



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Explorando a diversidade química de fungos fitoparasitas de frutos
e avaliação de seus potenciais inibitórios de papaína**

Vitor de Souza Mazucato

Ribeirão Preto

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Explorando a diversidade química de fungos fitoparasitas de frutos
e avaliação de seus potenciais inibitórios de papaína**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do
Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos

Orientado: Vitor de Souza Mazucato

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências Farmacêuticas em 19/11/2021. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2021

MAZUCATO, V. S.	Explorando a diversidade química de fungos fitoparasitas de frutos e avaliação de seus potenciais inibitórios de papaína		MESTRADO FCFRP USP 2021
--------------------	---	--	-------------------------------

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Mazucato, Vitor de Souza

Explorando a diversidade química de fungos fitoparasitas de frutos e avaliação de seus potenciais inibitórios de papaína. Ribeirão Preto, 2021.

146p.: il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Paulo Cezar Vieira.

1. Fungos fitopatogênicos.
2. *Fusarium guttiforme*.
3. *Colletotrichum horii*.
4. Biotransformação e modulação epigenética.
5. Inibidores enzimáticos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vitor de Souza Mazucato

Explorando a diversidade química de fungos fitoparasitas de frutos e avaliação de seus potenciais inibitórios de papaína

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências
Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTO

A minha família por acreditarem e confiarem em mim. E por auxiliarem e apoiarem durante todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira pela oportunidade, amizade, ensinamentos e apoio nestes anos. Me ajudando no crescimento profissional e como pessoa.

Ao Dr. Airton Damasceno Silva pela amizade, ensinamentos, paciência, companheirismo e apoio nestes anos.

A Profa. Dra. Hosana Maria Deboni por me acolher em seu laboratório, pelo apoio, amizade e inclusão na discussão do grupo de Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho – LQOAM.

Aos colegas e amigos do grupo LQOAM pelo companheirismo. Em especial a Thaiz Teixeira, Gustavo Santos e Ana Carolina Jordão pelos ensinamentos, amizades, ajuda e discussões valiosas.

Ao Prof. Dr. Hamilton Cabral por me ensinar em seu laboratório as boas práticas no trabalho com enzima e a Profa. Dra. Richele Priscila Severino, ambos me ajudaram a desenvolver uma metodologia para o ensaio enzimático.

Aos técnicos Vinicius Palaretti, Eduardo Crevelin e Rodrigo da Silva pela disposição para análises de RMN e CG/MS

A todos os funcionários, professores e pesquisadores que contribuíram direta ou indiretamente em minha formação e pesquisa.

A Universidade de São Paulo junto a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

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

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS e SÍMBOLOS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Material	16
3.1.1 Vidrarias	16
3.1.2 Reagentes e solventes	16
3.1.3 Meios de cultivo utilizados.....	17
3.1.4 Suportes para cromatografia	17
3.1.5 Equipamentos	18
3.1.6 Micro-organismos selecionados.....	18
3.1.7 Outros.....	19
3.2 Métodos	19
3.2.1 Seleção, preservação e manutenção das linhagens fúngicas	19
3.2.2 Experimento de interações entre os fungos.....	20
3.2.3 Avaliação do perfil químico em diferentes intervalos de tempo – escala reduzida.....	20
3.2.4 Cocultivo em larga escala em meios de PDB e Czapek	21
3.2.5 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) do ácido fusárico para os dois fungos estudados	22
3.2.6 Processos de biotransformação com ácido fusárico, 9,10-desidrofusárico e respectivas misturas	23
3.2.7 Cultivo com modificador epigenético.....	24
3.2.8 Obtenção dos extratos brutos e análises de RMN.....	24
3.2.9 Fracionamento dos extratos obtidos em escala reduzida.....	26
3.2.10 Fracionamento dos extratos obtidos em larga escala	32
3.2.11 Fracionamento dos extratos obtidos nos processos de biotransformações	35
3.2.12 Fracionamento dos extratos obtidos por modificação epigenética.....	39
3.2.13 Compostos obtidos a partir dos experimentos realizados	40
3.2.14 Ensaio enzimáticos.....	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Análise dos extratos brutos obtidos em escala reduzida	45
4.1.1 Cultivos Axênicos	46
4.1.2 Cocultivo	51

4.1.3	Comparação do perfil químico dos extratos obtidos em escala reduzida	56
4.2	Análise dos extratos brutos obtidos em larga escala	60
4.2.1	Meio PDB.....	60
4.2.2	Meio Czapek.....	62
4.2.3	Avaliação do perfil químico dos extratos em meios de cultivo diferentes	65
4.3	Interação entre fungos	68
4.4	Concentração inibitória mínima (CIM)	69
4.5	Análise dos extratos brutos obtidos nas biotransformações	71
4.5.1	Ácido fusárico e avaliação da toxicidade do produto formado	71
4.5.2	Ácido 9,10-desidrofusárico.....	75
4.5.3	Mistura ácido fusárico e ácido 9,10-desidrofusárico.....	78
4.6	Análise dos extratos brutos obtidos por modificador epigenético	81
4.7	Isolamento e elucidação estrutural dos compostos.....	88
4.7.1	Ácido fusário (1) e ácido 9,10-desidrofusárico (2).....	89
4.7.2	Tirosol (3).....	93
4.7.3	Fusarinol (4)	95
4.7.4	Complexo de ácido fusárico e magnésio (5) e Complexo de ácido 9,10-desidrofusárico (6).....	97
4.7.5	5-Butil-5-(hidroximetil)diidrofuranona (7)	105
4.7.6	Uracila (8)	108
4.7.7	<i>p</i> -Hidroxiacetofenona (9).....	109
4.7.8	Dicetopiperazina ciclo prolina-leucina (10).....	111
4.7.9	7-Hidroxifusarinol (11).....	114
4.7.10	9,10-Desidrofusarinol (12).....	117
4.7.11	Acetato de fusarinila (13).....	119
4.7.12	Gibepirona B (14)	122
4.8	Ensaio Enzimáticos	124
4.8.1	Titulação do sítio ativo da papaína	124
4.8.2	Determinação do experimental do valor de K_m	124
4.8.3	Avaliação da atividade de inibição da papaína.....	125
5.	CONCLUSÕES	128
6.	REFERÊNCIAS.....	130

RESUMO

MAZUCATO, V. S. **Explorando a diversidade química de fungos fitoparasitas de frutos e avaliação de seus potenciais inibitórios de papaína**. 2021. 146f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Neste trabalho foram estudados dois fungos, o *Fusarium guttiforme* e *Colletotrichum horii*, e seus potenciais de produzirem inibidores enzimáticos associados a doenças provocadas por esses fungos em abacaxi, mamão e caqui. Utilizou-se a técnica de cocultivo, uma abordagem utilizada atualmente para mimetizar o ambiente natural e obter uma maior diversidade química de compostos produzidos. Além disso, outras estratégias foram utilizadas para induzir a produção de diferentes metabólitos e explorar o potencial destes fungos como a utilização de meio de cultivo diferentes, sendo eles PDB e Czapek, a realização de processos de biotransformação das micotoxinas ácido fusárico (AF), ácido 9,10-desidrofusárico (ADF) e mistura deles e experimento com modificador epigenético, o ácido suberoidroxâmico (ASBH). Os extratos obtidos foram analisados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H), e técnicas cromatográficas foram utilizadas para isolamento dos compostos, cujas estruturas foram elucidadas por RMN de ^1H e espectrometria de massas, totalizando 14 compostos isolados e identificados. Os cultivos axênicos de *F. guttiforme* e *C. horii* em meio PDB levaram a produção de três compostos, o ácido fusárico (1), ácido 9,10-desidrofusárico (2) e tirosol (3), enquanto o cocultivo deles levou à produção de outros 4 compostos, o fusarinol (4), complexo do ácido fusárico com magnésio (5), complexo do ácido 9,10-desidrofusárico com magnésio (6) e uma lactona a 5-Butil-5-(hidroximetil)diidrofuranona (7), sendo estes três últimos inéditos na literatura. A variação de meio de cultivo PDB para meio Czapek levou a produção de compostos estruturalmente diferentes, sendo isolado os compostos uracila (8), *para*-hidroxiacetofenona (9) e a dicetopiperazina ciclo prolina-leucina (10). Os experimentos de biotransformação mostraram que o fusarinol obtido no cocultivo é resultado de um processo de destoxificação de AF pelo fungo *C. horii* a um composto menos tóxico, além disso foram obtidos outros 3 compostos desse processo, o 7-hidroxifusarinol (11), 9,10-desidrofusarinol (12) e acetato de fusarinila (13), sendo dois deles inéditos. A modulação epigenética com AS frente ao fungo *F. guttiforme* levou a um extrato com perfil químico diferente do controle, sendo obtidos alguns dos compostos obtidos no cocultivo em meio Czapek e a gibepirona B (14). Estes compostos foram submetidos a ensaio enzimático de inibição da papaína, as maiores atividade inibitória obtidas foram 56, 54 e 30% para os compostos complexo do ácido fusárico com magnésio (5), complexo do ácido 9,10-desidrofusárico com magnésio (6) e acetato de fusarinila (13) respectivamente.

Palavras-chave: fungos fitopatogênicos; *Fusarium guttiforme*; *Colletotrichum horii*; biotransformação e modulação epigenética; inibidores enzimáticos.

ABSTRACT

MAZUCATO, V. S. **Exploring the chemical diversity of phytoparasitic fungi on fruits and evaluating their papain inhibitory potentials.** 2021. 146f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

In this work, two fungi, *Fusarium guttiforme* and *Colletotrichum horii*, and their potential to produce enzyme inhibitors associated with diseases caused by these fungi in pineapple, papaya and persimmon were studied. Co-cultivation is an approach currently used to mimic the natural environment and obtain a large chemical diversity of produced compounds. In addition, other strategies were used to induce the production of other compounds and explore the potential of these fungi, such as the use of different culture media, namely PDB and Czapek, the performance of biotransformation processes of fusaric acid (AF), 9,10-dehydrofusaric acid (ADF) mycotoxins and their mixture and experiment with epigenetic modifier suberohydroxamic acid (SBHA). The obtained extracts were followed by hydrogen nuclear magnetic resonance (^1H NMR), chromatographic techniques were used to isolate the compounds that were elucidated by ^1H NMR and mass spectrometry, totaling 14 isolated compounds. Axenic cultivation in PDB medium led to the production of three compounds, fusaric acid (**1**), 9,10-dehydrofusaric acid (**2**) and tyrosol (**3**), while co-cultivation led to the production of another 4 compounds, fusarinol (**4**), compounds fusaric acid complex with magnesium (**5**), 9,10-dehydrofusaric acid complex with magnesium (**6**) and a 5-butyl-5-(hydroxymethyl)dihydrofuranone lactone (**7**), these last three are unpublished compounds. The variation from the PDB culture medium to the Czapek medium led to the production of totally different compounds, being isolated the compounds uracil (**8**), *p*-hydroxyacetophenone (**9**) and the diketopiperazine cycloproline-leucine (**10**). The biotransformation experiments showed that the fusarinol obtained in the co-cultivation is the result of a process of detoxification of FA by the fungus *C. horii* to a less toxic compound, in addition, other 3 compounds were obtained from this process 7-hydroxyfusarinol (**11**), 9,10-dehydrofusarinol (**12**) and fusarinyl acetate (**13**) being two of them unpublished. Epigenetic modulation with SBHA against the fungus *F. guttiforme* led to an extract with a different chemical profile than the control, being obtained some of the compounds obtained in co-cultivation in Czapek medium and also gibepiyrone B (**14**). These compounds were submitted to an enzymatic assay against papain, the highest inhibitory activities obtained were 56, 54 and 30% for the compounds fusaric acid complex with magnesium (**5**), 9,10-dehydrofusaric acid complex with magnesium (**6**) and fusarinyl acetate (**13**) respectively.

Keywords: phytopathogenic fungi; *Fusarium guttiforme*; *Colletotrichum horii*; biotransformation and epigenetic modulation; enzyme Inhibitor

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS e SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micro molar
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
λ_{ex}	Comprimento de onda de excitação
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
AF	Ácido fusárico
ADF	Ácido 9,10-desidrofusárico
Ala	Alanina
Arg	Arginina
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CIM	Concentração inibitória mínima
CLV	Cromatografia líquida a vácuo
d	Dupleto
DAD	<i>Diode array detection</i>
Dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitól

E-64	L-trans-Epoxisuccinil-Leucilamida (4-guanidino)-butano
FM	Fase móvel
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
Km	Constante de Michaelis-Menten
m	Multiplete
M	Concentração molar (mol/L)
m/z	Razão massa/carga
MeOH	Metanol
MHz	Mega-hertz
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono treze
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
PDA	<i>Potato dextrose agar</i>
PDB	<i>Potato dextrose broth</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
q	Quarteto
quint	Quinteto
s	Simpleto

sext	Sexteto
t	Tripleto
TCA	Ácido tricloroacético
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
ZFR-MCA	Carbobenzoxi- Z- fenilalanina-arginina-7- amino-4-metilcumarina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Extratos brutos obtidos dos cultivos axênicos e cocultivo em meio líquido

Tabela 2. Gradiente dos solventes utilizados na cromatografia líquida a vácuo.

Tabela 3. Gradiente dos solventes utilizados na cromatografia líquida a vácuo.

Tabela 4. Lista dos compostos isolados, fórmula estrutural, fração coletadas e massa obtida.

Tabela 5. Média dos diâmetros obtidos para cada concentração de ácido fusárico e a porcentagem de inibição calculada.

Tabela 6: Dados de RMN de ^1H do ácido fusárico (1)

Tabela 7: Dados de RMN de ^1H do ácido 9,10-desidrofusárico (2)

Tabela 8: Dados de RMN de ^1H do tirosol (3)

Tabela 9: Dados de RMN de ^1H do fusarinol (4)

Tabela 10 Dados de RMN de complexo ácido fusárico com magnésio (5) e ácido fusárico (1)

Tabela 11. Dados de RMN de complexo ácido 9,10-desidrofusárico com magnésio (6) e ácido 9,10-desidrofusárico (2).

Tabela 12. Dados de RMN de 5-Butil-5-(hidroximetil)diidrofuranona (7)

Tabela 13: Dados de RMN de ^1H da *p*-hidroxiacetofenona (9)

Tabela 14: Dados de RMN de ^1H da dicetopiperazina ciclo prolina-leucina (10)

Tabela 15: Dados de RMN de ^1H do composto 7-hidroxifusarinol (11).

Tabela 16: Dados de RMN ^1H do 9,10-desidrofusarinol (12)

Tabela 17: Dados de RMN ^1H e HMBC do acetato de fusarinila (13).

Tabela 18: Dados de RMN ^1H da gibepirona B (14) isolada e da literatura

Tabela 19: Atividade inibitória dos compostos frente a papaína.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alguns compostos inibidores enzimáticos que atuam como medicamentos.

Figura 2. Alguns compostos produzidos pelo gênero *Fusarium*.

Figura 3. Alguns compostos produzidos pelo gênero *Colletotrichum*.

Figura 4. Interações morfológicas observadas entre dois fungos em uma placa de Petri. As morfologias das colônias de cocultivos fúngicos mostram os quatro principais tipos de interações: inibição a distância, linhas de zona, inibição por contato e supercrescimento.

Figura 5. Alguns compostos inéditos isolados a partir do cocultivo microbiano.

Figura 6. Alguns compostos produzidos pela biotransformação ácido fusárico por micro-organismos.

Figura 7. Estrutura química do modulador epigenético ácido suberoidroxâmico.

Figura 8. Alguns compostos inéditos produzidos a partir de micro-organismo tratados com o modificador epigenético ácido suberoidroxâmico.

Figura 9. Fotos do fungo *F. guttiforme* registradas da parte superior (A) e inferior (B) da placa.

Figura 10. Fotos do fungo *C. horii* registradas da parte superior (A) e inferior (B) da placa.

Figura 11. Fluxograma do fracionamento dos extratos obtidos dos cultivos axênicos dos fungos *F. guttiforme* e *C. horii* (AxFg28) e (AxCh28) em 28 dias de crescimento.

Figura 12. Fluxograma do fracionamento dos extratos obtidos do cocultivo dos fungos *F. guttiforme* e *C. horii* em 7, 14 e 21 dias de crescimento.

Figura 13. Fluxograma do fracionamento do extrato obtido do cocultivo em escala reduzida dos fungos *F. guttiforme* e *C. horii* em 28 dias de crescimento.

Figura 14. Fluxograma do fracionamento do extrato obtido do cocultivo em larga escala dos fungos *F. guttiforme* e *C. horii* em 28 dias de crescimento em meio PDB.

Figura 15. Fluxograma do fracionamento do extrato obtido do cocultivo em larga escala dos fungos *F. guttiforme* e *C. horii* em 28 dias de crescimento em meio Czapek.

Figura 16. Fluxograma do fracionamento do extrato obtido da biotransformação do ácido fusárico por *C. horii* em 7 dias.

Figura 17. Fluxograma do fracionamento do extrato obtido da biotransformação do ácido fusárico por *C. horii* em 28 dias.

Figura 18. Fluxograma do fracionamento do extrato obtido da biotransformação do ácido 9,10-desidrofusárico por *C. horii* em 7 dias.

Figura 19. Fluxograma do fracionamento do extrato obtido da biotransformação da mistura de ácido fusárico e ácido 9,10-desidrofusárico por *C. horii* em 7 dias.

Figura 20. Fluxograma do fracionamento do extrato obtido com modificador epigenético no fungo *F. guttiforme*.

Figura 21. Esquema geral da metodologia de ensaio enzimático da papaína.

Figura 22. Foto do cultivo axênico do *F. guttiforme* em 7 e 28 dias. Na esquerda (A) no período de 7 dias de crescimento e na direita (B) 28 dias.

Figura 23: Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos AxFg7 e AxFg28. Em (A) na parte superior está o espectro de RMN de ^1H do extrato AxFg7 obtido em 400 MHz e solvente acetona- D_6 . Em (B) na parte inferior o RMN de ^1H do extrato AxFg28 obtido em 400 MHz e solvente acetona- D_6 .

Figura 24. Foto do cultivo axênico do *C. horii* em 7 e 28 dias. A esquerda (A) no período de 7 dias de crescimento e na direita (B) 28 dias.

Figura 25: Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos AxCh7 e AxCh28. Em (A) na parte superior está o espectro de RMN de ^1H do extrato AxCh7 obtido em 400 MHz e solvente acetona- D_6 . Em (B) na parte inferior o RMN de ^1H do extrato AxCh28 realizado em 400 MHz e solvente acetona- D_6 .

Figura 26. Cromatograma dos extratos obtidos dos cultivos axênicos de *F. guttiforme* e *C. horii* em 28 dias de cultivo; (A) Extrato AxFg28. Coluna da Supelco RP-8 (10 μm , 10 \times 250 mm) e taxa de fluxo de 4,0 mL.min $^{-1}$. O sistema de eluição foi composto por água e metanol 15 a 100% de MeOH, em 11 min, 100% de MeOH em de 11 a 13 min e 100 a 15% de MeOH de 13 a 14 min com detecção a 270 nm. (B) Extrato AxCh28. Coluna da Supelco RP-8 (10 μm , 10 \times 250 mm) e taxa de fluxo de 4,0 mL.min $^{-1}$. O sistema de eluição foi composto por água e metanol 15 a 100% de MeOH, em 13 min, 100% de MeOH de 13 a 15 min e 100 a 15% de MeOH de 15 a 16 min com detecção a 222 nm.

Figura 27. Espectro de absorção no UV dos compostos ácido fusárico e ácido 9,10-desidrofusárico. Em azul o espectro de absorção do composto ácido fusárico e em verde o espectro de absorção do ácido 9,10-desidrofusárico.

Figura 28. Fotos do cocultivo em escala reduzida de *F. guttiforme* e *C. horii* em 7, 14, 21 e 28 dias. Na parte superior esquerda (A) no período de 7 dias de crescimento, na parte superior direita (B) 14 dias, inferior esquerda (C) em 21 dias e na parte inferior direita (D) em 28 dias.

Figura 29: Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos de cocultivo em escala reduzida em 7, 14, 21 e 28 dias. (A) O espectro de RMN de ^1H do extrato CoR7 obtido em 400 MHz e solvente acetona- D_6 . (B) O espectro RMN de ^1H do extrato CoR14 obtido em 400 MHz e solvente acetona- D_6 . (C) O espectro RMN de ^1H do extrato CoR21 obtido em 400 MHz e solvente acetona- D_6 . (D) O espectro RMN de ^1H do extrato CoR28 obtido em 400 MHz e solvente CD_3OD .

Figura 30. Cromatograma da fração CoR7CLV5 Coluna da Supelco RP-8 (10 μm , 10 \times 250 mm) e taxa de fluxo de 4,0 mL.min $^{-1}$. O sistema de eluição foi composto por água e metanol (15 a 60% de MeOH, em 10 min, 100% de MeOH de 10 a 13 min, 30% de 13 a 17 min e detecção a 270 nm. Frações coletadas CoR7CLV5p1 (13,5 min), CoR7CLV5p2 (14,6 min) e CoR7CLV5p3 (15,33 min).

Figura 31. Espectro de RMN de ^1H da fração CoR28CLV4 (400MHz em CD_3OD).

Figura 32. Cromatograma da fração CoR28CLV4. Coluna da Supelco RP-8 (10 μm , 10 \times 250 mm) e taxa de fluxo de 4,0 mL.min $^{-1}$. O sistema de eluição foi composto por água e metanol (15 a 50% de MeOH, em 22 min, 15% de MeOH em de 22 a 25 min e detecção a 270 nm. Frações coletadas CoR28CLV4p1 (3,89 min), CoR28CLV4p2 (9,23 min) e CoR28CLV4p3 (12,09 min).

Figura 33. Espectro de absorção no UV dos compostos observados na fração CoR28CLV5. Em verde um sinal de pequena intensidade que não foi identificado, azul o espectro de absorção do composto ácido 9,10-desidrofusárico, em vermelho o

espectro de absorção do ácido fusárico, em azul claro o espectro de absorção do complexo de ácido 9,10-desidrofusárico com magnésio, em rosa o espectro de absorção do complexo de ácido fusárico com magnésio.

Figura 34. Diferenças observadas nos cultivos em 7 dias (acetona-D₆ em 400 MHz). (A) Espectro de RMN de ¹H do extrato CoR7; (B) Espectro de RMN de ¹H do extrato AxCh7; (C) Espectro de RMN de ¹H do extrato AxFg7; (D) Espectro de RMN de ¹H do branco do meio PDB.

Figura 35. Diferenças dos sinais obtidos nos cultivos em 14 dias (acetona -D₆ em 400 MHz). (A) Espectro de RMN de ¹H do extrato CoR7; (B) Espectro de RMN de ¹H do extrato AxCh7; (C) Espectro de RMN de ¹H do extrato AxFg7; (D) Espectro de RMN de ¹H do branco do meio PDB. Fonte: o autor (2021)

Figura 36. Foto do cocultivo após 28 dias de crescimento no meio PDB.

Figura 37. Espectro de RMN de ¹H do extrato CoLP28 e do controle em meio PDB (acetona -D₆ em 400 MHz). Na parte superior (A), espectro de RMN de ¹H do branco do meio de cultivo. Na parte inferior (B), espectro de RMN de ¹H do extrato CoLP28.

Figura 38. Foto do cocultivo após 28 dias de crescimento no meio Czapek.

Figura 39. Espectros de RMN de ¹H do extrato CoLC28 e do controle em meio PDB (acetona -D₆ em 400 MHz). Na parte superior (A) o espectro de RMN de ¹H do branco do meio de cultivo. Na parte inferior (B) o espectro de RMN de ¹H do extrato CoLC28.

Figura 40. Cromatograma da fração CoLC28. Coluna da Supelco RP-8 (10 µm, 10 × 250 mm). taxa de fluxo de 4,0 mL.min⁻¹. O sistema de eluição foi composto por água e metanol (15 a 100% de MeOH, em 20 min, 100% de MeOH em de 22 a 22 min e de 100 a 15% de 22 a 25min detecção a 254 nm em azul e 270 nm em preto. Frações coletadas CoLC28p1 (3,95 min), CoLC28p2 (4,0-8,8 min), CoLC28p3 (9,2 min), CoLC28p4 (9,8 min), CoLC28p5 (11,0 min), CoLC28p6 (12-15 min), CoLC28p7 (15,2 min), CoLC28p8 (16-18 min), CoLC28p9 (18,5 min), CoLC28p10 (20 min).

Figura 41. Espectro de RMN de ¹H da fração CoLC28p4 (CD₃OD em 400 MHz). Na parte superior (A) o espectro de RMN de ¹H da fração CoLC28p4. Na parte inferior (B) o espectro de RMN de ¹H ampliado.

Figura 42. Fotos mostrando o crescimento micelial do cocultivo em meio PDB (A) e Czapek (B) em 14 dias.

Figura 43. Espectros de RMN de ¹H do extrato CoLP28 e CoLC28 (acetona -D₆ em 400 MHz). Na parte superior (A) o espectro de RMN de ¹H da fração CoLP28. Na parte inferior (B) o espectro de RMN de ¹H ampliado CoLC28.

Figura 44. Cromatograma da fração CoLP28. Coluna da Supelco C-8 (25 cm x 4,6 mm, 5 µm) taxa de fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. O sistema de eluição foi composto por água e acetonitrila (15 a 100% de ACN, em 20 min, 100% de ACN em de 20 a 22 min e de 100 a 15% de 22 a 25min detecção a 270 nm em preto e 210 nm em azul.

Figura 45. Cromatograma da fração CoLC28. Coluna da Supelco C-8 (25 cm x 4,6 mm, 5 µm) taxa de fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. O sistema de eluição foi composto por água e acetonitrila (15 a 100% de ACN, em 20 min, 100% de ACN em de 20 a 22 min e de 100 a 15% de 22 a 25min detecção a 270 nm em preto e 210 nm em azul.

Figura 46. Foto do experimento de interações morfológicas entre os fungos *Fusarium guttiforme* e *Colletotrichum horii*.

Figura 47. Ensaio de concentração inibitória mínima, placas vistas de cima e costa para os dois fungos, *C. horii* e *F. guttiforme* em cada concentração.

Figura 53. Cromatogramas da separação do extrato BADFCh7. HPLC Coluna da Supelco RP-8 (10 μ m, 10 \times 250 mm) e taxa de fluxo de 4,0 mL.min⁻¹. O sistema de eluição foi composto por água e metanol (15 a 100 % de MeOH, em 20 min, 100% de MeOH em de 20 a 22 min e de 100 a 15% de 22 a 25 min com detecção a 267 nm.

Figura 54. Espectro de absorção do pico em 16,6 min do fracionamento do extrato BADFCh7. (A) Espectro de absorção no UV do pico em 16,6 min. (B) Comparação do espectro de absorção no UV do pico em 16,6 min (azul) e fusarinol (preto).

Figura 55. Sinais observados nos espectros de RMN de ¹H da biotransformação da mistura dos ácidos (400 MHz). (A) espectro de RMN de ¹H do extrato BMCh7 em acetona-D₆; (B) espectro de RMN de ¹H ampliado; (C) Espectro de RMN de ¹H do branco do meio com a mistura de ácidos em acetona-D₆ (D) espectro de RMN de ¹H ampliado.

Figura 56. Cromatograma da separação do extrato BMCh7. HPLC Coluna da Supelco RP-8 (10 μ m, 10 \times 250 mm) e taxa de fluxo de 4,0 mL.min⁻¹. O sistema de eluição foi composto por água e metanol 15 a 100 % de MeOH, em 20 min, 100% de MeOH em de 20 a 22 min e de 100 a 15% de 22 a 25 min, detecção a 270 nm.

Figura 57. Sobreposição dos espectros de absorção no UV do fracionamento do extrato BMCh7.

Figura 58. Espectro de RMN de ¹H do fungo *F. guttiforme* cultivado na presença do modificador epigenético ácido suberoidroxâmico (400 MHz). (A) espectro de RMN de ¹H do extrato EPGFg28 em acetona-D₆; (B) espectro de RMN do controle do fungo; (C) Espectro de RMN de ¹H do branco do meio com o modificador

Figura 59. Espectro de RMN de ¹H do extrato com modificador epigenético de *F. guttiforme* (400 MHz). (A) espectro de RMN de ¹H do extrato EPGFg28 ampliado em acetona-D₆; (B) espectro de RMN de ¹H ampliado do controle; (C) Espectro de RMN de ¹H do branco do meio com modificador em acetona-D₆.

Figura 60. Cromatogramas obtidos no experimento de modificador epigenético em preto com detecção em 270 nm e em azul 325 nm. (A) O cromatograma do extrato EPGFg28. (B) O cromatograma do controle.

Figura 61. Espectro de RMN de ¹H da fração EPGFg28p7 (CD₃OD em 400 MHz).

Figura 62. Estrutura das moléculas lignoren e ciclonerodiol observadas nas frações EPGFg28p9 e EPGFg28p10

Figura 63. Espectros do extrato do fungo *Colletotrichum* na presença do modificador epigenético ácido suberoidroxâmico (400 MHz). (A) espectro de RMN de ¹H do extrato EPGCh28 em acetona-D₆; (B) espectro de RMN do controle do fungo; (C) Espectro de RMN de ¹H do branco do meio com o modificador

Figura 64. Cromatogramas obtidos no experimento de modificador epigenético em preto 200 nm e em azul 225 nm. (A) O cromatograma do extrato EPGCh28. (B) O cromatograma do controle.

Figura 53. Cromatogramas da separação do extrato BADFCh7. HPLC Coluna da Supelco RP-8 (10 μ m, 10 \times 250 mm) e taxa de fluxo de 4,0 mL.min⁻¹. O sistema de eluição foi composto por água e metanol (15 a 100 % de MeOH, em 20 min, 100% de MeOH em de 20 a 22 min e de 100 a 15% de 22 a 25 min com detecção a 267 nm.

Figura 54. Espectro de absorção do pico em 16,6 min do fracionamento do extrato BADFCh7. **(A)** Espectro de absorção no UV do pico em 16,6 min. **(B)** Comparação do espectro de absorção no UV do pico em 16,6 min (azul) e fusarinol (preto).

Figura 55. Sinais observados nos espectros de RMN de ^1H da biotransformação da mistura dos ácidos (400 MHz). **(A)** espectro de RMN de ^1H do extrato BMCh7 em acetona- D_6 ; **(B)** espectro de RMN de ^1H ampliado; **(C)** Espectro de RMN de ^1H do branco do meio com a mistura de ácidos em acetona- D_6 **(D)** espectro de RMN de ^1H ampliado.

Figura 56. Cromatograma da separação do extrato BMCh7. HPLC Coluna da Supelco RP-8 (10 μm , 10 \times 250 mm) e taxa de fluxo de 4,0 mL.min $^{-1}$. O sistema de eluição foi composto por água e metanol 15 a 100 % de MeOH, em 20 min, 100% de MeOH em de 20 a 22 min e de 100 a 15% de 22 a 25 min, detecção a 270 nm.

Figura 57. Sobreposição dos espectros de absorção no UV do fracionamento do extrato BMCh7.

Figura 58. Espectro de RMN de ^1H do fungo *F. guttiforme* cultivado na presença do modificador epigenético ácido suberoidroxâmico (400 MHz). **(A)** espectro de RMN de ^1H do extrato EPGFg28 em acetona- D_6 ; **(B)** espectro de RMN do controle do fungo; **(C)** Espectro de RMN de ^1H do branco do meio com o modificador

Figura 59. Espectro de RMN de ^1H do extrato com modificador epigenético de *F. guttiforme* (400 MHz). **(A)** espectro de RMN de ^1H do extrato EPGFg28 ampliado em acetona- D_6 ; **(B)** espectro de RMN de ^1H ampliado do controle; **(C)** Espectro de RMN de ^1H do branco do meio com modificador em acetona- D_6 .

Figura 60. Cromatogramas obtidos no experimento de modificador epigenético em preto com detecção em 270 nm e em azul 325 nm. **(A)** O cromatograma do extrato EPGFg28. **(B)** O cromatograma do controle.

Figura 61. Espectro de RMN de ^1H da fração EPGFg28p7 (CD_3OD em 400 MHz).

Figura 62. Estrutura das moléculas lignoren e ciclonerodiol observadas nas frações EPGFg28p9 e EPGFg28p10

Figura 63. Espectros do extrato do fungo *Colletotrichum* na presença do modificador epigenético ácido suberoidroxâmico (400 MHz). **(A)** espectro de RMN de ^1H do extrato EPGCh28 em acetona- D_6 ; **(B)** espectro de RMN do controle do fungo; **(C)** Espectro de RMN de ^1H do branco do meio com o modificador

Figura 64. Cromatogramas obtidos no experimento de modificador epigenético em preto 200 nm e em azul 225 nm. **(A)** O cromatograma do extrato EPGCh28. **(B)** O cromatograma do controle.

Figura 65. Estrutura química dos compostos ácido fusárico (1) e ácido 9,10-desidrofusárico (2).

Figura 66. Espectros de RMN ^1H do ácido fusárico e ácido 9,10-desidrofusárico (MD_3OD em 400 MHz). **(A)** espectro de RMN de ^1H da mistura dos dois ácidos; **(B)** espectro de RMN do ácido fusárico; **(C)** Espectro de RMN de ^1H do ácido 9,10-desidrofusárico.

Figura 67. Estrutura química do composto tirosol (3).

Figura 68. Espectro de RMN de ^1H do tirosol (MD_3OD em 400 MHz).

Figura 69. Estrutura química do composto fusarinol (4).

- Figura 70.** Sinais observados no espectro do fusarinol (Acetona-D₆ em 400 MHz).
- Figura 71.** Estrutura química do composto complexo de ácido fusárico com magnésio (5).
- Figura 72.** Espectro de RMN de ¹H do complexo ácido fusárico com magnésio (5) (CD₃OD em 400 MHz).
- Figura 73.** Espectros de massas (EI) obtido dos compostos complexo ácido fusárico e magnésio (5) (A) e ácido fusárico (1) (B).
- Figura 74.** Estrutura química do composto complexo de ácido 9,10-desidrofusárico com magnésio (6).
- Figura 75.** Espectro de RMN de ¹H do complexo ácido 9,10-desidrofusárico com magnésio (6) (CD₃OD em 400 MHz).
- Figura 76.** Espectro de massas (EI) obtido do composto complexo ácido 9,10-desidrofusárico e magnésio (6).
- Figura 77.** Estrutura química do composto 5-Butil-5-(hidroximetil)diidrofuranona (7).
- Figura 78.** Sinais observados no espectro do 5-butil-5-(hidroximetil)diidrofuranona (CDCl₃ em 400 MHz).
- Figura 79.** Espectro de massas (EI) obtido do composto 5-butil-5-(hidroximetil)diidrofuranona.
- Figura 80.** Estrutura proposta e seus fragmentos observados no espectro de massas
- Figura 81.** Estrutura química do composto uracila (8).
- Figura 82.** Espectro de RMN de ¹H da uracila (CD₃OD em 400 MHz).
- Figura 83.** Estrutura química do composto *p*-hidroxiacetofenona (9).
- Figura 84.** Espectro de RMN de ¹H *p*-hidroxiacetofenona (CD₃OD em 400 MHz).
- Figura 85.** Espectro de massas (EI) obtido do composto *p*-hidroxiacetofenona
- Figura 86.** Estrutura química do composto dicetopiperazina ciclo prolina-leucina (10)
- Figura 87.** Espectros de RMN de ¹H da dicetopiperazina ciclo prolina-leucina (CD₃OD em 500 MHz). (A) O espectro ampliado. (B) O espectro completo.
- Figura 88.** Espectro de massas (EI) obtido do composto dicetopiperazina ciclo prolina-leucina
- Figura 89.** Estrutura química do composto 7-hidroxifusarinol (11)
- Figura 90.** Sinais observados no espectro do 7-hidroxifusarinol (acetona-D₆ em 500 MHz).
- Figura 91.** Espectro de massas (EI) obtido do composto 7-hidroxifusarinol.
- Figura 92.** Estrutura química do composto 9,10-desidrofusarinol (12).
- Figura 93.** Sinais observados no espectro do 9,10-desidrofusarinol (acetona-D₆ em 500 MHz).
- Figura 94.** Estrutura química do composto acetato de fusarinila (13).
- Figura 95.** Espectro de RMN de ¹H do acetato de fusarinila (CD₃OD em 500 MHz).
- Figura 96.** Espectro de correlação HMBC do acetato de fusarinila (CD₃OD em 500 MHz).

Figura 97. Espectro de massas (EI) obtido do composto acetato de fusarinila.

Figura 98. Estrutura química do composto gibepirona B (**14**).

Figura 99. Espectro de RMN de ^1H da gibepirona B (**14**) (CD_3OD em 500 MHz).

1. INTRODUÇÃO

1.1 Proteases

As proteases são importantes para uma variedade de processos biológicos em organismos, desde bactérias e vírus a mamíferos, catalisando a hidrólise das ligações peptídicas de proteínas clivando em fragmentos menores (VERMA et al., 2016).

Proteases, ou peptidases, semelhantes à papaína (*papain-like*) são enzimas que conduzem importantes funções metabólicas e regulatórias essenciais, o que pode ser evidenciado pela sua ocorrência em todas as formas de organismos vivos (WU, 2010). Elas participam de processos envolvendo morte celular, degradação de proteínas, autofagia, remodelação de matriz extracelular, processamento de vários fatores de crescimento e citocinas (DANA e PATHAK, 2020; BREZNIK et al., 2019). Desequilíbrios entre a degradação e síntese proteica, erros na transcrição e/ou regulação de processos celulares, localização incomum ou mesmo alterações na expressão de algumas proteases, a exemplo das catepsinas, estão intimamente relacionadas a diversas patologias, tais como progressão de tumores malignos, metástases (LI et al., 2017; VASILJEVA e TURK, 2008; WATSON e KREUZALER, 2009), mal de Alzheimer (HOOK et al., 2010), artrite reumatoide e osteoporose (YASUDA et al., 2005).

A primeira cisteíno protease, a papaína, foi isolada da fruta tropical *Carica papaya* (mamão). Nas plantas as enzimas proteolíticas estão envolvidas na germinação, crescimento, desenvolvimento e diferenciação do vegetal, controle do metabolismo, homeostase e na morte celular programada. Outros estudos demonstraram a importância das proteases como resposta imune das plantas contra patógenos, como bactérias fungos e insetos. O estudo de nocaute de proteases mostrou que os mutantes são mais suscetíveis a patógenos fúngicos. (MÉNARD, 1993; HOORN e JONES, 2004; MISAS-VILLAMIL et al., 2016; DOMSALLA e MELZIG, 2008; LIU et al., 2018)

Em mamíferos as cisteíno próteses são denominadas catepsinas e diferem dos vegetais na especificidade do substrato e em propriedades enzimáticas. Um exemplo é a catepsina V especificamente expressa no testículo, timo e córnea epitelial e que foi associada a miastenia gravis, doenças neurológicas e diabetes do tipo 1. Também

foi relatada a correlação de sua presença com progressão do câncer e foi observada sua alta expressão em carcinomas de colo e de mama. Por outro lado, a catepsina B possui atividade de endopeptidase e dipeptidil peptidase apresentando ampla distribuição tecidual. Alterações em sua localização, atividade e expressão estão relacionados a doenças como mal de Alzheimer e diversos tipos de câncer quando em grande quantidade como carcinomas de cólon, mama, próstata, pâncreas e cérebro. (LECAILLE et al., 2002; WIEDERANDERS et al., 1992; BRÖMME e KALETA, 2002; SANTAMARÍA et al., 1998; BRÖMME et al., 1999; ADACBI et al., 1998; NIWA et al., 2012; HOOK et al., 2005; MOHAMED e SLOANE, 2006; SLOANE et al., 1986; BERDOWSKA, 2004)

A inibição seletiva de enzimas apresenta papel importante no tratamento de câncer (BARZAK et al., 2019) e doenças relacionadas a infecções virais, parasitárias e bacterianas, por isso, esses inibidores são muito explorados na medicina moderna (CARDOSO et al., 2009). Interessante também é observar a correlação dessas proteases com o mecanismo de penetração e replicação do vírus SARS-CoV-2 em humanos, um novo coronavírus associado à pneumonia atípica que surgiu em Wuhan, China no final de 2019. Sua presença já foi encontrada em diversos países afetando homens, mulheres, idosos e crianças. Duas proteases são responsáveis pelo processamento das proteínas e vitais para replicação do vírus, a protease principal (Mpro) e a protease semelhante à papaína (PLpro) (CHAUHAN et al., 2020; LIU et al., 2020; HILGENFELD, 2014; FREITAS et al., 2020; YUEN et al., 2020; GOYAL e GOYAL, 2020).

Dessa forma, a compreensão cada vez maior dos seus mecanismos de ação justifica o uso dessas enzimas como alvos terapêuticos promissores na busca de novos inibidores, substâncias bioativas candidatas a fármacos antitumorais e outras doenças (EDWARDS e MURPHY, 1998). A figura 1 mostra exemplos de compostos inibidores enzimáticos que atuam como medicamentos e compostos antivirais.

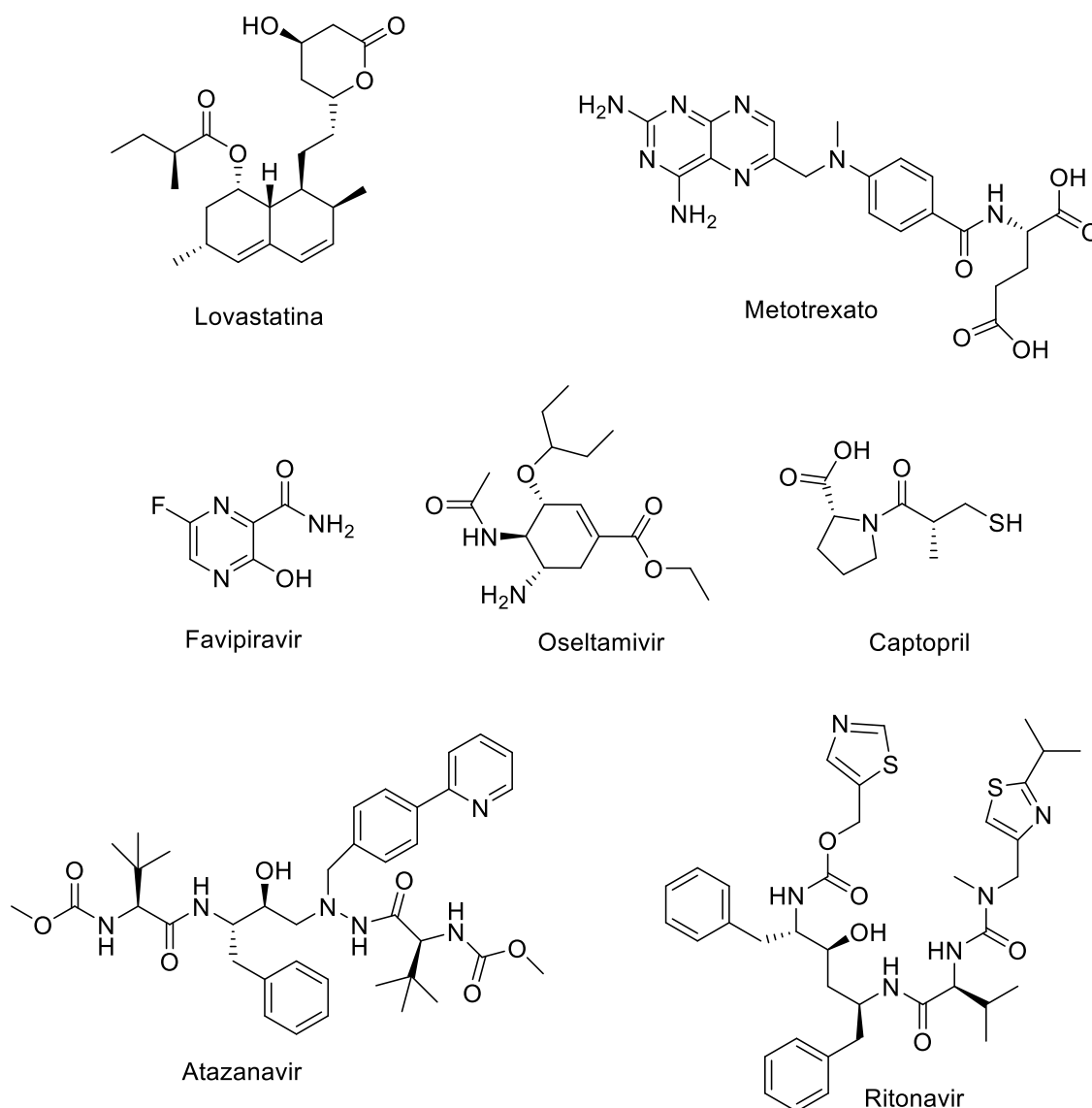


Figura 1. Alguns compostos inibidores enzimáticos que atuam como medicamentos. **Fonte:** o autor (2021).

1.2. Proteases na interação entre plantas e fungos

Durante a evolução, as plantas desenvolveram mecanismos de proteção que lhes asseguraram resistência a diferentes tipos de condições desfavoráveis, como fungos fitopatogênicos (VALUEVA e MOSOLOV, 2004) que utilizam de enzimas proteolíticas para hidrólise de proteínas da membrana e parede celular, permitindo a infestação na planta hospedeira (TREMACOLDI, 2009). Os compostos proteicos

encontrados nas plantas são os componentes principais envolvidos nos mecanismos de proteção das plantas (VALUEVA & MOSOLOV, 2004), capazes de formar complexos com enzimas proteolíticas, bloqueando reversível ou irreversivelmente a sua atividade catalítica (CHEVREUIL et al., 2011). As proteases, por sua vez, são importantes para a resistência da planta, e são alvos de agentes patogênicos secretados por micro-organismos para suprir as respostas imunes, acarretando um duelo bioquímico entre planta e micro-organismo (MISAS-VILLAMIL et al., 2016.; LIU et al., 2018).

Frutos como o mamão, abacaxi e caqui possuem alto teor de proteases e, muitas delas, estão envolvidas no processo de defesa contra micro-organismo patogênico (FARAHAT e EL-BATAWY, 2013; SALAS et al., 2008), ainda assim, estes frutos são infestados por fungos. Esta observação sugere que estes micro-organismos podem ser capazes de produzir inibidores dessas enzimas, como demonstrado por SILVA e colaboradores (2020) no caso da inibição de papaína e catepsinas V e B por metabólitos do fungo *Fusarium proliferatum* invasor de abacaxi. Este exemplo sugere a investigação dos metabólitos produzidos por esses fungos patogênicos na busca por novas moléculas bioativas potenciais inibidoras de proteases.

1.3. *Fusarium* e *Colletotrichum*

O gênero *Fusarium* está entre as espécies mais adaptativas do filo *Eumycota*, são fungos que apresentam filamentos e são distribuídos por todo o mundo (LALE e GADRE, 2016; ZHOU et al., 2019). Seus membros são patógenos de diversas plantas e são capazes de sobreviver em solos por vários anos, causando murchamento e apodrecimento grave em diversas culturas hortícolas (WANG et al., 2013; BODAH, 2017).

As micotoxinas produzidas pelo gênero *Fusarium* estão relacionados à virulência desse fungo e o ácido fusárico é a principal micotoxina associada a ele. Em alta concentração essa toxina induz várias respostas fisiológicas como alteração do crescimento celular, permeabilidade da membrana celular, inibição da síntese de ATP e quelação de cofatores importantes como ferro e zinco, pode também desencadear reações de defesa da planta e morte celular programada (CRUTCHER et al., 2014; BANI et al., 2014). Devido ao grande prejuízo econômico, os estudos envolvendo

estas espécies são de grande importância para vários países ao redor do mundo. Na América do Sul e Central observa-se uma doença conhecida como fusariose em abacaxi (VENTURA et al., 2009; VENTURA et al., 2009; DE SOUZA et al., 2016). Na China a murcha de *F. oxysporum* tem sido o fator limitante para uma produção lucrativa, principalmente em casos de cultivo de monocultura de melancia (WU et al., 2008; HOPKINS et al., 1992). Alguns dos metabólitos produzidos por estes fungos são fumonisinas, moniliformina, ácido fusárico (FOTSO et al., 2002; PENA et al., 2020), beauvericina (MORETTI et al., 1994) e naftoquinonas (DAME et al., 2015) mostrados na figura 2.

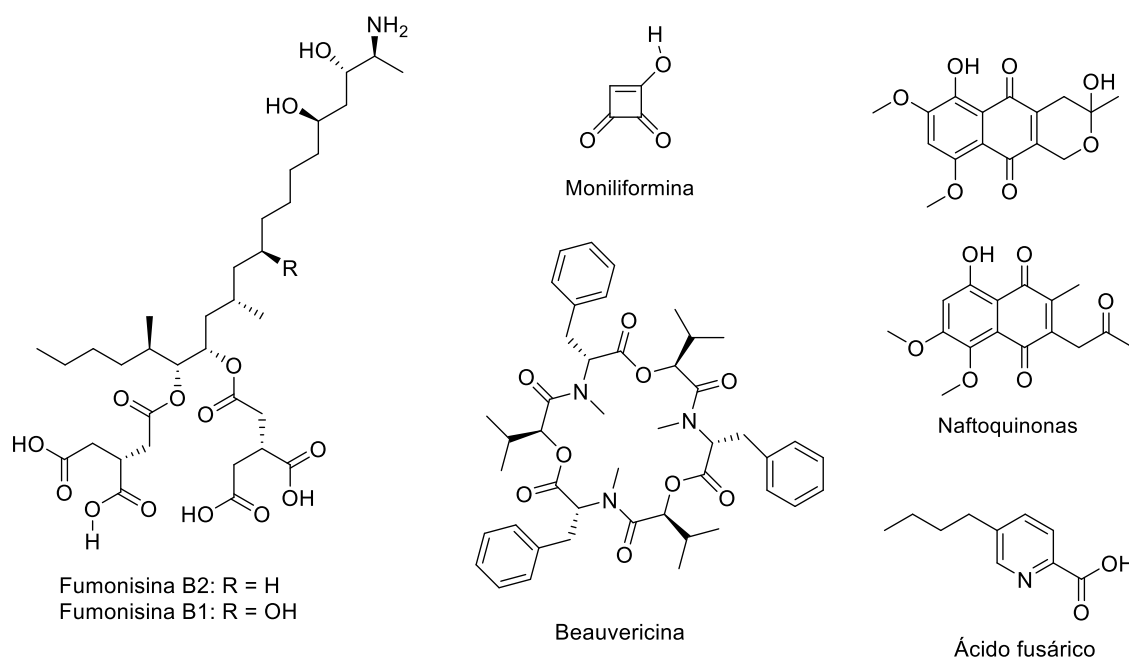


Figura 2. Alguns compostos produzidos pelo gênero *Fusarium*. **Fonte:** o autor (2021).

O gênero *Colletotrichum* é encontrado em todas as regiões temperadas, tropicais e subtropicais do planeta, sendo responsável por doenças em uma grande variedade de plantas lenhosas e herbáceas e já foi eleito o oitavo grupo de fungos fitopatogênicos do mundo, considerando sua importância científica e econômica. (WEIR et al., 2012; DEAN et al., 2012; CANNON et al., 2012; LI et al., 2016). Os fungos deste gênero causam manchas em plantas e manchas de antracnose e podridão em frutos, provocando um grande prejuízo em safras de alimentos básicos como banana, mandioca, laranja, cacau e caqui, principalmente na pós colheita (PERES et al., 2002, DEAN et al., 2012, CAI et al., 2009, LIMA et al., 2021). Estima-se que a perda pela

doença antracnose possa chegar a 40% da safra (LI et al., 2016). Diversos compostos químicos foram isolados desses fungos como ácido coletônico (HUSSAIN et al., 2014), higginsianinas A e B (CIMMINO et al., 2016), coletotrichonas A, B e C (WANG et al., 2016), representados na figura 3.

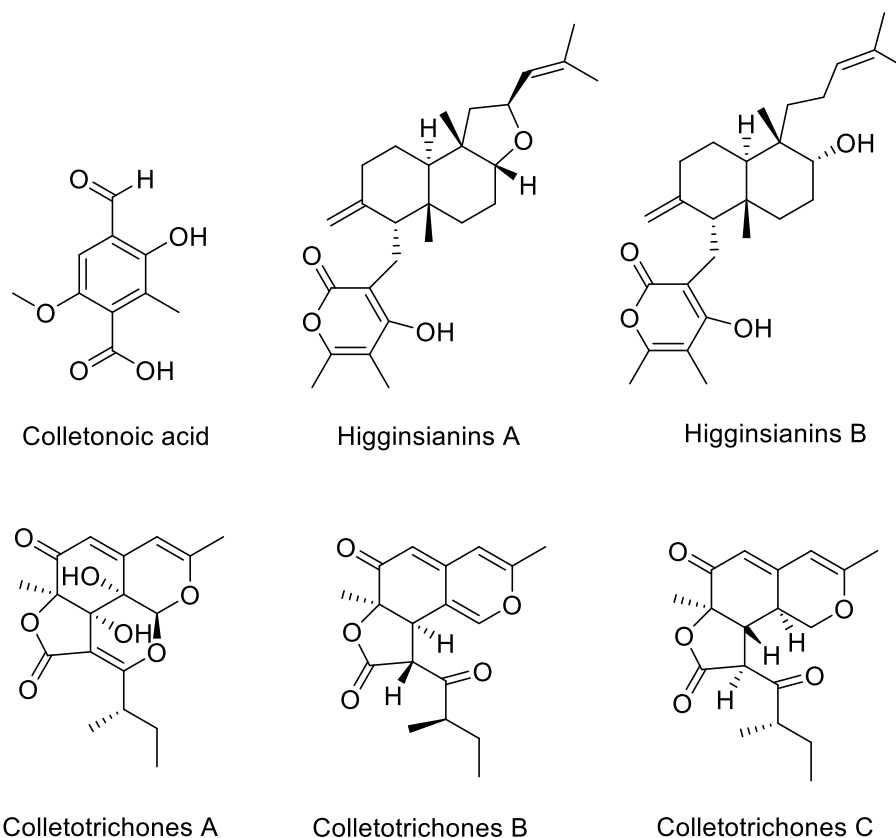


Figura 3. Alguns compostos produzidos pelo gênero *Colletotrichum*.
Fonte: o autor (2021).

1.4. Frutos comestíveis brasileiros e fungos patogênicos

No Brasil, frutos tropicais como mamão, abacaxi e o caqui apresentam grande valor socioeconômico, sendo que o clima quente do país favorece seu cultivo por todo território tornando o país um dos principais produtores e exportadores destes frutos. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2019 o Brasil produziu 1,6 bilhão de abacaxis, 169 mil toneladas de caqui e 1,2 milhão de toneladas de mamão, demonstrando a importância comercial destes frutos que são suscetíveis a diversas doenças fúngicas, causando grande prejuízo econômico.

O abacaxi é suscetível a uma doença conhecida como fusariose causada, principalmente, pelo patógeno *Fusarium guttiforme* que é responsável por perda de 30 a 40% do fruto e considerada a sua doença mais prejudicial. O fungo infecta todas as partes da planta, contudo o fruto é a parte mais vulnerável e os sintomas da doença são mais perceptíveis. Os sintomas incluem descoloração inicial da área infectada, tornando-se afundadas, de um marrom claro a escuro e são cobertos com o micélio do patógeno até o apodrecimento da fruta (PLOETZ, 2006; DE SOUZA et al., 2016).

O mamão e o caqui estão sujeitos a duas doenças causadas por fungos do gênero *Colletotrichum*. O mamão sofre uma doença chamada podridão peduncular provocando grandes prejuízos na pós-colheita. Já o caqui sofre uma doença grave conhecida como antracnose provocada pelo fungo *Colletotrichum horii* e está associado a diversas perdas econômicas. (NERY-SILVA et al., 2007; XIE et al., 2010; SILVA et al., 2020).

Esses dados mostram a importância de realizar estudos envolvendo esses fungos invasores de frutos na busca de compostos antimicrobianos para uso na agricultura ou medicinal em casos de alimentos contaminados por micotoxinas.

Os recentes avanços no sequenciamento genômico e a correlação da biossíntese de produtos naturais revelaram que os micro-organismos têm potencial ainda maior de produção de metabólitos secundários e que a maioria dos *clusters* de genes não são expressos em condições usuais de cultivo, essas rotas biossintéticas não expressas são chamadas de 'silenciosas' (HERTWECK, 2009; GROSS, 2009; BERTRAND et al., 2014; PAN et al., 2019;). Dessa forma, para acessar outras rotas biossintéticas inexploradas e aumentar a produção de metabólitos secundários, novas abordagens são desenvolvidas, como a utilização de meios de cultivos diferentes, cocultivo de micro-organismos, temperatura, pH, salinidade, utilização de modificadores epigenéticos, processos de biotransformação, entre outros. Neste trabalho algumas destas alternativas foram estudadas (PAN et al., 2019)

1.5. Cocultivo de micro-organismos

Os micro-organismos raramente são encontrados vivendo em populações de espécies únicas no meio ambiente. Estudos de diferentes habitats mostraram que uma enorme riqueza e abundância de micro-organismos são detectadas em uma

pequena amostra, sugerindo que as interações microbianas são inerentes ao estabelecimento de populações no ambiente, como no solo, sedimentos, animais e plantas. Muitos anos de coevolução de diferentes espécies levaram à adaptação e especialização, o resultado é uma grande variedade de relações que podem facilitar a coabitação como relacionamentos mutualistas e endossimbióticos, ou relacionamentos competitivos, antagônicos, patogênicos e parasitários (BRAGA et al., 2016), alguns exemplos destas interações podem ser observados na Figura 1. Tem sido relatado que o cocultivo entre micro-organismos do mesmo ecossistema pode induzir a ativação de rotas biossintéticas silenciosas que levam à produção e identificação de novos produtos naturais (BRAGA et al., 2016). Estes compostos produzidos pela interação entre organismos são utilizados para sinalização e defesas entre si.

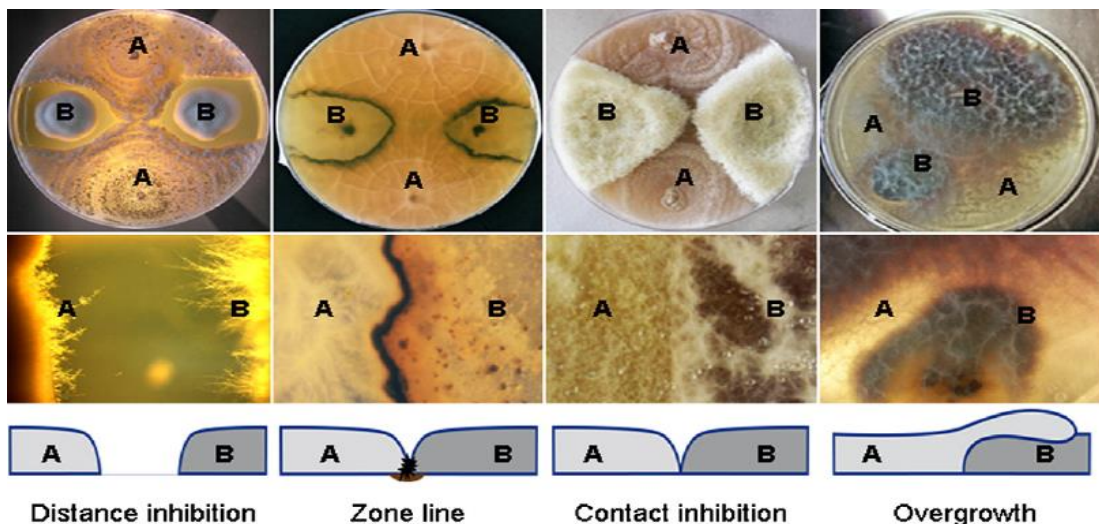


Figura 4. Interações morfológicas observadas entre dois fungos em uma placa de Petri. As morfologias das colônias de cocultivos fúngicos mostram os quatro principais tipos de interações: inibição a distância, linhas de zona, inibição por contato e supercrescimento. **Fonte:** Adaptado de Bertrand et al. (2014).

As interações microbianas envolvem a produção de metabólitos, geralmente bioativos. Para o estudo destas interações e produção de metabólitos, os modelos de cultivos clássicos axênicos em condições de laboratório não aproveitam plenamente das habilidades dos micróbios, uma vez que, as condições artificiais restringem o acesso a vários micro-organismos e/ou suas habilidades (UEDA e BEPPU., 2017). Uma forma de mimetizar um ambiente natural e contornar os problemas de cultivo é

cultivar os micro-organismos na presença um do outro(s). Em 2020, SILVA e colaboradores descreveram uma nova abordagem envolvendo o cocultivo como forma de aumentar a diversidade química de compostos produzidos por micro-organismos (SILVA et al 2020).

Dentre os micro-organismos, os fungos representam uma fonte promissora de metabólitos bioativos com quimiodiversidade reconhecidamente elevada. Aproximadamente 42% das moléculas bioativas microbianas foram produzidas por fungos, e muitos desses compostos têm sido amplamente utilizados como antifúngicos e antibióticos (AZZOLLINI et al., 2018).

Wang e colaboradores (2013) realizaram estudos de cocultivo de duas espécies do gênero *Fusarium*, o *F. tricinctum* e o *F. begoniae* o que levou à produção e isolamento de dois depsipeptídeos lineares, as subeniatinas A e B, figura 5, que não estavam presentes nos cultivos axênicos (WANG et al., 2013)

F. tricinctum também foi cultivado na presença da bactéria *Bacillus subtilis* por Ola e colaboradores (2013) em meio de arroz. Isso resultou no aumento de compostos já produzidos do fungo e também a produção de quatro compostos que não foram obtidos nos cultivos axênicos desses micro-organismos sendo a (-)-citreoisocumarina, e 3 novos produtos naturais macrocarpona C, o ácido N-(carboximetil) antranílico e (-) – citreoisocumarinol, figura 5 (OLA et al., 2013).

Mais recentemente Moussa e colaboradores (2019) cultivaram o fungo *F. tricinctum* na presença da bactéria *Streptomyces lividans*, também realizado em meio de arroz, levando a produção de quatro novos dímeros de naftoquinona, fusatricinonas A – D, um novo derivado de lateropirona a diidrolateropirona que não foram obtidos nos cultivos axênicos, figura 5 (MOUSSA et al., 2019). Outros compostos não detectados nos cultivos axênicos também foram obtidos no cocultivo por este grupo.

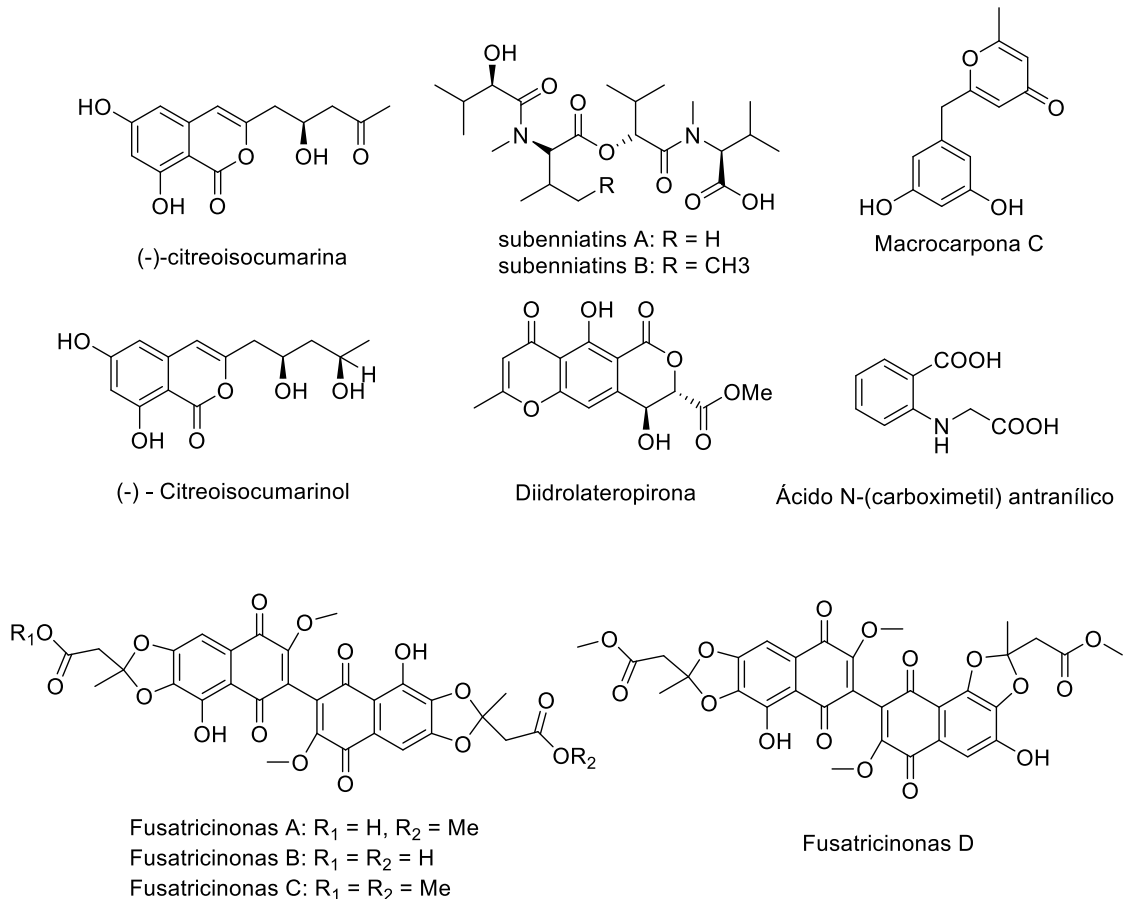


Figura 5. Alguns compostos inéditos isolados a partir do cocultivo microbiano.
Fonte: o autor (2021).

Isso mostra que o estudo de fungos em cocultivo, bem como o isolamento e a caracterização dos metabólitos produzidos por eles é fundamental para obtenção de novos compostos bioativos. Dessa forma, a descoberta de novos produtos naturais utilizando cultivo de fungos como fonte de produtos naturais mostra ser vantajosa e uma área bastante promissora.

1.6. Meio de cultivo

De um modo geral, as necessidades nutricionais dos micro-organismos são muito abrangentes e diversificadas, alguns deles requerem apenas uma pequena quantidade de nutrientes como fonte de alimento, enquanto outros requerem meios de cultivos mais complexos. O meio de cultivo tem efeito tanto no crescimento micelial quanto no metabolismo, sendo as fontes de carbono e nitrogênio os principais componentes do meio de cultivos. As fontes de carbono fornecem tanto base para a construção de biomassa quanto para energia, enquanto a fonte de nitrogênio é

necessária para síntese de proteínas e ácidos nucleicos. Dessa forma, pequenas alterações nas condições de crescimento podem levar a alterações nos perfis metabólicos microbianos. Por exemplo, alta concentração de, bem como extrato de malte ou levedura, e a adição de minerais e oligoelementos, geralmente levam à produção de metabólitos altamente diversos e de alto rendimento. As fontes de carbono também tiveram influências no cocultivo dos fungos *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus giganteus* - TR22-2 (RUIZ et al., 2010; SINGH et al., 2017; PAN et al., 2019; FRISVAD et al., 2008; MEYER e STAHL, 2003)

Outro fator importante presente no meio é a salinidade, que determina muitos aspectos da química natural da água e dos processos bioquímicos no sistema de cultivo. É uma variável de estado termodinâmica que, junto com a temperatura e pressão, controla as propriedades físicas como a pressão osmótica e enzimas envolvidas no crescimento e metabolismo microbiano (PAN et al., 2019; BLUNT et al., 2015). As condições de cultivo como pH, concentração de oxigênio, temperatura e luz são essenciais para o crescimento e as reações bioquímicas dos micro-organismos. (PAN et al., 2019; ALY et al., 2010)

1.7. Biotransformação

As biotransformações de xenobiótico, como fármacos, em organismos vivos são divididas em duas etapas denominadas metabolismo de fase I e de fase II. Nas reações de fase I, as modificações ocorrem pelo metabolismo a partir de reações de oxidação, redução, hidroxilação, hidrólise e entre outras, onde grupos polares são adicionados no xenobiótico. Nas reações da fase II, chamadas conjugações, ocorrem adição de grupos como glicose para tornar o xenobiótico mais solúvel em água. Em humanos estas etapas visam a conversão das substâncias geralmente hidrofóbicas em substâncias mais hidrofílicas ou uma forma mais facilmente excretada, que pode ser por suor, urina ou bile. (GONZALEZ et al., 2011; DERELANKO e HOLLINGER, 2002; AZERAD, 1999)

Foi demonstrado que o sistema de biotransformação de micro-organismos é muito semelhante às reações metabólicas de fase I dos mamíferos e por isso eles são

uma alternativa atraente para o estudo de metabolismo de fármacos e outros produtos químicos na predição de vias metabólicas em humanos, os fungos filamentosos são modelos clássicos para esses estudos. (VENISETTY e CIDDI, 2003; AZERAD, 1999; PALUDO et al., 2007)

Com o objetivo de identificar mecanismo de desintoxicação de ácido fusárico, Crutcher e colaboradores em 2014 realizaram o estudo de biotransformação do ácido fusárico por fungos *Aspergillus tubingensis* resistentes sendo possível obter um composto denominado fusarinol, figura 6 (CRUTCHER et al., 2014). Devido às altas atividades do AF e por estar envolvido em processo de patogenicidade de fungos *Fusarium*, Crutcher e colaboradores realizaram outro experimento em 2017 utilizando *Mucor rouxii* (CRUTCHER et al., 2017). Foram obtidos outros compostos hidroxilados como o ácido 10-hidroxifusárico e outros análogos mostrados na figura 6.

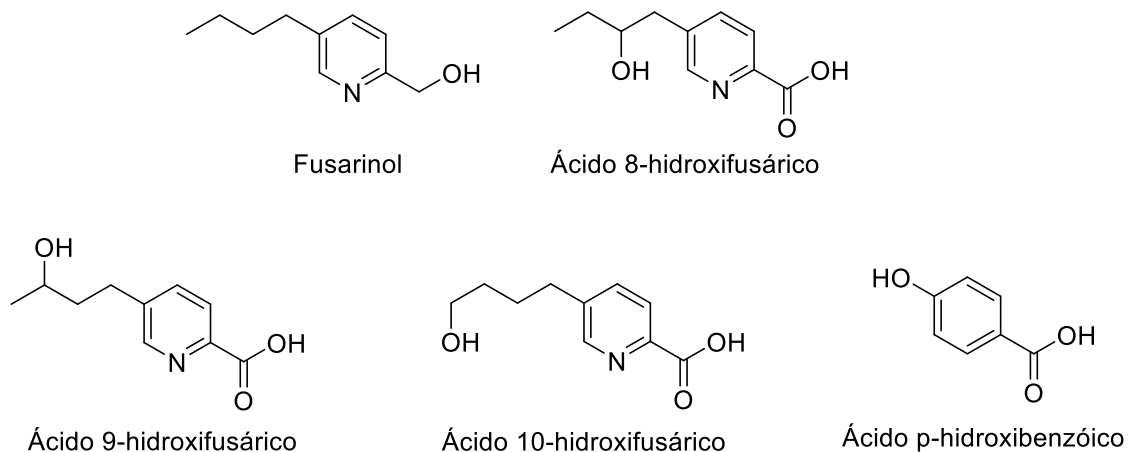


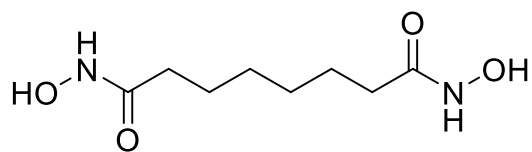
Figura 6. Alguns compostos produzidos pela biotransformação ácido fusárico por micro-organismos. **Fonte:** o autor (2021).

1.8. Modificador epigenético

Como descrito anteriormente as condições de cultivo nem sempre são capazes de acessar todas as rotas biossintéticas. Assim, para explorar totalmente a capacidade genética dos micro-organismos e acessar rotas biossintéticas silenciadas, estudos com modificadores epigenéticos são cada vez mais explorados. Uma das

modificações mais estudadas são realizadas nas histonas que são suscetíveis a modificações pós-tradução. A acetilação de histonas é realizada por enzimas histonas-acetiltransferases (HATs), enquanto a desacetilação de histonas é realizada por histona-desacetilases (HDACs). O equilíbrio dinâmico dessas enzimas promove processos de replicação, reparo e transcrição do DNA. A acetilação torna a cromatina mais aberta e acessível para fatores de transcrição, o que geralmente aumenta a expressão de genes produtores de metabólitos secundários. Dessa forma, a desacetilação provoca efeitos contrários, ela induz a condensação da cromatina e, conseqüentemente, a inativação do gene (BROSCH et al., 2001 GRAESSLE et al., 2008; Williams 2008; El-HAWARY et al., 2018; KOUZARIDES et al., 2007). Outros estudos que são realizados com modificadores e que não serão discutidos nesse trabalho são utilizando inibidores de DNA metiltransferase.

O ácido suberoidroxâmico (ASBH), figura 7, é um inibidor de HDAC, o que levou Asai e colaboradores (2013) a realizarem tratamento do fungo *Chaetomium indicum* com este modificador epigenético. Notou-se a indução na produção de policetídeos e o isolamento e caracterização de 6 novos compostos denominados chaetofenóis A-F. Análise do controle mostrou a presença de alguns policetídeos, contudo após o tratamento foi observado que a produção foi estimulada em diferentes graus e apenas os compostos A, B, C e E, figura 8, parecem realmente ser provenientes do tratamento com o inibidor (ASAI et al., 2013).

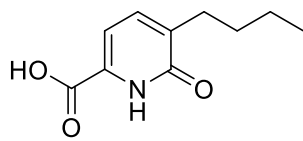


Ácido suberoidroxâmico (ASBH),

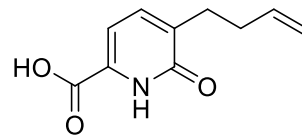
Figura 7. Estrutura química do modulador epigenético ácido suberoidroxâmico. **Fonte:** o autor (2021).

Chen e colaboradores (2013) induziram a produção de dois novos derivados de ácido fusárico, denominados ácido 5-butiril-6-oxo-1,6-diidropiridina-2-carboxílico e ácido 5-(but-9-enil)-6-oxo-1,6-diidropiridina-2-carboxílico, figura 8, que não foram produzidas no controle. Estes compostos foram produzidos pelo fungo *Fusarium*

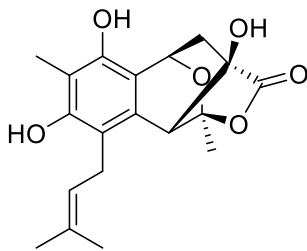
oxysporum, isolado da planta medicinal *Datura stramonium*, após o tratamento com ácido suberoidroxâmico. Ambos os compostos e o ácido fusárico foram avaliados quanto às suas atividades antibacterianas utilizando *Bacillus cereus* e observou-se que, enquanto ácido fusárico apresentou uma concentração mínima inibitória de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, os outros dois compostos não apresentam atividades, sugerindo que a oxidação do anel piridínico diminuiu significativamente a propriedade antibacteriana do ácido fusárico (CHEN et al., 2013).



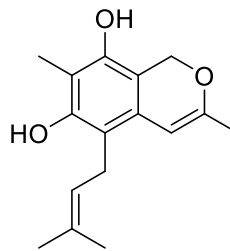
Ácido 5-butil-6-oxo-1,6-diidropiridina-2-carboxílico



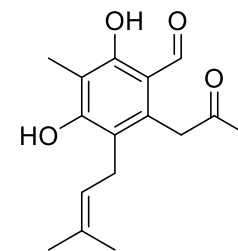
Ácido 5-(but-9-enil)-6-oxo-1,6-diidropiridina-2-carboxílico



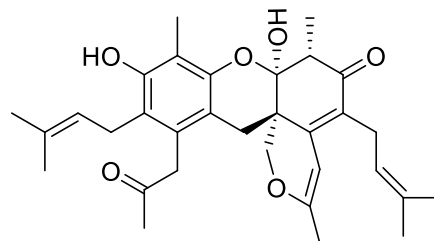
Chaetofenol C



Chaetofenol B



Chaetofenol A



Chaetofenol E

Figura 8. Alguns compostos inéditos produzidos a partir de micro-organismo tratados com o modificador epigenético ácido suberoidroxâmico. **Fonte:** o autor (2021).

2. OBJETIVOS

Principal

Isolar e identificar os metabólitos produzidos por fungos fitopatógenos em cultivos puros e mistos dos fungos *Fusarium guttiforme* e *Colletotrichum horii*, utilizar métodos para aumentar a diversidade química e estrutural dos compostos produzidos por eles e avaliar a atividade biológica dos compostos como inibidores de protease.

Específicos

- Cultivar os fungos em cultivo axênico e cocultivo em escala reduzida para avaliar o perfil metabólico dos extratos em intervalos de tempos diferentes;
- Realizar o cocultivo dos fungos em escala ampliada com dois meios líquidos distintos, o meio PDB e Czapek, para obtenção dos extratos;
- Analisar e comparar o perfil químico dos extratos por RMN de ^1H e HPLC-DAD;
- Avaliar os resultados obtidos, analisar a diversidade química dos extratos e utilizar abordagens químicas alternativas, tais como biotransformação e moduladores epigenéticos para obtenção de compostos e inéditos;
- Isolar e elucidar as estruturas químicas dos metabólitos por técnicas espectroscópicas (RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, ultravioleta, infravermelho) e espectrométricas (MS, LC-MS, GC-MS);
- Realizar ensaios para avaliação dos metabólicos isolados quanto sua atividade inibitória de papaína.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Vidrarias

Funil de separação 2 L (Uniglas); tubo de ensaio; proveta graduada de vidro de 50 e 500 mL (Uniglas); béqueres de 50 e 250 mL (Vidrolabor); Erlenmeyers de 250 e 500 mL (Vidrolabor); seringa de vidro de 3 mL; pipeta de Pasteur; tubos de RMN de 400 MHz (Deutero); colunas para cromatografia; funil de Büchner de vidro de 100 mL.

3.1.2 Reagentes e solventes

- Solventes PA: metanol, acetato de etila, hexano e etanol (Exodo/Labsynth/Neon);
- Solventes deuterado: metanol-D₄, clorofórmio-D, acetona-D₆ e dimetilsulfóxido-D₆ (Merck/CIL);
- Solventes grau HPLC: acetonitrila e metanol (Exodo);
- Água destilada e Água MiliQ;
- Ácido fusárico comercial (Sigma- Aldrich);
- Ácido suberoidroxâmico (Aldrich);
- Solução de vanilina ácida;
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Mallinckrodt) Chemicals;
- Substrato Z-FR-MCA (Carbobenzoxi-Z-fenilalanina-arginina-7-amino-4-metilcumarina) (Sigma)
- DTT (Ditiotreitol) (SIAL)
- E-64 (L-*trans*-Epoxisuccinil-LLeucilamida(4-guanidino)-butano) (Sigma)

- Acetato de Sódio triidratado (J.T. Baker)
- Caseína (Sigma)
- Papaína (Prozyn)
- Ácido tricloroacético (TCA) (Sial)

3.1.3 Meios de cultivo utilizados

- PDA (*Potato dextrose Agar*) (KASVI)
- PDB (*Potato dextrose broth*) (OXOID)
- Meio de cultivo Czapek com extrato de levedura:
 - NaNO₃
 - MgSO₄·7H₂O
 - KCl
 - FeSO₄·7H₂O
 - K₂HPO₄
 - Sacarose
 - Extrato de levedura

3.1.4 Suportes para cromatografia

Placas de alumínio cobertas com sílica gel 60 20x20 cm com espessura de 0,20 mm Alugram, UV₂₅₄ (Macherey); sephadex LH-20 – Amershan Pharmacia Biotech AB; sílica 230-400 mesh (Merck); coluna analítica Supelco C-8 (25 cm x 4,6 mm, 5 µm); coluna semipreparativa Supelco C-8 (25 cm x 10 mm, 10 µm); gel de sílica (40-70 mesh, Merck). Coluna capilar Rtx5-MS (Restek) de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d. i. x 0,25 µm de filme), composta de 5% de difenilsiloxano e 95% de dimetilpolisiloxano

3.1.5 Equipamentos

Aparelho de purificação de água; balança analítica (OHAUS); evaporador rotativo (BUCHI); bomba de vácuo (TECNAL); espectrômetro Bruker-Advance, DRX 400MHz; espectrômetro BRUKER(R) Modelo DRX500 Ultra Shield (R); capela de fluxo laminar; cromatógrafo líquido de alta eficiência – HPLC (modelo LC-6AD da Shimadzu) acoplado a um detector de arranjo de diodos – DAD (modelo SPD-M10AVP da Shimadzu; câmara de luz UV 254 e 366 nm (SOLAB); autoclave – espectrômetro de massa micrOTOF-II (Bruker Daltonics, Massachusetts, EUA) e Shimadzu QP2010Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) – Fluorímetro: Leitor de placa de ELISA modelo SpectraMax M3 (Molecular Devices).

3.1.6 Micro-organismos selecionados

As linhagens puras dos fungos *Fusarium guttiforme* e *Colletotrichum horii* (MMBF 04/07 e MMBF 32/08) que se encontram no laboratório foram obtidas da coleção microbiana do Instituto Biológico em São Paulo. As fotos dos respectivos fungos podem ser visualizadas nas figuras 9 e 10 a seguir.

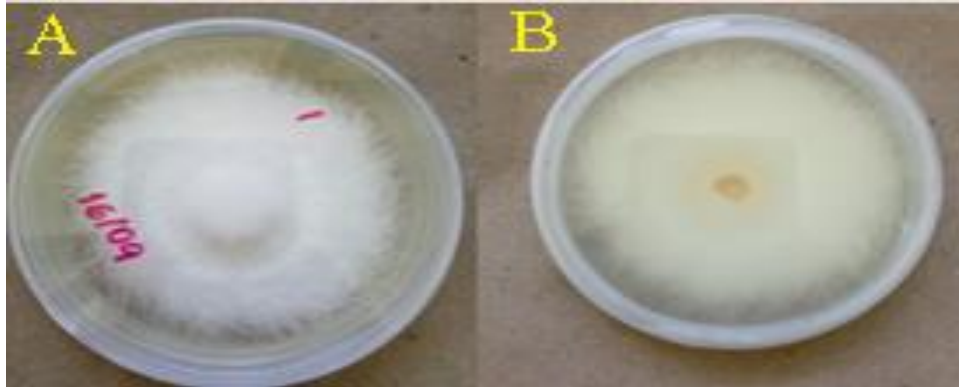


Figura 9. Fotos do fungo *F. guttiforme* registradas da parte superior (A) e inferior (B) da placa. **Fonte:** o autor (2021).

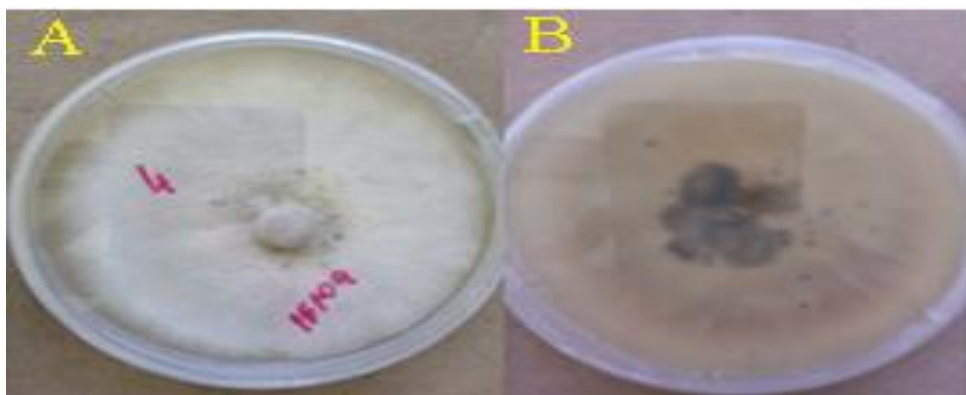


Figura 10. Fotos do fungo *C. horii* registradas da parte superior (A) e inferior (B) da placa. **Fonte:** o autor (2021).

3.1.7 Outros

Micropipetas de 1000, 200, 50 e 10 μm ; espátula; papel de filtro quantitativo; funil de Büchner; tubos *ependorf* de 1,5 e 2,0 mL; membrana filtrante para seringa de 0,22 μm ; placas de Petri de 9 e 6 cm de diâmetro (Kasvi); alça de platina; lamparina; tubos de transferência de 5 mm de diâmetro; paquímetro.

3.2 Métodos

3.2.1 Seleção, preservação e manutenção das linhagens fúngicas

Os dois micro-organismos foram escolhidos baseados no trabalho de doutorado do aluno Airton Damasceno Silva por seus extratos apresentarem alta

atividade biológica e inibidora de enzima. Também foi observada uma variação no perfil química do extrato de cocultivo quando comparado aos cultivos axênicos analisados por RMN de ^1H . Os fungos foram mantidos em placas de Petri contendo meio PDA e preservados em frascos com água desionizada estéril (CASTELLANI, 1963).

Para a manutenção das culturas, foi preparado meio PDA esterilizado (autoclavado a $125\text{ }^\circ\text{C}$ por 25 min) e em um fluxo laminar foi transferido para placas de Petri estéril de 9 cm de diâmetro. Um inóculo de cada fungo foi transferido, com o auxílio de um tubo de transferência, para o centro da placa que foi incubada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ao abrigo de luz por 7 dias, suficiente para os fungos atingirem um crescimento radial para realização dos demais cultivos. Todos os materiais utilizados foram previamente esterilizados.

3.2.2 Experimento de interações entre os fungos

Para avaliar a interação dos fungos e seus comportamentos na presença um do outro, eles foram cultivados em meio PDA esterilizado em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Um disco micelial de 0,5 cm de cada fungo foi colocado a 1 cm da lateral da placa em lados opostos e incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, ao abrigo de luz por 11 dias. O controle foi feito utilizando placas com fungos separados com discos também a 1 cm da lateral. Este experimento foi realizado em triplicata.

3.2.3 Avaliação do perfil químico em diferentes intervalos de tempo – escala reduzida

Para avaliar a produção metabólica dos fungos em intervalos de tempo diferentes, em cultivos axênicos e cocultivo, foram realizados seus cultivos em escala reduzida em 4 intervalos de tempos diferentes, utilizando meio líquido de batata – PDB autoclavado, os procedimentos foram realizados sob condições assépticas (capela de fluxo laminar) e os materiais foram esterilizados em autoclave.

3.2.3.1 Cultivo axênico dos fungos em meio PDB

O fungo *F. guttiforme* foi reativado em PDA a partir do estoque e foram realizados processos de repique sucessivos até o fungo apresentar um crescimento homogêneo. Após 7 dias de cultivo, 6 discos miceliais de 0,5 cm de diâmetro foram retirados das placas de crescimentos, utilizando um tubo de transferência, e inoculados em Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio PDB.

O cultivo foi realizado a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, estático, ao abrigo de luz e por períodos que variaram de 7, 14, 21 e 28 dias, e utilizando 4 Erlenmeyer para cada período. Utilizou-se um controle/branco contendo apenas o meio PDB, sem inoculação do fungo, para cada um dos intervalos de tempo. Para o fungo *C. horii* o procedimento foi o mesmo, obtendo-se os cultivos axênicos dos fungos em meio líquido PDB em 4 intervalos de tempos diferentes.

3.2.3.2 Cocultivo em meio PDB

O cocultivo foi realizado de forma semelhante ao cultivo axênico, descrito no item 3.2.3.1. Foram retirados 6 discos miceliais de cada fungo e transferidos para Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio PDB. As condições de cocultivo foram as mesmas dos cultivos axênicos, contudo foram cultivados 8 Erlenmeyers para cada período, obtendo-se o cocultivo dos fungos *F. guttiforme* e *C. horii* em meio líquido PDB em 4 intervalos de tempo diferente.

3.2.4 Cocultivo em larga escala em meios de PDB e Czapek

O cocultivo em larga escala foi realizado em dois meios líquidos diferentes, o PDB como realizado em escala reduzida, e o Czapek. O meio Czapek foi preparado seguindo as especificações para cada litro: 2,0 g de nitrato de sódio, 0,5 g de sulfato de magnésio, 0,5 g de cloreto de potássio, 30 g de sacarose, 0,01 g de sulfato ferroso, 1,0 g de fosfato dipotássico e 20,0 g de extrato de levedura, pH final de 5,0.

Para o cocultivo em larga escala foram utilizados 36 Erlenmeyers de 500 mL para cada meio e 4 Erlenmeyers contendo apenas o meio que foi utilizado como um

controle/branco (dois de cada), onde não foram inoculados os fungos. Foram retirados 6 discos miceliais de 0,5 cm de diâmetro de cada fungo e transferidos para os Erlenmeyers contendo 200 mL do meio líquido esterilizado. O tempo de cocultivo foi de 28 dias, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, estático e ao abrigo de luz, obtendo-se o cocultivo em larga escala dos fungos *F. guttiforme* e *C. horii* em meio de PDB e Czapek

3.2.5 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) do ácido fusárico para os dois fungos estudados

Com o propósito de evitar possíveis efeitos tóxicos do ácido fusárico a ser biotransformado aos dois fungos avaliados, foram determinados os valores de concentração inibitória mínima (CIM) do AF para esses fungos. Foi utilizado o método de diluição em ágar descrito por FENG e ZHENG (2007) e CHUTIA et al. (2009).

O experimento foi elaborado utilizando ácido fusárico comercial em placas de Petri de 6 cm de diâmetro e 5 mL de meio PDA esterilizado. O experimento foi efetuado em 6 concentrações diferentes de 0, 25, 50, 100, 250 e $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo a ausência de composto utilizada como controle negativo. O ácido fusárico foi pesado e solubilizado em etanol para se obter duas concentrações iniciais de 2,5 e 5.0 mg.mL^{-1} . Utilizando micropipeta, a solução de AF foi transferida para as placas de Petri e adicionou-se o meio PDA logo em seguida, agitando levemente as placas para homogeneizar. O experimento foi realizado em triplicata para cada concentração, com exceção da concentração mais alta. Foi realizado um controle de solvente, no qual nenhuma substância foi adicionada (apenas o fungo, o etanol e o meio de cultivo). Um disco de 0,5 cm de micélio foi transferido para o centro de cada placa e incubadas por 7 dias a 25°C .

Após o tempo de cultivo, com o auxílio de um paquímetro, mediu-se o diâmetro dos micélios em três direções diferentes, obtendo-se a média das medidas para cada placa. A porcentagem de inibição do crescimento foi calculada pelo diâmetro médio dos micélios em relação ao controle pela expressão matemática:

$$\text{Inibição \%} = \left(\frac{D_c - D_t}{D_c} \right) \cdot 100$$

Sendo D_c o diâmetro médio dos micélios de controle em triplicata e D_t o diâmetro médio dos micélios em que foram aplicados os compostos.

3.2.6 Processos de biotransformação com ácido fusárico, 9,10-desidrofusárico e respectivas misturas

O experimento de biotransformação foi realizado nas mesmas condições do experimento de cultivo em meio líquido de PDB, mantendo-se a quantidade de discos miceliais de cada fungo, em modo estático, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, ao abrigo de luz, e utilizando Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio PDB. Foram utilizados 4 Erlenmeyers para cada tempo sendo este definido 7 e 28 dias para *C. horii* e 14 e 28 dias *F. guttiforme*. O ácido fusárico foi solubilizado em etanol e adicionado em cada Erlenmeyer para se obter as seguintes concentrações finais: *F. guttiforme* $175,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e para o fungo *C. horii* de $25,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Um controle de solvente foi feito utilizando meio PDB na ausência de ácido fusárico adicionando-se apenas o etanol e o fungo, também foi realizado um branco foi feito com o meio PDB e o ácido fusárico na ausência do fungo.

Para o ácido 9,10-desidrofusárico foi utilizado o composto isolado das frações CoR28CLV5p2, BMCh7p2 e COL282.4p2 nas mesmas condições do AF, contudo foram utilizados 2 Erlenmeyers numa concentração de $27 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e apenas para o fungo *C. horii*. Foram utilizados 2 Erlenmeyers de controle de solvente (fungo na ausência do ácido e adicionando apenas o etanol) e controle do meio com o meio PDB e o ácido 9,10-desidrofusárico, tempo de cultivo de 7 dias.

Um outro experimento foi realizado utilizando a mistura de ácido fusárico e 9,10-desidrofusárico frente ao fungo *C. horii*. Para isto, foi utilizada a fração e COL282.4 que apresentou apenas a mistura dos dois compostos e preparados 4 Erlenmeyers numa concentração total de $50 \mu\text{g.mL}$, aproximadamente $25 \mu\text{g.mL}$ de cada composto. Assim como nos demais, foi realizado controle do solvente e do meio utilizando 2 Erlenmeyers para cada. O tempo de cultivo foi de 7 dias.

3.2.7 Cultivo com modificador epigenético

O experimento com modificador epigenético foi realizado utilizando inibidor de histonas-desacetilases, o ácido suberoidroxâmico (ASBH) figura 7, preparado para obter uma concentração final de 500 μ M como realizado por Chen e colaboradores (2013). O cultivo foi realizado em 200 mL de meio PDB autoclavado em Erlenmeyers de 500 mL, onde foram transferidos 6 discos miceliais dos fungos. Foram utilizados 6 Erlenmeyers para cada fungo com modificador, 2 Erlenmeyers sem o modificador para controle de cada fungo e 2 Erlenmeyers contendo o meio de PDB e o modificador, sem a adição de discos miceliais dos fungos que foi utilizado como branco e controle do meio, totalizando 18 Erlenmeyers. O cultivo foi realizado em modo estático, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, ao abrigo de luz e por um período de 28 dias.

3.2.8 Obtenção dos extratos brutos e análises de RMN

Os procedimentos realizados na obtenção dos extratos brutos foram baseados na metodologia desenvolvida durante o trabalho de doutorado do aluno Airton Damasceno Silva como descrita a seguir.

Após cada tempo de cultivo descritos anteriormente, os caldos de cultivo foram filtrados utilizando um funil de Büchner, papel de filtro quantitativo e um sistema a vácuo. O micélio foi descartado em saco de resíduo biológico adequado e realizou-se a partição líquido-líquido do caldo utilizando-se 300 mL de AcOEt para cada 600 mL de fase aquosa por três vezes, gerando 900 mL de fase orgânica. A fase orgânica então foi lavada com 450 mL de água até três vezes. O solvente da fase orgânica foi evaporado em evaporador rotativo equipado com bomba de vácuo a 30°C , obtendo-se o extrato bruto de cada cultivo realizado. Os extratos brutos foram armazenados ao abrigo de luz, sob refrigeração e foram codificados de acordo com a tabela 1.

Tabela 1. Extratos brutos obtidos dos cultivos axênicos e cocultivo em meio líquido

Código do extrato	Condições de cultura	Fungo	Tempo (dias)	Quantidade de Erlenmeyers	Massa (mg)
AxCh7	Axênico	<i>C. horii</i>	7	4	9,5
AxCh14	Axênico	<i>C. horii</i>	14	4	15,4
AxCh21	Axênico	<i>C. horii</i>	21	4	20,1
AxCh28	Axênico	<i>C. horii</i>	28	4	23,2
AxFg7	Axênico	<i>F. guttiforme</i>	7	4	17,9
AxFg14	Axênico	<i>F. guttiforme</i>	14	4	27,9
AxFg21	Axênico	<i>F. guttiforme</i>	21	4	35,3
AxFg28	Axênico	<i>F. guttiforme</i>	28	4	43,3
CoR7	Cocultivo em escala reduzida	<i>C. horii</i> e <i>F. guttiforme</i>	7	8	26,7
CoR14	Cocultivo em escala reduzida	<i>C. horii</i> e <i>F. guttiforme</i>	14	8	49,9
CoR21	Cocultivo em escala reduzida	<i>C. horii</i> e <i>F. guttiforme</i>	21	8	57,7
CoR28	Cocultivo em escala reduzida	<i>C. horii</i> e <i>F. guttiforme</i>	28	8	63,9
CoLP28	Cocultivo em Larga escala PDB	<i>C. horii</i> e <i>F. guttiforme</i>	28	36	298,0
CoLC28	Cocultivo em Larga escala Czapek	<i>C. horii</i> e <i>F. guttiforme</i>	28	36	211,0
BAFCh7	Biotransformação ácido fusárico	<i>C. horii</i>	7	4	22,9
BAFCh28	Biotransformação ácido fusárico	<i>C. horii</i>	28	4	36,4
BAFFg14	Biotransformação ácido fusárico	<i>F. guttiforme</i>	14	4	83,2
BAFFg28	Biotransformação ácido fusárico	<i>F. guttiforme</i>	28	4	97,4

BADFCh7	Biotransformação ácido 9,10- desidrofusárico	<i>C. horii</i>	7	2	36,2
BMCh7	Biotransformação mistura dos ácidos	<i>C. horii</i>	7	2	40,3
EPGFg28	Modificador epigenético	<i>F. guttiforme</i>	28	6	60,2
EPGCh28	Modificador epigenético	<i>C. horii</i>	28	6	65,7

Ax = cultivo axênico, Co = cocultivo, B = biotransformação e EPG = cultivo com modificador epigenético. R = escala reduzida, L = larga escala, AF = presença de ácido fusárico, ADF = presença de ácido 9,10-desidrofusárico, M = mistura dos dois ácidos, Fg = fungo *F. guttiforme* (Fg), Ch = *C. horii*, 7 = 7 dias de cultivo, 14 = 14 dias de cultivo, 21 = 21 dias de cultivo e 28 = 28 dias de cultivo.

Os extratos obtidos foram analisados por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H utilizando como solventes metanol- D_4 , clorofórmio- D e acetona- D_6 para avaliar seus perfis químicos. Os espectros foram realizados no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto utilizando-se um espectrômetro da marca Bruker-Advance em frequência de 400 MHz (9,4 T). As análises das frações e compostos isolados também foram realizadas por RMN de ^1H em 400 MHz ou em 500MHz da marca BRUKER(R) - Modelo DRX500 - Ultra Shield (R) (11,74T).

3.2.9 Fracionamento dos extratos obtidos em escala reduzida

3.2.9.1 Extratos obtidos de cultivos axênicos

Os extratos de 28 dias dos cultivos axênicos de ambos os fungos, AxFg28 e AxCh28, foram fracionados por HPLC realizada em uma bomba Shimadzu LC-6AD, utilizando uma coluna da Supelco RP-8 (10 μm , 10 \times 250 mm) com uma taxa de fluxo de 4,0 mL.min $^{-1}$. O sistema de eluição foi composto por água e metanol.

Para o extrato AxFg28, o sistema gradiente que se iniciou com metanol 15% e finalizando com 100% em 11 min, mantendo-se em 100% de metanol por 2 min para

limpeza, em seguida retornando para 15% de metanol para condicionamento da coluna cromatográfica, totalizando 14 min e com detecção por UV a 270 nm. O fracionamento resultou em 4 frações que receberam novos códigos de identificação de AxFg28p1 a AxFg28p4.

Já para o extrato AxCh28, o sistema gradiente iniciou-se com 15% de metanol e chegou a 100% em 13 min, mantendo-se por 2 min para limpeza e em seguida retornando para 15% de metanol para condicionamento da coluna cromatográfica, totalizando 16min e com detecção por UV a 222 nm. Foram obtidas 6 frações codificadas de AxCh28p1 a AxCh28p6.

As frações de ambas as separações foram analisadas por RMN de ^1H como representado no fluxograma da figura 11.

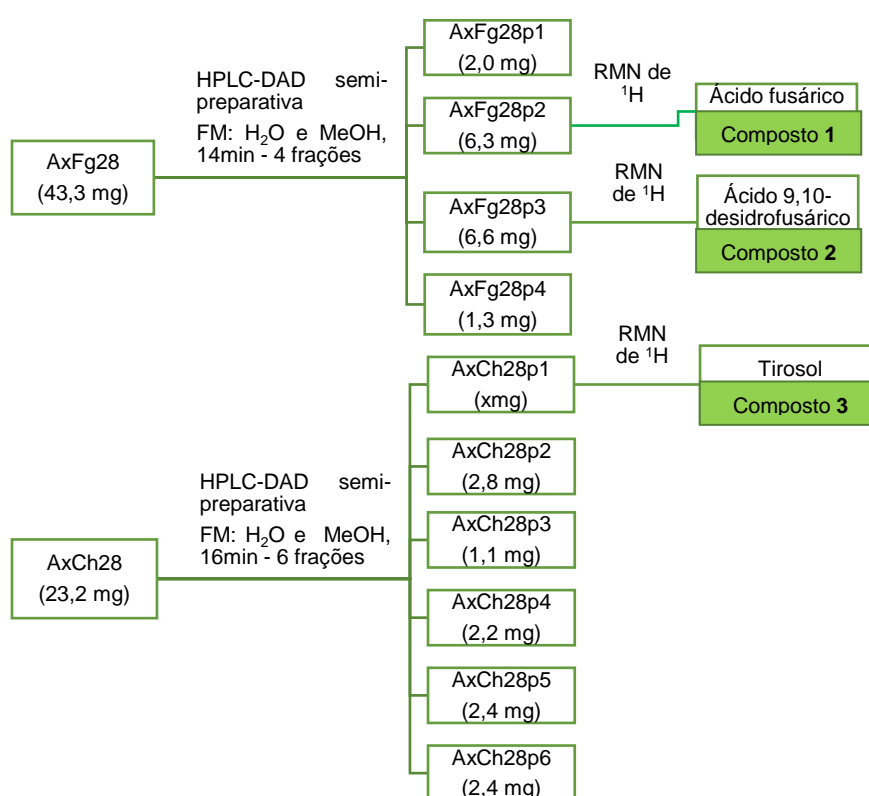


Figura 11. Fluxograma do fracionamento dos extratos obtidos dos cultivos axênicos dos fungos *F. guttiforme* e *C. horii* (AxFg28) e (AxCh28) em 28 dias de crescimento. **Fonte:** o autor (2021).

3.2.9.2 Extratos cocultivo

Os fracionamentos dos extratos de cocultivo em escala reduzida de 7, 14 e 21 dias (CoR7, CoR14, CoR21) foram realizados por cromatografia líquida a vácuo utilizando um funil de Büchner, sistema a vácuo e gel de sílica (40-70 mesh) como fase estacionária. A eluição foi realizada utilizando gradientes de 150 mL de solventes orgânicos, hexano e acetato de etila, como fase móvel, iniciando-se com 100 % de hex, até atingir 100% de AcOEt, e ao final foi utilizado 300 mL de MeOH obtendo-se 6 frações, como representado na tabela 2.

Tabela 2. Gradiente dos solventes utilizados na cromatografia líquida a vácuo.

Fracionamento	Hex (%)	AcOEt (%)	MeOH (%)	Volume (mL)
1º	100	0	0	150
2º	75	25	0	150
3º	50	50	0	150
4º	25	75	0	150
5º	0	100	0	150
6º	0	0	100	300

As frações coletadas para cada extrato receberam novos códigos de CLV 1 a CLV 6, por exemplo para o extrato de cocultivo de 7 dias (CoR7) as frações foram denominadas CoR7CLV1 a CoR7CLV6 e a cromatografia foi acompanhada por CCD, utilizando solução de vanilina ácida como revelador e RMN de ^1H .

As frações CoR7CLV5, CoR14CLV5 e CoR14CLV6 foram escolhidas para separação por HPLC realizada em um aparelho Shimadzu LC-6AD utilizando uma coluna da Supelco C8 (10 μm , 10 \times 250 mm) com uma taxa de fluxo de 4,0 mL.min⁻¹ e o sistema de eluição foi composto por água e metanol. Cada método utilizado na separação das frações está descrito a seguir.

CoR7CLV5: o sistema gradiente iniciou-se com em 30% de metanol e atingiu 60% em 10 min, e chegando a 100% em 13 min, e mantendo-se durante 4 min, sendo

em retornado para 30% de metanol aos 17 min durante 3 min, totalizando 20 min. A detecção foi realizada por UV a 270 nm sendo obtidas 3 frações denominadas CoR7CLV5p1 a CoR7CLV5p3.

CoR14CLV5: o sistema gradiente iniciou-se com 30% de metanol atingindo 100% aos 20 min, mantendo-se por 2 min e retornando a 40% aos 25 min total do fracionamento. A detecção foi realizada por UV a 270 nm, e foram coletadas 3 frações codificadas de CoR14CLV5p1 a CoR14CLV5p3.

CoR14CLV6: O sistema gradiente iniciou-se em 40% metanol atingindo 60% em 5 min, e a seguir para 100% de metanol aos 10 min mantendo-se por 4 min e retornando para 40%, totalizando 15 min. A detecção foi realizada por UV a 270 nm e nesta separação foram obtidas 3 frações denominadas CoR14CLV5p1 a CoR14CLV5p3.

Todas as frações coletadas foram analisadas por RMN de ^1H para avaliar a separação e determinar os passos seguintes. Um fluxograma dos fracionamentos é mostrado na figura 12.

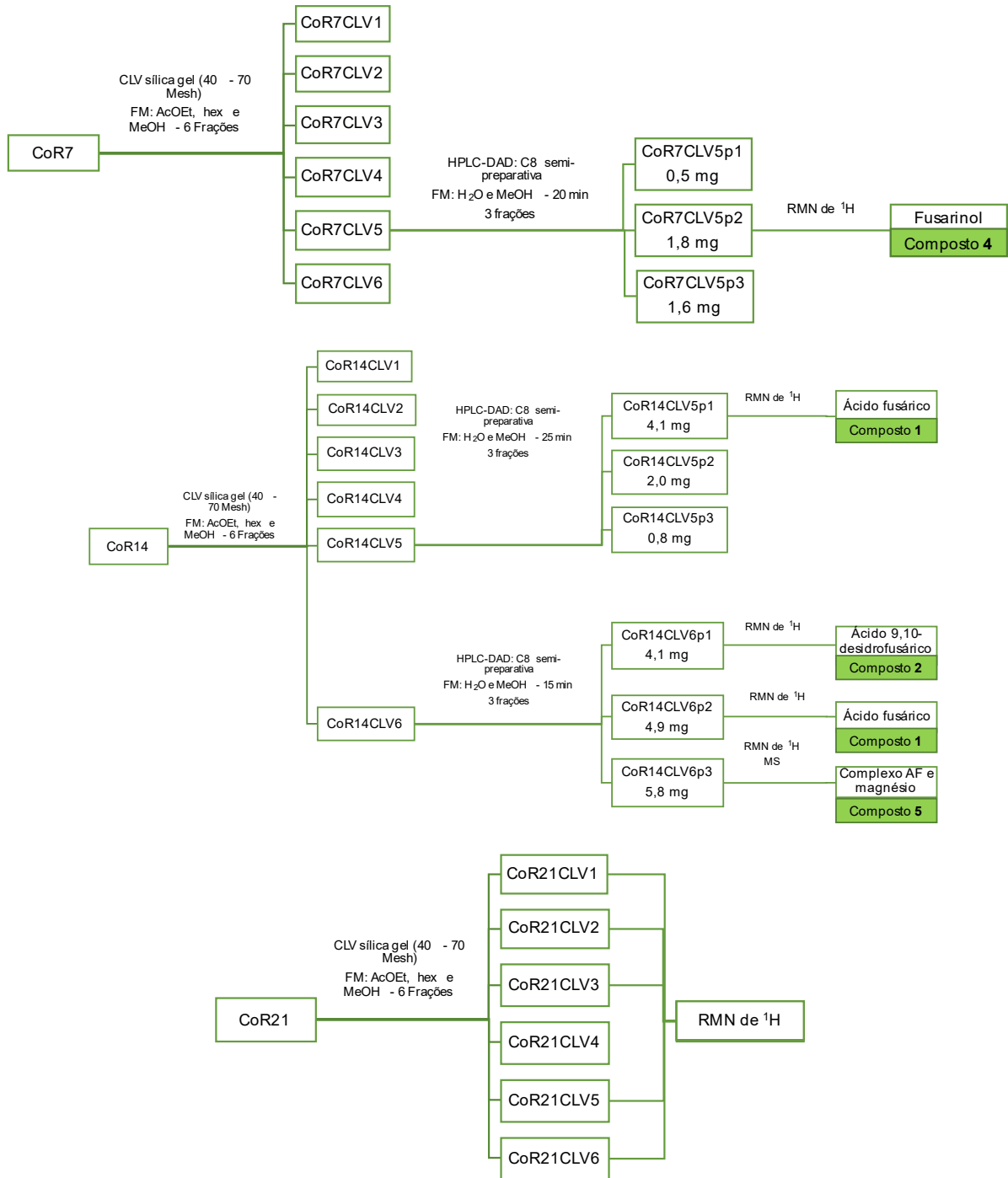


Figura 12. Fluxograma do fracionamento dos extratos obtidos do cocultivo dos fungos *F. guttiforme* e *C. horii* em 7, 14 e 21 dias de crescimento. **Fonte:** o autor (2021).

A fração CoR14CLV6p3 foi analisada por espectrometria de massas de alta resolução em um espectrômetro de massa micrOTOF-II (Bruker Daltonics, Massachusetts, EUA) equipado com uma fonte de ionização por electrospray e um

analisador de tempo de voo, empregando uma bomba de infusão (Kd Scientific) a uma taxa de fluxo de 0,20 mL

Para a separação do extrato de cocultivo em escala reduzida de 28 dias no meio PDB, CoR28, o fracionamento foi realizado utilizando o mesmo sistema de CLV, contudo foi utilizado um sistema de eluição de 5 frações ao invés de 6 obtendo-se 5 frações. O sistema pode ser observado na tabela 3 a seguir.

Tabela 3. Gradiente dos solventes utilizados na cromatografia líquida a vácuo.

Fracionamento	Hex (%)	AcOEt (%)	MeOH (%)	Volume (mL)
1º	100	0	0	150
2º	66,7	33,3	0	150
3º	33,3	66,7	0	150
4º	0	100	0	150
5º	0	0	100	150

As frações receberam novos códigos de CoR28CLV1 a CoR28CLV5 e foram analisadas por RMN de ^1H e CCD. As frações CoR28CLV4 e CoR28CLV5 foram separadas por HPLC utilizando uma bomba Shimadzu LC-6AD, uma coluna da Supelco RP-8 (10 μm , 10 \times 250 mm) e com uma taxa de fluxo de 4,0 mL.min⁻¹. O método de separação foi gradiente usando um sistema de eluição água e metanol:

CoR28CLV4: A separação iniciou-se com 15% de MeOH aumentando gradativamente até atingir 50% de MeOH em 12 min, retornando para 15% em 3 min totalizando 15 min. A detecção foi realizada por UV a 270 nm obtendo-se 3 frações denominadas CoR28CLV4p1 a CoR28CLV4p3.

CoR28CLV5: A separação iniciou-se com 30% de MeOH e atingiu 100% em 7 min, mantendo-se em 100% de fase orgânica por 4 min para limpeza, em seguida retornou para 30 % aos 13 min para acondicionamento da coluna, totalizando 14 min. A detecção foi realizada por UV a 270 nm e foram coletados 5 picos da separação denominados CoR28CLV5p1 a CoR28CLV5p5

Os compostos foram analisados por RMN de ^1H e um fluxograma resumindo a separação pode ser observado na figura 13.

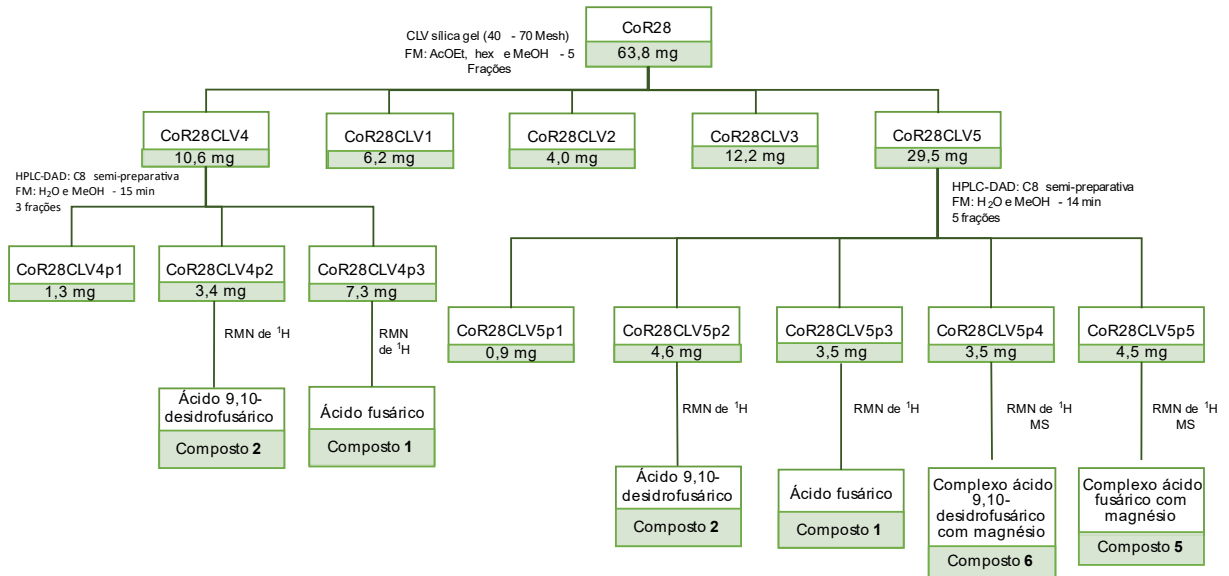


Figura 13. Fluxograma do fracionamento do extrato obtido do cocultivo em escala reduzida dos fungos *F. guttiforme* e *C. horii* em 28 dias de crescimento. **Fonte:** o autor (2021).

As frações CoR28CLV6p4 e CoR28CLV6p5 foram analisadas por espectrometria de massas de alta resolução

3.2.10 Fracionamento dos extratos obtidos em larga escala

3.2.10.1 Extrato em meio PDB

O extrato CoLP28 foi fracionado por cromatografia de exclusão utilizando-se Sephadex LH-20 como fase estacionária e uma coluna de vidro com dimensões de 2,5 cm de diâmetro e 60 cm de altura. A Sephadex foi suspensa em metanol (PA) e empacotada para ocupar 53 cm de altura da coluna. O extrato foi dissolvido em 1,5 mL e aplicado no topo da coluna. Foram coletadas frações contendo 10 mL de fase móvel. Acompanhou-se o processo de separação por cromatografia em camada delgada (CCD) e obtiveram-se 38 frações de 10 mL cada. Através de análise por CCD

as 38 frações foram reagrupadas em 4 novas frações, denominadas de CoLP28.1 a CoLP28.4

As frações CoLP28.1 e CoLP28.2 foram submetidas a sucessivos fracionamentos por CC de exclusão e de adsorção, utilizando uma coluna de vidro de 50 cm de altura e 2,0 cm de diâmetro. A coluna de vidro foi empacotada com 35,3 g de sílica flash de 230-400 mesh como fase estacionária ocupando uma altura de 27,0 cm. O eluente utilizado foi AcOEt e hex, em proporções que variaram para cada amostra sendo decididas com base na melhor separação obtida por cromatografia em camada delgada prévia. Cada fração foi coletada com 7 mL de fase móvel. O processo de separação foi acompanhado por CCD. Novas purificações foram realizadas por CC de adsorção e as novas sub-frações receberam codificações como indicado no fluxograma da figura 14.

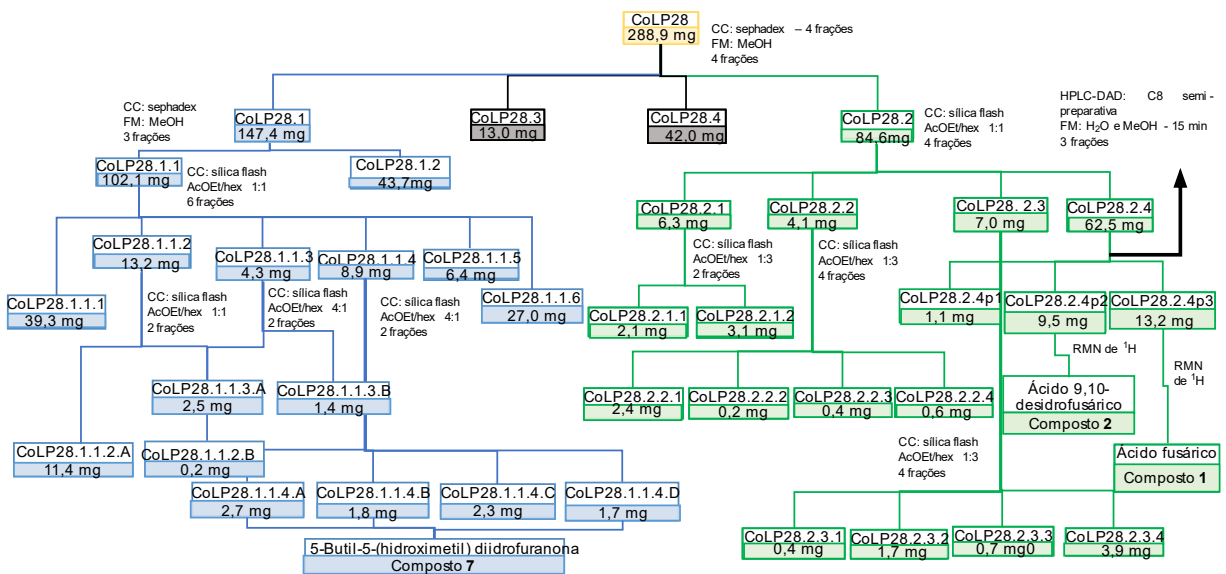


Figura 14. Fluxograma do fracionamento do extrato obtido do cocultivo em larga escala dos fungos *F. guttiforme* e *C. horii* em 28 dias de crescimento em meio PDB. **Fonte:** o autor (2021).

Análise da fração CoLP28.2.4 por RMN ¹H mostrou que esta fração apresentava uma mistura de compostos semelhantes à observada na fração CoR28.CLV4 em escala reduzida. Desta forma a fração foi separada por HPLC-DAD utilizando o mesmo método de separação da escala reduzida descrito anteriormente. Foram coletadas 3 frações denominadas CoLP28.2.4p1 a CoLP28.2.4p3.

A fração CoLp281.1.4.B foi analisada por espectrometria de massas em cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu, modelo QP-2010 acoplado a um detector de massas. O modo de análise foi impacto de elétrons e o gás de arraste foi hélio. A coluna utilizada foi: RTx-5MS (Resteck) de 30 metros, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 um de espessura de fase.

3.2.10.2 Extrato em meio Czapek

O extrato do cultivo em meio Czapek em larga escala, CoLC28 foi fracionado por HPLC-DAD utilizando uma bomba Shimadzu LC-6AD, uma coluna da Supelco RP-8 (10 μ m, 10 \times 250 mm) e com uma taxa de fluxo de 4,0 mL.min⁻¹. O sistema de eluição consistiu em água e metanol e o método de separação iniciou-se em 15% de MeOH, atingindo 100% em 20 min, mantendo-se por 2 min e retornando para 15% em 3 min, totalizando 25 min. A detecção foi realizada por UV em 264 nm e foram obtidas 10 frações codificadas como CoLC28p1 a CoLC28p8 que foram analisadas por RMN de ¹H, fluxograma mostrado na figura 15.

A fração CoLC28p4 passou por outro fracionamento utilizando HPLC-DAD iniciando com 10% de MeOH atingindo 100% em 15 min, mantendo-se por 3 min e retornando para 15% em 2 min, totalizando 20 min. A detecção foi realizada por UV em 260 nm e foram obtidas 3 frações codificadas como CoLC28p4.1 a CoLC28p4.3.

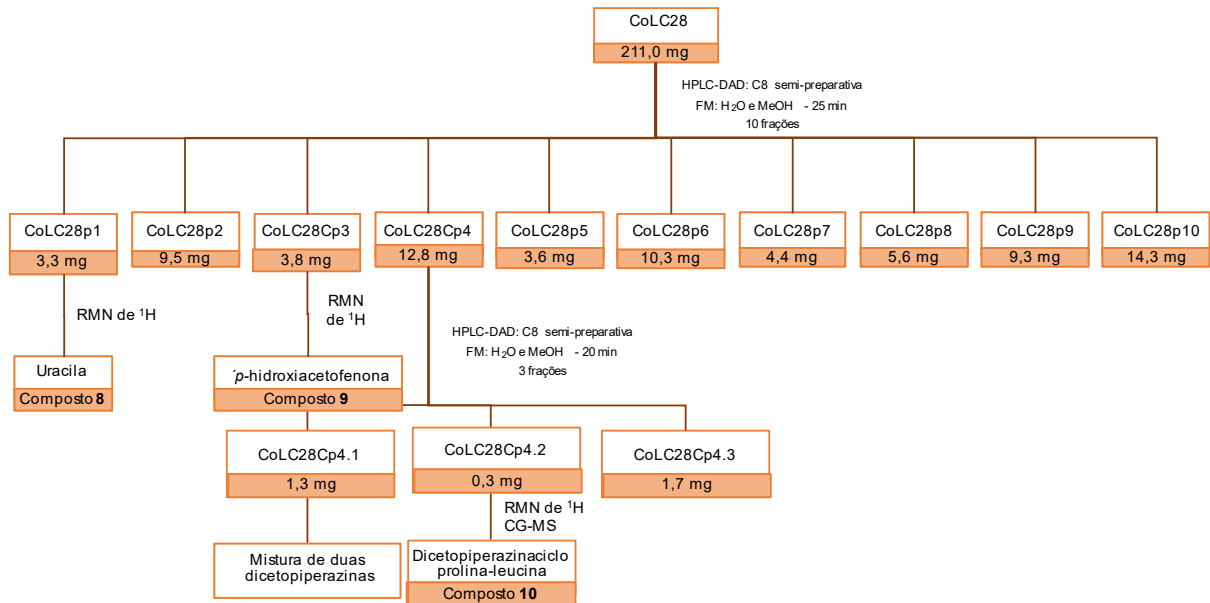


Figura 15. Fluxograma do fracionamento do extrato obtido do cocultivo em larga escala dos fungos *F. guttiforme* e *C. horii* em 28 dias de crescimento em meio Czapek. **Fonte:** o autor (2021).

As frações CoLC28p3, CoLC28p4.2, CoLC28p8 e CoLC28p10 foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) um sistema Shimadzu QP2010Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), equipado com injetor automático AOC-20i e com fonte de ionização por elétrons (EI-EM) operando em 70 eV. A separação cromatográfica foi realizada em coluna capilar Rtx5-MS (Restek) de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d. i. x 0,25 µm de filme). Foi utilizado gás Hélio como gás de arraste, a um fluxo constante de 1,1 mL/min. A temperatura do injetor e da fonte de íons foi de 200°C. As amostras foram preparadas em solventes grau espectroscópico (marca J.T. Baker), e o volume de injeção de amostra foi de 1,0 µL. A temperatura do forno foi programada de 60°C a 280°C a uma velocidade de 10°C/min. Os espectros de massas foram registrados com um intervalo de varredura de 0,5 s na faixa de massas de 45 a 800 Da.

3.2.11 Fracionamento dos extratos obtidos nos processos de biotransformações

Os extratos de biotransformação de AF pelo fungo *C. horii* de 7 e 28 dias (BAFCh7 e BAFCh28) foram separados por HPLC-DAD utilizando sistema de eluição

água e metanol, utilizando uma bomba Shimadzu LC-6AD, uma coluna da Supelco RP-8 (10 μm , 10 \times 250 mm) e com uma taxa de fluxo de 4,0 mL.min⁻¹. Ambos foram detectados por UV a 270 nm e as frações coletadas foram levadas para análise de RMN de ¹H.

O método de separação para o extrato BAFCh7 iniciou-se com 30% de MeOH, passando para 100% em 10 min, mantendo-se por 1 min e retornando para 15% em 12 min onde se manteve durante 1 min, totalizando 13 min. Foram obtidas 4 frações codificadas de BAFCh7p1 a BAFCh7p4 mostrado na figura 16.

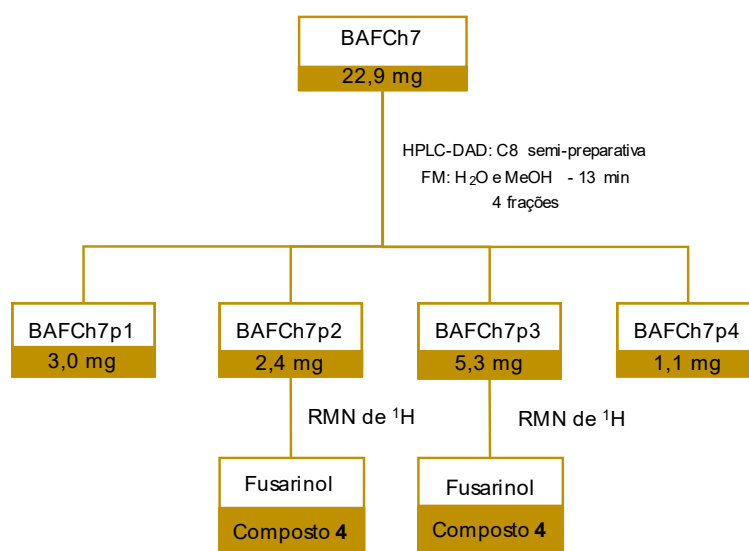


Figura 16. Fluxograma do fracionamento do extrato obtido da biotransformação do ácido fusárico por *C. horii* em 7 dias. **Fonte:** o autor (2021).

O método de separação do extrato BAFCh28 iniciou-se com 15% de MeOH e atingiu 100% em 7 min, mantendo-se constante por 4 min e retornando para 15% em 3 min, mantendo-se por 1 min e totalizando 13min. Foram obtidas 5 frações denominadas BAFCh28p1 a BAFCh28p5 mostradas na figura 17.

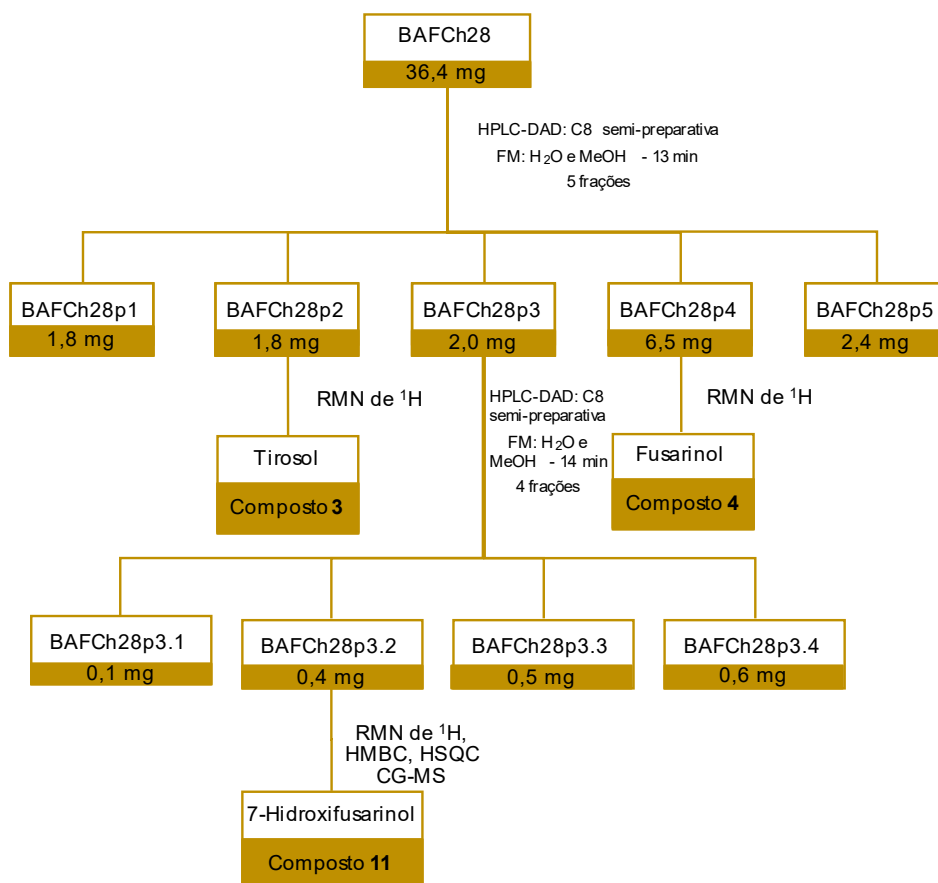


Figura 17. Fluxograma do fracionamento do extrato obtido da biotransformação do ácido fusárico por *C. horii* em 28 dias. **Fonte:** o autor (2021).

A fração BAFCh28p3 foi fracionada por HPLC-DAD utilizando o método iniciado com 30% de MeOH e atingindo 100% em 10 min, mantendo-se constante por 3 min e retornando para 30% em 1 min, mantendo-se por 1 min e totalizando 14min. A detecção foi realizada por UV a 270 nm e foram obtidas 4 frações denominadas BAFCh28p3.1 a BAFCh28p3.4, mostrado na figura 17. A fração BAFCh28p3.2 foi levada para CGMS e para análise de HMBC e HSQC.

O fracionamento do extrato BAFCh7 foi realizado utilizando HPLC e fase móvel composta por água e metanol. O método iniciou-se com 15% de metanol até atingir 100% em 20 min, mantendo-se em 100% por dois minutos e retornando para 15% em 3 min, totalizando 25min. A detecção foi realizada por UV a 267 nm e foram obtidas 4 frações denominadas BAFCh7p1 a BAFCh7p4. Fracionamento mostrado na figura 18.

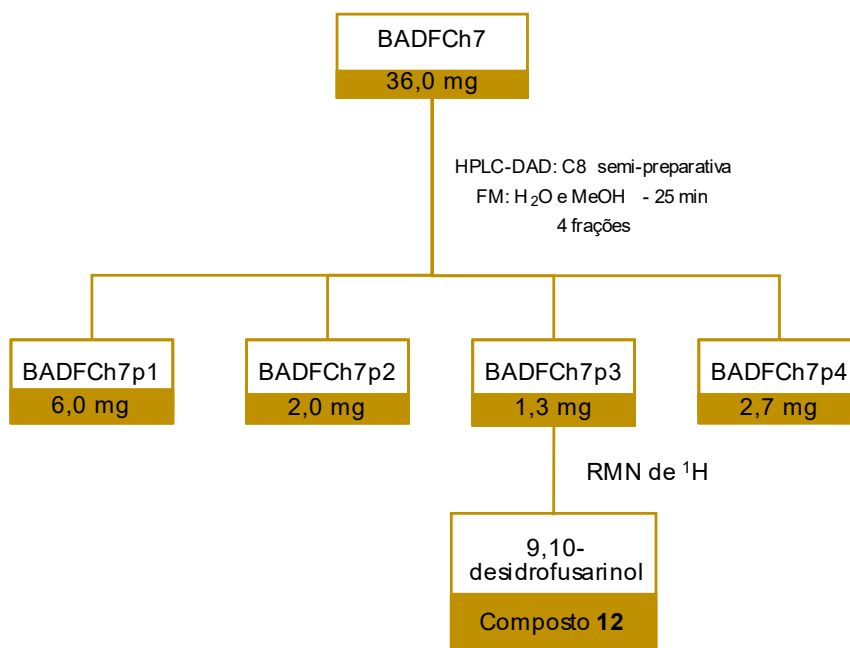


Figura 18. Fluxograma do fracionamento do extrato obtido da biotransformação do ácido 9,10-desidrofusárico por *C. horii* em 7 dias. **Fonte:** o autor (2021).

A fração BADFChp3 apresentou espectro de absorção semelhante ao do fusarinol e foi analisada por RMN de ^1H em 500 MHz, o fluxograma de separação é observado na figura 18.

O A fração BMCh7, que consiste na mistura dos dois ácidos, foi separada utilizando HPLC-DAD com o mesmo método do extrato BADFCh7. Contudo, a detecção foi realizada em 270 nm numa corrida de 25 min e foram obtidas 8 frações denominadas BMCh7p1 a BMCh7p8 como observado no fluxograma da figura 19. A fração BMCh7p5 foi analisada por CG/MS e RMN/HMBC.

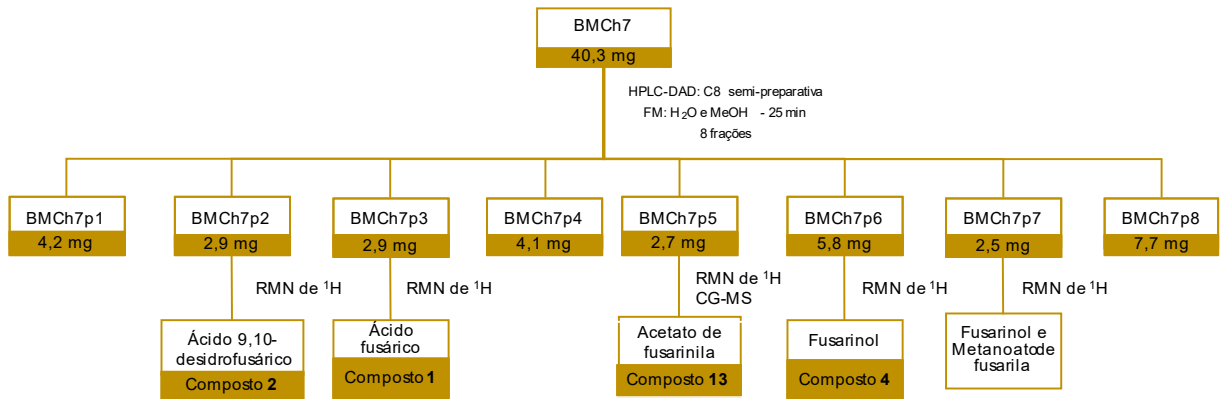


Figura 19. Fluxograma do fracionamento do extrato obtido da biotransformação da mistura de ácido fusárico e ácido 9,10-desidrofusárico por *C. horii* em 7 dias. **Fonte:** o autor (2021).

3.2.12 Fracionamento dos extratos obtidos por modificação epigenética

O fracionamento do extrato EPGFg28 foi realizado utilizando HPLC e fase móvel composta por água e metanol. O método iniciou-se com 15% de metanol até atingir 100% em 20 min, mantendo-se em 100% por dois minutos e retornando para 15% em 3 min, totalizando 25 min. A detecção foi realizada por UV a 300 nm e foram obtidas 10 frações denominadas EPGFg28p1 a EPGFg28p10. Fracionamento mostrado na figura 20. As frações foram analisadas por RMN de ¹H em 500 MHz e a fração EPGFg28p10 foi analisada por CG/EM.

A fração EPGFg28 passou por outro fracionamento, utilizando mesmo método de eluição contudo o sistema iniciou-se com 5% de MeOH. Foram coletadas 6 frações denominadas EPGFg28p7.1 a EPGFg287.6.

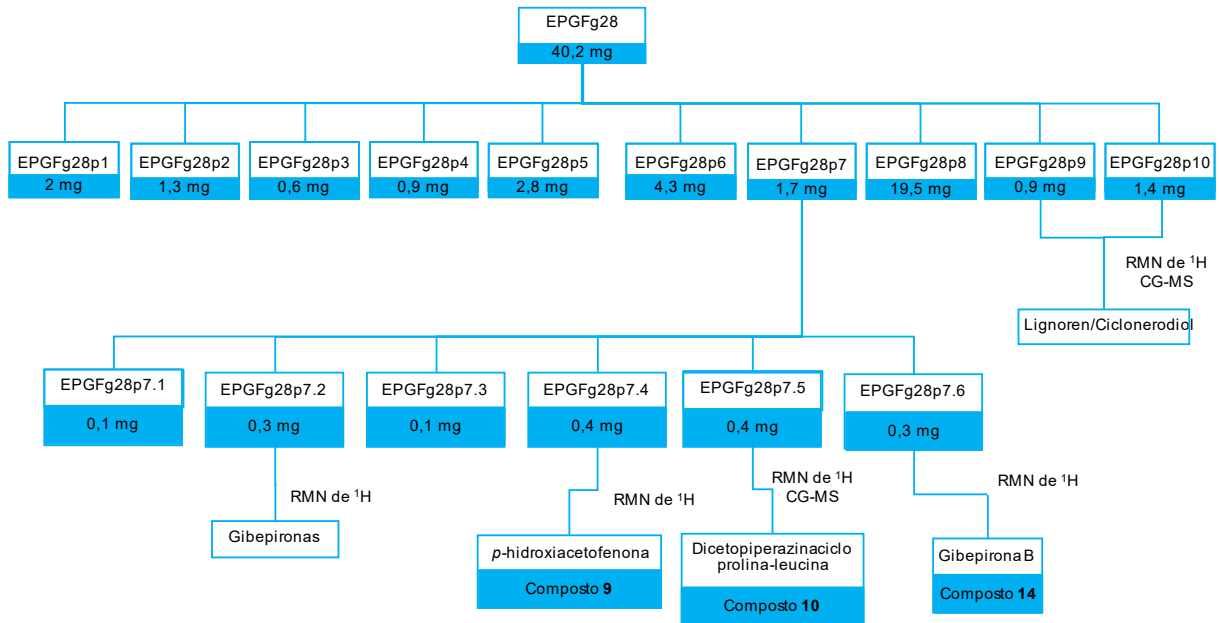


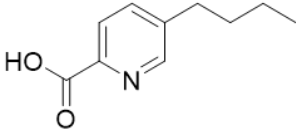
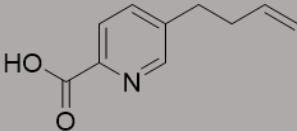
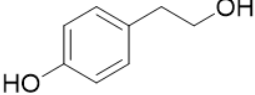
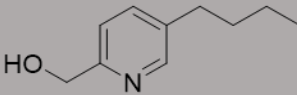
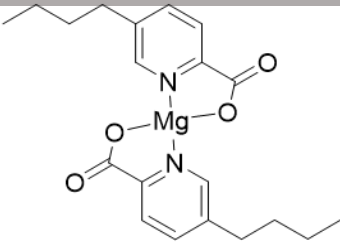
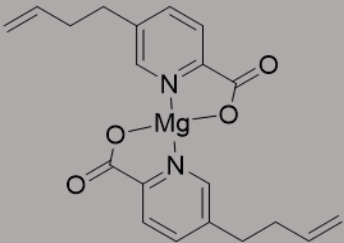
Figura 20. Fluxograma do fracionamento do extrato obtido com modificador epigenético no fungo *F. guttiforme*. **Fonte:** o autor (2021).

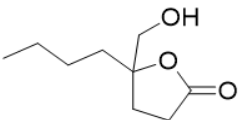
O extrato EPGCh28 também foi analisado por HPLC-DAD, contudo nenhum composto foi isolado ou identificada devido à baixa quantidade, dessa forma não foi apresentada a metodologia contudo algumas discussões serão realizadas posteriormente.

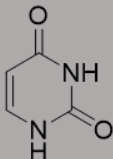
3.2.13 Compostos obtidos a partir dos experimentos realizados

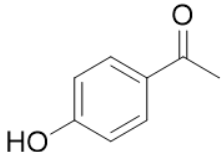
A tabela 4 a seguir reúne os compostos isolados a partir dos experimentos realizados, junto com as frações, fórmula estrutural, nome do composto e a massa.

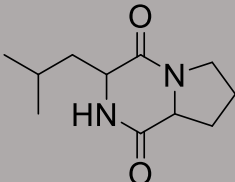
Tabela 4. Lista dos compostos isolados, fórmula estrutural, fração coletadas e massa obtida.

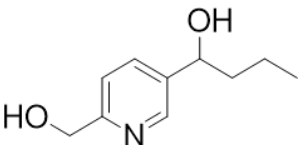
Composto	Nome	Fórmula estrutural	Frações da qual foi isolado	Massa (mg)
1	Ácido fusárico		CoLP28.2.4p3	13,2
			CoR28CLV4p3	7,3
			CoR28CLV5p3	3,5
			CoR14CLV5p1	4,1
2	Ácido 9,10-desidrofusárico		CoLP28.2.4p2	9,5
			CoR28CLV4p2	3,4
			CoR28CLV5p2	4,6
3	Tirosol		BAFCh28p2	1,8
			AxCh28p3	2,2
4	Fusarinol		CoR7CLV5p2	1,8
			BAFCh7p2	2,4
			BAFCh7p3	5,3
			BAFCh28p4	6,5
5	Complexo do ácido fusárico com magnésio		CoR14CLV6p3	5,8
			CoR28CLVp5	4,5
6	Complexo do ácido 9,10-desidrofusárico com magnésio		CoR28CLV5p4	3,5

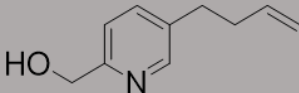
7	5-Butil-5-(hidroximetil)dii drofuranona		CoLP28.1.1.4.A	2,7
			CoLP28.1.1.4.B	1,8
			CoLP28.1.1.4.D	1,7

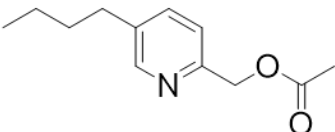
8	Uracila		CoLC28p1	3,3
---	---------	---	----------	-----

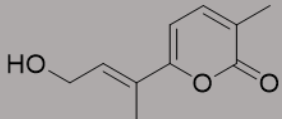
9	para-hidroxiacetofenona		CoLC28Cp3 EPGFg28p7.4	3,8 0,5
---	-------------------------	--	--------------------------	------------

10	Dicetopiperazina ciclo prolina-leucina		CoLC28Cp4.2 EPGFg28p7.5	0,3 0,4
----	--	---	----------------------------	------------

11	7-Hidroxi fusarinol		BAFCh28p3.2	0,4
----	---------------------	---	-------------	-----

12	9,10-Desidrofusarinol		BADFCh7p3	1,3
----	-----------------------	---	-----------	-----

13	Acetato de fusarinila		BMCh7p5	2,7
----	-----------------------	--	---------	-----

14	Gibepirona B		EPGFg28p7.6	0,3
----	--------------	---	-------------	-----

3.2.14 Ensaio enzimáticos

3.2.14.1 Titulação do sítio ativo da papaína

Para a realização de ensaios com a papaína foi determinada sua concentração molar utilizando caseína como substrato. Para isso, foi preparado tampão acetato de sódio (10 mM e pH 5,5) e a partir dele prepararam-se as soluções papaína na concentração de 5,0 mg.mL⁻¹, solução DDT a 100 mM solução de TCA a 10% e solução de caseína a 1%. Inicialmente determinou-se o tempo que seria realizado o ensaio, para isso a reação foi realizada nos tempos, 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15 e 20 min em triplicata. Em um eppendorf de 1,0 mL adicionou-se 20 µL da solução de papaína e 1,0 µL de DTT incubando por 5 min a 37 °C, em seguida adicionaram-se 20 µL do tampão e 100 µL da caseína deixando a reação ocorrer nos tempos determinados. A reação foi interrompida pela adição de 200 µL de TCA. A solução foi centrifugada a 7000 G por 10 min a 25 °C, em seguida foram retirados 200 µL do sobrenadante adicionando-se numa placa transparente. A leitura foi realizada no fluorímetro ajustado para ler absorvância em 280 nm.

A determinação da atividade enzimática foi realizada titulando-se o sítio ativo da enzima com o inibidor enzimático E-64, um inibidor comercial de referência, por 5 min de reação do método descrito anteriormente, conforme descrito em BARRETT et al., 1982 e adaptado para estas condições. A solução de inibidor foi adicionada após a primeira incubação com DTT e deixado para uma segunda incubação para interação do inibidor e enzima. A titulação foi realizada em diferentes concentrações do inibidor E-64 observando-se o declínio da atividade enzimática com aumento da concentração do inibidor. Assim traçou-se um gráfico da atividade enzimática versus a concentração

de E-64 e o valor da concentração da enzima foi determinado pela intercessão no eixo da abscissa.

3.2.14.2 Determinação do valor de K_m

O ensaio de inibição enzimática foi realizado utilizando como substrato o ZFR-MCA. Antes do ensaio determinou-se o valor de K_m entre a enzima e substrato utilizando o método semelhante do item 3.2.12.1, substituindo a caseína pelo ZFR-MCA, a concentração da enzima utilizada foi 209 μM , a concentração de DTT foi 10 mM, a reação ocorreu por 5 min antes de ser interrompida pela adição de TCA 10%, o experimento foi realizado em placa de ELISA na temperatura de 27 °C e com fluorímetro programado para realizar leitura com comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) 380 nm e emissão (λ_{em}) 460 nm. Para este substrato não foi realizada a centrifugação. A determinação do K_m experimental é realizado com concentrações diferentes de substrato e determinado por regressão não linear ou pela cinética de Michaelis-Menten (BARRETT et al., 1982).

3.2.14.3 Atividade de inibição enzimática

A avaliação da atividade inibitória dos compostos isolados frente à papaína foi realizada na concentração de 50 μM , valor decidido com base em estudos prévios realizados. A atividade enzimática foi determinada com base na hidrólise do substrato ZFR-MCA que foi observada pela fluorescência após 5 min de reação. O experimento foi realizado em placa de ELISA na temperatura de 27 °C e com fluorímetro programado para leitura com comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) 380 nm e emissão (λ_{em}) 460 nm.

Em um eppendorf foram adicionados 20 μL de papaína (25 μM) foi ativada com 1 μL de DTT (10 mM) por 5 min a 37 °C, em seguida a enzima foi incubada com 20 μL de tampão e 5 μL da solução de inibidor em DMSO na concentração de 50 μM por 5 min. A reação enzimática foi iniciada pela adição de 100 μL substrato para uma concentração final de 30 μM e após 5 min a reação foi interrompida pela adição de 200 μL de TCA a 10 %. A análise foi realizada no fluorímetro com 200 μL da solução

por poço em triplicata. Como controle positivo utilizou-se o inibidor comercial E-64 na mesma concentração, como branco adicionou-se o TCA antes do substrato para desnaturação da enzima e para avaliar a fluorescência sem adição de inibidor realizou-se um controle negativo apenas o DMSO. Na figura 21 é mostrado um esquema geral do ensaio de inibição enzimática.

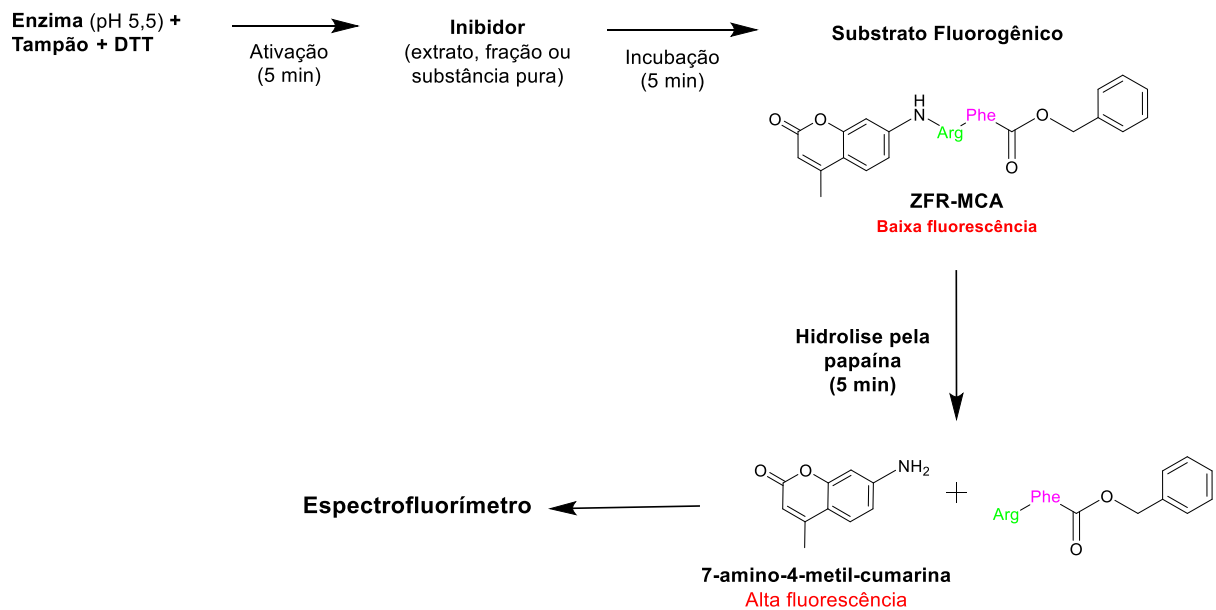


Figura 21. Esquema geral da metodologia de ensaio enzimático da papaína. **Fonte:** o autor (2021).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise dos extratos brutos obtidos em escala reduzida

Com o objetivo de avaliar a variação metabólica entre os cultivos axênicos de *F. guttiforme* e *C. horii* e comparação com o cocultivo destes fungos, bem como a variação em intervalos de tempos diferentes foram realizados primeiramente os cultivos em escala reduzida utilizando meio PDB. Os tempos escolhidos foram de 7, 14, 21 e 28 dias, e os extratos obtidos em AcOEt, que foram analisados por RMN de ^1H e por HPLC-DAD.

4.1.1 Cultivos Axênicos

O fungo *F. guttiforme* apresentou pequeno crescimento micelial dispersado no meio e coloração branca roseada nos primeiros setes dias, mas com o tempo os micélios cobriram totalmente a superfície do meio e apresentaram coloração totalmente branca, como mostrada figura 22 (A) em 7 dias e (B) 28 dias de crescimento.

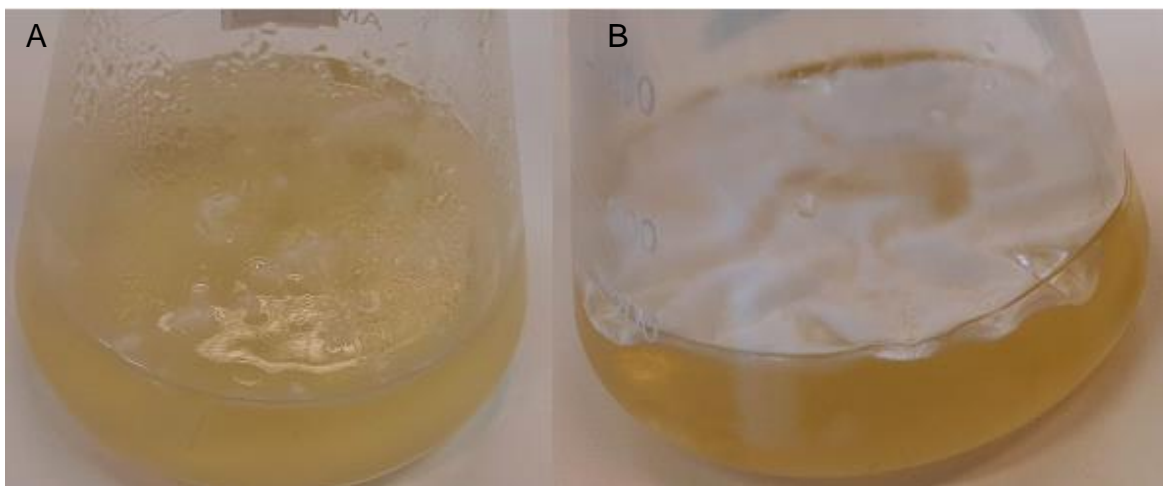


Figura 22. Foto do cultivo axênico do *F. guttiforme* em 7 e 28 dias. Na esquerda (A) no período de 7 dias de crescimento e na direita (B) 28 dias. **Fonte:** o autor (2021).

O espectro de RMN de ^1H do extrato obtido após 7 dias, figura 23 (A), apresentou 3 sinais na região de hidrogênios aromáticos: δ_{H} 7,89 (1H, dd, $J=1,7$ e $7,9$ Hz), 8,07 (1H, d, $J=8,0$) e 8,55 (1H, sl), sinais referentes ao composto **1**, identificado como ácido fusárico. Apresentou ainda sinais pouco intensos de outros hidrogênios vinílicos em 4,95, 5,01 e 5,85 ppm, já nos outros extratos de 14, 21 e 28 dias, os espectros de RMN de ^1H indicaram apenas aumento da quantidade de ácido 9,10-desidrofusárico na mistura, composto **2**, observado pelo aumento da integral dos hidrogênios vinílicos em δ_{H} 4,99 (2H, m) e δ_{H} 5,85 (1H, m), mostrado na figura 23 (B).

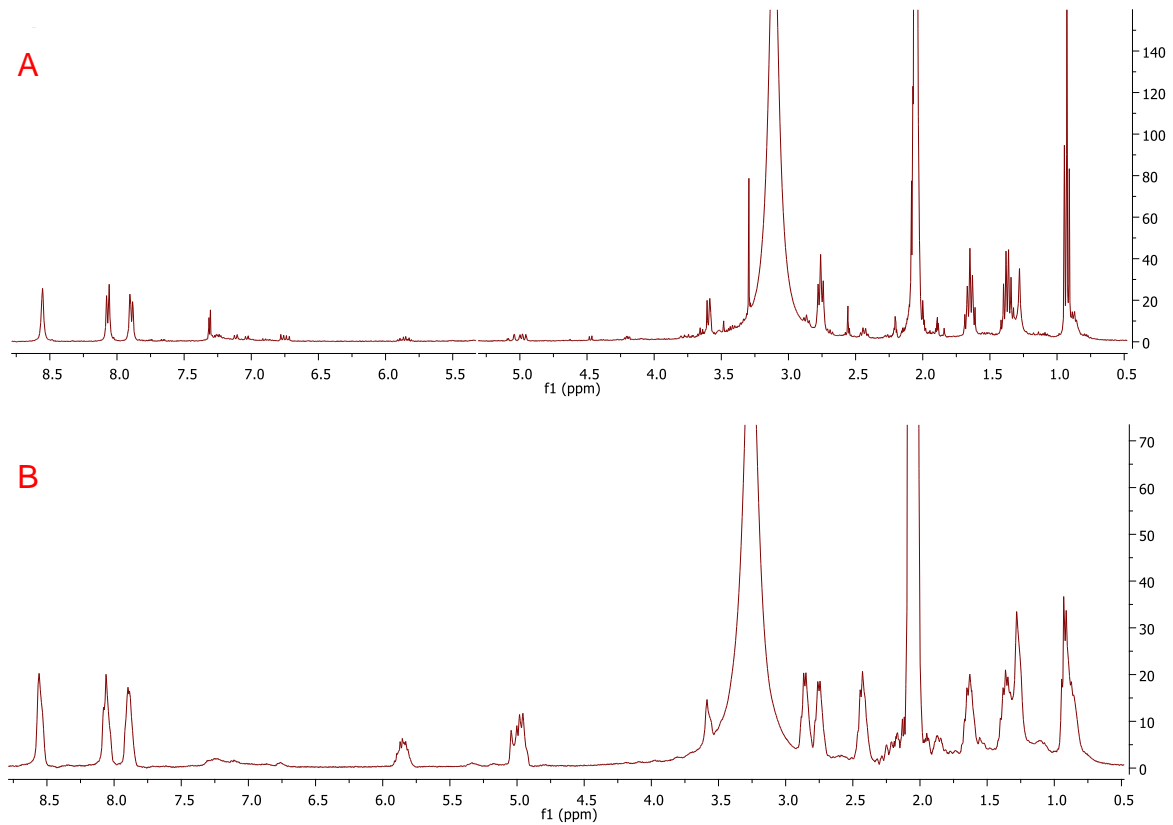


Figura 23: Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos AxFg7 e AxFg28. Em **(A)** na parte superior está o espectro de RMN de ^1H do extrato AxFg7 obtido em 400 MHz e solvente acetona- D_6 . Em **(B)** na parte inferior o RMN de ^1H do extrato AxFg28 obtido em 400 MHz e solvente acetona- D_6 . **Fonte:** o autor (2021).

Para o fungo *C. horii*, após 7 dias de crescimento o micélio apresentou uma coloração branca roseada na superfície do meio figura 24 **(A)**, nos tempos seguintes foram observados o aparecimento de pontos pretos e em 28 dias apresentou a aparência da figura 24 **(B)**.

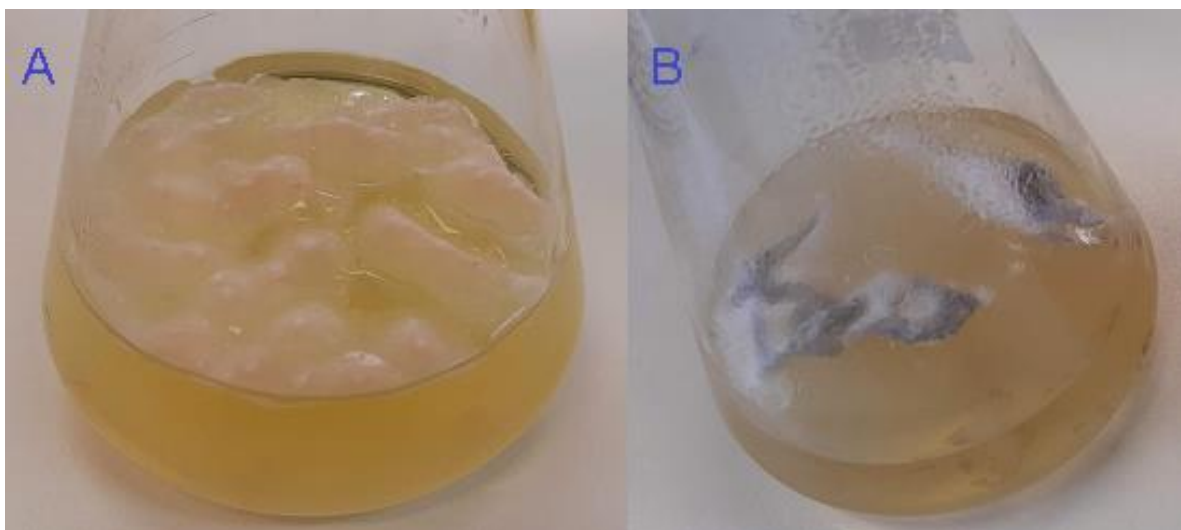


Figura 24. Foto do cultivo axênico do *C. horii* em 7 e 28 dias. A esquerda (**A**) no período de 7 dias de crescimento e na direita (**B**) 28 dias. **Fonte:** o autor (2021).

Através da análise de RMN de ^1H foram observados sinais poucos intensos em 7 dias de cultivo, sendo observado a presença de dois sinais de hidrogênios aromáticos: δ_{H} 6,71 (2H, d, $J=8,5$ Hz) e δ_{H} 7,05 (2H, d, $J=8,5$ Hz), referentes ao composto **3**. Nos demais tempos não foi observado o aparecimento de outros sinais, espectros mostrados na figura 25 (**A**) o espectro de RMN de ^1H de 7 dias e (**B**) de 28 dias.

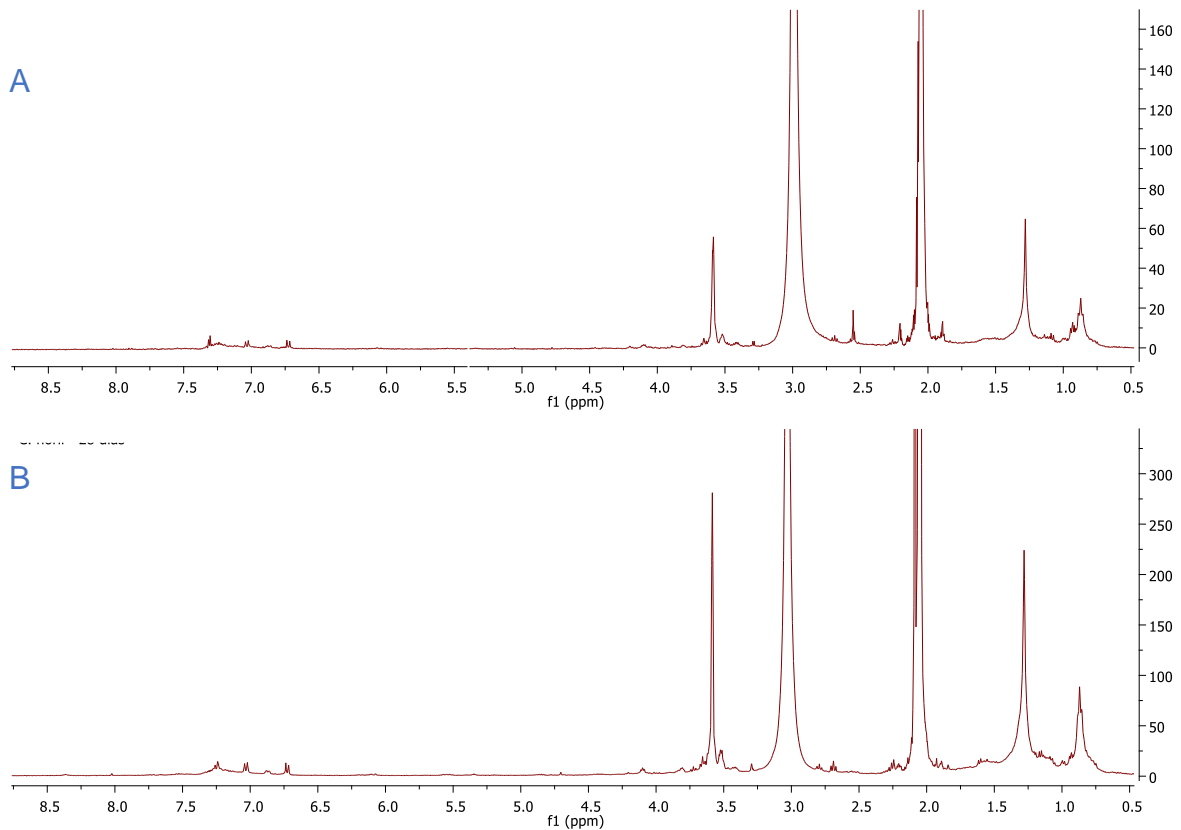


Figura 25: Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos AxCh7 e AxCh28. Em **(A)** na parte superior está o espectro de RMN de ^1H do extrato AxCh7 obtido em 400 MHz e solvente acetona- D_6 . Em **(B)** na parte inferior o RMN de ^1H do extrato AxCh28 realizado em 400 MHz e solvente acetona- D_6 . **Fonte:** o autor (2021).

Ambos os extratos de 28 dias dos dois fungos foram analisados e separados por HPLC-DAD e seus cromatogramas podem ser observados na figura 26, sendo **(A)** o extrato de AxFg28 em 270 nm e **(B)** o extrato AxCh28 em 222 nm.

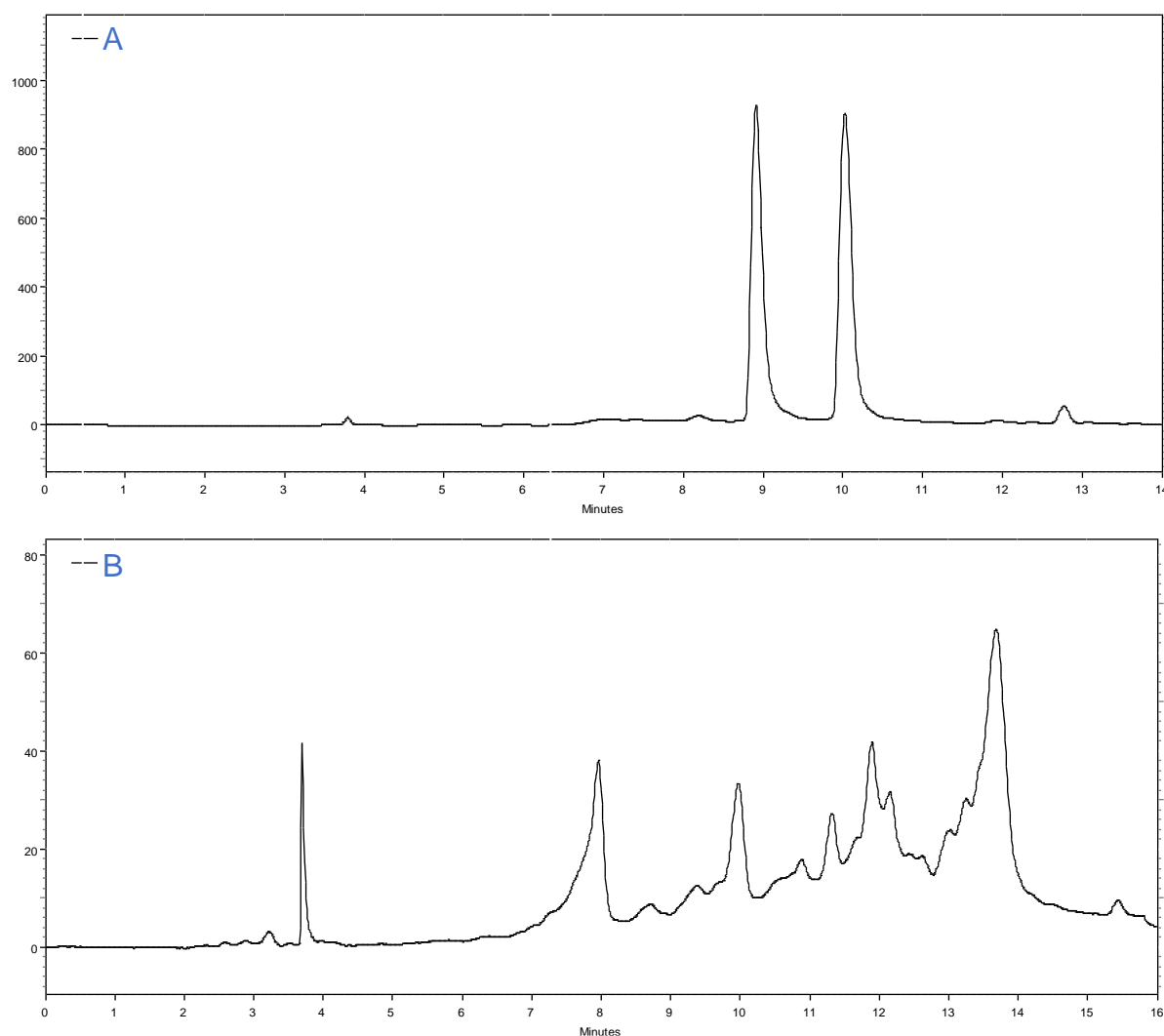


Figura 26. Cromatograma dos extratos obtidos dos cultivos axênicos de *F. guttiforme* e *C. horii* em 28 dias de cultivo; **A)** Extrato AxFg28. Coluna da Supelco RP-8 (10 μ m, 10 \times 250 mm) e taxa de fluxo de 4,0 mL.min⁻¹. O sistema de eluição foi composto por água e metanol 15 a 100% de MeOH, em 11 min, 100% de MeOH em de 11 a 13 min e 100 a 15% de MeOH de 13 a 14 min com detecção a 270 nm. **B)** Extrato AxCh28. Coluna da Supelco RP-8 (10 μ m, 10 \times 250 mm) e taxa de fluxo de 4,0 mL.min⁻¹. O sistema de eluição foi composto por água e metanol 15 a 100% de MeOH, em 13 min, 100% de MeOH de 13 a 15 min e 100 a 15% de MeOH de 15 a 16 min com detecção a 222 nm. **Fonte:** o autor (2021).

Analisando os espectros de RMN de ¹H e os cromatogramas dos dois extratos é possível comparar o perfil químico dos dois fungos. O cromatograma do extrato AxFg28 mostrou a presença de dois picos de maior intensidade em 8,91 e 10,03 min e seus fracionamentos indicaram que correspondem a dois compostos, respectivamente, ácido 9,10-desidrofusárico (**2**) e ácido fusárico (**1**), que foi evidenciado previamente no RMN de ¹H do extrato bruto. Outra característica destes

dois compostos evidenciada no cromatograma é a grande absorção no comprimento de onda de 270 nm. Seus espectros de absorção no UV podem ser observados na figura 27, em verde o espectro do ADF e em azul do AF. Esta absorção foi utilizada como guia para isolamentos futuros. Para o extrato AxCh28 é possível observar no cromatograma, figura 26 (B), picos de pequena intensidade o que já foi evidenciado no seu espectro de RMN de ^1H , não há a produção de um composto majoritário. O único composto identificado foi o eluído no pico em 7,89 min que é o tirosol (3).

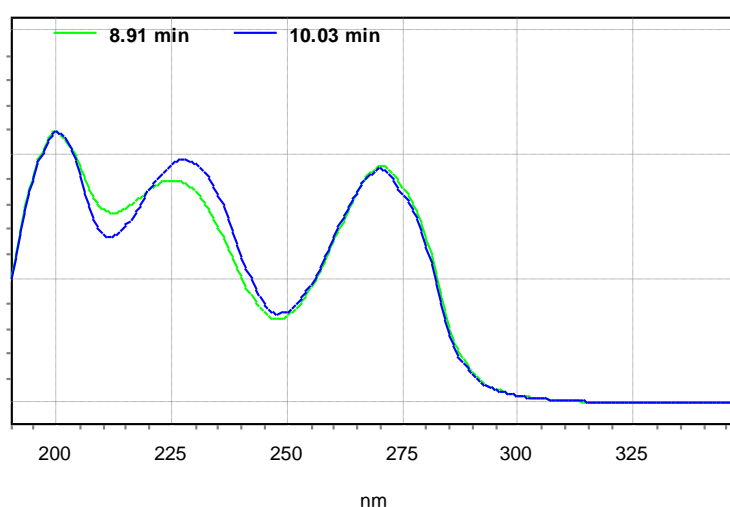


Figura 27. Espectro de absorção no UV dos compostos ácido fusárico e ácido 9,10-desidrofusárico. Em azul o espectro de absorção do composto ácido fusárico e em verde o espectro de absorção do ácido 9,10-desidrofusárico. **Fonte:** o autor (2021)

4.1.2 Cocultivo

O cocultivo em meio líquido PDB apresentou um crescimento micelial interessante evidenciado na figura 28. Nos primeiros 7 dias de crescimento o micélio apresentou coloração branca e roseada (A) semelhante ao cultivo do fungo *C. horii*. No período de 14 dias (B) apresentou com um volume maior de micélio e em 21 dias (C) foi observada uma coloração preta como constatado para *C. horii*. Contudo, em 28 dias de crescimento (D) o micélio apresentou uma coloração branca em toda sua superfície semelhante ao fungo *F. guttiforme*.

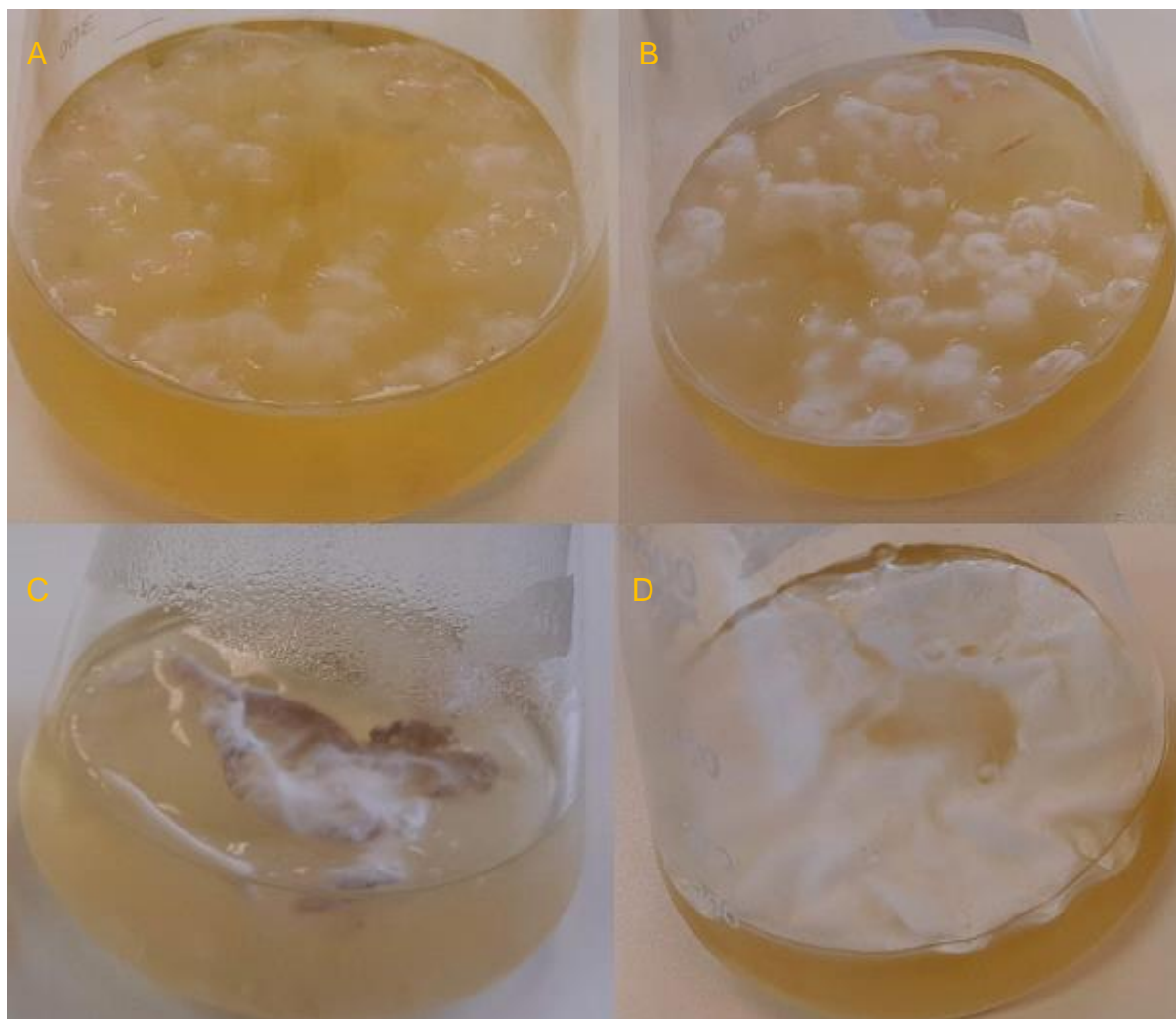


Figura 28. Fotos do cocultivo em escala reduzida de *F. guttiforme* e *C. horii* em 7, 14, 21 e 28 dias. Na parte superior esquerda (**A**) no período de 7 dias de crescimento, na parte superior direita (**B**) 14 dias, inferior esquerda (**C**) em 21 dias e na parte inferior direita (**D**) em 28 dias. **Fonte:** o autor (2021).

Os extratos foram analisados por RMN de ^1H e podem ser vistos na figura 29. No espectro foi possível observar sinais não existentes no cultivo axênico dos fungos, um sinal em 4,64 ppm indicando a presença de hidrogênios oximetilênicos e também a presença de sinais aromáticos com deslocamentos químicos diferentes do ácido fusárico indicando um novo composto o fusarinol (**4**), estas diferenças observadas em cada período de tempo são discutidas mais detalhadamente no item 4.1.3.

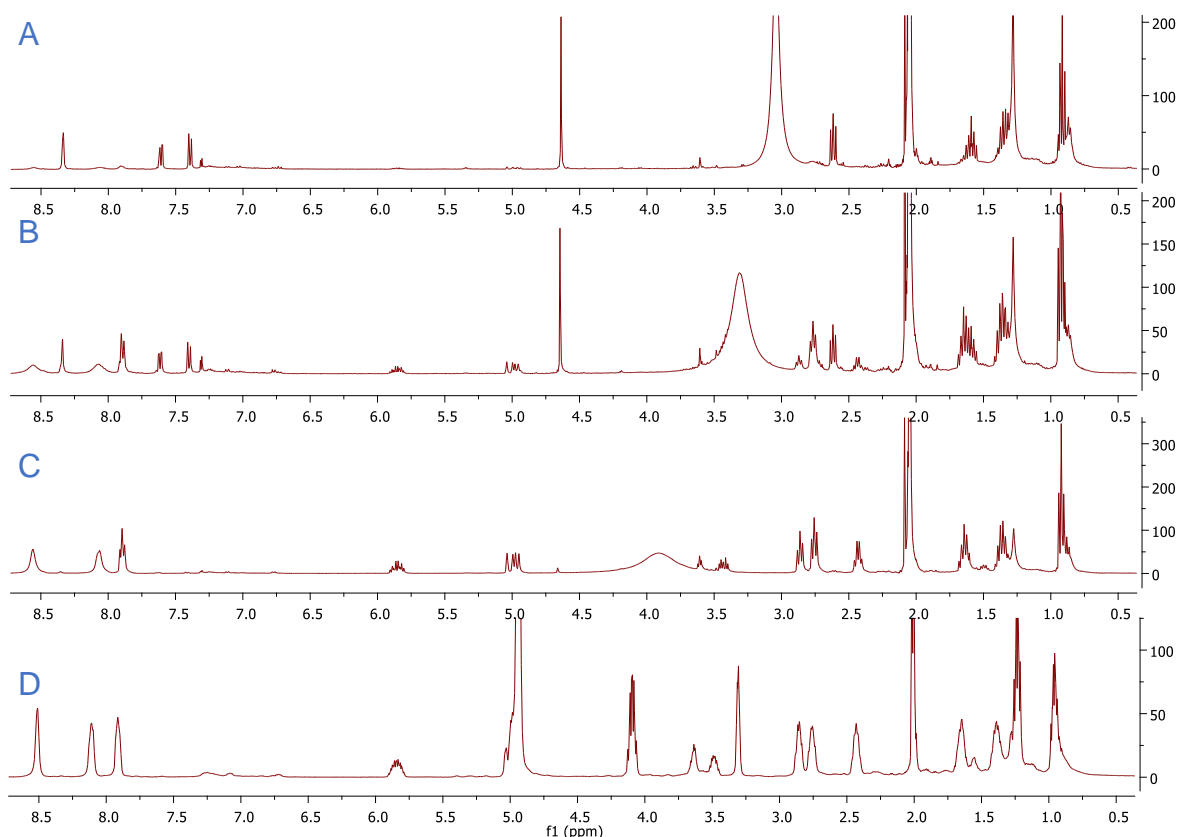


Figura 29: Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos de cocultivo em escala reduzida em 7, 14, 21 e 28 dias. **(A)** O espectro de RMN de ^1H do extrato CoR7 obtido em 400 MHz e solvente acetona- D_6 . **(B)** O espectro RMN de ^1H do extrato CoR14 obtido em 400 MHz e solvente acetona- D_6 . **(C)** O espectro RMN de ^1H do extrato CoR21 obtido em 400 MHz e solvente acetona- D_6 . **(D)** O espectro RMN de ^1H do extrato CoR28 obtido em 400 MHz e solvente CD_3OD . **Fonte:** o autor (2021).

Os extratos foram fracionados por CLV e na fração CoR7CLV5 foi observada a presença de fusarinol (**4**) que foi isolado por HPLC-DAD, figura 30, pico em 15,33 min. Nos demais extratos de 14, 21 e 28 dias as frações mais polares na CLV apresentaram majoritariamente a mistura de ácido fusárico (**1**) e ácido 9,10-desidrofusárico (**2**), evidenciado pelos sinais intensos destes compostos nos espectros de RMN de ^1H de seus extratos axênicos. A figura 31 mostra a fração CoR28CLV4 que apresentou a mistura de AF e ADF ilustrando como foram observados os fracionamentos dos demais dias.

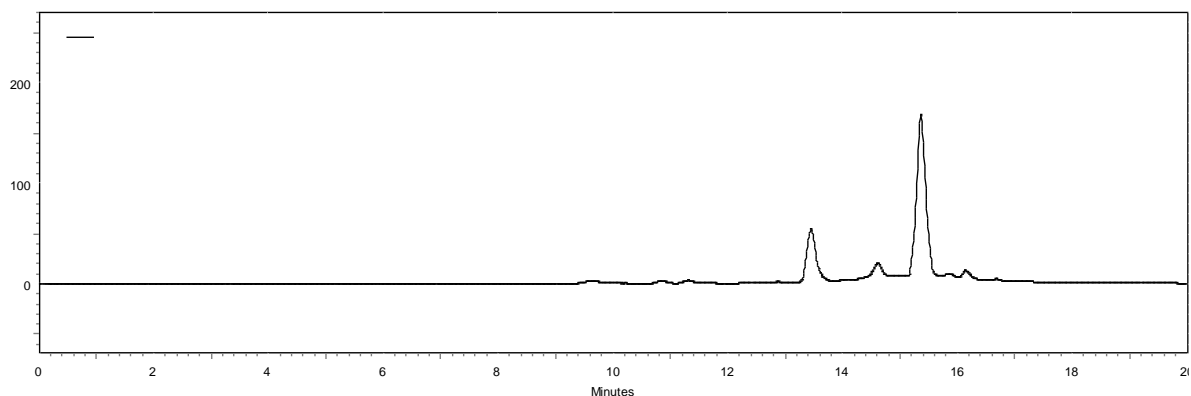


Figura 30. Cromatograma da fração CoR7CLV5 Coluna da Supelco RP-8 (10 μm , 10 x 250 mm) e taxa de fluxo de 4,0 mL.min⁻¹. O sistema de eluição foi composto por água e metanol (15 a 60% de MeOH, em 10 min, 100% de MeOH de 10 a 13 min, 30% de 13 a 17 min e detecção a 270 nm). Frações coletadas CoR7CLV5p1 (13,5 min), CoR7CLV5p2 (14,6 min) e CoR7CLV5p3 (15,33 min). **Fonte:** o autor (2021).

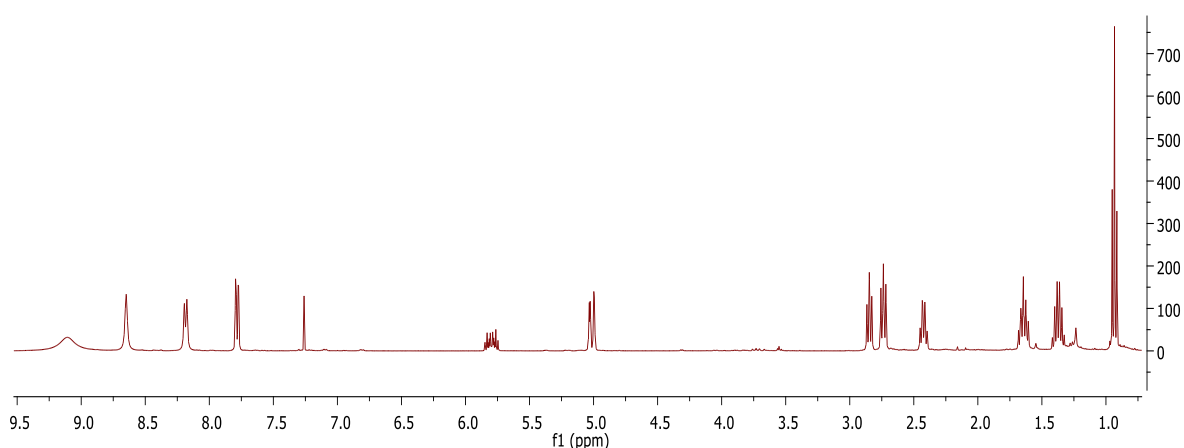


Figura 31. Espectro de RMN de ¹H da fração CoR28CLV4 (400MHz em CD₃OD).

Os compostos foram separados por HPLC-DAD obtendo-se três picos CoR28CLV4p1 (3,89 min), CoR28CLV4p2 (9,23 min) e CoR28CLV4p3 (12,09 min) como mostrado no cromatograma na figura 32. Os compostos CoR28CLV4p2 e CoR28CLV4p3 correspondem a ADF e AF, respectivamente.

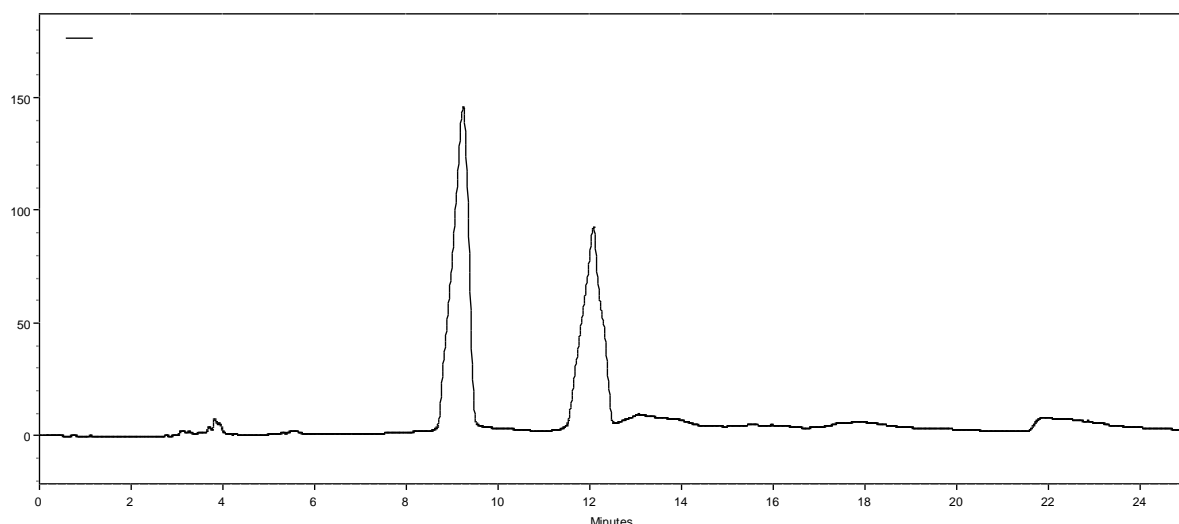


Figura 32. Cromatograma da fração CoR28CLV4. Coluna da Supelco RP-8 (10 μ m, 10 \times 250 mm) e taxa de fluxo de 4,0 mL.min⁻¹. O sistema de eluição foi composto por água e metanol (15 a 50% de MeOH, em 22 min, 15% de MeOH em de 22 a 25 min e detecção a 270 nm. Frações coletadas CoR28CLV4p1 (3,89 min), CoR28CLV4p2 (9,23 min) e CoR28CLV4p3 (12,09 min). **Fonte:** o autor (2021).

A fração CoR28CLV5 apresentou mistura de 4 compostos sendo dois deles o AF e ADF. A separação no HPLC-DAD levou ao isolamento destes compostos com tempo de retenção de 4,16 min e 5,37 min respectivamente. Também foram isolados outros dois compostos com tempo de retenção 5,81 e 6,87 min, o espectro destes dois compostos mostraram-se semelhante aos do AF e ADF como observado na figura 33. Após análises de espectrometria de massas sugeriu-se a estrutura de um complexo de ácido 9,10-desidrofusárico com magnésio (**6**) e um de ácido fusárico com magnésio (**5**), respectivamente. O composto **5** também foi isolado em 14 dias de cocultivo a partir da fração CoR14CLV6 e ambos os compostos **5** e **6** foram observados em 21 dias de cocultivo.

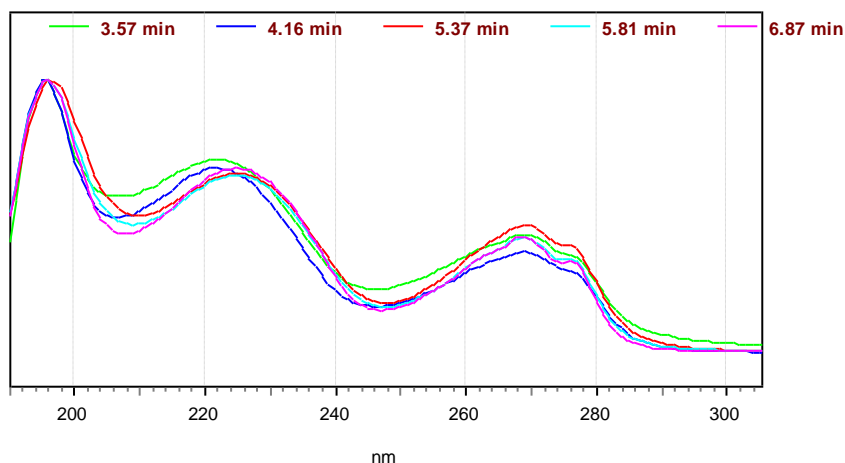


Figura 33. Espectro de absorção no UV dos compostos observados na fração CoR28CLV5. Em verde um sinal de pequena intensidade que não foi identificado, azul o espectro de absorção do composto ácido 9,10-desidrofusárico, em vermelho o espectro de absorção do ácido fusárico, em azul claro o espectro de absorção do complexo de ácido 9,10-desidrofusárico com magnésio, em rosa o espectro de absorção do complexo de ácido fusárico com magnésio. **Fonte:** o autor (2021)

Nas frações apolares não foram obtidas massas e evidências nos espectros de RMN de ^1H que justificassem a continuação de seus fracionamentos. Nelas também foram observados a presença de ftalato e outras pequenas impurezas.

4.1.3 Comparação do perfil químico dos extratos obtidos em escala reduzida

Os extratos obtidos de cocultivo e de cultivo axênico dos dois fungos em meio PDB foram analisados por RMN de ^1H e foram comparados entre si em cada intervalo de tempo. A partir dos espectros de cocultivo foi possível observar diferenças metabólicas nos extratos de 7 e 14 dias pelo aparecimento de 4 sinais bem intensos, que não são observados nos cultivos axênicos e que podem ser observados na figura 34 (A) indicados pelas setas e círculo roxo. Dentre eles observam-se 3 hidrogênios típicos do núcleo piridínico com deslocamentos químicos diferentes dos do ácido fusárico (sinais com menores deslocamentos químicos): δ_{H} 7,39 (1H, d, $J= 8,0$ Hz), δ_{H} 7,60 (1H, dd, $J=2,2; 8,0$ Hz) e δ_{H} 8,33 (1H, d, $J= 2,2$ Hz). Também se observou um sinal em δ_{H} 4,64 (2H, s) que pode ser atribuído a hidrogênios oximetilênicos podendo caracterizar fusarinol (4). Os traçados em preto indicam os hidrogênios piridínicos

referentes ao AF presente tanto no extrato de cocultivo por 7 dias, em baixa intensidade, (A) quanto no cultivo axênico *F. guttiforme* (C) discutido anteriormente.

Outra observação para o espectro de RMN de ^1H no período de 7 dias de cocultivo é a baixa intensidade de sinais de ácido fusárico que pode ser muito bem evidenciado no espectro de seu cultivo axênico. O ácido fusárico é um composto conhecido por sua alta atividade antibacteriana, foram relatados valores de concentração mínima inibitória menor que $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para diversas bactérias como *Acidovorax avenae*, *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus roseus* e *Streptococcus mutans* (CRUTCHER et al. 2017) e valores de $64 \mu\text{M}$ *Lactobacillus acidophilus* e *Escherichia coli* (SONDERGAARD et al., 2016), também foram relatadas atividades antifúngicas (CRUTCHER et al. 2017). Estas altas atividades antimicrobianas de AF poderiam sugerir que o fungo *C. horii* estaria convertendo ácido fusárico a fusarinol num processo de destoxificação. Foi relatado por Zhang e colaboradores (2021) que o grupo carboxila do núcleo piridínico é essencial para atividade antimicrobiana do ácido fusárico e análogos ao estudarem a relação estrutura e atividade frente a bactérias (ZHANG et al., 2021).

CRUTCHER e colaboradores (2014 e 2017) realizaram estudos de destoxificação de micro-organismos resistentes a ácido fusárico e os compostos obtidos foram testados quanto às suas fitotoxicidades. Foram obtidos derivados de ácido fusárico que apresentaram menor fitotoxicidade dentre eles o fusarinol (4), além de outros compostos hidroxilados (CRUTCHER et al., 2014 e 2017). Esses estudos sustentam a ideia de uma reação de destoxificação pelo *C. horii*.

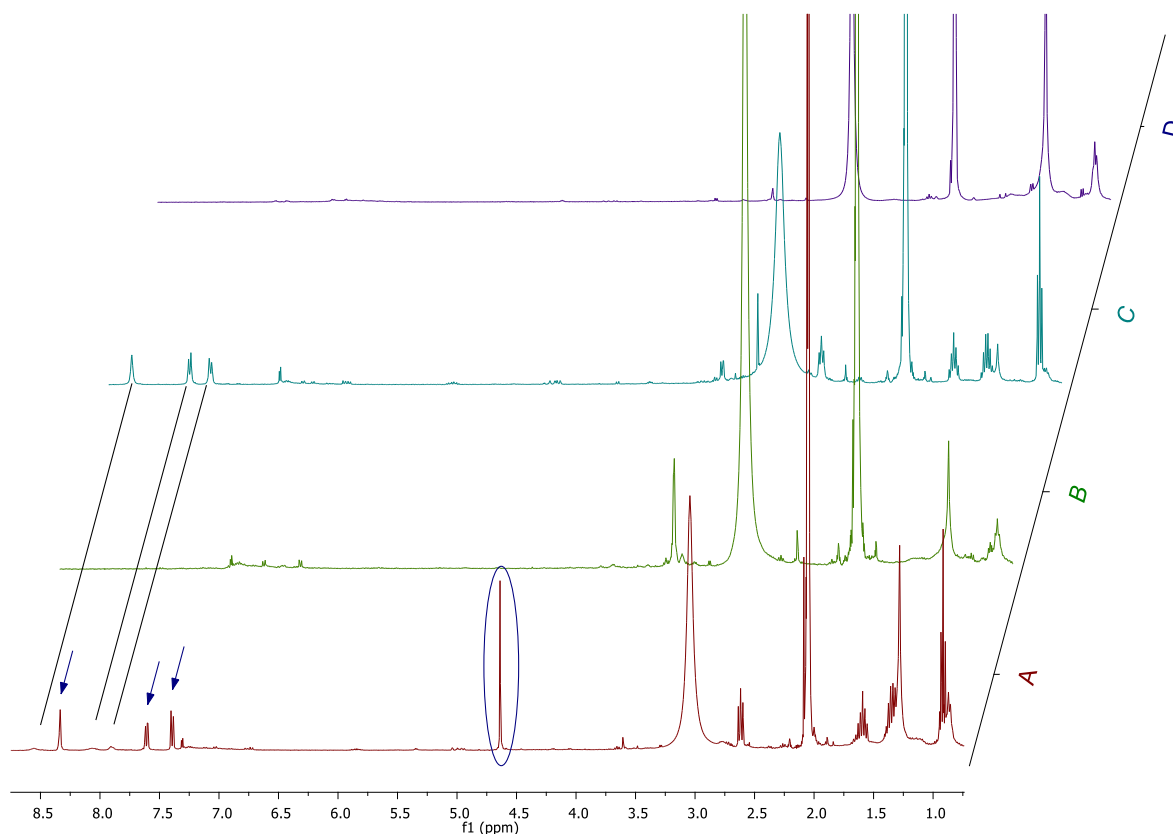


Figura 34. Diferenças observadas nos cultivos em 7 dias (acetona- D_6 em 400 MHz). (A) Espectro de RMN de 1H do extrato CoR7; (B) Espectro de RMN de 1H do extrato AxCh7; (C) Espectro de RMN de 1H do extrato AxFg7; (D) Espectro de RMN de 1H do branco do meio PDB. Fonte: o autor (2021)

A fração CoR7CLV4 proveniente do extrato de cocultivo de 7 dias foi separada por HPLC e foram obtidos 1,7 mg de fusarinol. Dessa forma, com o objetivo de obter uma maior massa do composto e para confirmar a biotransformação foram realizados os ensaios de biotransformação de ácido fusárico pelos dois fungos.

O espectro de RMN de 1H de 14 dias de cocultivo, figura 35 (A), indica a presença de uma mistura de ácido fusárico, ácido 9,10- desidrofusárico e fusarinol, que podem ser observados por seus sinais característicos. O ADF é observado pelos sinais vinílicos em 4,98 e 5,84 ppm e os sinais de hidrogênios piridínicos desblindado com deslocamento químico em 8,56, 8,07 e 7,89 ppm. Estes sinais de hidrogênios piridínicos também pertencem ao composto AF e a confirmação da mistura dos dois ácidos é indicada pela diferença de integração entre esses sinais e os da ligação dupla. Já a presença do fusarinol é observada pela presença de hidrogênios piridínicos mais blindados com deslocamento em 7,39, 7,60 e 8,33 ppm, confirmando

a ausência de carboxila e pelos hidrogênios oximetilênicos em 4,64 ppm integrando para 2H alfa ao nitrogênio.

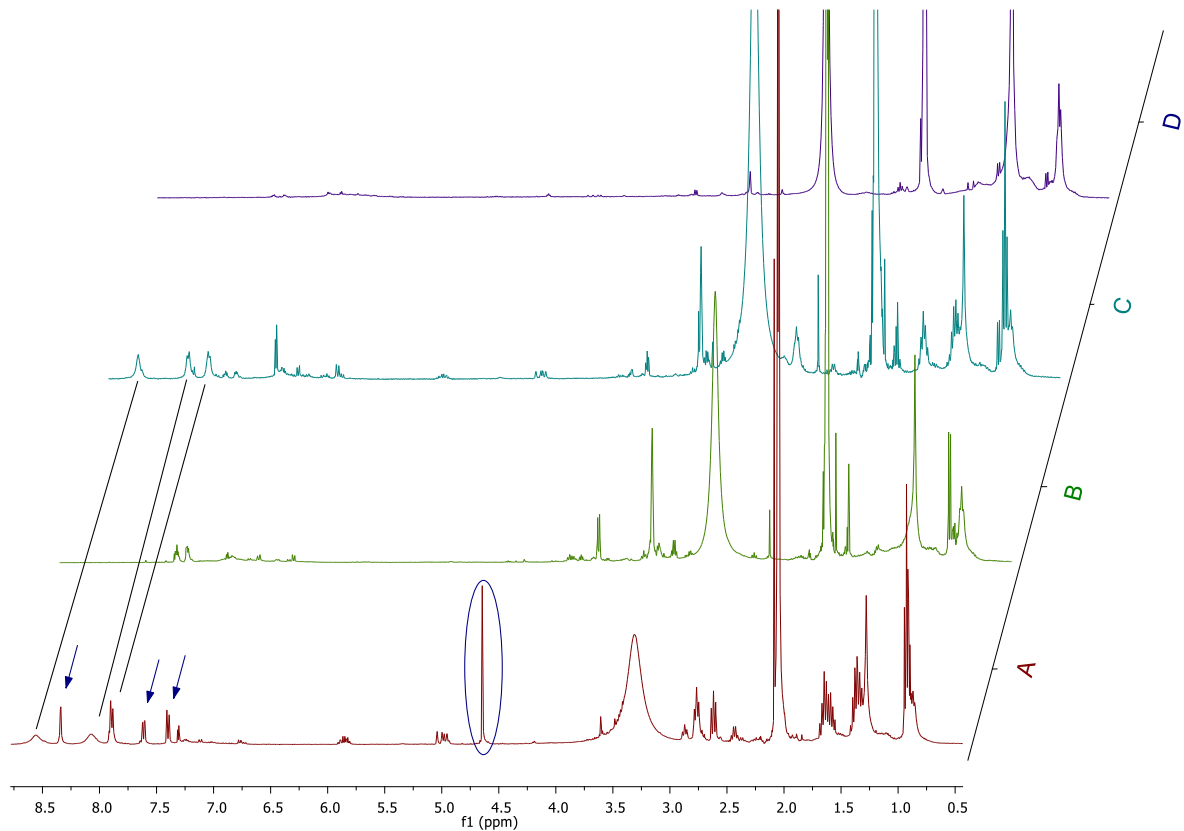


Figura 35. Diferenças dos sinais obtidos nos cultivos em 14 dias (acetona -D₆ em 400 MHz). **(A)** Espectro de RMN de ¹H do extrato CoR7; **(B)** Espectro de RMN de ¹H do extrato AxCh7; **(C)** Espectro de RMN de ¹H do extrato AxFg7; **(D)** Espectro de RMN de ¹H do branco do meio PDB. Fonte: o autor (2021) **Fonte:** o autor (2021).

Outros dois importantes fatores observados no cocultivo são que a partir de 14 dias não foi mais observada a presença de fusarinol, visualizado na figura 29 **(C)** e **(D)**, indicando que o aumento da concentração de ácido fusárico poderia ter inibido o crescimento do *C. horii*, resultando na convergência do perfil metabólico de 21 e 28 dias semelhantes ao perfil químico do fungo *F. guttiforme*. Outro fator observado é a ausência de fusarinol em 21 e 28 dias de cocultivo indicando que ele foi possivelmente oxidado novamente a ácido fusárico, porém, o fusarinol não faz parte da rota biosintética de ácido fusárico que utiliza L- aspartato como precursor para sua formação (STUDT et al. 2016). O fungo *F. guttiforme* foi cultivado na presença de fusarinol, contudo não foi observada nenhuma variação da quantidade de fusarinol ou produção de outro composto, portanto este dado não foi apresentado. O

fracionamento dos extratos de 14, 21 e 28 dias mostrou a presença de outros dois compostos derivados de AF e ADF complexado com magnésio o que também não foi observado no cultivo axênico.

Esta condição de cocultivo de 28 dias em meio PDB foi realizada anteriormente por outro membro do grupo e o extrato obtido apresentou majoritariamente a mistura de ácido fusárico e ácido 9,10-desidrofusarico que foi testado quanto sua atividade inibitória de enzima e atividade antimicrobiana (SILVA et al., 2020). Desta forma, para acessar produção do AF e ADF em maiores quantidades estas condições foram repetidas em larga escala.

4.2 Análise dos extratos brutos obtidos em larga escala

4.2.1 Meio PDB

Após o período de 28 dias de crescimento dos fungos, constatou-se que o micélio cobriu toda a superfície do meio líquido do Erlenmeyer, como observado na figura 36, apresentando coloração branca e superfície irregular em todos os 36 Erlenmeyers.



Figura 36. Foto do cocultivo após 28 dias de crescimento no meio PDB.
Fonte: o autor (2021).

O extrato CoLP28 e branco do meio foram analisados por RMN ^1H , observados na figura 37. No espectro do extrato é possível observar os 3 sinais hidrogênios característicos de um núcleo piridínico em δ_{H} 7,91, 8,07 e 8,56 ppm referentes aos compostos **1** e **2** e os três sinais de hidrogênios vinílicos em δ_{H} 4,97, 5,02 e 5,86 ppm característicos do composto **2** como discutido anteriormente no item 4.1.1. Estes compostos foram os majoritários no extrato e ao amplificar os sinais do espectro foi observado pequenos sinais de compostos minoritários que não foram observados no espectro do branco e, portanto, foi realizado o fracionamento do extrato.

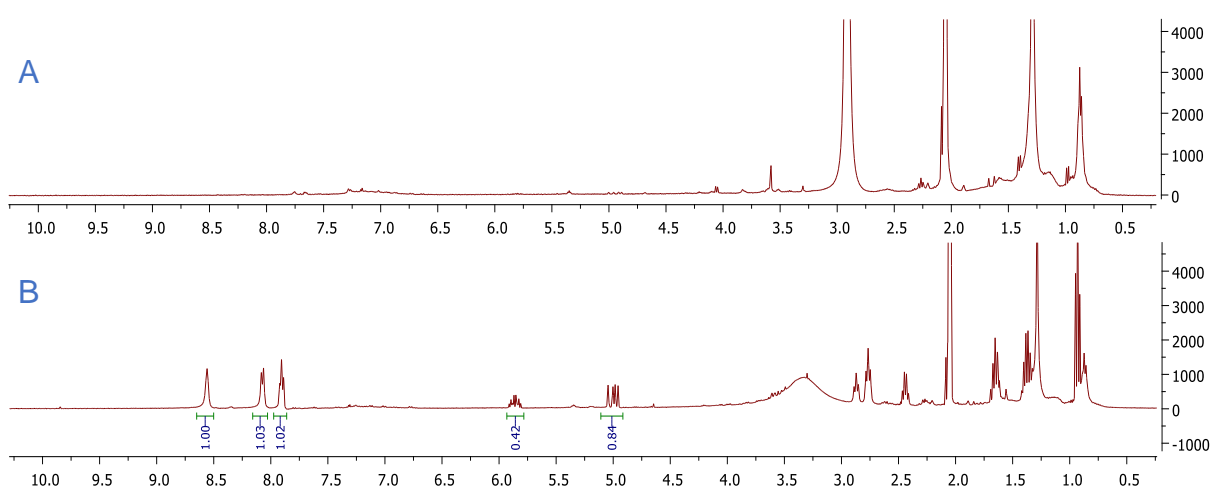


Figura 37. Espectro de RMN de ^1H do extrato CoLP28 e do controle em meio PDB (acetona - D_6 em 400 MHz). Na parte superior (**A**), espectro de RMN de ^1H do branco do meio de cultivo. Na parte inferior (**B**), espectro de RMN de ^1H do extrato CoLP28. **Fonte:** o autor (2021)

Após sucessivos fracionamentos por coluna de exclusão e adsorção foram obtidas apenas duas frações interessantes: a fração CoLP28.1.1.6 e CoLP28.2.4. Estas frações apresentaram maior polaridade e foram removidas da coluna de adsorção utilizando metanol.

A fração CoLP28.2.4 apresentou a mistura dos compostos ácido fusárico e ácido 9,10-desidrofusárico como na fração CoR28CLV4 e, portanto, foi realizado o mesmo método de separação como descrito no item 3.2.9.2. A fração CoLP28.1.1.6 apresentou a presença dos complexos de AF e ADF com magnésio, que foram identificados por espectrometria de massas.

Outras frações com compostos interessantes foram as CoLP28.1.1.4.A, CoLP28.1.1.4.B e CoLP28.1.1.4.D que apresentaram semelhantes de acordo com análise por CCD e RMN de ^1H . A fração CoLP28.1.1.4.B com maior pureza seu espectro mostrou sinais referente a uma lactona de 5 membros. A partir das análises de CG/MS e RMN de ^1H foi possível atribuir o composto **7** como 5-butil-5-(hidroximetil)diidrofuranona.

4.2.2 Meio Czapek

O cocultivo em meio Czapek apresentou o micélio do fungo semelhante ao do meio PDB após os 28 dias uma coloração branca e superfície irregular em todos os 36 Erlenmeyers, como mostrado na figura 38 a seguir.



Figura 38. Foto do cocultivo após 28 dias de crescimento no meio Czapek. **Fonte:** o autor (2021).

Assim como para o meio PDB, o extrato CoLC28 e do branco do meio de cultivo foram levados para análise de RMN de ^1H , visualizado na figura 37.

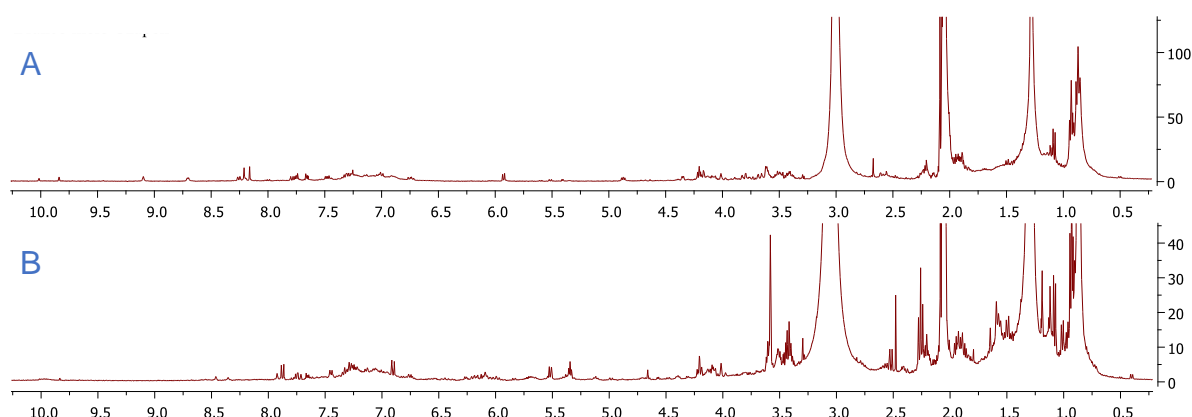


Figura 39. Espectros de RMN de ^1H do extrato CoLC28 e do controle em meio PDB (acetona $-\text{D}_6$ em 400 MHz). Na parte superior (A) o espectro de RMN de ^1H do branco do meio de cultivo. Na parte inferior (B) o espectro de RMN de ^1H do extrato CoLC28. **Fonte:** o autor (2021).

Analisando o espectro de RMN de ^1H do branco do meio, é possível observar uma grande complexidade do meio de cultivo e ao comparar com o espectro do extrato nota-se que o extrato se apresentou ainda mais complexo. Dentre eles, é possível destacar alguns como sinais dupletos na região do aromático, sinais entre 5,25 e 5,60 ppm, entre 2,25 e 2,60 ppm, entre 1,5 e 2,0 ppm e sinais dupletos intensos próximos de 1,0 ppm. Este extrato foi analisado por HPLC-DAD, cromatograma mostrado na figura 40

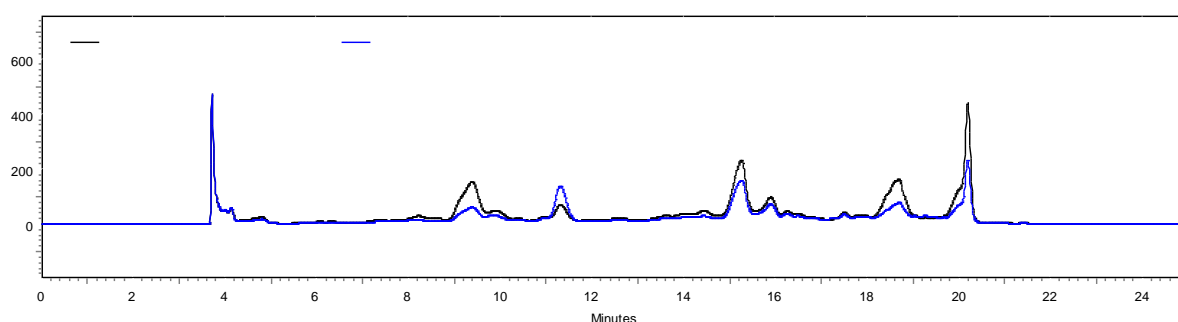


Figura 40. Cromatograma da fração CoLC28. Coluna da Supelco RP-8 ($10\ \mu\text{m}$, $10\ \times\ 250\ \text{mm}$). taxa de fluxo de $4,0\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O sistema de eluição foi composto por água e metanol (15 a 100% de MeOH, em 20 min, 100% de MeOH em de 22 a 22 min e de 100 a 15% de 22 a 25min detecção a 254 nm em azul e 270 nm em preto. Frações coletadas CoLC28p1 (3,95 min), CoLC28p2 (4,0-8,8 min), CoLC28p3 (9,2 min), CoLC28p4 (9,8 min), CoLC28p5 (11,0 min), CoLC28p6 (12-15 min), CoLC28p7 (15,2 min), CoLC28p8 (16-18 min), CoLC28p9 (18,5 min), CoLC28p10 (20 min). **Fonte:** o autor (2021).

O fracionamento resultou em 10 frações denominadas CoLC28p1 a CoLC28p10 que foram analisadas por RMN de ^1H . As frações CoLC28p1 e CoLC28p3 apresentaram-se mais puras e foi possível identificá-los sendo a primeira, o composto **8**, a uracila e a segunda, o composto **9**, a *p*-hidroxiacetofenona.

A fração CoLC28p4 foi caracterizada como uma mistura de duas dicetopiperazinas derivadas de aminoácidos não aromáticos observados por seus sinais de hidrogênios característicos, quatro dupletos em 0,93, 0,95, 0,97 e 1,09 ppm referentes a grupos metílicos, os sinais entre 1,8 e 2,4 e 3,1 e 3,6 ppm que são característicos da porção prolina. Também foram observados um simpleto em 2,53 ppm e dois dupletos em 6,84 e 7,89 ppm referentes à *p*-hidroxiacetofenona (**6**) e sinais pouco intensos que são característicos do composto ácido fusárico (**1**), espectro mostrado na figura 41.

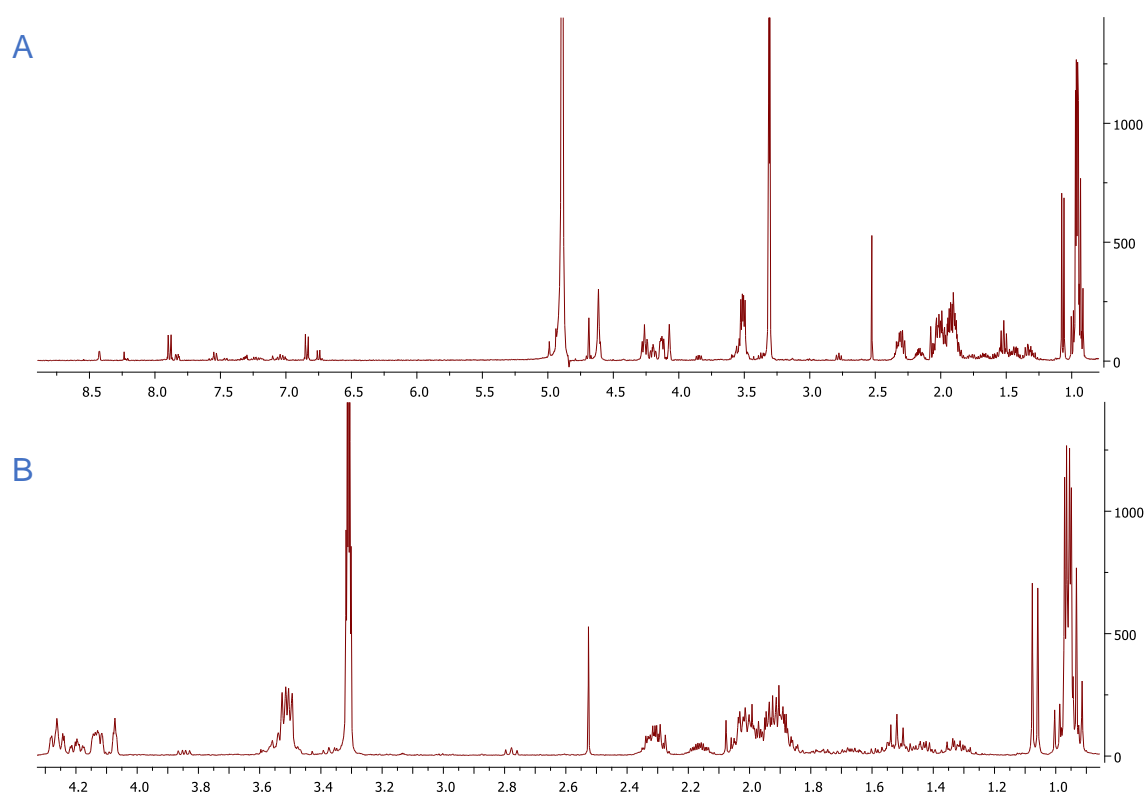


Figura 41. Espectro de RMN de ^1H da fração CoLC28p4 (CD_3OD em 400 MHz). Na parte superior (A) o espectro de RMN de ^1H da fração CoLC28p4. Na parte inferior (B) o espectro de RMN de ^1H ampliado. **Fonte:** o autor (2021).

Uma pequena quantidade da amostra foi analisada por CG/EM e o restante foi separado por HPLC. O fracionamento resultou no isolamento apenas da dicetopiperazina ciclo prolina-leucina (**10**)

O espectro de RMN de ^1H da fração CoLC28p8 apresentou sinais hidrogênios de duplas conjugadas entre si e a um grupo possivelmente ácido carboxílico. Também foram observados 3 sinais de hidrogênios ligados a um carbono ligado a hidroxila e outros sinais indicando a presença de uma grande cadeia lateral. A fração foi analisada por CG-EM e foram observados fragmentos menores que 241. Não foi possível isolar o composto por HPLC-DAD e não sendo possível chegar a uma proposta para a estrutura e por isso seu espectro não foi apresentado. CoLC28p10 apresentou composto semelhante ao CoLC28p8, contudo não havia a presença de sinais de hidrogênios instaurados no espectro de RMN de ^1H , sendo um ácido com uma grande cadeia apresentando hidroxilas. Esta fração também não foi purificada, e assim foi possível propor sua estrutura.

As demais frações apresentam como mistura de compostos com polaridade semelhantes e não foi possível suas separações e identificações.

4.2.3 Avaliação do perfil químico dos extratos em meios de cultivo diferentes

Com o objetivo de atingir rotas biossintéticas diferentes e obter uma variedade metabólica foi realizado o cocultivo em dois meios diferentes, PDB e Czapek em larga escala. Sabe-se que o meio de cultivo impacta diretamente no desenvolvimento dos fungos, as fontes de carbono são utilizadas como fonte de energia e para o crescimento micelial (RUIZ et al., 2010; SINGH et al., 2017; PAN, et al., 2019). Isso foi observado no cocultivo em dois meios diferentes. No meio PDB em 14 dias o micélio não havia coberto toda a superfície do meio como observado na figura 42 (**A**), sendo necessários 28 dias para atingir toda a extensão. Já no meio Czapek, em 14 dias já foi suficiente para o corpo micelial cobrir toda a superfície, como mostrado na figura 42 (**B**), o micélio não apresentou diferenças visuais entre os tempos de 14 até 28 dias de crescimento.



Figura 42. Fotos mostrando o crescimento micelial do cocultivo em meio PDB (A) e Czapek (B) em 14 dias. **Fonte:** o autor

Além do efeito no crescimento micelial, o meio também tem influência no metabolismo, diferentes fontes de carbono e nitrogênio geram metabólitos diferentes. A fonte de nitrogênio é necessária para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos e, também para unidades contendo nitrogênio para no metabolismo secundário (RUIZ et al., 2010; SINGH et al., 2017; PAN et al., 2019).

Comparando os espectros de RMN de ^1H , figura 43, e cromatogramas obtidos no HPLC-DAD num mesmo método de injeção, figura 44 e 45, é possível observar que no meio PDB obtiveram-se dois compostos majoritários o ácido fusárico (1) e ácido 9,10 desidrofusárico (2) que tiveram um tempo de retenção de 4,8 e 5,8 min respectivamente. Neste meio, sinais menos intensos no espectro de RMN de ^1H indicam a presença de outros compostos, contudo o fracionamento não resultou no isolamento destes minoritários com exceção da 5-butil-5-(hidroximetil)diidrofuranona (7) e dos complexos de AF e ADF como magnésio. No meio Czapek não foi observado

predomínio dos dois ácidos, no espectro figura 43 (B) não foram visualizados sinais característicos do núcleo piridínico, assim como no cromatograma figura 45, não foi observado pico com tempo de retenção semelhante e que apresentasse absorção em 270 nm. A única evidência da presença de ácido fusárico neste meio foi na fração CoLC28p4 que apresentou majoritariamente dicetopiperazinas, *p*-hidroxiacetofenona e uma quantidade quase indetectável de ácido fusárico. No meio Czapek tanto no espectro de RMN de ^1H , figura 43 (B) quanto no cromatograma, figura 45, é possível observar diversidade maior de metabólitos e de perfil completamente diferente do observado no meio PDB.

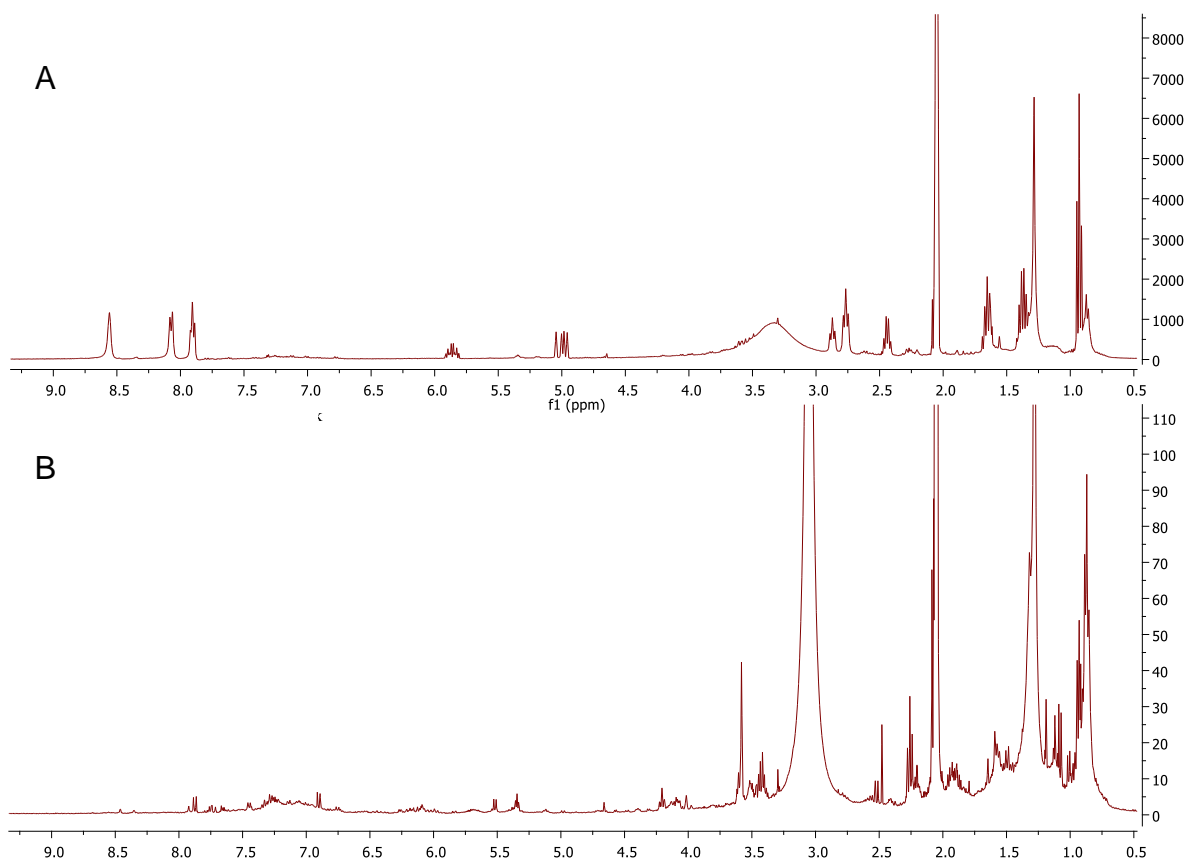


Figura 43. Espectros de RMN de ^1H do extrato CoLP28 e CoLC28 (acetona $-\text{D}_6$ em 400 MHz). Na parte superior (A) o espectro de RMN de ^1H da fração CoLP28. Na parte inferior (B) o espectro de RMN de ^1H ampliado CoLC28. **Fonte:** o autor (2021).

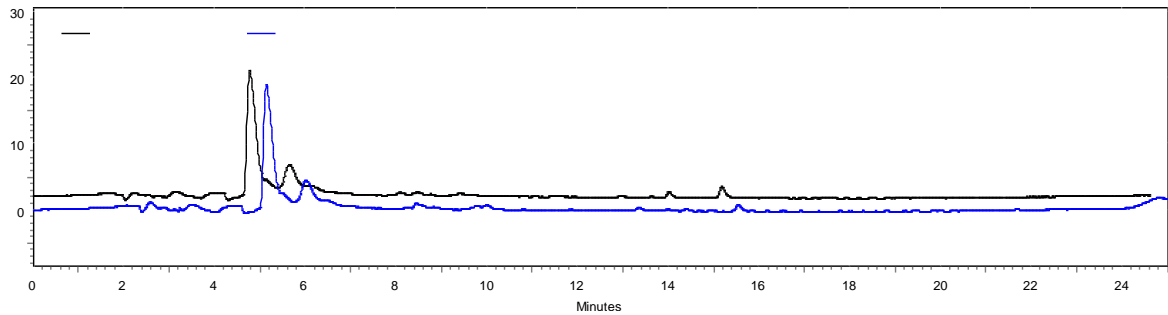


Figura 44. Cromatograma da fração CoLP28. Coluna da Supelco C-8 (25 cm x 4,6 mm, 5 μ m) taxa de fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. O sistema de eluição foi composto por água e acetonitrila (15 a 100% de ACN, em 20 min, 100% de ACN em de 20 a 22 min e de 100 a 15% de 22 a 25min detecção a 270 nm em preto e 210 nm em azul. **Fonte:** o autor (2021).

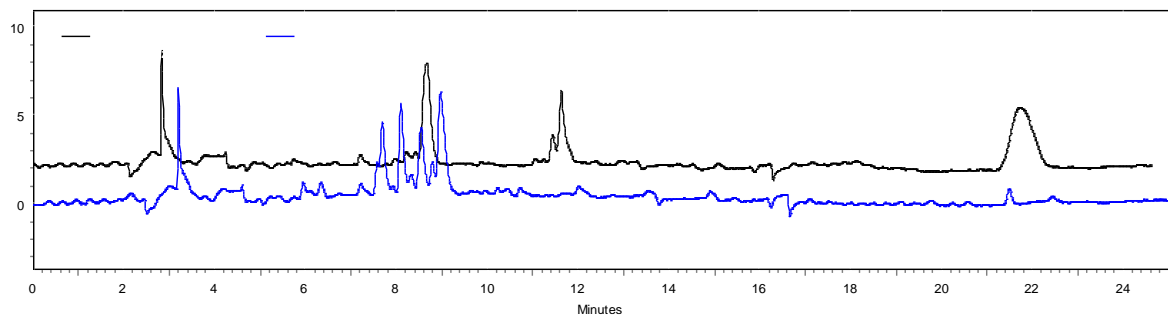


Figura 45. Cromatograma da fração CoLC28. Coluna da Supelco C-8 (25 cm x 4,6 mm, 5 μ m) taxa de fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. O sistema de eluição foi composto por água e acetonitrila (15 a 100% de ACN, em 20 min, 100% de ACN em de 20 a 22 min e de 100 a 15% de 22 a 25min detecção a 270 nm em preto e 210 nm em azul. **Fonte:** o autor (2021).

A partir destes dados pode-se concluir que a utilização de meios diferentes, com nutrientes diferentes, favoreceu a produção de metabólicos completamente diferentes nos dois meios.

4.3 Interação entre fungos

O experimento de interações fúngicas ocorreu por 11 dias quando foi observado o maior crescimento das placas contendo os fungos isolados (controle), mostrado na figura 46. O *Colletotrichum* (primeira coluna) cresceu em aproximadamente metade da placa enquanto o *Fusarium* (segunda coluna) cresceu na maior parte da placa. Já no cocultivo (terceira coluna), ambos os fungos cresceram

em menor proporção quando comparados ao controle. É importante observar que no final do experimento os fungos não se tocam, sugerindo um tipo de interação chamada inibição a distância. Este tipo de interação sugere a liberação de um ou mais compostos antifúngicos por um dos fungos presentes (BERTRAND et al., 2014).

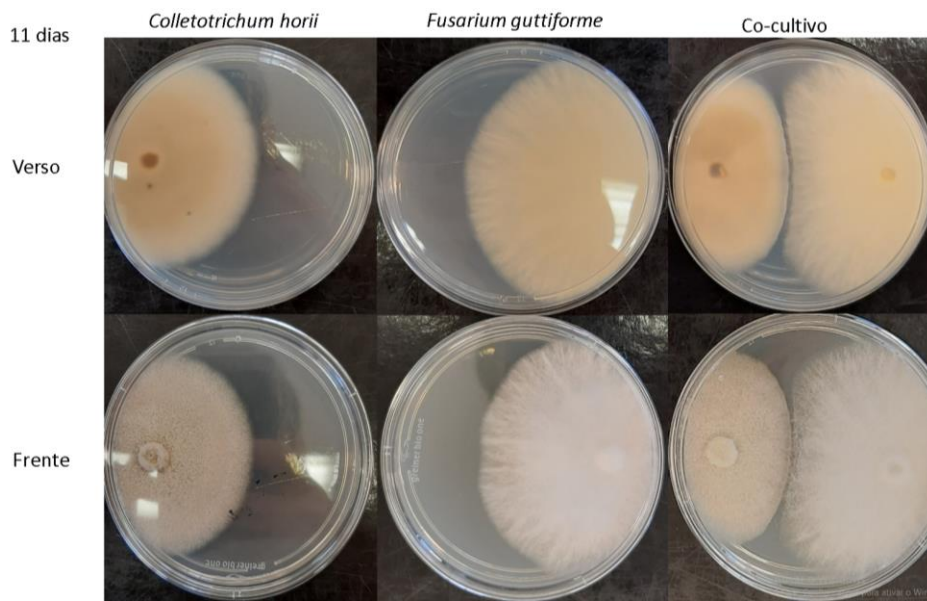


Figura 46. Foto do experimento de interações morfológicas entre os fungos *Fusarium guttiforme* e *Colletotrichum horii*. **Fonte:** o autor (2021).

4.4 Concentração inibitória mínima (CIM)

Como descrito anteriormente o ácido fusárico apresenta grande atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de fungos e bactérias em concentrações muito pequenas. Dessa forma, antes de realizar os experimentos de biotransformação foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) do ácido fusárico frente aos dois fungos estudados para se ter uma referência de concentração segura para realização do experimento.

A figura 47 mostra o crescimento dos fungos em cada concentração, e na tabela 5 constam os valores dos diâmetros medidos e a porcentagem de inibição calculada. Para a concentração de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi descartada uma das placas por apresentar um crescimento bem pequeno do fungo diferindo dos demais.

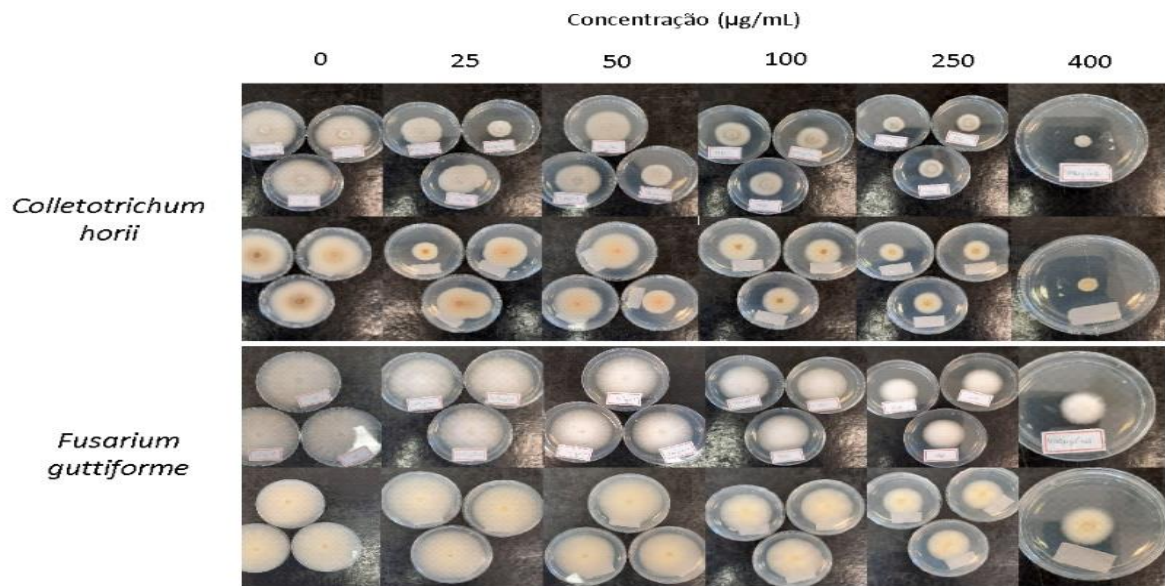


Figura 47. Ensaio de concentração inibitória mínima, placas vistas de cima e costa para os dois fungos, *C. horii* e *F. guttiforme* em cada concentração. **Fonte:** o autor (2021).

Tabela 5. Média dos diâmetros obtidos para cada concentração de ácido fusárico e a porcentagem de inibição calculada.

		Concentração ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)					
Fungo		0	25	50	100	250	400
Média Diâmetro (mm)	<i>Colletotrichum horii</i>	46,40	31,58	29,92	27,90	19,84	8,05
	<i>Fusarium guttiforme</i>	53,94	49,43	44,76	38,87	30,37	18,82
% de inibição	<i>Colletotrichum horii</i>	-	32,0	35,5	39,9	57,2	82,7
	<i>Fusarium guttiforme</i>	-	8,4	17,0	27,9	43,7	65,1

Foi observada a redução do crescimento de *C. horii* a partir da primeira concentração, contudo a redução mais acentuada foi observada a partir de $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ apresentando uma inibição de 39,9% e indicando que em concentrações de 25-50 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ seria seguro para realizar a reação de biotransformação. Foi escolhida a

concentração de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para o fungo *F. guttiforme* notou-se maior resistência ao ácido fusárico e a maior redução no crescimento foi observada a partir de 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, que apresentou uma inibição de 43,7% e indicando que abaixo desta concentração seria a faixa adequada para o experimento seguinte. Escolheu-se a concentração de 175 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o ensaio de biotransformação.

4.5 Análise dos extratos brutos obtidos nas biotransformações

4.5.1 Ácido fusárico e avaliação da toxicidade do produto formado

Analisando os extratos obtidos por biotransformação do ácido fusárico por RMN de ^1H , figura 48, observou-se que o AF foi totalmente consumido pelo fungo *C. horii* e transformado no composto **4**, fusarinol, no período de 7 dias (espectro D). Esse experimento foi mantido até 28 dias quando se observou a presença de fusarinol como em 7 dias, e outros sinais referentes ao composto tirosol (**3**) em δ_{H} 6,70 (2H, d, $J=2,0$ e 8,5 Hz), δ_{H} 7,03 (2H, d, $J=2,0$ e 8,5 Hz), δ_{H} 2,73 (2H, t, $J = 7,2$ Hz) e δ_{H} 3,70 (2H, t, $J = 7,2$ Hz).

Já para o fungo *F. guttiforme* não se observou a formação de qualquer composto, verificando-se que o material de partida estava intacto após 14 e 28 dias de cultivo, o que sugere que o ácido 9,10-desidrofusárico não é convertido a partir ácido fusárico nestas condições, podendo ser formado em etapas anteriores de sua rota biossintética. Entretanto estes dados não são suficientes para descartar a transformação de ácido fusárico em ácido 9,10-desidrofusárico.

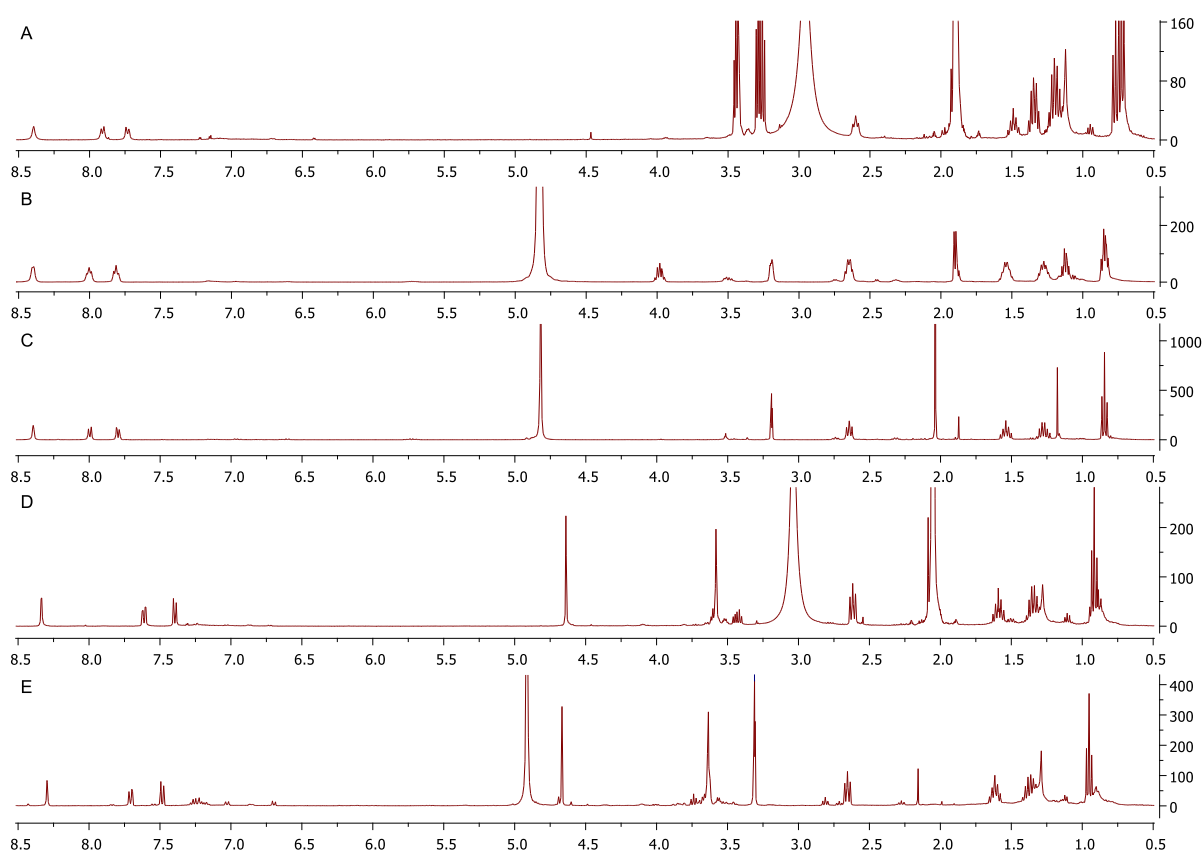


Figura 48. Sinais observados nos espectros de biotransformação do ácido fusárico (400 MHz). **(A)** Espectro de RMN de ^1H do branco do meio com ácido fusárico em acetona- D_6 ; **(B)** espectro de RMN de ^1H do extrato BAFFg14 em CD_3OD ; **(C)** espectro de RMN de ^1H do extrato BAFFg28 em acetona- D_6 ; **(D)** espectro de RMN de ^1H do extrato BAFCh7 em acetona- D_6 ; **(E)** espectro de RMN de ^1H do extrato BAFCh28 em CD_3OD . Fonte: o autor (2021) **Fonte:** o autor (2021).

Os extratos BAFCh7 e BAFCh28 foram separados por HPLC obtendo-se os dois cromatogramas mostrados na figura 49.

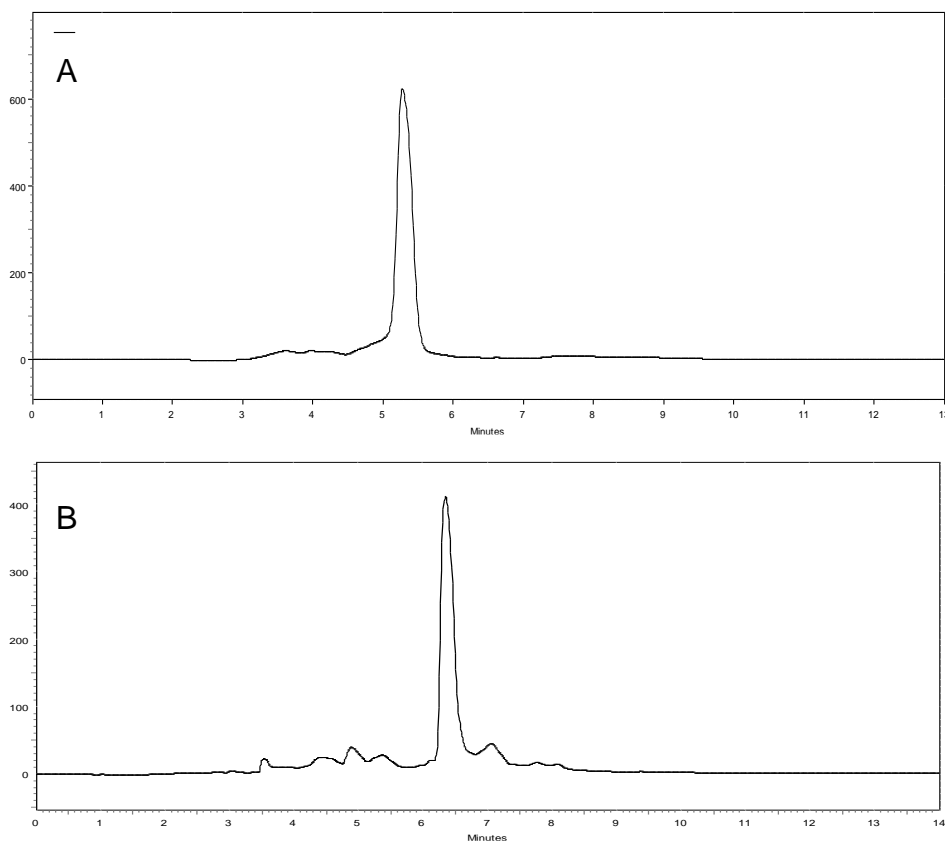


Figura 49. Cromatogramas de separação dos extratos BAFCh7 e BAFCh28. **(A)** HPLC Coluna da Supelco RP-8 (10 μ m, 10 \times 250 mm). taxa de fluxo de 4,0 mL.min⁻¹. O sistema de eluição foi composto por água e metanol (30 a 100 % de MeOH, em 10 min, 100% de MeOH em de 10 a 12 min e de 100 a 30 % de 12 a 13 min detecção a 270 nm. **(B)** HPLC Coluna da Supelco RP-8 (10 μ m, 10 \times 250 mm). taxa de fluxo de 4,0 mL.min⁻¹. O sistema de eluição foi composto por água e metanol (15 a 100 % de MeOH, em 10 min, 100% de MeOH em de 10 a 12 min e de 100 a 15% de 12 a 114 min detecção 270 nm. **Fonte:** o autor (2021).

Os dois picos mais intensos em 5,2 min **(A)** e 6,5 min **(B)** correspondem ao composto desejado fusarinol **(4)**, que foi isolado em ambos os extratos obtendo-se um total de 14,2 mg. O espectro de absorção no UV de **4** apresentou-se semelhante ao do ácido fusárico, com uma absorção máxima de 267 nm mostrado na figura 50.

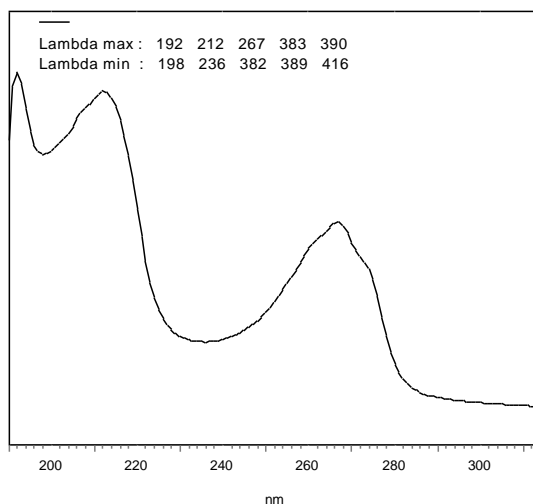


Figura 50. Espectro de absorção no UV do fusarinol. **Fonte:** o autor (2021)

Este resultado confirma a biotransformação do AF a fusarinol pelo fungo *C. horii*, observado no cocultivo de 7 e 14 dias.

Para averiguar que esta reação se trata de um processo de destoxificação para um composto menos tóxico, o fungo foi colocado para crescer em meio sólido PDA contendo os compostos, ácido fusárico e fusarinol, para que assim fosse possível comparar suas propriedades antimicrobianas.

Após 7 dias de incubação foi possível observar o resultado do experimento observado na figura 51. Na primeira coluna é observado o crescimento do fungo *C. horii* no meio PDA contendo apenas o solvente etanol utilizado como controle de solvente. Nota-se tanto na parte superior da placa (primeira fileira) quanto na inferior (segunda fileira) que o fungo cresceu por quase toda a superfície. Na segunda e terceira coluna temos o fungo crescendo em placas de PDA contendo $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do ácido fusárico. É possível notar uma forte inibição do crescimento micelial apresentando uma média de 31% de inibição. Nas duas últimas colunas (quarta e quinta) temos o crescimento do fungo na presença de uma concentração de $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do fusarinol. Nota-se que o fungo apresentou crescimento micelial semelhante à primeira coluna da placa de controle, apresentando uma inibição apenas de 8%.

Estes dados confirmam que no período de 7 e 14 dias o fungo *C. horii* realizou a biotransformação do ácido fusárico a fusarinol para sobreviver no meio. Isso é evidenciado ao observar as fotos de crescimento micelial nos experimentos de

cocultivo nos períodos determinados, figura 28. Nos períodos de 7 e 14 dias é possível observar características morfológicas do fungo *C. horii*, enquanto em 21 dias de crescimento é possível se observar a presença do fungo *F. guttiforme* e em 28 dias apenas a presença do *Fusarium*.

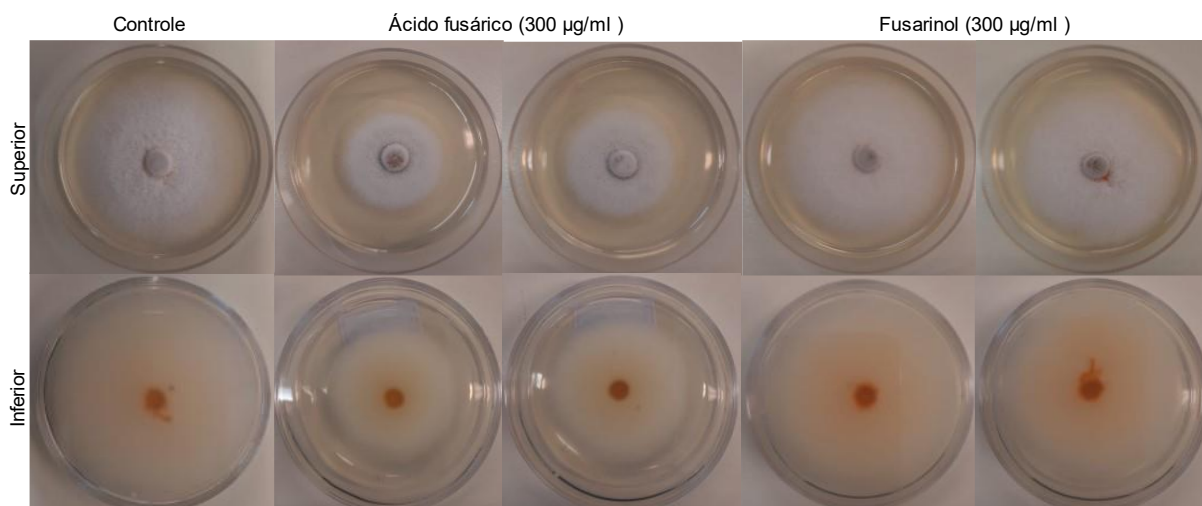


Figura 51. Ensaio de toxicidade dos compostos ácido fusárico e fusarinol frente ao fungo *C. horii*. **Fonte:** o autor (2021).

O espectro de RMN de ^1H da fração BAFCh28p3 apresentou sinais de hidrogênios oximetilênicos com deslocamento químico diferente do fusarinol, e ainda foi observado que a fração apresentava uma mistura de compostos. Dessa forma a fração foi fracionada por HPLC e a fração BAFCh28p3.2 apresentava os sinais de hidrogênios de interesse. Esta fração foi analisada por CG/EM sendo possível propor estrutura do 7-hidroxifusarinol (**11**).

4.5.2 Ácido 9,10-desidrofusárico

O experimento de biotransformação do ácido fusárico pelo fungo *C. horii* apresentou um resultado positivo, atingindo a expectativa de se obter o fusarinol e ainda foi possível obter outro derivado. O fungo mostrou-se muito suscetível a um composto tóxico diferente do fungo *F. guttiforme*, dessa forma com o intuito de obter compostos diferentes dos isolados até então foi realizado o experimento de biotransformação do ácido 9,10-desidrofusárico.

O extrato obtido e denominado BADFCh7 foi analisado por RMN de ^1H e seu espectro, figura 52, mostrou a presença de três sinais de hidrogênios piridínicos com deslocamento químico ligeiramente menor (hidrogênio mais blindados) que do ácido 9,10-desidrofusárico, sendo eles δ_{H} 7,39 (1H, d, $J=8,0$ Hz), δ_{H} 7,61 (1H, dd, $J=8,0$ e 2,1 Hz) e δ_{H} 8,35 (1H, d, $J=1,8$ Hz), semelhante ao ocorrido no processo de biotransformação do AF ao fusarinol. Também foi observado um sinal de hidrogênios oximetilênicos δ_{H} 4,64 (2H, s), indicando que ocorreu a redução da carboxila a álcool. Os deslocamentos químicos descritos e multiplicidades são semelhantes ao do fusarinol.

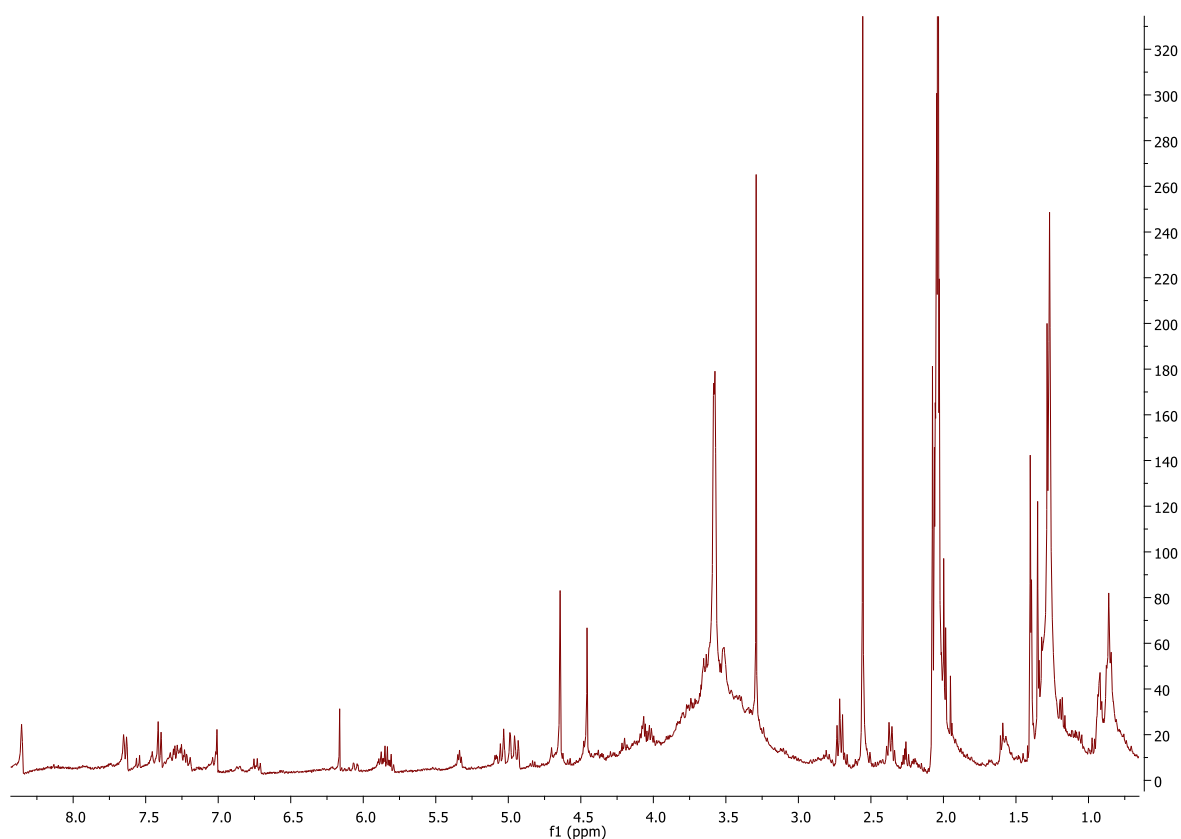


Figura 52. Espectro de RMN de ^1H da fração BADFCh7 (Acetona- D_6 em 500 MHz).
Fonte: o autor (2021).

Outros sinais observados foram a presença de hidrogênios vinílicos em 5,84, 5,01 e 4,95 ppm e outro sinal de hidrogênios oximetilênicos em 4,46 ppm. A partir destas observações e com a expectativa de se obter algum composto diferente dos até então isolados, foi realizado o fracionamento do extrato. No espectro também são

observados sinais piridínicos referentes ao ácido 9,10-desidrofusárico, indicando que ele não foi totalmente consumido.

A separação do extrato BADFCh7 foi realizada por HPLC-DAD em comprimento de onda de 267 nm onde o fusarinol apresentou maior absorção. O cromatograma, figura 53, mostra a presença de um pico intenso em 16,6 min indicando ser o composto desejado.

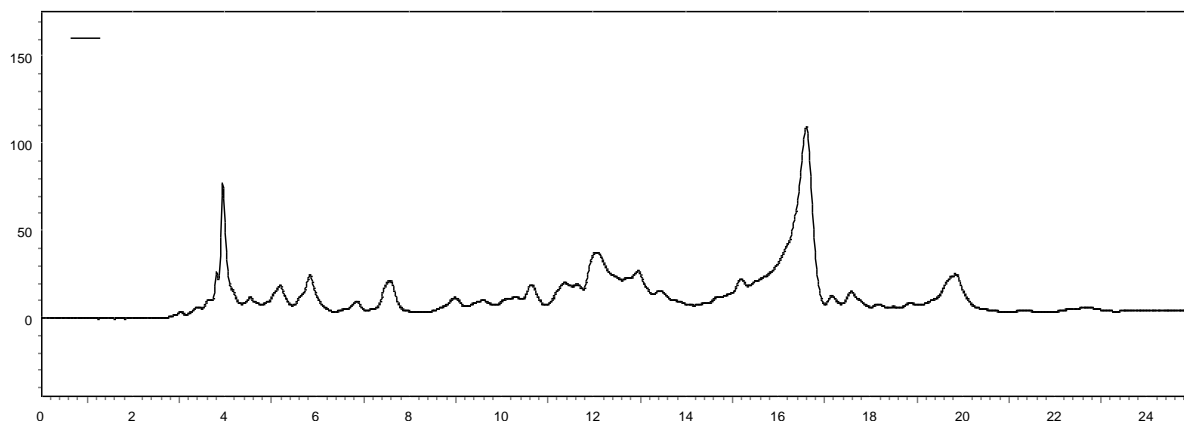


Figura 53. Cromatogramas da separação do extrato BADFCh7. HPLC Coluna da Supelco RP-8 (10 μm , 10 \times 250 mm) e taxa de fluxo de 4,0 mL.min⁻¹. O sistema de eluição foi composto por água e metanol (15 a 100 % de MeOH, em 20 min, 100% de MeOH em de 20 a 22 min e de 100 a 15% de 22 a 25 min com detecção a 267 nm. **Fonte:** O autor (2021).

O espectro de absorção no UV do pico (16,6 min), figura 54 (A) mostrou semelhança ao do fusarinol apresentando absorção máxima de 267 nm e sua comparação pode ser vista na figura 54 (B).

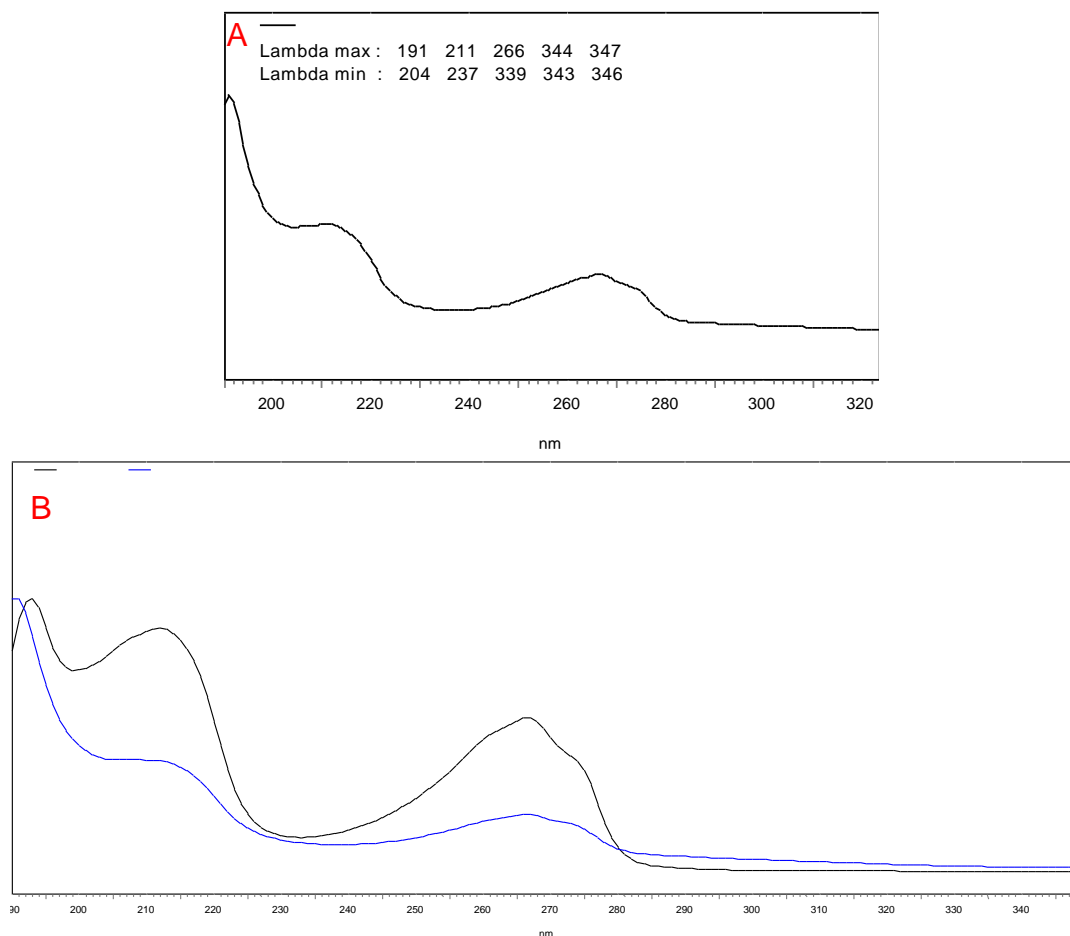


Figura 54. Espectro de absorção do pico em 16,6 min do fracionamento do extrato BADFCh7. **(A)** Espectro de absorção no UV do pico em 16,6 min. **(B)** Comparação do espectro de absorção no UV do pico em 16,6 min (azul) e fusarinol (preto). **Fonte:** o autor (2021).

A fração coletada foi seca e analisada por RMN de ^1H em 500 MHz e a partir do espectro foi possível atribuir ao composto **11** a estrutura do 9,10-desidrofusarinol.

4.5.3 Mistura ácido fusárico e ácido 9,10-desidrofusárico

A análise RMN de ^1H do extrato de biotransformação utilizando a mistura dos dois ácidos (BMCh7) revelou a presença de uma mistura mais complexa de compostos além do ácido fusárico, ácido 9,10-desidro fusárico e fusarinol observados anteriormente, como pode ser constatado na figura 55. Em A é possível observar o espectro do extrato de biotransformação e em B o espectro ampliado para 4,5 a 8,5 ppm. Neles é possível visualizar a presença de 4 sinais oximetilênicos em 4,53, 4,69,

5,11 e 5,27 ppm indicando possíveis compostos onde ocorreu redução da carboxila, que não são observados no espectro do branco do meio PDA, figura 55 C e o ampliado em D. O sinal em 4,69 ppm corresponde ao fusarinol (**4**). Também é possível observar a presença de sinais vinílicos em 5,83 ppm e dos sinais de hidrogênios piridínicos do AF e ADF indicando que no período de 7 dias o *C. horii* não foi capaz de biotransformar a mistura dos ácidos. Além destes sinais, é evidente que na região de hidrogênios piridínico há uma maior quantidade de sinais. Assim procedeu-se com o isolamento de algumas substâncias deste novo extrato.

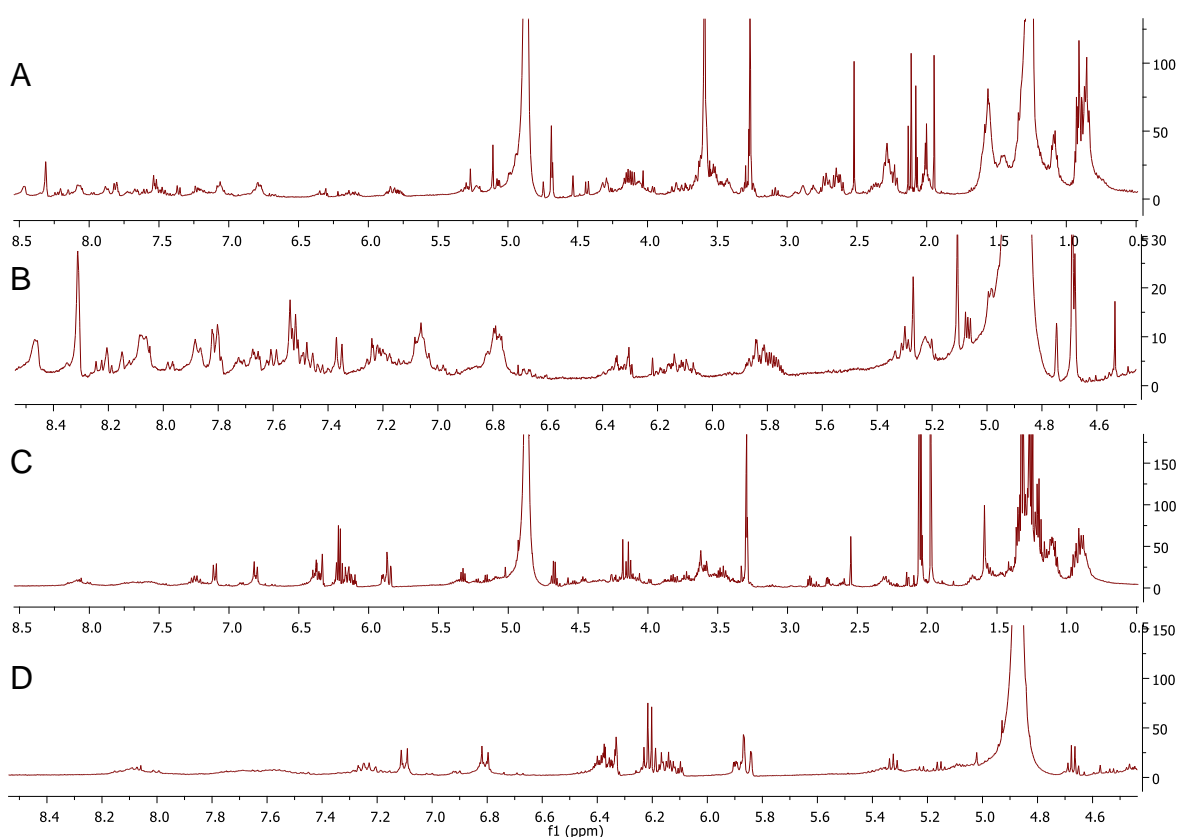


Figura 55. Sinais observados nos espectros de RMN de ^1H da biotransformação da mistura dos ácidos (400 MHz). (A) espectro de RMN de ^1H do extrato BMCh7 em acetona- D_6 ; (B) espectro de RMN de ^1H ampliado; (C) Espectro de RMN de ^1H do branco do meio com a mistura de ácidos em acetona- D_6 (D) espectro de RMN de ^1H ampliado. **Fonte:** o autor (2021).

A análise cromatográfica por HPLC do extrato BMCh7 por HPLC permitiu a separação e visualização de vários picos no cromatograma como ilustrado na figura 56.

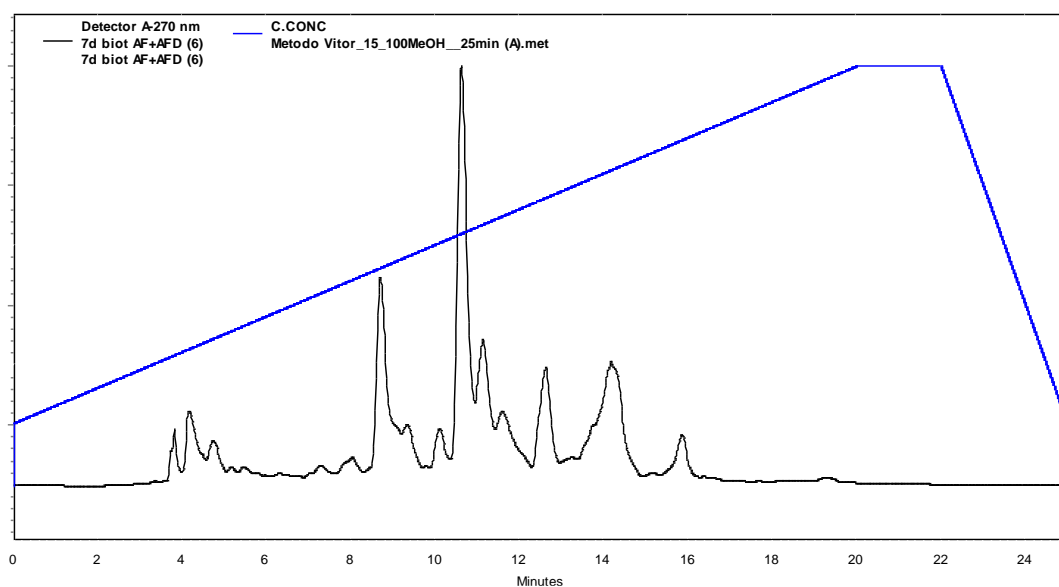


Figura 56. Cromatograma da separação do extrato BMCh7. HPLC Coluna da Supelco RP-8 (10 μm , 10 \times 250 mm) e taxa de fluxo de 4,0 mL.min⁻¹. O sistema de eluição foi composto por água e metanol 15 a 100 % de MeOH, em 20 min, 100% de MeOH em de 20 a 22 min e de 100 a 15% de 22 a 25 min, detecção a 270 nm. **Fonte:** O autor (2021).

A sobreposição dos espectros de absorção no UV, figura 57, dos picos da cromatografia mostrou que os picos em 8,69 e 10,61 min são semelhantes ao do ácido 9,10-desidrofusárico (**2**) e ácido fusárico (**1**), respectivamente, por apresentarem absorção em 270 nm, confirmando que o fungo não foi capaz de completar a biotransformação da mistura dos dois compostos no período de 7 dias. O pico em 11,14 min apresentou-se semelhante ao fusarinol (**4**), com absorção máxima em 260 nm, que foi confirmado através do isolamento e análise por RMN de ¹H. O pico em 12,61 min apresentou espectro de absorção no UV semelhante ao fusarinol, que após purificação forneceu um derivado do fusarinol denominado acetato de fusarinila (**13**), que foi identificado por RMN incluindo análise por HMBC e espectrometria de massas (pp. 118, 119 e 120).

Overlaid Spectra

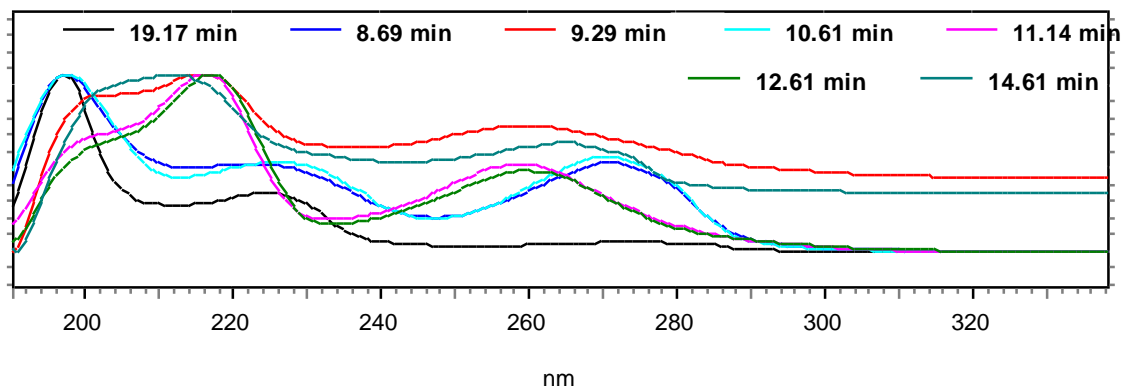


Figura 57. Sobreposição dos espectros de absorção no UV do fracionamento do extrato BMCh7.

Os demais picos também foram separados, todavia as frações coletadas exibiram pouca massa e não apresentaram uma pureza que pudesse levar à identificação de outros compostos.

4.6 Análise dos extratos brutos obtidos por modificador epigenético

Os fungos *F. guttiforme* e *C. horii* foram cultivados na presença do modificador epigenético ácido suberoidroxâmico e os extratos obtidos foram comparados aos extratos dos cultivos controles sem a presença do modificador e ao branco do meio. Para esta comparação foram obtidos espectros de RMN de ^1H dos extratos utilizando acetona- D_6 como solvente, figuras 58 e 63. Os extratos também foram analisados por HPLC-DAD utilizando metanol e água como fase móvel, ilustrados nas figuras 60 e 64.

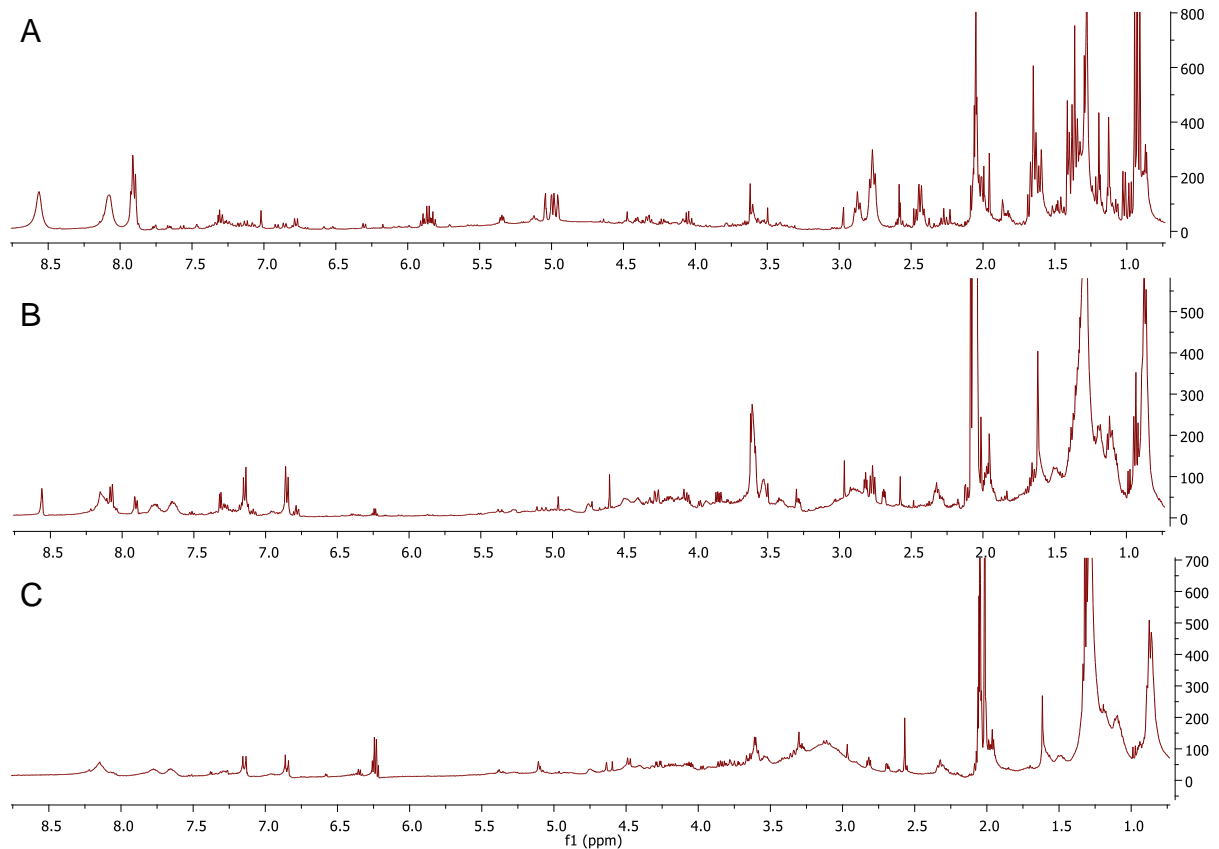


Figura 58. Espectro de RMN de ¹H do fungo *F. guttiforme* cultivado na presença do modificador epigenético ácido suberoidroxâmico (400 MHz). **(A)** espectro de RMN de ¹H do extrato EPGFg28 em acetona-D₆; **(B)** espectro de RMN do controle do fungo; **(C)** Espectro de RMN de ¹H do branco do meio com o modificador **Fonte:** o autor (2021).

Na figura 58 é possível observar mudança no perfil químico do extrato EPGFg28 **(A)**, que apresentou a mistura de ácido fusárico e ácido 9,10-desidrofusárico observado pela presença de sinais de hidrogênios vinílicos e piridínicos, como já discutido anteriormente no item 4.1.1. Já no extrato controle do fungo *Fusarium* não foram observados os sinais de hidrogênios vinílicos em δ_H 4,99 e δ_H 5,85, indicando a presença de apenas o ácido fusárico. Estas informações indicam que o crescimento do fungo com a adição do modificador ASBH induziu a produção do ácido 9,10-desidrofusárico pelo fungo. Também foi possível observar pequenas diferenças nos espectros nas regiões de 0,8 a 3,0 ppm, figura 59. Dentre elas pode-se destacar um quarteto em 2,45 ppm, vários sinais entre 1,6 e 1,7 ppm e sinais dupletos em 0,95 e 1,05 ppm.

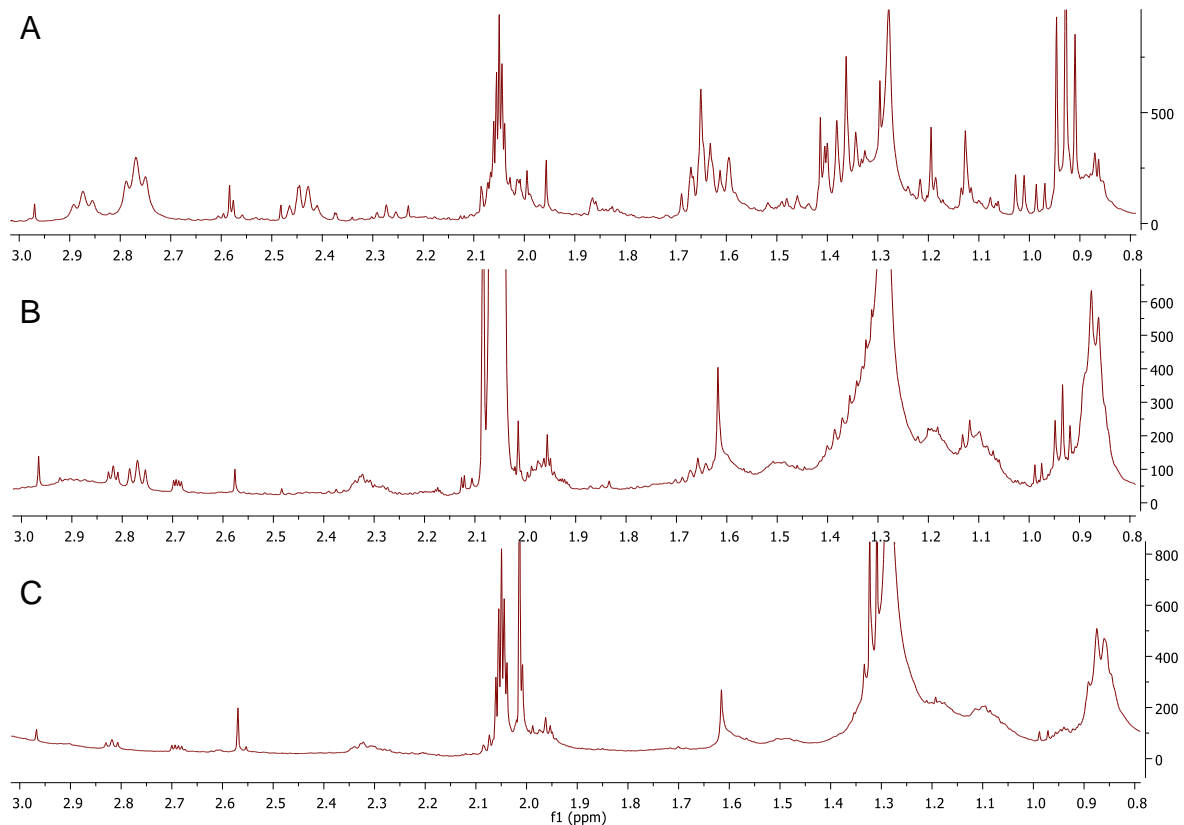


Figura 59. Espectro de RMN de ^1H do extrato com modificador epigenético de *F. guttiforme* (400 MHz). **(A)** espectro de RMN de ^1H do extrato EPGFg28 ampliado em acetona- D_6 ; **(B)** espectro de RMN de ^1H ampliado do controle; **(C)** Espectro de RMN de ^1H do branco do meio com modificador em acetona- D_6 . **Fonte:** o autor (2021).

Além das diferenças observadas nos espectros de RMN, outras foram também observadas ao comparar cromatogramas da figura 60, notando-se pequenas diferenças de picos, principalmente de média polaridade entre 10 e 14 min. Em preto mostra-se o cromatograma obtido com detecção no comprimento de onda de 270 nm, e tanto no controle, como no com modificador são observados picos intensos referentes ao ácido fusárico. Contudo, ao mudar o comprimento de onda para 325 nm, em azul, nota-se que no extrato EPGFg28, que os dois picos intensos somem e aparecem dois picos em 10,8 e 12,6 min, que não são observados no controle. Esta modificação motivou o isolamento destas duas substâncias.

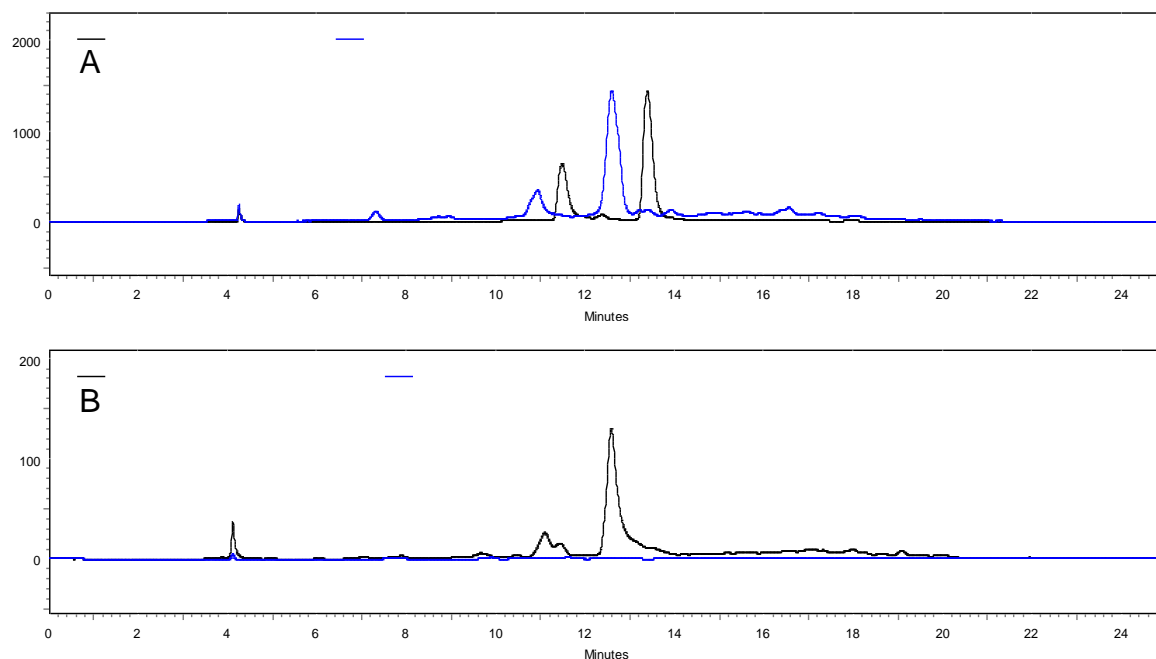


Figura 60. Cromatogramas obtidos no experimento de modificador epigenético em preto com detecção em 270 nm e em azul 325 nm. **(A)** O cromatograma do extrato EPGFg28. **(B)** O cromatograma do controle.

Devido à grande diversidade de picos de baixa intensidades e numa mesma região, algumas frações foram coletadas em intervalos de tempos na primeira separação por HPLC e as frações coletadas foram analisadas por RMN de ^1H . A primeira fração que mostrou um composto interessante foi a EPGFg28p6, que apresentou majoritariamente o composto **2** e sinais menos intensos que indicavam a presença de dicetopiperazinas semelhantes às encontradas no cultivo com meio Czapek. Devido à baixa intensidade dos sinais de hidrogênio das dicetopiperazinas no espectro de RMN de ^1H e à pequena massa não foram realizadas outras separações para purificação desta fração.

A fração EPGFg28p7 mostrou-se com maior variedade metabólica, verificada pelo seu espectro de RMN de ^1H , Figura 61, onde é possível observar a presença de 2 compostos já obtidos neste trabalho e sinais que indicam alguns compostos não observados anteriormente. Entre os compostos identificados anteriormente nota-se a presença de dois sinais aromáticos δ_{H} 7,89 (2H, d, $J= 9,0$ Hz) e δ_{H} 6,84 (2H, d, $J= 8,9$ Hz) e um sinal de metila alfa a uma carbonila δ_{H} 2,53 (3H, s) sinais que caracterizam a *p*-hidroxiacetofenona (**9**). O outro composto observado foi a dicetopiperazina ciclo

prolina-leucina (**10**) através dos seus sinais multipletos em 3,51, 4,13 e 4,26 ppm e dos dupletos em 0,97 e 0,95 ppm.

Esta fração foi separada por HPLC e foi possível confirmar a presença destas duas estruturas. Através destes resultados é possível dizer que com a presença do modificador epigenético foi possível acessar rotas de produtos naturais semelhantes a obtidas no cocultivo com meio Czapek obtendo-se esses dois compostos no meio PDB a partir do fungo *F. guttiforme*.

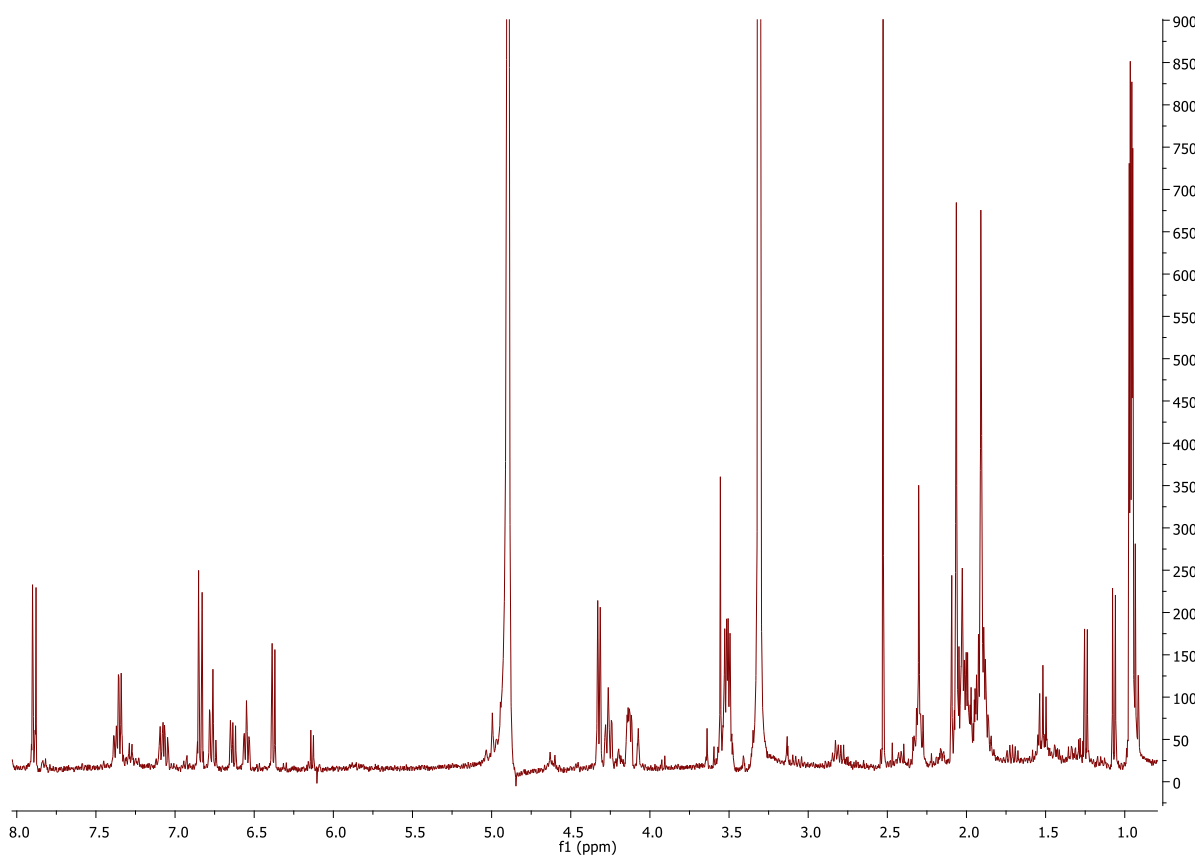


Figura 61. Espectro de RMN de ^1H da fração EPGFg28p7 (CD_3OD em 400 MHz).

A fração EPGFg28p7 também apresentou outra classe de compostos, cujo isolamento mostrou que as frações EPGFg28p7.2 e EPGFg28p7.6 continham gibepironas em pequenas quantidades, sendo a EPGFg28p7.6 a gibepirona B (**14**) que foi elucidada por RMN de ^1H e será discutida posteriormente, enquanto que a fração EPGFg28p7.2 apresentou uma mistura de dois compostos. O composto majoritário desta fração não foi identificado, contudo o minoritário apresentou semelhanças a gibepirona D, sendo necessário outras análises para confirmar.

As frações EPGFg28p9 e EPGFg28p10 apresentaram espectros de RMN de ^1H semelhantes, neles foi possível observar a presença de sinais de dois grupos metílicos em 1,64 e 1,7 ppm ligados a uma ligação dupla, outros sinais de grupos metila simpleto em 1,25 e 1,15 ppm e uma duplete em 1,04 ppm também foram observados. A comparação com os valores da literatura, Berg et al., 2004, indicou que o composto poderia ser o lignoren ou ciclonerodiol. A análise de CG-MS mostrou a presença de um íon m/z 222 que corresponde a massa do lignoren, todavia, uma perda de água (18 Da) da molécula do ciclonerodiol resultaria no íon m/z 222. Para confirmar a estrutura foi obtido um espectro no infravermelho da fração. Nele foi possível observar uma banda larga característica de hidroxila, entretanto, uma segunda banda referente a uma carbonila, não é condizente com o que se observou nos espectros de massa e RMN de ^1H . As duas estruturas propostas são observadas na figura 62.

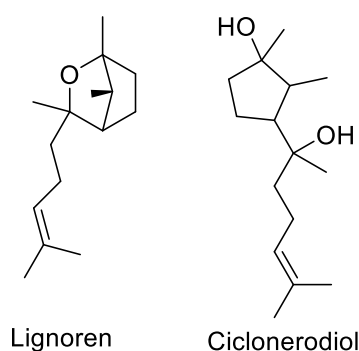


Figura 62. Estrutura das moléculas lignoren e ciclonerodiol observadas nas frações EPGFg28p9 e EPGFg28p10

O espectro de RMN de ^1H extrato EPGCh28, figura 63 (A) mostrou poucas diferenças do extrato controle, sem a presença do modificador figura 63 (B), indicando apenas alguns sinais pouco intensos, como observado na figura 63 junto com o branco do meio (C).

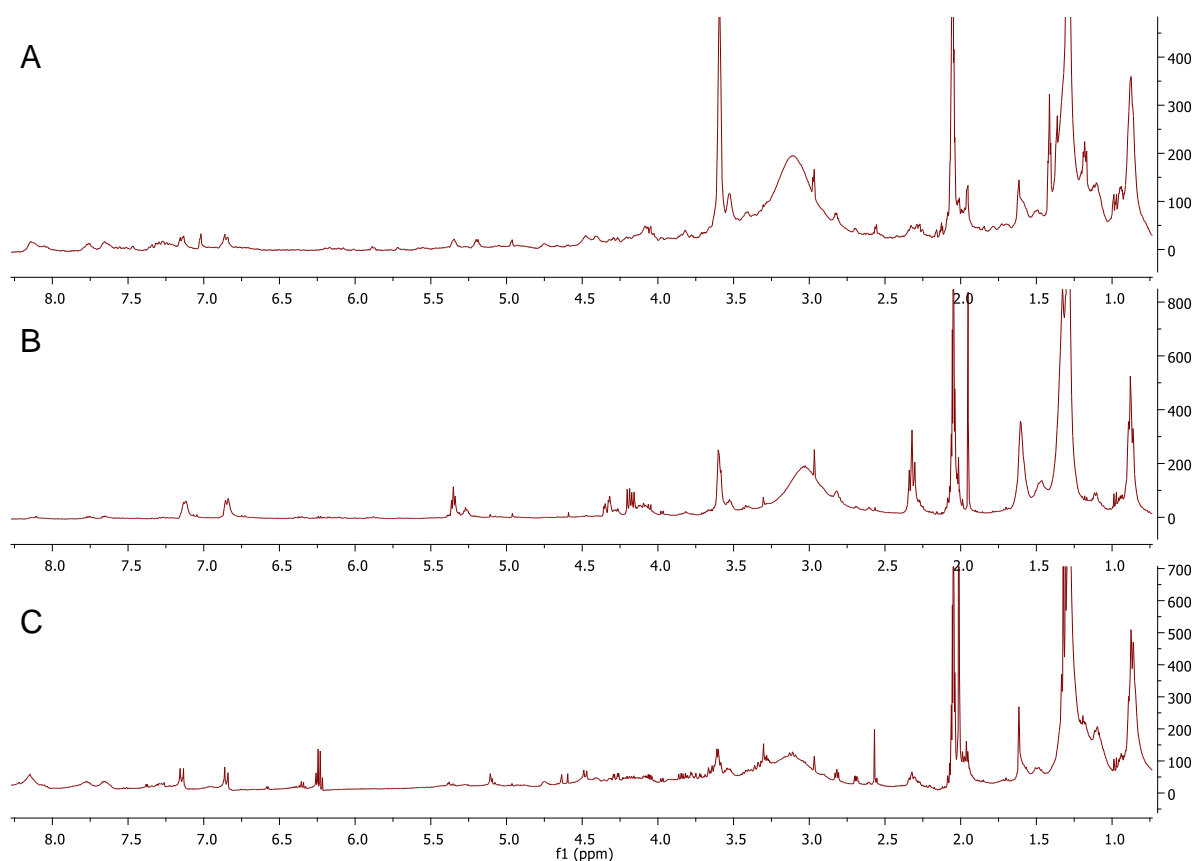


Figura 63. Espectros do extrato do fungo *Colletotrichum* na presença do modificador epigenético ácido suberoidroxâmico (400 MHz). **(A)** espectro de RMN de ¹H do extrato EPGCh28 em acetona-D₆; **(B)** espectro de RMN do controle do fungo; **(C)** Espectro de RMN de ¹H do branco do meio com o modificador **Fonte:** o autor (2021).

O cromatograma obtido após injeção no HPLC também apresentou pequenas diferenças como mostrado na figura 64, onde com detecção em 200 nm (preto) é possível observar pequenos picos diferentes entre 17,0 e 19,0 min e principalmente entre 13 e 14,5 min e em 21,6 min. Quando se compraram os cromatogramas em 225 nm (azul) é possível observar menores diferenças, apenas algumas entre 18 e 21 min. Evidenciando estas diferenças foi realizada a separação do extrato por HPLC-DAD e algumas frações foram analisadas por RMN de ¹H, contudo não foram obtidos compostos puros e de com massa suficiente para que procedessem ser purificados com outras técnicas e desta forma este fracionamento não foi descrito, sendo necessário um cultivo em escala ampliada para trabalhar com estes compostos.

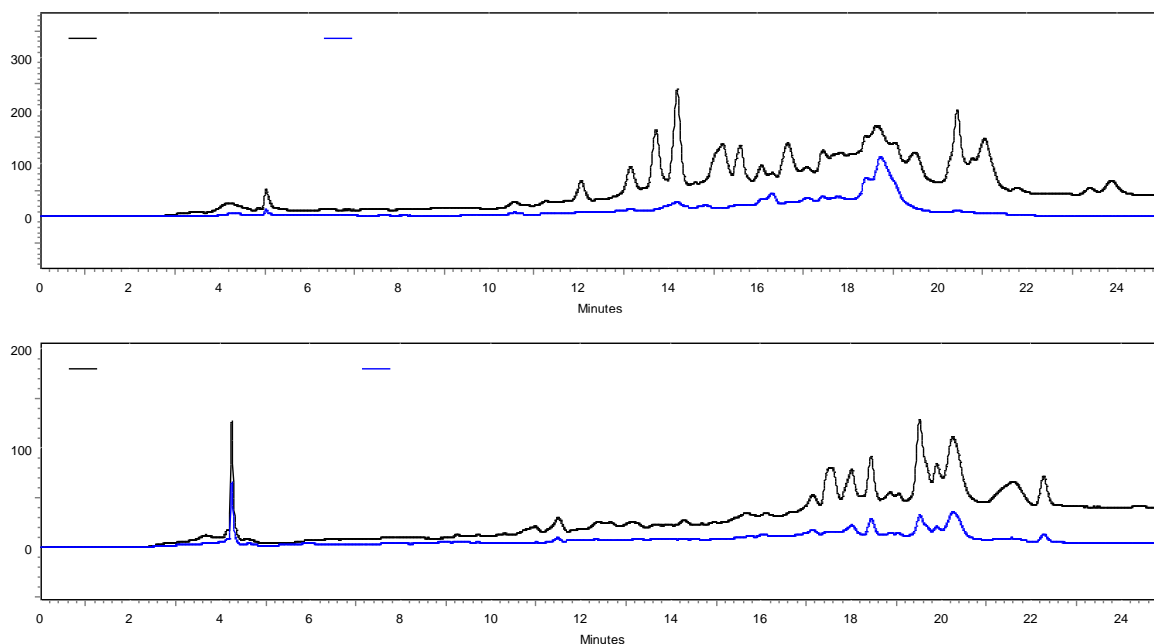


Figura 64. Cromatogramas obtidos no experimento de modificador epigenético em preto 200 nm e em azul 225 nm. **(A)** O cromatograma do extrato EPGCh28. **(B)** O cromatograma do controle.

O experimento com modificador epigenético mostrou-se uma boa abordagem para obtenção de novos compostos a partir do acesso a novas rotas biossintéticas. O fungo *F. guttiforme* foi o que mais apresentou modificações no metabolismo em comparação com *C. horii*. Nele foi possível obter 2 compostos encontrados no cocultivo em meio Czapek indicando que provavelmente foi o fungo *F. guttiforme* que produziu estes compostos no cocultivo. Além disso, notou-se a presença de compostos que não foram observados nos demais cultivos, sendo um deles identificado como gibberona B (14) e os que necessitariam de um cultivo em larga escala ou outras análises para elucidação a gibberona D e o lignoren/ciclonerodiol.

4.7 Isolamento e elucidação estrutural dos compostos

Através dos experimentos e fracionamentos descritos anteriormente foi possível isolar um total de 14 compostos mostrados na tabela 4 (item 3.2.13), junto com as frações que foram coletadas e a massa obtida dos compostos. Nela é possível observar que no meio PDB majoritariamente foram obtidos os compostos ácidos fusárico (1) e ácido 9,10-desidrofusárico (2) tanto no cultivo axênico de *F. guttiforme*

quanto no cocultivo, como discutidos anteriormente e no cocultivo foram observados 3 compostos inéditos, sendo 2 derivados de AF e ADF. O meio Czapek foi o que mais apresentou diversidade metabólica, podendo isolar compostos. O experimento de biotransformação resultou em 3 derivados do ácido fusárico e um derivado do ácido 9,10-desidrofusárico, dois deles são inéditos. A partir do experimento com modificador foi possível isolar dois compostos obtidos no meio Czapek e um composto que não foi observado nos demais cultivos a gibepirona B (**14**).

4.7.1 Ácido fusário (**1**) e ácido 9,10-desidrofusárico (**2**)

Os compostos **1** e **2**, figura 65, foram observados no cultivo axênico de *F. guttiforme* em todos os períodos de tempos estudados, também foram observados no cocultivo a partir de 7 dias. As análises de RMN de ^1H mostraram que o composto **2** aparecia em menor quantidade (intensidade/integral de seus sinais) em comparação com o composto **1** nos menores tempos de cultivo e nos tempos maiores sua intensidade aumentava até atingir proporção semelhante ao composto **1**.

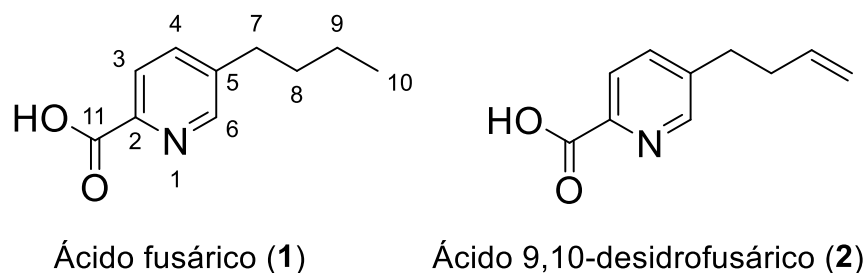


Figura 65. Estrutura química dos compostos ácido fusárico (**1**) e ácido 9,10-desidrofusárico (**2**).

Devido às suas semelhanças estruturais e polaridade, a separação deles por cromatografia por exclusão e cromatografia por coluna realizadas não foi possível. Estes compostos, conforme esperado, foram obtidos nas frações mais polares e seu espectro de RMN de ^1H pode ser observado na figura 66 (A).

O método utilizado para separação por HPLC-DAD mostrou-se bastante eficaz e foi possível obter os dois compostos como um sólido branco e seus espectros de RMN de ^1H estão apresentados na figura 66 (**B**) e (**C**) para **1** e **2**, respectivamente.

Composto **1**. O espectro de RMN de ^1H em CD_3COD apresentou 3 sinais de hidrogênios ligados a um núcleo piridínico e suas multiplicidades indicam que o núcleo apresenta substituições nas posições 2 e 5. Estes sinais são um duplo duplete em δ_{H} 7,67 ($J = 8,0$ e $2,0$ Hz), um duplete em δ_{H} 7,93 ($J = 8,0$ Hz) e um simpleto largo em δ_{H} 8,39 atribuídos a H4, H3 e H6, respectivamente. Foram observados quatro sinais característicos de um grupo n-butila. Um tripleto em δ_{H} 0,95 (3H, $J = 7,4$ Hz) de hidrogênios metílicos H-10, um sexteto em δ_{H} 1,38 (2H, $J = 7,5$ Hz), um quinteto δ_{H} 1,63 (2H, $J = 7,7$ Hz) e um tripleto de hidrogênios mais desblindados em δ_{H} 2,68 (2H, $J = 7,7$ Hz). A partir destes dados e comparação com os valores da literatura ambos mostrados na tabela 6 foi possível caracterizar o composto **1** como ácido fusárico, figura 65.

Composto **2**. Assim como para o ácido fusárico, o espectro em CD_3COD , figura 63 (**C**), também apresentou 3 sinais de hidrogênios ligados a um núcleo piridínico δ_{H} 7,69 (1H, dd, $J = 8,0$ e $2,2$ Hz), δ_{H} 7,94 (1H, d, $J = 8,0$ Hz) e δ_{H} 8,39 (1H, sl), também foram observados 3 hidrogênios vinílicos δ_{H} 5,84 (1H, ddt, $J = 6,5; 10,2; 17,0$ Hz), em δ_{H} 5,01 (1H, m) e δ_{H} 4,97 (1H, m), característicos de hidrogênios ligação dupla terminal, estes sinais e outros dois em δ_{H} 2,37 (2H, q, $J=7,5$ Hz) e δ_{H} 2,78 (2H, t, $J=7,5$ Hz) caracterizam o composto ácido 9,10-desidrofusárico, figura 65. Os sinais são coerentes quando comparados com os da literatura, tabela 6.

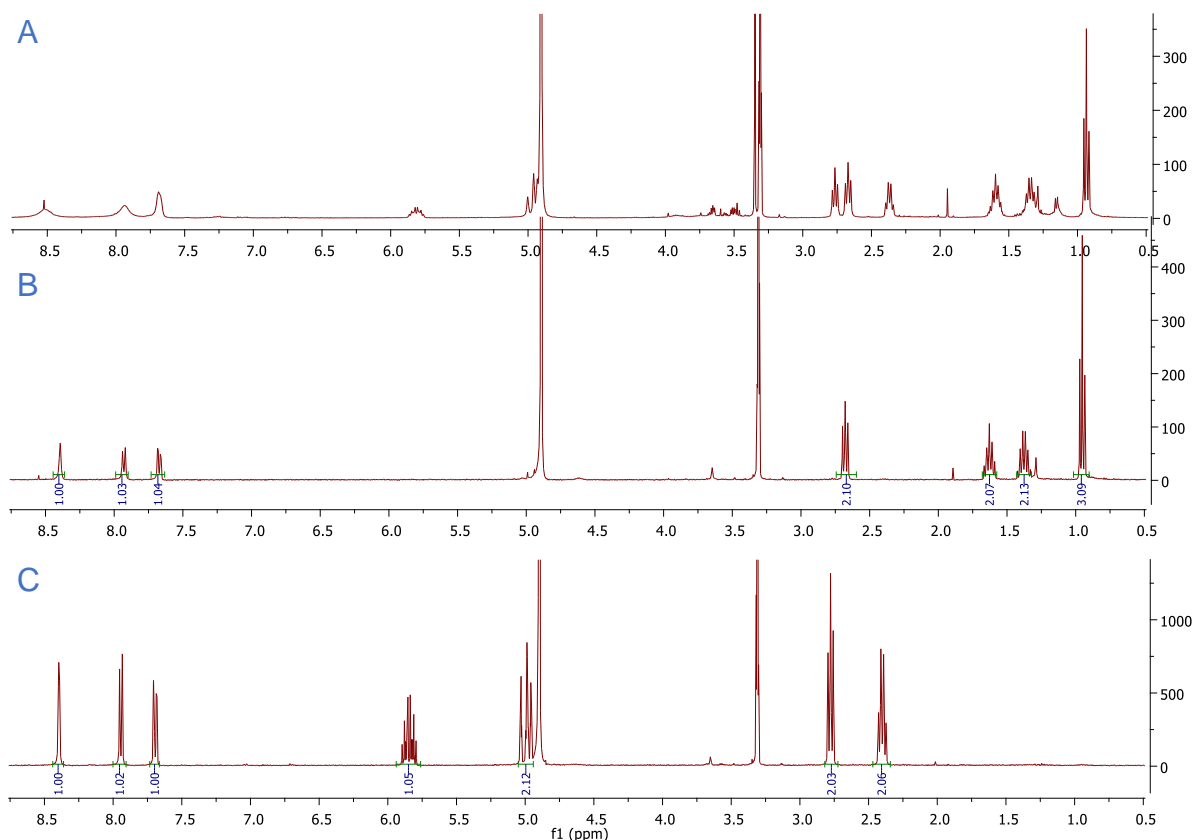


Figura 66. Espectros de RMN ¹H do ácido fusárico e ácido 9,10-desidrofusárico (MD₃OD em 400 MHz). **(A)** espectro de RMN de ¹H da mistura dos dois ácidos; **(B)** espectro de RMN do ácido fusárico; **(C)** Espectro de RMN de ¹H do ácido 9,10-desidrofusárico. **Fonte:** o autor (2021).

Tabela 6: Dados de RMN de ¹H do ácido fusárico (1)

n	δ_H (400 MHz em CD ₃ OD)	SILVA et al. (2020)
		δ_H (CD ₃ OD em 400 MHz)
3	7,93 (1H, d, J = 8,0 Hz)	8.10 (d, J = 8.0 Hz)
4	7,67 (1H, dd, J = 8,0 e 2,0 Hz)	7.90 (dd, J = 8.0 e 2,1 Hz)
6	8,39 (1H, s)	8.51 (s)
7	2,68 (2H, t, J=7,7 Hz)	2.76 (t, J = 7,8 Hz)
8	1,63 (2H, quint., J = 7,7 Hz)	1.66 (quint, J = 7,6 Hz)
9	1,38 (2H, sext., J = 7,5 Hz)	1.40 (sext, J = 7,4 Hz)
10	0,95 (3H, t, J = 7,4 Hz)	0.96 (t, 7,3 = Hz)

Tabela 7: Dados de RMN de ^1H do ácido 9,10-desidrofusárico (**2**)

n	δ_{H} (400 MHz em CD_3OD)	NIEHAUS et al. (2014)
		δ_{H} (CDCl_3 em 400 MHz)
3	7,94 (1H, d, $J = 8,0$ Hz)	7,78 (1H, dd, $J = 8,0$ Hz, 2,0 Hz)
4	7,69 (1H, dd, $J = 8,0$ e 2,2 Hz),	8,18 (1H, d, $J = 7,9$ Hz)
6	8,39 (1H, sl)	8,63 (1H, s)
7	2,77 (2H, t, $J = 7,5$ Hz)	2,84 (2H, t, $J = 7,6$ Hz)
8	2,37 (2H, q, $J = 7,5$ Hz),	2,42 (2H, q, $J = 6,8$ Hz)
9	5,84 (1H, ddt, $J = 6,5; 10,2; 17,0$ Hz)	5,87-5,69 (1H, m)
10a	4,97 (1H, m),	5,01-4,97 (1H, m)
10b	5,01 (1H, m)	5,04-5,01 (1H, m)

O ácido fusárico (**1**) e o ácido 9,10-desidrofusárico (**2**) são micotoxinas encontradas em várias espécies do gênero *Fusarium* (BACON et al., 1996), sua rota biossintética apresenta um L-aspartato como precursor e a participação de enzimas como aspartato quinase, acetiltransferase e desidrogenase. As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos em condições ambientais oportunas por fungos filamentosos, caracterizadas por baixo peso molecular e que podem causar uma ampla gama de doenças (BERTERO et al., 2018). Nas plantas estes compostos são estudados quanto suas atividades fitotóxica e correlacionando estas atividades à patogenicidade do fungo. Ambos os compostos apresentaram altas atividades fitotóxica em folhas de ervilhas produzidas por *F. oxysporum* (Bani et al., 2014), e ainda apresentaram inibição na germinação de sementes de *Orobanche ramosa* (ZONNO e VURRO, 2002). CRUTCHER e colaboradores (2014) descreveram a importância do ácido fusárico na virulência do fungo à planta e mostraram que um valor 0,5 mM causava necrose em cotilédones de plantas de algodão, também foi observada atividade fitotóxica em folhas de soja, tomateiro e folhas de tabaco (CRUTCHER et al., 2014).

O AF teve sua primeira atividade biológica reconhecida como inibidor da dopamina- β -hidroxilase em 1974, e a partir de então diversos estudos foram realizados apresentando atividades antioxidante, antiproliferativa, antitumoral etc.

(GOODWIN e SACK, 1974; TUNG et al., 2017; FERNANDEZ-POL et al., 1993). Atualmente, o ácido fusárico é conhecido como um composto de alta atividade biológica, entre elas antifúngica, antibacteriana, fitotóxica, inibidora enzimática imunotoxicidade,

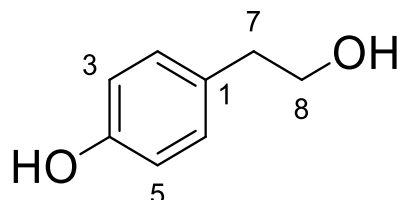
Dentre as atividades antimicrobianas podemos destacar alta atividade contra *Phytophthora infestans* CIM = 11 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (SON et al., 2008), *Agrobacterium tumefaciens* CIM = 11 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (SON et al., 2008), *Alternaria solani* CIM = 12,5 μM , (YANG et al., 2019) *Magnaporthe grisea* EC_{50} = 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, RIEGER et al 2010) *Bacillus cereus* CIM = 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (CHEN et al., 2013). E também foi testado quanto sua atividade em bactérias multirresistente a drogas sendo elas *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* apresentando CIM de 256, 256 e 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, (Zhang et al., 2021) importante resultado na busca de novos antibióticos.

Além disso, outras atividades também foram relatadas como também apresentou supressão da fotossíntese foliar (SINGH et al., 2017), atividade contra adultos do mosquito *Aedes aegypti* (BANI et al., 2014) e relatada pela primeira vez a inibição de 58% da atividade de papaína com 200 μM SILVA et al (2020). Estes resultados mostram a importância do estudo destes dois compostos em diversas áreas de pesquisa e geram uma expectativa para as análises dos seus derivados obtidos neste trabalho.

4.7.2 Tirosol (3)

O composto **3** foi observado nos cultivos axênicos de *C. horii* e nos experimentos de biotransformação e ele foi isolado por HPLC nos extratos AxFg28 e BAFCh28. O espectro de RMN de ^1H mostrado na figura 67 em CD_3COD revelou a presença de dois sinais de hidrogênios aromáticos integrando para 2 em δ_{H} 7,05 (2H, d, $J = 8,4$ Hz) e δ_{H} 6,72 (2H, d, $J = 8,4$ Hz), sinais característicos de um anel aromático dissubstituído em *para*, além disso, os deslocamentos químicos para estes hidrogênios indicam que uma das substituições seja um grupo hidroxila. O espectro também apresentou dois sinais tripletos de hidrogênios que acoplam entre si e um δ_{H} 2,73 (2H, t, $J = 7,2$ Hz) e o outro apresenta um deslocamento químico característico

de um hidrogênio de carbono ligado a hetero-átomo em δ_H 3,70 (2H, t, J = 7,2 Hz). Estes sinais estão coerentes com os encontrados na literatura e ambos mostrados na tabela 8 caracterizando o composto **3** como tirosol figura 67.



Tirosol (**3**)

Figura 67. Estrutura química do composto tirosol (**3**).

Tabela 8: Dados de RMN de ^1H do tirosol (**3**)

n	δ_H (400 MHz em CD_3OD)	Lin et al., (2008)
		δ_H (CD_3OD em 600 MHz)
2 e 6	7,05 (2H, d, J = 8,4 Hz)	7.01 (2H, dt, J = 8.7 Hz)
3 e 5	6,72 (2H, d, J = 8,4 Hz)	6.68 (2H, dt, J = 8.7 Hz)
7	2,73 (2H, t, J = 7,2 Hz)	2.70 (2H, t, J = 7.3 Hz)
8	3,70 (2H, t, J = 7,2 Hz).	3.67 (2H, t, J = 7.32 Hz)

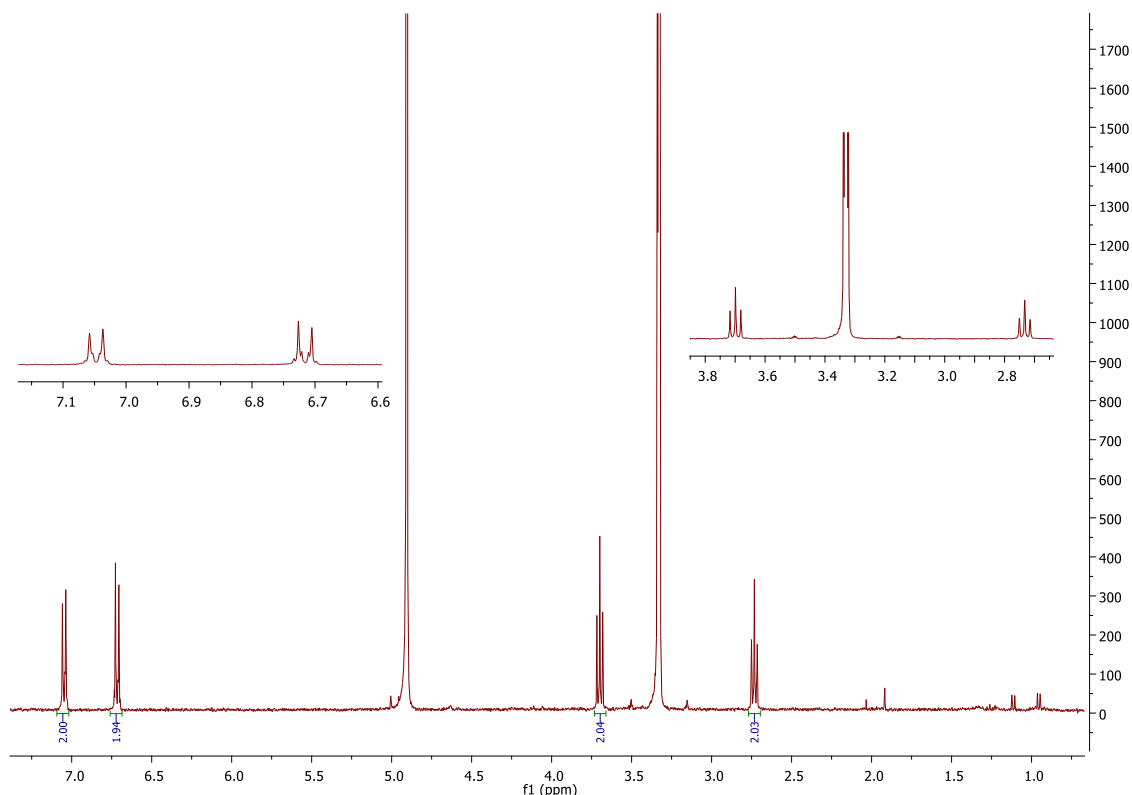


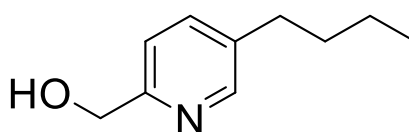
Figura 68. Espectro de RMN de ^1H do tirosol (MD_3OD em 400 MHz).

O tirosol é um composto derivado da tirosina ou tiramina e amplamente conhecido por estar envolvido em *Quorum sensing* e por mediar interações entre micro-organismos, sendo que seu acúmulo está diretamente correlacionado ao aumento da densidade de células fúngicas no meio de cultivo (CHUNG, et al., 2017; ALBUQUERQUE e CASADEVALL, 2012; SILVA et al., 2021; CHEN et al., 2016). O tirosol apresentou atividades antioxidantes (PRZYBYSZ et al., 2014; CHUNG, et al., 2017), antifúngicas (BÁIDEZ et al., 2006) e antibacteriana onde 10 μM do composto foi capaz de inibir o crescimento de *P. aeruginosa* em 50% (ABDEL-RHMAN et al., 2015).

4.7.3 Fusarinol (4)

O espectro de RMN de ^1H , figura 70, em acetona- D_6 do composto **4** mostrou semelhança com o composto **1**. Observou-se a presença de 4 sinais referentes a um substituinte n-butílica em δ_{H} 0,93 (3H, t, $J=7,4$ Hz), δ_{H} 1,36 (2H, sext, $J=7,4$ Hz), δ_{H} 1,60

(2H, quint, $J=7,8$ Hz), δ_H 2,63 (2H, t, $J=7,8$ Hz). O espectro apresentou 3 sinais de hidrogênios ligados a um núcleo piridínico com um deslocamento ligeiramente menor que o observado para o composto **1**, como já descrito, sendo eles δ_H 7,39 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), δ_H 7,61 (1H, dd, $J = 8,0$ e $2,0$ Hz) e δ_H 8,35 (1H, d, $J=2,0$ Hz). O sinal que não foi observado para o ácido fusárico, apenas no fusarinol, foi o simpleto em δ_H 4,65 integrando para 2H referentes a hidrogênios oximetilênicos. Estes sinais caracterizam o fusarinol, figura 69, e são condizentes com os valores obtidos da literatura como ilustrado na tabela 9.



Fusarinol (**4**)

Figura 69. Estrutura química do composto fusarinol (**4**).

Tabela 9: Dados de RMN de ^1H do fusarinol (**4**)

n	δ_H (400 MHz em acetona D_6)	CHEN et al., (2013).
		δ_H (CDCl_3 em 400 MHz)
3	7,39 (1H, d, $J = 8,0$ Hz)	7.18 (1H, d, $J = 7.8$ Hz)
4	7,61 (1H, dd, $J = 8,0$ e $2,0$ Hz)	7.42 (1H, d, $J = 7.8$ Hz)
6	8,35 (1H, d, $J=2,0$ Hz)	8.25 (C-6, 1H, bs),
7	2,63 (2H, t, $J=7,8$ Hz)	2.51 (2H, t, $J = 7.3$ Hz)
8	1,60 (2H, quint, $J=7,8$ Hz)	1,50 (2H, aparenta um quint, $J = 7.3$ Hz)
9	1,36 (2H, sext, $J=7,4$ Hz),	1.27 (2H, aparenta sext, $J = 7.3$ Hz)
10	0,93 (3H, t, $J=7,4$ Hz),	0.83 (3H, t, $J = 7.3$ Hz)
11	4,65 (2H, s)	4.66 (2H, s)

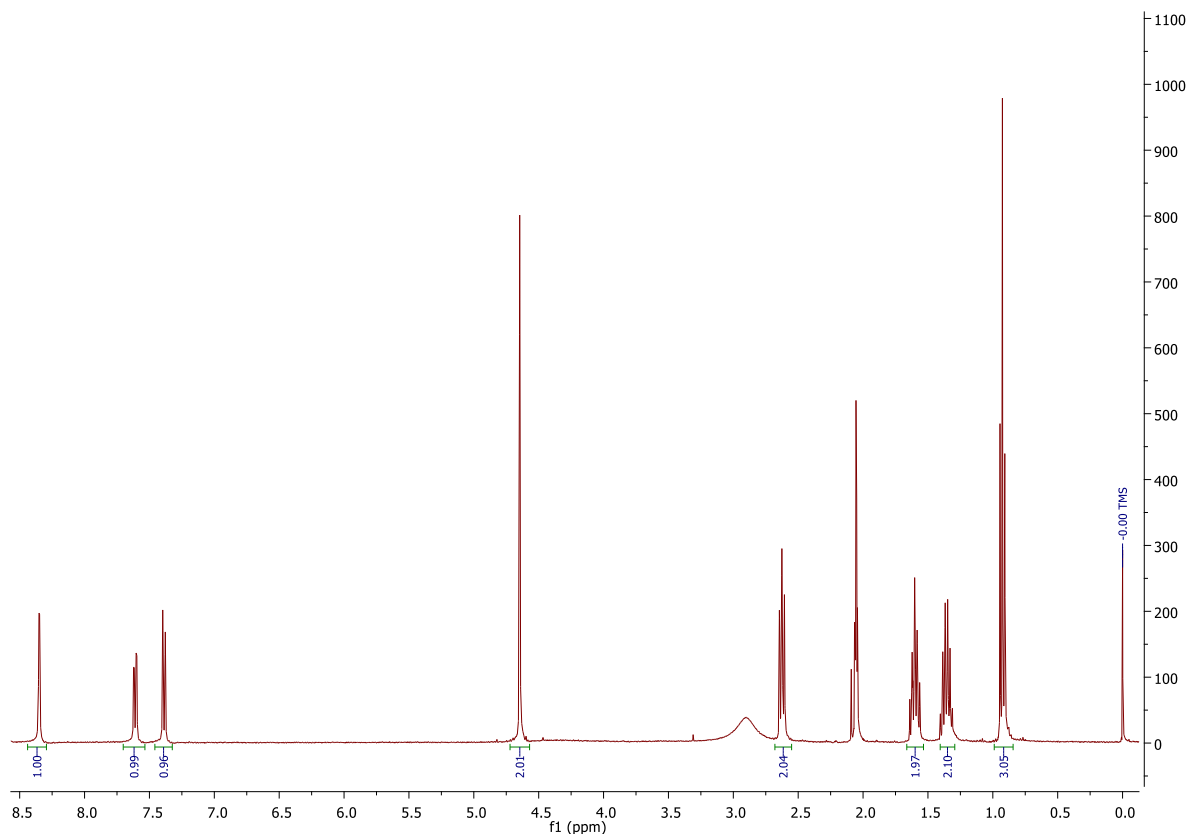


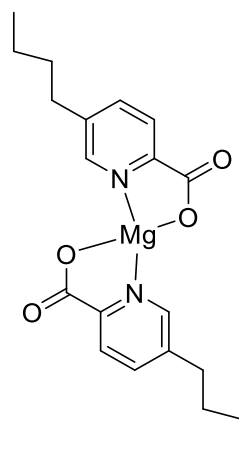
Figura 70. Sinais observados no espectro do fusarinol (Acetona D₆ em 400 MHz).

CRUTCHER e colaboradores (2014) descreveram a importância do ácido fusárico na virulência do fungo à planta e mostraram que um valor 0,5 mM causava necrose em cotilédones de plantas de algodão, enquanto que o para o fusarinol foi necessária uma concentração de 2,0 mM (CRUTCHER et al., 2014).

4.7.4 Complexo de ácido fusárico e magnésio (5) e Complexo de ácido 9,10-desidrofusárico (6)

As frações CoR14CLV6p3 e CoR28CLVp5 apresentaram um composto semelhante ao ácido fusárico (1) e sua estrutura foi proposta como a mostrada na figura 71. Seu espectro de RMN de ¹H, figura 72, apresentou uma cadeia lateral n-butílica sendo seus sinais δ_H 0,89 (6H, t, J = 7,4 Hz), 1,25 (4H, sext., J = 7,5 Hz), 1,54 (4H, quint., J = 7,6) e 2,65 (4H, t, 7,8 Hz) e apresentou sinais de um núcleo piridínico com sinais em δ_H 8,07 (2H, d, 8,1 Hz), 7,85 (2H, dd, J = 8,1 e 1,8 Hz) e 8,21 (2H, sl). Analisando os sinais de hidrogênio do núcleo piridínico é possível notar que

apresentaram diferenças significativas quando comparados com os do AF apresentando hidrogênio mais blindado na posição 6 e hidrogênios mais desblindados nas posições 3 e 4. Os sinais de hidrogênio da cadeia n-butila também apresentaram pequenas divergências. Os sinais podem ser comparados na tabela 10 a seguir.



Complexo de ácido fusárico com magnésio
Composto (5)

Figura 71. Estrutura química do composto complexo de ácido fusárico com magnésio (5).

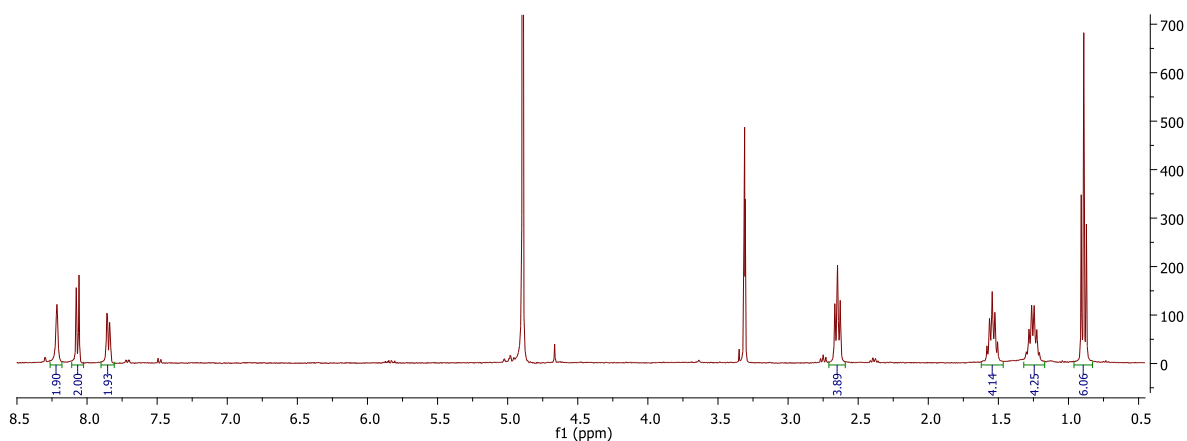


Figura 72. Espectro de RMN de ^1H do complexo ácido fusárico com magnésio (5) (CD_3OD em 400 MHz).

Tabela 10 Dados de RMN de complexo ácido fusárico com magnésio (5) e ácido fusárico (1)

n	Complexo ácido fusárico com magnésio δ_H (400 MHz, CD₃OD)	Ácido fusárico δ_H (400 MHz em CD₃OD)
3	8,07 (2H, d, J = 8,1 Hz)	7,93 (1H, d, J = 8,0 Hz)
4	7,85 (2H, dd, J = 8,1 e 1,8 Hz)	7,67 (1H, dd, J = 8,0 e 2,0 Hz)
6	8,21 (2H, sl)	8,39 (1H, s)
7	2,65 (4H, t, J = 7,8 Hz)	2,68 (2H, t, J = 7,7 Hz)
8	1,54 (4H, quint., J = 7,6)	1,63 (2H, quint., J = 7,7 Hz)
9	1,25 (4H, sext., J = 7,5 Hz)	1,38 (2H, sext., J = 7,5 Hz)
10	0,89 (6H, t, J = 7,4 Hz)	0,95 (3H, t, J = 7,4 Hz)

Dessa forma, o composto foi levado para análise de espectrometria de massas de alta resolução e seu espectro de massas é mostrado na figura 73 (A) a seguir, junto com o espectro do ácido fusárico (B) para comparação.

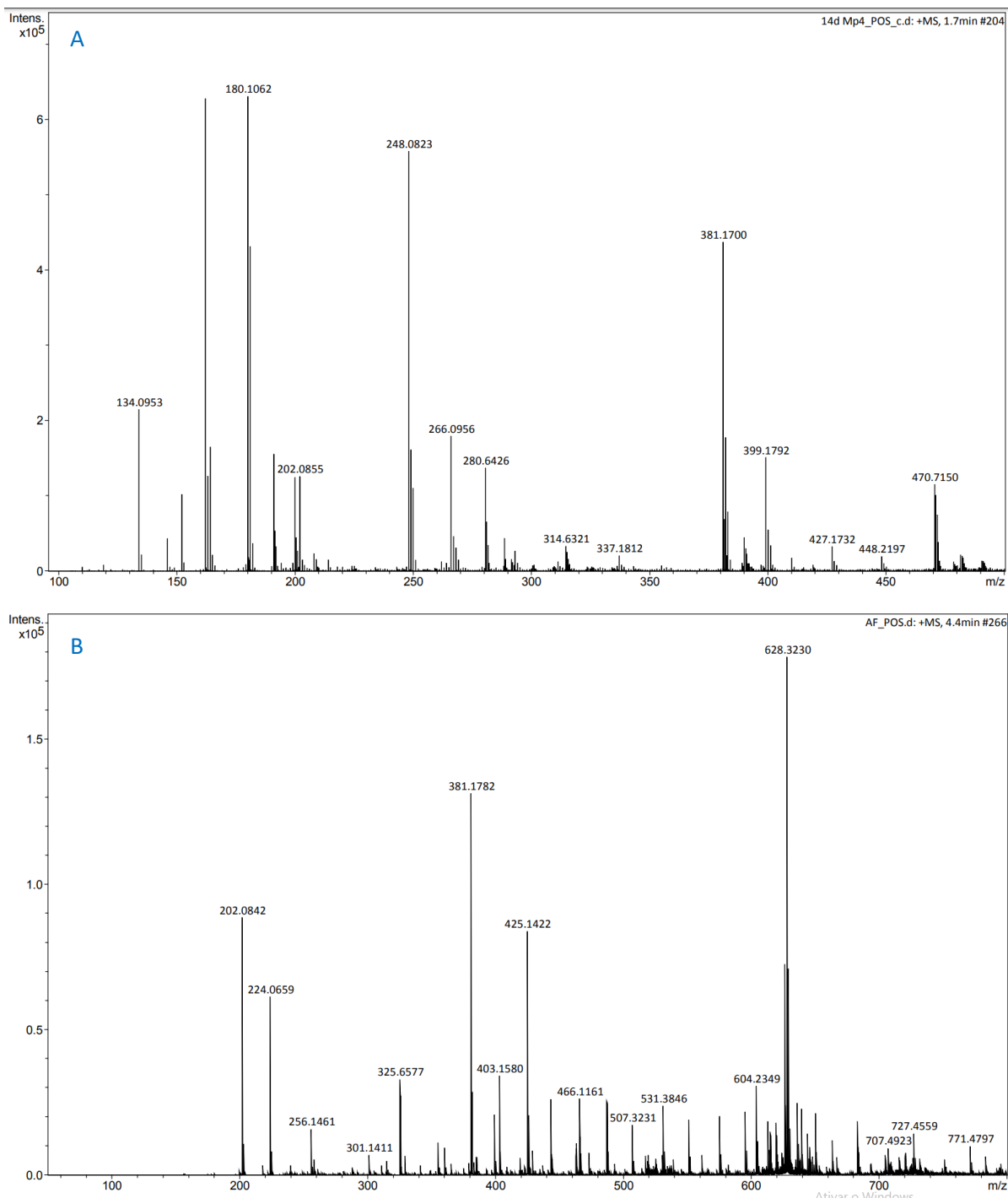
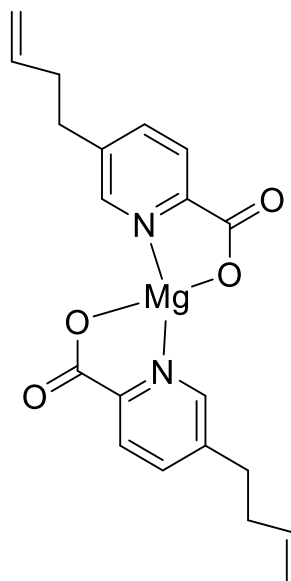


Figura 73. Espectros de massas (EI) obtido dos compostos complexo ácido fusárico e magnésio (**5**) (**A**) e ácido fusárico (**1**) (**B**).

No espectro de massas do composto **5**, figura 73 (**A**), é possível observar o íon m/z 180 referente ao $[AF+H]^+$, um íon m/z 164 de AF-16 e m/z 202 de $[AF+Na]^+$. Comparando com o espectro obtido para o ácido fusárico (**B**) é possível notar

divergências, principalmente que não foi observado o íon m/z 180 referente ao $[AF+H]^+$ apenas o m/z 202 de $[AF+Na]^+$, isto pode indicar que a formação do m/z 180 em (A) pode ser decorrência da fragmentação do complexo liberando uma unidade de AF o que não ocorreu em (B). Outra principal diferença é a presença do íon m/z 248 em (A) e íon m/z 222 em (B) uma diferença de 24 massa referente ao elemento magnésio (Mg). Isto sugere uma possível complexação com magnésio, como observado na figura 71, apresentando uma massa de 380 o que pode ser evidenciado pela presença do íon m/z 381 referente a $[M+H]^+$. O íon m/z 381 também aparece no espectro de massas (B) do padrão de AF e esta massa pode ser referente a um complexo de duas unidades de AF complexada com sódio resultando numa massa de 381. Para diferenciar estas duas possibilidades analisou-se as massas exatas teóricas dos complexos com magnésio (381,1665) e sódio (381,1790) comparando com a massa experimental exata de 381,1700 obtido no espectro (A) do composto 5. Notou-se uma diferença de 9 ppm para o complexo com magnésio e 24 ppm para complexo com sódio, uma diferença alta para espectrometria de massas de alta resolução, indicando um complexo com magnésio. Analisando o íon 381,1782 obtido no padrão de AF, espectro (B), e comparando com a massa exata teórica de um complexo de AF com sódio (381,179028) notou-se uma diferença de 2 ppm, indicando que este íon são duas unidades de AF mais sódio que se formou durante a análise. Os íons m/z 280 ($C_{15}H_{16}MgN_2O_2^+$) e 266 ($C_{14}H_{14}MgN_2O_2^+$) também são condizentes com a estrutura sugerida. Dessa forma o composto 5 foi proposto como complexo de ácido fusárico com magnésio, figura 71.



Complexo de ácido 9,10-desidrofusárico
com magnésio
Composto (6)

Figura 74. Estrutura química do composto complexo de ácido 9,10-desidrofusárico com magnésio (6).

O composto complexo de ácido 9,10-desidrofusárico com magnésio (6), figura 74, foi isolado da fração CoR28CLV5p4 e seu espectro de RMN de ^1H , figura 75, apresentou muito semelhante ao do ácido 9,10-desidrofusárico (2) com divergências como observado no composto 5, espectro observado na figura 75 os sinais obtidos bem como os do ADF para comparação estão na tabela 11.

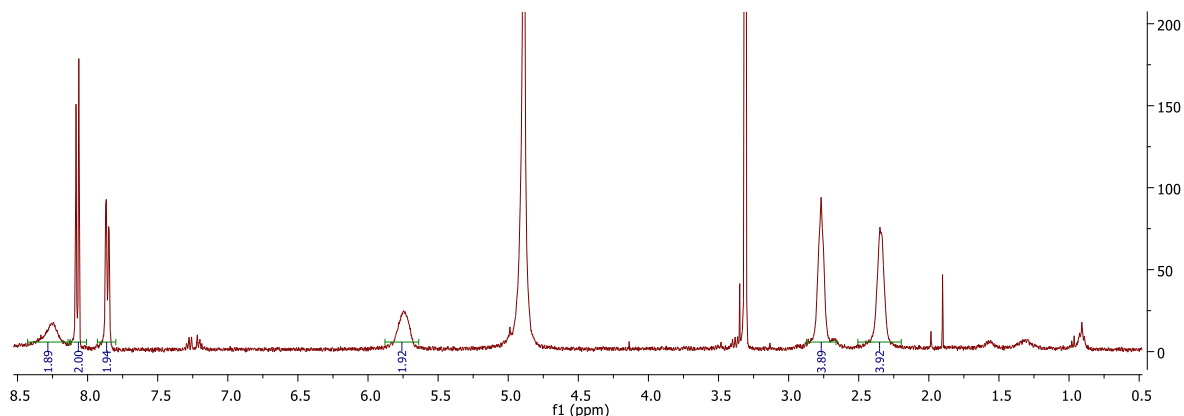


Figura 75. Espectro de RMN de ^1H do complexo ácido 9,10-desidrofusárico com magnésio (**6**) (CD_3OD em 400 MHz).

Tabela 11. Dados de RMN de complexo ácido 9,10-desidrofusárico com magnésio (**6**) e ácido 9,10-desidrofusárico (**2**).

	Complexo do ácido 9,10- desidrofusárico com magnésio	Ácido 9,10-desidrofusárico
N	δ_{H} (400 MHz, CD_3OD)	δ_{H} (400 MHz em CD_3OD)
3	8,07 (2H, d, J = 8,0 Hz)	7,94 (1H, d, J = 8,0 Hz)
4	7,86 (2H, dd, J = 8,0 e 1,7 Hz)	7,69 (1H, dd, J = 8,0 e 2,2 Hz),
6	8,25 (2H, sl)	8,39 (1H, sl)
7	2,77 (4H, m)	2,77 (2H, t, J= 7,5 Hz)
8	2,34 (4H, m)	2,37 (2H, q, J=7,4 Hz),
9	5,74 (2H, m)	5,84 (1H, ddt, J = 6,5; 10,2; 17,0 Hz)
10A	4,86-4,92 (m)	4,97 (1H, m),
10B		5,01 (1H, m)

O composto também foi levado para espectrometria de massa e seu espectro é mostrado na figura 76.

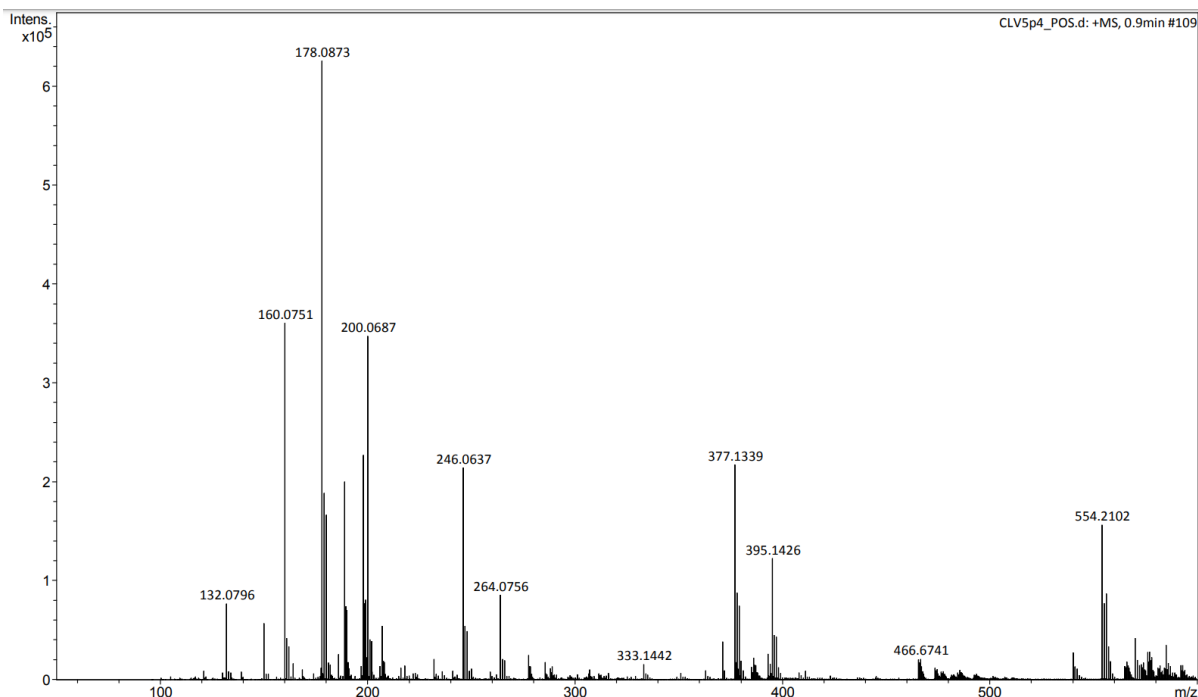


Figura 76. Espectro de massas (EI) obtido do composto complexo ácido 9,10-desidrofusárico e magnésio (**6**).

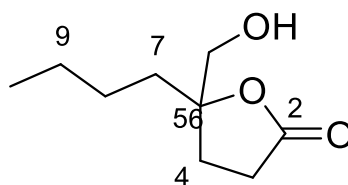
No espectro de massas do composto **6** ficou muito semelhante ao do composto **5**, sendo possível observar o íon m/z 377 ($M+H^+$) que corresponde a duas unidades de ADF complexado com magnésio. Os íons m/z 178 e 200 correspondem a $[ADF+H]^+$ e $[ADF+Na]^+$ e os íons m/z 246 ($C_{11}H_{12}MgNO_4^+$) e 264 ($C_{14}H_{12}MgN_2O_2^+$) são fragmentações do complexo que também foram observadas no composto **5**. Além disso, analisando a massa exata teórica da estrutura proposta (377,1351) e comparando com a massa experimental exata obtida (377,1339), foi obtido uma diferença de 3 ppm entre elas. Dessa forma, a partir destas evidências o composto foi sugerido como ácido 9,10-desidrofusárico e magnésio (**6**), figura 74.

Estes dois compostos foram obtidos a partir do cocultivo do fungo *F. guttiforme* e *C. horii* nos dias 14 e 28 e também foi observado sua presença em 21 dias. Não foram observadas suas presenças nos cultivos axênicos, este resultado mostra a importância da realização de cocultivo na busca e novos compostos.

4.7.5 5-Butil-5-(hidroximetil)diidrofuranona (7)

O espectro de RMN de ^1H da fração 1.2.1.4.B, figura 78, revelou a presença de dois sinais de hidrogênios oximetilênicos δ_{H} 3,54 (1H, d, $J=12,0$ Hz) e 3,75 (1H, d, $J=12,0$ Hz), um sinal de hidrogênios metílicos δ_{H} 0,91 (3H, t, $J= 7,0$ Hz), 2 sinais hidrogênios α à carboxila δ_{H} 2,58 (1H, ddd, $J= 6,4; 10,6; 18,2$ Hz) e δ_{H} 2,69 (1H, ddd, $J= 7,0 ; 10,7; 18,2$ Hz) e outros 2 hidrogênios δ_{H} 2,00 (1H, ddd, $J= 7,0; 10,6; 13,0$ Hz) e δ_{H} 2,27 (1H, ddd, $J= 6,4; 10,7; 13,0$ Hz)

Analisando-se as constantes de acoplamento percebe-se que os hidrogênios α à carboxila estão num mesmo carbono e apresentando uma constante de acoplamento geminal de 18,2 Hz, estes hidrogênios estão vizinhos aos hidrogênios em δ_{H} 2,00 e 2,27 e que também apresentam constante de acoplamento geminal de 13,0 Hz. A ausência de outros picos sugere que o composto seja uma lactona de 5 membros sendo um dos carbonos centro estereogênico dissustituído, resultando em dois hidrogênios oximetilênicos que não são magneticamente equivalentes, valores mostrados na tabela 12.

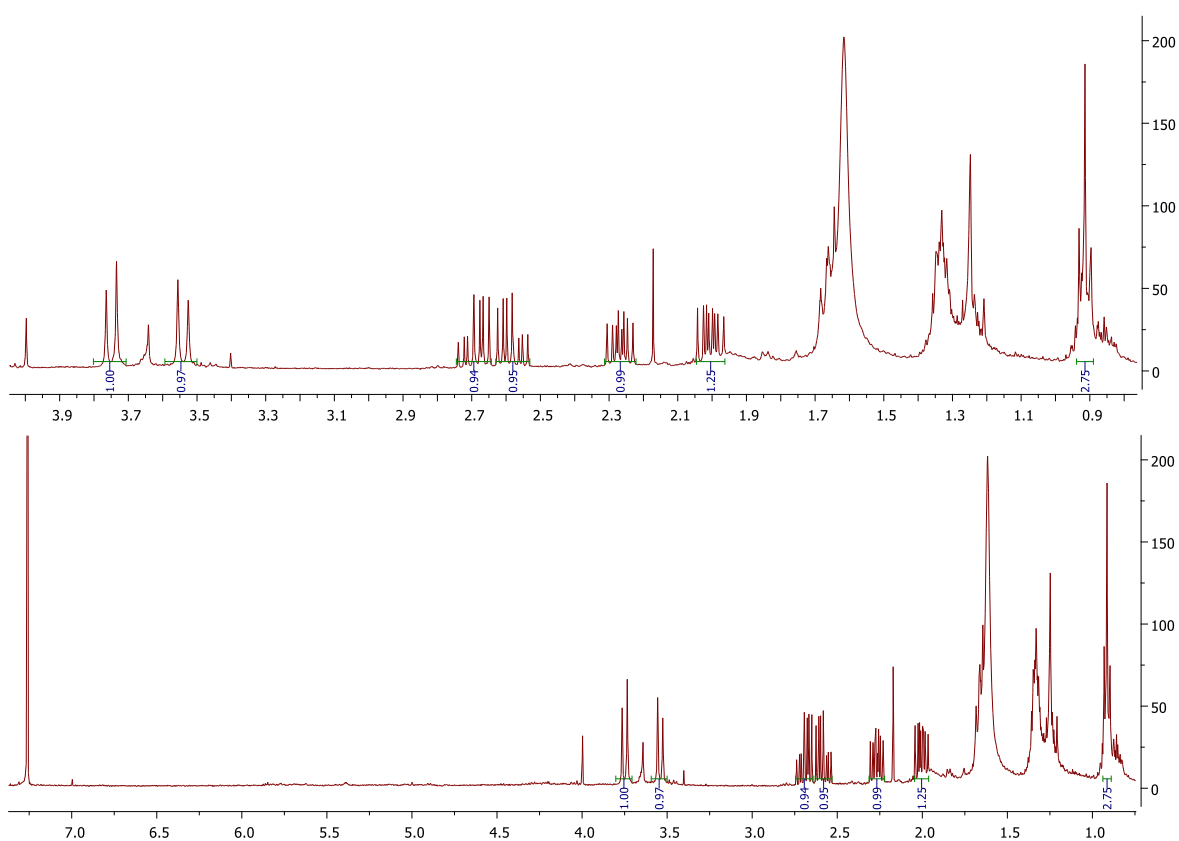


5-butil-5-(hidroximetil)dihidrofuranona (7)

Figura 77. Estrutura química do composto 5-Butil-5-(hidroximetil)diidrofuranona (7).

Tabela 12. Dados de RMN de 5-Butil-5-(hidroximetil)diidrofuranona (7)

n	δ_H (400 MHz em $CDCl_3$)
3a	2,58 (1H, ddd, J= 6,4; 10,6; 18,2 Hz)
3b	2,69 (1H, ddd, J= 7,0; 10,7; 18,2 Hz)
4a	2,00 (1H, ddd, J= 7,0; 10,6; 13,0 Hz)
4b	2,27 (1H, ddd, J= 6,4; 10,7; 13,0 Hz)
6a	3,54 (1H, d, J=12,0 Hz)
6b	3,75 (1H, d, J=12,0 Hz)
7	1,55- 1,70 (m)
8	1,2-1,4 (m)
9	1,2-1,4 (m)
10	0,91 (3H, t, J= 7,0 Hz)

**Figura 78.** Sinais observados no espectro do 5-butil-5-(hidroximetil)diidrofuranona ($CDCl_3$ em 400 MHz).

Para determinar a cadeia lateral desta lactona, que apresenta um grupo metil, realizou-se a espectrometria de massas do composto representado na figura 79. Não foi observado o pico do íon molecular de maior massa, mas observou-se um íon m/z 141, cuja massa corresponde a uma lactona de 5 membros e uma cadeia lateral com grupo n-butil observado na figura 79. Outra evidência da presença do substituinte n-butil é o íon m/z 57. Fragmentos observados no espectro de massas utilizados na elucidação estrutural dessa substância são mostrados na figura 80 seguir.

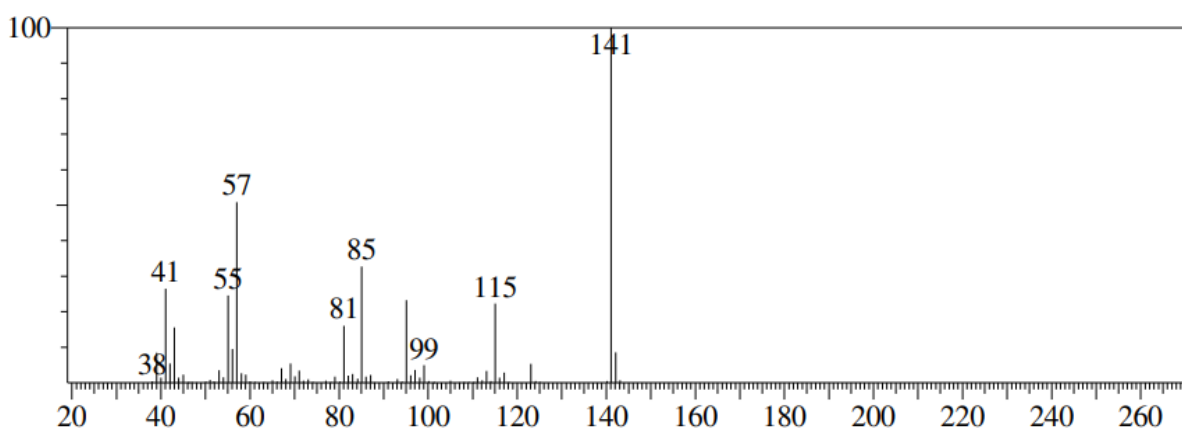


Figura 79. Espectro de massas (EI) obtido do composto 5-butil-5-(hidroximetil)diidrofuranona.

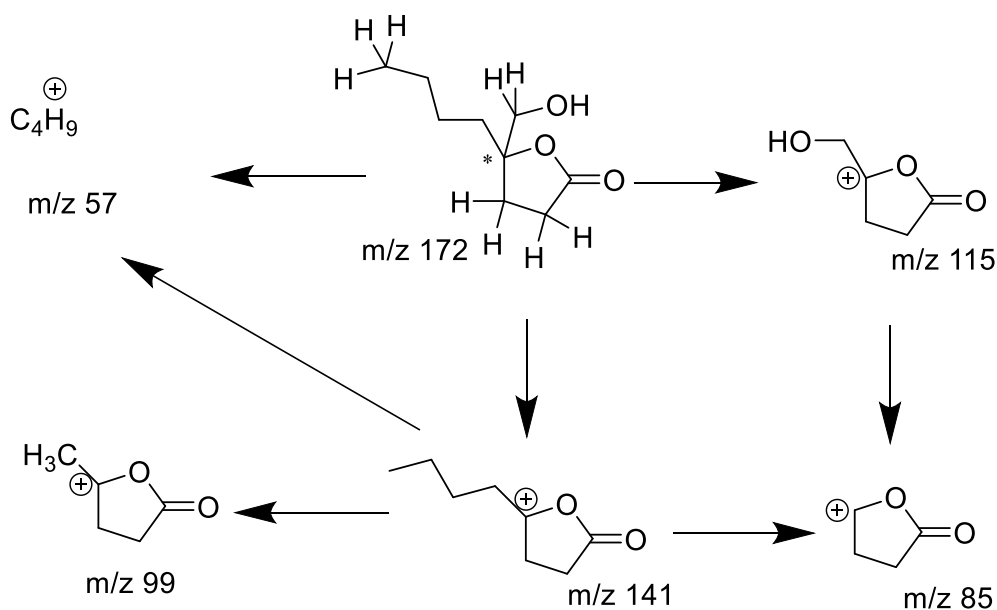
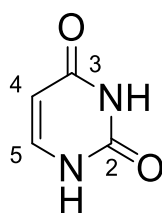


Figura 80. Estrutura proposta e seus fragmentos observados no espectro de massas

Esta lactona não foi encontrada na literatura indicando um possível composto inédito, os compostos semelhantes descritos apresentaram cadeia lateral de 3 ou 6 membros num estudo de síntese de γ -lactonas por TRIANDAFILLIDI et al., (2019).

4.7.6 Uracila (**8**)

O composto **8** (figura 81) foi isolado do cocultivo em meio Czapek, CoLC28, e análise do seu espectro de RMN de ^1H , figura 82, mostrou a presença de dois sinais em δ_{H} 5,61 (H, d, $J = 7,7$ Hz), δ_{H} 7,40 (1H, d, $J = 7,7$ Hz). A comparação dos seus deslocamentos químicos com a literatura concluiu-se se tratar da base nitrogenada uracila.



Uracila (**8**)

Figura 81. Estrutura química do composto uracila (**8**).

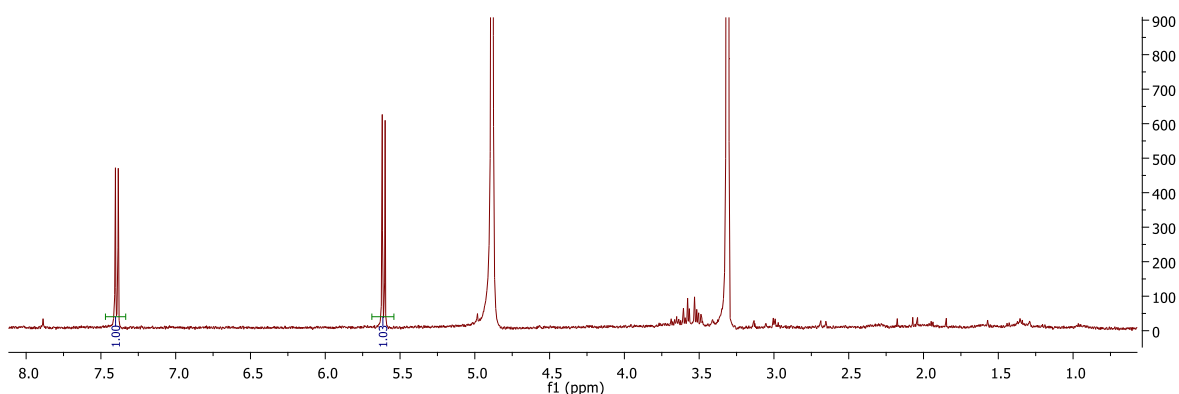
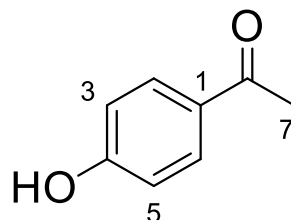


Figura 82. Espectro de RMN de ^1H da uracila (CD_3OD em 400 MHz).

4.7.7 *p*-Hidroxiacetofenona (9)

Os espectros de RMN ^1H das frações CoLC28Cp3 e EPGFg28p7.4 foram muito semelhantes, apresentando dois sinais com deslocamento químico característico de hidrogênios aromáticos ambos integrando para 2H. Estes sinais ainda mostraram multiplicidade característica de substituições no anel na posição *para* (1 e 4) sendo eles δ_{H} 7,88 (2H, d, $J = 8,8$ Hz) e δ_{H} 6,83 (2H, d, $J = 8,8$ Hz). Também observou-se a presença de um sinal com deslocamento químico de metila em posição- α a uma carbonila em δ_{H} 2,52 (3H, s). O espectro de RMN ^1H pode ser observado na figura 84, e seus valores podem ser comparados aos da literatura na tabela 13.



p-hidroxiacetofenona (9)

Figura 83. Estrutura química do composto *p*-hidroxiacetofenona (9).

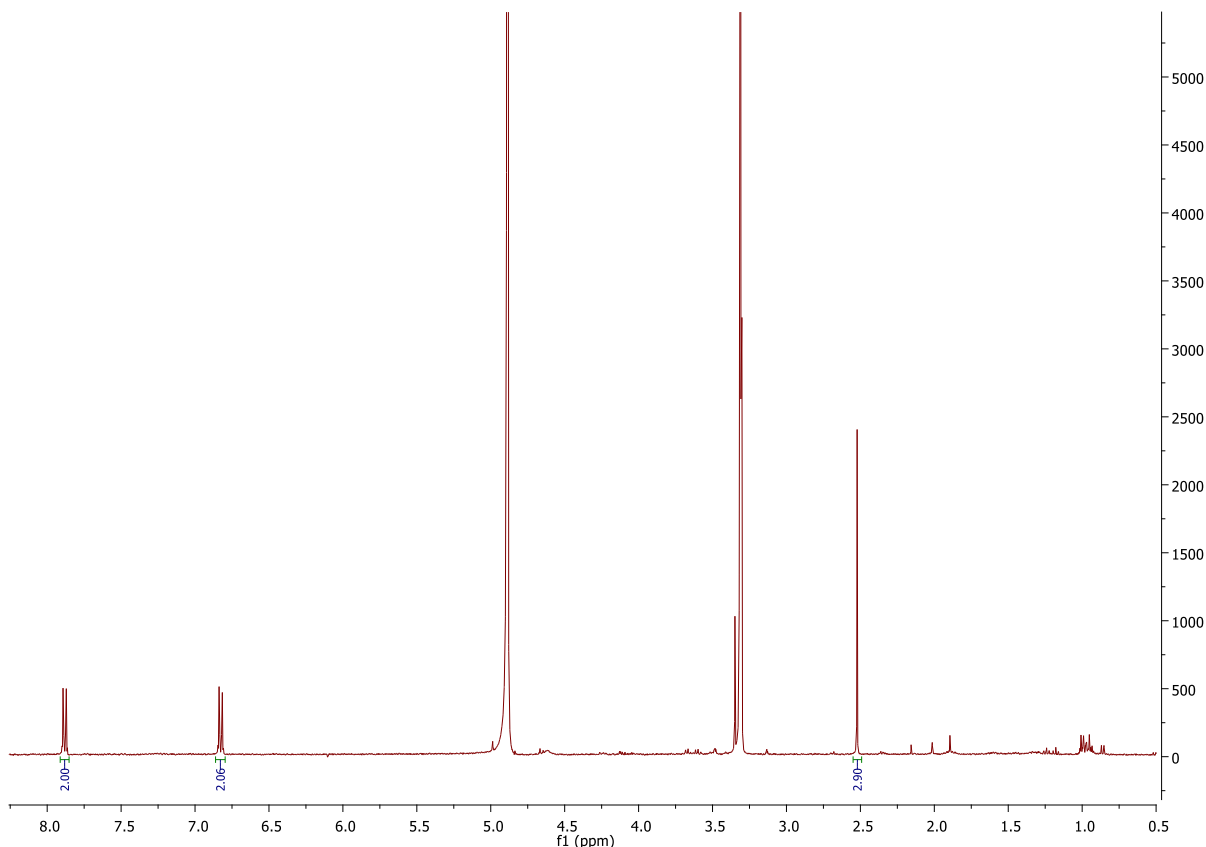


Figura 84. Espectro de RMN de ^1H *p*-hidroxiacetofenona (CD_3OD em 400 MHz).

Tabela 13: Dados de RMN de ^1H da *p*-hidroxiacetofenona (**9**)

n	δ_{H} (400 MHz em CD_3OD)	CHOU et al., (2012)
		δ_{H} (500 MHz, CDCl_3)
7	2,52 (3H, s)	2.58 (s, 3H)
2 e 6	7,88 (2H, d, J = 8,8 Hz)	7.90 (d, J = 8.5 Hz, 2H)
3 e 5	6,83 (2H, d, J = 8,8 Hz)	6.95 (d, J = 8.5 Hz, 2H)

A partir do espectro de massas do composto (figura 85) observou-se o pico do íon molecular m/z 136 que está de acordo com as informações obtidas por RMN de ^1H e os demais íons de fragmentações m/z 121, 93 e 65 são condizentes com a estrutura proposta, caracterizando o composto 4-hidroxiacetofenona (**9**), figura 83, também conhecido por piceol. Na literatura a *p*-hidroxiacetofenona foi relatada como hepatoprotetor, possuindo atividade anti-hepatite B e também alguns efeitos anti-inflamatórios (ZHAO et al., 2015; CHING-WEN et al., 2017)

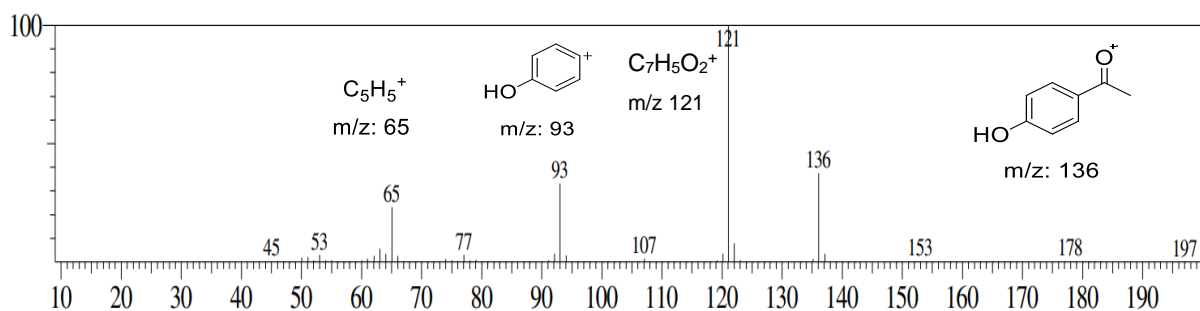
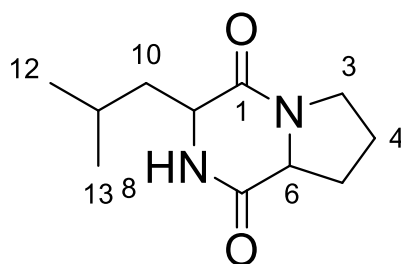


Figura 85. Espectro de massas (EI) obtido do composto *p*-hidroxiacetofenona

4.7.8 Diketopiperazina ciclo prolina-leucina (**10**)

O composto **10**, figura 86, foi isolado no cocultivo em meio Czapek e não foi observada sua presença no cocultivo em meio PDB ou no cultivo axênico de ambos os fungos. Ao realizar o cultivo do fungo *F. guttiforme* na presença de um modificador epigenético foi possível observar uma mudança no perfil do extrato e dentre os compostos isolados foi possível obter o mesmo composto **10** confirmado por análises de RMN de ^1H . O espectro de RMN ^1H , figura 87, mostrou a presença de dois sinais referentes a hidrogênios metílicos em δ_{H} 0,96 (3H, d, $J = 6,2$ Hz) e δ_{H} 0,97 (3H, d, $J=6,2$ Hz). É possível observar sinais multipletos em δ_{H} 1,52 (1H, m) e δ_{H} 2,31 (1H, m), e sinais de hidrogênios de carbono ligado a um heteroátomo em δ_{H} 3,49 - 3,53 (2H, m), δ_{H} 4,13 (1H, m) e δ_{H} 4,26 (1H, m). Outros sinais são observados entre 1,7 e 2,2 ppm e suas atribuições são mostrados na tabela 14 em comparação com os dados obtidos da literatura. Os deslocamentos químicos observados para os hidrogênios são característicos de diketopiperazinas derivadas de aminoácidos não aromáticos e o sinal em 4,26 ppm é condizente com um resíduo de aminoácido leucina, enquanto os sinais de hidrogênios metilênicos e metínicos são característicos de um resíduo de aminoácido prolina.



Diketopiperazina ciclo prolina-leucina (**10**)

Figura 86. Estrutura química do composto diketopiperazina ciclo prolina-leucina (**10**)

Tabela 14: Dados de RMN de ^1H da diketopiperazina ciclo prolina-leucina (**10**)

n	δ_{H} (500 MHz em CD_3OD)	δ_{H} (HWANG et al., 2017) (400 MHz, CDCl_3)
3	3,49 - 3,53 (2H, m)	3,51 (1H, m)
		3,63 (1H, m)
4	1,85 - 2,08 (2H, m)	1,88 (1H, m)
		2,01 (1H, m)
5	2,31 (1H, m) 1,85 - 2,08 (1H, m)	2,38 (1H, m)
		2,01 (1H, m)
6	4,13 (1H, m)	4,07 (1H, dd, J= 6,4 e 9,2)
9	4,26 (1H, dd, J= 7,4 e 8,2 Hz)	4,00 (1H, m)
10	1,52 (1H, m) 1,85 - 2,08 (1H, m)	1,63 (1H, m)
		1,77 (1H, m)
11	1,85 - 2,08 (1H, m)	1,63 (1H, m)
12	0,96 (3H, d, J = 6,2 Hz)	0,94 (3H, d, J = 6,8)
13	0,97 (3H, d, J = 6,2 Hz)	0,98 (3H, d, J = 6,8)

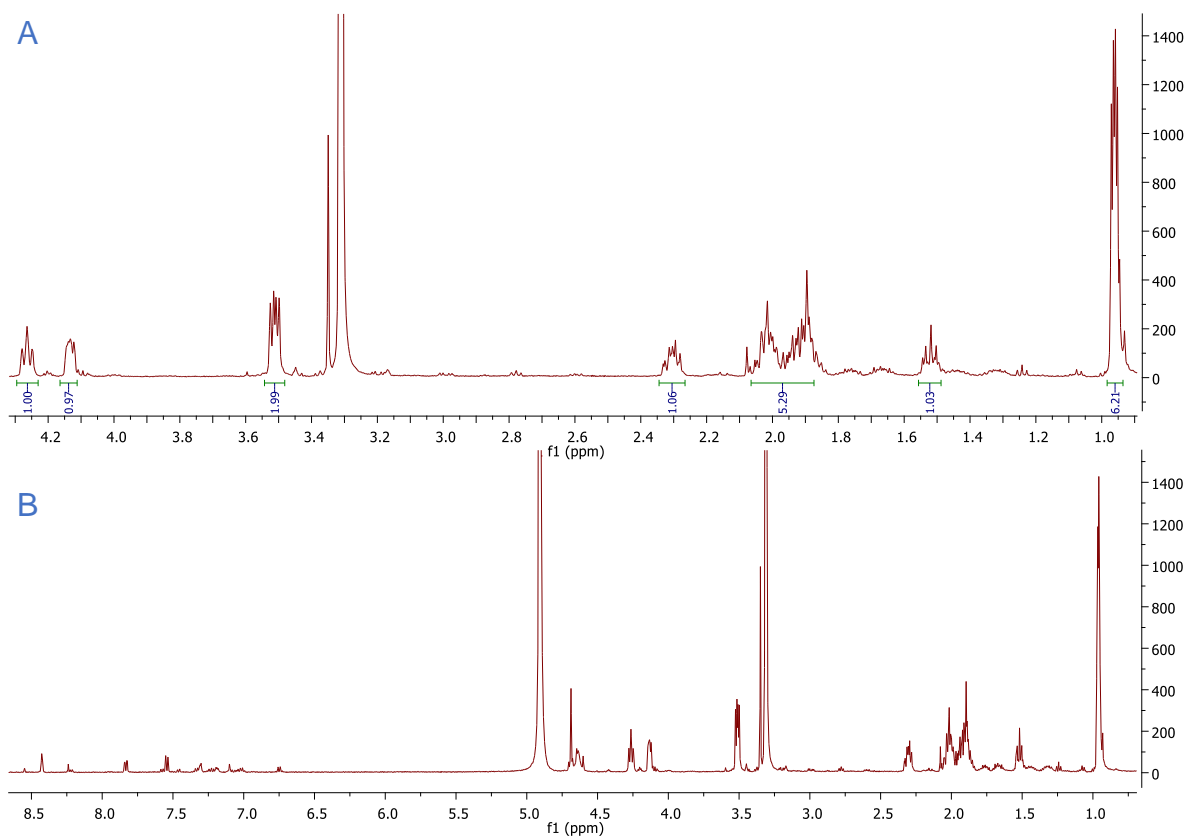


Figura 87. Espectros de RMN de ^1H da dicetopiperazina ciclo prolina-leucina (CD_3OD em 500 MHz). **(A)** O espectro ampliado. **(B)** O espectro completo.

A análise desta fração por CG/EM revela no seu espectro de massas o íon molecular de maior massa m/z 210 condizente com os dados obtidos de RMN de ^1H , figura 88. Também foram observados os íons m/z 154 e m/z 70 característicos de fragmentações de dicetopiperazinas, íons foram condizentes com os encontrados na literatura (WANG et al., 2010). A comparação destes dados com os da literatura permitiu atribuir a estrutura do composto **10** como dicetopiperazina ciclo prolina-leucina.

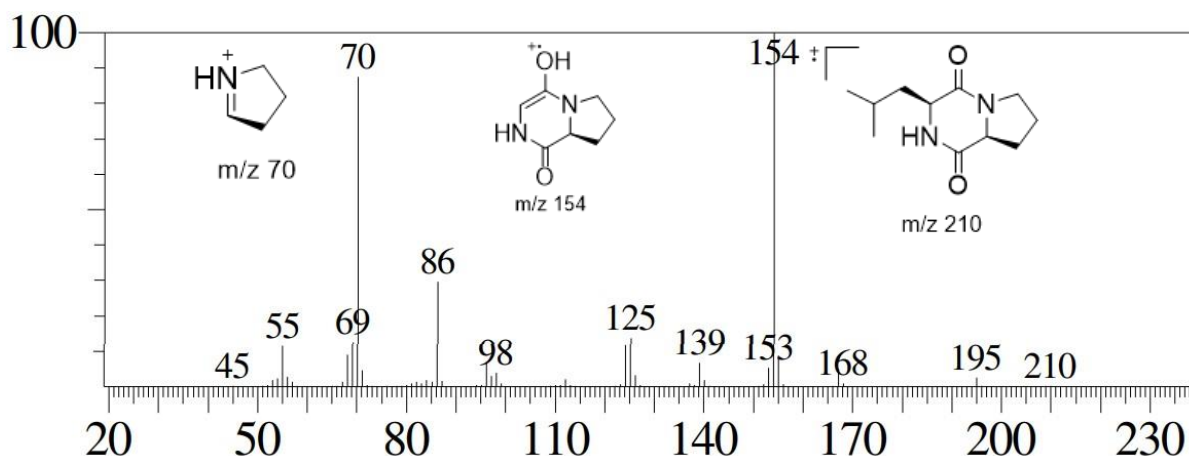


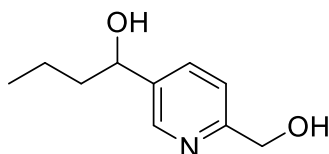
Figura 88. Espectro de massas (EI) obtido do composto dicetopiperazina ciclo prolina-leucina

A dicetopiperazina ciclo prolina-leucina foi relatada com uma grande atividade inibitória para papaína de 94% e atividade mediana para catepsina V e B numa concentração de 50 μM , além disso também apresentou atividade antimicrobiana inibindo o crescimento de bactérias como *B. subtilis* e *E. coli* e fungos *P. expansum* e *F. oxysporum* dentre outros. Também apresentou um efeito positivo quanto atividade antialérgicas podendo ser utilizado componente alimentar funcional ou como ingrediente farmacêutico ativo para pacientes alérgicos (SILVA et al., 2020; KUMAR et al., 2014; XIE et al., 2017).

4.7.9 7-Hidroxifusarinol (**11**)

O composto **11**, figura 89, foi obtido da biotransformação do ácido fusárico pelo *C. horii* num período de 28 dias e seu espectro de RMN de ^1H , figura 90, apresentou 3 sinais de hidrogênios característicos de um núcleo piridínico em δ_{H} 7,43 (1H, d, $J = 8,20$ Hz), δ_{H} 7,75 (1H, dd, $J = 8,0$ e $2,1$ Hz) e δ_{H} 8,47 (1H, d, $J = 1,8$ Hz) sinais com deslocamento químicos semelhantes ao do fusarinol indicando uma redução da carboxila a álcool. Uma diferença foi notada nos hidrogênios da cadeia alquílica do composto referente aos sinais de hidrogênios multipletos integrando para 1. Um sinal em 4,72 (1H, m) característico de grupo hidroxila indica a presença de um substituinte

na cadeia n-butila e ao comparar os sinais com o do fusarinol (4) esta substituição seria na posição 7, confirmado posteriormente pela espectrometria de massas. Os hidrogênios nas posições 8 e 9 não são magneticamente equivalentes, possuindo deslocamento químicos diferentes e aparecendo como multipletos, estes sinais e os dos hidrogênios metílicos podem ser visualizados na tabela 15.



7-Hidroxifusarinol (11)

Figura 89. Estrutura química do composto 7-hidroxifusarinol (11)

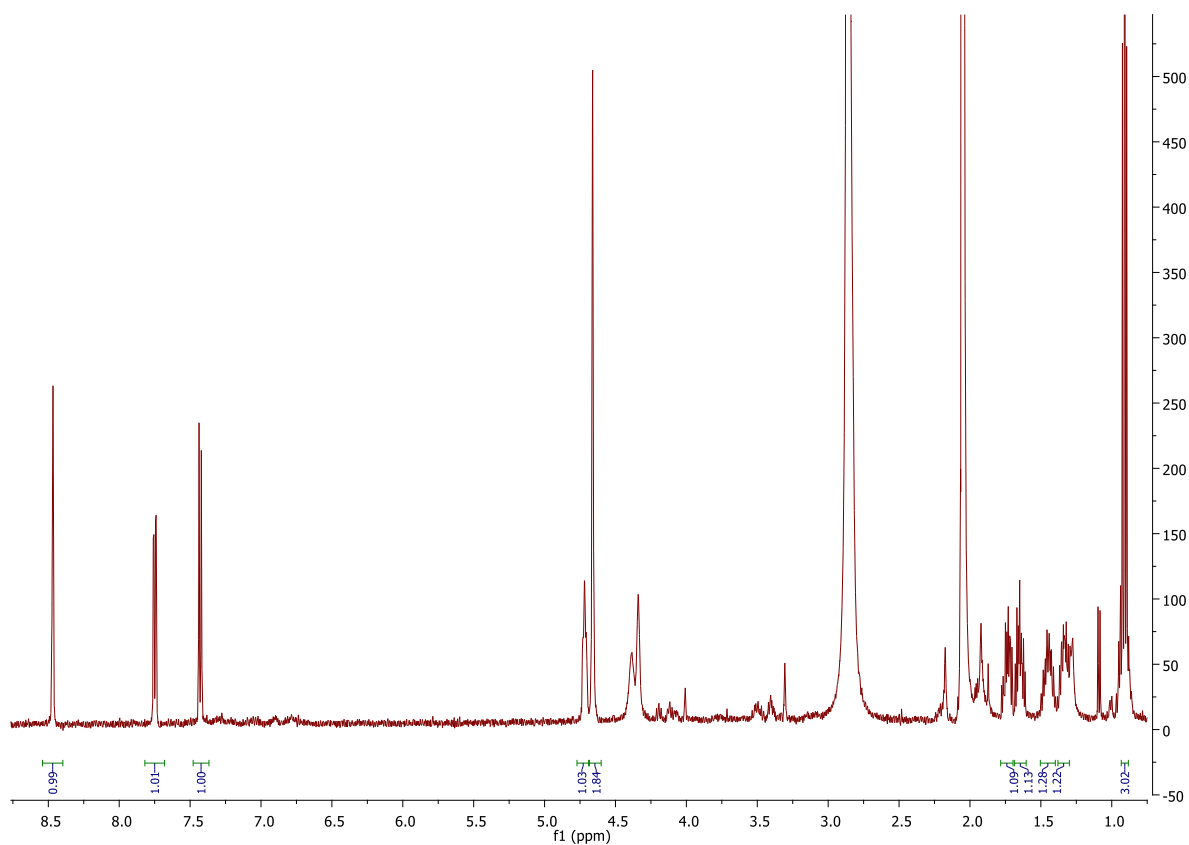


Figura 90. Sinais observados no espectro do 7-hidroxifusarinol (acetona-D⁶ em 500 MHz).

Tabela 15: Dados de RMN de ^1H do composto 7-hidroxifusarinol (**11**).

n	δ_{H} (500 MHz em acetona- D_6)
3	7,43 (1H, d, J = 8,1 Hz)
4	7,75 (1H, dd, J = 8,1 e 2,0 Hz)
6	8,47 (1H, d, J = 2,0 Hz)
7	4,72 (1H, m)
8a	1,73 (1H, m)
8b	1,65 (11,73 (1H, m)
9a	1,45 (1H, m)
9b	1,34 (1H, m)
10	0,91 (3H, t, J = 7,5 Hz)
11	4,66 (2H, s)

O espectro de massas do composto, figura 91, apresentou um íon molecular de maior massa m/z 181 e um íon em m/z em 138 indicando a possibilidade de uma oxidação adicional ao fusarinol. Além disso, o íon m/z 138 formado a partir de uma clivagem α indica que a segunda hidroxila está localizada na posição 7 do substituinte n-butila.

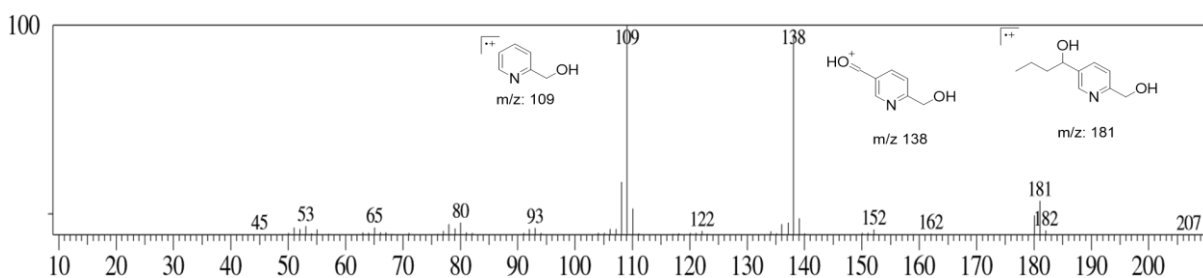


Figura 91. Espectro de massas (EI) obtido do composto 7-hidroxifusarinol.

A partir destas informações o composto **11** foi denominado 7-hidroxifusarinol. Este composto não foi encontrado na literatura o que indica ser inédito.

4.7.10 9,10-Desidrofusarinol (**12**)

O composto **12**, figura 92 foi obtido da biotransformação do ácido 9,10-desidrofusárico pelo fungo *C. horii* em 7 dias de crescimento, extrato BADFCh7, seu espectro de RMN de ^1H , figura 93, mostrou a presença de 3 hidrogênios vinílicos em δ_{H} 5,86 (1H, ddt, $J = 6,6; 10,2; 17,0$ Hz), em δ_{H} 5,02 (1H, d, $J = 17,0$ Hz) e δ_{H} 4,95 (1H, d, $J = 10,2$ Hz) característicos de uma ligação dupla terminal como observado no ADF o composto precursor. Observou-se ainda a presença de 3 hidrogênios de um núcleo piridínicos em δ_{H} 7,39 (1H, d, $J=8,0$), δ_{H} 7,63 (1H, dd, $J=8,0$ e $2,1$ Hz), δ_{H} 8,36 (1H, sl), além de dois sinais em 2,38 (2H, q, $J=7,4$ Hz) e δ_{H} 2,72 (2H, t, $J= 7,8$ Hz) e um sinal de hidrogênios oximetilênicos em 4,64, estes sinais podem ser observados na tabela 16. A presença de sinais oximetilênicos e hidrogênios piridínicos mais blindados em comparação ao ADF indicam uma redução do grupo carboxílico a álcool, como observado para o ácido fusárico e o composto **12** foi denominado 9,10-desidrofusarinol.

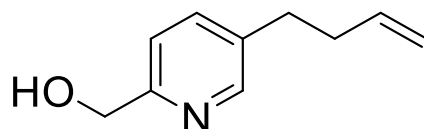
9,10-desidrofusarinol (**12**)

Figura 92. Estrutura química do composto 9,10-desidrofusarinol (**12**).

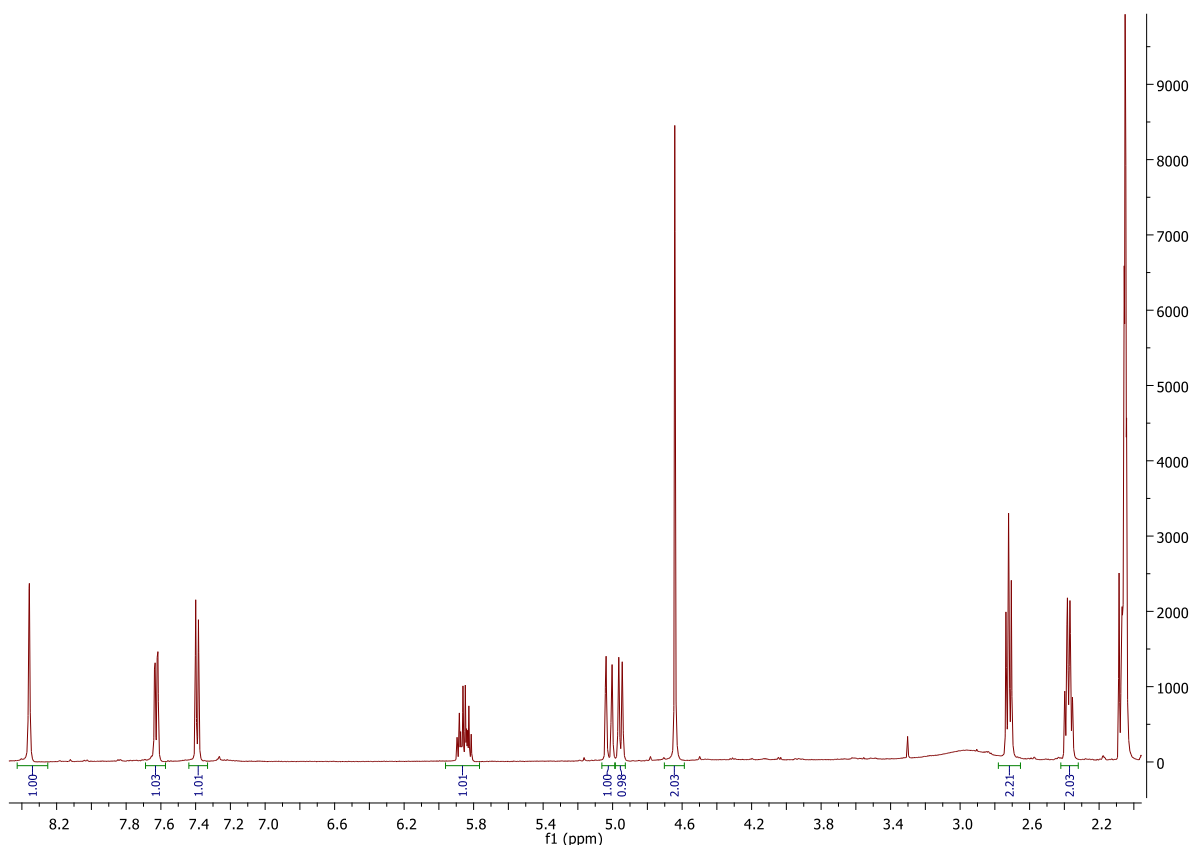


Figura 93. Sinais observados no espectro do 9,10-desidrofusarinol (acetona-D₆ em 500 MHz).

Tabela 16: Dados de RMN ¹H do 9,10-desidrofusarinol (**12**)

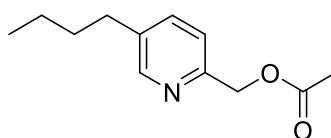
n	δ _H (500 MHz em acetona-D ₆)
3	7,39 (1H, d, J=8,0)
4	7,63 (1H, dd, J=8,0 e 2,1 Hz)
6	8,36 (1H, sl).
7	2,72 (2H, t, J= 7,8 Hz)
8	2,38 (2H, q, J=7,4 Hz)
9	5,86 (1H, ddt, J = 6,6; 10,2; 17,0 Hz)
10a	4,95 (1H, d, J = 10,2 Hz)
10b	5,02 (1H, d, J = 17,0 Hz)
11	4,64 (2H, s)

Este composto não foi encontrado na literatura indicando se tratar de um composto inédito, e pode ser também um produto de destoxificação do ácido

precursor, assim como observado para o caso do fusarinol. Zhang e colaboradores em 2021 realizaram um estudo de síntese de derivados de ácido fusárico e testaram suas atividades antibacteriana correlacionado a atividade dos compostos com suas estruturas. Eles observaram que o grupo carboxila do núcleo piridínico é essencial para atividade antibacteriana e, portanto, o 9,10-desidrofusarinol não deve apresentar alta atividade contra bactérias (Zhang et al., 2021).

4.7.11 Acetato de fusarinila (13)

A partir da biotransformação da mistura do ácido fusárico com o ácido 9,10-desidrofusárico pelo fungo *C. horii*, extrato BMCh7, foi possível obter um outro derivado do ácido fusárico, figura 94. O espectro de RMN de ^1H , figura 95 e tabela 17, do composto mostrou um sinal de hidrogênio em δ_{H} 8,47 (1H, d, $J = 2,1$ Hz) e dois sinais de hidrogênios em δ_{H} 7,52 (2H, m). Estes deslocamentos que indicam hidrogênios de um núcleo piridínico, e menores que os observados para o ácido fusárico. O sinal simpleto em δ_{H} 5,32 (2H, s) indica a presença de hidrogênios oximetilênicos com deslocamento químico ligeiramente maior que do fusarinol, indicando um possível composto diferente dos observados anteriormente. Os sinais de hidrogênios em δ_{H} 0,96 (3H, t, $J = 7,4$ Hz), δ_{H} 1,39 (2H, sext, $J = 7,5$ Hz), δ_{H} 1,64 (2H, quint, $J = 7,5$ Hz) e δ_{H} 2,67 (2H, t, $J = 7,7$ Hz) indicam que não houve alterações na cadeia lateral n-butílica. Um outro sinal em δ_{H} 2,18 (3H, s) indica a presença de um grupo metila alfa a uma carbonila. Estas informações são condizentes com a presença de um grupo éster ao invés de álcool, evidenciado pelo deslocamento químico maior dos hidrogênios na posição 11.



Acetato de fusarinila (13)

Figura 94. Estrutura química do composto acetato de fusarinila (13).

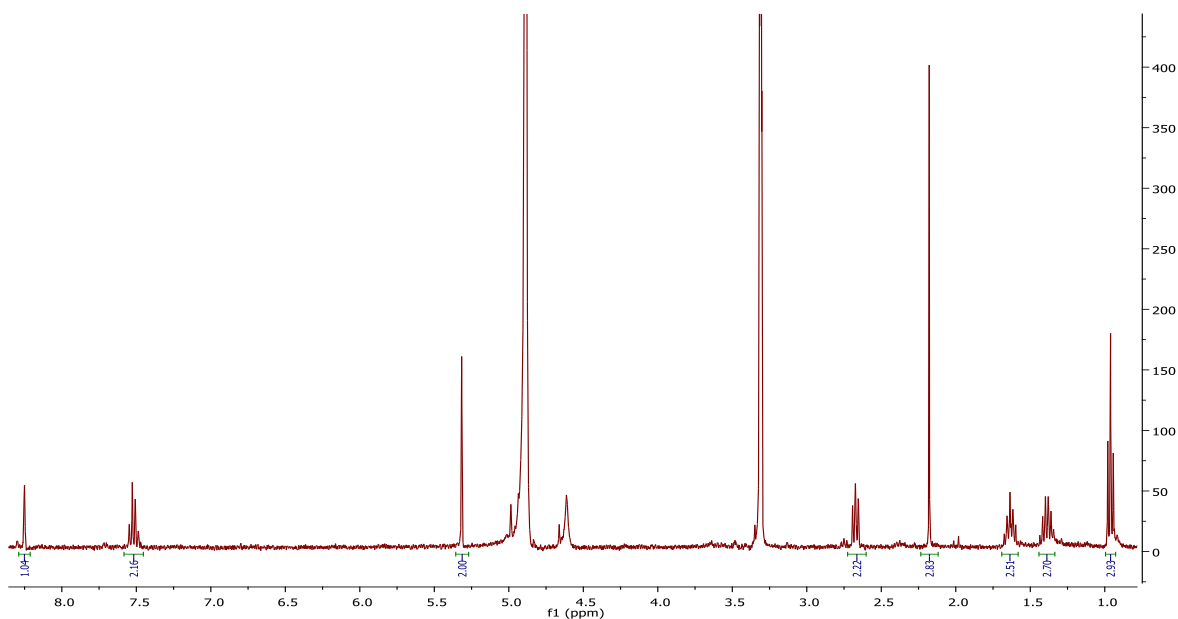


Figura 95. Espectro de RMN de ^1H do acetato de fusarinila (CD_3OD em 500 MHz).

Tabela 17: Dados de RMN ^1H e HMBC do acetato de fusarinila.

n	RMN de ^1H (500 MHz em CD_3OD)	HMBC (500 MHz em CD_3OD)
3	7,52 (2H, m)	
4		
6	8,47 (1H, d, $J = 2,1$ Hz)	
7	2,67 (2H, t, $J = 7,7$ Hz)	32,15
8	1,64 (2H, quint, $J = 7,5$ Hz)	
9	1,39 (2H, sext, $J = 7,5$ Hz)	
10	0,96 (3H, t, $J = 7,4$ Hz)	21,65
11	5,32 (2H, s)	124,03; 144,21; 170,44
14	2,18 (3H, s)	170,48

Na tabela 17 estão os dados de RMN de ^1H e de HMBC. O espectro de HMBC pode ser observado na figura 96 e a partir dele foi possível confirmar as observações realizadas no espectro de hidrogênio. Nele é possível visualizar uma correlação do hidrogênio $\delta_{\text{H}} 2,18$ (H-14) com o carbono $\delta_{\text{H}} 170,48$ (C-13) deslocamento químico de um carbono de éster. A partir do hidrogênio $\delta_{\text{H}} 5,32$ (H-11) é possível ver correlação

com δ_H 170,48 (C-13), δ_H 144,21(C-12) e δ_H 124,03 (C-13) conectando os hidrogênios H-14 ao grupo piridínico e confirmando a posição do grupo éster.

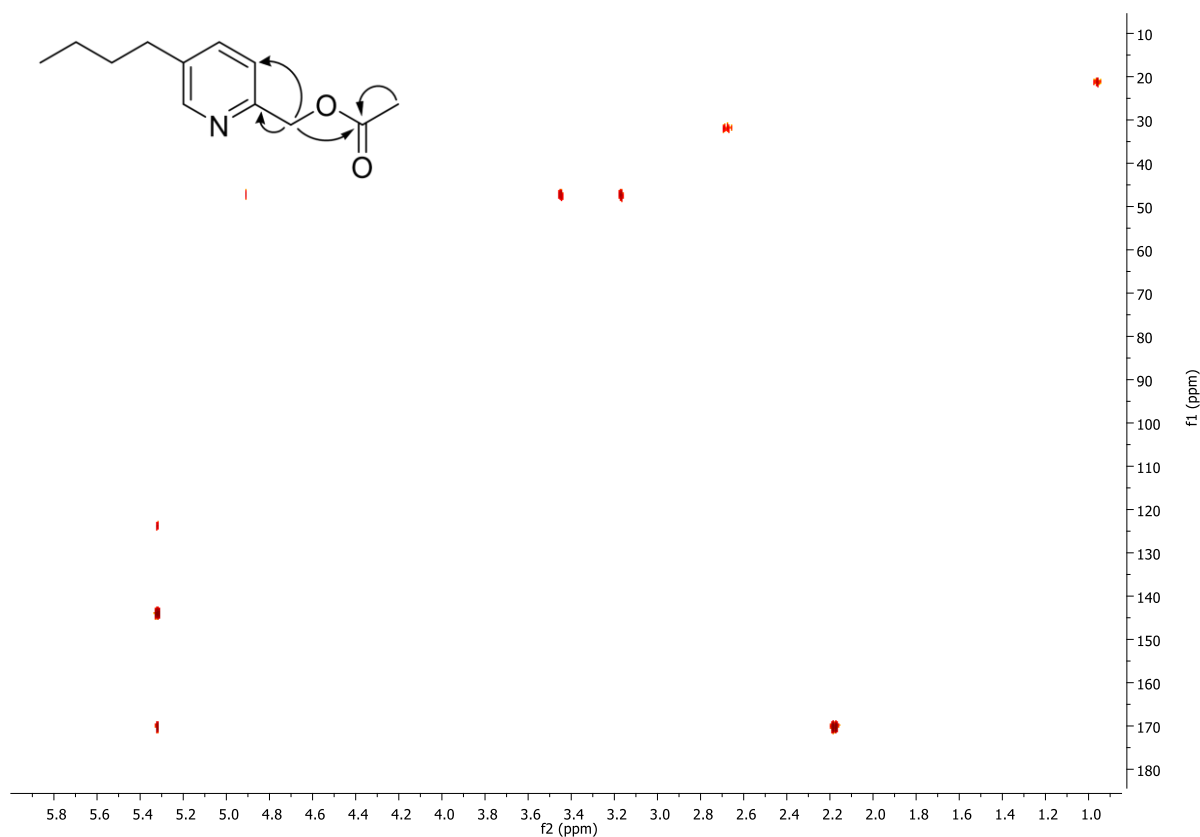


Figura 96. Espectro de correlação HMBC do acetato de fusarinila (CD_3OD em 500 MHz).

Também foi obtido o espectro de massas do composto que pode ser observado na figura 97. Nele é possível observar o íon molecular $[M+H]^+$ de m/z 208 e os íons fragmentos m/z 148 e m/z 208 que correspondem as espécies $[C_{10}H_{14}N]^+$ e $[C_{10}H_{16}NO]^+$ respectivamente, confirmando a estrutura proposta para o acetato de fusarinila.

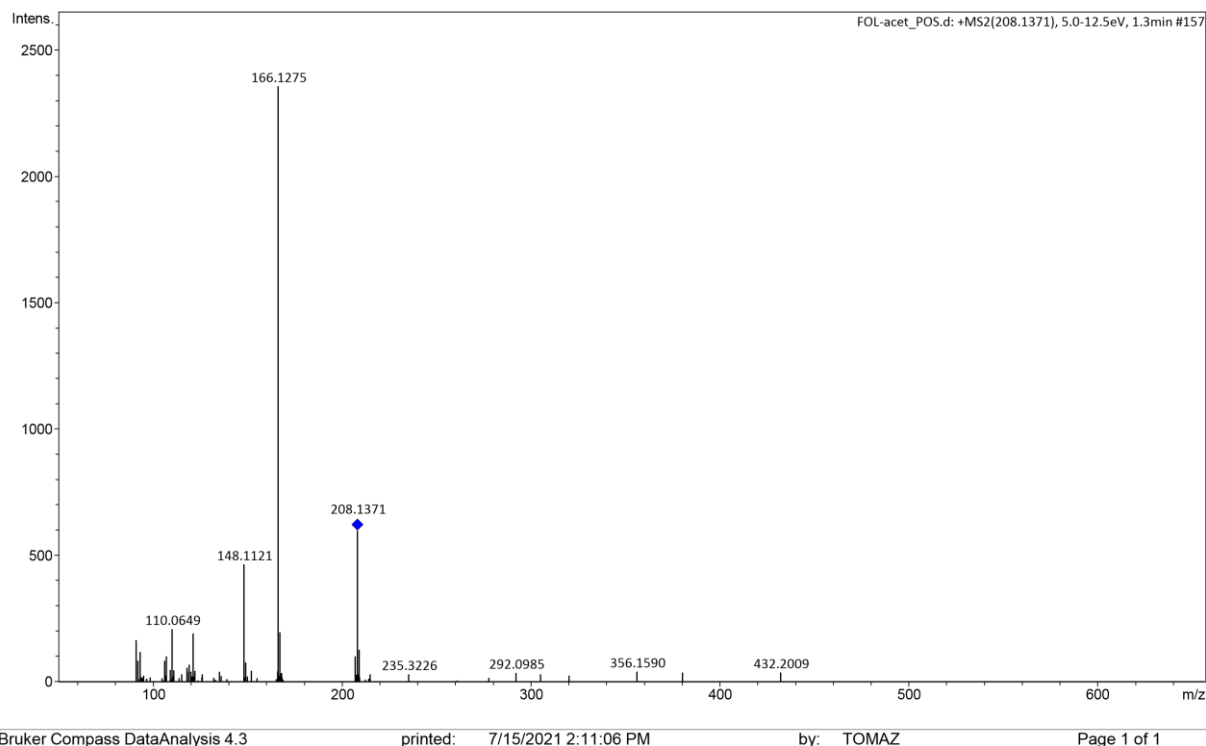


Figura 97. Espectro de massas (EI) obtido do composto acetato de fusarinila.

4.7.12 Gibepirona B (14)

A gibepirona B (**14**), figura 98, foi identificada na fração EPGFg28p7.6 apresentando-se majoritariamente e foi elucidada por análise de RMN de ^1H . O espectro, figura 99, mostrou dois sinais de hidrogênios metílicos em δ_{H} 1,91 (3H, d, $J = 0,8$ Hz) e 2,07 (3H, d, $J = 0,9$ Hz), sinais hidrogênios oximetilênicos em δ_{H} 4,32 (d, 2H, $J = 6,6$ Hz), sinais de hidrogênios em ligação dupla em δ_{H} 6,55 (1H, tq, $J = 6,6$ e 0,8 Hz) e duplas conjugadas característica de 2-pirona em δ_{H} 6,38 (1H, d, $J = 7,0$ Hz) e 7,35 (1H, dq, 7,0 e 0,9 Hz).

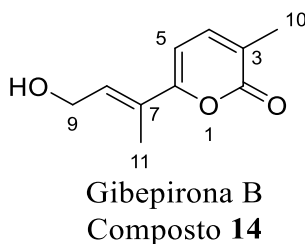


Figura 98. Estrutura química do composto gibepirona B (**14**).

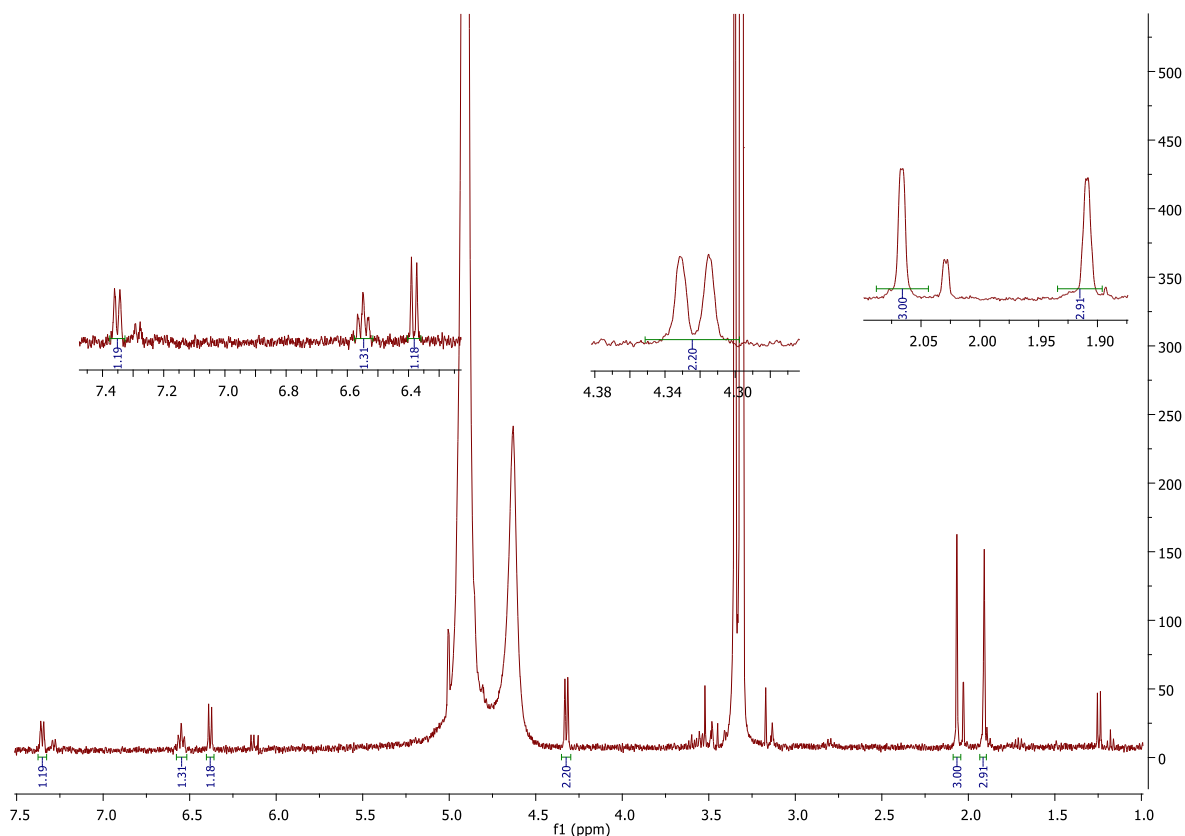


Figura 99. Espectro de RMN de ^1H da gibepirona B (**14**) (CD_3OD em 500 MHz).

Os dados de RMN de ^1H da gibepirona obtida bem como da literatura são mostrados na tabela 18

Tabela 18: Dados de RMN ^1H da gibepirona B (**Z**) isolada e da literatura

n	δ_{H} (500 MHz, CD_3OD)	BARRERO et al., 1993
		δ_{H} (300 MHz em CDCl_3)
4	7,35 (1H, dq, 7,0 e 0,9 Hz)	7.12 (dq, J = 6.9 Hz, J = 1.2 Hz)
5	6,38 (1H, d, J = 7,0 Hz)	6.14 (d, J = 6.9 Hz)
8	6,55 (1H, tq, J = 6,6 e 0,8 Hz)	6.63 (tq, J=6.6 Hz, J = 1,0)
9	4,32 (d, 2H, J = 6,6 Hz)	4.38 (d, J = 6.6 Hz)
10	2,07 (3H, d, J = 0,9Hz)	2.10 (d, J=1.2 Hz)
11	1,91 (3H, d, J = 0,8 Hz)	1.88 (d, J = 1.0 Hz)

A gibepirona foi isolada a partir do experimento de modificação epigenética do *F. guttiforme* com ácido suberoidroxâmico, não sendo observada em nenhum dos

outros cultivos realizados, que foi obtido um composto oriundo de uma rota biosintética diferente. Isto mostra como experimentos com moduladores epigenéticos podem ser utilizados para obtenção de uma maior variedade de metabólitos e até mesmo em classe de compostos completamente diferentes dos obtidos nos cultivos sem modulação.

4.8 Ensaio Enzimáticos

4.8.1 Titulação do sítio ativo da papaína

A papaína foi adquirida comercialmente na forma de pó e solubilizada no tampão para obter uma concentração de 5 mg.mL⁻¹. Inicialmente foi determinada a concentração molar da enzima utilizando o inibidor irreversível E-64. Este inibidor é produzido pelo fungo *Aspergillus japonicus* e foi isolado e caracterizado como inibidor irreversível específico para cisteína peptidase, permitindo a titulação do sítio ativo e determinação da concentração da enzima (BARRETT et al., 1982). O experimento foi realizado utilizando como substrato a caseína e antes de iniciar foi determinado qual o tempo ideal de reação. Para isso, a reação enzimática foi realizada em intervalos de tempos diferente e traçado um gráfico de atividade enzimática em função do tempo. Percebeu-se que a atividade aumentou constantemente até o intervalo de tempo de 6 min e depois foi observada uma diminuição até manter-se constante. Dessa forma foi definido o intervalo de tempo de 5 min.

Em seguida realizou-se a titulação do sítio ativo num intervalo de tempo de reação de 5 min. Foi observado um declínio da atividade enzimática com o aumento da concentração do inibidor e ao traçar um gráfico da atividade enzimática em função da concentração de E-64 foi possível obter a concentração molar da enzima pela da intercessão no eixo da abscissa. A concentração molar da solução estoque preparada da papaína foi 251 µM.

4.8.2 Determinação do experimental do valor de K_m

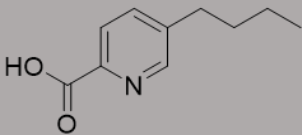
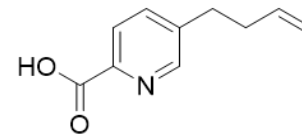
O valor de K_m é uma medida de afinidade da enzima pelo substrato sendo único para cada relação enzima/substrato e completamente dependente da temperatura e

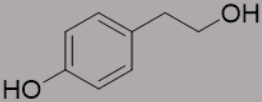
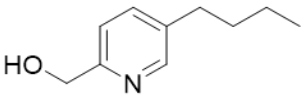
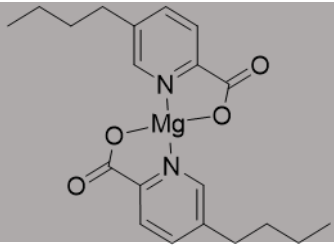
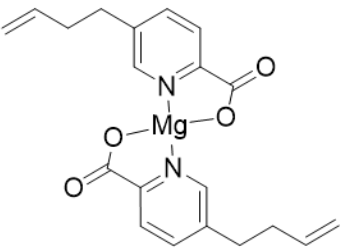
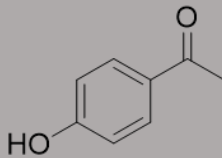
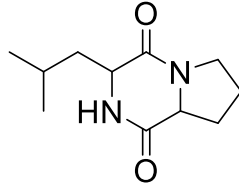
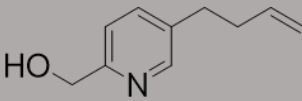
do pH do meio. O experimento de inibição foi realizado utilizando o substrato ZFR-MCA e, portanto, foi determinado o valor de K_m para este substrato (COPELAND, 2013). Para sua determinação foi realizado a leitura da fluorescência emitida pela liberação do resíduo MCA após 5 min de reação e variando a concentração do substrato. O valor obtido do K_m experimental obtido foi de 81 μM e o valor descrito na literatura para este substrato é 79 μM (DAVY et al., 1998)

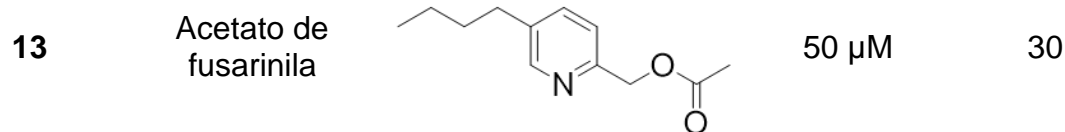
4.8.3 Avaliação da atividade de inibição da papaína

Os compostos isolados e identificados bem como as frações EPGFg28p10, CoLC28p8 e CoLC28p10 foram avaliadas quanto suas atividades inibitórias da papaína na concentração de 50 μM . Para os compostos complexo do ácido fusárico com magnésio (**5**) e complexo do ácido 9,10-desidrofusárico com magnésio (**6**) os cálculos foram realizados com base na massa molecular do ácido 9,10-desidrofusárico e ácido fusárico, pelo fato de suas estruturas terem sido elucidadas após o dia que o ensaio foi realizado. Fazendo as correções para a fórmula molecular correta tem-se que as concentrações são 25,2 e 23,5 μM , respectivamente. Para as frações CoLC28p8 e CoLC28p10 foram consideradas uma massa molecular de 300 g/mol para realização dos cálculos e para a fração EPGFg28p10 foi considerado a massa molecular ciclonerodiol de 240,2 g/mol. A escolha da concentração de 50 μM foi feita com base em trabalhos prévios do grupo, para ter um parâmetro de comparação. Os valores de porcentagens de inibição obtidas estão dispostos na tabela 15 a seguir.

Tabela 19: Atividade inibitória dos compostos frente a papaína.

Composto	Nome	Fórmula estrutural	Concentração	% de inibição
1	Ácido fusárico		50 μM	8
2	Ácido 9,10-desidrofusárico		50 μM	26

3	Tirosol		50 μ M	12
4	Fusarinol		50 μ M	13
5	Complexo do ácido fusárico com magnésio		25,2 μ M	56
6	Complexo do ácido 9,10-desidrofusárico com magnésio		23,5 μ M	54
9	<i>p</i> -hidroxiacetofenona		50 μ M	23
10	Dicetopiperazina ciclo prolina-leucina		50 μ M	14
12	9,10-Desidrofusarinol		50 μ M	1



-	EPGFg28p10	-	50 µM	18
-	CoLC28p8	-	50 µM	11
-	CoLC28p10	-	50 µM	35

O ácido fusárico (**1**) apresentou 8 % de inibição, ele foi isolado por outro membro do grupo apresentando 10% de inibição para uma mesma concentração numa metodologia semelhante. O ácido 9,10-desidrofusárico (**2**) apresentou um aumento significativo na inibição para 26 % decorrente de uma ligação dupla na posição 9-10. Já a redução do grupo carboxílico destes compostos para álcool resultou na diminuição da atividade inibitória obtendo-se 13 e 1 % para fusarinol (**4**) e 9,10-desidrofusarinol (**12**) respectivamente. O acetato de fusarinila (**13**) apresentou 30% de inibição indicando que a esterificação aumentou o potencial inibitório do AF. Dentre os derivados do ácido fusárico os compostos complexo do ácido fusárico com magnésio (**5**) complexo do ácido 9,10-desidrofusárico com magnésio (**6**) foram os que apresentaram maior inibição de 56 e 54 % respectivamente, mesmo numa concentração molar menor. O tirosol (**3**) e *p*-hidroxiacetofenona (**9**) que apresentam uma semelhança estrutural apresentaram 12 e 23 % respectivamente. Estes resultados e os observados para os derivados de ácido fusárico indicam que um grupo carbonila aumenta o potencial inibitório de um composto quando comparado ao seu respectivo álcool. A dicetopiperazina ciclo prolina-leucina (**10**) apresentou 14% de inibição, este composto foi isolado anteriormente por membro do grupo e apresentou 94% de inibição de papaína em 50 µM e esta diferença pode ser decorrente pela diferença da metodologia. A uracila (**8**) também foi obtida pelo membro do grupo e não apresentou atividade inibitória por isso não foi realizado seu ensaio. As frações EPGFg28p10 e CoLC28p8 apresentaram baixa atividade inibitória de 18 e 11 % respectivamente, contudo a fração CoLC28p10 apresentou uma atividade inibitória maior 35 %.

Comparando a forma que foram obtidos cada composto testado a partir do cocultivo em meio PDB foram obtidos os compostos de maior atividade inibidora enzimática sendo eles os dois complexos com magnésio, mostrando a importância do cocultivo como método para aumento da atividade biológica. Dentre os cultivos axênicos em meio PDB o ADF foi o que mais apresentou atividade. O processo de biotransformação mostrou-se uma boa forma de obter derivados sendo possível obter o acetato de fusarinila que foi o quarto composto com maior atividade. O experimento em meio de cultivo Czapek mostrou-se uma boa forma de obter perfis químicos diferentes e que apresentaram potenciais inibitórios distintos e dentre eles a dicetopiperazina ciclo prolina-leucina apresentou a maior inibição enzimática de acordo com a literatura de 94% (Silva et al., 2020) A fração CoLC28p10 também apresentou elevada atividade em comparação aos demais. O experimento de modulação epigenética com o fungo *F. guttiforme* resultou no isolamento de alguns compostos semelhantes ao do meio Czapek e dentre eles a dicetopiperazinas e a fração EPGFg28p10 (lignoren/ciclonerodiol) apresentaram mais atividade. As demais frações obtidas do experimento apresentaram pouca massa e dessa forma não foram realizados seus ensaios inibitórios, contudo os resultados obtidos neste trabalho justificam um cultivo em larga escala para obtenção de maior massa dos compostos e realização de outros ensaios enzimáticos além da papaína.

5. CONCLUSÕES

O trabalho tem como objetivo a busca de inibidores de proteases, o estudo do perfil metabólico de dois fungos invasores de frutos o *F. guttiforme* e *C. horii* e a utilização de estratégias para explorar a capacidade destes fungos de produzir novos metabolitos bioativos. Foram realizados cocultivo das linhagens fúngicas com o objetivo de mimetizar as condições ambientais que os micro-organismo estão sujeitos na natureza. Utilização de dois meios de cultivo para avaliar como das diferentes fontes de alimentos influenciam na produção dos metabolitos, e realização de biotransformação e modulação epigenética para diversificar os compostos obtidos. Todas as estratégias mostraram-se efetivas na diversificação do metabolismo

secundário das linhagens testadas, sendo possível isolar 14 compostos, sendo 5 deles não relatados na literatura.

Nos cultivos axênicos e meio PDB foi isolado o tirosol (3), produzido pelo fungo *C. horii* e ácido fusárico (1) e ácido 9,10-desidrofusárico (2) produzido pelo fungo *F. guttiforme*, duas micotoxinas com altas atividades antimicrobiana. No cocultivo foi observado em 7 e 14 dias a presença do composto fusarinol (4), que se tratava de um processo de destoxificação realizado pelo *C. horii* convertendo o ácido fusárico a fusarinol. O cultivo em PDA contendo AF e o fusarinol confirmou que o fusarinol é menos tóxico quando comparado ao ácido fusárico. Além disso, o cocultivo resultou em outros 3 compostos não observados nos cultivos axênicos, o complexo do ácido fusárico com magnésio (5), complexo do ácido 9,10-desidrofusárico com magnésio (6) e 5-butil-5-(hidroximetil) diidrofuranona (7), os três não relatados na literatura.

A mudança do meio de cultivo para o meio Czapek, resultou no isolamento de 3 compostos completamente diferentes do meio PDB e não foram isolados as duas micotoxinas que foram predominantes no meio PDB. Foram isolados a uracila (8), *p*-hidroxiacetofenona (9) dicetopiperazina ciclo prolina-leucina (10), além de se observar a presença de outros compostos que não foram possíveis isolar para elucidação.

Os experimentos de biotransformação com o fungo *C. horii* representaram uma boa abordagem para obter derivados dos compostos ácido fusárico e ácido 9,10-desidrofusárico, obtendo-se o fusarinol (3), 7-hidroxifusarinol (11), 9,10-desidrofusarinol (12) e acetato de fusarinila (13) sendo os compostos 11 e 12 inéditos. O experimento com modulação epigenética para o fungo *F. guttiforme* resultou no acesso das mesmas rotas de biossíntese do meio Czapek a partir do meio PDB sendo possível isolar os compostos 9 e 10, além de observar a outras classes de compostos como lignoren/ciclonerodiol, e presença de gibepirona sendo a B (14) isolada e identificada.

Os compostos foram testados frente a papaína para ensaio de inibição enzimática. Dentre os compostos o complexo do ácido fusárico com magnésio (5), complexo do ácido 9,10-desidrofusárico com magnésio e acetato de fusarinila apresentaram melhores atividades inibitória, de 56, 54 e 30 % respectivamente. O

composto dicetopiperazina ciclo prolina-leucina (**10**) foi descrito na literatura apresentando 94 % de inibição para papaína, resultado que não pode ser reproduzido

Estes resultados mostram a importância da utilização de micro-organismos na busca de novos produtos naturais e o grande potencial biossintético que um mesmo organismo pode apresentar fazendo pequenas variações no seu meio de crescimento.

6. REFERÊNCIAS

ABDEL-RHMAN, S. H.; EL-MAHDY, A. M.; EL-MOWAFY, M. Effect of Tyrosol and Farnesol on Virulence and Antibiotic Resistance of Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **BioMed research international**, v. 2015, p. 456463, 2015.

ADACBI, W.; KAWAMOO; S.; OHNO, I.; NISHIDA, K.; KINOSHITA, S.; MATSUBARA, K.; OKUBO, K. Isolation and characterization of human cathepsin V: A major proteinase in corneal epithelium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 39, n. 10, p. 1789–1796, 1998.

ALBUQUERQUE, P.; CASADEVALL, A. Quorum sensing in fungi - a review. **Medical Mycology**, v. 50, n. 4, p. 337-345, 2012.

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: A prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, v. 41, n. 1, p. 1–16, 2010.

ASAI, T.; YAMAMOTO, T.; SHIRATA, N.; TANIGUCHI, T.; MONDE, K.; FUJII, I.; GOMI, K.; OSHIMA, Y. Structurally diverse chaetophenol productions induced by chemically mediated epigenetic manipulation of fungal gene expression. **Organic Letters**, v. 15, n.13, p. 3346-3349, 2013.

AZERAD, R. Microbial models for drug metabolism. **Biotransformations**, v. 63, 1999.

AZZOLLINI, A.; BOGGIA, L.; BOCCARD, J.; SGORBINI, B.; LECOULTRE; N.; ALLARD, P. M.; RUBIOLO, P.; RUDAZ, S.; GINDRO, K.; BICCHI, C.; WOLFENDER, J. L. Dynamics of metabolite induction in fungal co-cultures by metabolomics at both

volatile and non-volatile levels. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. p. February, p. 1–12, 2018.

BACON, C. W.; PORTER J. K.; NORRED, W. P.; LESLIE, J. F. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4039–4043, 1996.

BÁIDEZ, A.G.; GÓMEZ, P.; DEL RÍO, J.A.; ORTUÑO. A. Antifungal capacity of major phenolic compounds of *Olea europaea* L. against *Phytophthora megasperma* Drechsler and *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 69, n. 4-6, p. 224–229, 2006.

BANI, M.; RISPAIL, N.; EVIDENTE, A.; RUBIALES, D.; CIMMINO, A. Identification of the main toxins isolated from *Fusarium oxysporum* F. Sp. pisi race 2 and their relation with isolates' pathogenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 12, p. 2574–2580, 2014.

BARRERO, A. F.; OKRA, J. E.; HERRADOR, M. M.; CABRERA, E.; SANCHEZ, J. F.; QUILEZ, J. F.; ROJAS, F. J.; REYES J.F. Gibberones: α -pyrones from *Gibberella fujikuroi*. **Tetrahedron**, v. 49, n. 1, p. 141–150, 1993.

BARRETT, A. J.; KEMBHAVI, A. A.; BROWN, M. A.; KIRSCHKE, H.; KNIGHT, C. G.; TAMAIT, M. & HANADAT, K. "L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido(4- guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L". **Biochemical. Journal.**, v. 201, n.1, p. 189-198, 1982.

BARZAK, F. M.; HARJES, S.; KVACH, M. V.; KURUP, H. M.; JAMESON, G. B.; FILICHEV, V. V.; HARJES, E. Selective inhibition of APOBEC3 enzymes by single-stranded DNAs containing 2'- deoxyzebularine. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 17, n. 43, p. 9435–9441, 2019.

BERDOWSKA, I. Cysteine proteases as disease markers. **Clínica Chimica Acta**, v. 342, n. 1-2, p. 41-69, 2004.

BERTERO, A.; MORETTI, A.; SPICER, L. J.; CALONI, F. *Fusarium* molds and mycotoxins: Potential species-specific effects. **Toxins**, v. 10, n. 6, p. 1–27, 2018.

BERTRAND, S.; BOHNI, N.; SCHNEE, S.; SCHUMPP, O.; GINDRO, K.; WOLFENDER, J. L. Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1180–1204, 2014.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNROA, M. H. G.; PRINSEPD, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 3, p. 116–211, 2015.

BODAH, T. E. Root Rot Diseases in Plants: A Review of Common Causal Agents and Management Strategies. **Agricultural Research & Technology: Open Access Journal**, v. 5, n. 3, 2017.

BRAGA, R. M.; DOURADO, M. N.; ARAÚJO, W. L. Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 86–98, 2016.

BREZNIK, B.; MITROVIĆ, A.; LAH, T. T.; KOS, K. Cystatins in cancer progression: More than just cathepsin inhibitors. **Biochimie**, v. 166, p. 233–250, 2019.

BROSCH, C.; LOIDL, P.; GRAESSLE, S. Histone modifications and chromatin dynamics: a focus on filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 3, p. 409–439, 2008.

BRÖMME, D.; KALETA, J. "Thiol-dependent cathepsins: cathophysiological implications and recent advances in inhibitor design". **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 18, p. 1639, 2002.

BRÖMME, D.; LI, Z.; BARNES, M.; MEHELER, E. "Human cathepsin V functional expression, tissue distribution, electrostatic surface potential, enzymatic characterization, and chromosomal localization". **Biochemistry**, v. 39, n. (8), p. 2377, 1999.

CAI, L.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; WALLER, J. M.; ABANG, M. M.; ZHANG, J. Z.; YANG, Y. L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z. Y.; PRIHASTUTI, H.;

SHIVAS, R. G. MCKENZIE, H. C.; JOHNSTON, P. R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 183–204, 2009.

CANNON, P. F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S. *Colletotrichum* - current status and future directions. **Studies in Mycology**, v. 73, n. 1, p. 181–213, 2012.

CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes magnéticos cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 175-187, 2009.

CASTELLANI, A. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. **Mycopathologia et mycologia applicata Mycopathol Mycol Appl.**, v. 20, n. 1-2, p. 1-6, 1963.

CHAUHAN, G.; MADOU, M. J.; KALRA, S.; CHOPRA, V.; GHOSH, D.; MARTINEZ-CHAPA, S. O. Nanotechnology for COVID-19: Therapeutics and Vaccine Research. **ACS Nano**, v. 14, n. 7, p. 7760–7782, 2020.

CHEN, H.; AWAKAWA, T.; SUN, J.; WAKIMOTO, T.; ABE, I. Epigenetic modifier-induced biosynthesis of novel fusaric acid derivatives in endophytic fungi from *Datura stramonium* L. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 3, n. 1, p. 20-23, 2013.

CHEN, H.; FINK, G. R. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. **Genes and Development**, v. 20, n. 9, p. 1150–1161, 2006.

CHEVREUIL, L. R.; GONÇALVES, J. F. C.; SCHIMPL, F. C.; C. S. C. R.; SOUZA, L. A. G.; PANDO, S. C. Prospecção de inibidores de serino proteinases em folhas de leguminosas arbóreas da floresta Amazônica. **Acta Amazonica Acta Amaz.**, v.41, n. 1, p. 163-170, 2011.

CHING-WEN, C.; YUN-CHIEH, C.; YU-CHIN, L.; WEN-HUANG; P. p-Hydroxyacetophenone suppresses nuclear factor- κ B-related inflammation in nociceptive and inflammatory animal models. **Journal of Natural Medicines**, v. 71, n. 2, p. 422–432, 2017.

CHOU, SC.; CHIU, YJ.; CHEN, CJ.; LIN, YC.; WU, CH.; CHAO, CT.; CHANG, CW.; PENG, WH. Analgesic and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract of *Artemisia morrisonensis* Hayata in mice. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

CHUNG, D.; KIM, S. Y.; AHN, J. H. Production of three phenylethanoids, tyrosol, hydroxytyrosol, and salidroside, using plant genes expressing in *Escherichia coli*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.

CHUTIA, M.; BHUYAN, P. D.; PATHAK, M.G.; SARMA, T.C.; BORUAH, P. Antifungal activity and chemical composition of Citrus reticulata Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 3, p. 777–780, 2009.

CIMMINO, A.; MATHIEU, V.; MASI, M.; CIMMINO, A.; MATHIEU, V.; MASI, M.; BARONCELLI, R.; BOARI, A.; PESCIPELLI, G.; FERDERIN, M.; LISY, R.; EVIDENTE, M.; TUZI, A.; ZONNO, M. C.; KORNIENKO, A.; KISS, R.; EVIDENTE, A. Higginsianins A and B, Two Diterpenoid α -Pyrone Produced by *Colletotrichum higginsianum*, with in Vitro Cytostatic Activity. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 1, p. 116–125, 2016.

COPELAND, R. A. "Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery". New Jersey: Wiley, 2013.

CRUTCHER, F. K.; LIU, J.; PUCKHABER, L. S.; STIPANOVIC, R. D.; DUKE, S. E.; BELL, A. A.; WILLIAMS, H. J.; NICHOLS, R. L. Conversion of Fusaric Acid to Fusarinol by *Aspergillus tubingensis*: A Detoxification Reaction. **Journal of Chemical Ecology**, v. 40, n. 1, p. 84–89, 2014.

CRUTCHER, F. K.; PUCKHABER, L. S.; STIPANOVIC, R. D.; BELL, A. A.; NICHOLS, R. L.; LAWRENCE, K. S.; LIU, J. Microbial Resistance Mechanisms to the Antibiotic and Phytotoxin Fusaric Acid. **Journal of Chemical Ecology**, v. 43, n. 10, p. 996–1006, 2017.

CRUTCHER, F. K.; PUCKHABER, S. L.; BELL, A. A.; LIU, J.; DUKE, S. R.; STIPANOVIC, R. D.; NICHOLS, R. L. Detoxification of Fusaric Acid by the Soil Microbe

Mucor rouxii. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 24, p. 4989–4992, 2017.

DAME, Z. T.; SILIMA, B.; GRYZENHOUT, M.; VAN REE, T. "Bioactive compounds 106 from the endophytic fungus *Fusarium proliferatum*". **Natural Product ResearchNat. Prod. Res.**, v. 30, n. (11), p. 1301, 2015.

DANA, D.; PATHAK, S. K. A Review of Small Molecule Inhibitors and Functional Probes of Human Cathepsin L. **Molecules**. v. 25, n. 3, p. 698, 2020.

DAVY, A.; SVENDSEN, I.; SØRENSEN, S. O.; SØRENSEN, M. B.; ROUSTER, J.; MELDAL, M.; SIMPSON, D. J. & CAMERON-MILLS, V. "Substrate specificity of barley cysteine endoproteases EP-A and EP-B 1". **Plant PhysiologyPlant Physiol.**, v. 117, n. (2), p. 255-261, 1998.

DE SOUZA, J. T.; TROCOLI, R. O.; MONTEIRO, F. P. Plants from the Caatinga biome harbor endophytic Trichoderma species active in the biocontrol of pineapple fusariosis. **Biological Control**, v. 94, n. 24, p. 25–32, 2016.

DEAN, R.; VAN KAN, J.A.L.; PRETORIUS, Z.A.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P.D.; RUDD, J.J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G.D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 414–430, 2012.

DERELANKO, M. J.; HOLLINGER, M. A. Handbook of toxicology. **CRC Press**, 2nd edition, p. 1440, 29 Agosto, 2001.

DOMSALLA, A.; MELZIG, M. F. "Occurrence and properties of proteases in plant latices". **Planta Medica.**, v. 74, n. (7), p. 699, 2008.

EDWARDS, D. R.; MURPHY, G. Cancer: proteases-invasion and more. **Nature**, v. 394, n. 6693, p. 527-528, 1998.

EL-HAWARY, S. S.; SAYED, A. M.; MOHAMMED, R.; HASSAN, H. M.; ZAKI, M. A.; RATEB, M. E.; MOHAMMED, T. A.; AMIN, E.; ABDELMOHSEN, U. R. Epigenetic

modifiers induce bioactive phenolic metabolites in the marine-derived fungus *penicillium brevicompactum*. **Marine Drugs**, v. 16, n. 8, p. 253, 2018.

FARAHAT, A. M.; EL-BATAWY, O. I. Proteolytic activity and some properties of stirred fruit yoghurt made using some fruits containing proteolytic enzymes. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, v. 1, n. 1, p. 38-44, 2013.

FENG, W.; ZHENG, X. Essential oils to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo. **Food Control**, v. 18, n. 9, p. 1126–1130, 2007.

FERNANDEZ-POL, J. A.; KLOS, D. J.; HAMILTON, P. D.; Cytotoxic activity of fusaric acid on human adenocarcinoma cells in tissue culture. **Anticancer Research**, 1993, v.13, n. 1, p. 57-64, 1993.

FOTSO, J.; LESLIE, J. F.; SMITH, J. S. Production of beauvericin, moniliformin, fusaproliferin, and fumonisins B1, B2, and B3 by fifteen ex-type strains of *Fusarium species*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 5195–5197, 2002.

FREITAS, B. T.; DURIE, I. A.; MURRAY, J.; LONGO, J. E.; MILLER, H. C.; CRICH, D.; HOGAN, R. J.; TRIPP, R. A.; PEGAN, P. D. Characterization and Noncovalent Inhibition of the Deubiquitinase and deISGylase Activity of SARS-CoV-2 Papain-Like Protease. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 8, p. 2099–2109, 2020.

FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological Research**, v. 112, n. Pt 2, p. 231–240, 2008.

GONZALEZ, F.J.; COUGHTRIE, M.; TUKEY, R.H. Drug Metabolism. In: BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. (Ed.) Goodman and Gilman's - **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12a ed. New York: McGraw Hill, 2011. p. 123-143.

GOODWIN, F. K.; SACK, R. L.; Behavioral effects of a new dopamine- β -hydroxylase inhibitor (fusaric acid) in man. **Journal of psychiatric research**, v.11, n. C, p. 211-226, 1974.

GOYAL, B.; GOYAL, D. Targeting the Dimerization of the Main Protease of Coronaviruses: A Potential Broad-Spectrum Therapeutic Strategy. **ACS Combinatorial Science**, v. 22, n. 6, p. 297–305, 2020.

GRAESSLE, S.; LOIDL, P.; BROSCH, G. Histone acetylation: plants and fungi as model systems for the investigation of histone deacetylases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, p. 704-720, 2001.

GROSS, H. Strategies to unravel the function of orphan biosynthesis pathways: recent examples and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 75, n. 5-6, p. 267-277, 2009.

HERTWECK, C. The biosynthetic logic of polyketide diversity. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, n. 26, p. 4688-4716, 2009.

HILGENFELD, R. From SARS to MERS: crystallographic studies on coronaviral proteases enable antiviral drug design. **The FEBS journal**, v. 281, n. 18, p. 4085–4096, 2014.

HOOK, V.; TONEFF, T.; BOGYO, M.; GREENBAUM, D.; MEDZIHRADESKY, K. F.; NEVEU, J.; LANE, W. HOOK, G.; REISINE, T. **Journal of Biological Chemistry Biol. Chem.**, v. 386, p. 931 - 940 2005.

HOOK, V.; HOOK, G.; KINDY, M. Pharmacogenetic features of cathepsin B inhibitors that improve memory deficit and reduce β -amyloid related to Alzheimer's disease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 391, n. 8, p. 861-872, 2010.

HOPKINS, D. L.; LOBINSKE, R. J.; LARKIN, R. P. Selection for *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* Race 2 in Monocultures of Watermelon Cultivars Resistant to Fusarium Wilt. **Phytopathology**, v. 82, n. 3, p. 290, 1992

HUSSAIN, H.; ROOT, N.; JABEEN, F.; AL-HARRASI, A.; AL-RAWAHI, A.; AHMAD, M.; HASSAN, Z.; ABBAS, G.; MABOOD, F.; SHAH, A.; BADSHAH, A.; KHAN, A.; AHMAD, R.; GREEN, I.; R. DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; KROHN, K. HUSSAIN, H.; ROOT, N.; JABEEN, F.; et al. Seimatoric acid and colletonoic acid: Two new

compounds from the endophytic fungi, *Seimatosporium* sp. and *Colletotrichum* sp. **Chinese Chemical Letters**, v. 25, n. 12, p. 1577–1579, 2014.

HWANG, J. T.; JANG, H. J.; KIM, J. H.; PARK, C. S.; KIM, Y.; LIM, C. H.; LEE, S. W.; RHO, M. C. *Lactococcus lactis* KR-050L inhibit IL-6/STAT3 activation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 5, p. 1412–1422, 2017.

IBGE | Portal do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística | IBGE. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 06 ago. 2021.

KOUZARIDES, T. Chromatin Modifications and Their Function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693–705, 2007.

KUMAR, S. N.; NAMBIAN, B.; SUNDARESAN, A.; MOHANDAS, C.; ANTO, R. J. Isolation and identification of antimicrobial secondary metabolites from *Bacillus cereus* associated with a rhabditid entomopathogenic nematode. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 209–218, 2014.

LALE, G. J.; GADRE, R. V. Production of bikaverin by a *Fusarium fujikuroi* mutant in submerged cultures. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.

LAWRENCE, R. J.; EARLEY, K.; PONTES, O.; SILVA, M.; CHEN, Z. J.; NEVES, N.; VIEGAS, W.; PIKAARD, C. S. A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. **Molecular Cell**, v. 13, n. 4, p. 599-609, 2004.

LECAILLE, F.; KALETA, J. & BRÖMME, D. "Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design". **Chemical Reviews Chem. Rev.**, v. 102, n. (12), p. 4459, 2002.

LI, H.; ZHOU, G. Y.; LIU, J. A.; XU, J. Population genetic analyses of the fungal pathogen *Colletotrichum fructicola* on Tea-Oil trees in China. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–24, 2016.

LI, Y. Y.; FANG, J.; AO, G. Z. Cathepsin B and L inhibitors: a patent review (2010 - present). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 27, n. 6, p. 643–656, 2017.

LIMA, T. C.; SANTOS, R.S.; SILVA, S. Y. S.; SANTOS, D. A.; SILVA, S. C.; GOMES, A. A. OLIVEIRA, M. C. F.; ALVES, K. F.; PINTO, L.; OLIVEIRA, M. N. VOCs profile of *Colletotrichum* spp. as a potential tool for quality control of açai pulp. **Food Chemistry**, v. 362, 2021.

LIN, Z. J.; LU, X. M.; ZHU, T. J.; FANG, Y. C.; GU, Q. Q.; ZHU, W. GPR12 Selections of the metabolites from an endophytic *Streptomyces* sp. Associated with *Cistanches deserticola*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, n. 9, p. 1108–1114, 2008.

LIU, J.; SHARMA, A.; NIEWIARA, M. J.; SINGH, R.; MING, R. & YU, Q. "Papain-like cysteine proteases in *Carica papaya*: lineage-specific gene duplication and expansion". **BMC Genomics**, v. 19, n. (1), p. 1, 2018.

LIU, T.; LUO, S.; LIBBY, P.; SHI, G. P. Cathepsin L-selective inhibitors: A potentially promising treatment for COVID-19 patients. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 213, p. 107587, 2020.

MADOU, M. J.; KALRA, S.; CHOPRA, V.; GHOSH, D.; MARTINEZ-CHAPA, S. O. Nanotechnology for COVID-19: Therapeutics and Vaccine Research. **ACS Nano**, v. 14, n. 7, p. 7760– 7782, 2020.

MÉNARD, R. Structure-function studies in the papain family of cysteine proteases. **J. of the Braz. Assoc. for the Adv. of Sci.**, v. 45, n. 5, p. 292-298, 1993.

MÉNARD, R.; CARMONA, E.; PLOUFFE, C.; BRÖMME, D.; KONISHI, Y.; LEFEBVRE, J.; STORER, A. C. The specificity of the S' 1 subsite of cysteine proteases. **FEBS**, v. 328, n. 1-2, p. 107-110, 1993.

MEYER, V.; STAHL, U. The influence of co-cultivation on expression of the antifungal protein in *Aspergillus giganteus*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 68–74, 2003.

MISAS-VILLAMIL, J. C.; VAN DER HOORN, R. A. L.; DOEHLEMANN, G. Papain-like cysteine proteases as hubs in plant immunity. **New Phytologist**, v. 212, n. 4, p. 902–907, 2016.

MOHAMED, M. M. SLOANE, B. F. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. **Nature reviews Cancer Nat. Rev. Cancer** **2006**, V. 6, n. 10, p. 764 – 775, 2006.

MORETTI, A.; LOGRIECO, A.; BOTTALICO, A.; RITIENI, A. & RANDAZZO, G. "Production of beauvericin by *Fusarium proliferatum* from maize in Italy". **Mycotoxin ResearchMycotoxin Res.**, v. 10, n. 2, p. 73 - 78, 1994.

MOUSSA, M. EBRAHIM, W.; BONUS, M.; GOHLKE, H.; MÁNDI, A.; KURTÁN, T.; HARTMANN, R.; KALSCHEUER, R.; LIN, W.; LIU, Z.; PROKSCH, P. Co-culture of the fungus *Fusarium tricinctum* with *Streptomyces lividans* induces production of cryptic naphthoquinone dimers. **RSC Advances**, v. 9, n. 3, p. 1491–1500, 2019.

NERY-SILVA, F. A.; MACHADO, J. C.; RESENDE, M. L. V.; LIMA, L. C. O. Metodologia de inoculação de fungos causadores da podridão peduncular em mamão **Ciência e Agrotecnologia, Cienc. Agrotec.** v. 31, n. 5, p. 1374-1379, 2007.

NIEHAUS, E. M.; VON BARGEN, K. W.; ESPINO, J. J.; PFANNMÜLLER, A.; HUMPF, H. U.; TUDZYNSKI, B. Characterization of the fusaric acid gene cluster in *Fusarium fujikuroi*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 4, p. 1749–1762, 2014.

NIWA, Y.; SUZUKI, T.; DOHMAE, N.; UMEZAWA, K. & SIMIZU, S. "Determination of Cathepsin V Activity and Intracellular Trafficking by N-glycosylation.". **FEBS Lett.**, v. 586, n. (20), p. 3601, 2012.

OLA, A. R.; THOMY, D.; LAI, D.; BRÖTZ-OESTERHELT, H.; PROKSCH, P. Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* through coculture with *Bacillus subtilis*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 11, p. 2094–2099, 2013.

PALUDO, C. R.; SILVA-JUNIOR, E. A.; SILVA, E. O.; VESSECCHI, R.; LOPES, N. P.; PUPO, M. P.; EMERY, F. S.; GONÇALVES, N. S.; SANTOS, R. A.; FURTADO, N. A. J. C. Inactivation of β -Lapachone Cytotoxicity by Filamentous Fungi that Mimic the Human Blood Metabolism. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 42, n. 2, p. 213–220, 2017.

PAN, R.; BAI, X.; CHEN, J.; ZHANG, H.; WANG, H. Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: A literature review. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–20, 2019.

PENA, G. A.; SULYOK, M.; CHULZE, S. N. Effect of interacting conditions of water activity, temperature and incubation time on *Fusarium thapsinum* and *Fusarium andiyazi* growth and toxin production on sorghum grains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 318, p. 108468, 2020.

PERES, N. A. R.; KURAMAE, E. E.; DIAS, M. S. C.; SOUZA, N. L. Identification and Characterization of *Colletotrichum* spp. affecting Fruit after Harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 150, n. 3, p. 128–134, 20028.

PLOETZ, R. C.; Fusarium-Induced Diseases of Tropical Perennial Crops. **The American Phytopathological Society Phytopathology**, v. 96, n. 6, p. 648-652, 2006

PRZYBYSZ, A.; GAWROŃSKA, H.; GAJC-WOLSKA, J. Biological mode of action of a nitrophenolates-based biostimulant: Case study. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1–15, 2014.

RIEGER, P. H.; LIERMANN, J. C.; OPATZ, T.; ANKE, H.; THINES, E. Caripyrin, a new inhibitor of infection-related morphogenesis in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **The Journal of antibiotics**, v. 63, n. 6, p. 285, 2010

RUIZ, B.; CHÁVEZ, A.; FORERO, A.; GARCÍA-HUANTE, Y.; ROMERO, A.; SÁNCHEZ, M.; ROCHA, D.; SÁNCHEZ, B.; RODRÍGUEZ-SANOJA, R.; SÁNCHEZ, S.; LANGLEY, E. Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 146–167, 2010.

SALAS, C. E.; GOMES, M. T. R.; HERNANDEZ, M. C.; LOPES, M. T. P. Plant cysteine proteinases: evaluation of the pharmacological activity. **Phytochemistry**, v. 69, n. 12, p. 2263-2269, 2008.

SANTAMARÍA, I.; VELASCO, G.; CAZORLA, M.; FUEYO, A.; CAMPO, E.; LÓPEZ-OTÍN, C. Cathepsin L2, a novel human cysteine proteinase produced by breast and colorectal carcinomas. **Cancer Research**, v. 58, p. 1624–1630, 1998.

SILVA, A. D.; AMBROZIN, A.; DE CAMARGO, A.; CRUZ, F., FERREIRA, L.; KROGH, R.; SILVA, T. L. Liquid Fungal Cocultivation as a Strategy to Access Bioactive Metabolites. **Planta medica**, v. 87, n. 1-02, p. 187-195, 2021.

SILVA, A. D.; AMBROZIN, A. R. P.; CARNEIRO, R. L.; VIEIRA, P. C. A new approach for identifying antagonism among fungi species and antifungal activity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 179, p. 112960, 2020.

SILVA, G. H.; SOUZA, J. A. R.; MACEDO, W. R.; PINTO, F. G. Tyrosol, a phenolic compound from *Phomopsis* sp., is a potential biostimulant in soybean seed treatment. **Phytochemistry Letters**, v. 43, p. 40–44, 2021.

SILVA, T. L.; TOFFANO, L.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; SOUZA, L. R. F.; VIEIRA, P. C. Mycotoxins from *Fusarium proliferatum*: new inhibitors of papain-like cysteine proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 1169-1175, 2020

SINGH, V. K.; SINGH, H. B.; UPADHYAY, R. S.; Role of fusaric acid in the development of 'Fusarium wilt' symptoms in tomato: Physiological, biochemical and proteomic perspectives. **Plant physiology and biochemistry, Plant Physiol. Biochem.** v. 118, p. 320, 2017,

SINGH, V.; HAQUE, S.; NIWAS, R.; SRIVASTAVA, A.; PASUPULETI, M.; TRIPATHI, C. K. M. Strategies for fermentation medium optimization: An in-depth review. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. Janeiro, p. 2087, 2017.

SLOANE, B. F.; ROZHIN, J.; JOHNSON, K.; TAYLOR, H.; CRISSMAN, J. D.; HONN, K. V. Cathepsin B: association with plasma membrane in metastatic tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 8, p. 2483-2487, 1986.

SON, S. W.; KIM, H. Y.; CHOI, G. J.; LIM, H. K.; JANG, K. S.; LEE, S. O.; LEE, S.; SUNG, N. D.; KIM, J. C.; Bikaverin and fusaric acid from *Fusarium oxysporum* show antioomycete activity against *Phytophthora infestans*. **Journal of applied microbiology** J. Appl. Microbiol, v. 104, n. 3, p. 692, 2008.

SONDERGAARD, T. E.; HANSEN, F. T.; PURUP, S.; NIELSEN, A. K.; BONEFELD-JØRGENSEN, E. C.; GIESE, H.; SØRENSEN, J. L. Fusarin C acts like an estrogenic agonist and stimulates breast cancer cells in vitro. **Toxicology Letters**, v. 205, n. 2, p. 116–121, 2011

STUDT, L.; JANEVSKA, S.; NIEHAUS, E. M.; BURKHARDT, I.; ARNDT, B.; SIEBER, C. M. K.; HUMPF, H. U.; DICKSCHAT, J. S.; TUDZYNSKI, B. Two separate key enzymes and two pathway-specific transcription factors are involved in fusaric acid biosynthesis in *Fusarium fujikuroi*. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 936–956, 2016.

TREMACOLDI, C. R. Proteases e Inibidores de Proteases na Defesa de Plantas Contra Pragas. **Embrapa Amazonia Oriental**, v.1, p. 44, 2009.

TRIANDAFILLIDI, I.; SAVVIDOU, A.; KOKOTOS, C. G. Synthesis of γ -Lactones Utilizing Ketoacids and Trimethylsulfoxonium Iodide. **Organic Letters**, v. 21, n. 14, p. 5533–5537, 2019.

TUNG, T. T.; JAKOBSEN, T. H.; DAO, T. T.; FUGLSANG, A. T.; GIVSKOV, M.; CHRISTENSEN, S. B.; NIELSEN, J. Fusaric acid and analogues as Gram-negative bacterial quorum sensing inhibitors. **European Journal of Medicinal ChemistryEur. J.Med. Chem.**, v. 126, p. 1011-1020, 2017

UEDA, K.; BEPPU, T. Antibiotics in microbial coculture. **The Journal of Antibiotics Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 4, p. 361–365, 2017.

VALUEVA, T. A.; MOSOLOV, V. V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. **Biochemistry (Moscow)**, v. 69, n. 11, p. 1305-1309, 2004.

VAN DER HOORN, R. A. L.; JONES, J. D. G. "The plant proteolytic machinery and its role in defence". **Current Opinion in Plant Biology, Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 7, n. 4, p. 400-407, 2004.

VASILJEVA, O.; TURK, B. Dual contrasting roles of cysteine cathepsin in cancer progression: apoptosis versus tumor invasion. **Biochimie**, v. 90, n. 2, p. 380-386, 2008.

VENISETTY, R. K.; CIDDI, V. Application of microbial biotransformation for the new drug discovery using natural drugs as substrates. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 153-167, 2003.

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; CABRAL, J. R. S.; MATOS, A. P. VITÓRIA': NEW PINEAPPLE CULTIVAR RESISTANT TO FUSARIOSIS, **Acta Horticulturae Acta Hortic.**, v. 822, p. 51, 2009

VERMA, S.; DIXIT, R.; PANDEY, K. C. Cysteine proteases: Modes of activation and future prospects as pharmacological targets. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, p. 1–12, n. April, 2016.

WANG, J. H.; QUAN, C. S.; QI, X. H.; LI, X.; FAN, S. D. Determination of diketopiperazines of *Burkholderia cepacia* CF-66 by gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 5, p. 1773–1779, 2010.

WANG, J. P.; LIN, W.; WRAY, V.; LAI, D. PROKSCH, P. Induced production of depsipeptides by co-culturing *Fusarium tricinctum* and *Fusarium begonia*. **Tetrahedron Letters**, v.54, n. 20, p.2492-2496, 2013.

WANG, M.; XIONG, Y.; LING, N.; FENG, X.; ZHONG, Z.; SHEN, Q.; GUO, S.; Detection of the dynamic response of cucumber leaves to fusaric acid using thermal imaging. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 66, p. 68-76. 2013.

WANG, W. X.; KUSARI, S.; LAATSCH, H.; GOLZ, C.; KUSARI, P.; STROHMANN, C.; KAYSER, O.; SPITELLER, M. Antibacterial Azaphilones from an Endophytic Fungus, *Colletotrichum* sp. BS4. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 4, p. 704–710, 2016.

WATSON, C. J.; KREUZALER, P. A. The role of cathepsin in involution and breast cancer. **Journal Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 14, n. 2, p. 171-179, 2009.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum* gloeosporioides species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 115–180, 2012.

WIEDERANDERS, B.; BRÖMME, D.; KIRSCHKE, H.; FIGURA, K. V.; SCHMIDT, B.; PETERS, C. Phylogenetic conservation of cysteine proteinases. **Journal of Biological Chemistry**The J. of Biol. Chem., v. 267, n. 19, p. 13708-13713, 1992.

WILLIAMS, R. B.; HENRIKSON, J. C.; HOOVER, A. R.; LEE, A. E.; CICHEWICZ, R. H. Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 6, n. 11, p. 1895-1897, 2008.

WU, G. Functional assays with isolated proteases. Assay development: fundamentals and practices. **Hoboken: John Wiley & Sons**, 2010.

WU, H. S.; YIN, X. M.; LIU, D. Y.; LING, N.; BAO, W.; YING, R. R.; ZHU, Y. Y.; GUO, S. W.; SHEN, Q. R. Effect of fungal fusaric acid on the root and leaf physiology of watermelon (*Citrullus lanatus*) seedlings. **Plant and Soil**, v. 308, n. 1, p. 255, 2008

XIE, C. L.; LIU, Q.; XIA, J.; GAO, Y.; YANG, Q.; SHAO, Z. Z.; LIU, G.; YANG, X.. Anti-allergic compounds from the deep-sea-derived actinomycete *Nesterenkonia flava* MCCC 1K00610. **Marine Drugs**, v. 15, n. 3, p. 1–8, 2017.

XIE, L.; ZHANG, J. Z.; CAI, L.; HYDE, K. D. Biology of *Colletotrichum horii*, the causal agent of persimmon anthracnose. **Mycology**, v. 1, n. 4, p. 242–253, 2010.

YANG, Z.; DAN, W-J.; LI, Y-X.; PENG, G-R.; ZHANG, A-L.; GAO, J-M. Antifungal metabolites from *Alternaria atrans*: an endophytic fungus in *Psidium guajava*. **Natural Product Communications**, v. 14, n. 5, 2019

YASUDA, Y.; KALETA, J.; BRÖMME, D. The role of cathepsin in osteoporosis and arthritis: rationale for the design of new therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 7, p. 973-993, 2005.

YUEN, C. K.; LAM, J. Y.; WONG, W. M.; MAK, L. F.; WANG, X.; CHU, H.; CAI, J. P.; JIN, D. Y.; TO, K. K. W.; CHAN, J. F. W.; YUEN, K. Y.; KOK, K. H. SARS-CoV-2 nsp13,

nsp14, nsp15 and orf6 function as potent interferon antagonists. **Emerging Microbes and Infections**, v. 9, n. 1, p. 1418–1428, 2020.

ZHANG, Q. Y.; YANG, F. Y.; LIAO, S. G.; WANG, B.; LI, R.; DONG, Y. X.; ZHOU, M.; YANG, Y. Y.; XU, G. B. Synthesis, Antibacterial Activity, and Structure–Activity Relationship of Fusaric Acid Analogs. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 42, n. 4, p. 577–582, 2021.

ZHAO, Y.; GENG, C. A.; CHEN, H.; MA, Y. B.; HUANG, X. Y.; CAO, T. W.; HE, K.; WANG, H.; ZHANG, X. M.; CHEN, J. J. Isolation, synthesis and anti-hepatitis B virus evaluation of p-hydroxyacetophenone derivatives from *Artemisia capillaris*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 7, p. 1509–1514, 2015.

ZHOU, G.; QIAO, L.; ZHANG, X.; SUN, C.; CHE, Q.; ZHANG, G.; ZHU, T.; GU, Q.; LI, D. Fusaricates H-K and fusolanones A-B from a mangrove endophytic fungus *Fusarium solani* HDN15-410. **Phytochemistry**, v. 158, p. 13–19, 2019.

ZONNO, M. C.; VURRO, M. Inhibition of germination of *Orobanche ramosa* seeds by *Fusarium toxins*. **Phytoparasitica**, v. 30, n. 5, p. 519–524, 2002.

