	Referência
<i>Garcinia mangostana</i>	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	Antibacteriano: SA e MRSA (MIC: 128 µg.mL ⁻¹)	(RUKACHAISIRIKUL <i>et al.</i> , 2009)
<i>Myxilla incrustans</i>	<i>Microsphaeropsis</i> sp.	Antifúngico: <i>Eurotium repens</i> e <i>Ustilago violácea</i> (DA: ~50 µg)	(HÖLLER <i>et al.</i> , 1999)
<i>Smallanthus sonchifolius</i>	<i>Apiospora montagnei</i>	Antiparasitário: <i>Schistosoma mansoni</i> (MIC: 12,5 µg.mL ⁻¹)	(RAMOS <i>et al.</i> , 2013)
<i>Markhamia platycalyx</i>	<i>Aspergillus flocculus</i>	Anticâncer: linhagem celular de leucemia mielóide K562 (30 µM)	(TAWFIKE <i>et al.</i> , 2019)
<i>Alibertia macrophyla</i>	<i>Penicillium</i> sp.	Antifúngico: <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>C. sphaerospermum</i> (Bioautografia: 5µg e 10µg respectivamente)	(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2009)

Fonte: do autor.

Legenda: SA: *Staphylococcus aureus*; MRSA: *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente (pelas siglas em inglês); CIM: Concentração Inibitória Mínima; DA: Difusão em Ágar.

A seguir, a **Figura 54** reúne os sinais detectados na região de aromáticos para os três compostos que foram identificados na mistura complexa da amostra AEm68-C.

Figura 54 - Sinais de hidrogênios aromáticos identificados no espectro de RMN- ^1H (8,18 – 6,69 ppm) pertencentes a compostos específicos presentes na amostra AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C



Fonte: do autor.

5.3.3.2 Análise da mistura de compostos presentes na amostra AEm68-E

- **4-hidroxifenilacetamida**

Um outro composto conhecido foi identificado na amostra AEm68-E, cuja elucidação estrutural se descreve a seguir, baseado nos dados representados na **Tabela 17**.

De forma similar como descrito para o ácido 4-hidroxibenzoico, no espectro de ^1H da amostra AEm68-E (**Figura 55**) foram observados sinais em δ 7,09 (H2,6) e 6,71 (H3,5) cada sinal integrando para dois H, que indicam a presença de um sistema aromático para-dissubstituído. A multiplicidade encontrada para esses sinais (duplo duplo dubleto), assim como os valores de J se correspondem com a presença de um

sistema aa'bb', característico deste tipo de substituição do anel benzênico. Por outro lado, foi observado um sinal em forma de singleto em δ 3,43 (H7) integrando para dois H, característico de grupo CH₂ desblindado devido à proximidade com anel aromático e grupos funcionais (**Tabela 17**).

Tabela 17- Deslocamento químico δ (ppm) e constante de acoplamento J (Hz) para a 4-hidroxifenilacetamida em CD₃OD, 14,1 T a 25 °C

No.	¹ H	¹³ C	HMBC	COSY
1	128,2	
2,6	7,09 (ddd; J=8,39, 2,16, 0,55; 2H)	131,4	42,4; 115,8; 131,4; 157,2	H3; H5; H7
3,5	6,71 (ddd; J=8,39, 2,10; 0,55; 2H)	115,8	115,8; 128,2; 157,2	H2; H6
4	157,2	
7	3,43 (s; 2H)	42,4	128,2; 131,4; 177,1	H2; H6
8	177,1	
4-OH	n.o.	
8-NH ₂	n.o.	

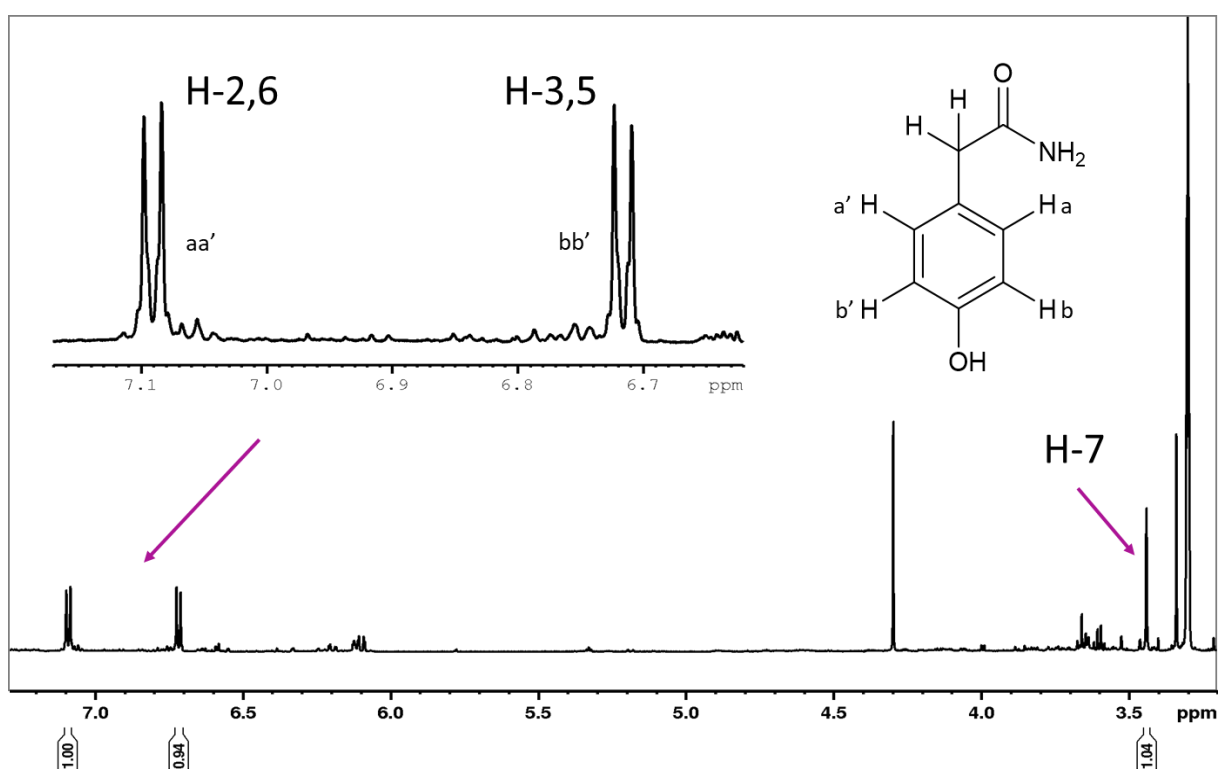
Fonte: do autor.

Legenda: n.o.: Não observado.

A análise do espectro HSQC (**Figura 56**) permitiu definir os carbonos (C-H sp²) da estrutura: C2,6 (131,4 ppm) e C3,5 (115,8 ppm). Já o espectro de HMBC (**Figura 57**) mostrou as correlações entre os H2,6 com C3,5 e H3,5 com C2,6 e com os carbonos não hidrogenados do anel: C1 (128,2 ppm) e C4 (157,2 ppm). Os hidrogênios H2,6, acoplado com o C7 (42,4 ppm), enquanto o H7 correlaciona com o C8 (177,1 ppm), um carbono carbonílico pertencente a um grupo funcional amida. O carbono quaternário aromático com δ 157,2 indicou a presença de um grupo hidroxila OH ligado a ele (**Tabela 17**).

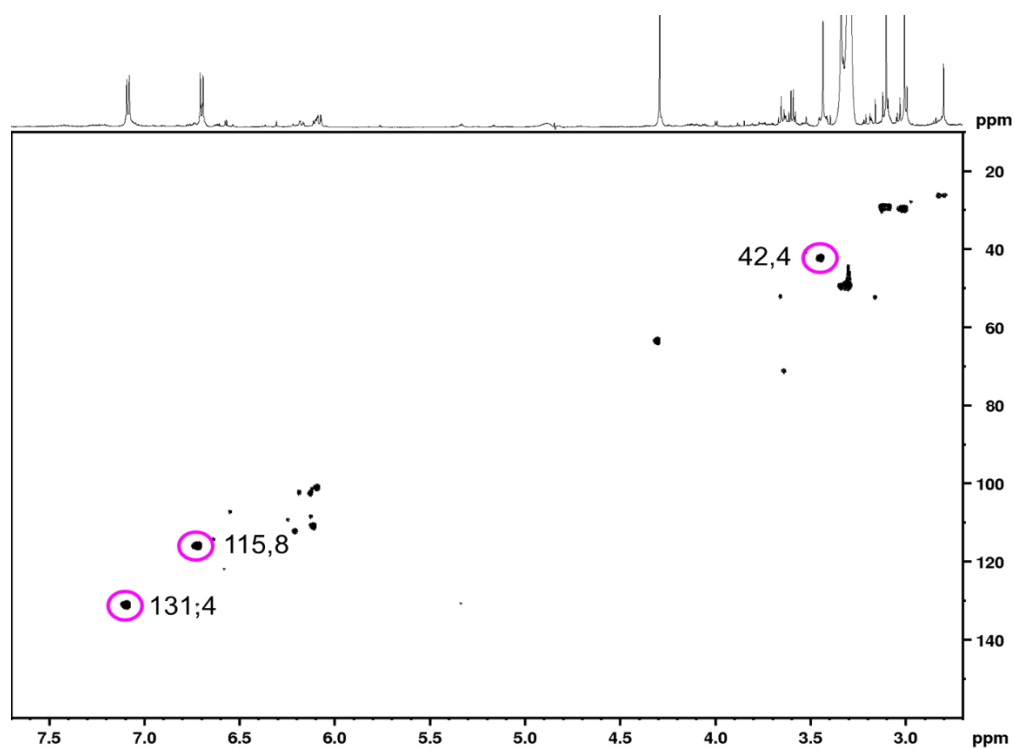
Finalmente, as correlações observadas no espectro COSY (**Figura 58**) corroboram com a presença do anel benzênico na estrutura (correlações entre os H2,6 e os H3,5) e a substituição do C com δ 42,4 na posição 1 (correlação dos H2,6 com H7). A **Figura 59** mostra a estrutura deste composto (4-hidroxiacetamida) após as análises feitas e as correlações observadas nos espectros de HMBC e COSY.

Figura 55 – Sinais identificados para a 4-hidroxifenilacetamida no espectro de ^1H (região entre 7,3 – 3,2 ppm) da subfração AEm68-E em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C



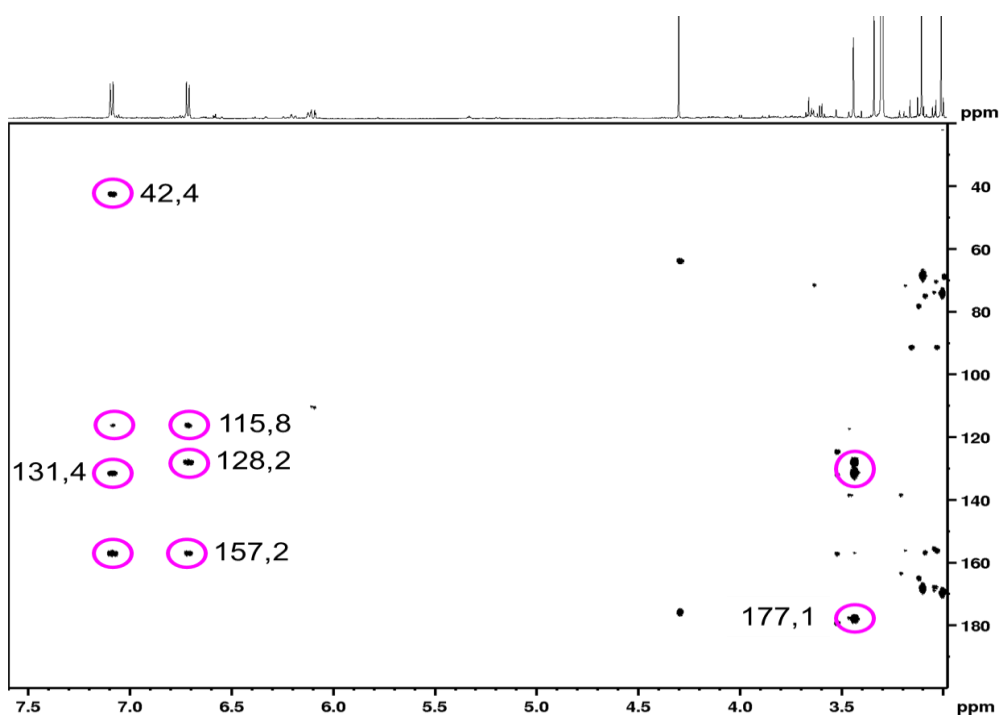
Fonte: do autor.

Figura 56 – Correlações observadas para a 4-hidroxifenilacetamida no espectro de HSQC da subfração AEm68-E em CD₃OD, 14,1 T a 25 °C



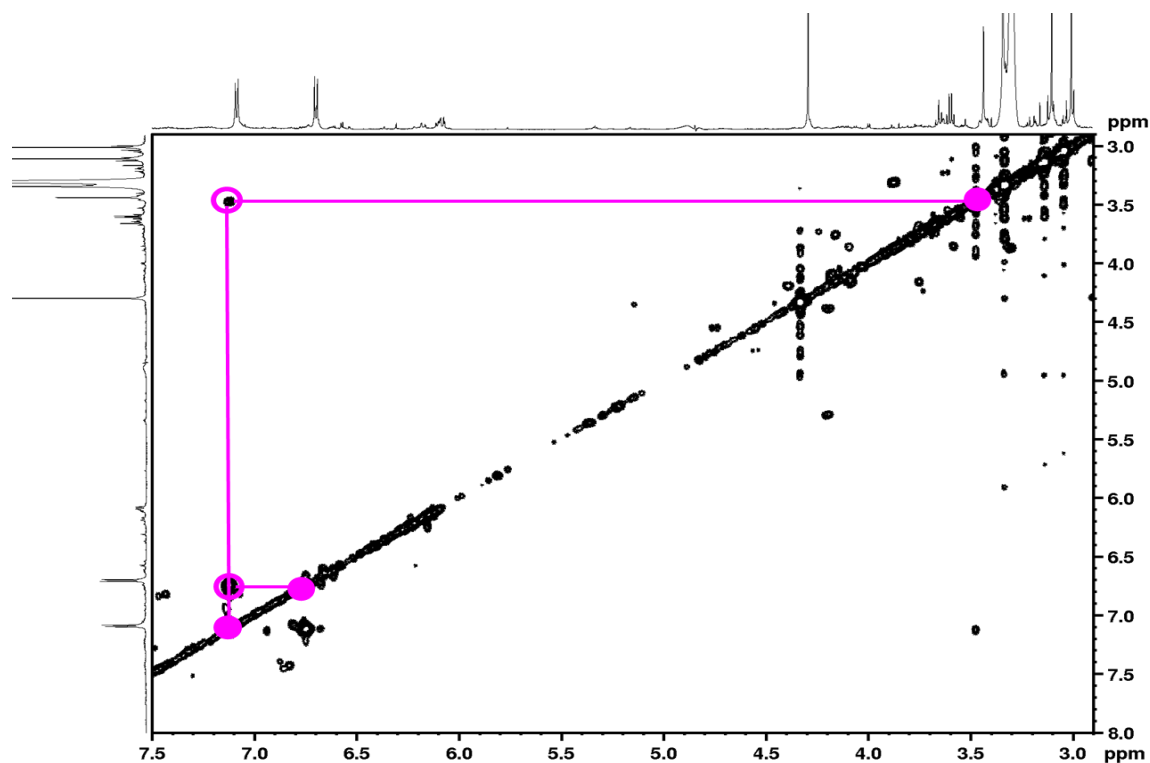
Fonte: do autor.

Figura 57 – Correlações observadas para a 4-hidroxifenilacetamida no espectro de HMBC da subfração AEm68-E em CD₃OD, 14,1 T a 25 °C



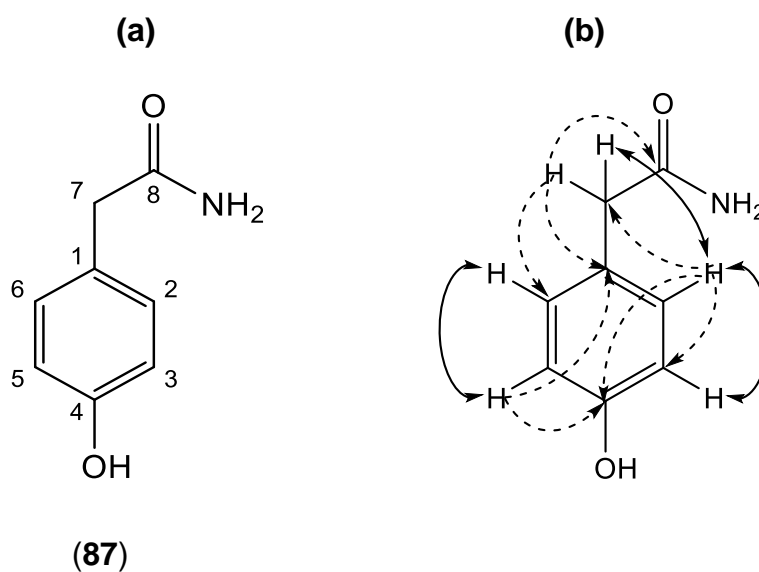
Fonte: do autor.

Figura 58 – Correlações observadas para a 4-hidroxifenilacetamida no espectro de HMBC da subfração AEm68-E em CD₃OD, 14,1 T a 25 °C



Fonte: do autor.

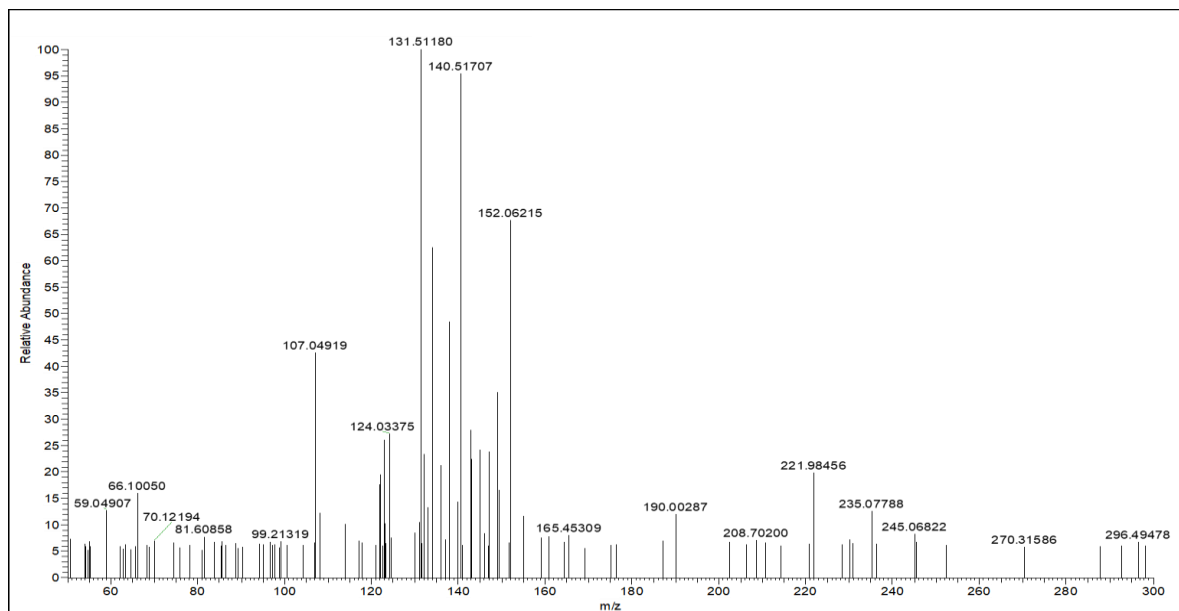
Figura 59 - Representação da 4-hidroxifenilacetamida: a) Estrutura química; b) Correlações observadas nos espectros de COSY (linha contínua) e HMBC (linha descontinua)



Fonte: do autor.

A **Figura 60** mostra o espectro de massas da fragmentação dos compostos com m/z 152, presentes na amostra AEm68-E.

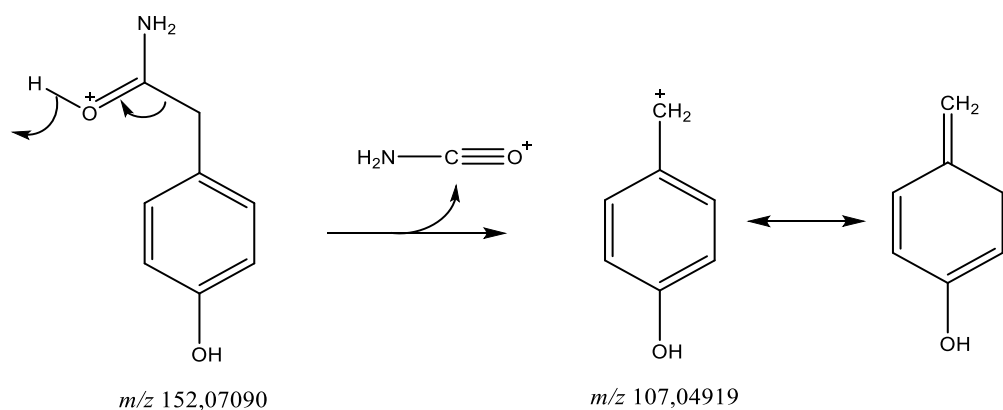
Figura 60 – Espectro de massas ESI (+)-MS/MS do íon m/z 152



Fonte: do autor.

Na análise do espectro observou-se o pico do íon molecular $[M+H]^+$ em m/z 152,07090, que sugere a fórmula molecular $C_8H_{10}O_2N$ (massa exata: 152,071154 uma, $\Delta M_i = 3,7$ ppm), se correspondendo com a da 4-hidroxifenilacetamida na sua forma protonada. Além disso, foi observado um íon fragmento em m/z 107,04919 derivado de uma clivagem α , que é uma fragmentação característica de amidas (**Figura 61**). Para consultar o pico m/z 152,07090 remita-se à **Tabela 20, Apêndice E**.

Figura 61 – Provável fragmentação da 4-hidroxifenilacetamida



Fonte: do autor.

A hidroxifenilacetamida foi anteriormente identificada (junto com outros seis compostos) através da cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa (CG-EM) em extratos de acetato de etila, obtidos da fermentação do fungo endofítico *Penicillium* sp. isolado da espécie *Centella asiatica*. Os autores constataram uma atividade antioxidante significativa do extrato (IC_{50} de $54,72 \pm 2,19 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) equivalente à atividade detectada para o ácido ascórbico (IC_{50} de $50,00 \pm 0,98 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Por outro lado, o extrato de acetato de etila mostrou efeito antiproliferativo contra as linhagens de células humanas HeLa, A431 e MCF7. Estes achados estabelecem uma possível relação do composto 4-hidroxiacetamida com atividades biológicas de grande importância (DEVI; PRABAKARAN, 2014). Recentemente, Willems *et al.* (2020) relataram a participação da 4-hidroxifenilacetamida como um intermediário na rota biossintética de alcaloides quinolínicos com propriedades antimicrobianas.

De forma geral, pode-se afirmar que os compostos identificados nas subfrações AEm68-C e AEm68-E, incluindo o ácido indol-3-carboxílico, que foi isolado de uma da subfração AEm9-C, possuem um potencial antimicrobiano descrito na literatura e na própria atividade antimicrobiana observada durante os testes realizados neste trabalho, que apresentaram sua máxima expressão contra leveduras.

O uso da espectroscopia da RMN foi crucial para o sucesso na identificação dos metabólitos -mesmo que conhecidos- nas amostras analisadas. As técnicas 1D (^1H e ^{13}C) e 2D (COSY, HSQC, HMBC, TOCSY, entre outras) são muito empregadas atualmente na identificação de compostos conhecidos em misturas complexas de amostras biológicas e de plantas (VAN DER HOOFT; RANKIN, 2018). Apesar de ser uma técnica de baixa sensibilidade, estes autores salientam a grande reprodutibilidade da RMN, sendo muito útil em estudos de metabolômica. No presente trabalho, o uso de uma sonda criogênica para adquirir os espectros possibilitou as análises e a identificação dos compostos aqui apresentados, lembrando que, como trata-se de misturas, provavelmente as quantidades reais destes compostos são da ordem de μg , o que faz desta técnica espectroscópica uma poderosa ferramenta na elucidação estrutural de substâncias.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- a) Este trabalho permitiu o isolamento de 103 fungos endofíticos que foram submetidos a um *screening* para determinar a sua atividade antibiótica, se detectando um potencial antibacteriano e antifúngico em aproximadamente 10% dos fungos isolados.
- b) O processo fermentativo do fungo endofítico *Lasiodiplodia* sp. permitiu a obtenção de extratos brutos, frações e subfrações com atividade antimicrobiana, indicando um potencial promissor contra patógenos Gram positivos e leveduras.
- c) A atividade antimicrobiana observada contra os patógenos *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* constitui uma expressão clara das potencialidades dos produtos naturais produzidos pelo endófito *Lasiodiplodia* sp. na procura de soluções viáveis ao problema da resistência antimicrobiana.
- d) O fracionamento dos extratos brutos e frações mostrou que a atividade antimicrobiana poderia aumentar ou diminuir, o que se sustenta na influência das interrelações que se estabelecem entre os compostos que fazem parte das misturas.
- e) A atividade antimicrobiana observada para frações e subfrações estão relacionadas à presença de metabólitos secundários bioativos que foram identificados através de técnicas cromatográficas, espectroscópicas e espectrométricas.
- f) As análises químicas das frações e subfrações possibilitaram o isolamento do ácido indol-3-carboxílico, assim como a identificação de quatro compostos por CG/EM ((Z) -docos-13-enamida, metil (Z) -octadec-9-enoato, (Z)-octadec-9-enamida, dodecanamida) e mais quatro compostos por RMN/HRESIMS em misturas complexas (ácido-4-hidroxibenzóico, ácido indol-3-carboxílico, 4 hidroximeleina e 4-hidroxifenilacetamida).
- g) A técnica de RMN se ratifica como uma poderosa ferramenta na identificação de metabólitos secundários em misturas complexas.

Por se tratar de um trabalho que marcou o começo de uma linha de pesquisa, dirigida à identificação dos metabólitos secundários produzidos por fungos endófitos isolados do Ipê no Laboratório de Bioprocessos da UNIFAL-MG, o mesmo tem servido de base para a execução e/ou planejamento de outros trabalhos vinculados à pesquisa no grupo, sob a condução e orientação da Professora Jaine H.H. Luiz. Estes trabalhos são elencados a seguir:

- a) Estudos de otimização de meios de cultura: já foi defendido um trabalho de Dissertação da PPGBIOTEC que conseguiu otimizar parâmetros relativos aos componentes do meio de cultura e ao tempo de cultivo para obter os maiores rendimentos de extratos com atividade antimicrobiana.
- b) Estudo químico de extratos obtidos em meios de cultura otimizados: em execução por um mestrando do PPGQ que dará continuidade ao trabalho acima citado visando a identificação/isolamento dos compostos responsáveis pela atividade biológica dos extratos, incluindo substâncias inéditas.
- c) Estudos de atividade antimicrobiana: planeja-se a realização de estudos onde seja mensurada a capacidade coadjuvante dos compostos identificados em sua forma pura (isolados) ou adquiridos comercialmente, quando associados a antimicrobianos clássicos.
- d) Estudos de co-cultivo de endófitos: em execução por uma mestranda do PPGBIOTEC com o intuito de analisar o comportamento dos endófitos *Preussia africana* e *Lasiodiplodia* sp. (ambos isolados do Ipê) bem como estudar os metabólitos secundários envolvidos na interação entre os fungos.

REFERÊNCIAS

- ABDALHA, A. A.; MEKAWAY, A. A. I. Antimicrobial susceptibility of certain fungal and bacterial strains to dodecanamide and quinazolinone derivatives. **World Applied Sciences Journal**, v. 24, p. 312-319, jan. 2013.
- ABRAHAM, J.; SILAMBARASAN, S. Role of novel fungus *Lasiodiplodia* sp. JAS12 and plant growth promoting bacteria *Klebsiella pneumoniae* JAS8 in mineralization of endosulfan and its metabolites. **Ecological Engineering**, v. 70, p. 235–240, set. 2014.
- ADAMS, R. W. *et al.* “Perfecting” WATERGATE: clean próton NMR spectrum from aqueous solution. **Chemical Communications**, v. 49, n. 4, p. 358-360, jan. 2013.
- ADNAN, M. *et al.* Investigation of the Biological Activities and Characterization of Bioactive Constituents of *Ophiorrhiza rugosa* var. *prostrata* (D. Don) & Mondal Leaves through *In Vivo*, *In Vitro*, and *In Silico* Approaches. **Molecules**, v. 24, n. 7, 8 abr. 2019.
- AGOSTINI, Sandra Barbosa Neder. **Prospecção de compostos bioativos no produto de fermentação de fungos endofíticos isolados de *Handroanthus impetiginosus***. 2016. 69 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2016. Disponível em: <https://bdtd.unifal-mg.edu.br:8443/handle/tede/980>. Acesso em: 19 fev. 2018.
- AKHOUNDI, M. *et al.* A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, p. 1–40, 3 mar. 2016.
- ANCHEEVA, E.; DALETOS, G.; PROKSCH P. Bioactive Secondary Metabolites from Endophytic Fungi. **Current Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 11, p. 1836-1854. 2020.
- ANDERTON, M. J. *et al.* Pharmacokinetics and tissue disposition of 3-indole-3-carbinol and its acid condensation products after oral administration to mice. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 15, p. 5233–5241, ago. 2004.
- ANDOLFI, A. *et al.* Lasiojasmonates A–C, three jasmonic acid esters produced by *Lasiodiplodia* sp., a grapevine pathogen. **Phytochemistry**, v. 103, p. 145–153, 23 abr. 2014.
- ALI, A.; JAVAID, A.; SHOAIB, A. GC-MS analysis and antifungal activity of methanolic root extract of *Chenopodium album* against *Sclerotium rolfsii*. **Planta Daninha**, v. 35, 07 ago. 2017.
- ALI, S. S. *et al.* Genome and transcriptome analysis of the latent pathogen *Lasiodiplodia theobromae*, an emerging threat to the cacao industry. **Genome**, v. 63, n. 1 p. 37-52, jan. 2020.
- ALVES DA CUNHA, M. A. *et al.* Lasiodiplodan, an exocellular (1->6)-b-D-glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: production on glucose, fermentation kinetics, rheology and anti-proliferative activity. **Journal of Indian Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 1179–1188, ago. 2012.

ARAÚJO, I. A. C. *et al.* Efficacy of lapachol on treatment of cutaneous and visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 199, p. 67-73, 21 fev 2019.

ARAÚJO, W. L. *et al.* (Coord.). **Guia prático**: isolamento e caracterização de micro-organismos endofíticos. Piracicaba, Calo, 2010.

ASHA, K. N.; CHOWDHURY, R.; HASAN, C. M.; RASHID, M. A. Steroids and polyketides from *Uvaria hamiltonii* stem bark. **Acta Pharmaceutica**, v. 54, p. 57–63, fev. 2004.

ASLAM, B. *et al.* Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1645–1658, 10 out. 2018.

ASTUTI, P.; WAHYONO; NABABAN, A. O. Antimicrobial and cytotoxic activities of endophytic fungi isolated from *Piper crocatum* Ruiz & Pav. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 2, p. 592-596, 4 jul. 2014.

BILLE, J. *et al.* Outbreak of human listeriosis associated with tomme cheese in northwest Switzerland, 2005. **Euro surveillance: bulletin Européenne sur les maladies transmissibles**, v. 11, n. 6, p. 11-12, jun 2006.

BRAGA DE OLIVEIRA, A.; RASLAN, D. S.; DE OLIVEIRA, G. G.; MAIA, J. G. S. Lignans and naphthoquinones from *Tabebuia incana*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 5, p. 1409–1412, nov. 1993.

BRANDÃO, G. C. *et al.* Antiviral activities of plants occurring in the state of Minas Gerais, Brazil. Part 2. Screening Bignoniaceae species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 742–750, 12 nov. 2010.

CARLET, C. *et al.* *Lasiodiplodia theobromae* deep mycosis in a kidney transplant patient Mycose profonde due à *Lasiodiplodia theobromae* chez une patiente greffée rénale. **Médecine et maladies infectieuses** v. 49 p. 545–547, out. 2019.

CASTELLANOS, J. R. G.; PRIETO, J. M.; HEINRICH, M. Red Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*) - A global ethnopharmacological commodity? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, p. 1–13, nov. 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) **Antibiotic resistance threats in the United States, 2019**. Department of Health and Human Services. Atlanta, GA: U.S, 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>. Acesso em: 25 dec. 2019.

CHACÓN-MORALES, P.; AMARO-LUIS J. M.; BAHASAS A. Isolation and characterization of (+)-mellein, the first isocoumarin reported in *Stevia* genus. **Avances en Química**, v. 8, n. 3, p. 145-151, dez. 2013.

CHANCLUD, E.; MOREL, J. B. Plant hormones: a fungal point of view. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, p. 1289–1297, out. 2016.

CHANDRASEKHARAN, M.; KANNATHASAN, K.; VENKATESALU, V. Antimicrobial activity of fatty acid methyl esters of some members of chenopodiaceae. **Zeitschrift fur Naturforschung C. Journal of Bioscience**, v. 63, p. 331-6, maio/jun. 2008.

CHEN, J. H. et al. Water suppression without signal loss in HR-MAS 1H NMR of cells and tissues. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 171, n. 1, p. 143-150, set. 2004.

CHEN, S-L. et al. Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. **Chinese Medicine**, v. 11, n. 1, p. 37, jul. 2016.

CHEN, S. et al. Cytotoxic and antibacterial preussomerins from the mangrove endophytic fungus *Lasiodiplodia theobromae* ZJ-HQ1. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 9, p. 2397-2402, 25 ago. 2016.

_____. et al. β -Resorcylic acid derivatives with α -glucosidase inhibitory activity from *Lasiodiplodia* sp. ZJ-HQ1, an endophytic fungus in the medicinal plant *Acanthus ilicifolius*. **Phytochemistry Letters**, v. 13, p. 141–146, 6 jun. 2015.

_____. et al. Lasiodiplactone A, a novel lactone from the mangrove endophytic fungus *Lasiodiplodia theobromae* ZJ-HQ1. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 15, p. 6338–6341, ago. 2017.

CHO, J. Y.; MOON, J. H.; SEONG, K. Y.; PARK K. H. Antimicrobial activity of 4-Hydroxybenzoic acid and trans 4-hydroxycinnamic acid isolated and identified from rice hull. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 11, p. 2273-2276, nov. 1998.

CIMMINO, A. et al. Phytotoxic lipophilic metabolites produced by grapevine strains of *Lasiodiplodia* species in Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n.6, p.1102–1107, 30 jan. 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts-3rd edition**. Approved Standard M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA. 2008.

_____. **Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Aerobic Bacteria-10th edition**. Approved Standard M07-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA. 2015.

COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816–23, ago. 2006.

CRUYWAGEN, E.M.; SLIPPERS, B.; ROUX, J.; WINGFIELD, M. J. Phylogenetic species recognition and hybridization in *Lasiodiplodia*: A case study on species from baobabs. **Fungal Biology**, v. 121, n.4, p. 420-436, ago. 2016.

CRUZ, J. S.; DA SILVA, C. A.; HAMERSKI, L. Natural Products from Endophytic Fungi Associated with *Rubiaceae* Species. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 128, ago. 2020.

DE CAPRILES, C.H.; MATA, S.; MIDDELVEEN, M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. **Mycopathologia**, v. 106, n. 2, p. 73–79. 1989

DEBROY, S.; PROSPER, O.; MISHOE, A.; MUBAYI, A. Challenges in modeling complexity of neglected tropical diseases: A review of dynamics of visceral leishmaniasis in resource limited settings. **Emerging Themes in Epidemiology**, v. 14, 18 set. 2017.

DESHMUKH, S. K.; VEREKAR, S. A.; BHAVE, S. V. Endophytic fungi: a reservoir of antibacterials. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, art. 715, 8 jan. 2015.

DEVI, N. N.; PRABAKARAN, J. J. Bioactive metabolites from an endophytic fungus *Penicillium* sp. isolated from *Centella asiatica*. **Current Research in Environmental & Applied Mycology**, v. 4, n. 1, p. 34–43, 11 fev. 2014.

DEVYS, M. *et al.* Isolation of the new (-)-(3R,4S)-4hydroxymellein from the fungus *Septoria nodorum* Berk. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 47, p. 779-781, jul. 1992

DISSANAYAKE, A. J.; PHILLIPS, A. J. L.; LI, X. H.; HYDE, K. D. Botryosphaeriaceae: Current status of genera and species. **Mycosphere**, v. 7, n. 7, p. 1001–1073, 23 dec. 2016.

DJOUKENG, J. D.; POLLI, S.; LARIGNON, P.; ABOU-MANSOUR, E. Identification of phytotoxins from *Botryosphaeria obtusa*, a pathogen of black dead arm disease of grapevine. **European Journal of Plant Pathology**, v.124, n. 2, p. 303-308, jun. 2009.

DRAČNSKÝ, M.; BOUŘ, P. Computational analysis of solvent effect in NMR spectroscopy. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 6, n. 1, p. 288-299, 2010.

DUAN, X. *et al.* Diversity and bioactivities of fungal endophytes from *Distylium chinense*, a rare waterlogging tolerant plant endemic to the Three Gorges Reservoir. **BMC Microbiology**, v.19, n. 278. 2019.

DZOYEM, J. P. *et al.* Cytotoxicity, antioxidant and antibacterial activity of four compounds produced by an endophytic fungus *Epicoccum nigrum* associated with *Entada abyssinica*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 2, mar./abr. 2017.

EINSTEIN, A. **Como vejo o mundo**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1981. Disponível em:
[https://blogdomiltonjung.files.wordpress.com/2013/02/como_vejo_o_mundo_\(albert_einstein\).pdf](https://blogdomiltonjung.files.wordpress.com/2013/02/como_vejo_o_mundo_(albert_einstein).pdf). Acesso em: 20 set. 2021.

ETAME, R. E. *et al.* Effect of Fractioning on Antibacterial Activity of *Enantia chlorantha* Oliver (Annonaceae) Methanol Extract and Mode of Action. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, n. 2, p. 1-13, 29 abr. 2018.

ETAME, R. E. *et al.* Effect of fractioning on antibacterial activity of n-butanol fraction from *Enantia chlorantha* stem bark methanol extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 56, 11 mar. 2019.

FÉLIX, C. *et al.* Temperature modulates the secretome of the phytopathogenic fungus *Lasiodiplodia theobromae*. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, article 1096, 3 ago. 2016.

_____. *et al.* Production of toxic metabolites by two strains of *Lasiodiplodia theobromae*, isolated from a coconut tree and a human patient. **Mycologia**, v. 110, n. 4, p. 642-653, jul./ago. 2018a.

_____. *et al.* *Lasiodiplodia theobromae* as a producer of biotechnologically relevant enzymes. **International Journal of Molecular Science**, v. 19, n. 2, 23 jan. 2018b.

FERRAZ-FILHA, Z. S. *et al.* *Tabebuia roseoalba*: in vivo hypouricemic and anti-inflammatory effects of its ethanolic extract and constituents. **Planta Medica**, v. 82, p. 1395–1402, 9 maio 2016.

FERREIRA-JÚNIOR, J. C. *et al.* Isolation of a dihydrobenzofuran lignin, icariside E4, with an antinociceptive effect from *Tabebuia roseo-alba* (Ridley) Sandwith (Bignoniaceae) bark. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n. 6, p. 950–956, jun. 2015.

FORCAT, S.; BENNET, M.; GRANT, M.; MANSFIELD, J. W. Rapid linkage of indole carboxylic acid to the plant cell wall identified as a component of basal defense in *Arabidopsis* against *hrp* mutant bacteria. **Phytochemistry**, v. 71, p. 870-876, jun. 2010.

FORSETH R. R.; SCHROEDER F. C. NMR-spectroscopic analysis of mixtures: from structure to function. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 1, p. 38–47, fev. 2011.

GÓMEZ, O. C.; LUIZ, J. H. H. Endophytic fungi isolated from medicinal plants: future prospects of bioactive natural products from *Tabebuia/Handroanthus* endophytes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 21, p. 9105-9109, nov. 2018.

_____; MOREIRA, D. B. M.; HERNANDEZ, I. L. C.; LEMES, R. M. L.; LUIZ, J. H. H. Antimicrobial activity improvement after fractionating organic extracts from *Lasiodiplodia sp.* fermentation. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 3795-3816, 15 jan. 2021a.

_____; MOREIRA, D. B. M.; LUIZ, J. H. H. Medicinal potentialities and pathogenic profile of *Lasiodiplodia* genus. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, out. 2021b.

HE, G.; MATSUURA, H.; YOSHIHARA, T. Isolation of an α -methylene- γ -butyrolactone derivative, a toxin from the plant pathogen *Lasiodiplodia theobromae*. **Phytochemistry**, v. 65 p. 2803-2807, out. 2004.

HIMAJA, M. *et al.* Synthesis and biological evaluation of indole-3-carboxylic acid derivatives of amino acids and peptides. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 1, n. 1, p. 436-440, jan. 2010.

HINRICHSEN, S. L. *et al.* [Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 394–8, jul./ago. 2008.

HOLETZ, F. B. *et al.* Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, out. 2002.

HÖLLER, U.; KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D. Three New Metabolites from Marine-Derived Fungi of the Genera *Coniothyrium* and *Microsphaeropsis* Ulrich. **Journal of Natural Products**, v. 62, n.1, p. 114-118, jan. 1999.

HUANG, C. *et al.* Thiocladospolide E and cladospamide A, novel 12-membered macrolide and macrolide lactam from mangrove endophytic fungus *Cladosporium* sp. SCNU-F0001. **Fitoterapia**, v. 137, art. 104246, 17 jun. 2019.

HUANG, J. *et al.* New lasiodiplodins from mangrove endophytic fungus *Lasiodiplodia* sp. 318#. **Natural Product research**, v. 31, n. 3, p. 326–332. 2017.

HUSSEIN, H. M.; HAMEED, I. H.; IBRAHEEM, O. A. Antimicrobial activity and spectral chemical analysis of methanolic leaves extract of *Adiantum capillus-veneris* using GC-MS and FT-IR Spectroscopy. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**, v. 8, n. 3, p. 369-385, mar. 2016.

HU, X. *et al.* Homoharringtonine production by endophytic fungus isolated from *Cephalotaxus hainanensis* Li. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 32, n.7, 4 jun. 2016.

IGLESIAS, M. A. *et al.* Occurrence and phenotypic and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in slaughterhouses in southern Brazil. **Food Research International**, v. 100, p. 96-101, out. 2017.

JAYALAKSHMI, M.; VANITHA, V.; PUSHPABHARATHI, N. Biochemical screening of *Penaeus vannamei* shell waste by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Asian Journal of Chemistry**, v. 30, n. 6, p. 1311-1316, jan. 2018.

JHA, S. **Endophyte and Secondary Metabolites**. Springer Nature, Switzerland, 2019.

JINU, M. V.; GINI, C. K.; JAYABASKARAN, C. In vitro antioxidant activity of cholestanol glucoside from an endophytic fungus *Lasiodiplodia theobromae* isolated from *Saraca asoca*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 1, p. 952-962, 2015.

KAMAL, N.; VIEGELMANN, C. V.; CLEMENTS, C. J.; EDRADA-EBEL, R. A. Metabolomics-guided isolation of anti-trypanosomal metabolites from the endophytic fungus *Lasiodiplodia theobromae*. **Planta Medica**, v. 83, n. 6, p. 565-573, 18 out. 2016.

KHARWAR, R. N. *et al.* Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 7, p. 1208–1228, jul. 2011.

KIM, D. H. *et al.* Chemical constituents of Impatiens balsamina stems and their biological activity. **Natural Product Sciences**, v. 25, n. 2, p. 130-135, jun. 2019.

KINDO, A. J.; PRAMOD, C.; ANITA, S.; MOHANTY, S. Maxillary sinusitis caused by *Lasiodiplodia theobromae*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 167–169, 16 abr. 2010.

KOYAMA, J.; MORITA, I.; TAGAHARA, K.; IRIA, K. J. Cyclopentene dialdehydes from *Tabebuia impetiginosus*. **Phytochemistry**, v. 53, n. 8, p. 869–872, abr. 2000.

KUETE, V. Potential of Cameroonian Plants and Derived Products against Microbial Infections: A Review. **Planta Medica**, v. 76, n. 14, p. 1479–1491, 8 jun. 2010.

LI, J. *et al.* Lasiodiplodins from mangrove endophytic fungus *Lasiodiplodia* sp. 318#. **Natural Product Research**, v. 30, p. 755-760, 29 jul. 2015.

LIM, C. H. Isolation and structure identification of phytotoxins from *Lasiodiplodia Theobromae*, the cause of Java Black rot of sweet potato. **Korean Journal of Agricultural Science**, v. 25, n. 1, p. 118-123. 1998.

LIMA, L. A. *et al.* *In vitro* antifungal activity of fatty acid methyl esters of the seeds of *Annona cornifolia* A.St.-Hil. (Annonaceae) against pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 6, p. 777-80, nov. /dec. 2011.

LU, X. *et al.* Palmarumycins from the endophytic fungus *Lasiodiplodia pseudotheobromae* XSZ-3. **Helvetica Chimica Acta**, v. 97, p. 1289-1294. 2014.

LYONS, P. C.; PLATTNER, R. D.; BACON, C. W. Occurrence of peptide and clavine ergot alkaloids in tall fescue grass. **Science**, v. 232, p. 487–489, 25 abr. 1986.

MA, Y. M. *et al.* A new p-hydroxybenzoic acid derivative from an endophytic fungus *Penicillium* sp. of *Nerium indicum*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 19, n. 12, p. 1-7, 18 April 2017.

MARTINEZ-KLIMOVA, E.; RODRÍGUEZ-PEÑA, K.; SÁNCHEZ, S. Endophytes as sources of antibiotics. **Biochemical Pharmacology**, v. 134, p. 1–17, 15 jun. 2017.

MARCELLANO, J. P.; COLLANTO, A. S.; FUENTES, R. G. Antibacterial Activity of Endophytic Fungi Isolated from the Bark of *Cinnamomum mercadoi*. **Pharmacognosy Journal**, v.9, n.3, p. 405–409, abr. 2017.

MEENA, K. K. *et al.* Abiotic Stress Responses and Microbe-Mediated Mitigation in Plants: The Omics Strategies. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 172, 9 fev. 2017.

MICHAEL, C. A.; DOMINEY-HOWES, D.; LABBATE, M. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. **Frontiers in Public Health**, v. 2, art. 145, 16 set. 2014.

MIR, R. A. *et al.* Elicitation of forskolin in cultures of *Rhizactonia bataticola*-A phytochemical synthesizing endophytic fungi. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 10, p. 185-189, 8 ago. 2015.

MISHRA, R.; KUSHVEER, J. S.; SARMA, V. V. Secondary metabolites produced by endophytic fungi from marine environments. *In*: JHA, S. **Endophyte and Secondary Metabolites: Production of usefull metabolites**. Switzerland: Springer Nature, 2019. p. 475-490.

MOHAMMADI, S. *et al.* Medicinal plants used in the treatment of Malaria: A key emphasis to *Artemisia*, *Cinchona*, *Cryptolepis*, and *Tabebuia* genera. **Phytotherapy Research**, p. 1–14, 14 jan. 2020.

MOJID, M. A.; JAE, H. Antibacterial and antiyeast compounds from marine-derived bacteria. **Mar Drugs**, v. 12, n. 5, p. 2913–2921, 13 maio 2014.

MOLINSKI T. F. NMR of natural products at the 'nanomole-scale'. **Natural Products Reports**, v. 27, p.321–329, 8 fev. 2010.

MOON, D. O. *et al.* Antiinflammatory effects of β -lapachone in lipopolysaccharid-estimated BV2 microglia. **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 4, p. 506–514, 16 jan. 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–666, 25 mar. 2016.

OLEA R. S. G.; ROQUE N. F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de ^{13}C **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 278-281. 1990.

OLIVEIRA, N. A. *et al.* *Listeria monocytogenes* in brazilian foods: occurrence, risks to human health and their prevention. **Current Research in Nutrition and Food Science Journal**, v. 7, n. 2, p. 320-330, jul. 2019.

OLIVEIRA, C. M. *et al.* Bioactive Metabolites Produced by *Penicillium* sp.1 and sp.2, Two Endophytes Associated with *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae). **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 64, p. 824 – 830, jun. 2009.

PANDI, M. *et al.* Isolation and detection of taxol, an anticancer drug produced from *Lasiodiplodia theobromae*, an endophytic fungus of the medicinal plant *Morinda citrifolia*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 8, p.1428-1435, 21 fev. 2011.

PALEM, P. P. C.; KURIAKOSE, G. C.; JAYABASKARAN, C. Correction: an endophytic fungus, *Talaromyces radicus*, isolated from *Catharanthus roseus*, produces vincristine and vinblastine, which induce apoptotic cell death. **PLOS one**, 23 dec. 2015.

PARK, B. S.; LEE, K. G.; TAKEOKA, G. R. Comparison of three sample preparation methods on the recovery of volatile from *Taheebo* (*Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 19, p. 287–292, 29 mar. 2004.

PAUL, S.; KANNAN, I.; MOHANRAM, K. Extensive *ERG11* mutations associated with fluconazole-resistant *Candida albicans* isolated from HIV-infected patients. **Current Medical Mycology**, v. 5, p. 1-6, 2019.

PFALLER, M. A. *et al.* Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004–2008. **PLoS One**, v. 9, n. 7, 3 jul. 2014.

PHILLIPS, A. J. L. *et al.* The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, v. 76, n. 1, p.51–167, 30 set. 2013.

PINHATI, H. M. *et al.* Outbreak of candidemia caused by fluconazole resistant *Candida parapsilosis* strains in an intensive care unit. **BMC Infectious Disease**, v. 16, n. 1, 20 ago. 2016.

PIRES, T. C. S. P. *et al.* Bioactive properties of *Tabebuia impetiginosa*-based phytopreparations and phytoformulations: a comparison between extracts and dietary supplements. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 22863–88871, 21 dec. 2015.

POGUE, J. M.; KAYE, K. S.; COHEN, D. A.; MARCHAIM, D. Appropriate antimicrobial therapy in the era of multidrug-resistant human pathogens. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 4, p. 302–312, abr. 2015.

PONGCHAROEN, W. *et al.* A New Dihydrobenzofuran Derivative from the Endophytic Fungus *Botryosphaeria mamane* PSU-M76. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 9, p. 1404–1405. 2007.

RADIĆ, N.; ŠTRUKELJ, B. Endophytic fungi—The treasure chest of antibacterial substances. **Phytomedicine**, v. 19, n. 14, p. 1270–1284, 15 nov. 2012.

RAMOS, H. P. *et al.* Evaluation of dihydroisocoumarins produced by the endophytic fungus *Arthrinium state* of *Apiospora montagnei* against *Schistosoma mansoni*. **Natural Products Research**, jun. 2013.

RAO, M. M.; KINGSTON, D. G. Plant anticancer agents. XII. Isolation and structure elucidation of new cytotoxic quinones from *Tabebuia cassinoides*. **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 5, p. 600–604, 1 set. 1982.

RODRIGUES, C. S.; Sá, C. V. G. C.; MELO, C. B. *Listeria monocytogenes* contamination in industrial sausages. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 40. 2018.

RODRÍGUEZ-GÁLVEZ, E.; MALDONADO, E.; ALVES, A. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* causing dieback of table grapes in Peru. **European Journal of Plant Pathology**, v. 141, n. 3, p. 477-489, mar. 2015.

RUKACHAISIRIKUL, V. *et al.* Metabolites from the endophytic fungi *Botryosphaeria rhodina* PSU-M35 and PSU-M114. **Tetrahedron**, v. 65, p. 10590–10595, out. 2009.

SAH, B.; SUBBAN, K.; CHELLIAH, J. Cloning and sequence analysis of 10-deacetylbaccatin III-10-O-acetyl transferase gene and WRKY1 transcription factor from taxol-producing endophytic fungus *Lasiodiplodia theobromae*. **FEMS microbiology letters**, v. 364, n. 24, p. 253, 29 nov. 2017.

SAHA, S.; SENGUPTA, J.; BANERJEE, D.; KHETAN, A. *Lasiodiplodia theobromae* keratitis: a case report and review of literature. **Mycopathologia**, v. 174, p. 335–339, 28 abr. 2012.

_____. *Lasiodiplodia theobromae* keratitis: a rare fungi from eastern India. **Microbiology Research**, v. 3, p. 82–83, ago. 2013.

SAKHUJA, R.; VASHIST, M.; BHOON, Y. K.; JAIN, S. C. Phytochemical investigation of *Tabebuia palmeri*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 49, n. 6, p. 1039–1042. 2014.

SALVATORE, M. M., ALVES, A., ANDOLFI, A. Secondary Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*: Distribution, Chemical Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. **Toxins**, v. 12, n.7, 457, 17 jul. 2020.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 321-324, ago. 2007.

SAVI, D. C.; ALUIZIO, R.; GLIENKE, C. Brazilian plants: An unexplored source of endophytes as producers of active metabolites. **Planta Medica**, v. 85, n. 8, p. 619–636, maio 2019.

SCHROEDER, F. C. *et al.* NMR-spectroscopic screening of spider venom reveals sulfated nucleosides as major components for the brown recluse and related species. **Proceedings of the Natural Academy of Sciences U.S.A.**, v.105, n.38, p. 14283–14287, 23 set. 2008.

SHAMLOO, E. *et al.* Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: a review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 20, n. 4, p. 241-254, 25 maio 2019.

SICHAEM, J.; KAENNAKAM, S.; SIRIPONG, P.; TIP-PYANG, S. Tabebuialdehydes A-C, cyclopentene dialdehyde derivatives from the roots of *Tabebuia rosea*. **Fitoterapia**, v. 83, n. 8, p. 1456–1459, dec. 2012.

SINGH, R.; DUBEY, A. K. Endophytic actinomycetes as emerging source for therapeutic compounds. **Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 106–116, ago. 2015.

SPELLBERG, B.; SRINIVASAN, A.; CHAMBERS, H. F. New societal approaches to empowering antibiotic stewardship. **JAMA**, v. 315, n. 12, p. 1229–1230, 22 mar. 2016.

STECKEL, A.; SCHLOSSER, G. An Organic Chemist's Guide to Electrospray Mass Spectrometric Structure Elucidation. **Molecules**, v. 24, n. 3, fev. 2019.

STEINERT, J.; KHALAF, H.; RIMPLER, M. HPLC separation and determination of naphthol[2,3-b]furan-4,9-diones and related compounds in extracts of *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae). **Journal Chromatography A**, v. 693, p. 281–287. 1995.

_____; RIMPLER, M. High performance liquid chromatographic separation of some naturally occurring naphthoquinones and anthraquinones. **Journal of Chromatography A**, v. 723, p. 206–209. 1996.

STIERLE, A.; STROBEL, G. A.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. 260, p. 154–155, 9 abr. 1993.

STROBEL, G. A.; STIERLE, A.; STIERLE, D.; HESS, W. M. *Taxomyces andreanae*, a proposed new taxon for a bulbiferous hyphomycete associated with Pacific yew (*Taxus brevifolia*). **Mycotaxon**, v. 47, p. 71–80. 1993.

_____. The emergence of endophytic microbes and their biological promise. **Journal of Fungi**, v. 4, 16. Maio 2018.

SUMMERBELL, R. C.; KRAJDEN, S.; LEVINE, R.; FUKSA, M. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Lasioidiplodia theobromae* and successfully treated surgically. **Medical Mycology**, v. 42, n. 6, p. 543–547, dec. 2004.

SUN, B. N. *et al.* Determination of chemical constituents of the marine pulmonate slug *Paraoncidium reevesii*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 12, p. 2071–2074. 2014.

SUO, M. *et al.* Anti-inflammatory constituents from *Tabebuia avellanedae*. **Fitoterapia**, v. 83, n. 3, p. 1484–1488, 29 ago. 2012.

SYEDA, A. M.; RIAZUNNISA, K. Data on GC-MS analysis, in vitro anti-oxidant and anti-microbial activity of the *Catharanthus roseus* and *Moringa oleifera* leaf extracts. **Data in brief**, v. 29, art. 105258, jan. 2020.

TACCONELLI, E. *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 318–327, 1 mar. 2018.

TAKAHASHI, S. *et al.* Lignan glycosides and phenolic compound glycosides from the branches of *Tabebuia chrysotricha*. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 676–684, 18 mar. 2015.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 448–459, ago. 2001.

TAWFIKE, A. F. *et al.* Isolation of anticancer and anti-trypanosome secondary metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus flocculus* via bioactivity guided isolation and MS based metabolomics. **Journal of Chromatography B**, v. 1106-1107, n. 1, p. 71-83, fev. 2019.

TORRES-MENDOZA, D.; ORTEGA, H. E.; CUBILLA-RIOS, L. Patents on Endophytic Fungi Related to Secondary Metabolites and Biotransformation Applications. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 2, 1 maio 2020.

UMEOKOLI, B. O. A new depsidone derivative from mangrove sediment derived fungus *Lasiodiplodia theobromae*. **Natural Product Research**, v. 33, n. 15, p. 2215-2222, 20 ago. 2018.

VALAYIL, J. M.; KURIAKOSE, G. C.; JAYABASKARAN, C. Isolation, purification and characterization of a novel steroidal saponin cholestanol glucoside from *Lasiodiplodia theobromae* that induces apoptosis in A549 cells. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, vol. 16, n. 7, p. 865-874. 2016.

VALGAS, C.; DE SOUZA, S. M.; SMÂNIA E. F. A.; SMÂNIA JR., A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, abr/jun 2007.

VAN DER HOOFT, Justin. J. J.; RANKIN, Naomi Metabolite Identification in Complex Mixtures Using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. In: WEBB Graham A. (ed.) **Modern Magnetic Resonance**. Switzerland: Springer, Cham, 2018. p. 1309-1314.

VENIERAKI, A.; DIMOU, M.; KATINAKIS, P. Endophytic fungi residing in medicinal plants have the ability to produce the same or similar pharmacologically active secondary metabolites as their hosts. **Hellenic Plant Protection Journal**, v. 10, n. 2, p. 51–66, jan. 2017.

VENKATESAN, S. *et al.* Biological properties of endophytic fungi. **Brazilian Archive of Biology and Technology**, v. 59, e16150436, 6 maio 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/babt/v59/1516-8913-babt-59-16150436.pdf>. Acesso em: 19 dec. 2019.

VINCENT, I. M. *et al.* Untargeted metabolomic analysis of miltefosine action in *Leishmania infantum* reveals changes to the internal lipid metabolism. **International Journal for Parasitology. Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 1, p. 20–27, 5 dec. 2013.

VOUKENG, I. K. *et al.* Antibacterial activities of the methanol extract, fractions and compounds from *Elaeophorbia drupifera* (Thonn.) Stapf. (*Euphorbiaceae*). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 28, 7 jan. 2017.

WAGNER, H.; KREHER, B.; LOTTER, H.; HAMBURGER, M. O. Structure determination of new isomeric naphtho[2,3-b]furan-4,9-diones from *Tabebuia avellanedae* by the selective-INEPT technique. **Helvetica Chimica Acta**, v. 72, n. 4, p. 659–667, 14 jun. 1989.

WARASHIMA, T.; NAGATANI, Y.; NORO, T. Constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 13, p. 2003–2011, jul. 2004.

_____. Further constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. **Phytochemistry**, v. 66, n.5, p. 589–597, mar. 2005.

_____. Constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. **Chemical & Pharm Bulletin**, v. 54, n. 1, p. 14–20, jan. 2006.

WEI, W. *et al.* An antibacterial metabolite from *Lasiodiplodia pseudotheobromae* F2. **Phytochemistry**, v. 100, p. 103–109, abr. 2014.

WEINER, L. M. *et al.* Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 37, n. 11, p. 1288-1301, nov. 2016.

WILLEMS, T. *et al.* Alkaloids from Marine Fungi: Promising Antimicrobials. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, 18 jun. 2020.

WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-report-on-cancer-setting-priorities-investing-wisely-and-providing-care-for-all>. Acesso em: 07 out. 2020.

WHO 2018 World Health Organization, 2018. Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. Geneva. Disponível em: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/. Acesso em: 05 out. 2020.

WOO, P. C. Y. *et al.* *Lasiodiplodia theobromae* pneumonia in a liver transplant recipient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 380–384, 13 nov. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) **Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics**. 2017. Disponível em: https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1. Acesso em: 26 nov. 2019.

XU, J.; WAGONER, G.; DOUGLAS, J. C.; DREW, P. D. β -Lapachone ameliorization of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 254, p. 46–54, 15 jan. 2013.

YAN, L. *et al.* Production of bioproducts by endophytic fungi: chemical ecology, biotechnological applications, bottlenecks, and solutions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n.15, p. 6279-6298, ago. 2018.

ZHANG, L.; HASEGAWA, I.; OHTA, T. Iridoid esters from *Tabebuia avellanedae* and their in vitro anti-inflammatory activities. **Planta Medica**, v. 83, p. 164–171. 2017.

ZHANG, L. *et al.* Furanonaphthoquinones from *Tabebuia avellanedae* induce cell cycle arrest and apoptosis in the human non-small cell lung cancer cell line A549. **Phytochemistry Letters**, v. 11, p. 9–17, 11 jan. 2015.

ZHAO, J. *et al.* Endophytic fungifor producing bioactive compounds originally from their host plants. *In*: MENDEZ-VILAS, A. **Current research, technology education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**. Badajoz, Spain: Formatex Research Center, 2010. v. 1, p. 567–576.

APÊNDICE A – Isolamento de fungos endofíticos

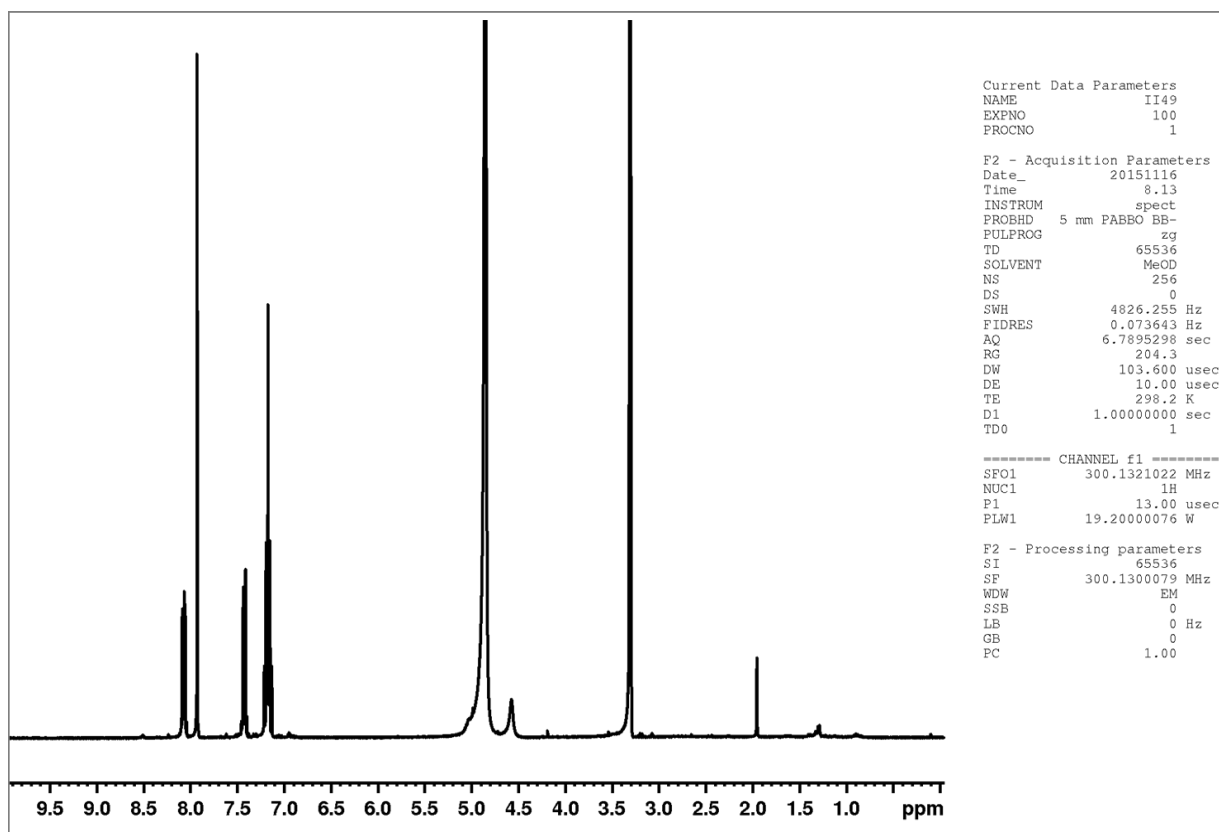
Tabela 18- Fungos endofíticos isolados de amostras de folhas, ramos e casca do Ipê

Placa	Fonte	Fragmentos com crescimento fúngico	Código
1	Folha	a, b, d, e	1F(a-e)
2	Folha	b	2Fb
3	Folha	a, b, c, d	3F(a-d)
4	Folha	a, b, c, d, e	4F(a-e)
5	Folha	a, b, c	5F(a-c)
6	Folha	a, b, c, d, e	6F(a-e)
7	Folha	a, b, c, d	7F(a-d)
8	Folha	b, c, d, e	8F(b-e)
9	Folha	d, e	9F(d,e)
10	Folha	a, b, c, d, e	10F(a-e)
11	Folha	a, b, c, d, e	11F(a-e)
12	Folha	a, b, d	12F(a-d)
13	Folha	b, c, d, e	13F(b-e)
14	Folha	a, b ¹ , b ² , e	14F(a-e)
15	Folha	c, d	15F(c,d)
16	Folha	b, c, d, e	16F(b-e)
17	Folha	a ¹ , a ² , b ¹ , b ² , c ¹ , c ² , d, e	17F(a-e)
18	Folha	a, b, c, d, e	18F(a-e)
19	Folha	a, b, c, d, e	19F(a-e)
20	Ramo	a, b, c, d, e	20R(a-e)
21	Casca do galho	a, b, c, d ¹ , d ² , e	21CG(a-e)
22	Casca do tronco	b, c, d, e	22CT(b-e)
23	Casca do galho	a, b, c, d	23CG(a-d)
24	Casca do tronco	a, b, c, d, e	24CT(a-e)
25	Casca do galho	c ¹ , c ² , e	25CG(c,e)

Fonte: do autor.

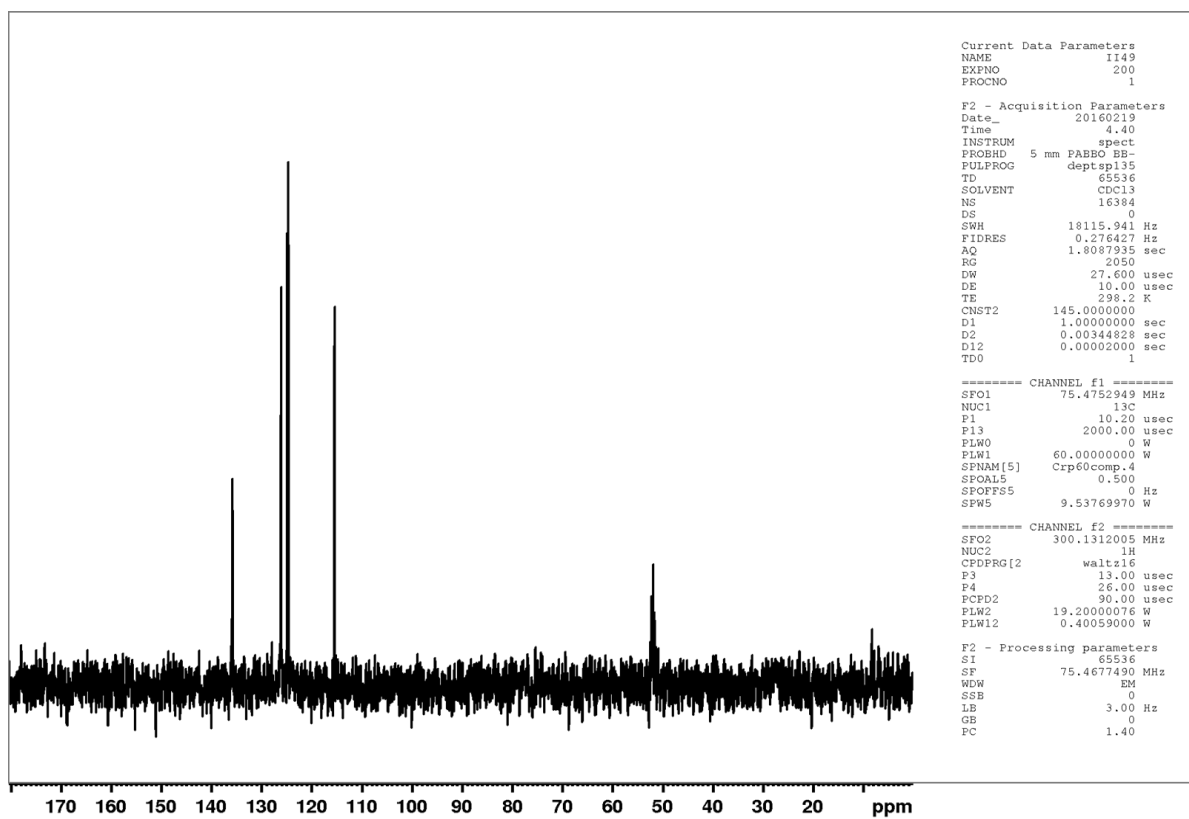
APÊNDICE B – Espectros de RMN da amostra AEm9-C

Figura 62 – Sinais identificados no espectro de ^1H da subfração AEm9-C em CD_3OD , 7,05 T a 25 °C



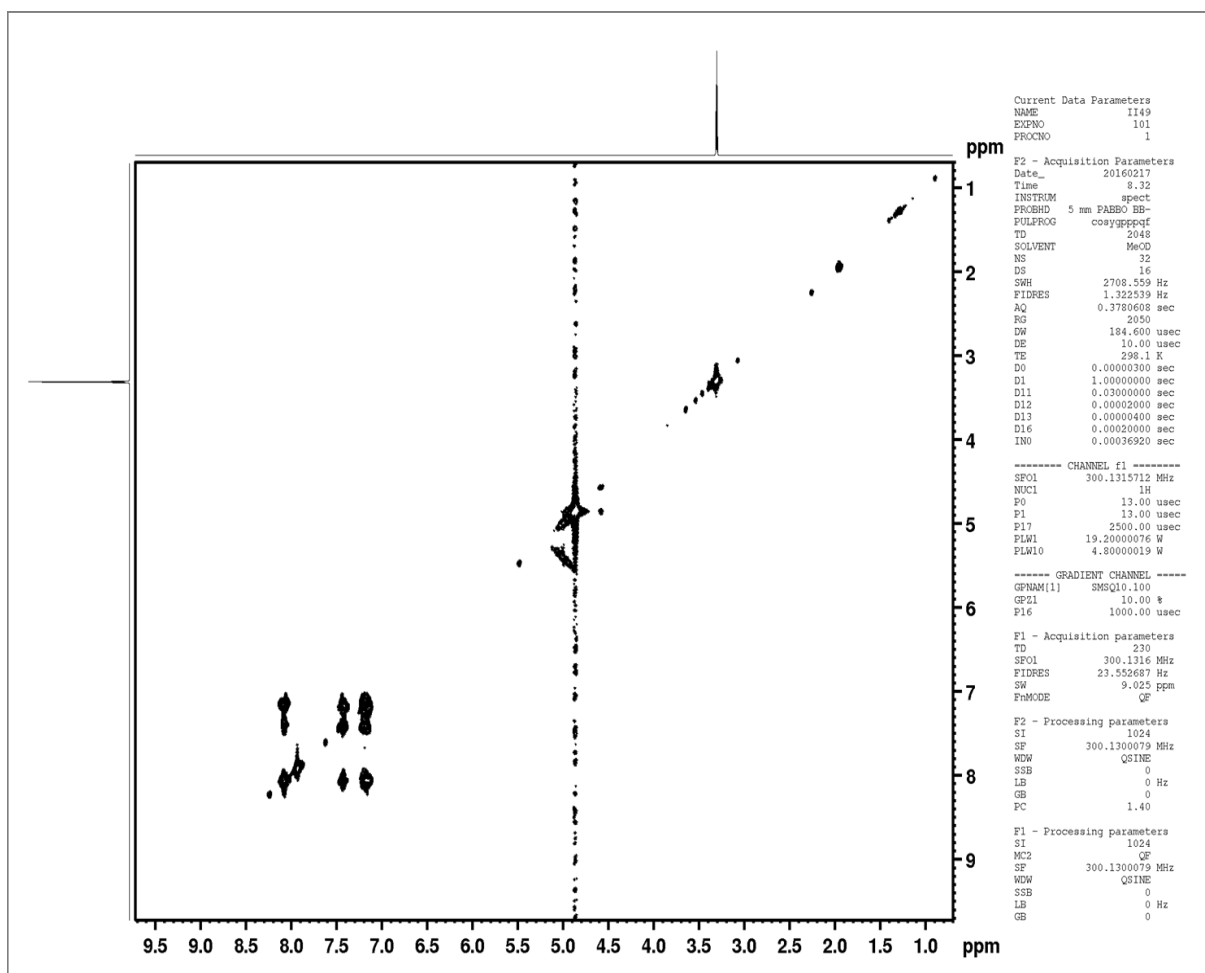
Fonte: do autor.

Figura 63 – Sinais identificados no espectro de DEPT da subfração AEm9-C em CD₃OD, 7,05 T a 25 °C



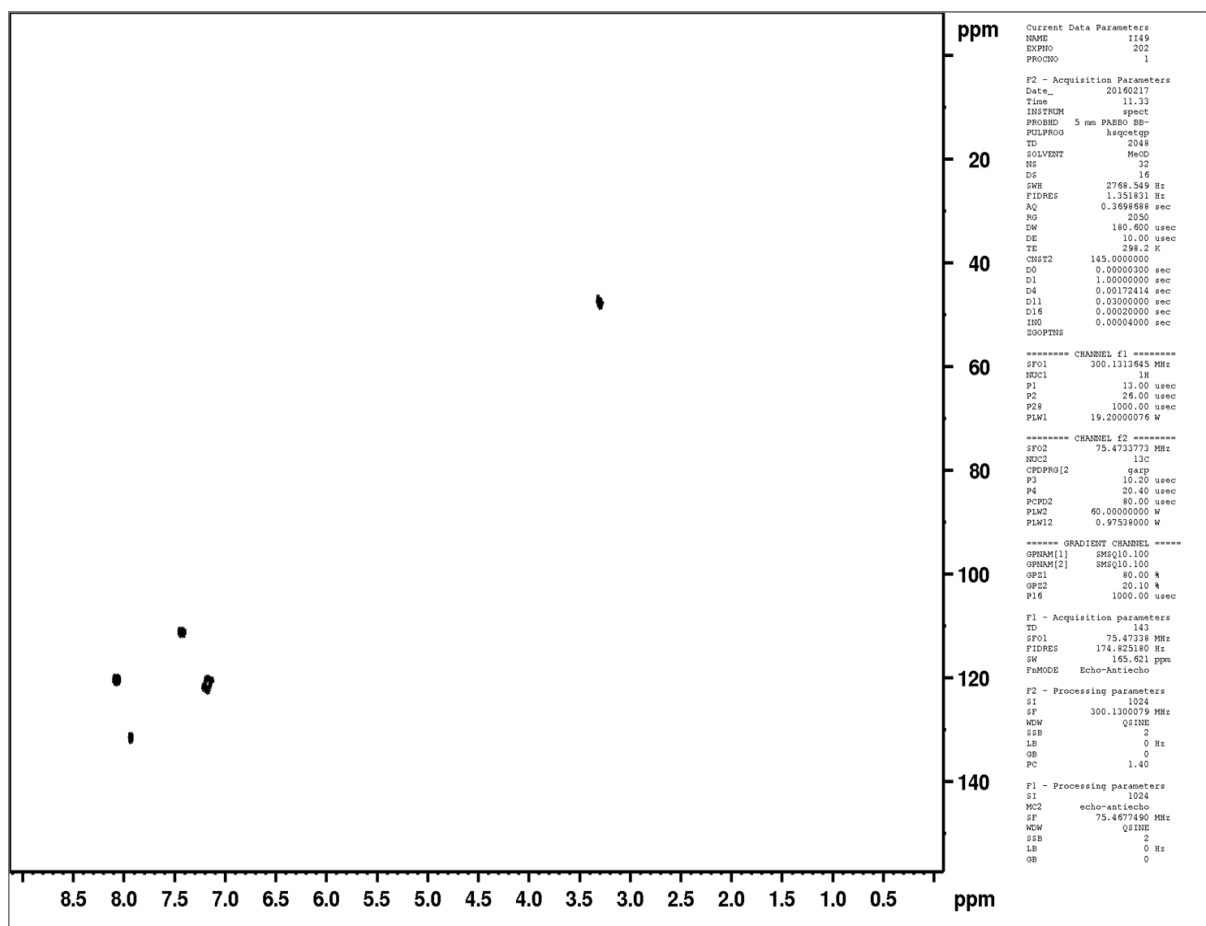
Fonte: do autor.

Figura 64 – Correlações observadas no espectro de COSY da subfração AEm9-C em CD_3OD , 7,05 T a 25 °C



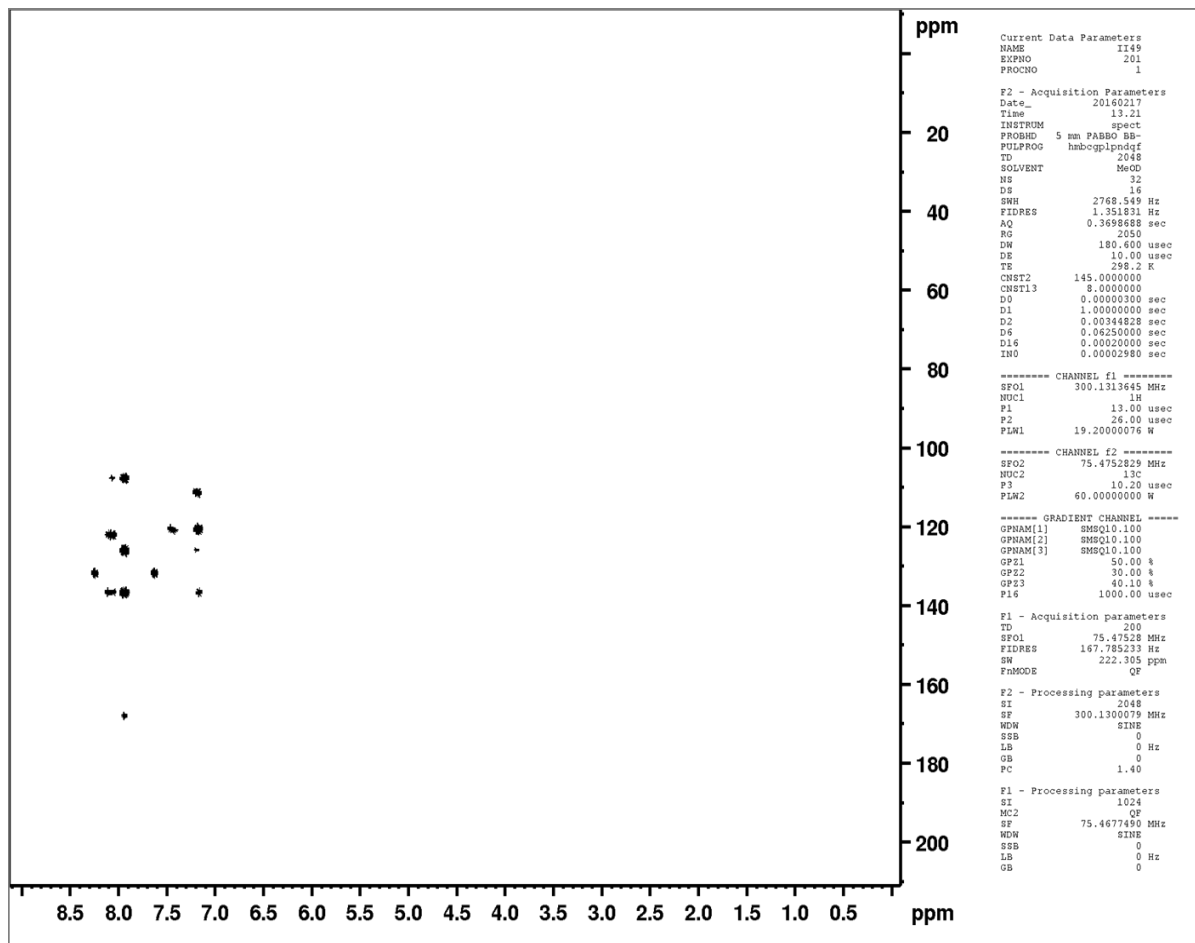
Fonte: do autor.

Figura 65 – Correlações observadas no espectro de HSQC da subfração AEm9-C em CD_3OD , 7,05 T a 25 °C



Fonte: do autor.

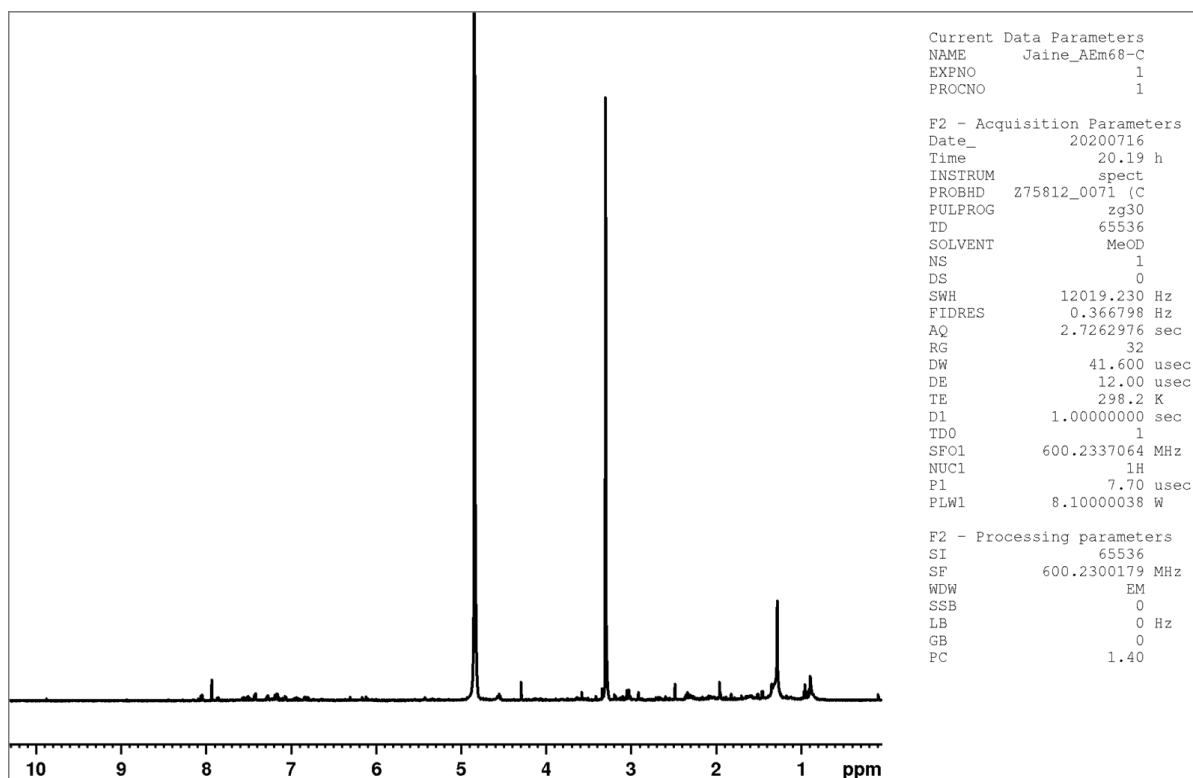
Figura 66 – Correlações observadas no espectro de HMBC da subfração AEm9-C em CD₃OD, 7,05 T a 25 °C



Fonte: do autor.

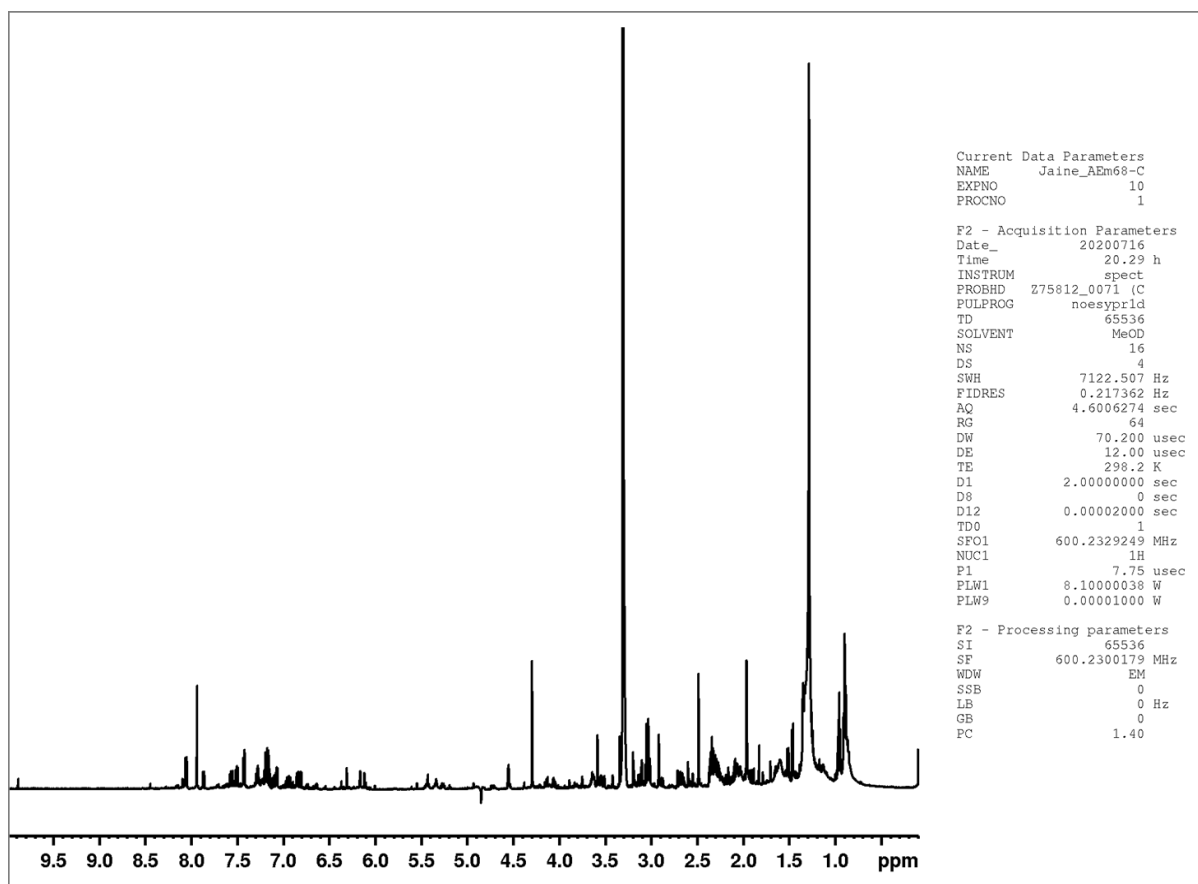
APÊNDICE C – Espectros de RMN da amostra AEm68-C

Figura 67 – Sinais identificados no espectro de ^1H da subfração AEm68-C em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C



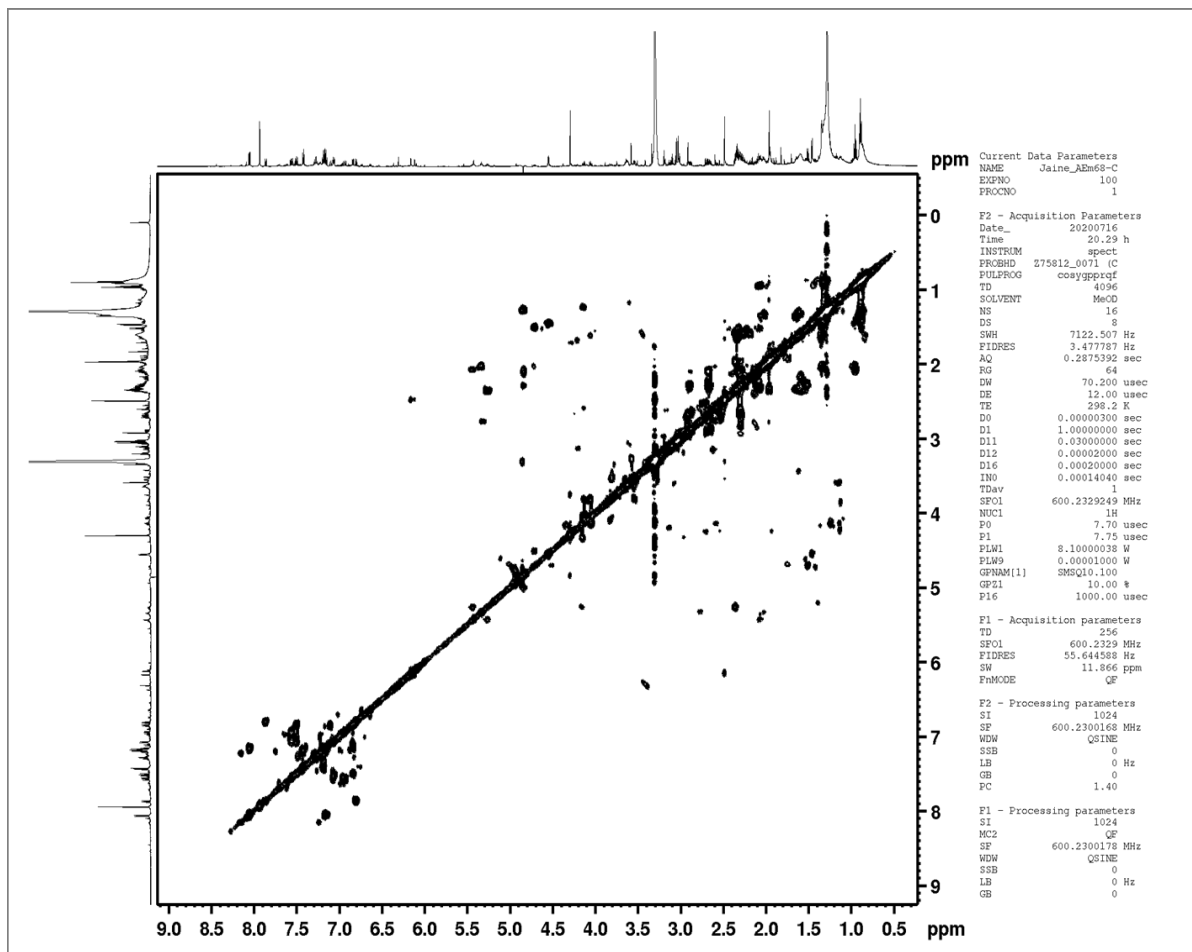
Fonte: do autor.

Figura 68 – Sinais identificados no espectro de ^1H da subfração AEm68-C após supressão do sinal da água em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C



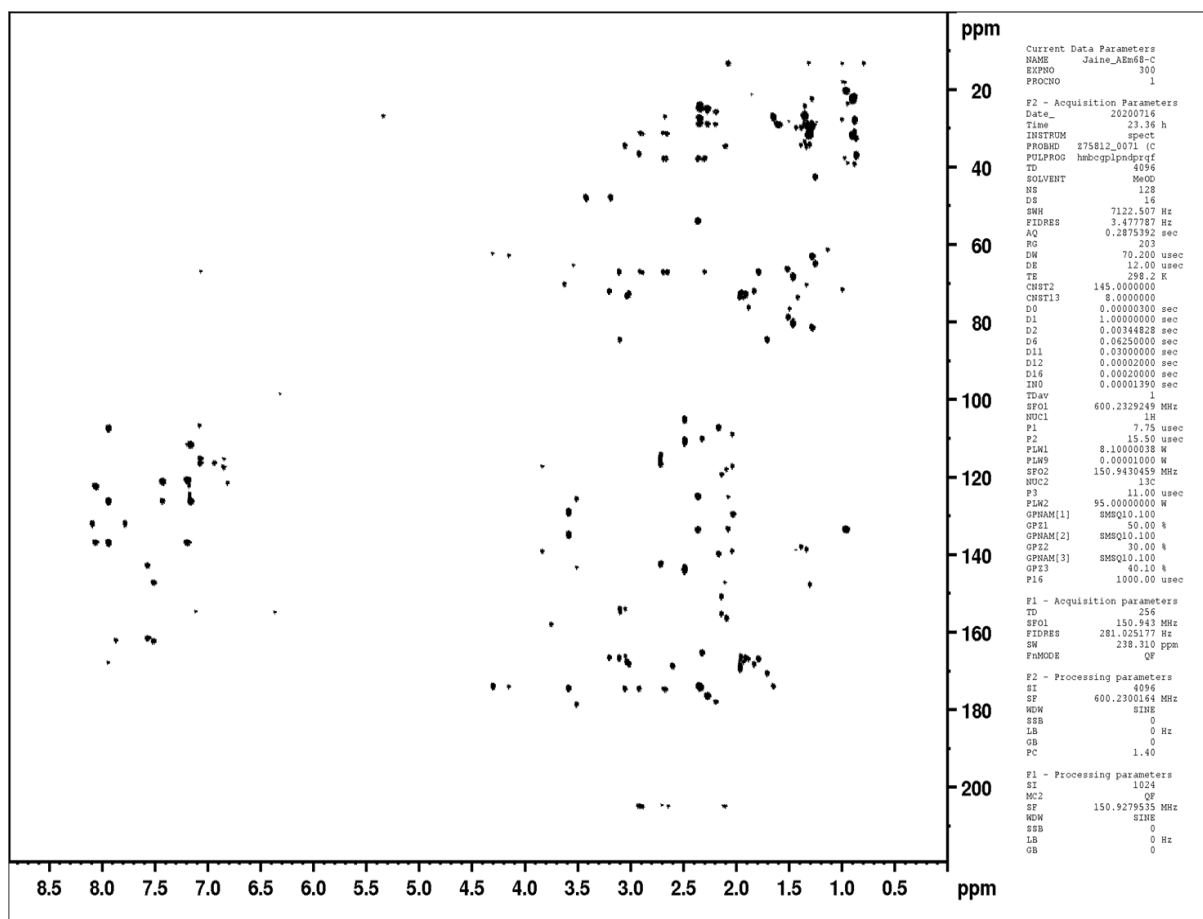
Fonte: do autor.

Figura 69 – Correlações observadas no espectro de COSY da subfração AEm68-C em CD₃OD, 14,1 T a 25 °C



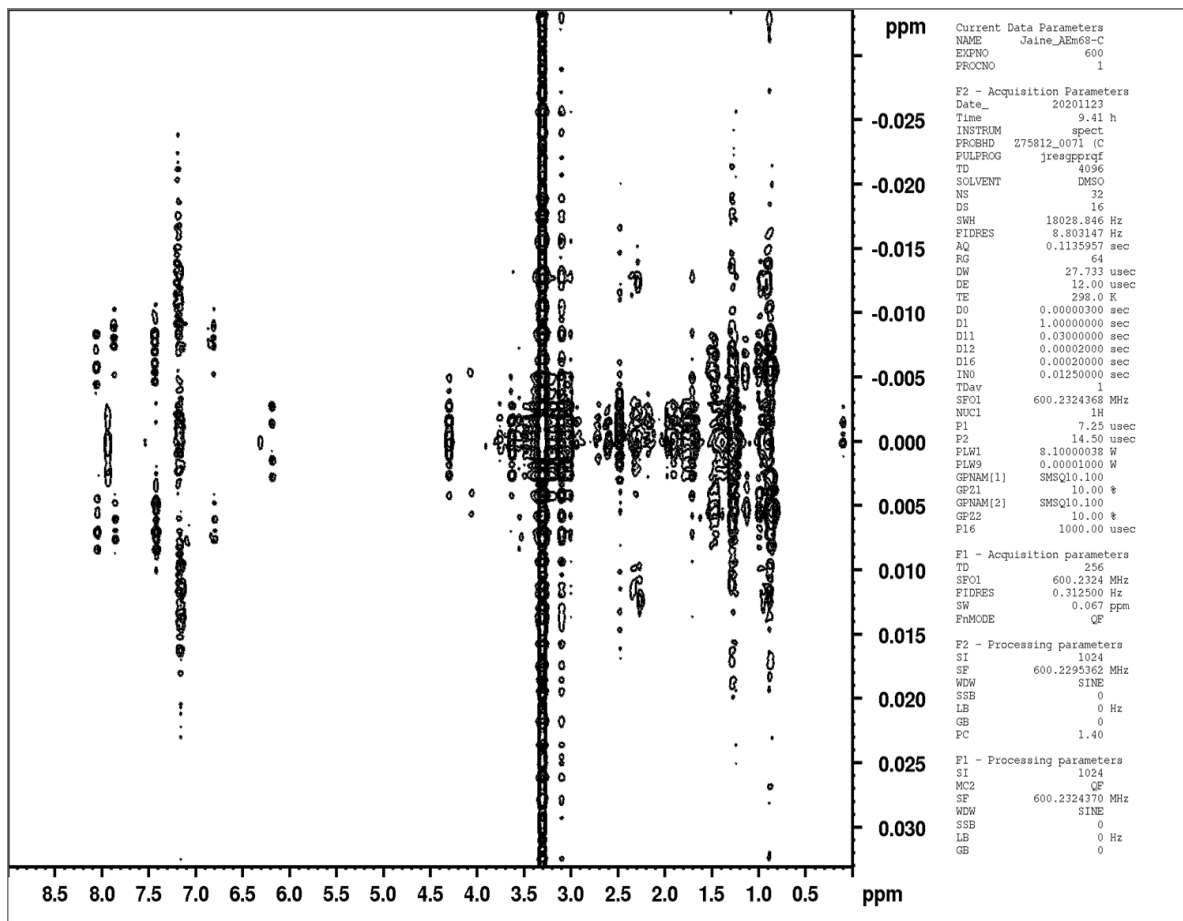
Fonte: do autor.

Figura 71 – Correlações observadas no espectro de HMBC da subfração AEm68-C em CD₃OD, 14,1 T a 25 °C



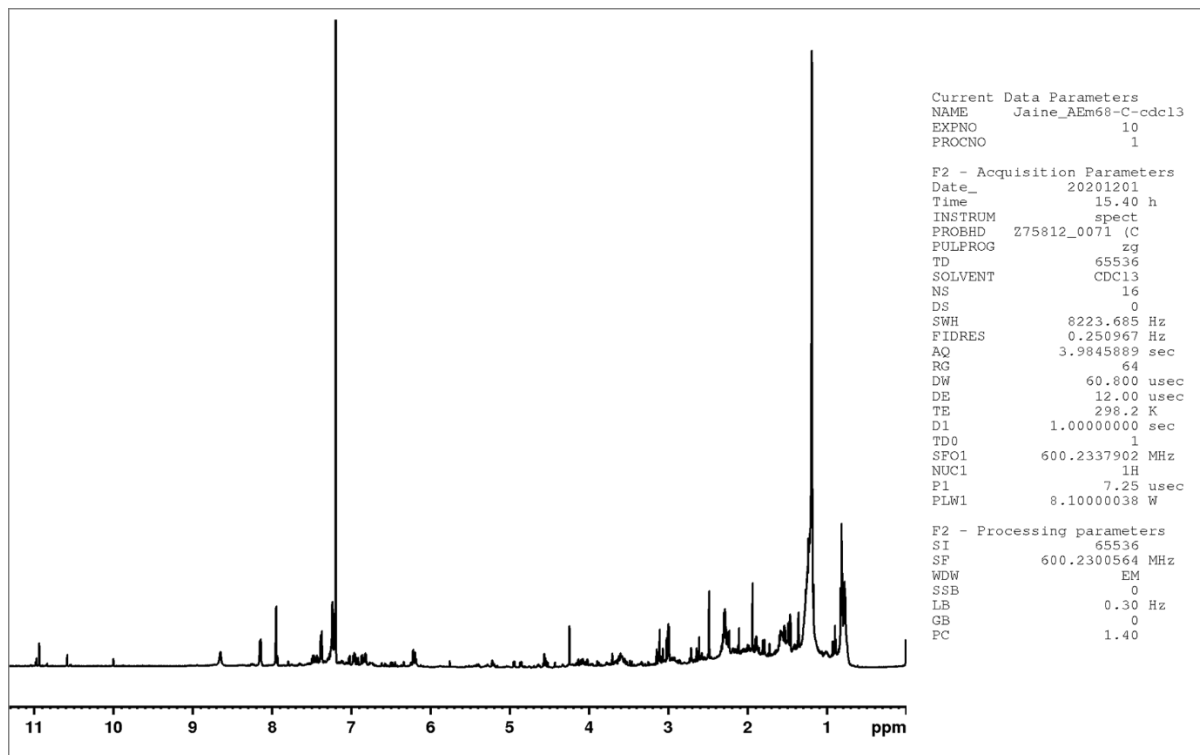
Fonte: do autor.

Figura 72 – Correlações observadas no espectro *J*-resolved da subfração AEm68-C em CD₃OD, 14,1 T a 25 °C



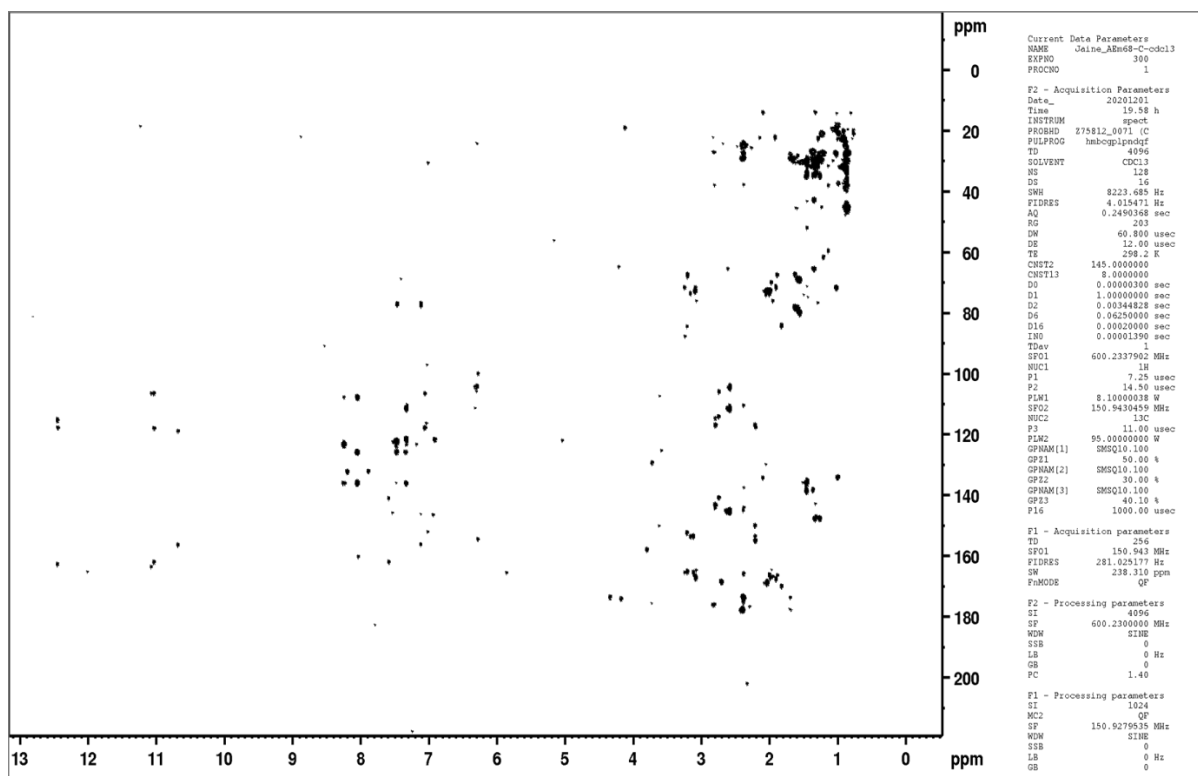
Fonte: do autor.

Figura 73 – Sinais identificados no espectro de ^1H da subfração AEm68-C em CDCl_3 , 14,1 T a 25 °C



Fonte: do autor.

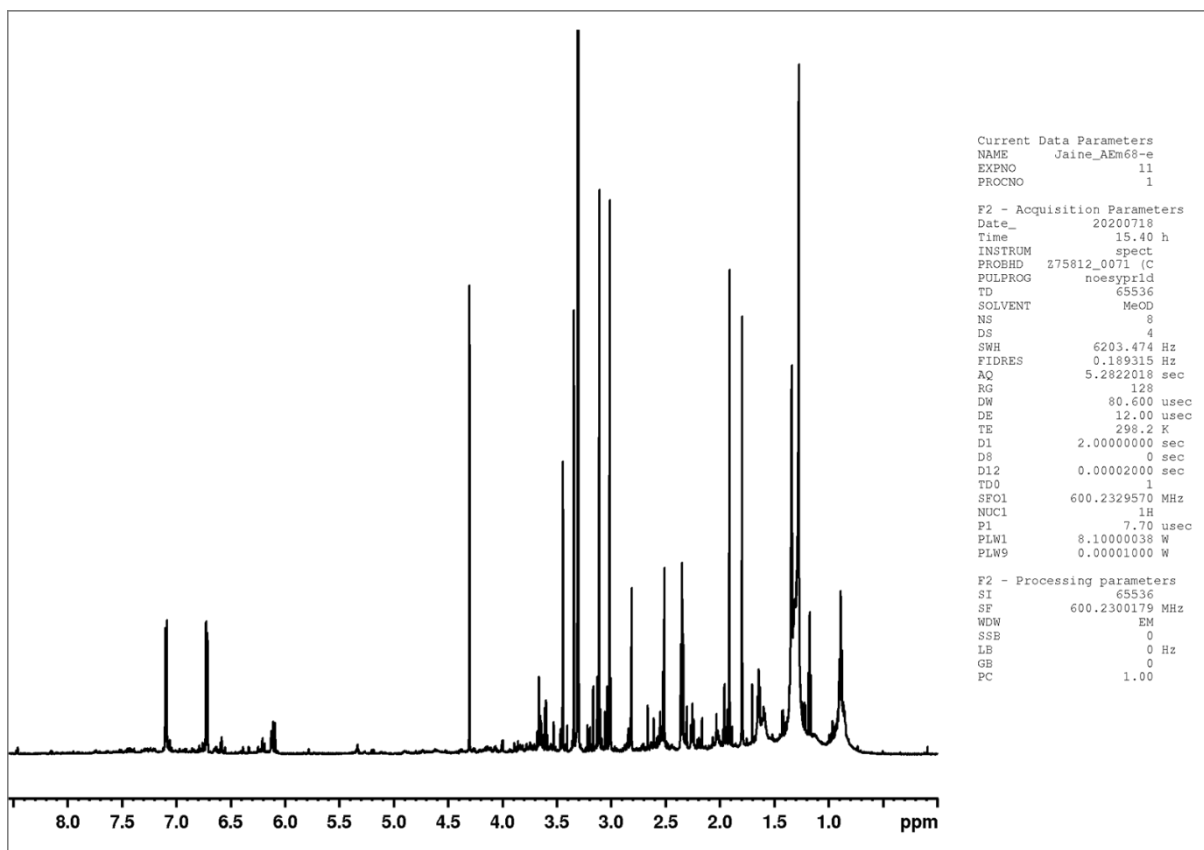
Figura 74 – Sinais identificados no espectro de HMBC da subfração AEm68-C em CDCl_3 , 14,1 T a 25 °C



Fonte: do autor.

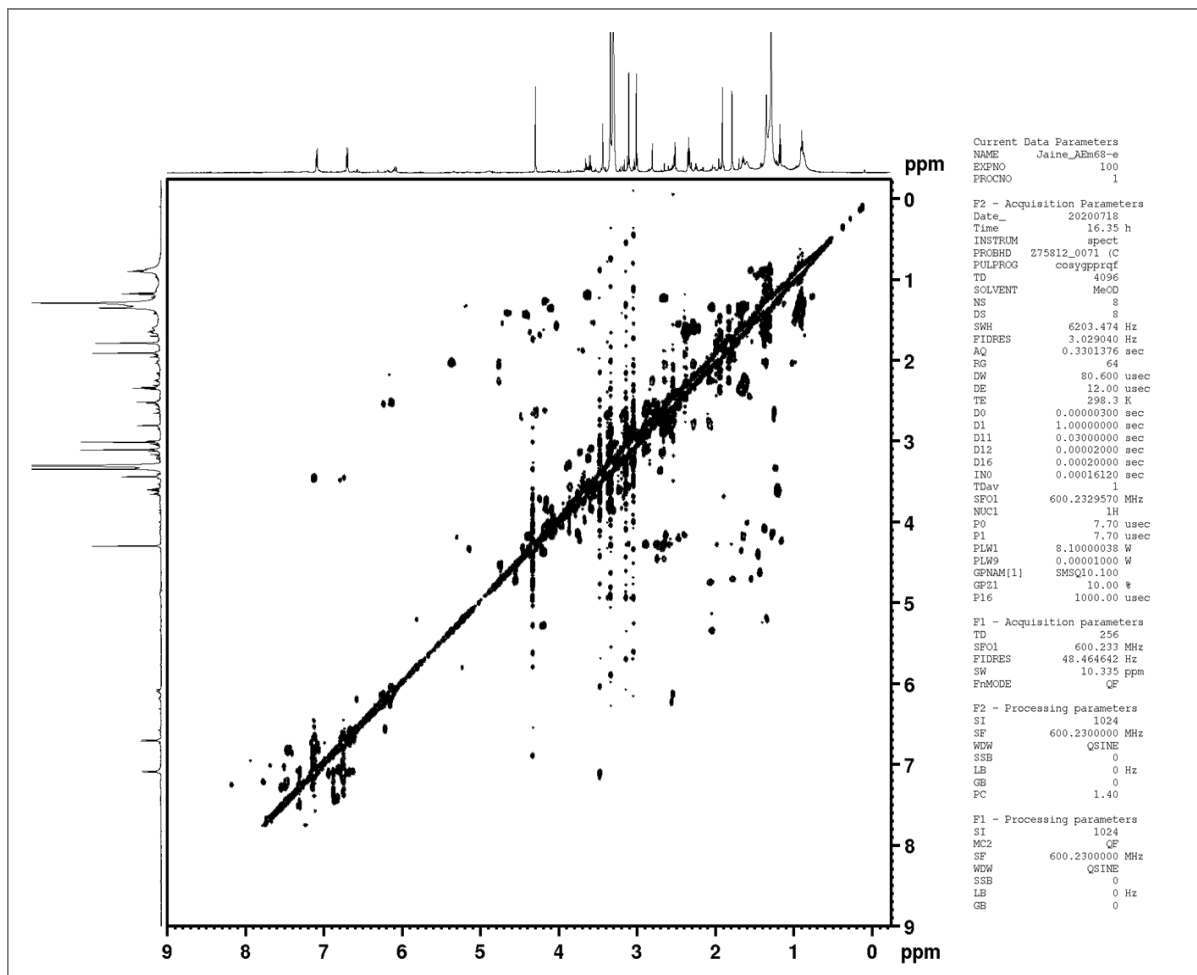
APÊNDICE D – Espectros de RMN da amostra AEm68-E

Figura 75 – Sinais identificados no espectro de ^1H da subfração AEm68-E em CD_3OD , 14,1 T a 25 °C



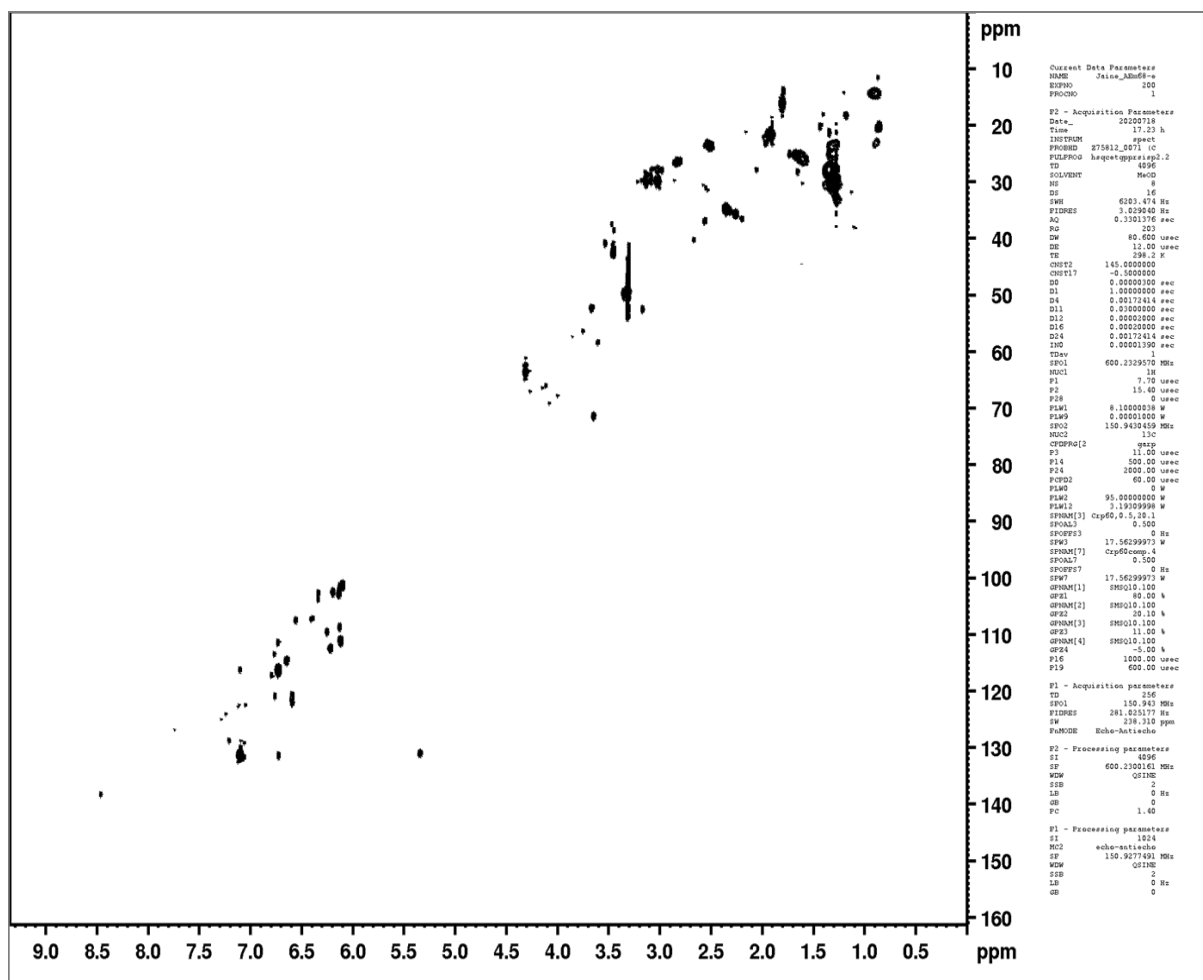
Fonte: do autor.

Figura 76 – Correlações observadas no espectro de COSY da subfração AEm68-E em CD₃OD, 14,1 T a 25 °C



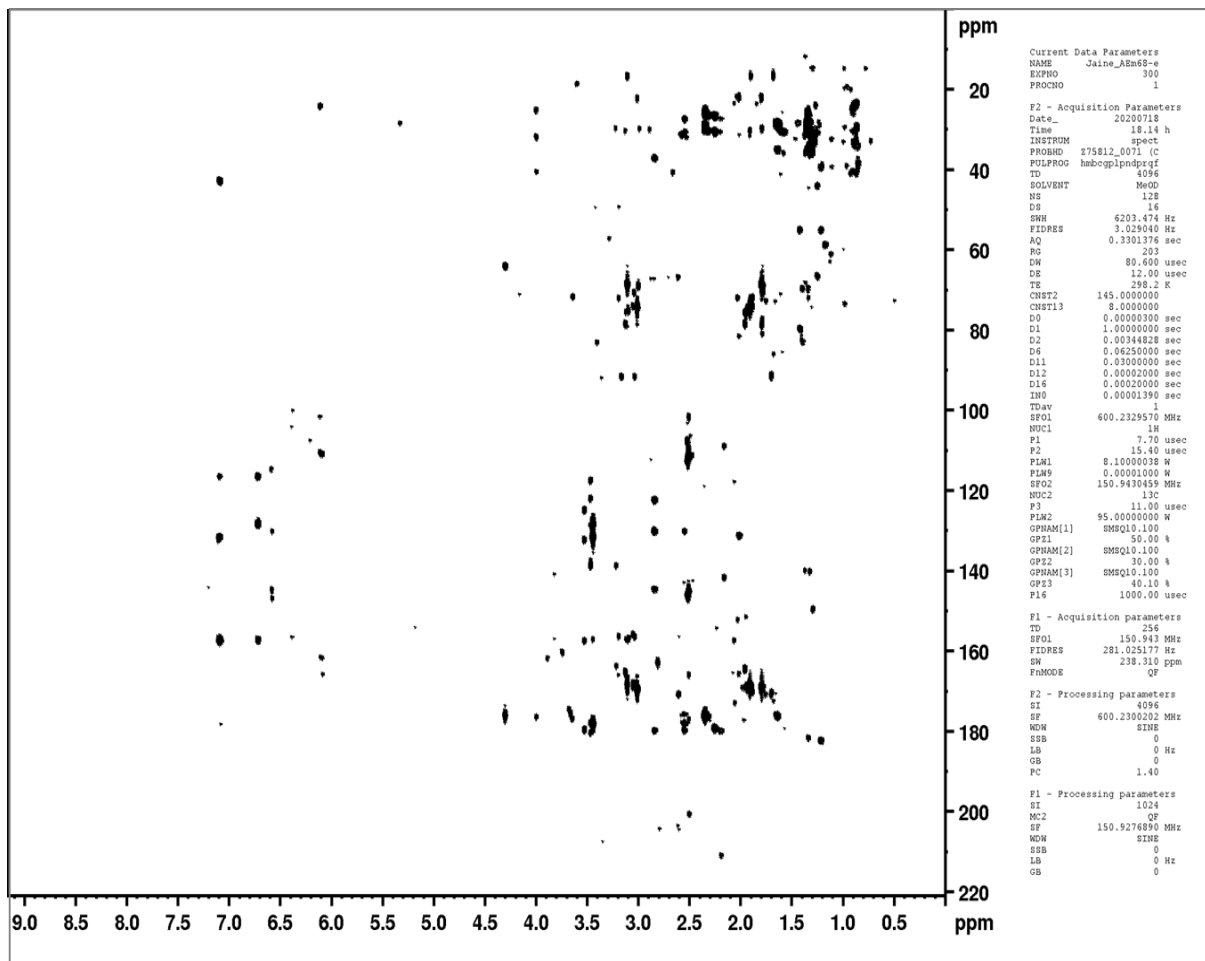
Fonte: do autor.

Figura 77 – Correlações observadas no espectro de HSQC da subfração AEm68-E em CD₃OD, 14,1 T a 25 °C



Fonte: do autor.

Figura 78 – Correlações observadas no espectro de HMBC da subfração AEm68-E em CD₃OD, 14,1 T a 25 °C



Fonte: do autor.

APÊNDICE E – Dados de ESI(+) - MS/MS

Tabela 19 – Valores de massa (m/z) e intensidade dos fragmentos derivados do íon m/z 139, amostra AEm68-C

(continua)

Massa	Intensidade	Massa	Intensidade	Massa	Intensidade
52,04062	41,27953	79,05413	107,3282	110,7878	44,39474
53,20784	43,77642	79,80854	49,97337	111,044	245,9937
54,19643	40,55834	80,97082	47,90444	111,0552	106,0669
55,71894	40,75901	81,06969	214,7642	111,0711	51,95981
56,82105	43,43952	83,04897	349,6065	111,0803	395,3474
57,89825	38,24814	85,15102	47,3135	113,5117	46,19674
58,89835	40,26194	86,72722	44,22603	113,9636	593,1035
59,45816	52,4695	88,15663	38,4893	114,3363	69,73185
60,0934	41,26786	89,41153	46,3503	115,4696	44,54344
60,6506	45,36366	91,08475	41,32458	116,5063	143,3748
65,06644	37,0633	92,0388	45,83981	116,9719	76,34256
66,10061	104,9475	93,06968	245,5121	117,5142	131,9027
68,34644	50,53066	94,92858	42,76183	118,0043	77,0553
69,03333	662,8782	95,04902	167,7661	118,0158	137,065
69,03426	71,55365	95,08537	525,0106	118,0244	169,2591
69,27492	39,0957	97,02824	89,44309	118,0297	80,0022
69,45763	44,76762	97,06466	566,8362	118,0501	54,38945
70,15488	45,50486	98,79177	37,73819	118,4921	75,23895
71,11119	44,12384	98,96121	756,3158	118,5018	244,1016
71,92232	43,89745	103,2003	46,28729	118,5068	435,0617
72,07575	49,13338	103,6947	44,61469	118,5093	331,3896
72,46244	53,21273	105,778	44,4017	118,5196	43,67318
74,05839	48,40002	105,8578	47,72969	118,522	924,8558
74,69779	43,0796	105,9814	44,25086	118,532	134,9991
76,47296	39,83624	107,049	472,1199	118,5401	81,67638
77,43217	45,57429	107,5802	40,58728	121,0215	65,74879
78,25778	46,92857	108,7152	52,15222	121,0258	231,3373
78,3824	45,62215	110,4012	45,09058	121,0283	3490,515

Fonte: do autor.

Tabela 19 – Valores de massa (m/z) e intensidade dos fragmentos derivados do íon m/z 139, amostra AEm68-C

(conclusão)

Massa	Intensidade	Massa	Intensidade	Massa	Intensidade
121,0305	315,867	128,9419	56,09703	177,7417	52,64595
121,0396	1090,922	130,9893	72,41715	181,831	46,95769
121,0419	85,3476	132,0016	119,1904	183,924	53,29396
121,0647	265,6229	136,5027	69,68013	196,0711	54,09129
121,1011	1007,296	136,52	164,1971	208,3031	40,74429
124,3961	54,38968	138,679	46,24831	209,7879	40,11557
125,5117	181,8607	139,0388	59,7306	219,0313	64,76745
126,5195	107,6455	139,05	98,30013	224,7588	44,91778
126,9674	296,1445	139,0542	93,06124	227,3568	48,89639
127,0211	85,4335	139,0753	557,5959	229,2783	54,1573
127,0297	147,2497	139,0865	200,425	231,9581	45,53299
127,0354	93,62211	139,1116	638,7963	234,1546	40,86375
127,0397	119,5947	139,1142	49,07596	235,9881	264,5079
127,4925	94,08775	139,123	75,90807	236,0368	93,84998
127,4973	214,4518	139,988	124,4316	240,8416	44,84265
127,5039	59,08846	141,0074	53,91388	241,6745	41,82356
127,5071	426,6457	141,0659	48,44817	245,3132	58,87481
127,512	354,9225	149,4187	45,50008	253,2551	56,87296
127,5146	548,7977	151,3779	49,05206	253,7372	50,12777
127,517	65,52363	154,9901	275,0059	261,4368	50,33579
127,5273	938,0221	162,0668	42,43434	274,7285	57,16585
127,5294	55,5571	163,0389	90,12407	277,8612	46,22925
127,539	96,61052	164,1703	40,67498	283,128	49,04775
127,5432	77,25295	165,8014	45,72408	284,5983	50,58034
127,9766	45,7634	168,4316	39,58948	292,9967	48,08155
127,9792	543,986	169,7324	52,29528		

Fonte: do autor.

Tabela 20 – Valores de massa (m/z) e intensidade dos fragmentos derivados do íon m/z 152, amostra AEm68-E

(continua)

Massa	Intensidade	Massa	Intensidade	Massa	Intensidade
50,77364	12,5192	94,16476	10,86753	130,0648	13,99564
54,13613	10,93989	94,9928	10,60979	131,0121	14,59684
54,18874	9,949621	96,67535	11,40759	131,029	17,88721
54,73838	9,005893	97,13626	10,4783	131,4939	20,58301
55,04331	11,62629	97,18448	10,56326	131,5045	22,97053
55,15718	10,11303	97,78476	10,75166	131,5118	171,2596
59,04907	21,68298	98,84342	9,833022	131,53	75,08463
62,22593	9,928789	99,21319	11,70315	131,5981	11,19902
62,72638	9,239292	100,6707	10,46831	131,6643	10,42535
63,2803	10,7765	104,3426	10,37996	132,0442	36,52473
64,49907	9,09587	106,8303	11,4851	132,062	27,78989
65,70406	10,13771	107,0492	72,90469	132,1021	40,08186
66,1005	27,27082	108,1076	20,82925	133,0391	22,65976
68,35382	10,51862	113,9638	17,31433	134,0601	29,91897
68,91727	9,803021	117,1612	11,76099	134,0869	23,56191
70,12194	11,76989	117,7516	11,38194	134,1063	107,2254
74,41913	11,44657	121,0292	10,47836	136,0044	36,42026
75,81261	9,520537	122,0068	30,15847	137,0235	12,33818
78,17593	9,144656	122,0238	16,53087	138,0311	83,10765
78,30396	10,49413	122,0684	33,1982	139,988	24,51648
80,92283	8,820977	122,5826	10,35557	140,499	15,33407
81,60858	13,27642	123,0387	44,73208	140,5096	48,34276
83,77686	11,48742	123,0572	17,38861	140,5171	163,5732
85,29981	10,34435	123,3079	11,06109	140,5285	21,23657
85,48097	11,55558	124,0338	46,4684	140,5353	87,16818
86,46193	10,57694	124,0474	17,78218	141,0023	10,42808
88,77152	11,18644	124,0851	9,699746	143,0017	47,8482
89,21396	9,64318	124,5269	12,9306	143,0123	34,97666
90,29906	9,727028	130,0463	14,62087	143,022	10,66044

Fonte: do autor.

Tabela 20 – Valores de massa (m/z) e intensidade dos fragmentos derivados do íon m/z 152, amostra AEm68-E

(conclusão)

Massa	Intensidade	Massa	Intensidade
143,0433	12,33367	176,3764	10,74765
143,0542	38,37197	176,3764	10,74765
145,0097	41,23781	190,0029	20,50229
146,0724	14,40367	202,5225	11,28076
146,9617	10,14042	206,191	10,75935
147,0365	40,96792	208,702	12,02854
149,0471	60,12811	187,1184	11,84088
149,5224	28,2378	190,0029	20,50229
149,5407	26,08163	202,5225	11,28076
151,6445	11,27368	206,191	10,75935
152,0069	49,3673	208,702	12,02854
152,0171	26,61983	187,1184	11,84088
152,0425	12,82785	190,0029	20,50229
152,0621	115,8505	202,5225	11,28076
152,0709	15,79089	206,191	10,75935
152,1071	14,71077	208,702	12,02854
155,0028	20,0231	187,1184	11,84088
159,2369	12,91601	190,0029	20,50229
160,9895	13,20435	202,5225	11,28076
164,3341	11,46045	206,191	10,75935
165,4531	13,70713	208,702	12,02854
169,1266	9,371859	187,1184	11,84088
175,1113	10,58904	190,0029	20,50229

Fonte: do autor.