

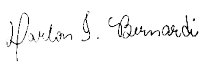
**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

Darlon Irineu Bernardi

**Metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos filamentosos de
ambientes extremos**

**São Carlos
2023**

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.

Assinatura: 
Data: 03.06.2023

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Bernardi, Darlon Irineu

Metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos filamentosos de ambientes extremos / Darlon Irineu Bernardi. — São Carlos, 2023.
201 f.

Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2023.
Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

1. Fungos filamentosos. 2. Peptídeos. 3. Produtos naturais. 4. Desreplicação. 5. Química orgânica. I. Título.

Solange M S Puccinelli - CRB: 1500/8



Darlon Irineu Bernardi

Exemplar Revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

**Metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos filamentosos de
ambientes extremos**

Tese apresentada ao Instituto de Química de São
Carlos da Universidade de São Paulo como parte
dos requisitos para obtenção do título de doutor
em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

São Carlos

2023

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado forças para conseguir terminar e escrever este material, mesmo com todas as dificuldades.

Aos meus pais João e Cida, e a minha irmã Danuza, que sempre foram de um amor e apoio incondicionais para comigo, eu amo vocês! Conjuntamente, agradeço infinitamente a toda minha família que a cada ligação por whatsapp estavam comigo nos momentos bons e naqueles não tão bons.

As minhas grandes amigas que São Carlos me deu e que as levarei para a vida, Letícia e Analu, a mineira e a baiana que ao mínimo do meu chamado estavam prontas a me ajudar em qualquer que fosse a dificuldade. Obrigado por nossos longos cafés com pães de queijo, chipas e pão amanteigado!

Agradeço também a todos os amigos que de longe ou de perto estavam sempre me apoiando aqui em São Carlos: Jackeline, Suelen, Clarice, Luiza, Diandra, Carlinhos, Nair, Vina, Alice, César, Fernanda (minha pêssega), Eidy, Larissa Fernandes e Tia Antonieta. Aos meus queridos amigos do período de graduação na UEM: Evandro, Milena, Silvia, Igor, Ana Cláudia, Ana Paula, Letycia, Rodolfo, Josinha (dos flavonoides), Beatriz, Ivânia e minha querida orientadora Profa. Dr. Debora C. Baldoqui. Meu muito obrigado.

As minhas grandes companheiras e guerreiras de laboratório, Dr. Juliana, Dr. Luciane, Dr. Karin e Lamô! Vocês fizeram todo o período que passei em São Carlos melhor e mais leve. De maneira especial, agradeço a Dr. Juliana minha galega paranaense por toda paciência em me recepcionar no laboratório e por sua colaboração, alegria, e amizade em realizar tantos trabalhos comigo que deram tantos frutos.

Ich danke meinem besten Freund und der Liebe meines Lebens Kai-Philipp, dass er so viel Zeit ohne mich ertragen hat, der meine morgendliche schlechte Laune immer noch erträgt und immer bereit ist zu fragen: brauchst du irgendetwas, Honey? Vielen lieben Dank, ohne dich hätte ich es nicht geschafft.

Muito obrigado a todos os colegas de laboratório que dividíamos as horas intermináveis em frente dos HPLCs e aos tantos alunos de iniciação científica que passaram pelo laboratório, são tantos que não ousou mencionar os nomes! Muito obrigado.

Meu especial obrigado para todos os profissionais da USP e do IQSC, principalmente aqueles que se dedicam a realizar as diversas análises na CAQUI e de

maneira especial, agradeço a Dr. Fabiana Tessari pela obtenção dos espectros de massas de alta resolução.

Um imenso e caloroso obrigado pelos trabalhos, conversas e conselhos ofertados pelas “meninas super-poderosas da Pós-graduação”, Gislei Oliveira, Daniele Paiutta e Andreia Moraes. Sem a ajuda de vocês a conclusão deste trabalho não teria sido possível. Especialmente agradeço ao Professor. Dr. Éder Cavalheiro por toda ajuda e pelos sábios conselhos paternais. Muito obrigado.

Agradeço imensamente a recepção do Prof. Dr. Russell Cox, da Universidade de Leibniz Hannover, por ter me recebido em seu grupo durante o ano de 2021. Obrigado também ao Dr. Lucas Kahlert, Mary Shenouda e Katja Körner por toda ajuda nos trabalhos de bancada. Um especial obrigado à Dr. Laura Íoca por ter começado e me apresentado ao mundo da biologia molecular.

Obrigado também ao Professor Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck, por ter oferecido as melhores condições de trabalho para o desenvolvimento desta tese e sua orientação. Agradeço imensamente pelo suporte financeiro oferecido pela FAPESP através dos processos 2020/11691-8 e 2016/21341-9.

RESUMO

BERNARDI, D. I. **Metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos filamentosos de ambientes extremos**. 2023. 201 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

A diversidade de metabólitos secundários bioativos produzida por microrganismos em meio de cultura é expressiva. Porém ao longo das últimas décadas a investigação de metabólitos secundários hidrossolúveis, bem como o estudo de linhagens microbianas provenientes de ambientes pouco convencionais tem sido abandonado. Este trabalho objetivou a investigação das condições de cultivo de fungos endofíticos e isolados de solo, evidenciando condições ótimas para o crescimento e produção metabólica. Subsequentemente, foi realizado o *screening* biológico e químico de frações oriundas de extratos de meio de cultivo de linhagens selecionadas, bem como o isolamento de metabólitos bioativos hidrossolúveis e lipofílicos produzidos por estas linhagens. Duas linhagens de fungos filamentosos foram cultivadas em escala ampliada de crescimento: um fungo endofítico isolado da planta *Anthurium alcatrazense*, que foi classificada como *Byssochlamys spectabilis* Aa1 e produziu dois novos metabólitos secundários, a dicetopiperazina *ciclo*-(D-Trp-L-Glu) e o derivado peptídico formil-L-triptofil-L-alanina, além do composto conhecido *N*-acetil-quinurenina, que teve seus dados de RMN e configuração absoluta estabelecidos como a (*S*)-*N*-acetil-quinurenina. Os compostos *ciclo*-(D-Trp-L-Glu) e (*S*)-*N*-acetil-quinurenina foram avaliados frente células OVCAR-3 e apresentaram IC₅₀ de 1,120 e 1,073 µM, respectivamente. A partir do meio de cultura do fungo *Aspergillus* sp. SDC28 isolado do solo de caverna foi possível isolar dois compostos lipofílicos, a versicolorina C e o versiconol. Seus potenciais anticancerígenos frente células OVCAR3 também foram determinados com IC₅₀ de 0,24 e 1,07 µM, respectivamente. Estes compostos tiveram suas configurações absolutas determinadas. A fim de se conhecer o poder de seletividade da mistura de resinas XAD-2,-4,-7 na adsorção de metabólitos hidrossolúveis, o metabólito secundário solitumina A produzido pela linhagem fúngica *Penicillium solitum* IS1-A foi utilizado de maneira que sua captura através das resinas adsortivas pudesse evidenciar com qual resina sua estrutura química teria maior afinidade.

Palavras chaves: fungos filamentosos, peptídeos, produtos naturais, desreplicação, química orgânica.

ABSTRACT

BERNARDI, D. I. **Bioactive secondary metabolites produced by filamentous fungi from extreme environments**. 2023. 201 p. Thesis (PhD in Organic and Biological Chemistry) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

The diversity of secondary bioactive metabolites produced by microorganisms in culture medium is expressive. However, over the last few decades, the investigation of water-soluble secondary metabolites, as well as the study of microbial strains from unconventional environments, has been abandoned. This work aimed to investigate the cultivation conditions of endophytic fungi and soil isolates, showing optimal conditions for growth and metabolic production. Subsequently, biological and chemical screening of fractions from extracts obtained from the culture medium of selected strains was carried out, as well as the isolation of water-soluble and lipophilic bioactive metabolites produced by these strains. Two strains of filamentous fungi were cultivated on a larger scale: an endophytic fungus isolated from the plant *Anthurium alcatrazense*, classified as *Byssochlamys spectabilis* Aa1 and produced two new secondary metabolites, the diketopiperazine cyclo-(D-Trp-L-Glu) and the peptide derivative formyl-L-tryptophyl-L-alanine, in addition to the known compound *N*-acetyl-kynurenine, which had its NMR data and absolute configuration established as (*S*)-*N*-acetyl-kynurenine. The compounds cyclo-(D-Trp-L-Glu) and (*S*)-*N*-acetyl-kynurenine were evaluated against OVCAR-3 cells and showed IC₅₀ of 1.120 and 1.073 μM, respectively. The second strain cultivated in large scale, the fungus *Aspergillus* sp. SDC28 isolated from cave soil, produced in its culture medium two lipophilic compounds, versicolorin C and versiconol. Their anticancer potential against OVCAR-3 cells were also determined with IC₅₀ of 0.24 and 1.07 μM, respectively. These compounds had their absolute configuration determined. In order to know the selectivity power of the mixture of XAD-2,-4,-7 resins during the process of water-soluble metabolites adsorption, the natural product solitumine A produced by the fungal strain *Penicillium solitum* IS1-A was used. The capture of solitumine A through the adsorptive resins allowed us to evaluate with which individual resin its chemical structure have greater affinity.

Keywords: filamentous fungi, peptides, natural products, dereplication, organic chemistry.

Lista de figuras

Figura 1- Número de compostos publicados por ano e taxa percentual de novos compostos em relação ao total de produtos naturais isolados.	17
Figura 2 - Primeiros exemplos de substâncias detectadas por desreplicação do extrato bruto de linhagens microbianas.	18
Figura 3 - Metabólitos microbianos hidrossolúveis isolados utilizando-se resinas de troca-iônica.	19
Figura 4 - A: Número de artigos publicados no J. Nat. Prod. entre 1996 e 2009 relatando o isolamento de metabólitos secundários utilizando as seguintes fases estacionárias: apenas Si-gel, C ₁₈ , LH-20 em combinação ou não, excluindo outras fases estacionárias; HP-20; Si-gel com H ₂ O no eluente; DIOL; Outros (incluindo C ₈ , poliamida, diferentes resinas adsortivas, troca iônica); Si-gel ligado a cianopropil; resinas adsortivas XAD (incluindo XAD-2,-4,-7,-16); Si-gel ligado a aminopropil; Si-gel ligado a fenil; B: Porcentagem dos 4,859 artigos publicados no JNP entre 1996 e 2009 relatando o isolamento de produtos naturais hidrofóbicos e hidrofílicos.	21
Figura 5 - Toxinas marinhas hidrossolúveis isoladas a partir de extratos aquosos de diversas fontes biológicas.	22
Figura 6 - Metabólitos secundários polares isolados a partir de meio aquoso ou solúvel em água de diversas fontes biológicas.	24
Figura 7- Alcalóides produzidos por espécies de vinca.	27
Figura 8 - Metabólitos secundários isolados de árvores do gênero <i>Taxus</i>	28
Figura 9 – Exemplos de metabólitos secundários produzidos por espécies de fungos endofíticos pertencentes ao gênero <i>Aspergillus</i>	29
Figura 10 - Metabólitos secundários isolados de <i>Penicillium flavigenum</i>	31
Figura 11 - Antifúngicos utilizados como controle contra fungos e utilizados frente a fungos isolados de ambientes cavernícolas.	31
Figura 12 - Metabólitos secundários isolados da bactéria <i>S. fulvissimus</i> DSM 40593 encontrada em caverna da Bélgica.	32
Figura 13 - Metabólitos secundários isolados de <i>B. spectabilis</i> endófito de <i>Edgeworthia chrysantha</i> Lindl.	33
Figura 14 - Metabólitos secundários isolados de <i>B. spectabilis</i> DSM 109444 endófito de Videira (<i>Vitis vinifera</i>)	34

Figura 15 - Pequenas moléculas e lovastatina com alto valor agregado produzidas por fungos do gênero <i>Aspergillus</i>	35
Figura 16 - Aflatoxinas e demais metabólitos secundários produzidos por diferentes espécies de <i>Aspergillus</i>	36
Figura 17 - Metodologia utilizada para extração, fracionamento inicial e análise dos extratos de fungos (Eluição: I - (1) 100% H ₂ O (2) 75:25% H ₂ O/MeOH, (3) 50:50% H ₂ O/MeOH, (4) 25:75%, H ₂ O/MeOH e (5) 100% MeOH; II - (1) Hexano/CH ₂ Cl ₂ 50:50%, (2) 100% CH ₂ Cl ₂ , (3) 50:50% CH ₂ Cl ₂ /AcOEt, (4) 100% AcOEt, (5) 50:50% AcOEt/MeOH e (6) 100% MeOH).....	44
Figura 18 - Etapas de preparação, extração e purificação dos extratos obtidos do fungo endofítico Aa1 (Eluição fase normal: Aa1M1 Hexano/CH ₂ Cl ₂ 1:1 (v/v); Aa1M2 CH ₂ Cl ₂ 100%; Aa1M3 CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 1:1 (v/v); Aa1M4 AcOEt 100%; Aa1M5 AcOEt/MeOH 1:1 (v/v) e Aa1M6 MeOH 100%. Eluição fase reversa: Aa1R1 H ₂ O 100%; Aa1R2 H ₂ O/MeOH 75:25 (v/v); Aa1R3 50:50 (v/v); Aa1R4 H ₂ O/MeOH 25:75 (v/v); Aa1R5 100% MeOH).	46
Figura 19 - Cromatograma de separação cromatográfica da fração Aa1R2E7-11 monitorada no comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}}$ de 254; Coluna semi-preparativa C ₁₈ , com fluxo de 3 mL min ⁻¹ de H ₂ O/MeOH/MeCN 60:35:5 (v/v/v).	47
Figura 20 - Cromatograma de separação cromatográfica da fração Aa1R2E7-11F monitorada no comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}}$ de 275 nm; Coluna analítica C ₁₈ , com fluxo de 1 mL min ⁻¹ de H ₂ O/MeOH 80:20 (v/v).	48
Figura 21 - Cromatograma de separação cromatográfica da fração Aa1R2E7-11F4 monitorada no comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}}$ de 285 nm; Coluna analítica C ₁₈ , com fluxo de 1 mL min ⁻¹ de H ₂ O/MeOH 80:20 (v/v) com 1% de ácido fórmico.	48
Figura 22 - Cromatograma de separação cromatográfica da fração Aa1R2E7-11G monitorada no comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}}$ de 220 nm; Coluna analítica Xterra C ₁₈ , com fluxo de 1 mL min ⁻¹ de H ₂ O/MeOH 70:30 (v/v) com 1% de ácido fórmico.	49
Figura 23 - Etapas de fracionamento e purificação dos metabólitos secundários presente na fração Aa1R2 obtidas do fungo endofítico Aa1. I: Coluna Bio Gel P2; H ₂ O:MeOH 20%; II: Coluna SiOH derivatizada com grupos fenila; gradiente de MeOH em H ₂ O; III: HPLC-UV, InertSustain C ₁₈ ; H ₂ O/MeOH/MeCN 60:35:5; IV: HPLC-UV, InertSil ODS-4 C ₁₈ ; H ₂ O/MeOH 80:20 +1% de ácido fórmico; V: HPLC-UV, XTerra C ₁₈ ; H ₂ O/MeOH 70:30 +1% de ácido fórmico; VI: HPLC-UV, InertSil ODS-4, H ₂ O/MeOH 80:20 + 1%	

de ácido fórmico. (Caixas verdes: frações reunidas; caixas alaranjadas: compostos puros).	50
Figura 24 - Cromatograma de separação cromatográfica da fração SDC28M35-23 monitorada no comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}}$ de 254 nm; Coluna analítica Inertsil [®] ODS-4, com fluxo de 1 mL min ⁻¹ de H ₂ O/MeOH 1:1.	53
Figura 25 - Cromatograma de separação cromatográfica da fração SDC28M35-24 monitorada no comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}}$ de 254 nm; Coluna analítica Inertsil [®] ODS-4, com fluxo de 1 mL min ⁻¹ de H ₂ O/MeOH 1:1 + 0,1 TFA.	53
Figura 26 - Cromatograma de separação cromatográfica da fração SDC28M35-257 monitorada no comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}}$ de 254 nm; Coluna semi-preparativa C ₁₈ , com fluxo de 2,5 mL min ⁻¹ de H ₂ O/MeOH 6:4.....	54
Figura 27 - Cromatograma de separação cromatográfica da fração SDC28M35-289 monitorada no comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}}$ de 254 nm; Coluna analítica C ₁₈ , com fluxo de 1,0 mL min ⁻¹ de H ₂ O:MeOH 45/55.	55
Figura 28 - Cromatograma de separação cromatográfica da fração SDC28M35-302 monitorada no comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}}$ de 254 nm; Coluna analítica C ₁₈ , com fluxo de 1,0 mL min ⁻¹ de H ₂ O/MeOH 3:7.	55
Figura 29 - Cromatograma de separação cromatográfica da fração SDC28M35-302B monitorada no comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}}$ de 254 nm; Coluna analítica C ₁₈ , com fluxo de 1,0 mL min ⁻¹ de H ₂ O/MeOH 1:1.	56
Figura 30 - Cromatograma de separação cromatográfica da fração SDC28M35-302FG monitorada no comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}}$ de 254 nm; Coluna analítica C ₁₈ , com fluxo de 1,0 mL min ⁻¹ de H ₂ O/MeOH 30:70 + 0,3 TFA.	57
Figura 31 - Fluxograma de isolamento dos compostos bioativos produzidos por <i>Aspergillus</i> sp. SDC28.	58
Figura 33 - Cromatograma da fração Aa1R2 em 254 nm.....	76
Figura 34 - Cromatograma da fração Aa1R3 em 254 nm.....	77
Figura 35 - Cromatograma da fração Aa1R4 em 254 nm.....	77
Figura 36 - Cromatograma da fração Aa1R5 em 254 nm.....	78
Figura 37 - (A) <i>Anthurium alcatrazense</i> . Fonte: COELHO e CATHARINO (2008). ...	81
Figura 38 - Composto Aa1R2E7-11G4 (68) , principais correlações de HMBC (setas vermelhas) e COSY (negrito).	83
Figura 39 - Comparação de espectros experimentais de UV e ECD em MeOH (preto) com espectros calculados pelo programa CAM-B3LYP/PCM(MeOH)/TZVP. Dados	

experimentais para (+)-ciclo-(D-Trp-L-Glu) versus simulado (3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-ciclo-(L-Trp-L-Glu) (azul) e (3 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-ciclo-(D-Trp-L-Glu) (vermelho).....	84
Figura 40 - Exemplos de metabólitos secundários contendo D-Triptofano.....	85
Figura 41 - Composto Aa1R2E7-11F1 (76) , principais correlações de HMBC (setas vermelhas) e COSY (negrito).....	88
Figura 42 - Comparação de espectros experimentais de UV e ECD em MeOH (preto) com espectros calculados pelo programa CAM-B3LYP/PCM(MeOH)/TZVP. Dados experimentais para (+)-formil-L-triptofil-L-alanina versus simulado (9 <i>S</i> ,14 <i>S</i>)-formil-L-triptofil-L-alanina (vermelho) e (9 <i>R</i> ,14 <i>S</i>)-formil-D-triptofil-L-alanina (azul).....	89
Figura 43 - Composto Aa1R2E7-11F4I , principais correlações de HMBC (setas vermelhas) e COSY (negrito).....	92
Figura 44 - Comparação de espectros experimentais de UV e ECD em MeOH (preto) com espectros calculados pelo programa CAM-B3LYP/PCM(MeOH)/TZVP. Dados experimentais para (+)- <i>N</i> -acetil-quinurenina versus simulado (2 <i>S</i>)- <i>N</i> -acetil-quinurenina (vermelho).	92
Figura 45 - Rota de fragmentação da <i>N</i> -acetil-quinurenina proposta por RAEL et al. (2018), com modificação.....	96
Figura 46 - Cromatograma da fração SDC28M1 em 240 nm.....	98
Figura 47 - Cromatograma da fração SDC28M2 em 240 nm.....	99
Figura 48 - Cromatograma da fração SDC28M3 em 240 nm.....	99
Figura 49 - Cromatograma da fração SDC28M4 em 240 nm.....	100
Figura 50 - Cromatograma da fração SDC28M5 em 240 nm.....	100
Figura 51 - Cromatograma da fração SDC28M6 em 240 nm.....	101
Figura 52 - (A) Imagem da área amostrada da zona de penumbra da Gruta do Catão. (B) Aparência morfológica de <i>Aspergillus</i> sp. SDC28.....	102
Figura 53 - Correlações HMBC (setas vermelhas), COSY (negrito) e NOESY (setas azuis) observadas para a versicolorina C (78).	103
Figura 54 - Correlações HMBC (setas vermelhas) e COSY (negrito) observadas para o versiconol (79).	105
Figura 55 - (Esquerda) Comparação dos espectros experimentais de UV e dicróismo circular eletrônico (ECD) de (–)-versicolorina C em MeOH (preto) com os espectros calculados (CAM-B3LYP/PCM(MeOH)/TZVP, vermelho) para (1' <i>R</i> ,2' <i>S</i>)-versicolorina C. (Direita) Estruturas otimizadas, energias relativas e populações de Boltzmann dos	

confôrmeros de energia mais baixa identificados para (1' <i>R</i> ,2' <i>S</i>)-versicolorina C pelo B3LYP/PCM(MeOH)/6-31G(d).....	106
Figura 56 - (Esquerda) Comparação dos espectros experimentais de UV e dicroísmo circular eletrônico (ECD) do (-)-versiconol em MeOH (preto) com espectros calculados (CAM-B3LYP/PCM(MeOH)/TZVP, vermelho) para (2' <i>S</i>)-versiconol. (Direita) Estruturas otimizadas, energias relativas e populações de Boltzmann dos confôrmeros de menor energia identificados para (2' <i>S</i>)-versiconol no B3LYP/PCM(MeOH)/6-31G(d).	107
Figura 57 - Estruturas finais dos compostos versicolorina C (78) e versiconol (79) isolados de <i>Aspergillus</i> sp. SDC28.....	108
Figura 58 - Resultado dos ensaios antibacteriano dos compostos isolados de <i>Aspergillus</i> SDC28. Seta azul: versiconol; seta vermelha: versicolorina C; Controle positivo: vancomicina (ponto verde); tetraciclina (ponto rosa); cloranfenicol (ponto alaranjado).	110
Figura 59 - Resultado dos ensaios antibacteriano dos compostos isolados de <i>Aspergillus</i> SDC28. Seta azul: versiconol; seta vermelha: versicolorina C; Controle positivo: fungicida FOX (ponto alaranjado).....	110
Figura 60 - Metabólitos hidrossolúveis produzidos por <i>Penicillium solitum</i> IS1-A... 112	
Figura 61 - Curva analítica para solitumina A (80).....	113
Figura 62 - Presença de solitumina A (80) nas frações XAD2 (XAD2-1: H ₂ O:MeOH 75:25 v/v; XAD2-2: H ₂ O:MeOH 50:50 v/v; XAD2-3: H ₂ O:MeOH 75:25 v/v; XAD2-4: MeOH 100%), pelo teste t de Student não-pareado (p <0,05).	115
Figura 63 - Presença e comparação de solitumina A (80) nas frações 2 (H ₂ O/MeOH 1:1) pelo teste t de Student não-pareado (p > 0,05).	116
Figura 64 - Comparação do perfil cromatográfico das três frações XAD2-2 (linha preta), XAD4-2 (linha azul) e XAD7-2 (linha vermelha) contendo solitumina A (80), adsorvida de extratos aquosos do fungo <i>P. solitum</i> IS1-A, detecção por HPLC-UV com $\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm.	117

Lista de tabelas

Tabela 1 - Linhagens fúngicas endofíticas isoladas de <i>A. alcatrazense</i> , <i>A. loefgrenii</i> e <i>B. venosa</i> selecionadas para o estudo de triagem e desreplicação.	42
Tabela 2 - Resultado de ensaio biológico para descoberta de extratos bioativos (PBP).	71
Tabela 3 - Resultado de citotoxicidade para as frações dos extratos fúngicos obtidos de <i>A. alcatrazense</i> , <i>A. loefgrenii</i> e <i>B. venosa</i> frente a diversas linhagens celulares* em uma única concentração de 100 ug mL ⁻¹	72
Tabela 4 - Resultado de viabilidade celular frente ao parasita <i>Leishmania infantum</i>	73
Tabela 5 - Resultado de viabilidade celular frente ao parasito <i>Trypanosoma cruzi</i>	73
Tabela 6 - Resultado do teste biológico contra o protozoário <i>L. infantum</i> , considerando o crescimento dos fungos nos meios de PDB, M2% e SBD+YE separadamente e extração conjunta dos três meios.	74
Tabela 7 - Frações orgânicas avaliadas frente diversas linhagens bacterianas.	75
Tabela 8 - Resultado do ensaio de inibição dos ligantes de penicilina das frações de Aa1R (extrato orgânico das resinas) e Aa1M (extrato metanólico).	81
Tabela 9 - Dados de RMN de ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (150,9 MHz) para a composto Aa1R2E7-11G4/ ciclo-(D-Trp-L-Glu) (68)	86
Tabela 10 - Dados de RMN de ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (150,9 MHz) para a composto Aa1R2E7-11F1/ formil-L-triptofil-L-alanina	90
Tabela 11 - Dados de RMN de ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (150,9 MHz) para a composto Aa1R2E7-11-F4I/ (2S)-N-acetil-quinurenina	93
Tabela 12 - Dados de RMN para os compostos isolados de <i>Aspergillus</i> sp. SDC28 em DMSO-d ₆	108
Tabela 13 - Comparação dos dados de precisão e estabilidade para análise quantitativa considerando solitumina A (80) como padrão.	114

Lista de abreviaturas

δ	Deslocamento químico
AcOEt	Acetato de etila
BGC	Agrupamento de genes biossintéticos (<i>biosynthetic gene cluster</i>)
COSY	Espectroscopia de correlação homonuclear (<i>homonuclear correlation spectroscopy</i>)
DAD	Detector de arranjo de diodos (<i>diode array detector</i>)
DNP	Dicionário de produtos naturais (<i>dictionary of natural products</i>)
ELSD	Detector de Espalhamento de Luz Evaporativo (<i>evaporative light scattering detector</i>)
EIC	Cromatograma de íon extraído (<i>extracted ion Chromatogram</i>)
ESI	Ionização por eletrospray (<i>electrospray ionization</i>)
HMBC	Correlação de ligações múltiplas heteronucleares (<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HSQC	Espectroscopia de coerência quântica única heteronuclear (<i>heteronuclear single quantum coherence spectroscopy</i>)
LC-HRMS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (<i>liquid chromatography-high resolution mass spectrometry</i>)
m/z	Razão massa/carga
MeCN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
MS	Espectrometria de Massas (<i>mass spectrometry</i>)
NOESY	Espectroscopia de efeito Overhauser nuclear (<i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>)
PNs	Produtos Naturais
QToF	Detector de quadropolotempo de voo (<i>quadrupole-time of flight detector</i>)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SPE	Extração em fase sólida (<i>solid-phase extraction</i>)

TFA	Ácido Trifluoroacético
TIC	Cromatograma de íons totais (<i>total ion chromatogram</i>)
t _R	Tempo de Retenção
UPLC-HRMS	Cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (<i>ultra high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry</i>)
UPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas em tandem (<i>ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>)

Sumário

1 – Estudo químico e biológico de extratos de culturas de fungos filamentosos de ambientes extremos	16
1.1. Introdução	16
1.1.1. Estudo de desreplicação de extratos obtidos de linhagens fúngicas filamentosas e técnicas empregadas para o isolamento de novos produtos naturais de diferentes fontes naturais	16
1.1.2. - Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos e de fungos provenientes de ambientes isolados	25
1.1.3. O gênero <i>Byssochlamys</i>	32
1.1.4. O gênero <i>Aspergillus</i>	34
1.2. Objetivos.....	37
1.3. Materiais e métodos.....	38
1.3.1. Generalidades	38
1.3.1.1. Sistemas cromatográficos HPLC-UV-ELSD-MS e UPLC-QToF-MS	38
1.3.1.2. Solventes	39
1.3.1.3. Análises físicas dos compostos isolados	39
1.3.2. Linhagens Microbianas.....	42
1.3.2.1. Linhagens microbianas endofíticas.....	42
1.3.2.2. Linhagens microbianas isoladas de solo	43
1.3.3. <i>Screening</i> químico e biológico de extratos de linhagens fúngicas filamentosas.....	43
1.3.3.1. Seleção do meio de crescimento, cultivo em escala preparativa e isolamento dos metabólitos secundários de L9/Aa1	45
1.3.3.2. Determinação da configuração absoluta dos derivados peptídeos produzidos pela linhagem endofítica L9/Aa1.....	51

1.3.4. Seleção do meio de crescimento, cultivo em escala preparativa e isolamento dos metabólitos secundários da linhagem isolada de solo de caverna SDC28	51
1.3.5. Ensaio Biológicos – metodologias utilizadas.....	62
1.3.5.1. Ensaio anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> in vitro.....	62
1.3.5.2. Determinação da avaliação da atividade antibacteriana	62
1.3.5.3. Atividade leishmanicida	63
1.3.5.4. Citotoxicidade (utilizado na fase de screening).....	64
1.3.5.5. Inibição dos ligantes de penicilina.....	64
1.3.5.6. Citotoxicidade (frente os compostos puros isolados da linhagem endofítica L9/Aa1 e da linhagem de solo SDC28).....	65
1.3.5.7. Atividade antibacteriana (protocolo utilizado nos compostos isolados de SDC28).....	66
1.3.5.8. Atividade antifúngica (protocolo utilizado nos compostos isolados de SDC28).....	67
1.3.6. Quantificação do alcaloide peptídico solitumina A (80)	67
1.3.6.1. Preparação de solução padrão e amostras para quantificação	67
1.3.6.2. Validação do método analítico	68
1.4. Resultados e discussão.....	70
1.4.1. Estudo de desreplicação química e biológica de extratos de fungos filamentosos.....	70
1.4.1.1. Análise do perfil de atividades biológicas das linhagens endofíticas	70
1.4.2. Análise do perfil de atividades biológicas das linhagens de solo	73
1.4.3. Análise do perfil químico da linhagem L9/Aa1	76
1.4.3.1. Isolamento dos metabólitos secundários produzidos pela linhagem endofítica <i>Byssochlamys spectabilis</i> Aa1 isolado da planta <i>Anthurium alcatrazense</i>	80
1.4.3.1.1. Análise da Aa1R2E7-11G.....	81
1.4.3.1.2. Análise da fração Aa1R2E7-11F	87
1.4.3.1.3. Análise da fração Aa1R2E7-11F4	90

1.4.4. Análise do perfil químico da linhagem SDC28	98
1.4.4.1. Isolamento dos metabólitos secundários produzidos pela linhagem isolada de solo de caverna <i>Aspergillus</i> sp. SDC28	101
1.4.4.1.1. Análise das frações SDC28M35-257EF4 e SDC28M35-23B	102
1.4.5. Investigação da adsorção dos metabólitos hidrossolúveis da linhagem da antártica <i>Penicillium solitum</i> IS1-A	112
1.4.5.1. Avaliação da seletividade extrativa das resinas XAD-2, XAD-4 e XAD-7	112
1.5. Conclusões	118
Referências bibliográficas	120
ANEXOS	143

1 – Estudo químico e biológico de extratos de culturas de fungos filamentosos de ambientes extremos

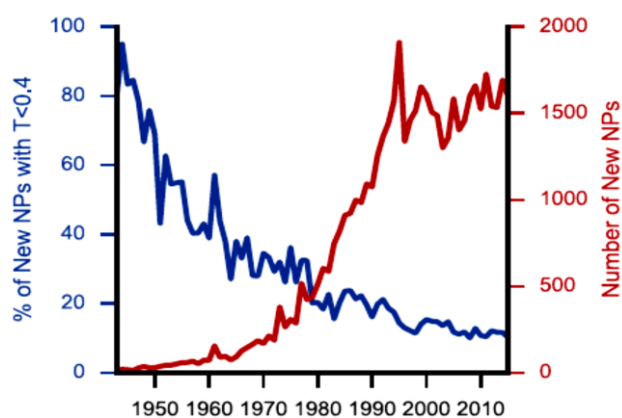
1.1. Introdução

1.1.1. Estudo de desreplicação de extratos obtidos de linhagens fúngicas filamentosas e técnicas empregadas para o isolamento de novos produtos naturais de diferentes fontes naturais

Fungos filamentosos destacam-se como produtores de metabólitos secundários bioativos em decorrência da versatilidade de seu maquinário bioquímico e diversidade biológica, estimada em mais de 5 milhões de espécies (O'BRIEN et al., 2005). O genoma de fungos filamentosos é consideravelmente maior e mais complexo do que o genoma de bactérias. Conseqüentemente, os agregados gênicos que codificam a biossíntese de produtos naturais fúngicos são abundantes e podem ser mais diversificados, ainda que expressos de forma limitada em condições ordinárias de cultivo (KATZ e BALTZ, 2016).

Mesmo que a maquinária enzimática tão vasta encontrada nos DNAs genômicos dos eucariotos possa tornar quase ilimitado o número de substâncias químicas biossintetizadas por fungos, o re-isolamento de determinados produtos naturais constitui-se como um dos maiores desafios para os pesquisadores da área. Estudo recente realizado por PYE e colaboradores (2017) indica que a descoberta de produtos naturais inéditos se estabilizou em pouco mais 1500 novas substâncias por ano nas últimas décadas (**Figura 1**). Quando analisamos a curva azul do mesmo gráfico, esta indica forte diminuição na descoberta de novos produtos naturais estruturalmente inéditos a partir dos anos 40 (PYE et al., 2017).

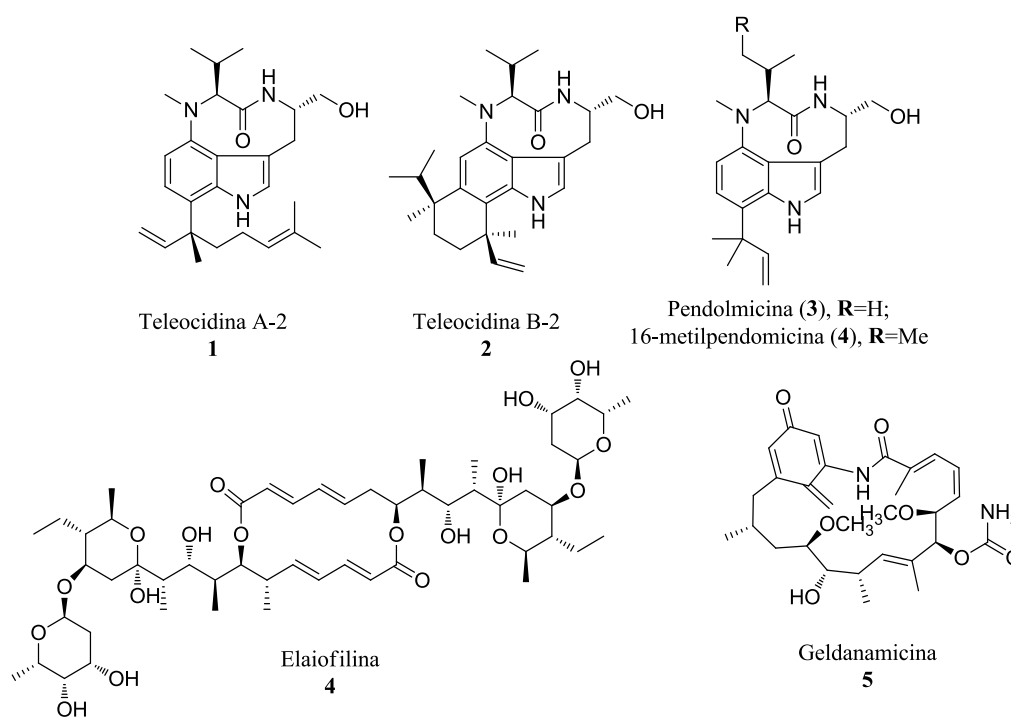
Figura 1- Número de compostos publicados por ano e taxa percentual de novos compostos em relação ao total de produtos naturais isolados.



Na tentativa de se evitar o re-isolamento de produtos naturais já conhecidos, diversas abordagens são empregadas. O termo desreplicação foi inicialmente introduzido no início da década de 90, como uma etapa inicial no processo de triagem de extratos brutos com potentes atividades biológicas (CONSTANT e BEECHER, 1995). Os primeiros exemplos de desreplicação que são encontrados mostram-nos a descoberta de compostos com atividade anti-HIV surpreendentemente a partir de extratos aquosos. Os “contaminantes” que interferiam na análise biológica das amostras foram eficazmente removidos no processo de isolamento das substâncias com o potencial anti-HIV. O primeiro grupo relata uma série de etapas partindo-se de uma precipitação com etanol 50% do extrato aquoso, no qual pôde-se separar uma primeira fração insolúvel majoritariamente constituída por polissacarídeos ativos. A parte solúvel seguia então para diversas separações cromatográficas envolvendo Sephadex G-25, C₄, C₁₈ e colunas pré-empacotadas de poliamida. Dependendo da ligação reversível ou irreversível, os extratos ativos puderam ser priorizados para futuros estudos. Autores contemporâneos a este trabalho, ao se investigar extratos aquosos de invertebrados marinhos na tentativa de descoberta de metabólitos secundários bioativos, desenvolveram uma metodologia de desreplicação, envolvendo também precipitação e separações cromatográficas em Sephadex G-25 e coluna DEAE-celulose eluída em gradiente com solução de NaCl. Análises de ¹³C e análise elementar, puderam determinar que os compostos com atividade anti-HIV tratavam-se de polissacarídeos sulfatados (CARDELLINA et al., 1993; BEUTLER et al., 1993).

Os primeiros relatos do uso de desreplicação de extratos microbianos levaram ao isolamento das teleocidina A-2 (**1**) e teleocidina B-1 (**2**), pendolmicina (**3**) e seu derivado 16-metilpendolmicina, elaiofilina (**4**), e a geldanamicina (**5**) (**Figura 2**) (SEDLOCK et al., 1992; ALVI, PETERSON, HOFMANN, 1995).

Figura 2 - Primeiros exemplos de substâncias detectadas por desreplicação do extrato bruto de linhagens microbianas.

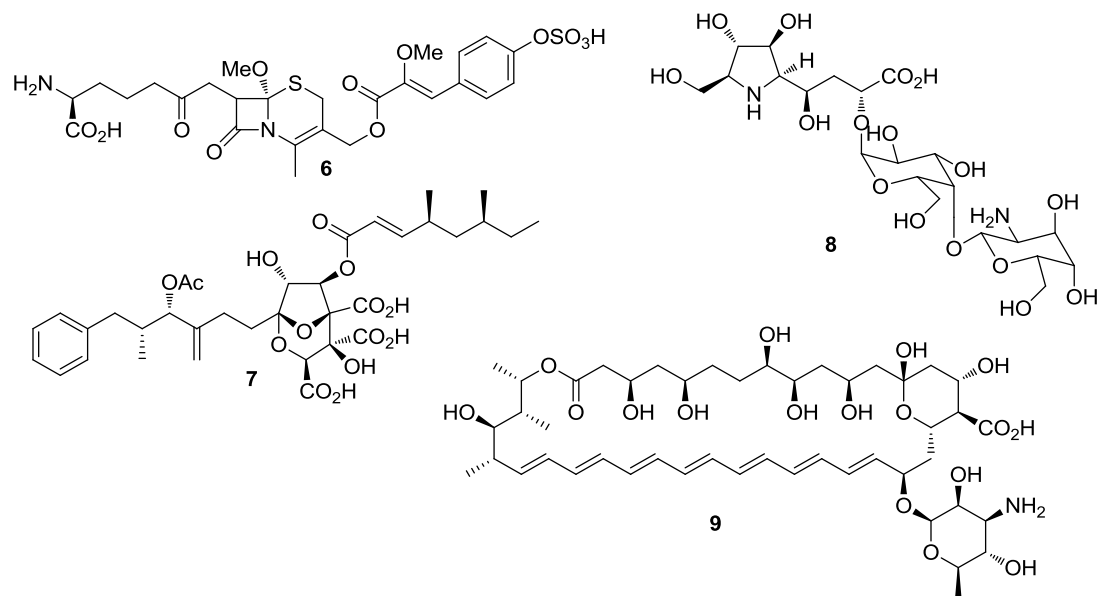


Desde então, diversos outros estudos utilizando abordagens das mais diferentes formas de desreplicação são empregados (HUBERT, NUZILLARD, RENAULT, 2017). Até março de 2023, 777 artigos mencionam o termo “desreplicação” em busca realizada pelo Web of Science. E o número de citações destes trabalhos cresce paralelamente ao de citações de artigos (24,973 citações) utilizando o mesmo termo desreplicação como palavra-chave e produtos naturais como assunto.

Métodos otimizados de desreplicação incluem uma etapa de *clean up* (“limpeza”) das amostras, seguida de análise da(s) fração(ões) obtidas por técnicas hífenadas (NIELSEN e SMEDSGAARD, 2003). Os métodos de desreplicação possibilitam a triagem de uma grande quantidade de amostras. Sendo assim, é possível se avaliar o “grau de novidade” de extratos bioativos em tempo relativamente curto.

Porém, um ponto que dificulta a descoberta de novos compostos bioativos é o favorecimento dos estudos de extratos orgânicos em detrimento dos extratos aquosos do meio de cultivo de microrganismos (BERLINCK et al., 2021). Etapas de purificação de extratos aquosos envolvem a difícil remoção de componentes do meio de cultura e de metabólitos primários. O isolamento de metabólitos como a cefamicina A (**6**, produzida por *Streptomyces griseus*), gualamycina (**7**, produzida por *Streptomyces* sp.), o ácido zaragózico A (ou esqualestatina A, **8**, fungo não identificado) e a anfotericina B (**9**, *S. griseus*) necessitou do emprego de resinas de troca iônica utilizando tampões de difícil remoção (**Figura 3**) (MILLER et al., 1972; TSUCHIYA et al., 1995; BERGSTROM et al., 1993; BARROW, 2006).

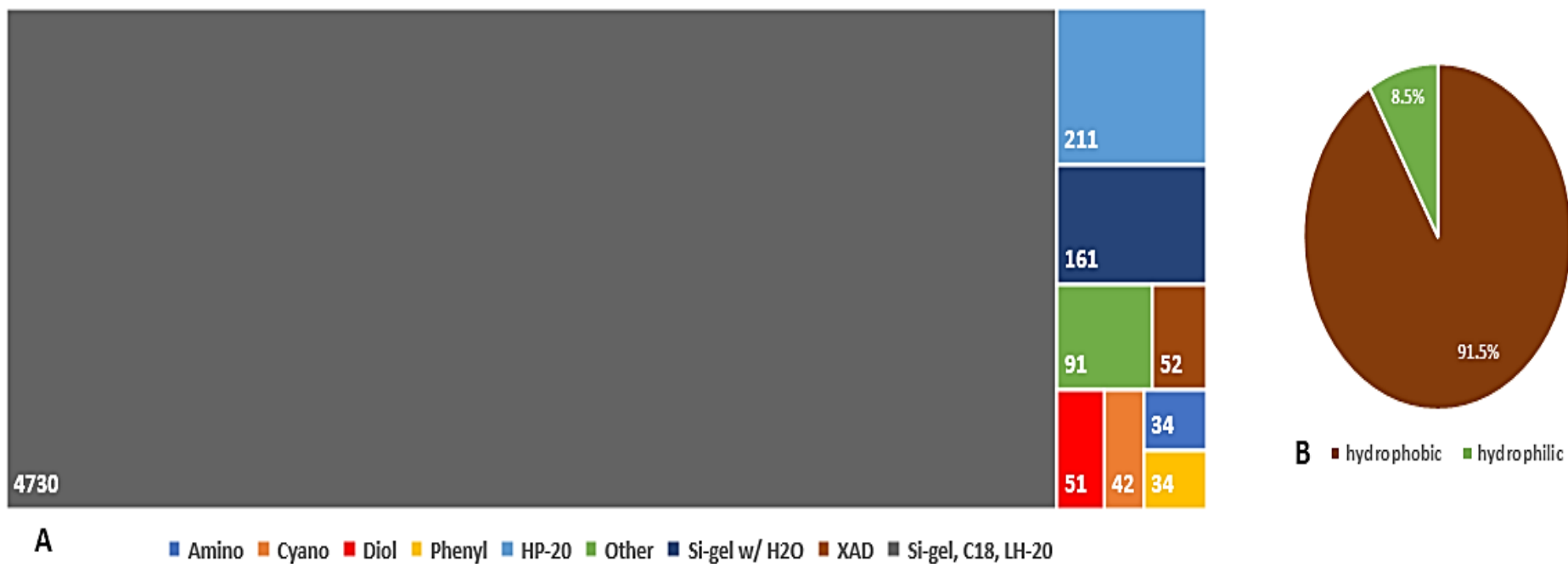
Figura 3 - Metabólitos microbianos hidrossolúveis isolados utilizando-se resinas de troca-iônica.



Recentemente um extenso artigo de revisão foi publicado pelo grupo do Prof. Dr. Berlinck, no qual os autores discutem detalhadamente as dificuldades e estratégias para se trabalhar com produtos naturais de origem aquosa. Nessa revisão bibliográfica é mencionado que uma pesquisa realizada no *Journal of Natural Products* (JNP) durante os anos de 1996-2009, cobrindo um total de 4,859 artigos publicados, os autores demonstraram que 91,5% de todos os artigos publicados durante este período relatam o isolamento de produtos naturais considerados hidrofóbicos, e apenas 8,5% relatam o isolamento de compostos hidrofílicos (BERLINCK et al., 2021).

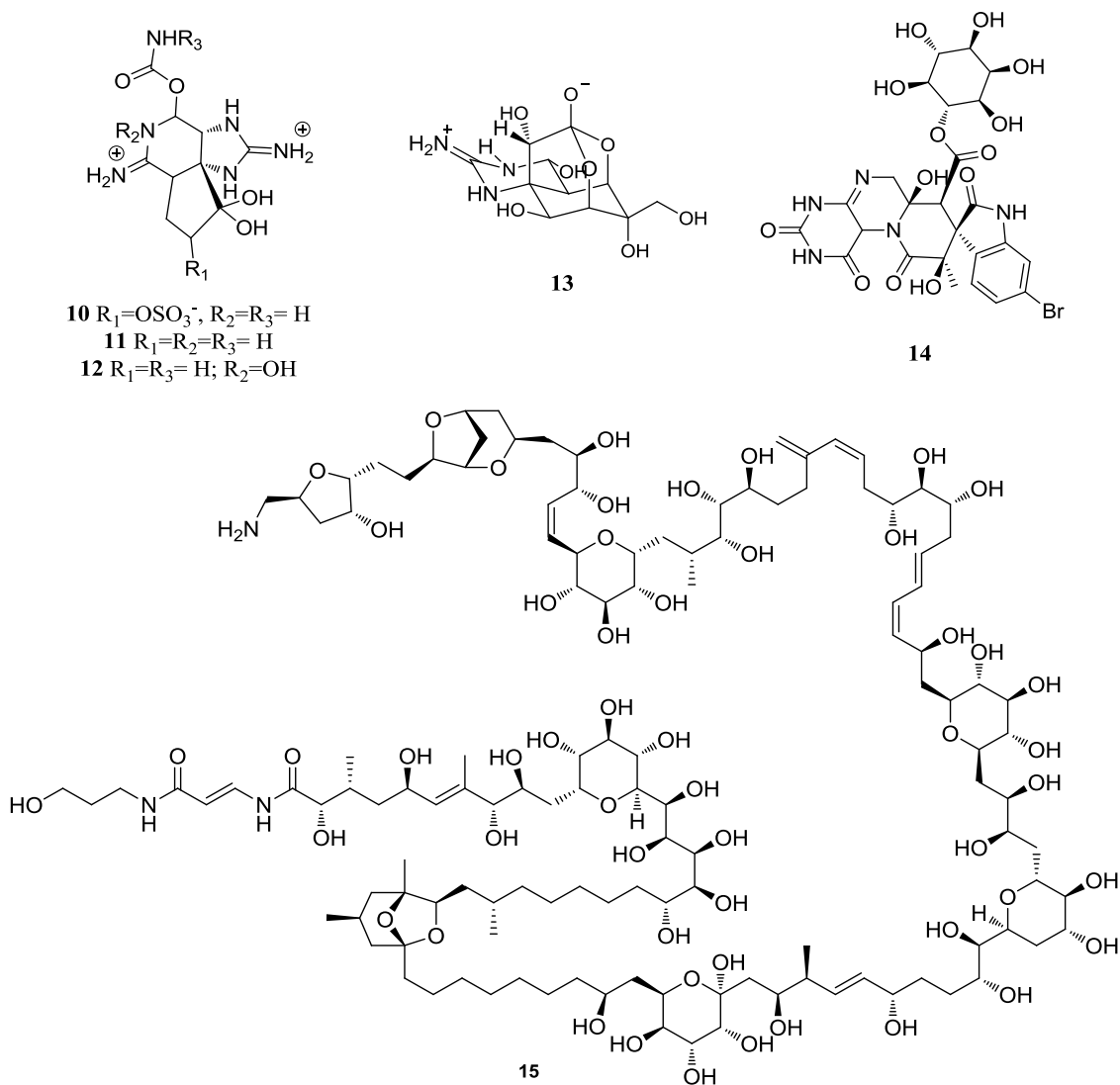
Tal tendência também reflete para o tipo de suporte cromatográfico empregado nas separações de compostos provenientes de extratos orgânicos e extratos aquosos. Fases estacionárias utilizadas para a separação de componentes hidrofílicos são muito menos utilizadas em detrimento da utilização de sílica gel, C₁₈ e sephadex LH-20 para a purificação de compostos hidrofóbicos. Podemos observar na **Figura 4** que 97,3% dos artigos investigados na pesquisa utilizaram majoritariamente sílica gel como suporte cromatográfico (BARROW, 2006; BERLINCK et al., 2021).

Figura 4 - A: Número de artigos publicados no J. Nat. Prod. entre 1996 e 2009 relatando o isolamento de metabólitos secundários utilizando as seguintes fases estacionárias: apenas Si-gel, C₁₈, LH-20 em combinação ou não, excluindo outras fases estacionárias; HP-20; Si-gel com H₂O no eluente; DIOL; Outros (incluindo C₈, poliamida, diferentes resinas adsorptivas, troca iônica); Si-gel ligado a cianopropil; resinas adsorptivas XAD (incluindo XAD-2,-4,-7,-16); Si-gel ligado a aminopropil; Si-gel ligado a fenil; **B:** Porcentagem dos 4,859 artigos publicados no JNP entre 1996 e 2009 relatando o isolamento de produtos naturais hidrofóbicos e hidrofílicos.



Para a purificação de metabólitos hidrossolúveis suportes como géis de Sephadex G10, G15, G25 e Bio Gel P2 foram amplamente empregados. Toxinas hidrossolúveis como gonyautoxina (**10**), saxitoxina (**11**), neosaxitoxina (**12**), tetrodotoxina (**13**) foram isoladas utilizando-se cromatografia em Bio Gel P2 eluída em água pura, ou água acidificada (SHIMIZU, 1985; YU, 2003). Para o isolamento da surugatoxina (**14**) duas separações em Sephadex G25 foram suficientes para a purificação (KOSUGE et al., 1972). Já a palitoxina (**15**) foi isolada a partir de extrato aquoso, envolvendo várias separações cromatográficas, uma delas através da utilização da resina de polietileno QX-2187 (**Figura 5**) (MOORE e SCHEUER, 1970).

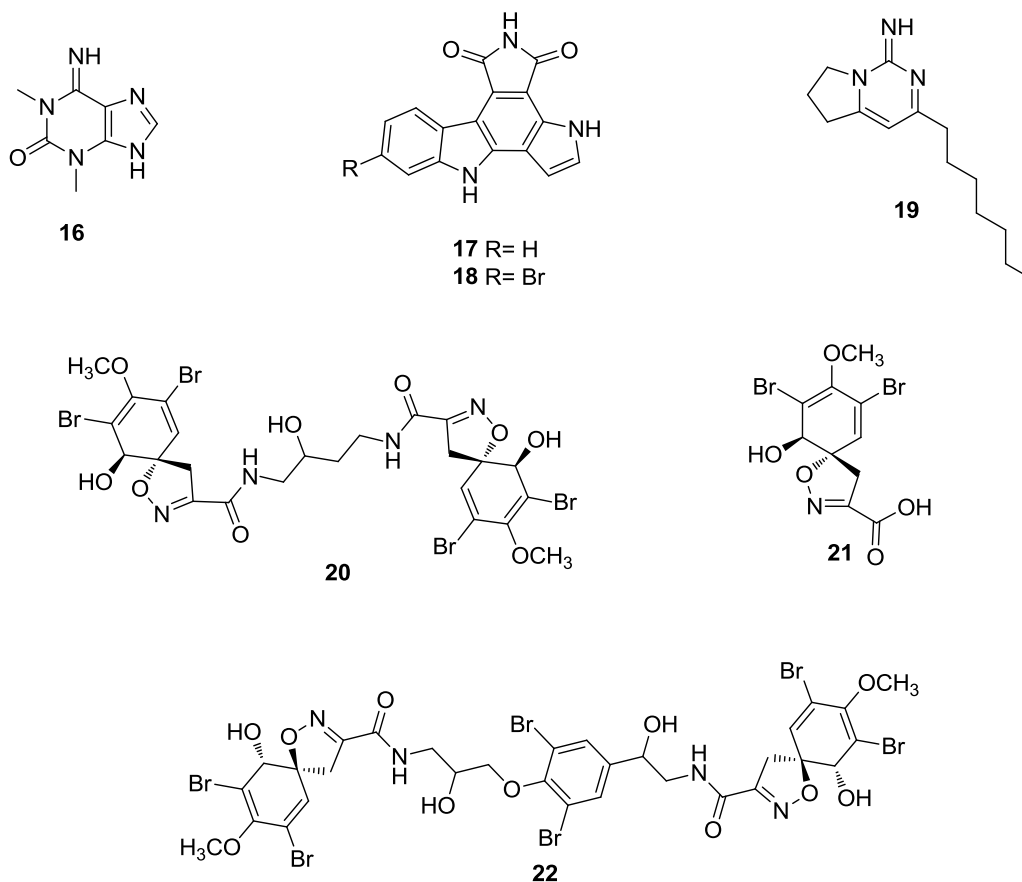
Figura 5 - Toxinas marinhas hidrossolúveis isoladas a partir de extratos aquosos de diversas fontes biológicas.



O Grupo de Química Orgânica de Sistemas Biológicos do IQSC vem desenvolvendo abordagens para o isolamento de compostos hidrossolúveis através do emprego de resinas poliméricas com capacidade adsorptivas. Estas possuem a grande vantagem do processo de dessorção ser realizado com solventes orgânicos voláteis (MeOH e acetona), e podem ser reutilizáveis (BERLICNK et al., 2022).

As estratégias incluem o emprego de resinas poliméricas de diferentes composições e propriedades, como XAD-2 (estireno-divinilbenzeno), XAD-4 e XAD-7 (metacrílicas). Do extrato aquoso e *n*-butanólico da esponja *Amphimedon viridis* foi possível isolar um novo derivado purínico (**16**) utilizando extração em XAD-2, seguido de purificações em Sephadex LH-20 e Bio GEL P2 (CHECHADE et al., 1997). Da ascídia *Didemnum granulatum*, os compostos minoritários granulatimida (**17**) e 6-bromogranulatimida (**18**) foram isolados utilizando-se XAD-7 como suporte cromatográfico (BRITTON et al., 2001). A monalidina (**19**) foi isolada a partir de fração aquosa da esponja *Monanchora arbuscula*, utilizando-se uma mistura de resinas XAD-4 e XAD-7 (SANTOS et al., 2015). Mais recentemente foi possível se isolar três derivados da dibromotirosina (**20-22**) a partir do meio de cultivo da bactéria *Pseudovibrio denitrificans* Ab134 (NICÁCIO et al., 2017). A extração inicial do meio de cultivo desta bactéria foi realizada com uma mistura de resinas XAD-2, XAD-4 e XAD-7. O mesmo meio de cultivo foi paralelamente extraído com AcOEt, mas não se observou a presença dos compostos **20-22** neste extrato (**Figura 6**).

Figura 6 - Metabólitos secundários polares isolados a partir de meio aquoso ou solúvel em água de diversas fontes biológicas.



As resinas de adsorção não-iônicas possuem características únicas que fazem com que compostos orgânicos e não-orgânicos possam se ligar a estes materiais de maneira reversível (KARVE, M. e RAJGOR, 2008). Três são os parâmetros que afetam diferentemente a capacidade de sorção desses tipos de resinas com um determinado grupo de adsorbatos. O momento de dipolo das substâncias a serem adsorvidas, o tamanho do poro que cada resina possui e por fim a área superficial de cada resina. O material a ser adsorvido deve ser capaz de migrar pelos poros até a superfície adsorvente (FONTANALS et al., 2005 e 2007; LIN e JUANG, 2009).

Recentemente o grupo do Prof. Dr. Berlinck realizou um levantamento bibliográfico no periódico *Journal of Natural Products* entre os anos de 2008 - 2018. Foi observado que de 499 artigos que relataram o isolamento de metabólitos secundários a partir de meios de cultivos de linhagens fúngicas, apenas 5% desses artigos apresentaram a utilização de metodologias diferenciadas para extração de produtos naturais (RODRÍGUEZ et al., 2020). Dentre essas metodologias, podemos destacar o uso de

resinas como SP207ss, XAD, Diaion HP-20 e Amberchrome, no intuito de se evitar a redundância no isolamento de metabólitos secundários já conhecidos.

1.1.2. - Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos e de fungos provenientes de ambientes isolados

Os microrganismos nomeadamente bactérias, fungos e vírus têm sido objeto de grande curiosidade por diversos grupos de cientistas, incluindo, químicos, bioquímicos e médicos por centenas de anos, principalmente devido às correlações destes microrganismos com a saúde humana, animal e vegetal. Correlações estas que não apenas se apresentam prejudiciais, mas também relacionadas à produção de diversos metabólitos secundários importantes como corantes, vitaminas e substâncias utilizadas no tratamento contra centenas de enfermidades (ÍOCA et al., 2014).

Microrganismos endofíticos ou também denominados endófitos são linhagens fúngicas e/ou bacterianas capazes de colonizarem o interior de tecidos ou órgãos vegetais das plantas, sendo a colonização realizada totalmente ou podendo ser mais expressivas nas folhas, caules ou raízes. De maneiras semelhantes aos fungos fitopatogênicos, eles apresentam a capacidade de penetrar na planta e se disseminar sistemicamente no hospedeiro (ARAÚJO et al., 2010). Os endófitos podem penetrar nas plantas por meio dos estômatos, raízes, ferimentos ou cicatrizes, aberturas artificiais sofridas pela ação de pragas, animais, agressões abióticas ou por meio da secreção de enzimas hidrolíticas (MACCHERONI et al., 2010; SANTOYO et al., 2016). Habitam o interior de plantas em pelo menos uma fase de seu ciclo de vida, colonizando espaços intercelulares, bem como o interior do xilema e floema, sem causar sintomas perceptíveis ou doenças (AZEVEDO et al., 2000; AZEVEDO et al., 2002; STONE et al., 2000; BORGES et al., 2009; HALLMANN et al., 1997; REKHA et al., 2013).

A simbiose entre um endófito e uma planta é um acontecimento natural que pode se apresentar como mutualismo mas também como parasitismo. Geralmente a planta hospedeira não sofre danos com a presença do fungo endofítico, mas muitas vezes essa relação é benéfica com base no equilíbrio entre as exigências do fungo invasor (que muitas vezes busca abrigo) e as respostas da planta (que podem ser a necessidade de proteção). Quando há um desequilíbrio nessa interação, a saúde da planta apresenta danos (KOGEL et al., 2006). A incidência e a variedade de espécies de microrganismos

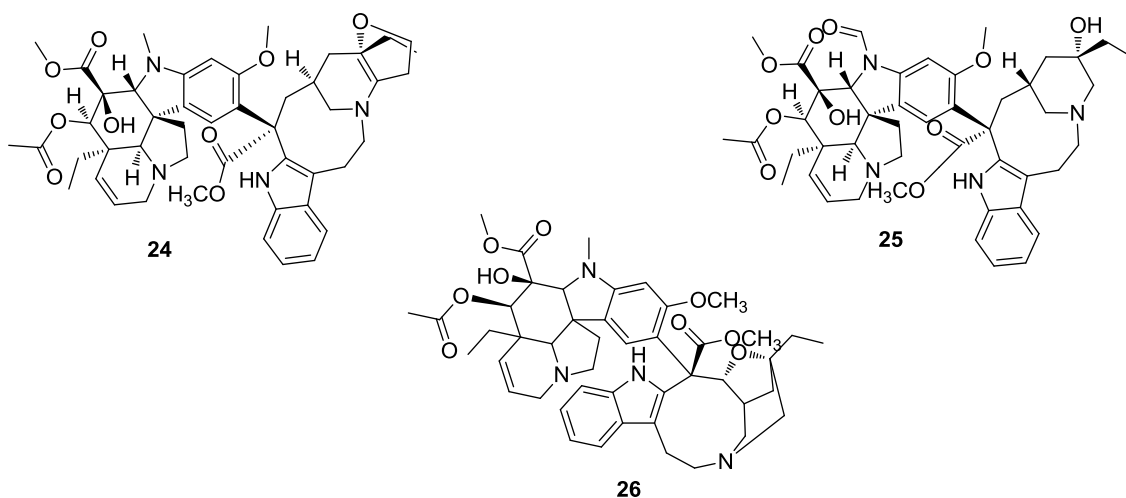
endofíticos encontrados em plantas que tiveram seus tecidos interiores investigados, podem variar de acordo com o tipo de hospedeiro, distribuição geográfica, idade da planta, condições ecológicas e sazonais (CARROLL e CARROLL, 1978; ARNOLD et al., 2003; ARAÚJO et al., 2010, 2014).

Por mais que a descoberta do primeiro microrganismo endofítico date de 1904, sabe-se que as linhagens fúngicas endofíticas têm sido associados a plantas há mais de 400 milhões de anos (Krings et al., 2007). Eles são onipresentes e ocorrem em todas as plantas conhecidas, incluindo uma ampla gama de ordens hospedeiras, famílias, gêneros e espécies, em ecossistemas tão diversos quanto musgos (DAVEY e CURRAH, 2006), gramíneas (MÜLLER e KRAUSS 2005; SU et al., 2010), árvores decíduas e coníferas (GUO et al., 2008; ALBRECHTSEN et al., 2010; MOHAMED et al., 2010; SUN et al., 2011) e líquens (SURYANARAYANAN et al., 2005). Os fungos endofíticos consistem principalmente em membros de Ascomycota, bem como alguns táxons de Basidiomycota, Zygomycota e Oomycota (ZHENG e JIANG 1995; SINCLAIR e CERKAUSKAS, 1996). Os fungos endofíticos podem ser vistos como importantes componentes dos ecossistemas naturais, podendo desempenhar papéis fundamentais na reciclagem de materiais orgânicos e energia.

Fungos endofíticos têm se mostrado fontes de diversos produtos naturais com importantes atividades biológicas (KUSARI et al., 2012; SCHULZ et al., 2002). Entretanto, a busca por novos medicamentos ou protótipos de novas drogas que possam ser utilizadas para o tratamento de doenças enfrentam diversos processos desde sua descoberta.

Em 1971 um novo produto natural terpênico foi isolado da casca do teixo do noroeste do Pacífico, *Taxus brevifolia* Nutt., denominado taxol ou paclitaxel (23, STIERLE et al., 1995). Este produto natural demonstrou atividade *in vivo* contra P-388, Leucemia murina P-1534 e L-1210, carcinosarcoma Walker 256, sarcoma 180, e sistemas de teste de tumor de pulmão de Lewis, o que culminou na aprovação pela agência regulatória FDA como um medicamento contra cânceres de mama e ovário. Com um mecanismo de ação único, o taxol visa a formação de microtúbulos, mas de uma forma única promovendo a polimerização da tubulina e estabilizando os microtúbulos contra a despolimerização (SCHIFF et al., 1979; SCHIFF et al., 1980). Os microtúbulos são um importante alvo subcelular para agentes quimioterápicos, como por exemplo os alcalóides produzidos por vinca, como a vincalécoblastina (24), leurocristina (25) e catharanthamina (26, EL-SAYED e CORDELL, 1981).

Figura 7- Alcalóides produzidos por espécies de vinca.

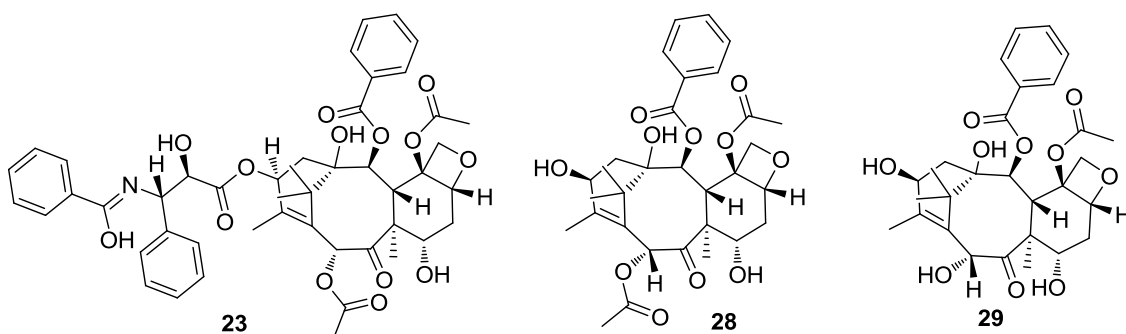


Com o advento do taxol (**23**) como um importante quimioterápico, a procura por este metabólito secundário levou praticamente a extinção de árvores do gênero *taxus*, uma vez que a quantidade produzida de taxol pelas cascas é extremamente pequena, menos de 0,02% do peso seco (STIERLLE et al., 1995). Para contornar essa nuance, diversas sínteses completas do diterpeno foram realizadas, quase que simultaneamente (NICOLAOU et al., 1994; HOLTON et al., 1994). Entretanto, a síntese total não se mostrou uma alternativa viável devido muitas subetapas e alto custo dos materiais de partida. Uma vez que a síntese completa não se mostrou suficiente para suprir a demanda de taxol para testes clínicos, semisínteses foram desenvolvidas a partir de intermediários do taxol, como a baccatina III (**28**) e a 10-deacetilbaccatina III (**29**), isolados da espécie de *Taxus baccata* (HOLTON 1990; GEORG et al., 1991). Muitas tentativas por vezes não bem-sucedidas levaram a procura por microrganismos endofíticos associados às espécies de árvores produtoras de taxol, na busca de se encontrar uma linhagem fúngica que fosse capaz de produzir o fitoterápico eficientemente em meio de cultura sem a presença de extratos foliares de árvores do gênero *taxus* (SOLIMAN e RAIZADA, 2013).

Por mais que haja uma grande controvérsia a respeito se linhagens fúngicas endofíticas podem ser produtoras ou não de taxol em meio de cultivo, a primeira linhagem endofítica descrita como produtora de taxol foi denominada *Taxomyces andreana*, isolado do interior das cascas de *Taxus brevifolia* (STIERLE et al., 1993). Esta linhagem é capaz de biossintetizar apenas microgramas de taxol (**23**) por litro de cultura. Relata-se

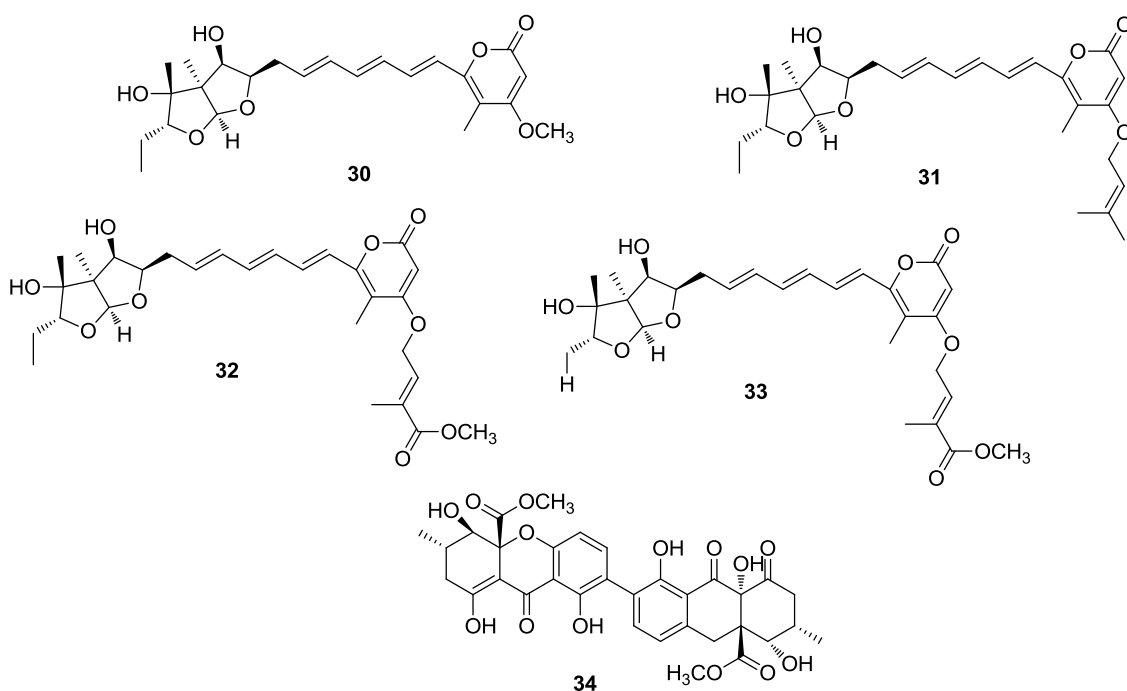
que pelo menos 18 linhagens fúngicas já foram reportadas como produtoras de taxol (ZHOU et al., 2010). Recentemente uma linhagem isolada de *Taxus x media* proveniente do Canadá, denominada *Paraconiothyrium* SSM001 foi avaliada em diferentes meios de cultivo contendo ou não extratos vegetais de espécies de taxus, na tentativa de se aumentar ou induzir a produção de taxol. Resultados apontam que quando o endófito foi cultivado na presença de outros fungos endofíticos também presentes na espécie vegetal (*Alternaria* e *Phomopsis*), a produção de taxol pela linhagem *Paraconiothyrium* SSM001 pôde ser aumentada em até oito vezes (SOLIMAN e RAIZADA, 2013).

Figura 8 - Metabólitos secundários isolados de árvores do gênero *Taxus*



O taxol é o exemplo mais bem conhecido de um produto natural isolado de plantas que pode vir a ser produzido por fungos endofíticos à espécie hospedeira, com um alto valor agregado. Todavia, muitas espécies de endófitos também são capazes de produzir uma ampla gama de metabólitos secundários de grande importância estrutural (que podem servir como protótipos para sínteses totais de produtos naturais mais elaborados), como também fonte de novos agentes terapêuticos (NEWMANN e CRAGG, 2020). Da espécie *Aspergillus versicolor* Y10 encontrada nos tecidos da espécie vegetal *Huperzia serrata*, levou ao isolamento de derivados prenilados asteltoxina denominados como avertoxinas A-D (30-33). Avertoxina C (32) apresentou atividade significativa inibitória frente a acetilcolinesterase humana com IC₅₀ de 14,9 μM, além de moderada atividade citotóxica (WANG et al., 2015). Do meio de cultivo de *Aspergillus aculeatus*, endofítico de *Rosa damascena* Mill., um derivado inédito de ácido escalênico teve sua estrutura determinada. O policetideo F7 (34) apresentou dano mitocondrial e as espécies reativas de oxigênio mediaram a apoptose em células TNBC (células triplo negativa de câncer de mama), interrompendo a fase G1 do ciclo celular. Foi observado também ruptura significativa de microtúbulos dessas células (FAROOQ et al., 2020).

Figura 9 – Exemplos de metabólitos secundários produzidos por espécies de fungos endofíticos pertencentes ao gênero *Aspergillus*.



Na natureza os fungos evoluíram ao longo tempo para ocupar uma ampla gama de nichos ecológicos, dependendo de fatores abióticos como temperatura, disponibilidade de água, balanço de gases e pH do ambiente em que se encontram (MAGAN, 2007). Por isso, a busca por linhagens de microrganismos considerados “únicos ou exóticos” em ambientes extremos ou ambientes que sejam intocados pela ação humana é de grande interesse, uma vez que pode nos proporcionar uma inesgotável fonte de novas descobertas (GOSTINCAR, ZALAR, GUNDE-CIMERMAN, 2021).

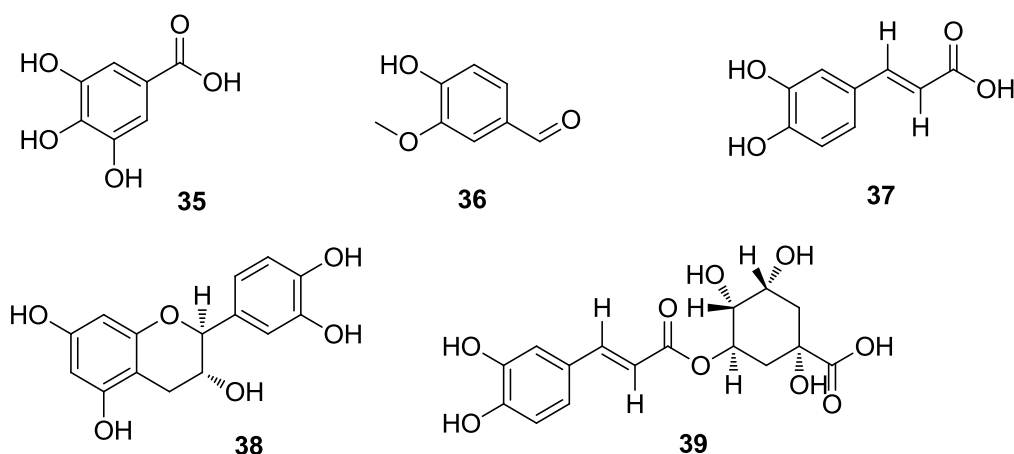
A procura por linhagens que sejam consideradas “únicas” provenientes de ambientes cavernícolas constituem-se de grande interesse, uma vez que ambientes como cavernas são considerados ambientes oligotróficos extremos e possuem características específicas que determinam a microbiota local. Poucos estudos investigaram a composição e funcionalidade da microbiota edáfica de ambientes subterrâneos. O levantamento da microbiota da caverna Driny localizada nas montanhas do Cárpatos, na Eslováquia, levou à obtenção de 30 espécies de fungos, todos de espécies conhecidas. Estudo análogo realizado com fezes de morcegos coletadas em cavernas da mesma região

levaram ao isolamento de 14 espécies de fungos, todos igualmente já descritos (OGÓREK et al., 2016a; OGÓREK et al., 2016b).

Análise da microflora do solo da caverna Chaabe na Argélia (BELYAGOUBI et al., 2018), revelou a presença de diversas bactérias do gênero *Streptomyces* e a presença de oito gêneros de linhagens fungicas. O gênero mais abundante era pertencente ao gênero *Penicillium* spp. (60,53%; 23 espécies), *Cladosporium* spp. (10,53%; 4 espécies), *Alternaria* sp. e *Aspergillus* sp. (7,89%; 3 espécies), *Beauveria* sp. (5,26%; 2 espécies), *Rhizopus* sp., *Rhizomucor* sp., e *Readeriella* sp. (2,63%; 1 espécie). Interessantemente, a espécie de *Readeriella* sp. é normalmente associada a espécie vegetal de *Eucalyptus*. Outro relato filogenético mas desta vez da caverna Heshang (China) revelou que a diversidade de fungos cultiváveis do solo era pertencente majoritariamente ao gênero *Penicillium* sp. (52% das espécies determinadas), seguido pela presença de fungos pertencentes aos gêneros *Trichoderma*, *Paecilomyces* e *Aspergillus*, e com presença minoritária de fungos do gênero *Cladosporium* e *Beauveria felina* (MAN et al., 2015). Não existe uma relação evidente entre determinado tipo de gênero fúngico a ser encontrado com os solos cavernícolas, entretanto, a microbiota é influenciada pelo tipo do material rochoso, a composição mineral das rochas, a porosidade das rochas e principalmente pelas condições ambientais, como disponibilidade de água, temperatura, pH e fonte de matéria orgânica (GORBUSHINA, 2007).

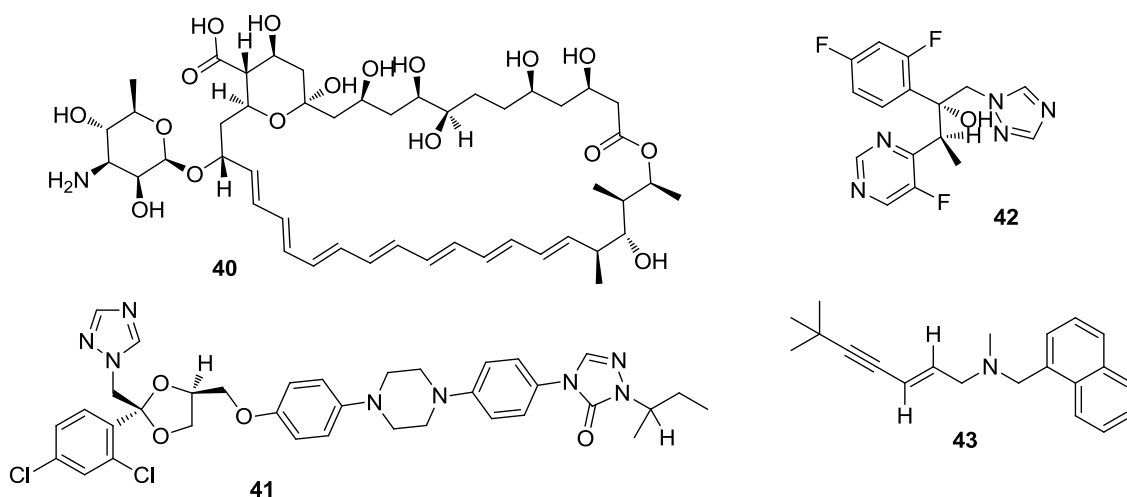
No Brasil o primeiro estudo da microbiota de uma caverna é considerado o relato da caverna de Lapa Nova, no município de Vazante (Minas Gerais), no qual resultou no isolamento de linhagens de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Calcarisporium*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Emericella*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gliocladium*, *Mucor*, *Purpureocillium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Trichoderma* (TAYLOR et al., 2017; FERREIRA et al., 2009). Na tentativa de se avaliar o poder de produção de metabólitos secundários com capacidade antioxidante, os fungos isolados do solo do quadrilátero ferrífero mineiro, *Penicillium flavigenum*, *Aspergillus sydowii*, *Lecanicillium aphanocladii*, *Aspergillus keveii*, *Epicoccum nigrum*, *Aspergillus aureolatus*, foram investigados frente aos ensaios de DPPH, ABTS e determinação dos fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteu. Devido ao alto poder antioxidante encontrado nos extratos de *P. flavigenum*, o extrato fenólico deste isolado foi investigado por HPLC-UV, e os compostos ácido gálico (**35**), vanilina (**36**), ácido caféico (**37**), catequina (**38**), ácido clorogênico (**39**) foram considerados responsáveis pela atividade antioxidante (TAVARES et al., 2008).

Figura 10 - Metabólitos secundários isolados de *Penicillium flavigenum*.



Investigação subsequente conduzida pelo mesmo grupo de pesquisadores brasileiros verificou que várias das linhagens de fungos isoladas de diferentes cavernas da região do quadrilátero ferrífero apresentam resistência aos anti-fúngicos anfotericina B (40), itraconazol (41), voriconazol (42) e terbinafina (43).

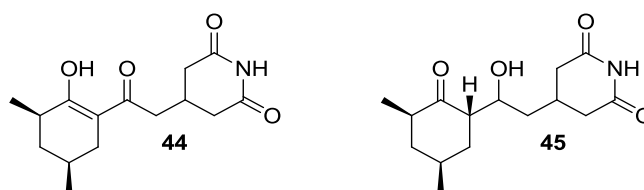
Figura 11 - Antifúngicos utilizados como controle contra fungos e utilizados frente à fungos isolados de ambientes cavernícolas.



Ainda não existem estudos químicos do metabolismo secundário de linhagens fúngicas isoladas de ambientes cavernícolas fora do Brasil. Todavia, o único relato de isolamento de metabólitos secundários de microrganismos provenientes de solo é o estudo da bactéria do gênero *Streptomyces* isolados da gruta de *Collemboles* na Bélgica,

que demonstrou que dentre 78 linhagens cultiváveis isoladas, 29 apresentaram atividade antibiótica contra *Bacillus subtilis* e contra *Rasamsonia argilacea*, 27 contra *Micrococcus luteus*, 26 contra *Penicillium chrysogenum*, 24 contra *Aspergillus fumigatus* e 20 contra *Klebsiella pneumoniae* MACIEJEWSKA et al., 2016). A linhagem denominada *S. fulvissimus* DSM 40593 produziu a cicloheximida (**44**) e a deidroheximida (**45**).

Figura 12 - Metabólitos secundários isolados da bactéria *S. fulvissimus* DSM 40593 encontrada em caverna da Bélgica.



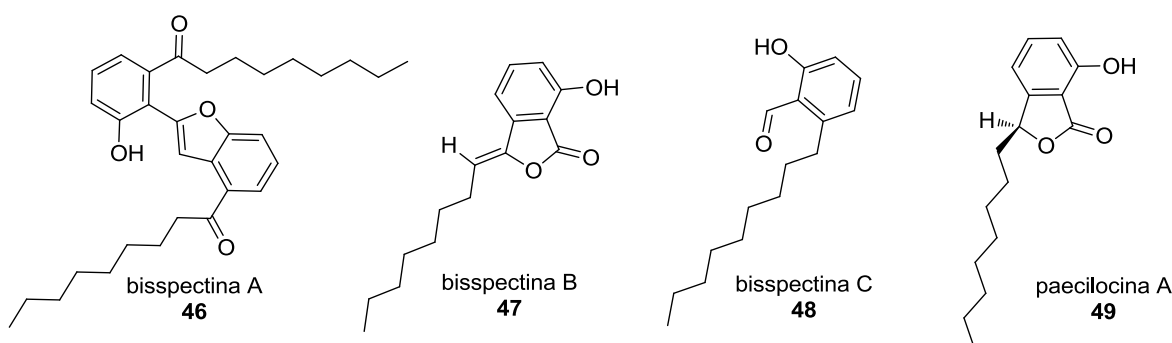
1.1.3. O gênero *Byssochlamys*

O gênero *Byssochlamys* (Thermoascaceae: Eurotiales) é constituído por espécies fúngicas estreitamente relacionadas aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Os fungos deste gênero são comumente encontrados em solo, plantas e até mesmo algas marinhas. Como estão amplamente distribuídos em diversos nichos biológicos, algumas espécies de *Byssochlamys* produzem ascósporos (estrutura reprodutiva de fungos da classe dos Ascomycetos), que são capazes de sobreviver ao calor e baixo nível de oxigênio (HOUBRAKEN, et al., 2008; YILMAZ et al., 2014; SAMSON et al., 2009).

Existem pelo menos dois estudos do metabolismo secundário de *B. spectabilis* isolados de plantas. O primeiro relata o isolamento de *B. spectabilis* associado aos tecidos de uma planta utilizada na medicina tradicional chinesa, *Edgeworthia chrysantha* Lindl, pertencente à família Thymelaeaceae, que vêm sendo usada no tratamento de delacrimação, oftalmalgia (dor nos olhos sem presença de inflamação), inchaço dos olhos e poluição noturna (BABA et al., 1990; HASHIMOTO, TORI, ASAKAWA, 1991). O estudo do extrato orgânico de *B. spectabilis*, levou ao isolamento da bisspectina A (**46**), considerado como um policetídeo com um novo esqueleto de carbono, juntamente com dois novos derivados que foram idealizados como precursores biossintéticos de bisspectina A, as bisspectinas B e C (**47** e **48**). Conjuntamente os autores relatam o isolamento do policetídeo conhecido paecilocina A (**49**).

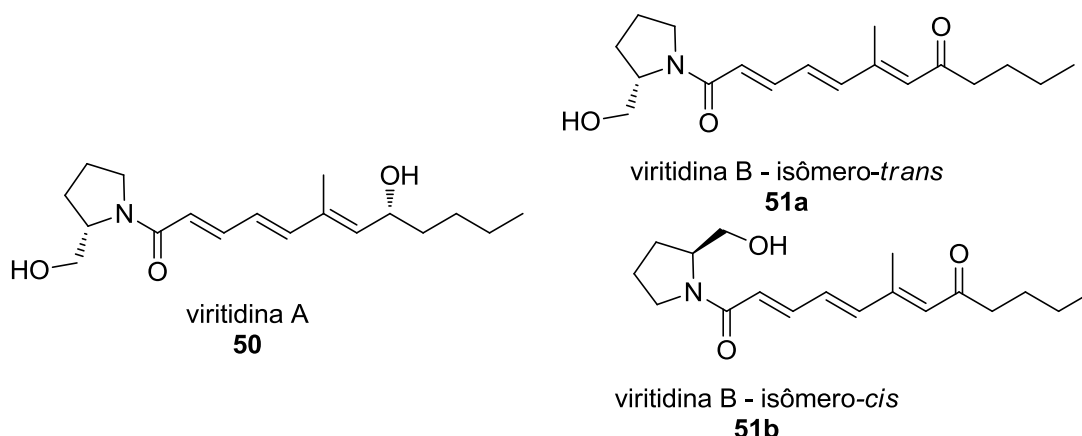
Testes antimicrobianos *in vitro* realizados frente as linhagens de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* demonstraram que a bisspectina C foi fracamente ativa, entretanto a bisspectina A (**46**) e a paecilocina A (**49**) exibiram efeitos inibitórios seletivos frente hCE-2. Especialmente, o novo dímero octacetídeo (**46**) mostrou forte inibição de hCE-2 com o valor IC₅₀ de 2,01 mM, que os autores atribuíram tão forte inibição à sua estrutura molecular altamente hidrofóbica (WU et al., 2018). As carboxilesterases de humanos (hCES) são uma importante classe de serina hidrolases que quebram numerosas substâncias endógenas e xenobióticos que contenham ligações éster ou amida. São comumente encontradas no fígado e no intestino e possuem a característica de biotransformar várias classes de drogas contendo grupos éster, agentes anticancerígenos, analgésicos opiáceos, inibidores da HMG-CoA redutase (estatinas), estimulantes do SNC, medicamentos antivirais e agentes antiplaquetários. (HATFIELD et al., 2016).

Figura 13 - Metabólitos secundários isolados de *B. spectabilis* endófito de *Edgeworthia chrysantha* Lindl.



O segundo estudo descrevendo o metabolismo secundário de uma espécie *B. spectabilis*, linhagem DSM 109444 endófito de *Vitis vinífera L.*, levou ao isolamento de dois compostos denominados viritidina A (**50**) e B (**51**) (LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al., 2020). A viritidina A já é um composto conhecido, entretanto a viritidina B (**51**) não. Interessantemente, o composto viritidina B (**51**) apresentou forte cis-isomerismo trans-amida (**51a** e **51b**). As configurações absolutas foram determinadas pelo método de Mosher e o derivatização por Marfey. Viritidina A (**50**) apresentou fraca citotoxicidade frente a linhagem celular KB3.1 (carcinoma epidérmico humano) com um IC₅₀ de 30 mg ml⁻¹.

Figura 14 - Metabólitos secundários isolados de *B. spectabilis* DSM 109444 endófito de Videira (*Vitis vinifera* L.).

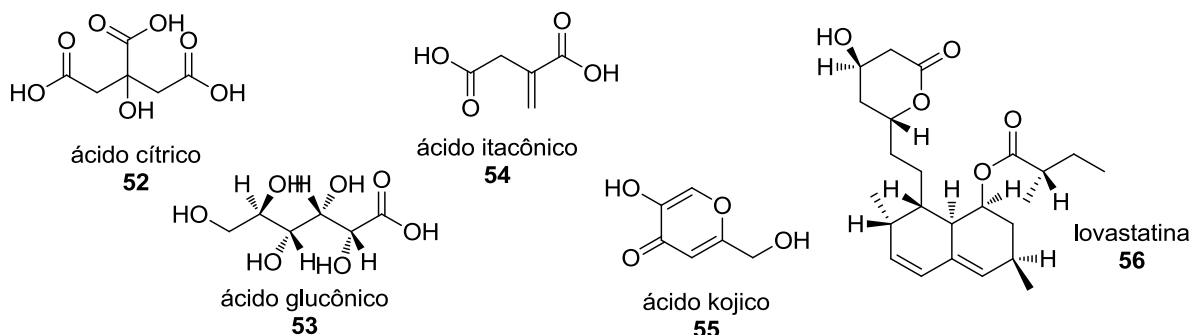


1.1.4. O gênero *Aspergillus*

A primeira descrição como um gênero fúngico remonta a 1729 por Micheli, que concedeu o nome *Aspergillus* ao gênero do devido a estrutura de seus esporos, que se assemelhava muito a um aspersório (do latim, *aspergillum*). Todavia, uma descrição completa do gênero apenas foi realizada em 1965 por Rapper e Fennel, onde foram reconhecidas cerca de 132 espécies (BENNETT, 2010; GEISER et al., 2007).

Atualmente, o gênero *Aspergillus* é um dos gêneros fúngicos mais amplos em todo o planeta, compreendendo aproximadamente 339 espécies aceitas (SAMSON et al., 2014). É um dos gêneros fúngicos com maior importância econômica, uma vez que são capazes de produzir muitos produtos com alto valor agregado, enzimas extracelulares como β -galactosidases, β -mananases, xilanases e celulases. Entretanto, o interesse comercial do conhecimento a respeito da ação desses microrganismos é devido a produção em meio de cultura de diversos metabólitos secundários com interesse nas mais diversas redes industriais, tais como: ácidos orgânicos como ácido cítrico (52), ácido glucônico (53), ácido itacônico (54) e ácido kojico (55) (BENNETT, 2010). Além destes compostos de alto valor agregado, fungos do gênero *Aspergillus* são responsáveis pela produção de um dos medicamentos mais vendidos globalmente para tratar o colesterol elevado no sangue e reduzir o risco de doença cardiovascular, a lovastatina (56), produzida por *Aspergillus terreus* (NEUVONEN, BACKMAN, NIEMI, 2008; GIBBONS e ROKAS, 2013).

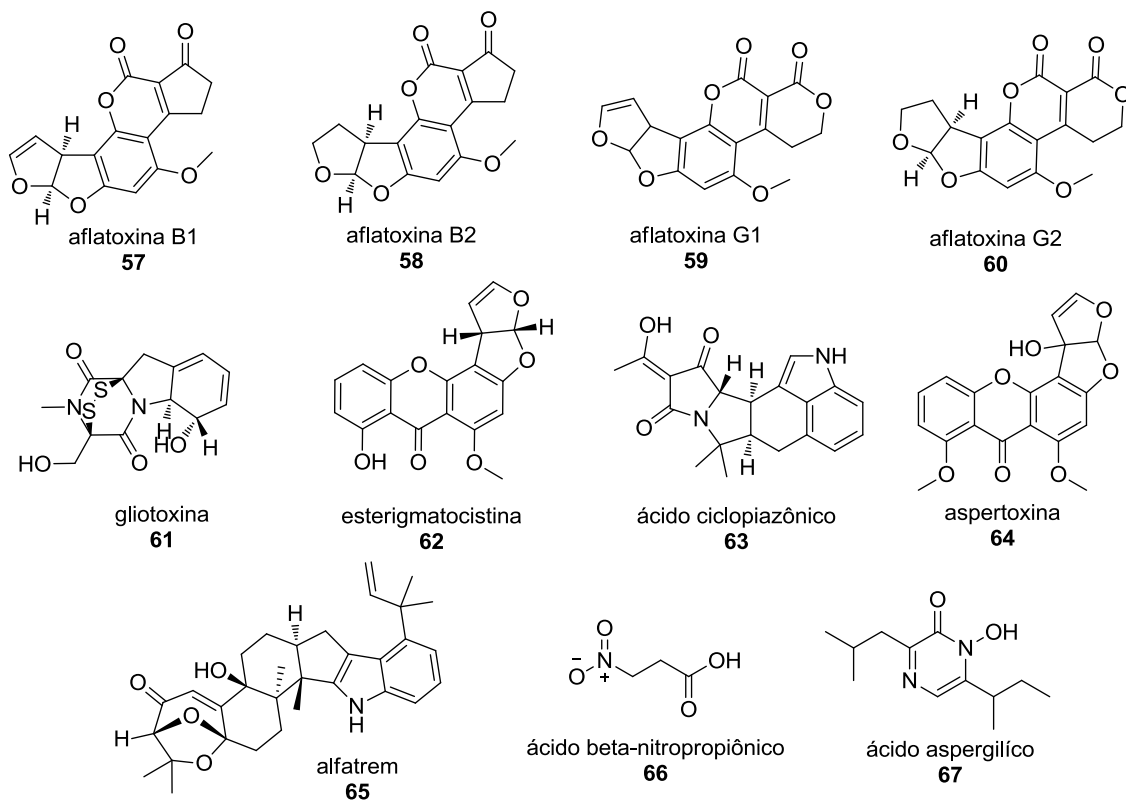
Figura 15 - Pequenas moléculas e lovastatina com alto valor agregado produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*.



Dentre as várias classes de metabólitos secundários produzidos por espécies de *Aspergillus* seus membros são frequentemente relatados como contaminantes de alimentos ou como causadores de algumas micoses humanas, tais como aspergilose pulmonar, onimicose (infecção nas unhas) e ceratite micótica ou ceratomicosose (infecção ocular de difícil tratamento, pois os próprios mecanismos de defesa dos olhos, como piscar e lacrimejar, eliminam a ação dos colírios) (KOCSUBÉ et al., 2016). Essas substâncias produzidas por fungos deste gênero, são denominadas de aflatoxinas, que literalmente significa "toxina de *Aspergillus flavus*", e são usadas como quimiomarcadores deste gênero (YU et al., 2004) Entretanto, várias espécies taxonomicamente relacionadas a *A. flavus* são capazes de sintetizar essas toxinas, como por exemplo, *A. parasiticus*, *A. arachidicola*, *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. pseudonomius* e *A. pseudotamari* (TANIWAKI, PITT, MAGAN, 2018).

As quatro aflatoxinas mais conhecidas são a B1 (57), B2 (58), G1 (59) e G2 (60), dentre pelo menos 16 toxinas estruturalmente relacionadas. Elas podem estar presente em diversos tipos de grãos, como milho, arroz, café, amendoim, nozes e frutas durante ou após a colheita, mas a contaminação pode ocorrer principalmente durante o armazenamento dos alimentos (TORRES et al., 2014; GUCHI, 2015; MARTIN et al., 2017; SHOTWELL et al., 1966). Além das aflatoxinas, espécies de *Aspergillus* também são capazes de produzir compostos como gliotoxina (61), esterigmatocistina (62), ácido ciclopiazônico (63), aspertoxina (64), aflatrem (65), ácido β -nitropropiónico (66) e ácido aspergílico (67) (HEDAYATI et al., 2007).

Figura 16 - Aflatoxinas e demais metabólitos secundários produzidos por diferentes espécies de *Aspergillus*.



1.2. Objetivos

Tendo-se em consideração que a maior parte dos novos medicamentos aprovados e em uso são produtos naturais ou têm suas estruturas baseadas em produtos naturais (NEWMANN e CRAGG, 2020), e a grande necessidade de descoberta de novos protótipos para fármacos e/ou produtos naturais que apresentem atividade biológica relevante para a saúde humana, este trabalho tem por objetivo fundamental o estudo de extratos obtidos a partir do meio de cultura líquido de linhagens de fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Byssochlamys* e *Aspergillus*, provenientes de ambientes considerados únicos. Adicionalmente, realizar um estudo analítico de correlação entre a natureza das resinas adsorptivas XAD-2,-4,-7 e a estrutura do alcaloide peptídico solitumina A isolado a partir dos extratos obtidos da linhagem fúngica filamentosa *Penicillium solitum* IS1-A, proveniente da Antártica. Para alcançar estes objetivos, constituem-se os objetivos específicos deste trabalho:

- a) O desenvolvimento e otimização de metodologia de desreplicação por HPLC-UV-MS-ELSD para priorização de extratos de fungos endofíticos e não-endofíticos mais relevantes para estudo;
- b) Elaborar um banco de dados com os resultados obtidos de desreplicação, de maneira a disponibilizar informações sobre métodos de separação mais adequados, perfil cromatográfico e natureza dos constituintes químicos presentes nos extratos;
- c) Prover informações para a seleção e priorização de extratos a serem estudados, objetivando o isolamento de constituintes químicos inéditos e ativos em bioensaios;
- d) Isolar e identificar metabólitos secundários hidrossolúveis produzidos por um fungo endofítico *Byssochlamys spectabilis* Aa1 isolado de *Anthurium alcatrazense*;
- e) Isolar e identificar metabólitos secundários lipofílicos produzidos por um fungo filamentosos *Aspergillus* sp. SDC28 isolado de solo de caverna;
- f) Avaliar quando possível as atividades biológicas dos metabólitos secundários isolados em suas formas puras;
- g) Avaliar o poder extrativo das resinas de adsorção XAD-2,-4,-7 através da solitumina A, um alcaloide peptídico isolado da linhagem fúngica *Penicillium solitum* IS1-A.

1.3. Materiais e métodos

1.3.1. Generalidades

1.3.1.1. Sistemas cromatográficos HPLC-UV-ELSD-MS e UPLC-QToF-MS

Análises por HPLC-UV-ELSD-MS foram realizadas em sistema cromatográfico Waters[®], que consiste em um sistema de controle Alliance, modelo Waters 2695, acoplado a um detector espectrofotométrico UV-visível, modelo Waters 2696, com detector de arranjo de fotodiodos e um detector de espectrometria de massas, modelo Waters Micromass ZQ 2000, operando utilizando plataforma Empower.

O detector de absorção no ultravioleta (UV) foi ajustado para detecção na faixa de λ_{max} 200–400 nm. O espectrômetro de massas (MS) foi ajustado para as seguintes condições: voltagem do capilar 3,00 kV, temperatura na fonte 100 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, ionização por eletrospray (ESI) operando nos modos positivo e negativo, com detecção na faixa de 100 – 1200 Da, para a aquisição de cromatogramas de íons totais (TIC). O fluxo de gás no cone e de dessolvatação foram mantidos em 50 e 350 L/h, respectivamente. A aquisição dos dados e processamento foram realizados utilizando plataforma Empower 2.0.

As análises foram realizadas utilizando uma coluna de fase reversa C₁₈ (Waters X-Terra RP 18, 250 x 4,6 mm, 5µm de tamanho de partículas) com fluxo de fase móvel de 1 mL min⁻¹. A eluição foi realizada com fase móvel composta de (A) H₂O com 0,1% de ácido fórmico e (B) 1:1 (v/v) MeOH/MeCN com 0,1% ácido fórmico. O gradiente foi aplicado da seguinte forma: 0-1,0 minutos mantido em 10% B, gradiente linear até 100% B de 1,0-21,0 min, de 21,0-23,0 minutos foi mantido 100% B, de 23,0-30,0 minutos foi mantido 10% B para condicionamento da coluna. O tempo total da análise foi de 30 minutos. O volume de injeção foi de 20 µL de uma solução 1,0 a 2,0 mg mL⁻¹.

As análises de UPLC-QToF-MS foram realizadas utilizando coluna BEH C₁₈ (2,1 x 100 mm, 1,7 µm; Waters Corporation) e fase móvel composta por H₂O Milli-Q com 0,1% de ácido fórmico (Panreac) e MeCN (Sigma) com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente de eluição usado foi de 90:10 de H₂O/MeCN a 100% MeCN por 7 min, mantido em 100% de MeCN por 2 min e H₂O/MeCN 90:10 por 0,9 min; com fluxo de 0,50 mL min⁻¹. A coluna foi mantida a uma temperatura de 40 °C e as amostras foram mantidas a

15 °C. A aquisição de espectros de massa no modo MS centróide foi realizada em modo de resolução positiva, tempo de aquisição de 0 a 10 minutos, fonte ESI, faixa de massa de 100 a 1200 Da, tempo de varredura de 0,2 s⁻¹. As condições ESI do modo positivo foram: tensão capilar de 1,2 kV, tensão cone de 30 V, temperatura da fonte a 100 ° C, temperatura de dessolvatação de 450 °C, fluxo de gás cúbico de 50 L h⁻¹ e fluxo de gás de dessolvatação de 750 L h⁻¹. Para a calibração interna, utilizou-se uma solução de encefalina leucina (Sigma) 200 pg mL⁻¹, infundida pela sonda *lock-mass* com vazão de 10 µL min⁻¹. As amostras foram diluídas em MeOH com concentração de 0,01 mg mL⁻¹.

1.3.1.2. Solventes

Os solventes utilizados para procedimentos de extração, cromatografia em coluna pré-empacotada e limpeza de resinas foram de grau analítico (Synth). Já os utilizados no sistema cromatográfico HPLC-UV-ELSD-MS são de grau HPLC (AppliChem Panreac, Sigma-Aldrich, Honeywell – Riedel-de-Haen, J.T. Baker). Foi utilizada água destilada e purificada em um sistema Milli-Q Millipore equipado com resina de troca iônica e filtro biológico. Para as análises em UPLC-QToF-MS os solventes apresentavam grau elevado de pureza (Sigma-Aldrich, Honeywell – Riedel-de-Haen). A água destilada utilizada para preparo de meio de cultura foi preparada por um sistema de osmose reversa TE-4007-10 Tecnal.

1.3.1.3. Análises físicas dos compostos isolados

As rotações ópticas foram registradas em um polarímetro Polartronic H Schmidt+Haensch. Os espectros de UV foram registrados em um espectrofotômetro Shimadzu UV-3600. Os espectros de IV foram obtidos em um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier Shimadzu IRAffinity-1 em uma placa de sílica. Os espectros de RMN foram obtidos a 25 °C, com o próprio solvente como padrão interno, usando um espectrômetro Bruker AV-600 operando em 600 MHz (¹H) ou 150 MHz (¹³C) com criosonda de 2,5 mm.

Os espectros UV/ECD foram registrados na região de 195–400 nm com um espectrômetro Jasco J-815 (Jasco, Tóquio, Japão) usando os seguintes parâmetros: largura de banda 1 nm; resposta 1 s; velocidade de varredura 100 nm/min; 5 acumulações;

temperatura do quarto; Célula de quartzo com comprimento de caminho de 0,1 cm. Com as amostras preparadas em MeOH.

Os cálculos DFT e TD-DFT para os compostos isolados do fungo endofítico **L9/Aa1** foram realizados a 298 K em solução MeOH usando o modelo contínuo polarizável (PCM) em sua versão de formalismo de equação integral (IEFPCM) incorporado no software Gaussian 09.35. Os cálculos foram realizados para o confômero escolhido arbitrariamente (9*S*,14*S*)-**68** e (9*R*,14*S*)-**68**, (3*S*,6*S*)-**76** e (3*R*,6*S*)-**76**, bem como (9*S*)-**77**. Pesquisas conformacionais foram realizadas no nível da teoria da mecânica molecular empregando o campo de força MMFF incorporado no pacote de software Spartan 08. Inicialmente, 100 confômeros foram identificados para todas as configurações, com energia relativa (*rel E.*) dentro de 10 kcal mol⁻¹ do confômero de menor energia. Esses confômeros foram então otimizados em geometria no nível B3LYP/PCM(MeOH)/6-31G(d). Para o composto **68**, 16 confômeros de (9*S*,14*S*)-**68** e 18 de (9*R*,14*S*)-**68**, que contribuíram $\geq 2\%$ da população total de Boltzmann, foram selecionados para cálculos espectrais de UV e ECD. Com relação ao composto **76**, os confômeros 13 e 12 de (3*S*,6*S*)-**76** e (3*R*,6*S*)-**76**, respectivamente, foram selecionados para cálculos de UV e ECD. Finalmente, para o composto **77**, 6 confômeros foram selecionados para cálculos espectrais de UV e ECD. A análise vibracional não resultou em frequências imaginárias para todos os confômeros, confirmando-os como mínimos reais. TD-DFT foi empregado para calcular a energia de excitação (em nm) e força rotatória *R* na forma de velocidade de dipolo (*R*_v em unidades cgs: 10⁻⁴⁰ esu² cm²), no nível CAM-B3LYP/PCM(MeOH)/TZVP. As forças rotatórias calculadas das primeiras 30 transições eletrônicas singleto → singleto foram simuladas em uma curva ECD usando bandas gaussianas com uma largura de banda de σ 0,25 eV. As transições de comprimento de onda previstas foram multiplicadas com um fator de escala variando de 1,08-1,10, determinado pela melhor concordância entre os espectros de UV experimentais e calculados. O fator de Boltzmann para cada confômero foi calculado com base nas energias eletrônicas no nível CAM-B3LYP/PCM(MeOH)/TZVP.

Os espectros de UV e ECD dos compostos isolados do fungo de caverna **SDC28 78** e **79** foram registrados usando um espectrômetro Jasco J-810 na região de 200–500 nm usando os seguintes parâmetros: três acumulações; temperatura ambiente; amostras em soluções de metanol; comprimento do caminho da célula de 0,1 cm; e concentração de 0,3 mg ml⁻¹. Os espectros de IR e VCD foram medidos usando um espectrômetro Chiral/IR-2XFT-VCD (BioTools Inc.) usando uma resolução de 4 cm⁻¹ e tempo de coleta

de 20 h. O retardo ótimo do modulador ZnSe fotoelástico foi fixado em 1400 cm^{-1} . Os desvios instrumentais menores da linha de base foram eliminados dos espectros finais subtraindo os espectros de VCD do composto **79** daqueles obtidos para o solvente, nas mesmas condições. Os espectros de IR e VCD foram registrados em uma célula BaF₂ com comprimento de caminho de $100\text{ }\mu\text{m}$ usando DMSO-d₆ como solvente. A amostra foi preparada dissolvendo $4,0\text{ mg}$ do composto **79** em $130\text{ }\mu\text{l}$ de solvente.

Os cálculos foram realizados para (1'S,2'R)-**78** e (2'S)-**79** que foram escolhidos arbitrariamente. Pesquisas conformacionais foram realizadas no nível da teoria da mecânica molecular usando o campo de força MMFF incorporado no pacote do software Spartan 08. Cinco confôrmeros de (1'S,2'R)-**78** e 100 confôrmeros de (2'S)-**79**, com uma energia relativa (rel E.) dentro de 10 kcal mol^{-1} do confôrmero de menor energia, foram selecionados e a geometria foi otimizada pelo B3LYP nível /PCM(MeOH)/6-31G(d). Os dois confôrmeros de (1'S,2'R)-**78** com rel E. $< 2,2\text{ kcal mol}^{-1}$, e os quatro confôrmeros de (2'S)-**79** com rel E. $< 1,7\text{ kcal mol}^{-1}$ foram selecionados para cálculos espectrais de UV e ECD. A análise vibracional não resultou em frequências imaginárias para todos os confôrmeros, confirmando-os como reais mínimos. O TDDFT foi usado para calcular a energia de excitação (em nm) e a força rotatória na forma de velocidade de dipolo (unidades R_{vel} em cgs: $10^{-40}\text{ esu}^2\text{ cm}^2$), no nível CAM-B3LYP/PCM(MeOH)/TZVP. As forças rotatórias calculadas a partir das primeiras 30 transições eletrônicas singleto→singelo foram simuladas em uma curva ECD usando bandas Gaussianas com uma largura de banda de $\sigma 0,25\text{ eV}$. As transições de comprimento de onda previstas foram multiplicadas com um fator de escala de 1,1, determinada pela melhor concordância entre os espectros de UV experimentais e calculados. O fator de Boltzmann para cada confôrmero foi calculado com base nas energias livres de Gibbs. O espectro ECD de (1'R,2'S)-**78** foi obtido multiplicando o espectro calculado para (1'S,2'R)-**78** por -1 . Os mesmos quatro confôrmeros identificados no nível B3LYP/PCM(MeOH)/6-31G(d) foram re-otimizados e seus dados IR/VCD foram calculados no nível B3PW91/PCM(DMSO)/6-31G(d,p). Após comparações iniciais de dados experimentais e calculados, cálculos adicionais foram realizados com moléculas de DMSO explícitas ligadas a diferentes grupos hidroxila. O melhor experimento e simulação foi encontrado quando a ligação de hidrogênio entre uma única molécula de DMSO e o grupo hidroxila em C-6 acontece. Os espectros de IR e VCD foram criados usando as forças dipolo e rotacionais, que foram calculadas no mesmo nível que o usado durante a etapa de otimização da geometria e convertidos em absortividades molares ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Cada

espectro foi plotado como uma soma de bandas Lorentzianas com meia-larguras em uma mei-largura máxima de 6 cm⁻¹. Os números de onda calculados foram multiplicados por um fator de escala de 0,97. Os espectros finais foram gerados usando uma média simples dos confôrmeros de menor energia identificados para o composto **79** e plotados usando o software Origin 8 (GUBIANI, et al., 2022).

1.3.2. Linhagens Microbianas

1.3.2.1. Linhagens microbianas endofíticas

As linhagens dos fungos endofíticos das plantas *Anthurium alcatrazense*, *A. loefgrenii* e *Begonia venosa* (**Tabela 1**) foram fornecidas pelo grupo de pesquisa da Prof. Dr. Simone P. de Lira da ESALQ-USP.

Tabela 1 - Linhagens fúngicas endofíticas isoladas de *A. alcatrazense*, *A. loefgrenii* e *B. venosa* selecionadas para o estudo de triagem e desreplicação.

<i>A. alcatrazense</i>	<i>A. loefgrenii</i>	<i>B. venosa</i>
P7AM2F1 (L2)	P2MF1F2 (L1)	P8AM2F1 (L14)
P7MSF2F2 (Aa1)	P2MF2F3 (L11)	P8AH3F1 (L15)
P7M3F2 (L10)		P8AM1F2 (L16)
P7BDA3F2 (L12)		P8AM1F3 (L17)
P7MF1F2 (L13)		P8AH3F2 (L18)
		P8M1F2 (L19)
		P8AH3F3 (L20)
		P8AM1F1 (L21)
		P8BDA2F2 (L22)
		P8AH1F1 (L23)
		P8MAC1F1 (L24)
		P8BDA3F3 (L25)

Linhagens endofíticas foram reativadas em placas de Petri contendo meio PDB na concentração de 24 g.L⁻¹ e ágar bacteriológico na concentração de 20 g L⁻¹, durante 7 dias. As linhagens foram inoculadas em meio líquido em frascos Shott de 500 mL,

contendo 200 mL de cada um dos meios líquidos: PDB (“*potato dextrose broth*”), SBD+YE (“*sabouraud dextrose broth*” adicionado de 1% de “*yeast extract*”) e M2% (malte 2%). Em seguida foram incubadas por 14 dias em modo estático e, à temperatura de 25 °C.

1.3.2.2. Linhagens microbianas isoladas de solo

As linhagens microbianas foram isoladas do solo da Gruta do Catão localizada no interior da Unidade de Conservação do Parque Municipal da Lagoa Azul, situado próximo ao município de São Desidério e Lagoa Azul, no oeste do estado da Bahia. Estas linhagens foram fornecidas pela Profa. Dra. Mirna H. R. Selegim da UFSCar - São Carlos.

As linhagens CBMAI 1894 (**SDC 12**), CBMAI 1895 (**SDC 27**) E CBMAI 1926 (**SDC 28**), foram selecionadas taxonomicamente de maneira a se priorizar o estudo de microrganismos pertencentes a táxons incomuns. Observando-se o crescimento de cada linhagem, estas foram classificadas como sendo de crescimento rápido (até 7 dias), moderado (até 14 dias) e lento (até 21 dias).

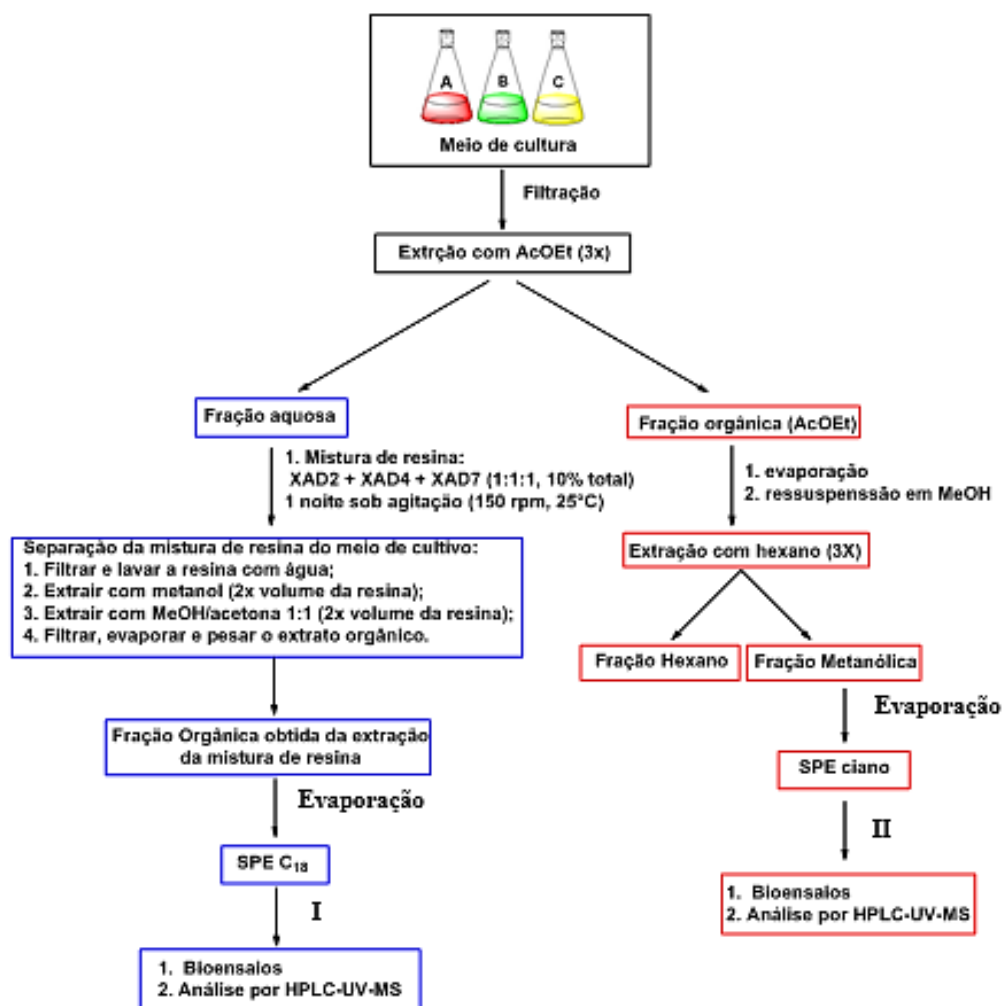
Linhagens fúngicas foram reativadas em placas de Petri contendo meio PDB na concentração de 24 g L⁻¹ e ágar bacteriológico na concentração de 20 g L⁻¹, durante 7 dias. As linhagens foram inoculadas em meio líquido em frascos Shott de 500 mL, contendo 200 mL de cada um dos meios líquidos: PDB (“*potato dextrose broth*”), SBD+YE (“*sabouraud dextrose broth*” adicionado de 1% de “*yeast extract*”) e M2% (malte 2%). Em seguida foram incubadas por 14 dias em modo estático e, à temperatura de 25 °C.

1.3.3. Screening químico e biológico de extratos de linhagens fúngicas filamentosas

Cada uma das linhagens fúngicas foi crescida em três meios de cultivo (**Figura 17**). Após o crescimento, o meio de cultura foi filtrado e submetido a uma partição com AcOEt. A fração AcOEt foi evaporada até a secura e ressuspensa em MeOH/hexano 1:1 (v/v). Esta partição foi realizada 3 vezes. A fração polar (MeOH) desta partição foi submetida a uma cromatografia em coluna pré-empacotada (SPE) em colunas de sílica-gel derivatizada com grupos cianopropila (CN, Waters[®]), utilizando-se o seguinte

gradiente de eluição (1) Hexano/CH₂Cl₂ 50:50%, (2) 100% CH₂Cl₂, (3) 50:50% CH₂Cl₂/AcOEt, (4) 100% AcOEt, (5) 50:50% AcOEt/MeOH e (6) 100% MeOH.

Figura 17 - Metodologia utilizada para extração, fracionamento inicial e análise dos extratos de fungos (Eluição: **I** - (1) 100% H₂O (2) 75:25% H₂O/MeOH, (3) 50:50% H₂O/MeOH, (4) 25:75%, H₂O/MeOH e (5) 100% MeOH; **II** - (1) Hexano/CH₂Cl₂ 50:50%, (2) 100% CH₂Cl₂, (3) 50:50% CH₂Cl₂/AcOEt, (4) 100% AcOEt, (5) 50:50% AcOEt/MeOH e (6) 100% MeOH).



FONTE: Autoria própria.

A fração aquosa resultante da partição dos meios de cultura com AcOEt foi extraída com uma mistura de resinas poliméricas XAD-2, XAD-4 e XAD-7 (1:1:1), sob agitação a 25 °C por uma noite. A mistura de resinas foi filtrada em funil de Büchner e lavada com H₂O. Em seguida, o material orgânico adsorvido nas resinas foi dessorbido com MeOH e com uma mistura 1:1 de MeOH/acetona. As frações orgânicas foram

reunidas e evaporadas até a secura. O extrato obtido foi fracionado por SPE em coluna pré-empacotada de sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano (C₁₈, Phenomenex[®]), utilizando-se um gradiente de eluição: (1) 100% H₂O (2) 75:25% H₂O/MeOH, (3) 50:50% H₂O/MeOH, (4) 25:75%, H₂O/MeOH e (5) 100% MeOH.

As frações obtidas dessa separação foram submetidas a análises por HPLC-ELSD-UV-MS. Em paralelo, cerca de 1 a 2 mg de cada uma das frações foram enviados para bioensaios de atividade biológica, incluindo ensaio anti-*Trypanosoma cruzi*, antibacteriano, citotoxicidade, inibição dos ligantes de penicilina e inibição do proteassomo.

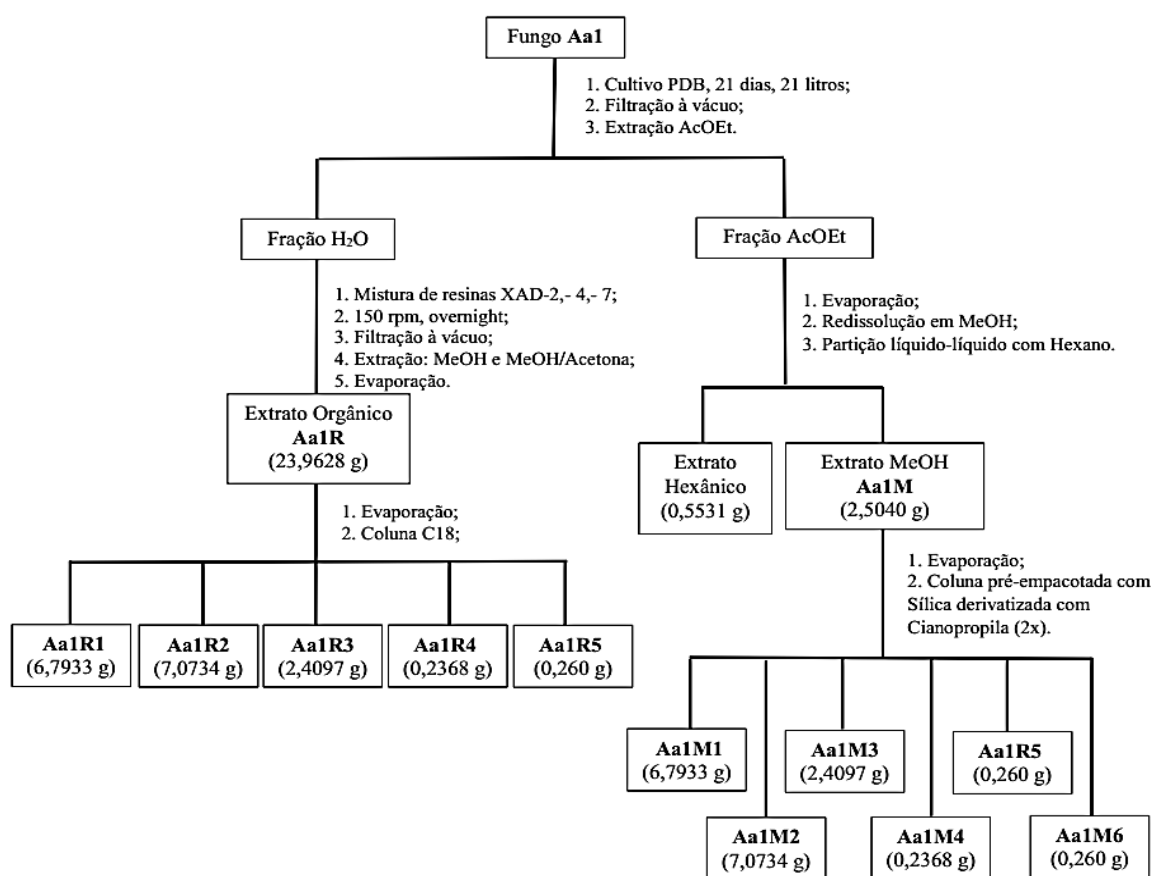
1.3.3.1. Seleção do meio de crescimento, cultivo em escala preparativa e isolamento dos metabólitos secundários de L9/Aa1

A linhagem endofítica **L9/Aa1** foi selecionada para crescimento em escala ampliada, em 21 litros de meio PDB (105 Shotts de 500 mL, contendo 200 mL de meio PDB por Shott). O crescimento foi monitorado pelo decréscimo da concentração de glicose do meio de cultivo utilizando-se tiras de medição visual de glicose (Uriscan[®]), durante 21 dias. Ao final deste período foram adicionados 100 mL de AcOEt em cada frasco Shott, deixando-se 24 horas em repouso. O micélio foi descartado por filtração em celite e papel de filtro. A mistura AcOEt + meio líquido filtrado foi particionada conforme a metodologia descrita no item **1.3.3 (Figura 17)**. A fração metanólica provinda da fração AcOEt foi evaporada e denominada de **Aa1M** (2,5040 g). Esta fração foi submetida a uma separação cromatográfica em coluna pré-empacotada de sílica-gel derivatizada com grupos cianopropila (CN 1 g, 2x; Waters[®]), utilizando-se como eluente: (**Aa1M1**) 50:50% Hexano/CH₂Cl₂, (**Aa1M2**) 100% CH₂Cl₂, (**Aa1M3**) 50: 50% CH₂Cl₂/AcOEt, (**Aa1M4**) 100% AcOEt, (**Aa1M5**) 50:50% AcOEt/MeOH e (**Aa1M6**) 100% MeOH. As frações **Aa1M1 – Aa1M6**, foram analisadas por HPLC-UV-ELSD-MS, enviadas para ensaios biológicos e armazenadas em refrigerador.

O extrato orgânico obtido a partir da dessorção das resinas, denominado **Aa1R** (23,9628 g) foi submetido a uma separação em coluna cromatográfica ($\Phi = 7$ cm x h= 13 cm), utilizando-se como fase estacionária sílica gel derivatizada com C₁₈, e eluição com um gradiente de MeOH em H₂O, obtendo-se 5 frações, **Aa1R1 – Aa1R5**. Essas frações foram analisadas por HPLC-UV-ELSD-MS e enviadas para ensaios biológicos. A **Figura**

18 apresenta as etapas de purificação para as frações obtidas do meio de cultivo da linhagem **Aa1**.

Figura 18 - Etapas de preparação, extração e purificação dos extratos obtidos do fungo endofítico **Aa1** (Eluição fase normal: **Aa1M1** Hexano/CH₂Cl₂ 1:1 (v/v); **Aa1M2** CH₂Cl₂ 100%; **Aa1M3** CH₂Cl₂/AcOEt 1:1 (v/v); **Aa1M4** AcOEt 100%; **Aa1M5** AcOEt/MeOH 1:1 (v/v) e **Aa1M6** MeOH 100%. Eluição fase reversa: **Aa1R1** H₂O 100%; **Aa1R2** H₂O/MeOH 75:25 (v/v); **Aa1R3** 50:50 (v/v); **Aa1R4** H₂O/MeOH 25:75 (v/v); **Aa1R5** 100% MeOH).

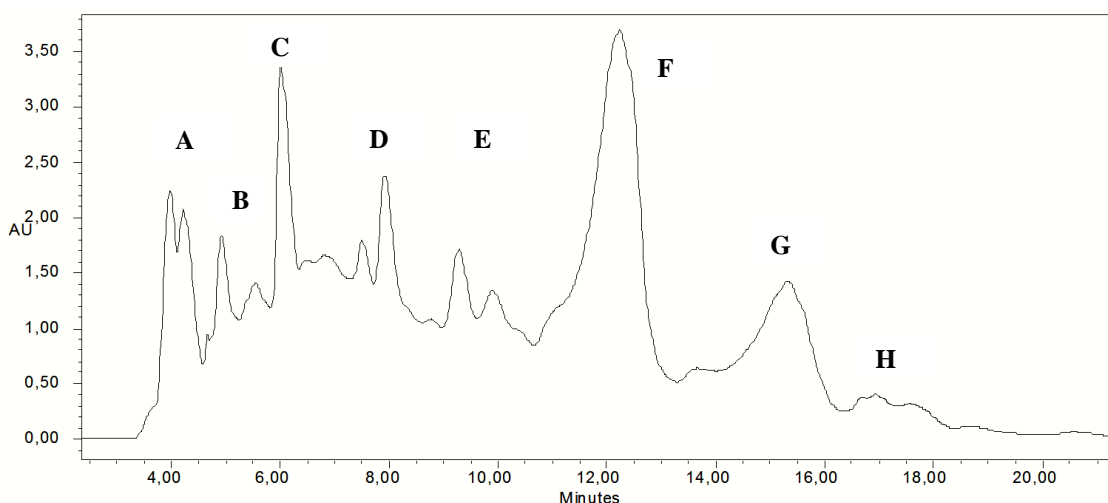


FONTE: Autoria própria.

Uma alíquota da fração **Aa1R2** (420 mg) foi submetida a uma separação cromatográfica em coluna contendo Biogel P2 ($\Phi = 2 \text{ cm} \times h = 86 \text{ cm}$), utilizando-se como fase móvel um sistema isocrático de H₂O:MeOH 8:2. Foram coletadas 102 frações de 4 mL. Após análise do perfil cromatográfico por CCD (CH₂Cl₂:MeOH 3:7, mais 2 gotas de ácido acético), as frações coletadas foram reagrupadas em 7 frações (**Aa1R2A** – **Aa1R2G**). Este processo foi repetido por 15 vezes até o fracionamento total do material.

A fração codificada como **Aa1R2E** (376,30 mg) foi submetida posteriormente a uma separação cromatográfica em coluna pré-empacotada de sílica gel derivatizada com grupos fenila (Waters, 5 g), utilizando-se como eluente um gradiente de MeOH em H₂O. Após análise do perfil cromatográfico por CCD (CH₂Cl₂:MeOH 2:8, mais 2 gotas de ácido acético), 15 frações foram obtidas (**Aa1R2E1-E15**). As frações **Aa1R2-E7** a **Aa1R2-E11** foram reunidas mais uma vez por semelhança em seu perfil cromatográfico. A nova fração denominada **Aa1R2E7-11** (77,60 mg) foi submetida a uma separação em HPLC-UV utilizando-se uma coluna semi-preparativa de sílica derivatizada com grupos C₁₈ (InertSustain®, 10 x 250 mm, 5 µm), em modo isocrático H₂O/MeOH/MeCN 60:35:5, com fluxo de 3 mL min⁻¹, e detecção por UV em λ_{máx} de 254 e 320 nm. Nove frações foram coletadas dessa separação (**Figura 19**).

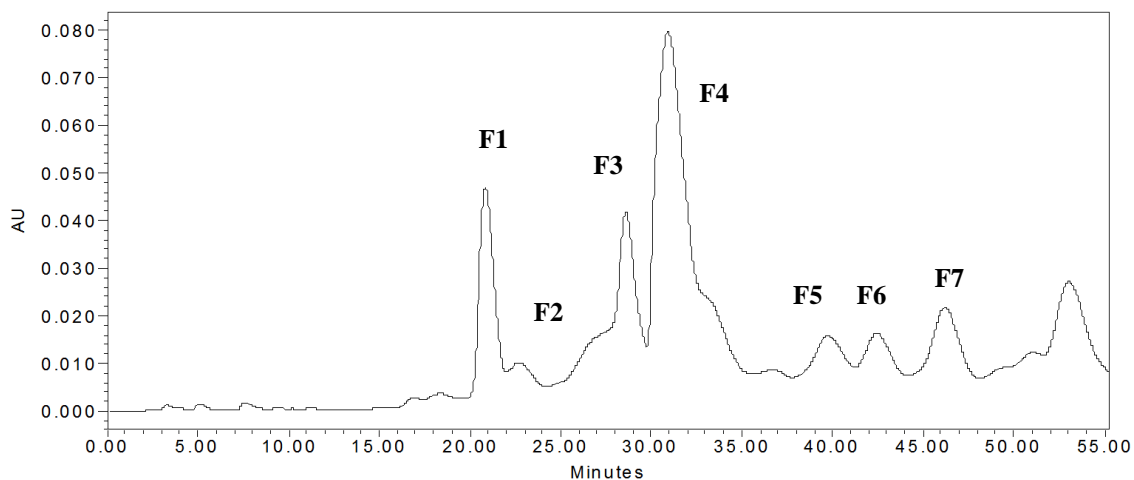
Figura 19 - Cromatograma de separação cromatográfica da fração Aa1R2E7-11 monitorada no comprimento de onda λ_{máx} de 254; Coluna semi-preparativa C₁₈, com fluxo de 3 mL min⁻¹ de H₂O/MeOH/MeCN 60:35:5 (v/v/v).



FONTE: Autoria própria.

As frações coletadas foram analisadas por HPLC-UV-MS-ELSD. A fração **Aa1R2E7-11F** (12,60 mg) foi selecionada para purificação por HPLC-UV utilizando-se uma coluna analítica de sílica derivatizada com grupos C₁₈ (InertSil ODS-4, 4,6 x 250 mm; 5µm), em modo isocrático H₂O/MeOH 80:20 com 1% de ácido fórmico, fluxo de 1 mL min⁻¹. A detecção foi realizada por UV em λ_{máx} de 240 e 275 nm. Sete frações foram coletadas dessa separação (**Figura 20**). A fração codificada como **Aa1R2E7-11F1** (1,0 mg) apresentou grau de pureza satisfatório e foi enviada para análise de RMN mono e bidimensionais.

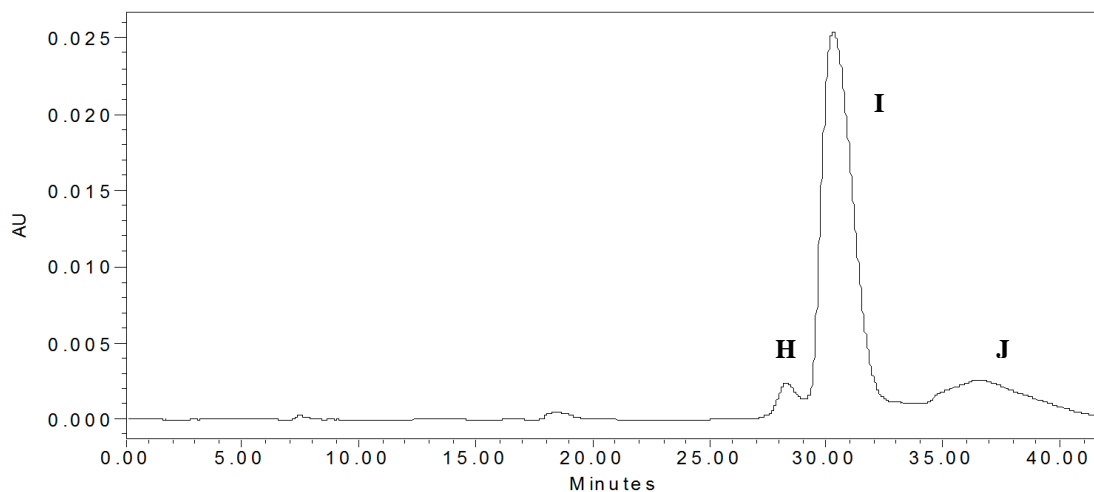
Figura 20 - Cromatograma de separação cromatográfica da fração Aa1R2E7-11F monitorada no comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}}$ de 275 nm; Coluna analítica C₁₈, com fluxo de 1 mL min⁻¹ de H₂O/MeOH 80:20 (v/v).



FONTE: Autoria própria.

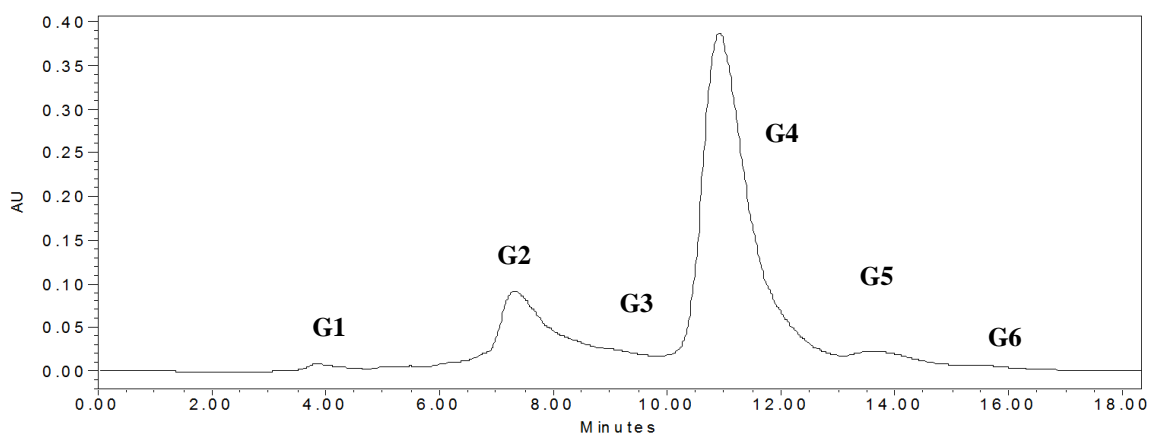
A fração **Aa1R2E7-11F4** (2,8 mg) foi purificada por HPLC-UV utilizando-se coluna analítica de sílica gel derivatizada com grupos C₁₈ (InertSil ODS-4, 4,6 x 250 mm; 5 μ m), em modo isocrático H₂O/MeOH 80:20 com 1% de ácido fórmico, com fluxo de 1 mL min⁻¹. A detecção foi realizada por UV em $\lambda_{\text{máx}}$ de 255 e 285 nm. Onze frações foram coletadas dessa separação (**Figura 21**). A fração codificada como **Aa1R2E7-11F4I** (2,4 mg) apresentou grau de pureza satisfatório e foi selecionada para identificação pela análise de seus dados espectroscópicos.

Figura 21 - Cromatograma de separação cromatográfica da fração **Aa1R2E7-11F4** monitorada no comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}}$ de 285 nm; Coluna analítica C₁₈, com fluxo de 1 mL min⁻¹ de H₂O/MeOH 80:20 (v/v) com 1% de ácido fórmico.



A fração **Aa1R2E7-11G** (10,60 mg) foi selecionada para mais uma etapa purificação por HPLC-UV. Esta fração foi purificada utilizando-se coluna analítica de sílica gel derivatizada com grupos C₁₈ (XTerra, 4,6 x 250 mm; 5µm), em modo isocrático H₂O/MeOH 70:30 adicionado 1% de ácido fórmico, e fluxo de 1 mL min⁻¹, e detecção por UV em λ_{máx} de 220 nm. Seis frações foram coletadas dessa separação (**Figura 22**). A fração codificada como **Aa1R2E7-11G4** (3,5 mg) apresentou grau de pureza satisfatório e foi enviada para análise de RMN mono e bidimensionais.

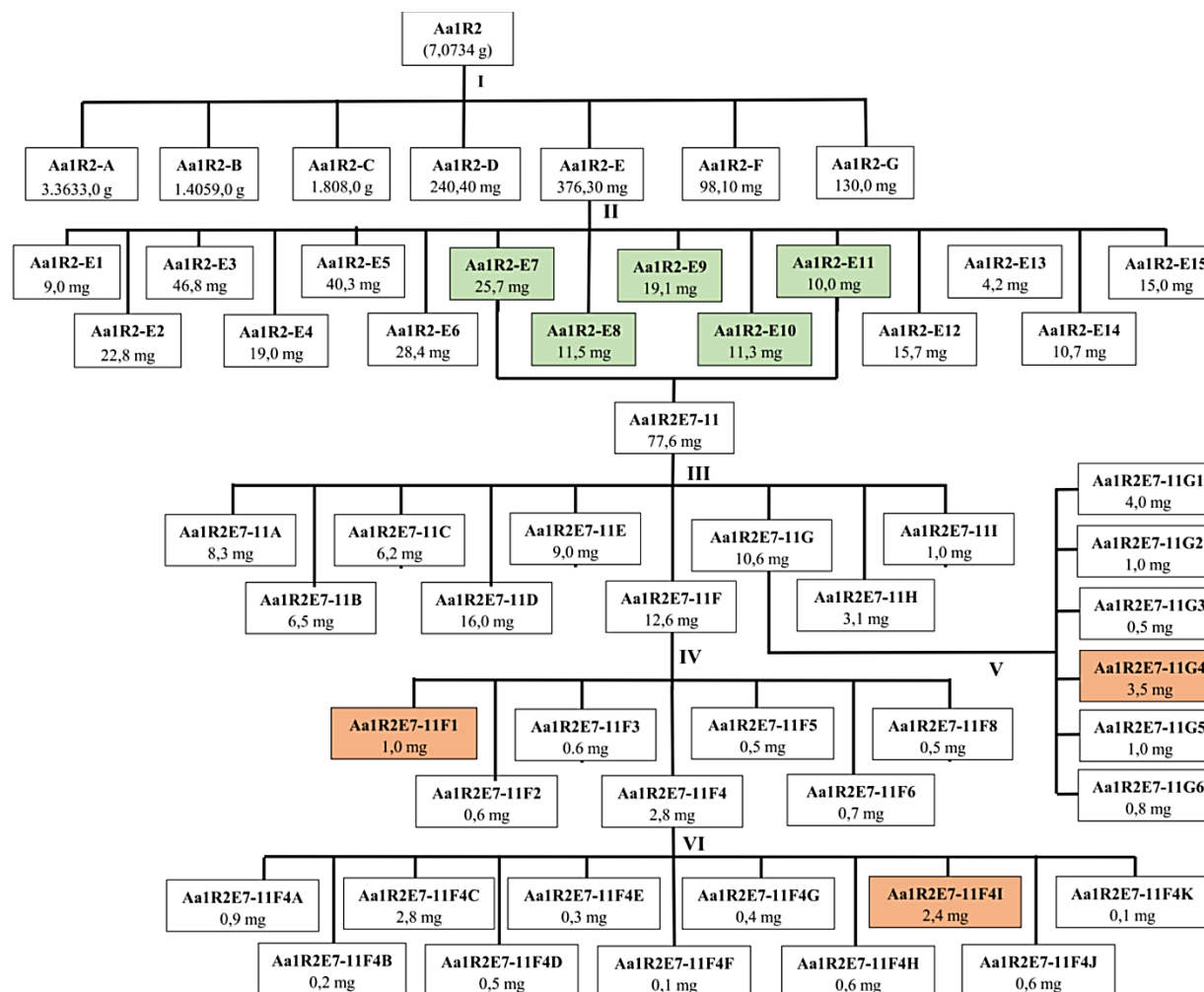
Figura 22 - Cromatograma de separação cromatográfica da fração Aa1R2E7-11G monitorada no comprimento de onda λ_{máx} de 220 nm; Coluna analítica Xterra C₁₈, com fluxo de 1 mL min⁻¹ de H₂O/MeOH 70:30 (v/v) com 1% de ácido fórmico.



FONTE: A autoria própria.

Um esquema contendo as etapas de fracionamento da fração **Aa1R2** é apresentado na **Figura 23**.

Figura 23 - Etapas de fracionamento e purificação dos metabólitos secundários presente na fração Aa1R2 obtidas do fungo endofítico Aa1. I: Coluna Bio Gel P2; H₂O:MeOH 20%; II: Coluna SiOH derivatizada com grupos fenila; gradiente de MeOH em H₂O; III: HPLC-UV, InertSustain C₁₈; H₂O/MeOH/MeCN 60:35:5; IV: HPLC-UV, InertSil ODS-4 C₁₈; H₂O/MeOH 80:20 +1% de ácido fórmico; V: HPLC-UV, XTerra C₁₈; H₂O/MeOH 70:30 +1% de ácido fórmico; VI: HPLC-UV, InertSil ODS-4, H₂O/MeOH 80:20 + 1% de ácido fórmico. (Caixas verdes: frações reunidas; caixas alaranjadas: compostos puros).



FONTE: Autoria própria.

1.3.3.2. Determinação da configuração absoluta dos derivados peptídeos produzidos pela linhagem endofítica L9/Aa1

Aproximadamente 0,2 mg dos derivados peptídicos foram submetidos a hidrólise com HCl 6 N (1 mL) a 100-110 °C durante cerca de 24 h. Após a hidrólise, o HCl residual foi removido ressuspensando-se em água e seguida de evaporação em sistema SpeedVac. Este procedimento foi repetido três vezes. Os hidrolisados, assim como os padrões de aminoácidos foram derivados com o reagente de *L*-Marfey (*N*- (2,4-dinitro-5-fluorofenil)-alaninamida, *L*-FDAA). Aproximadamente 0,1 mg do hidrolisado ou dos padrões foram misturados com 80 µL de acetona, 50 µL de H₂O, 20 µL de NaHCO₃ 1 N e 20 µL de solução de *L*-FDAA (10 mg mL⁻¹ em acetona). As misturas foram agitadas a 40 °C por 1h. Depois disso, as misturas foram removidas do aquecimento e o *quenched* reacional foi realizado adicionando-se 20 µL de 1 N HCl. As misturas de reacionais foram evaporadas e ressuspensas em MeCN para análise por UPLC-QToF-MS. As análises foram realizadas segundo a metodologia e parâmetros descritos no item 1.3. Cromatogramas do íon extraído (EIC) e os tempos de retenção foram comparados com cada padrão de aminoácido derivatizado com o reagente de Marfey para assinalamento da configuração absoluta dos resíduos de aminoácidos presentes nos peptídeos que foram hidrolisados.

1.3.4. Seleção do meio de crescimento, cultivo em escala preparativa e isolamento dos metabólitos secundários da linhagem isolada de solo de caverna SDC28

A linhagem fúngica filamentosa **SCD28** foi isolada do solo da zona de penumbra da Gruta do Catão (São Desidério, Bahia) pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Mirna H. R. Selegim do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, UFSCar - São Carlos, e identificado como *Aspergillus* sp SDC28.

Foi realizado *screening* inicial de crescimento da linhagem *Aspergillus* sp. SDC28 em três meios de cultivo diferentes, PDB, M2% e SDB+YE. Os extratos AcOEt e extratos aquosos dessorbidos da mistura de resinas XAD-2,-4,-7 oriundos do meio de cultivo da linhagem **SDC28**, apresentaram potente inibição frente ao proteassomo, independente da constituição do meio de cultivo. Portanto, decidiu-se realizar o crescimento da linhagem em escala ampliada (29 L) em malte 2%.

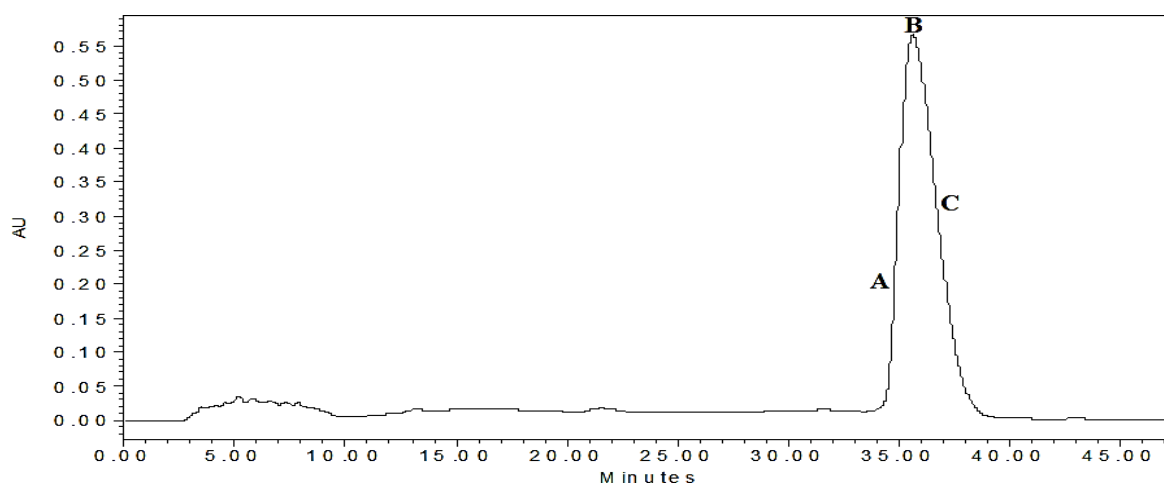
O extrato orgânico obtido do cultivo em meio líquido de M2% foi fracionado como descrito na **Figura 23**. Por apresentarem uma atividade de inibição do proteassomo, as frações **SDC28M3** a **SDC28M5**, foram reunidas e submetidas à separação por cromatografia de permeação em gel (Sephadex[®] LH-20) com eluição isocrática (MeOH). As frações coletadas estão sendo analisadas química e biologicamente para então, dar prosseguimento no isolamento dos compostos bioativos.

A fração de Acetato de etila (EtOAc) foi evaporada até a secagem total do solvente e solubilizada em H₂O/MeOH 5:95 (v/v), e submetida a partição com hexano três vezes. A fração solúvel de MeOH foi denominada **SDC28M** (10.448,6 g). A fração **SDC28M** foi submetida a cromatografia em coluna seca aberta com um gel de sílica gel derivatizada com grupos cianopropil (10 g) eluído com 1 L de hexano/CH₂Cl₂ 1:1, 100% CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/EtOAc 1:1, 100% EtOAc, EtOAc/MeOH 1:1 e 100% MeOH. As frações coletadas foram concentradas até a secura para gerar as frações denominadas **SDC28M1** (5.884,4 mg), **SDC28M2** (2.005,8 mg), **SDC28M3** (986,5 mg), **SDC28M4** (121,7 mg), **SDC28M5** (1.253,9 mg) e **SDC28M6** (135,8 mg).

As frações **SDC28M3**, **SDC28M4** e **SDC28M5** foram combinadas e separadas por cromatografia de exclusão de tamanho em uma coluna Sephadex LH-20[®] e eluídas com MeOH, resultando em 350 frações de 10 ml cada. As frações foram combinadas em 34 frações adicionais após análise por cromatografia em camada delgada com ácido fosfomolibdico, seguida de aquecimento a 50°C por 5 min. As substâncias fluorescentes foram visualizadas sob luz UV (λ_{\max} 254 e 366 nm).

A fração **SDC28M35-23** (18,7 mg) foi submetida a uma separação por HPLC usando uma coluna analítica Inertsil[®] ODS-4 (4,0 × 250 mm, 5 μ m) a uma taxa de fluxo de 1,0 ml min⁻¹ por 45 min, com H₂O/MeOH 1:1 (v/v) como eluente e detecção em λ_{\max} 254 e 280 nm (**Figura 24**). Foram obtidas três frações (**SDC28M35-23A** a **SDC28M35-23C**). A fração **SDC28M35-23B** foi identificada como versiconol (3,9 mg).

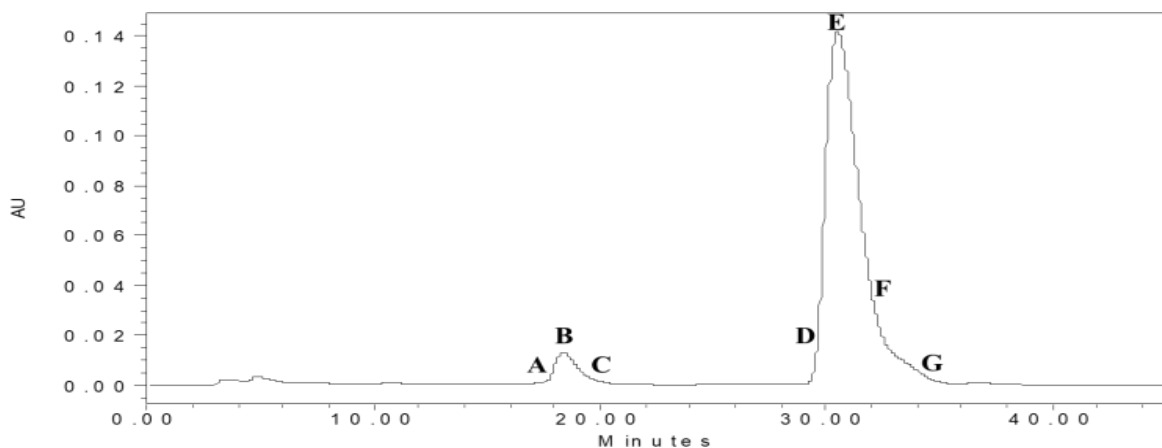
Figura 24 - Cromatograma de separação cromatográfica da fração **SDC28M35-23** monitorada no comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}}$ de 254 nm; Coluna analítica Inertsil[®] ODS-4, com fluxo de 1 mL min⁻¹ de H₂O/MeOH 1:1.



FONTE: Autoria própria.

A fração **SDC28M35-24** (36,3 mg) foi submetida a uma separação cromatográfica por HPLC utilizando uma coluna analítica Inertsil[®] ODS-4 (4,0 × 250 mm, 5 μm), com fluxo de 1,0 ml min⁻¹ por 35 min, com H₂O/MeOH 1:1 (v/v) + 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) como eluente e detecção em λ_{max} 254 e 280 nm (**Figura 25**). Oito frações foram obtidas (**SDC28M35-24A** a **SDC28M35-24H**). As frações **SDC28M35-24F** e **SDC28M35-24G** foram identificadas como versiconol (15,8 mg).

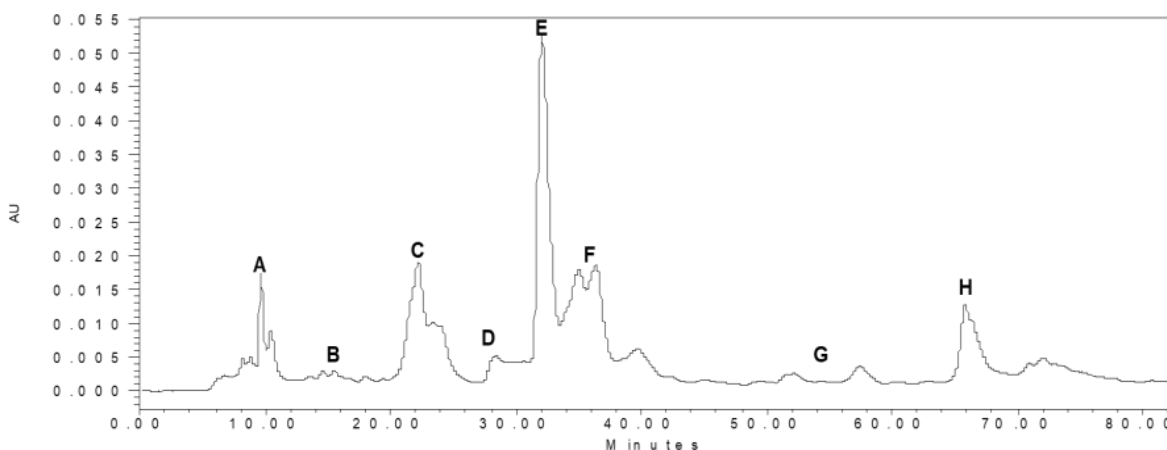
Figura 25 - Cromatograma de separação cromatográfica da fração **SDC28M35-24** monitorada no comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}}$ de 254 nm; Coluna analítica Inertsil[®] ODS-4, com fluxo de 1 mL min⁻¹ de H₂O/MeOH 1:1 + 0,1 TFA.



FONTE: Autoria própria.

As frações **SDC28M35-25** (18,8 mg), **SDC28M35-26** (7,5 mg) e **SDC28M35-27** (17,4 mg) foram combinadas (**SDC28M35-257**) e purificadas por HPLC utilizando uma coluna analítica InertSustain® C₁₈ (4,6 × 250 mm, 5 μm) com H₂O/MeOH 40:60 + 0,1% TFA como o eluente, a uma taxa de fluxo de 1,0 ml min⁻¹ por 80 min. A separação cromatográfica foi monitorada em λ_{max}254 e 280 nm. Oito frações foram obtidas (**SDC28M35-257A** a **SDC28M35-257H**).

Figura 26 - Cromatograma de separação cromatográfica da fração **SDC28M35-257** monitorada no comprimento de onda λ_{máx} de 254 nm; Coluna semi-preparativa C₁₈, com fluxo de 2,5 mL min⁻¹ de H₂O/MeOH 6:4.



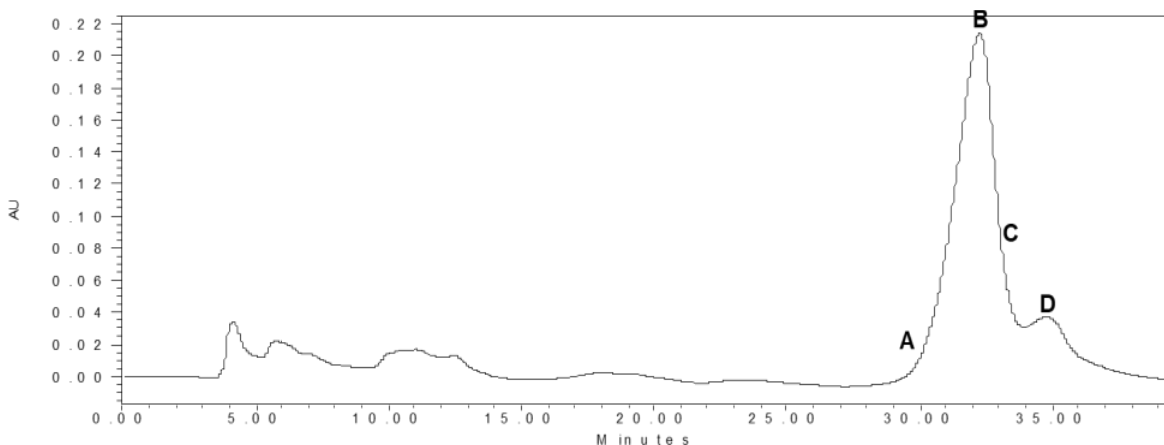
FONTE: Autoria própria.

As frações **SDC28M35-257E** (3,5 mg) e **SDC28M35-257F** (3,9 mg) foram combinadas (**SDC28M35-257EF**) e purificadas por HPLC utilizando uma coluna analítica Inertsil® ODS-4 (4,0 × 250 mm, 5 μm) com H₂O/ MeOH 30:70 + 0,1% TFA como eluente, com fluxo de 1,0 mL min⁻¹ por 30 min. A separação cromatográfica foi monitorada em λ_{max}254 e 280 nm. Foram obtidas cinco frações (**SDC28M35-257EF1** a **SDC28M35-257EF5**). A fração **SDC28M35-257EF2** foi identificada como versiconol (4,4 mg). As frações **SDC28M35-257EF4** (1,1 mg) e **SDC28M35-257EF5** (0,5 mg) foram identificadas como versicolorina C (1,6 mg).

As frações **SDC28M35-28** (6,3 mg) e **SDC28M35-29** (23,2 mg) foram combinados (**SDC28M35-289**) e submetidos a separação cromatográfica por HPLC utilizando uma coluna analítica InertSustain® C₁₈ (4,6 × 250 mm, 5 μm) com H₂O/MeOH 45:55 como eluente, com fluxo de 1,0 mL min⁻¹ por 40 min. A separação cromatográfica foi monitorada em λ_{max}220 e 254 nm. Quatro frações foram obtidas (**SDC28M35-289A**

a **SDC28M35-289D**). A fração **SDC28M35-289B** foi identificada como versicolorina C (1,6 mg).

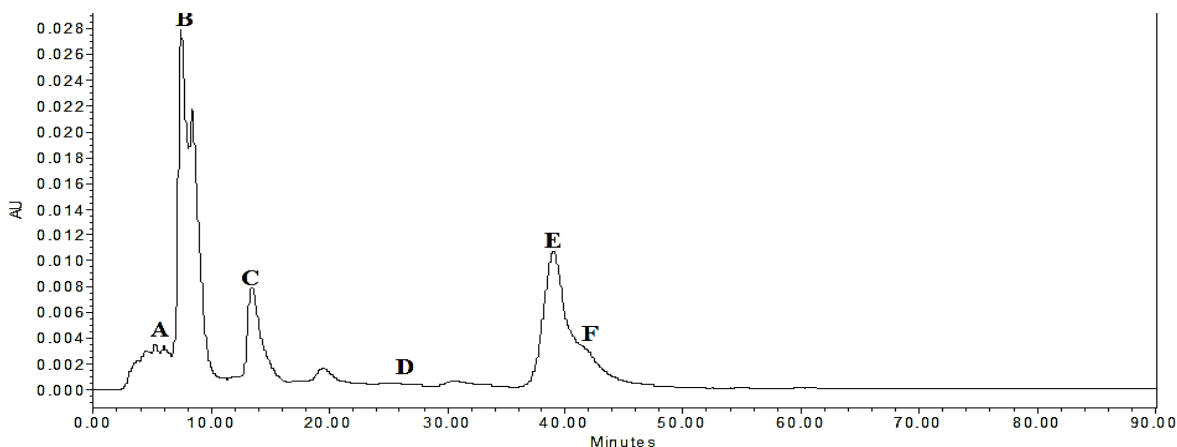
Figura 27 - Cromatograma de separação cromatográfica da fração **SDC28M35-289** monitorada no comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}}$ de 254 nm; Coluna analítica C₁₈, com fluxo de 1,0 mL min⁻¹ de H₂O:MeOH 45/55.



FONTE: Autoria própria.

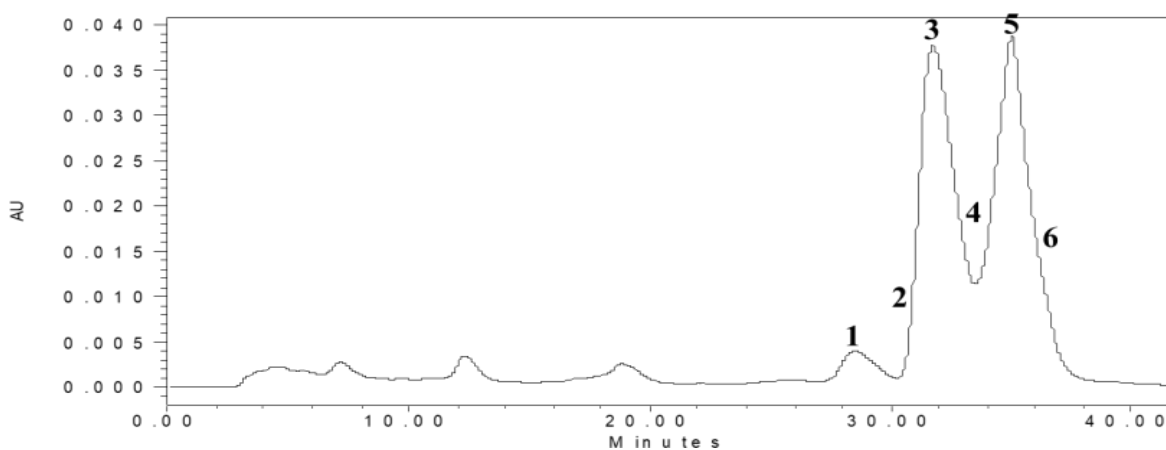
As frações **SDC28M35-30** (7,8 mg), **SDC28M35-31** (22,5 mg) e **SDC28M35-32** (5,8 mg) foram reunidas (**SDC28M35-302**) e submetidas a separação por HPLC usando uma coluna analítica InertSustain[®] C₁₈ (4,6 × 250 mm, 5 μm) com H₂O/MeOH 30:70 como eluente, a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹ por 45 min. A separação cromatográfica foi monitorada em $\lambda_{\text{máx}}$ = 254 e 280 nm. Sete frações foram obtidas (**SDC28M35-302A** a **SDC28M35-302G**).

Figura 28 - Cromatograma de separação cromatográfica da fração **SDC28M35-302** monitorada no comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}}$ de 254 nm; Coluna analítica C₁₈, com fluxo de 1,0 mL min⁻¹ de H₂O/MeOH 3:7.



A fração **SDC28M35-302B** (9,4 mg) foi novamente separada por HPLC utilizando uma coluna analítica Inertsil[®] ODS-4 (4,0 × 250 mm, 5 μm) com H₂O/MeOH 1:1 + 0,3% TFA como o eluente, com fluxo de 1,0 mL min⁻¹ por 40 min. A separação cromatográfica foi monitorada em λ_{max} 254 e 280 nm. Sete frações foram obtidas (**SDC28M35-302B1** a **SDC28M35-302B7**). As frações **SDC28M35-302B3** (1,8 mg) e **SDC28M35-302B4** (2,0 mg) foram identificadas como versiconol (3,8 mg).

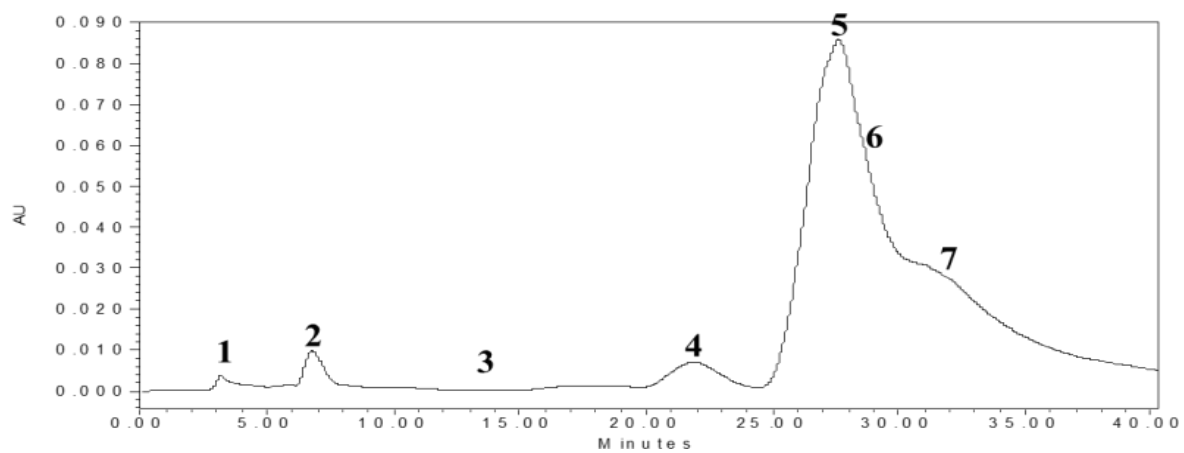
Figura 29 - Cromatograma de separação cromatográfica da fração **SDC28M35-302B** monitorada no comprimento de onda λ_{máx} de 254 nm; Coluna analítica C₁₈, com fluxo de 1,0 mL min⁻¹ de H₂O/MeOH 1:1.



FONTE: Autoria própria.

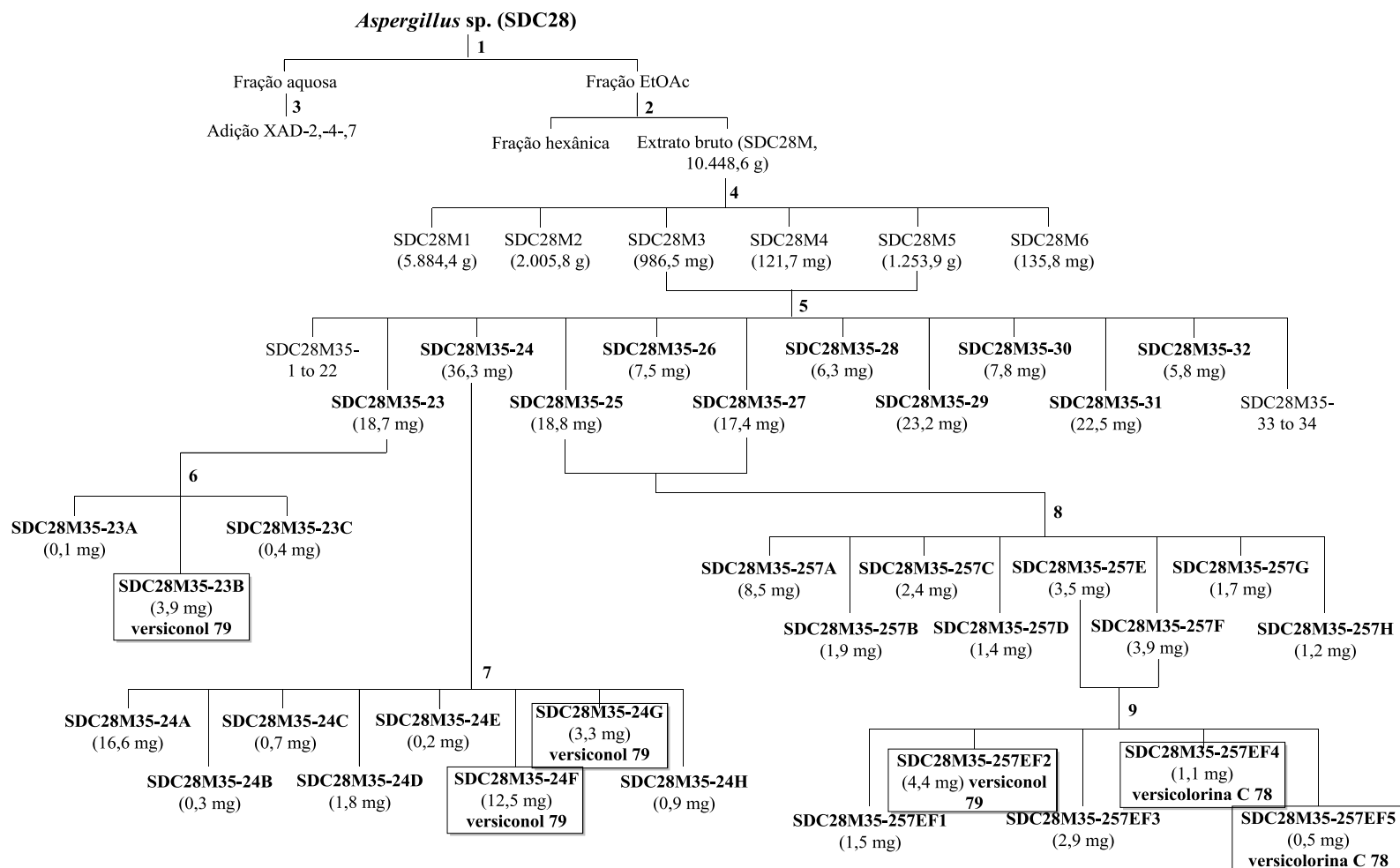
As frações **SDC28M35-302F** (3,7 mg) e **SDC28M35-302G** (0,6 mg) foram combinadas (**SDC28M35-302FG**) e purificadas por HPLC utilizando uma coluna analítica Inertsil[®] ODS-4 (4,0 × 250 mm, 5 μm) com H₂O/MeOH 30:70+ 0,3% TFA como eluente, com fluxo de 1,0 mL min⁻¹ por 35 min. A separação cromatográfica foi monitorada em λ_{max} 254 e 280 nm. Sete frações foram obtidas (**SDC28M35-302FG1** a **SDC28M35-302FG7**). As frações **SDC28M35-302FG5** e **SDC28M35-302FG7** foram identificadas como versicolorina C (1,8 mg).

Figura 30 - Cromatograma de separação cromatográfica da fração **SDC28M35-302FG** monitorada no comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}}$ de 254 nm; Coluna analítica C₁₈, com fluxo de 1,0 mL min⁻¹ de H₂O/MeOH 30:70 + 0,3 TFA.



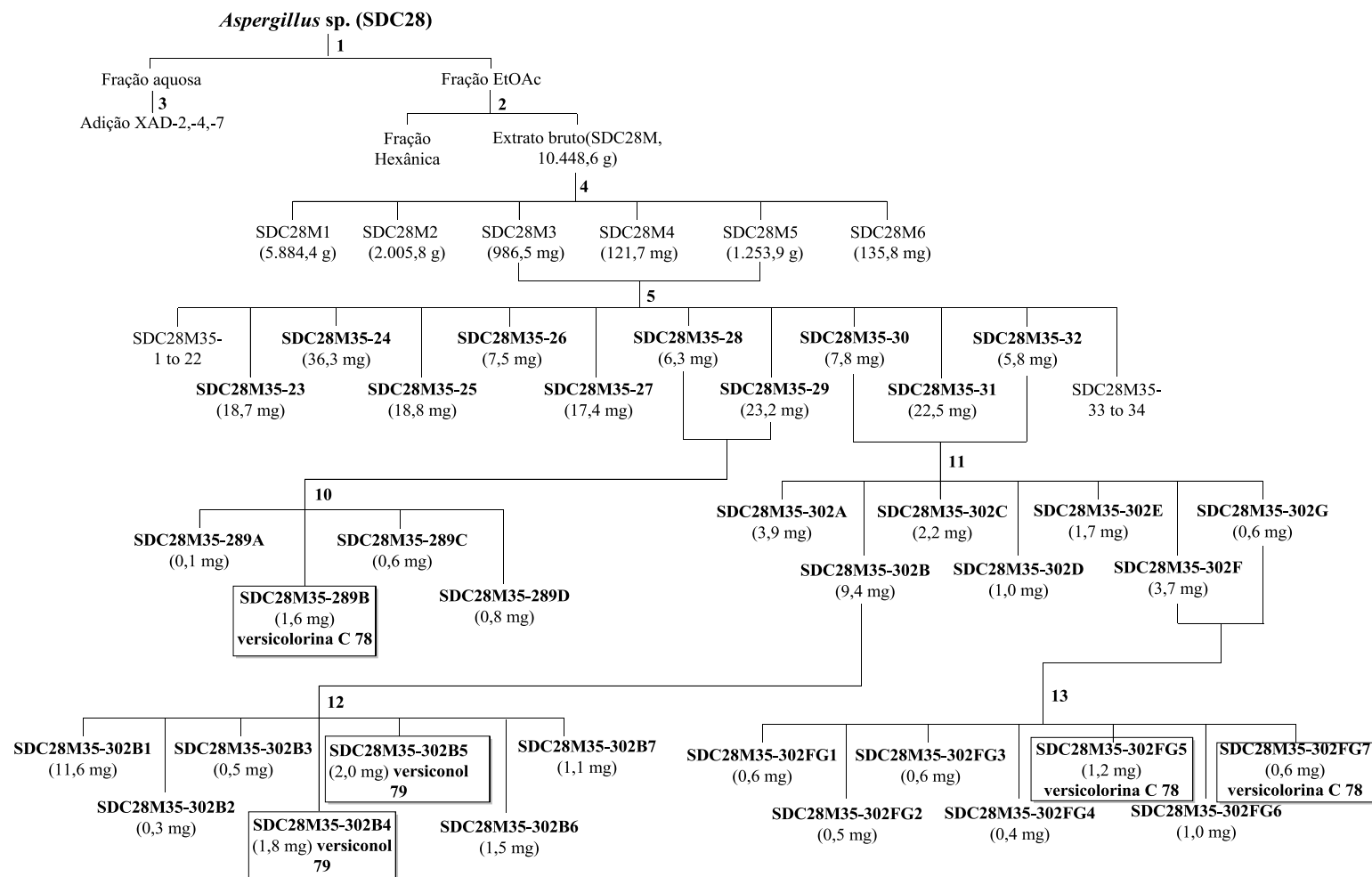
FONTE: Autoria própria.

Figura 31 - Fluxograma de isolamento dos compostos bioativos produzidos por *Aspergillus* sp. SDC28.



FONTE: Adaptado de GUBIANI et al. (2022).

Figura 32 - Fluxograma de isolamento dos compostos bioativos produzidos por *Aspergillus* sp. SDC28 (continuação).



FONTE: Adaptado de GUBIANI et al. (2022).

Resumo dos Esquemas de Isolamento descritos nas Figuras 31 e 32 para os compostos *Aspergillus sp.* SDC28

Etapa 1. *Aspergillus sp.* (SDC28) foi cultivado em frascos shot de 500 mL, cada um contendo 250 mL de meio malte 2%, durante 33 dias a 25 °C em modo estático. Após o crescimento, Acetato de etila (EtOAc) foi adicionado às culturas fúngicas e a mistura de meio de cultura e EtOAc foi submetida a filtração. A fração orgânica foi separada por partição líquido-líquido.

Etapa 2. A fração de EtOAc foi ressuspensa em 1 L de H₂O/MeOH 5:95 e desengordurada com hexano (3 x 500 mL). Após partição, cada fase foi evaporada até a secura. Obteve-se um extrato bruto com rendimento de 10,45 g do material solúvel em MeOH (SDC28M).

Etapa 3. À fração aquosa do meio de crescimento foi adicionado uma mistura das resinas poliméricas XAD-2, XAD-4 e XAD-7 e deixada sob agitação durante uma noite (160 rpm). Após filtração, a mistura de resina foi dessorvida com 100% MeOH e com MeOH/acetona 1:1.

Etapa 4. Separação cromatográfica em coluna de sílica gel derivatizada com grupos cianopropila. Eluente: hexano/CH₂Cl₂ 1:1, CH₂Cl₂ 100%, CH₂Cl₂ /EtOAc 1:1, EtOAc 100%, EtOAc/MeOH 1:1 e 100% MeOH.

Etapa 5. Separação cromatográfica em coluna de Sephadex LH-20®. Eluente: MeOH.

Etapa 6. Separação cromatográfica por HPLC. Coluna: fase reversa C₁₈ (Inertsil® ODS-4, 5 µm, 4,0 x 250 mm). Eluente: H₂O/MeOH 1:1. Tempo de execução: 45 min. Taxa de fluxo: 1,0 mL min⁻¹. Detecção: λ_{max} 254 e 280 nm.

Etapa 7. Separação cromatográfica por HPLC. Coluna: fase reversa C₁₈ (Inertsil® ODS-4, 5 µm, 4,0 x 250 mm). Eluente: H₂O/MeOH 1:1 + 0,1% TFA. Tempo de execução: 35 min. Taxa de fluxo: 1,0 mL/min. Detecção: λ_{max} 254 e 280 nm.

Etapa 8. Separação cromatográfica por HPLC. Coluna: fase reversa C₁₈ (InertSustain®, 5 µm, 4,6 x 250 mm). Eluente: H₂O/MeOH 40:60 + 0,1% TFA. Tempo de execução: 80 min. Taxa de fluxo: 1,0 mL min⁻¹. Detecção: λ_{max} 254 e 280 nm.

Etapa 9. Separação cromatográfica por HPLC. Coluna: fase reversa C₁₈ (Inertsil® ODS-4, 5 µm, 4,0 x 250 mm). Eluente: H₂O/MeOH 30:70 + 0,1% TFA. Tempo de execução: 30 min. Taxa de fluxo: 1,0 1,0 mL min⁻¹. Detecção: λ_{max} 254 e 280 nm.

Etapa 10. Separação por HPLC. Coluna: coluna de fase reversa C18 (InertSustain[®], 5 μm , 4,6 x 250 mm). Eluente: 45:55 H₂O/MeOH. Tempo de execução: 40 min. Taxa de fluxo: 1,0 mL min⁻¹. Detecção: λ_{max} 220 e 254 nm.

Etapa 11. Separação cromatográfica por HPLC. Coluna: fase reversa C₁₈ (InertSustain[®], 5 μm , 4,6 x 250 mm). Eluente: H₂O/MeOH 30:70. Tempo de execução: 45 min. Taxa de fluxo: 1,0 mL min⁻¹. Detecção: λ_{max} 254 e 280 nm.

Etapa 12. Separação cromatográfica por HPLC. Coluna: fase reversa C₁₈ (Inertsil[®] ODS-4, 5 μm , 4,0 x 250 mm). Eluente: H₂O/MeOH 1:1 + 0,3% TFA. Tempo de execução: 40 min. Taxa de fluxo: 1,0 mL min⁻¹. Detecção: λ_{max} 254 e 280 nm.

Etapa 13. Separação cromatográfica por HPLC. Coluna: fase reversa C₁₈ (Inertsil[®] ODS-4, 5 μm , 4,0 x 250 mm). Eluente: H₂O/MeOH 30:70 + 0,3% TFA. Tempo de execução: 35 min. Taxa de fluxo: 1,0 mL min⁻¹. Detecção: λ_{max} 254 e 280 nm.

1.3.5. Ensaios Biológicos – metodologias utilizadas

A fim de se averiguar se os extratos obtidos no *screening* possuíam algum interesse do ponto de vista biológico, diversos bioensaios foram realizados, com diversos colaboradores externos ao IQSC. Nos itens a seguir as metodologias utilizadas para cada bioensaio foram descritas.

1.3.5.1. Ensaios anti-*Trypanosoma cruzi* in vitro

Os epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram cultivados em meio de infusão de triptose de fígado suplementado com 20 mg/L de hemina e 10% de soro fetal de vitelo a 28°C²¹. Os parasitas transfectados são cultivados no mesmo meio contendo 200 µg/L de G418. Após 5 dias de proliferação, as células são recolhidas por centrifugação (1000 x g a 4°C, 5 min), lavadas e resuspendidas em solução salina tamponada com fosfato (PBS pH 7,3). As células são contadas usando uma câmara Neubauer. A atividade antiparasitária é avaliada contra tripanosomatídeos, utilizando um teste de viabilidade de MTT após 24 h de incubação. Os valores de concentração máxima efetiva (EC₅₀) para as populações de *T. cruzi* são calculados a partir da regressão sigmoideal das curvas concentração-resposta usando Scientific Graphing and Analysis Software Origin 5.0. Os experimentos são realizados em triplicata e repetido duas ou três vezes. Os experimentos citotóxicos são realizados utilizando macrófagos de medula óssea a partir de camundongos BALB/c. As células diferenciadas são cultivadas em placas de 96 poços a 37°C para posterior incubação com concentrações crescentes das amostras ativas durante 24 h. O método MTT também é realizado e os valores de CC₅₀ são calculados em conformidade. Os experimentos com camundongos BALB/c são aprovados pelo Comitê Ético de Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP (4535-1/2017).

1.3.5.2. Determinação da avaliação da atividade antibacteriana

Para os ensaios da atividade antibacteriana foram utilizadas bactérias de coleção (cepas padrão) da *American Type Culture Collection* (ATCC/USA) e da *National Collection of Type Cultures* (NCTC/UK), bem como isolados clínicos (IC) de pacientes

com infecções causadas por bactérias multirresistentes, gentilmente cedidas pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

A atividade antibacteriana foi avaliada pela técnica de microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC). Para a obtenção do inóculo as cepas armazenadas em freezer a -80°C foram repicadas em meio de cultura Agar Sangue. Após isto, as bactérias foram incubadas em temperatura de 37°C em estufa bacteriológica durante 24 horas. O solvente utilizado para diluição das frações foi o dimetilsulfóxido (DMSO) por ser pouco volátil e não permitir a precipitação da amostra.

Para determinação da MIC foi utilizada a técnica de microdiluição em microplaca. A técnica da MIC foi realizada de acordo com a metodologia preconizada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012) com adaptações empregando-se resazurina como revelador do crescimento bacteriano. As amostras foram consideradas ativas, quando a MIC foi igual ou inferior a $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$.

1.3.5.3. Atividade leishsmanicida

Culturas de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *L. (L.) infantum* foram mantidas em garrafas de cultura estéreis $25\ \text{cm}^2$ a 26°C em meio 199 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nutricell) até a 5ª passagem semanal. Às culturas de *L. (L.) infantum* foi adicionado 2% de urina humana masculina filtrada e mais 10% de soro fetal bovino. Os extratos foram pesados e estocados em tubos tipo *ependorf* a 4°C . As amostras foram solubilizadas com DMSO (Sigma-Aldrich), calculando-se o volume e a massa de cada uma delas para serem obtidos estoques a $10\ \text{mg/mL}$. Cada amostra foi agitada vigorosamente por 1 minuto em vórtex e elas foram armazenadas a 4°C para uso em até 48 horas.

A sensibilidade de promastigotas frente as diferentes amostras foram avaliadas utilizando-se o método do MTT. A primeira fase dos testes constitui na avaliação da atividade dos compostos a partir de duas concentrações: 50 e $100\ \mu\text{g/mL}$, por 24 horas. Após este período, caso a viabilidade celular calculada com relação ao controle não tratado seja igual ou inferior a 20%, são realizados ensaios com as seguintes concentrações do composto de interesse: 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e $100\ \mu\text{g/mL}$ por 24 horas. Foi acrescentado um grupo incubado apenas com 1% DMSO como controle de diluente. Resumidamente, os ensaios para avaliação de sensibilidade *in vitro* são realizados com promastigotas de fase logarítmica ($2,5$ a 5×10^6 por orifício em placas de

96 orifícios) incubados com concentrações crescentes das frações por 24h. A seguir, adiciona-se 30 µL de 5 mg/mL de MTT (Sigma-Aldrich) preparado em PBS 1X estéril para incubação por 2 horas a 26°C. Logo após, 30 µL de SDS 20% é adicionado e o produto liberado tem sua absorbância medida através de um espectrofotômetro (MultiSkan Synergy). As curvas dose-resposta para obtenção das concentrações efetivas para inibição de 50 e 90% de crescimento das culturas, assim como as concentrações letais (100%), serão determinadas utilizando-se o *software* Origin (OriginLab Corp.). Cada ensaio foi realizado em triplicatas e repetido pelo menos três vezes.

1.3.5.4. Citotoxicidade (utilizado na fase de *screening*)

A citotoxicidade foi determinada por meio da utilização do Cell Proliferation Kit (Roche Applied Science), baseado na clivagem do sal amarelo tetrazolium XTT pelas células metabolicamente ativas formando um corante formazana alaranjada. Foram semeadas 10^4 células por poço em placas de 96 poços e mantidas em estufa de CO₂ a 37° C por 24 h. Após esse período o protocolo de tratamento consistiu em expor as células às diferentes concentrações da substância teste (0,1; 1; 10 e 100 µM) por 24 h. O controle negativo não recebeu tratamento e o controle positivo foi tratado com DMSO 10% (v/v). Após esse tempo de exposição foi realizada a lavagem das células com tampão salino fosfato (PBS) 1X e incubação das mesmas em meio DMEM sem fenol vermelho acrescido da solução XTT/elétron por 4 h. Após esse tempo, foi realizada a leitura colorimétrica em espectrofotômetro (492-690 nm), sendo então determinada a proporção de células viáveis em razão das medidas de absorbância. O IC₅₀ foi calculado por meio de regressão não-linear usando o software GraphPad Prism 3.0.

1.3.5.5. Inibição dos ligantes de penicilina

Extratos e sub-frações foram incubados por 1h com a proteína recombinante purificada e depois é adicionado o marcador fluorescente (Bocilina) e então a polarização de fluorescência é medida para saber se houve ligação. Fragmentos correspondentes as PBPs 2b cepas 5205 e R6, PBP2x e PBP1b de *Streptococcus pneumoniae* já encontravam-se clonados em vetor pGEX-4T-1 o qual confere um sinal de GST que é utilizado para o processo de purificação além de um sítio de clivagem com TEV. Eles foram utilizados para transformar bactérias competentes BL21 (DE3). As proteínas recombinantes foram

expressas na presença de 1 mM de IPTG durante um período *overnight* à 16 °C. Uma vez induzidas, as células foram submetidas a centrifugação a 6000 rpm por 10 min a 4 °C e os precipitados foram ressuspensos em tampão de lise 50 mM Tris e 200 mM NaCl em pH 7,5.

A ruptura das células, bem como do DNA das amostras foi realizado mecanicamente no gelo utilizando-se sonicação (2 segundos com intervalos de 10 segundos por 2 minutos), e os extratos foram centrifugados a 13000 rpm durante 40 min a 4°C para a obtenção do sobrenadante.

Para a purificação da proteína, o sobrenadante contendo a proteína de interesse foi fracionado em coluna GStap (GE Healthcare) de 5ml previamente equilibrada com tampão A: 50 mM Tris e 200 mM NaCl em pH 8,0 e a proteína foi eluída após tratamento com trombina por 2h a temperatura ambiente em tampão: 50 mM Tris e 200 mM NaCl em pH 8,0. As frações contendo a proteína foram então submetidas à exclusão por tamanho em coluna Superdex 75 16/60 (GE Healthcare) utilizando-se para tanto tampão: 20 mM Tris, 200 mM NaCl e 1 mM EDTA em pH 8,0.

O análogo fluorescente à penicilina: Bocilina FL® (Invitrogen) foi utilizado como competidor ao domínio de ligação à penicilina das proteínas PBPs. Foram utilizadas placas escuras de 384 poços ProxiPlate® (PerkinElmer®), e o leitor ClarioStar® do LNBIO com comprimento de onda de excitação de 485 nm e emissão de 520 nm, utilizando-se um filtro a 515 nm para bloquear excitações residuais. O pré-ensaio de otimização e o ensaio de *screening* utilizando-se as diferentes bibliotecas foram realizados de acordo com protocolo descrito em FEDAROVICH et al. (2012) sob supervisão do Dr. Artur Cordeiro especialista em HTS e pesquisador integrante do Laboratório Nacional de Biociências LNBio.

1.3.5.6. Citotoxicidade (frente os compostos puros isolados da linhagem endofítica L9/Aa1 e da linhagem de solo SDC28)

Os testes foram conduzidos pela Profa. Dr. Joanna E. Burdette da Universidade de Illinois Chicago. As células de câncer de ovário humano OVCAR3 foram adquiridas da AmericanType Culture Collection (Manassas, VA). A linhagem celular foi propagada a 37 °C em 5% de CO₂ em meio RPMI 1640, suplementado com soro bovino fetal (10%), penicilina (100 U ml⁻¹) e estreptomicina (100 µg ml⁻¹). As células em crescimento em fase-log foram coletadas por tripsinização, seguida por duas etapas de lavagem para

remover todos os vestígios de enzima. Um total de 5.000 células foram semeadas por poço de uma placa de 96 poços (Microtest 96[®], Falcon) e incubadas durante a noite (37 °C em 5% de CO₂). As amostras dos compostos foram dissolvidas em DMSO e então diluídas e adicionadas aos poços. As células foram incubadas na presença da substância que foram testadas por 72 h a 37 °C e avaliadas quanto à viabilidade usando um ensaio comercial de absorvância (CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay, Promega Corp.) que mediu as células viáveis. Os valores de IC₅₀ foram expressos em µM em relação ao controle de solvente (DMSO). As medições foram registradas em um leitor de placas BioTek operando a 600 nm. Controles positivos foram incluídos em placas de triagem (taxol 10 nM, GUBIANI et al., 2022).

1.3.5.7. Atividade antibacteriana (protocolo utilizado nos compostos isolados de SDC28)

Os testes foram conduzidos pela Prof. Dr. Simone Lira, da ESALQ-Piracicaba. Cepas bacterianas Gram-negativas e Gram-positivas foram adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC), National Collection of Type Cultures (NCTC) e isolados clínicos (fornecidos pelo Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto - estado de São Paulo, Brasil) foram usados para avaliar a atividade antibacteriana de frações (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* BW25113, *E. coli* ATC 10536, *Staphylococcus aureus* ATC 25923). Os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram determinados pelo método de microdiluição em placas de 96 poços, conforme recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute. As amostras foram dissolvidas em DMSO a 1,0 mg mL⁻¹ e diluídas em meio Mueller-Hinton, para concentrações entre 0,048 e 100,0 µg mL⁻¹. O teor final de DMSO foi de 4% (v/v) que também foi utilizada como controle negativo. A tetraciclina foi usada como controle positivo. A concentração do inóculo foi ajustada para cada cepa bacteriana afim de fornecer uma concentração celular de 5x10⁵ CFU/poço.

A placa de 96 poços foi então incubada a 37 °C durante 24 horas em condições aeróbicas. Após a incubação, as placas foram avaliadas em um leitor de microplacas (SUNRISETM - TECAN), seguido da adição de 30 µL de solução aquosa de resazurina 0,02% a cada poço, para indicar a viabilidade da bactéria, as cores azul e vermelho indicam a ausência e a presença de crescimento bacteriano, respectivamente (SARKER, NAHAR, KUMARASAMY, 2007). Todos os testes foram realizados em triplicata.

1.3.5.8. Atividade antifúngica (protocolo utilizado nos compostos isolados de SDC28)

A atividade antifúngica foi avaliada pelo método de difusão em disco de papel (CLSI, 2011; 2012) e conduzidas pela prof. Dr. Simone Lira, da ESALQ-Piracicaba. Os microrganismos fitopatogênicos testados foram *Rhizoctonia solani* (CMAA 1589 – isolado de orégano) e *Colletotrichum falcatum* (isolado de cana-de-açúcar). Cepas fúngicas foram cultivadas em meio de cultura batata dextrose ágar (ACUMEDIA) a 28 °C por três dias. Após o crescimento, os fragmentos miceliais foram retirados da borda (5 mm de diâmetro) e transferidos para o centro de novas placas de Petri (90 x 15 mm) contendo meio BDA. Ao redor do fragmento foram colocados discos de papeis estéreis, onde foram aplicados 5 µL (10 mg mL⁻¹) das amostras testes diluídas em MeOH, MeOH/H₂O ou DMSO, de acordo com a solubilidade da amostra. As placas de controle continham apenas as cepas fitopatogênicas, MeOH, DMSO e H₂O. O fungicida comercial FOX foi utilizado como controle positivo. Após um período de incubação de três dias a 28 °C para *R. solani* e oito dias de incubação para *C. falcatum*, os ensaios foram avaliados. O tempo de avaliação de cada fitopatógeno variou de acordo com o tempo suficiente para o fungo controle crescer em toda a placa.

1.3.6. Quantificação do alcaloide peptídico solitumina A (80)

1.3.6.1. Preparação de solução padrão e amostras para quantificação

A investigação da fração hidrossolúvel obtida do meio de crescimento do fungo *P. solitum* IS1-A, isolado no continente Antártico, foi realizada pela Dr. Julie Rodriguez. Foi obtida uma série de novos alcaloides peptídicos inéditos. O alcaloide solitumina A (**80**) foi identificado como sendo o composto majoritário do extrato oriundo das resinas XAD-2,-4,-7.

As soluções de amostras para quantificação de solitumina A (**80**) foram preparadas como se segue: o fungo *Penicillium solitum* IS1-A foi cultivado em triplicata em frascos Schott de 500 mL, contendo 100 mL de PDB como meio de cultura. Após 33 dias de incubação a 20 °C, o meio de cultura foi separado dos micélios por filtração em papel de filtro e celite, utilizando-se a metodologia descrita no **item 1.3**, com

modificações (MORAIS et al., 2010). Adicionou-se XAD-2, XAD-4 e XAD-7 separadamente à cada experimento de cultivo do fungo.

Cada um dos experimentos de adsorção fora deixado em agitação *overnight*. Após o período de adsorção, as réplicas dos experimentos individuais de crescimento e adsorção com cada uma das resinas foram dessorvidas individualmente. Os extratos das resinas foram secos em *speedvac* e submetidos separadamente à separação cromatográfica, conforme representado na **Figura 17**. Foram utilizadas colunas pré-empacotadas de sílica derivatizada com grupos C₁₈ (Waters, 1 g), Utilizando-se como fase móvel misturas de MeOH em H₂O (H₂O, H₂O/MeOH 75:25, H₂O/MeOH 1:1, H₂O/MeOH 25:75, MeOH). Foram obtidas cinco frações a partir da separação cromatográfica em C₁₈ dos extratos dessorbidos de cada uma das resinas XAD. As amostras secas foram pesadas com precisão e as soluções foram preparadas a uma concentração de 1,0 mg mL⁻¹.

A massa exata de solitumina A (**80**) (4 mg) foi dissolvida em 1,0 mL de solução 1:1 H₂O/MeOH. Para a confecção do gráfico de calibração, foi preparada uma solução estoque de 1,0 mg mL⁻¹ do padrão, armazenado a 4 °C. Oito soluções padrão de trabalho foram preparadas por diluição seriada da solução estoque com H₂O/MeOH 1:1 em concentrações apropriadas (0,180; 0,150; 0,125; 0,100; 0,075; 0,050; 0,025 e 0,01 mg mL⁻¹).

1.3.6.2. Validação do método analítico

A validação do método foi realizada de acordo com as diretrizes propostas pelo *European Medicines Agency* (EMA) e literatura adequada (OGÓREK et al., 2016a; OGÓREK et al., 2016b; BANDEIRA e CAVALHEIRO, 2009). As diretrizes incluem a determinação de seletividade, precisão e estabilidade. A determinação da pureza do pico para melhorar a seletividade foi avaliada por comparação com comprimentos de onda de detecção de UV (220 a 400 nm) e espectros de MS para o padrão. A precisão foi calculada pela avaliação da repetibilidade e precisão intermediária em três níveis de concentração (0,180; 0,100 e 0,001 mg mL⁻¹). Para o cálculo da repetibilidade, as amostras foram analisadas em triplicata no mesmo dia. Para medir a precisão intermediária, as amostras foram analisadas em triplicata em três dias diferentes. A estabilidade foi testada analisando as áreas de pico do padrão em três níveis de concentração (0,180; 0,100 e 0,001 mg mL⁻¹) em intervalos de tempo regulares (0, 24 e

48 h). As soluções foram armazenadas a 4 °C durante as análises (CHAN, CHEUNG, SZE, 2013).

Os resultados foram expressos como média \pm RSD (*relative standard deviation*) dos experimentos realizados com o grupo de extratos oriundos da dessorção das resinas XADs (XAD-2, -4, -7). O teste *t* de *Student* foi aplicado para verificar diferenças estatísticas entre as três frações eluídas com H₂O/MeOH 1:1, a partir de cada experimento com cada uma das resinas (XAD2 -2, XAD4-2 e XAD7-2) contendo solitumina A (**80**). As diferenças de concentração de solitumina A (**80**) entre os grupos de frações foi avaliada pelo teste *t* de *Student*, utilizando-se o software Prisma Graph-Pad (versão 4.0), e a diferença estatística foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

1.4. Resultados e discussão

1.4.1. Estudo de desrepliação química e biológica de extratos de fungos filamentosos

Para esclarecer a nomenclatura designada para os extratos e frações obtidas de cada linhagem endofítica, **L+número** corresponde à linhagem fúngica sem identificação molecular. Se conter a letra **A**, refere-se ao extrato orgânico proveniente da extração das resinas XAD-2, -4, -7. As letras **M**, **P**, **S** referem-se às iniciais dos meios de cultivo utilizados, **Malte**, “*Potato dextrose broth*”, “*Sabouraud dextrose broth*”, respectivamente. Finalmente, o número ao final do código representa a fração proveniente do fracionamento nas colunas pré-empacotadas com C₁₈ ou cianopropila, que detém a atividade biológica.

Para as frações obtidas dos extratos dos fungos da Antártica o prefixo **L1-2A** e **C3** referem-se às linhagens fúngicas. Por exemplo, o código **L1-2APSR2**, **L1-2A** refere-se à linhagem fúngica Antártica. A letra **P** ao meio de cultivo “*Potato dextrose broth*”. A letra **S** para água do mar artificial e por fim, **R2**, para extrato orgânico oriundo das resinas, fração 2 (H₂O/MeOH 75:25).

1.4.1.1. Análise do perfil de atividades biológicas das linhagens endofíticas

Após a extração dos meios de cultivo das linhagens fúngicas endofíticas de *A. alcatrazense*, *A. loefgrenii* e *B. venosa* (provenientes da ilha de Alcatrazes) seguindo a metodologia ilustrada na **Figura 17**, foi realizada análise dos perfis químicos dos extratos dos meios de cultivo por HPLC-UV-MS e avaliação em ensaios biológicos, com o objetivo de compor um banco de dados para cada linhagem fúngica.

Dessa maneira quando as frações foram avaliadas no teste utilizado para identificar a competição das amostras com o domínio de ligação à penicilina (*PB domain*) ou domínio de transpeptidase (*TP domain*), realizado em colaboração com a Professora Dr. Andrea Dessen (Laboratório Nacional de Biociências, LNBio) uma linhagem de *A. loefgrenii* e cinco linhagens de *B. venosa* se mostraram extremamente interessantes no ponto de vista de inibição, como pode ser observado na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Resultado de ensaio biológico para descoberta de extratos bioativos (PBP).

Planta	Linhagem Fúngica Extrato Orgânico	Inibição (%)	Linhagem Fúngica Extrato Orgânico	Inibição (%)
<i>A. loefgrenii</i>	Resina			
	L1AS1	40,6	L1P1	91,7
	L1AM1	31,3	L1M1	63,5
<i>B. venosa</i>	L17AS1	39,2		
	L22AM2	39,1		
	L16AS1	30,1		
	L25AM2	29,9		
	L25AS2	30,4		
	L23AS1	33,3		

FONTE: Autoria própria.

O ensaio biológico de inibição de PBPs objetiva a descoberta de substâncias químicas que sejam alternativas viáveis para o tratamento de doenças causadas por bactérias que sejam resistentes aos antibióticos derivados β -lactâmicos. Um exemplo é *Neisseria gonorrhoeae*, um patógeno humano causador de gonorréia. Por mais de 40 anos, a gonorréia foi tratada com uma dose única de penicilina. O aumento prevalência de cepas que apresentam resistência à penicilina levou a sua retirada em 1986 pelos Centros para o Controle de Doenças e Prevenção. Os alvos primordiais para os derivados β -lactâmicos são proteínas de ligação à penicilina (PBPs), transpeptidases que catalisam a formação de ligações cruzadas entre os peptídeos e o glicano adjacente durante os estágios finais da síntese dos peptidoglicanos nas bactérias, ou seja, está intrinsecamente envolvida com o crescimento, divisão e manutenção da forma celular. A descoberta de substâncias que inibam a formação dessas ligações cruzadas na parede celular bacteriana, levaria à morte da bactéria resistente, e tornando-se uma fonte promissora de novos antibióticos.

Quando avaliados quanto à atividade antimicrobiana (expressas aqui por concentração mínima inibitória, MIC) frente à diversas bactérias bucais, resistentes e leveduras, as linhagens analisadas não demonstraram potente atividade, com MICs acima de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as frações dos extratos dos meios de cultivo das linhagens de *A. alcatrazense* e *A. loefgrenii* foram consideradas inativas. As linhagens endofíticas de *B. venosa* não foram analisadas neste bioensaio.

Ao ser analisado o resultado dos ensaios de citotoxicidade frente diversas linhagens de células tumorais, um primeiro *screening* foi realizado com três repetições

experimentais para cada amostra que foi testada, apenas na concentração máxima de 100 ug mL⁻¹, selecionando-se as amostras que sejam potencialmente ativas. Diversas frações dos fungos endofíticos de *B. venosa* se mostram potencialmente interessantes, bem como as linhagens de *A. alcatrazense* e *A. loefgrenii* (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Resultado de citotoxicidade para as frações dos extratos fúngicos obtidos de *A. alcatrazense*, *A. loefgrenii* e *B. venosa* frente a diversas linhagens celulares* em uma única concentração de 100 ug mL⁻¹.

Planta	Linhagem Fúngica	Extrato Orgânico	Extrato Orgânico Resina
<i>A. loefgrenii</i>	L1	M1, P1	-
	L11 ^a	1, 2, 3, 5	1, 2
<i>A. alcatrazense</i>	L2 ^a	2, 3	4
	L10 ^a	2, 3, 4	1, 2, 3, 4
	L15	P3, P5, M1	-
	L16	P1, S2, P5	-
	L17	P2, P3, P5	AS4
	L19	P2	-
	L20	-	AM1, AM2, AM3
<i>B. venosa</i>	L21	P1, M1, M2, M5, S1	AM2, AM3, AS2
	L22	P1, P5, M1	AM2
	L23	-	AS1
	L24	S2	-
	L25	P2, M1	AS2, AM2

* Linhagens celulares testadas: MCF-7 (câncer mama), MCF-10A (células normais de mama), ACP01 (adenocarcinoma gástrico), HELA (célula imortalizada).

^aRefere-se a uma triagem anterior, onde os três meios de cultivos eram extraídos conjuntamente e após seguia-se a mesma metodologia de fracionamento.

FONTE: Autoria própria.

Quando avaliadas no ensaio frente ao parasita *Leishmania infantum* causador da leishmaniose visceral, que é uma doença denominada de zoonose de evolução crônica, que se não tratada rapidamente, pode levar a óbito em até 90% dos casos. É transmitida ao homem pela picada de fêmeas do inseto vetor infectado, denominado flebotomíneo e conhecido popularmente como mosquito palha, asa-dura, tatuquiras, birigui, dentre outros. No Brasil, a principal espécie responsável pela transmissão é a *Lutzomyia longipalpis*. As frações que levaram a uma redução de viabilidade celular de 50% e 20% são discriminadas abaixo. As demais frações apresentaram viabilidade celular altas (acima de 50%), logo não despertando interesse quanto ao potencial frente ao parasita. As frações obtidas de meios de crescimento de fungos endofíticos de *B. venosa* não foram enviadas para este bioensaio, devido à pouca quantidade de material obtido (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Resultado de viabilidade celular frente ao parasita *Leishmania infantum*.

Planta	Linhagem Fúngica	Fração - viabilidade celular entre 50-20%	Fração- Viabilidade celular entre 20-0%
A. <i>Alcatrazense</i>	L2	S1, S2, S3, S4, S5, S6	M2, P1, P2, P3
	L10	AS2, AP2	-
	L13	P1, P2, P3, P4, P5	S1, S2, S3

FONTE: Autoria própria.

O resultado do bioensaio contra o parasito *Trypanosoma cruzi*, causador da Doença de Chagas apresentou algumas frações com algum potencial quando testados em concentrações únicas. Os dados podem ser vistos na tabela a seguir. A contaminação ocorre através do contato direto com as fezes que o hospedeiro conhecido popularmente como “barbeiro” deposita sobre a pele humana, enquanto se alimenta de sangue. Geralmente, a picada provoca coceira e o ato de coçar facilita a penetração do parasito no local da picada. O *T. cruzi* contido nas fezes do “barbeiro” pode penetrar no organismo humano, mas também pela mucosa dos olhos, nariz e boca ou através de feridas ou cortes recentes existentes na pele.

Tabela 5 - Resultado de viabilidade celular frente ao parasito *Trypanosoma cruzi*.

Planta	Linhagem Fúngica	Fração do extrato orgânico	Fração do extrato orgânico da resina
A. <i>Alcatrazense</i>	L1	A3	-
	L2	A4	B1
	L9/Aa1	A3, A4	B3, B4
	L12	A4	B2, B5

FONTE: Autoria própria.

1.4.2. Análise do perfil de atividades biológicas das linhagens de solo

Os extratos orgânicos obtidos através do meio de cultura líquido das linhagens **SDC27** e **SDC28** apresentaram diversas frações que foram ativas no bioensaio de atividade leishmaniscida contra *L. infantum*. Apenas duas frações oriundas do extrato das resinas XAD-2,-4,-7 dos fungos **SDC12** e **SDC28** apresentaram atividade (**Tabela 6**).

Tabela 6 - Resultado do teste biológico contra o protozoário *L. infantum*, considerando o crescimento dos fungos nos meios de PDB, M2% e SBD+YE separadamente e extração conjunta dos três meios.

Extrato	Fração Orgânica	<i>L.infantum</i>	Extrato Aquoso	Fração	<i>L.infantum</i>
SDC12	1	-	SDC12A	1	-
	2	-		2	-
	3	-		3	-
	4	-		4	Ativa
	5	-		5	-
	6	-			
SDC27	1	Ativa	SDC27	1	-
	2	Ativa		2	-
	3	Ativa		3	-
	4	-		4	-
	5	-		5	-
	6	-			
SDC28	1	Ativa	SDC28	1	-
	2	Ativa		2	-
	3	Ativa		3	-
	4	-		4	Ativa
	5	-		5	-
	6	-			

Quanto ao teste de inibição do proteassomo, apenas a linhagem de **SDC28** se mostrou promissora. E quanto à atividade de inibição dos ligantes de penicilina, o fungo **SDC27** se destacou com frações aquosas ativas.

Quando os extratos foram analisados no biensaio antibacteriano frente a diversas linhagens de bactérias, diversas frações orgânicas mostraram-se promissoras. Apenas o fungo **SDC28** apresentou uma fração aquosa ativa frente a *B. subtilis* (fração 3) (**Tabela 7**).

Devido a pronunciada atividade que os extratos orgânicos da linhagem **SDC28** apresentou no bioensaio de inibição do proteassomo, esta foi escolhida para crescimento em escala ampliada e isolamento dos seus constituintes químicos.

Tabela 7 - Frações orgânicas avaliadas frente diversas linhagens bacterianas.

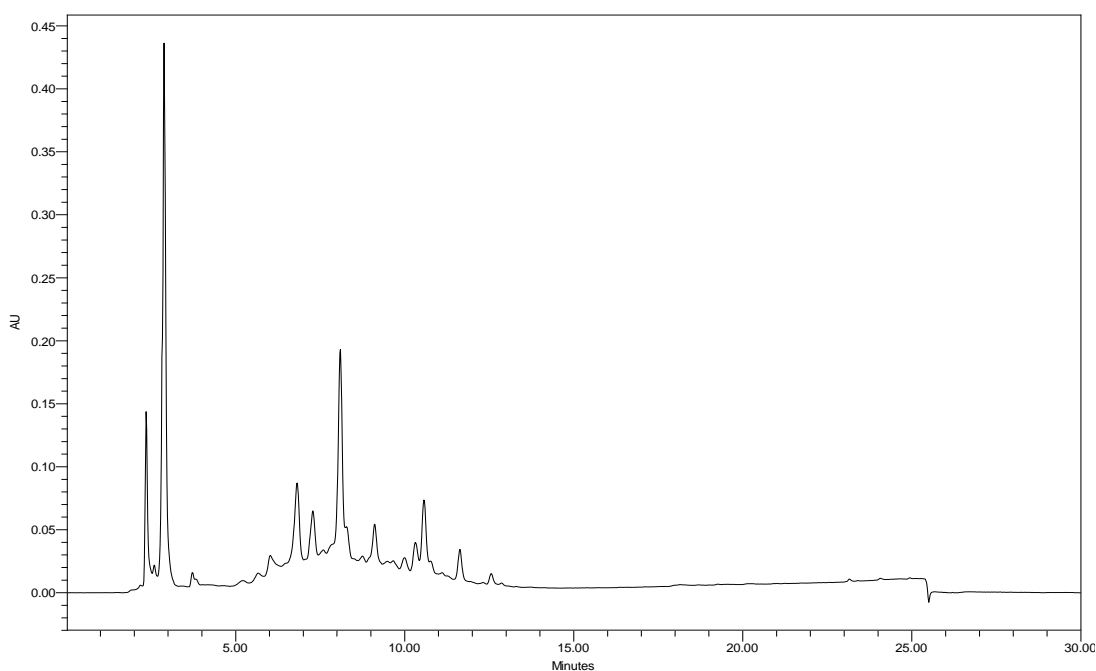
Linhagem	Fração	<i>S. mutans</i>	<i>S. mitis</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
SDC27	1	-	-	-	-	-	-	-	Ativa
	2	Ativa	Ativa	-	Ativa	Ativa	Ativa	-	Ativa
	3	Ativa	Ativa	-	Ativa	Ativa	Ativa	-	Ativa
	4	-	-	-	-	-	-	-	Ativa
	5	Ativa	Ativa	-	Ativa	Ativa	Ativa	-	Ativa
	6	-	-	-	-	-	-	-	Ativa
SDC28	1	-	-	-	-	-	-	-	Ativa
	2	-	-	-	-	-	-	Ativa	Ativa
	3	-	-	-	-	-	-	-	Ativa
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-

1.4.3. Análise do perfil químico da linhagem L9/Aa1

A linhagem **Aa1** foi isolada de *A. alcatrazense* e crescida em PDB e teve sua identificação molecular realizada através de análise molecular da região do ITS-4, no qual em comparação com os dados genéticos disponíveis através da ferramenta de blastP, apresentou similaridade superior a 98% com a linhagem *Byssochlamys spectabilis*. Os extratos obtidos da linhagem *Byssochlamys spectabilis* Aa1 apresentaram atividade antiparasitária frente *Trypanossoma cruzi* e atividade no bioensaio de inibidores de ligantes de penicilina. Devido a isso, foi selecionada para o crescimento em larga escala (21 litros de PDB) e também devido seu perfil químico diferenciado. Acredita-se que metabólitos secundários produzidos pela linhagem **Aa1** sejam estruturalmente inéditos, devido escassa informação encontrada nos bancos de dados *Dictionary of Natural Products* (DNP) e SciFinder. Abaixo podemos observar como a separação cromatográfica do extrato orgânico proveniente das resinas se apresentou após separação cromatográfica em coluna pré-empacotada com C₁₈.

Figura 33 - Cromatograma da fração **Aa1R2** em 254 nm.

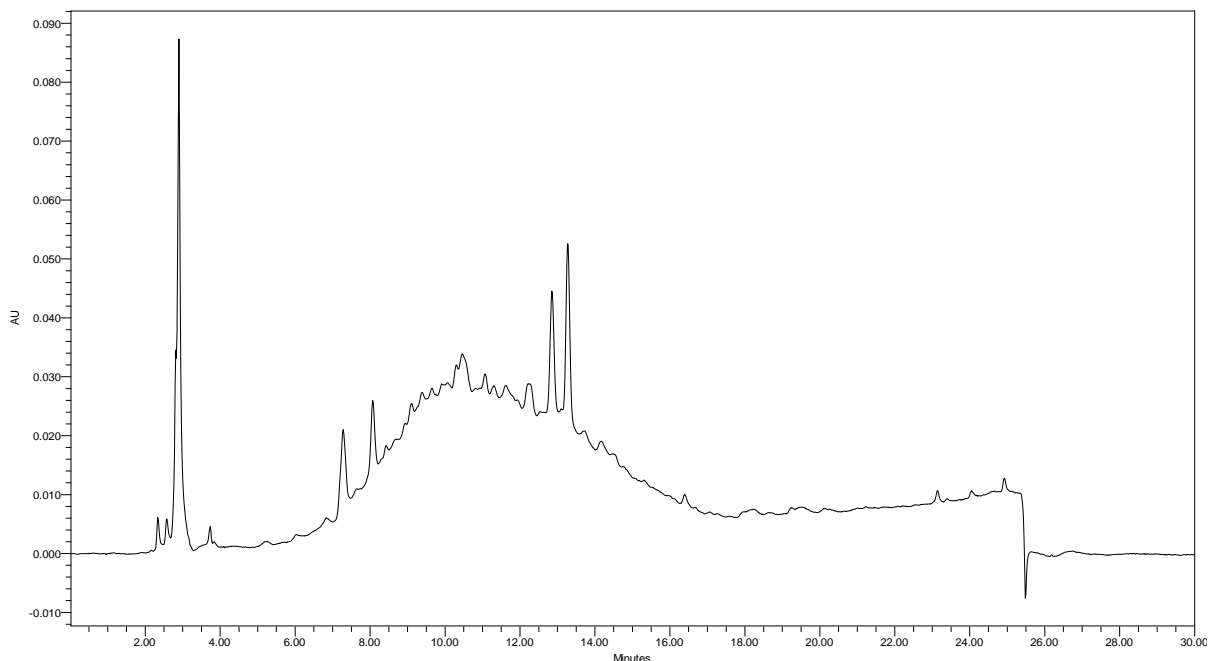
Condição: coluna X-Terra RP 18 (4,6 x 250 mm; 5µm; 1 mL min⁻¹), λ_{máx} 254 nm e gradiente de eluição de MeOH/MeCN em H₂O (0,1% de ácido fórmico): 0-1 min 10% MeOH/MeCN, 1-21 min de 10% à 100% de MeOH/MeCN, 21-23 min 100% de MeOH/MeCN, 23-30 condição inicial.



FONTE: Autoria própria.

Figura 34 - Cromatograma da fração **Aa1R3** em 254 nm.

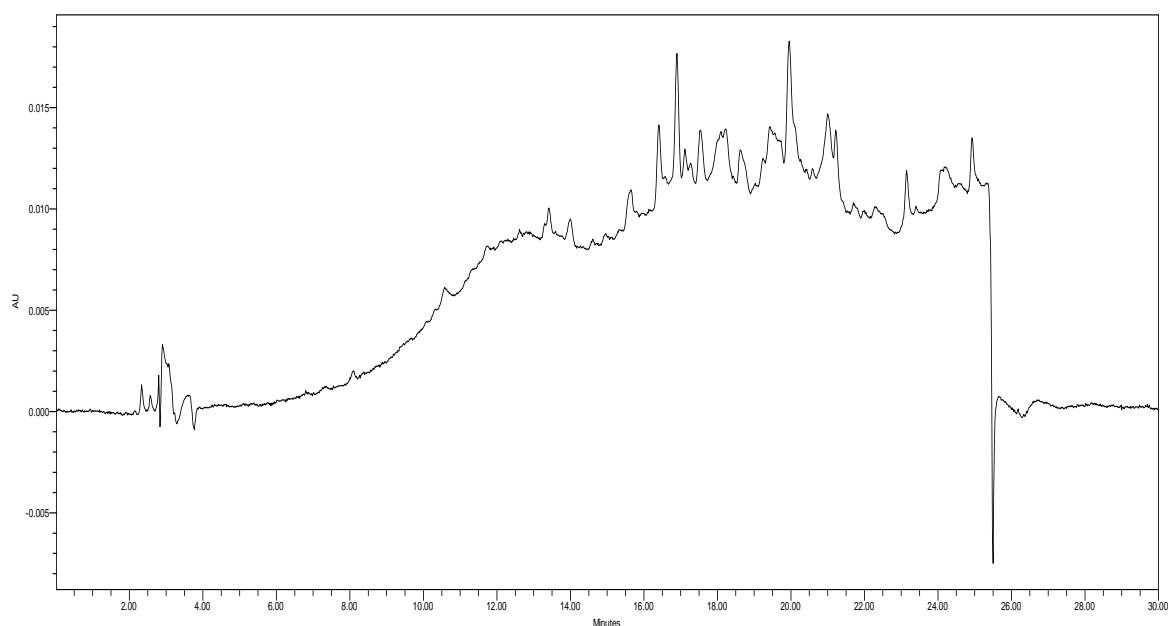
Condição: coluna X-Terra RP 18 (4,6 x 250 mm; 5 μ m; 1 mL min⁻¹), $\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm e gradiente de eluição de MeOH/MeCN em H₂O (0,1% de ácido fórmico): 0-1 min 10% MeOH/MeCN, 1-21 min de 10% à 100% de MeOH/MeCN, 21-23 min 100% de MeOH/MeCN, 23-30 condição inicial.



FONTE: Autoria própria.

Figura 35 - Cromatograma da fração **Aa1R4**.

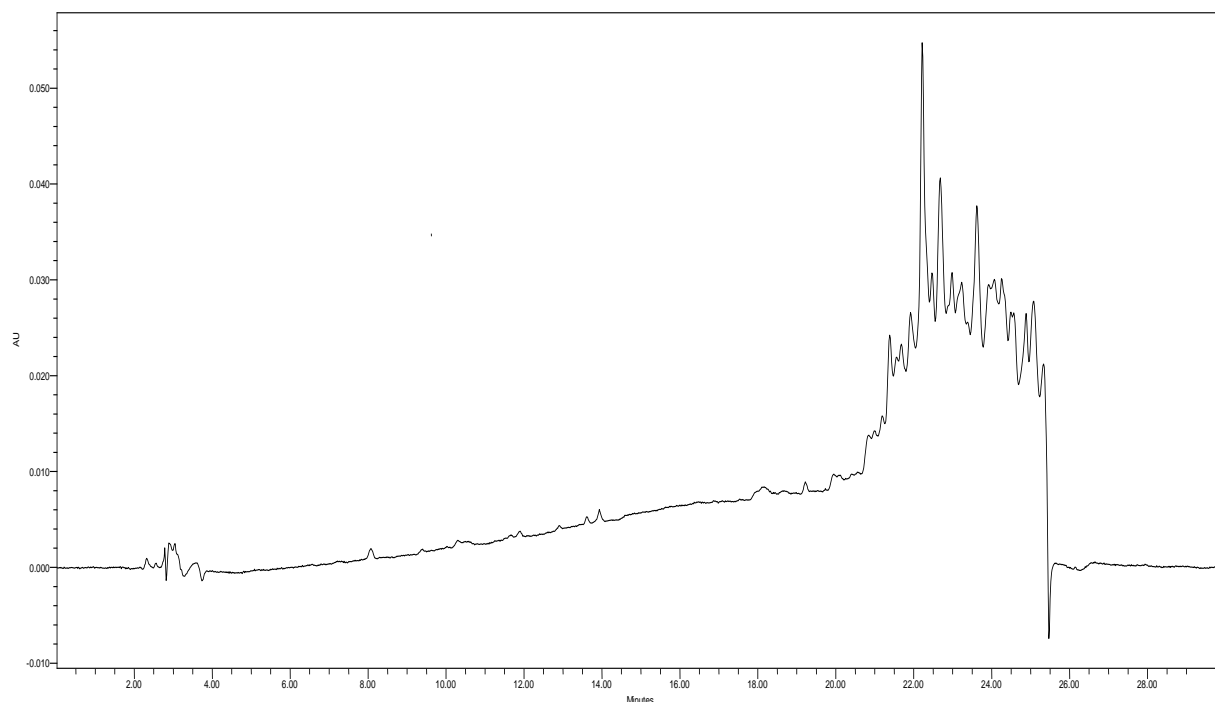
Condição: coluna X-Terra RP 18 (4,6 x 250 mm; 5 μ m; 1 mL min⁻¹), $\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm e gradiente de eluição de MeOH/MeCN em H₂O (0,1% de ácido fórmico): 0-1 min 10% MeOH/MeCN, 1-21 min de 10% à 100% de MeOH/MeCN, 21-23 min 100% de MeOH/MeCN, 23-30 condição inicial.



FONTE: Autoria própria.

Figura 36 - Cromatograma da fração **Aa1R5**.

Condição: coluna X-Terra RP 18 (4,6 x 250 mm; 5 μ m; 1 mL.min⁻¹), $\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm e gradiente de eluição de MeOH/MeCN em H₂O (0,1% de ácido fórmico): 0-1 min 10% MeOH/MeCN, 1-21 min de 10% à 100% de MeOH/MeCN, 21-23 min 100% de MeOH/MeCN, 23-30 condição inicial.



FONTE: A autoria própria.

As **Figuras 33-36** nos apresentam cromatogramas obtidos por HPLC-UV das frações obtidas após fracionamento cromatográfico em coluna de C₁₈, e o que nos chama à atenção é o fato de como os constituintes químicos estão concentrados nas frações devido às suas polaridades inerentes. O que valida a nossa metodologia de trabalho para a obtenção de extratos aquosos a partir da captura dos constituintes mais polares que permanecem no meio de cultivo líquido (água – rotineiramente descartado), após a extração realizada com acetato de etila seguido por usuais separações cromatográficas utilizando solventes não-polares e sílica gel como fase estacionária (RODRIGUEZ et al., 2020). Shimizu (1985) descreve um protocolo de obtenção de extratos polares a partir de organismos marinhos, inclusive utilizando géis diferenciados como Bio-gel P2 e as resinas XAD-2 e -4. Entretanto, em contraposição a metodologia proposta por Shimizu (1985) e durante a era dourada dos antibióticos (HOOPER, 1982), apenas pouquíssimos artigos publicados no JNP relatam a investigação de extratos hidrofílicos, em detrimento de extratos lipofílicos. Quando analisados os artigos publicados durante o período de 10 anos (2008-2018), apenas 5% dos 500 artigos relatam a utilização de resinas adsorptivas no processo de isolamento dos constituintes químicos. Entretanto, estes

trabalhos não deixam claro se os compostos eram ou não solúveis em água (RODRIGUEZ et al., 2020).

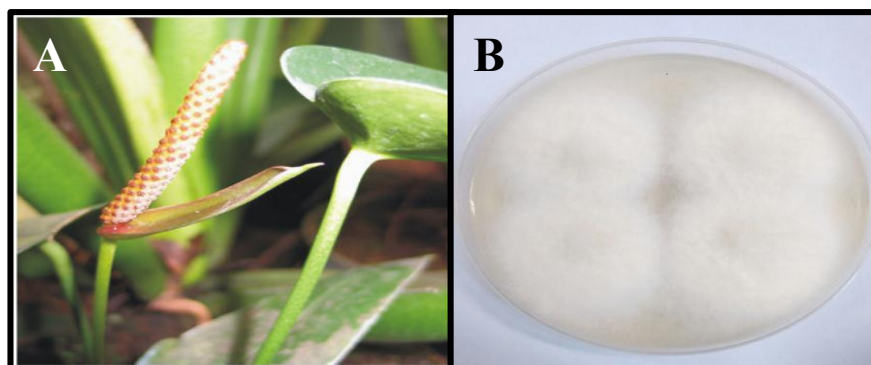
1.4.3.1. Isolamento dos metabólitos secundários produzidos pela linhagem endofítica *Byssochlamys spectabilis* Aa1 isolado da planta *Anthurium alcatrazense*

A planta hospedeira *Anthurium alcatrazense* foi descoberta recentemente, sendo endêmica da Ilha de Alcatrazes - Município de São Sebastião-SP, e não possui estudo fitoquímico (COELHO e CATHARINO, 2008; DE ANDRADE et al., 2021). O arquipélago de Alcatrazes é considerado um ambiente único, uma vez que sua vegetação teve pouquíssimo ou quase algum contato humano. A ilha possui uma vegetação típica de Mata Atlântica com estrato arbóreo e plantas capoeiras. Encontra-se cerca de 170 espécies de plantas, sendo algumas consideradas endêmicas da ilha, como o antúrio negro (*Anthurium alcatrazense*, KODJA et al., 2012). Poucos estudos revelam a identidade da microbiota associada à vegetação encontrada na ilha (CORREIA et al., 2018; GRIGOLETTO, et al., 2020; ANDRADE et al., 2021; TAKAKI et al., 2022).

O gênero *Anthurium* é um gênero pertencente à família Araceae e está distribuído em todo o sul do continente americano. As flores de várias espécies de antúrios são cultivadas para fins ornamentais, e as folhas têm usos tradicionais como agente anti-inflamatórios (DEFRANK et al., 1989; Marutani, Tang, Kamemoto, 1987). De *A. acutangulum* Engler, usado como remédio para tosse (SEGURA et al., 1998) e do estudo fitoquímico de *A. versicolor* resultou no isolamento de flavonas glicosiladas (AQUINO et al., 2001).

A linhagem *Byssochlamys spectabilis* Aa1 foi isolada deste hospedeiro e crescida em PDB. As frações de **Aa1R1-Aa1R5** mostraram-se moderadamente ativas no ensaio de inibição da PBP. A fração **Aa1R2** mostrou-se a mais ativa (**Tabela 8**). Devido a relevância biológica encontrada nos extratos de *B. spectabilis* **Aa1**, o estudo químico objetivando o isolamento de metabólitos secundários hidrossolúveis foi realizado a partir da fração **Aa1R2** (H₂O/MeOH 75:25).

Figura 37- (A) *Anthurium alcatrazense*. Fonte: COELHO e CATHARINO (2008).
(B) Perfil do isolado *Byssoschlamys spectabilis* Aa1.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 8 - Resultado do ensaio de inibição dos ligantes de penicilina das frações de **Aa1R** (extrato orgânico das resinas) e **Aa1M** (extrato metanólico).

Extrato	Fração	Porcentagem de inibição (%)*	Extrato	Fração	Porcentagem de inibição (%)*
Aa1R	1	Nula	Aa1M	1	5
	2	20		2	8
	3	15		3	10
	4	8		4	8
	5	Nula		5	12
-	-	-	6	nula	-

Fonte: Autoria própria.

1.4.3.1.1. Análise da fração Aa1R2E7-11G

O composto codificado como **Aa1R2E7-11G4 (68)** foi isolado a partir da fração **Aa1R2** (H₂O/MeOH 75:25) por uma série de separações cromatográficas. O composto apresentou-se como um sólido cristalino incolor. O espectro de massas de alta resolução (HRESIMS, **Anexo 1**) em modo negativo de **Aa1R2E7-11G4** indicou a fórmula C₁₆H₁₇N₃O₄. No espectro de HRESIMS observou-se um sinal de *m/z* 314,1140 correspondente à molécula desprotonada [M-H]⁻. O cálculo do índice de deficiência de hidrogênio (IDH) indicou que a estrutura apresenta dez insaturações.

O espectro de RMN de ¹H (**Anexos 2-5**) da amostra **Aa1R2E7-11G4 (68)** evidenciou a presença de hidrogênios em um sistema cíclico aromático: em δ_H 7,60 (dd, *J* = 8,1; 1,0, H-9), em δ_H 7,05 (ddd, *J* = 8,4; 7,0; 1,0, H-10), em δ_H 7,36 (dd, *J* = 8,1; 1,0,

H-12), além do sinal em $\delta_{\text{H}} 7,11$ (dd, $J = 8,0; 1,0$, H-11) parcialmente sobreposto ao sinal do hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 7,14$ (s, H-14).

Observou-se a presença dos hidrogênios metínicos em $\delta_{\text{H}} 4,80$ (dd, $J = 9,0; 4,8$, H-3) e $\delta_{\text{H}} 4,14$ (dd, $J = 9,0; 4,5$, H-6). Além de dois duplo dupletos referentes aos hidrogênios metilênicos diasterotópicos em $\delta_{\text{H}} 3,44$ (dd, $J = 14,7; 5,0$, H-7) e o hidrogênio $\delta_{\text{H}} 3,24$ (dd, $J = 14,7; 9,0$, H-7). Foi observada a presença de hidrogênios metilênicos em $\delta_{\text{H}} 2,19$ (m, H-16) e outros dois sinais também de hidrogênios metilênicos diasterotópicos em $\delta_{\text{H}} 2,30$ (m, H-15a) e $\delta_{\text{H}} 1,89$ (m, H-15b).

O espectro de RMN de ^{13}C (**Anexo 6**) apresentou 16 sinais de carbono, sendo, oito carbonos aromáticos referentes a um núcleo indólico ($\delta_{\text{C}} 124,7$ C-14, $\delta_{\text{C}} 111,3$ C-8, $\delta_{\text{C}} 129,1$ C-8a, $\delta_{\text{C}} 119,5$ C-9, $\delta_{\text{C}} 120,2$ C-10, $\delta_{\text{C}} 122,8$ C-11, $\delta_{\text{C}} 112,6$ C-12, $\delta_{\text{C}} 138,3$ C-12a). Além disso, foram observados sinais de duas carbonilas de amida ($\delta_{\text{C}} 175,3$ C-2 e $175,1$ C-5), um carbono carboxílico ($\delta_{\text{C}} 182,0$ C-17), três carbonos metilênicos ($\delta_{\text{C}} 26,8$ C-15, $28,6$ C-7 e $30,5$ C-16) e, dois carbonos metínicos-carbinólicos ($\delta_{\text{C}} 54,9$ C-3 e $58,2$ C-6).

O sistema de di-substituição do anel benzênico foi estabelecido pelas correlações de COSY dos hidrogênios aromáticos. Foi possível observar o acoplamento do hidrogênio H-9 com o hidrogênio H-10, do hidrogênio H-10 com os hidrogênios H-9 e H-11, do hidrogênio H-11 com os hidrogênios H-10 e H-12, além do acoplamento do H-12 com o hidrogênio H-11.

As posições inequívocas dos hidrogênios aromáticos H-9 e H-12 *para* substituídos foram definidas pelas correlações de HMBC entre o hidrogênio H-9 com os carbonos C-11 ($\delta_{\text{C}} 122,8$) e C-12a ($\delta_{\text{C}} 138,3$) e a correlação do hidrogênio H-12 com os carbonos C-8a ($\delta_{\text{C}} 129,1$) e o carbono C-10 ($\delta_{\text{C}} 120,2$). A posição do hidrogênio H-10 foi confirmada pelas correlações com os carbonos C-12 ($\delta_{\text{C}} 112,6$) e o carbono C-8a ($\delta_{\text{C}} 129,1$). Sua posição *orto* com o hidrogênio H-11 foi definida pelas correlações entre este hidrogênio com os carbonos C-9 ($\delta_{\text{C}} 119,5$) e o carbono C-12a ($\delta_{\text{C}} 138,3$).

A confirmação da presença do anel indólico foi atribuída às correlações do hidrogênio aromático H-14 com os carbonos C-8a ($\delta_{\text{C}} 129,1$) e à correlação com o carbono C-12a ($\delta_{\text{C}} 138,1$). Também observou-se correlação do hidrogênio H-9 com o carbono C-8 ($\delta_{\text{C}} 111,3$). A trissubstituição do anel pirrólico pôde ser estabelecida na correlação de longa distância entre o H-14 com um substituinte metilênico C-7 ($\delta_{\text{C}} 28,6$).

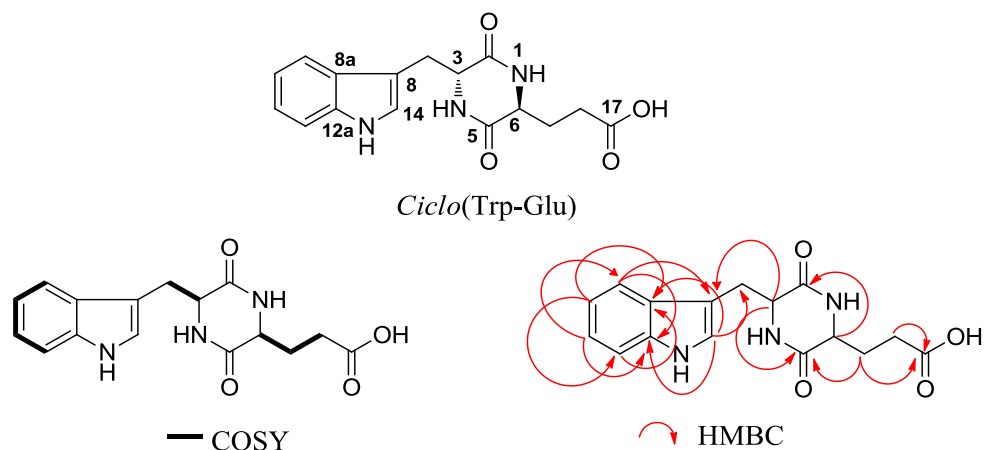
Uma conexão de COSY pôde ser observada entre os hidrogênios metilênicos diasterotópicos H-7 e o hidrogênio metínico H-3. Por apresentar um deslocamento químico tão desblindado, a vizinhança do hidrogênio H-3 deveria apresentar grupos

fortemente retiradores de elétrons. Assim, a análise do espectro HMBC confirmou a interação do hidrogênio metínico H-3 com o carbono carbonílico C-5 (δ_C 175,2) e ainda a correlação deste mesmo hidrogênio H-3 com o carbono aromático C-8 (δ_C 111,3) e com o carbono metilênico C-7 (δ_C 28,6).

O ciclo 2,5-dicetopiperazina foi estabelecido observando-se as correlações já explicitadas para o hidrogênio metínico H-3 e do hidrogênio metínico H-6 que apresentaram correlações com o carbono carbonílico C-2 (δ_C 175,3). No espectro de COSY, correlações foram observadas entre o hidrogênio metínico H-6 com hidrogênios metilênicos diastereotópicos na posição H-15, que por conseguinte também acoplam com outros dois hidrogênios metilênicos H-16.

As observações acima puderam ser confirmadas pelas correlações HMBC do hidrogênio metínico H-6 com os carbonos metilênicos C-15 (δ_C 26,8) e C-16 (δ_C 30,5). São nítidas as correlações dos hidrogênios H-15 e H-16 com o carbono carboxílico terminal C-17 (δ_C 182,0). Todas as correlações H/H e H/C observadas para o composto **Aa1R1E7-11G4** (**Figura 38**) podem ser observadas nos espectros de HSQC (**Anexo 7**), HMBC (**Anexo 8**) e COSY (**Anexo 9**), indicando que a estrutura do composto é da *ciclo*-(Trp-Glu). A **Tabela 9** apresenta os dados de deslocamentos atribuídos para a estrutura de **Aa1R2E7-11G4**.

Figura 38 - Composto **Aa1R2E7-11G4** (**68**), principais correlações de HMBC (setas vermelhas) e COSY (negrito).

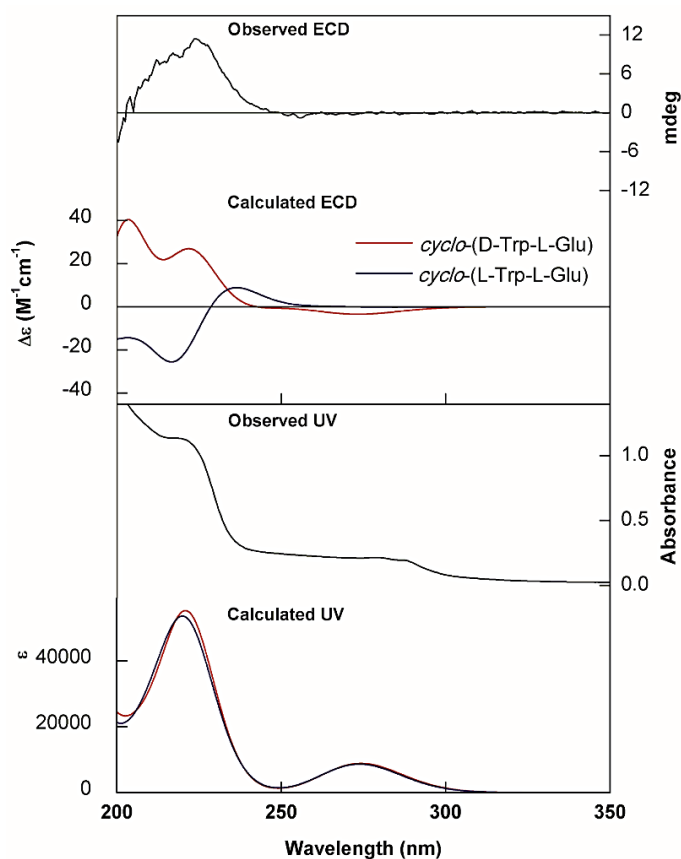


Fonte: Autoria própria.

A configuração absoluta dos centros estereogênicos foi realizada por hidrólise e derivatização com o reagente de Marfey. Após análise por UPLC-MS do peptídeo derivatizado em comparação com os padrões dos aminoácidos derivatizados, foi possível

definir o resíduo de ácido glutâmico como tendo configuração L (**Anexo 10**). A configuração absoluta do resíduo de triptofano não pôde ser definida por derivatização com o reagente de Marfey, e por isso a configuração do mesmo foi realizada com auxílio de cálculos TD-DFT. Os cálculos realizados para ambos os diastereoisômeros de Trp indicaram a presença de um resíduo D-Trp (**Figura 39**; **Anexos 13-14**). A estrutura final da dicetopiperazina **Aa1R2E7-11G4 (68)** foi então estabelecida como *ciclo*-(D-triptofano-L-ácido glutâmico), ou simplesmente como *ciclo*-(D-Trp-L-Glu).

Figura 39 - Comparação de espectros experimentais de UV e ECD em MeOH (preto) com espectros calculados pelo programa CAM-B3LYP/PCM(MeOH)/TZVP. Dados experimentais para (+)-*ciclo*-(D-Trp-L-Glu) versus simulado (3*S*,6*S*)-*ciclo*-(L-Trp-L-Glu) (azul) e (3*R*,6*S*)-*ciclo*-(D-Trp-L-Glu) (vermelho).

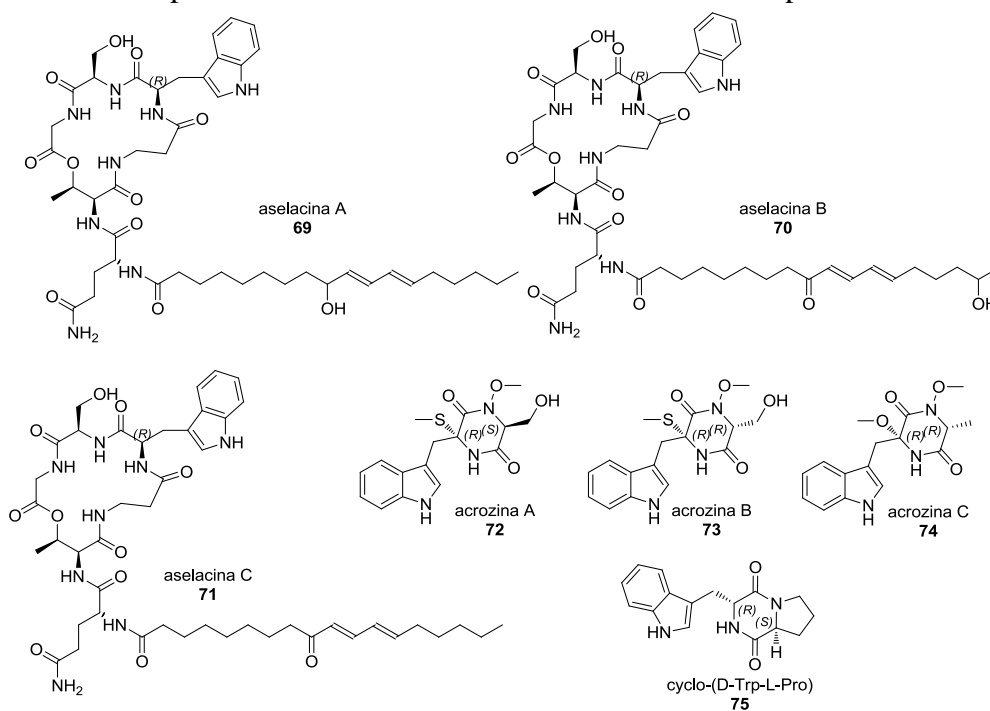


Fonte: A autoria própria.

Busca minuciosa realizada em diferentes bancos de dados, dentre eles o *Dictionary of Natural Products* e *SciFinder*, e literatura especializada, indicaram que o composto **Aa1R2E7-11G4 (68)** encontrado no extrato aquoso das resinas XAD-2,-4,-7 é o primeiro exemplo de uma dicetopiperazina onde uma unidade de triptofano acopla-se com uma unidade de ácido glutâmico, um composto inédito na literatura, com um novo esqueleto de carbono.

As 2,5-dicetopiperazinas são metabólitos secundários comumente encontrados em meio de cultura de fungos endofíticos, com diversas atividades biológicas, tais como citotóxica, antibacteriana, propriedades imunossupressoras e antileishmania (LI et al., 2015; YAN et al., 2019; GUIMARÃES et al., 2010; METWALY, GHONEIM, MUSA, 2015). A biossíntese destes compostos envolve a condensação de dois ou mais aminoácidos, envolvendo normalmente as enzimas do tipo NRPS - peptídeos sintetases não ribossômicas (MOOTZ e MARAHIEL, 1997; ORTEGA et al., 2021). Entretanto, o isolamento da ciclo-(D-Trp-L-Glu) é de grande interesse estrutural, uma vez que apenas dois exemplos de peptídeos fúngicos contendo um resíduo D-Trp foram relatados, as aselacinas, lipopeptídeos isolados de *Acremonium* sp. (HOSHLOWSKI et al., 1994), acrozinas A-C isoladas do fungo *Acrostalagmus luteoalbus* TK-43, espécie endofítica à alga marinha *Codium fragile* (CAO et al., 2019) e a ciclo-(D-Trp-L-Pro) encontrada em culturas da bactéria endofítica *Bacillus stratosphericus* LW-03 (KHAN et al., 2020).

Figura 40 - Exemplos de metabólitos secundários contendo D-Triptofano.



Fonte: Autoria própria.

Em testes para determinação da atividade citotóxica conduzidos pela Dr^a. Joanna Burdette (University of Illinois), utilizando-se células normais de câncer de ovário humano (OVCAR3), foi possível determinar a atividade antiproliferativa da dicetopiperazina ciclo(D-Trp-Glu) (**68**) apresentando IC₅₀ de 1,120 µM.

Tabela 9 -Dados de RMN de ¹H (500 MHz) e ¹³C (150,9 MHz) para a composto **Aa1R2E7-11G4/ ciclo-(D-Trp-L-Glu) (68)**.

ciclo-(D-Trp-L-Glu)		
Posição	δ_C (ppm)	δ_H (J em Hz)
1 – NH	-	-*
2	175,3	-
3	54,9	4,80 (dd, 9,0; 4,8)
4 – NH	-	-*
5	175,1	-
6	58,2	4,14 (dd, 9,0; 4,5)
7	28,6	3,24 (dd, 14,7; 9,0) 3,44 (dd, 14,7; 5,0)
8	111,3	-
8a	129,1	-
9	119,5	7,60 (dd, 8,1; 1,0)
10	120,2	7,05 (ddd, 8,4; 7,0; 1,0)
11	122,8	7,11 dd (8,0; 1,0)
12	112,6	7,36 (d, 8,0; 1,0)
12a	138,3	-
13 – NH	-	-*
14	124,7	7,14 (s, 1H)
15	26,8	1,89 (m, 1H) 2,30 (m, 1H)
16	30,5	2,10 (m, 2H)
17	182,0	-

*Deslocamento químico não observado.

Fonte: Autoria própria.

1.4.3.1.2. Análise da fração Aa1R2E7-11F

Após purificada por HPLC-UV-MS-ELSD, a fração **Aa1R2E7-11F** apresentou alto grau de pureza. O pico majoritário desta fração apresentou aduto molecular com potássio $[M+K]^+$ em m/z 342.0776 no modo positivo de ionização (**Anexo 15**), indicando a fórmula molecular $C_{15}H_{17}N_3O_4$. O cálculo do índice de deficiência de hidrogênio (IDH) indicou que a estrutura apresenta nove insaturações.

O espectro de RMN de 1H (**Anexo 16-18**) da amostra **Aa1R2E7-11F1** (**76**) evidenciou a presença de hidrogênios característicos de um núcleo indólico pela presença de dois duplos duplos dupletos em δ_H 7,10 (ddd, $J = 8,0; 7,0, 1,0$, H-6), parcialmente sobreposto com o sinal em δ_H 7,11 (s, H-2) e δ_H 7,03 (ddd, $J = 8,0; 7,0; 1,0$, H-5), um duplo duplete em δ_H 7,35 (dd, $J = 8,0; 1,2$, H-7) referente ao hidrogênio do pirrol e um duplo duplete δ_H 7,63 ($J = dd, 8,0; 1,0$, H-4).

Observou-se a presença de dois hidrogênios metínicos, um em δ_H 4,30 (td, $J = 4,1; 4,1; 1,1$, H-9) e outro em δ_H 3,73 (dq, $J = 15,0; 1,2$, H-14). Além de dois duplos dupletos referentes aos hidrogênios diasterotópicos em δ_H 3,49 (dd, $J = 14,6; 4,0$, H-8a) e o hidrogênio δ_H 3,10 (dd, $J = 14,6; 4,5$, H-8b). Além do sinal em δ_H 0,39 (d, $J = 7,1$, H-16) referente à hidrogênios metílicos.

O espectro de RMN de ^{13}C (**Anexo 19**) apresentou ressonância para 15 sinais de carbono, dos quais são oito carbonos aromáticos referentes a um núcleo indólico (δ_C 126,1 C-2, δ_C 109,6 C-3, δ_C 129,5 C-3a, δ_C 120,3 C-4, δ_C 120,4 C-5, δ_C 122,8 C-6, δ_C 112,4 C-7 e δ_C 138,1 C-7a). Além disso, foram observados sinais de duas carbonilas de amida (δ_C 169,8 C-12 e 170,5 C-11), um carbono carboxílico (δ_C 170,9 C-15), dois carbonos metínicos (δ_C 52,0 C-14 e 57,8 C-9), um carbono metilênico (δ_C 31,0 C-8) e finalmente um carbono metílico (δ_C 20,3 C-16).

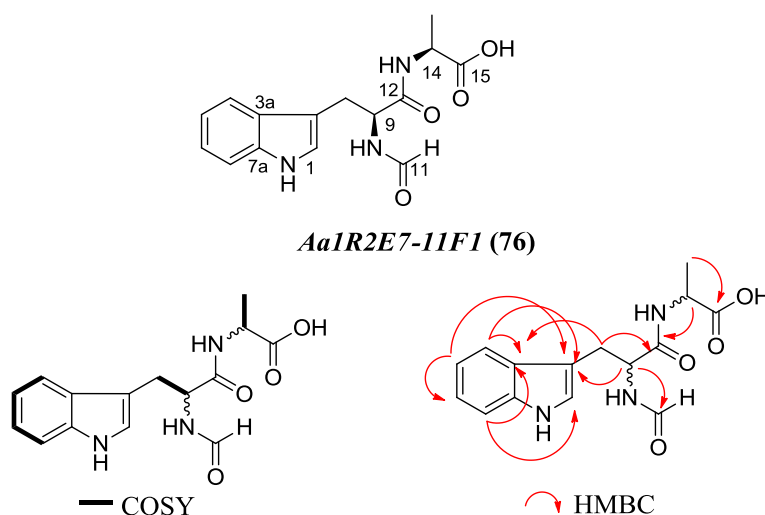
O sistema de di-substituição do anel benzênico foi semelhantemente estabelecido como para a amostra **Aa1R2E7-11G4** (**68**), pelas correlações de COSY dos hidrogênios aromáticos. As posições dos carbonos aromáticos foram atribuídas com base nas correlações destes com os hidrogênios aromáticos presentes no espectro de HMBC (**Anexo 21**). A trissubstituição do anel pirrólico pôde ser fundamentada pela correlação entre o hidrogênio aromático H-2 (δ_H 7,11) com o substituinte metilênico C-8 (δ_C 31,0).

De forma análoga a molécula anterior, foi possível observar correlações a longa distância entre o hidrogênio metínico δ_H 4,30 (H-9) com os carbonos carbonílicos de amida em δ_C 169,8 (C-12) e δ_C 170,5 (C-11). Todavia, a ausência de outro hidrogênio

metínico com deslocamento químico semelhante a H-9 impossibilitou a formação de um anel 2,5-dicetopiperazina. Pelo experimento de HSQC (**Anexo 20**) foi estabelecida a conectividade de um hidrogênio em δ_H 8,58 ligado ao carbono da amida referente ao sinal em δ_C 170,5 (C-11).

A correlação de COSY (**Anexo 22**) entre os hidrogênios metílicos H-16 (δ_H 0,39) e o hidrogênio metínico H-14 (δ_H 3,73) permitiu inferirmos que há presença de um resíduo intacto de alanina estendendo a cadeia já construída após o carbono carbonílico C-12 (δ_C 169,8). Isto pôde ser comprovado pela presença de correlações de HMBC entre o hidrogênio metínico H-14 (δ_H 3,73) tanto com o carbono carbonílico C-12 (δ_C 169,8) e com o carbono carboxílico C-15 (δ_C 170,9). Os espectros mono e bidimensionais da amostra **Aa1R2E7-11F1** podem ser vistos nos anexos.

Figura 41 - Composto **Aa1R2E7-11F1** (**76**), principais correlações de HMBC (setas vermelhas) e COSY (negrito).

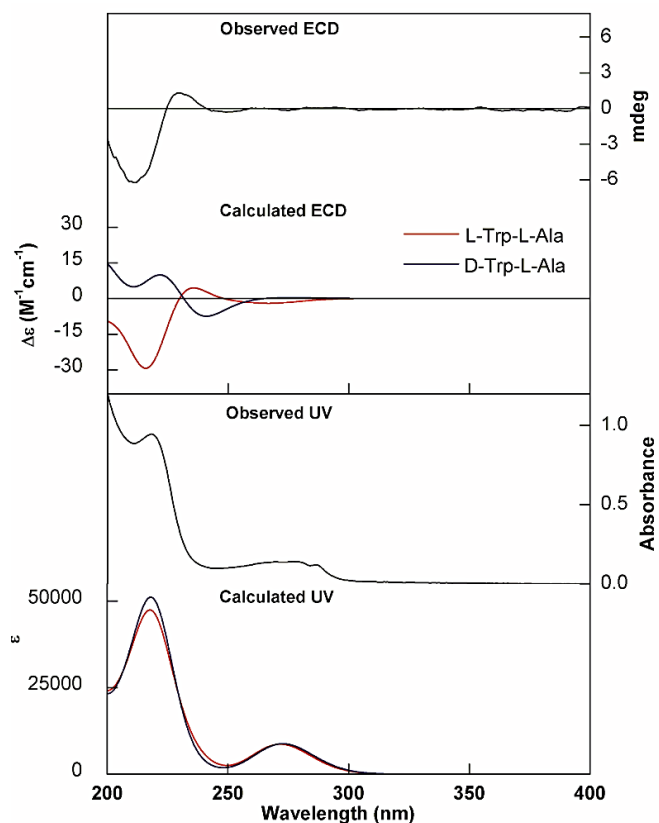


FONTE: Autória própria.

A configuração absoluta dos centros estereogênicos foi realizada por hidrólise e derivatização com o reagente de Marfey. Após análise por UPLC-MS do peptídeo derivatizado em comparação com os padrões dos aminoácidos também derivatizados, foi possível definir o resíduo de alanina como tendo configuração L. A configuração absoluta do resíduo de triptofano novamente não pôde ser definida pela reação de derivatização com o reagente de Marfey (**Anexo 23**). Todavia, utilizando-se de cálculos computacionais de TD-DFT (**Figura 42; Anexos 26-27**) com o professor Dr. João Marcos Batista Junior (UNIFESP), foi possível determinar a configuração do resíduo de triptofano como sendo

também L, assim o composto **Aa1R2E711-F1** foi finalmente definido como formil-L-triptofil-L-alanina (**76**).

Figura 42 - Comparação de espectros experimentais de UV e ECD em MeOH (preto) com espectros calculados pelo programa CAM-B3LYP/PCM(MeOH)/TZVP. Dados experimentais para (+)-formil-L-triptofil-L-alanina versus simulado (9*S*,14*S*)-formil-L-triptofil-L-alanina (vermelho) e (9*R*,14*S*)-formil-D-triptofil-L-alanina (azul).



FONTE: Autoria própria.

A **Tabela 10** apresenta os dados de deslocamentos químicos atribuídos para a estrutura final da formil-L-triptofil-L-alanina (**Aa1R2E711-F1**).

Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (150,9 MHz) para a composto **Aa1R2E7-11F1/ formil-L-triptofil-L-alanina**.

formil-L-triptofil-L-alanina (76)		
Posição	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (J em Hz)
1 – NH	-	-
2	126,1	7,11 (s)
3	109,6	-
3a	129,5	-
4	120,3	7,63 (dd, 8,0; 1,0)
5	120,4	7,03 (ddd, 8,0; 7,0; 1,0)
6	122,8	7,10 (ddd, 8,0; 7,0; 1,0)*
7	112,4	7,35 (dd, 8,0; 1,0)
7a	138,1	-
8	31,0	3,49 (dd, 14,6; 4,0) 3,10 (dd, 14,6; 4,1)
9	57,8	4,30 (td, 4,1; 4,1; 1,1)
10-NH	-	-
11	170,5	8,58 (s)
12	169,8	-
13-NH	-	-
14	52,0	3,73 (dq, 15,0; 1,2)
15	170,9	-
16	20,3	0,39 (d, 7,1)

*A constante *orto* de acoplamento não pôde ser calculada, devido a coalescência com sinal em δ_{H} 7,11 ppm, referente ao hidrogênio indólico.

FONTE: Autoria própria.

1.4.3.1.3. Análise da fração **Aa1R2E7-11F4**

O composto **Aa1R2E7-11F4I** (77) apresentou-se como um pó amorfo incolor. O espectro de massas de alta resolução indicou a fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$ para o composto. Os espectros de massas de alta resolução indicaram a presença de um aduto molecular sodiado $[\text{M}+\text{Na}]^+$ em m/z 273,0857 no modo positivo de ionização (**Anexo 28**), condizente com a fórmula molecular proposta. O cálculo do índice de deficiência de hidrogênio (IDH) indicou que a estrutura apresenta sete insaturações.

O espectro de RMN de ^1H (**Anexo 29-31**) da amostra **Aa1R2E7-11F4I** evidenciou a presença de hidrogênios característicos de um anel aromático *orto*-dissubstituído pela presença de dois duplo duplo dupletos em δ_{H} 7,27 (ddd, $J = 8,4; 7,0$,

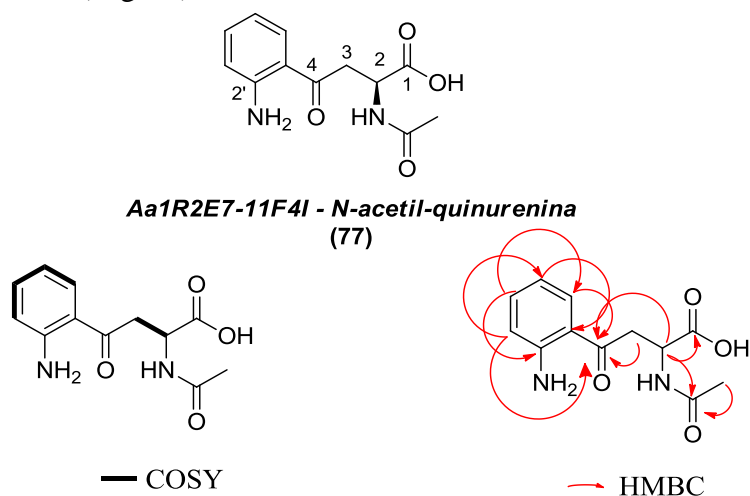
1,4, H-4') e $\delta_{\text{H}} 6,62$ (ddd, $J = 8,4; 7,0; 1,1$, H-5'), e dois duplo dupletos em $\delta_{\text{H}} 7,77$ (dd, $J = 8,1; 1,0$, H-6') e $\delta_{\text{H}} 6,77$ (dd, $J = 8,4; 1,0$, H-3'). Observou-se a presença de um hidrogênio metínico em $\delta_{\text{H}} 4,81$ (dd, $J = 6,5; 4,8$; H-2) e a presença do sinal em $\delta_{\text{H}} 2,0$ (s, H-3") referente à hidrogênios metílicos.

No espectro de RMN de ^{13}C (**Anexo 32**) foi possível observar ressonância para 12 sinais de carbono, dos quais são 6 carbonos aromáticos. Três sinais foram atribuídos a carbonilas, sendo um sinal de carbonila de amida ($\delta_{\text{C}} 172,5$ C-2"), um de carbonila de cetona (200,2 C-4) e uma carboxila ($\delta_{\text{C}} 175,2$ C-11). Além de um carbono metínico ($\delta_{\text{C}} 50,2$ C-2) e um metílico ($\delta_{\text{C}} 23,1$ C-3").

A diss substituição do anel aromático, bem como o posicionamento inequívoco dos hidrogênios aromáticos, puderam ser comprovadas pelas correlações de HMBC (**Anexo 34**) do sinal de hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 7,77$ com os sinais de carbonos em $\delta_{\text{C}} 132,6$ (C-6'), $\delta_{\text{C}} 200,2$ (C-4) e $\delta_{\text{C}} 152,9$ (C-2'). Adicionalmente, as correlações do hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 6,77$ com os sinais de carbonos em $\delta_{\text{C}} 118,3$ (C-1'), $\delta_{\text{C}} 116,4$ (C-5') e os acoplamentos à longa distância com os sinais de carbonos em $\delta_{\text{C}} 200,2$ e $\delta_{\text{C}} 132,6$ (C-6').

O posicionamento dos carbonos carbonílicos foi possível de ser estabelecida em se observando correlações no espectro de HMBC do hidrogênio metínico $\delta_{\text{H}} 4,81$ com os carbonos em $\delta_{\text{C}} 200,2$, $\delta_{\text{C}} 175,2$ (C-1), $\delta_{\text{C}} 172,5$ (C-2") e com o carbono metílico $\delta_{\text{C}} 42,1$ (C-3). Adicionalmente, os hidrogênios metilênicos $\delta_{\text{H}} 3,50$ (H-3a) e $\delta_{\text{H}} 3,61$ (H-3b) também correlacionam-se com o carbono carbonílico $\delta_{\text{C}} 200,2$ (C-4) e o carbono carboxílico em $\delta_{\text{C}} 175,2$ (C-1). Além das correlações a longa distância destes hidrogênios com o carbono aromático $\delta_{\text{C}} 132,6$ (C-6'). Na **Tabela 11** é possível visualizar as atribuições de RMN para esta molécula e os espectros de RMN bidimensionais podem ser verificados nos anexos (**Anexo 33** – HSQC; **Anexo 35** - COSY).

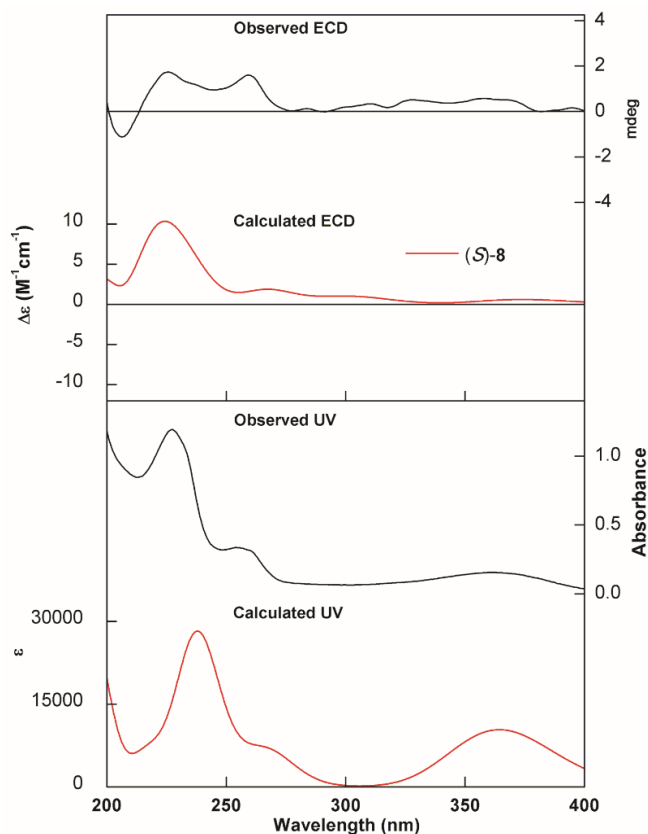
Figura 43 - Composto **Aa1R2E7-11F4I**, principais correlações de HMBC (setas vermelhas) e COSY (negrito).



FONTE: Autoria própria.

A configuração absoluta do composto foi atribuída como *S* por comparação de dados experimentais de ECD com espectros simulados de TD-DFT (**Anexo 39**).

Figura 44 - Comparação de espectros experimentais de UV e ECD em MeOH (preto) com espectros calculados pelo programa CAM-B3LYP/PCM(MeOH)/TZVP. Dados experimentais para (+)-*N*-acetil-quinurenina versus simulado (2*S*)-*N*-acetil-quinurenina (vermelho).



FONTE: Autoria própria.

Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (150,9 MHz) para a composto Aa1R2E7-11-F4I/ (2S)-N-acetil-quinurenina.

Posição	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (J in Hz)
1	175,2	-
2	50,2	4,81 (dd, 6,5; 4,8)
3	42,1	3,50 (dd, 17,4; 4,8) 3,61 (dd, 17,4; 6,4)
4	200,2	-
1'	118,3	-
2'	152,9	-
3'	118,6	6,77 (dd, 8,4; 1,0)
4'	136,6	7,27 (ddd, 8,4; 7,0; 1,4)
5'	116,4	6,62 (ddd, 8,4; 7,0; 1,1)
6'	132,6	7,77 (dd, 8,1; 0,6)
2''	172,5	-
3''	23,1	2,00 (s)

*Não observado.

FONTE: Autoria própria.

A molécula da amostra **Aa1R2E7-11F4I (77)** já é conhecida na literatura como sendo o ácido 2-acetamida-4-(2-aminofenil)-4-oxobutanoíco ou N-acetil-quinurenina. É o principal componente de uma fração denominada LMWF5A (fração de baixo peso molecular do sêrum de albumina humana comercial). Esta fração é obtida a partir de um longo processo de precipitação em EtOH gelado a partir do sêrum de albumina humana (HSA), que posteriormente é pasteurizado. Para a obtenção da fração enriquecida com a N-acetil-quinurenina, a solução pasteurizada de HSA é submetida à uma filtração de fluxo tangencial em uma membrana de difluoreto de polivinilideno (filtração molecular <5000 Da) (BAR-OR et al., 2018).

Embora os dados de RMN ainda não sejam discriminados na literatura para esse composto, os dados de fragmentação de massas já são conhecidos, como pode ser visto abaixo na **Figura 45**. São sugeridas duas rotas diferentes de fragmentação pelos autores. O primeiro onde ocorre a formação da quirunenina (fragmento m/z 209,09) e outro perde a porção aromática da molécula, restando apenas a cadeia lateral alifática ramificada (fragmento m/z 158,04). Os dados relatados por Rael et al., (2018) são condizentes com os encontrados para a amostra **Aa1R2E7-11F4I (Anexo 36)**. Embora os autores não

propuseram, existe ainda um outro fragmento m/z 233,09 referente a perda de uma molécula de água (RAEL et al., 2018).

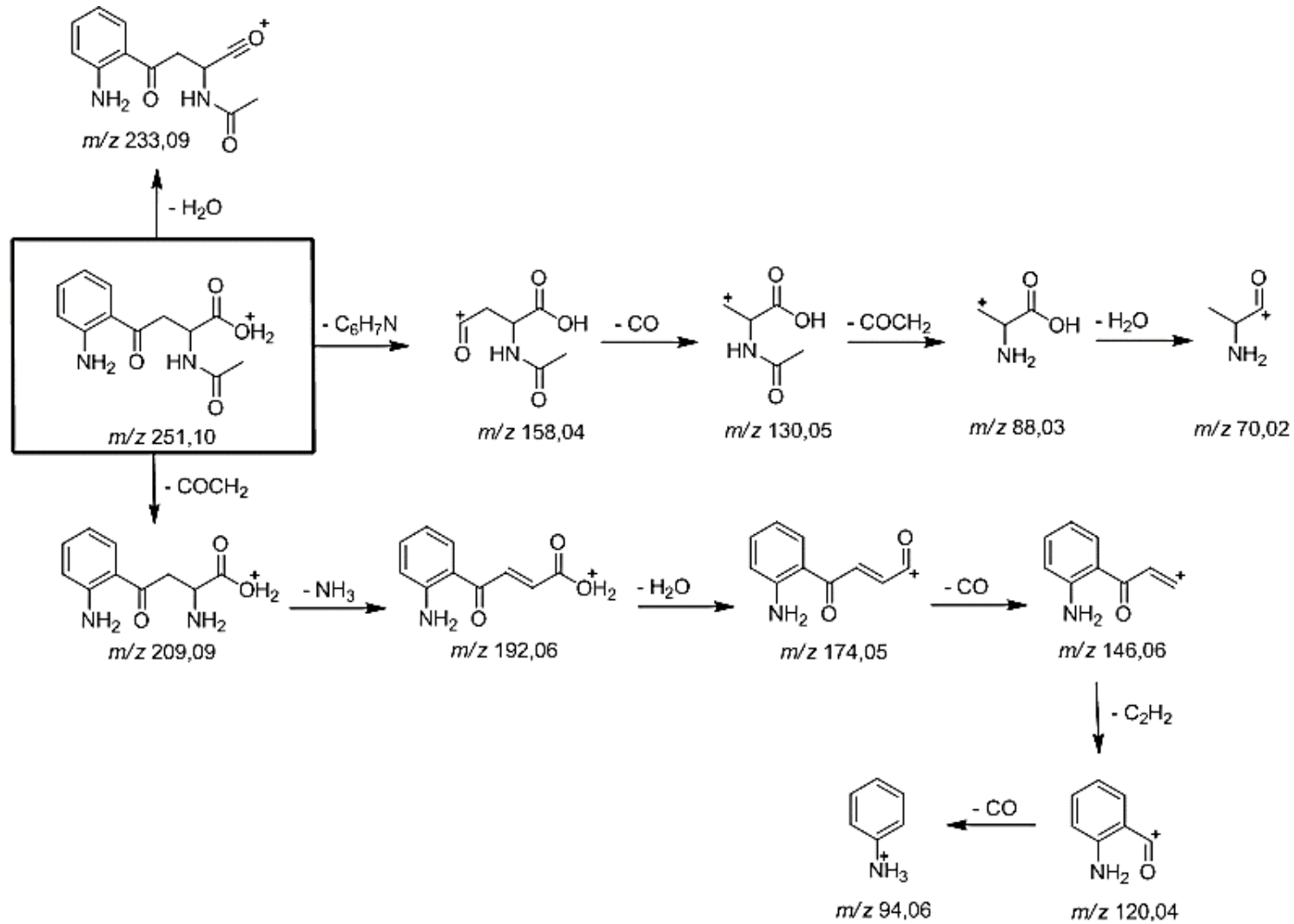
A família das quinureninas é representada pela molécula que leva seu nome, *L*-quinurenina. Consiste em um metabólito de degradação do *L*-triptofano e é utilizado na produção de niacina (ou vitamina B3) (BARAN, JELLINGER, DEECKE, 1999; STONE e DARLINGTON, 2002). A *L*-quinurenina é sintetizada pela enzima triptofano dioxigenase, encontrada principalmente no fígado, e requer a presença da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (WANG et al., 2010) A quinurenina e outros metabólitos correlacionados realizam diversas funções biológicas, e tem sido alvo de diversos trabalhos de síntese orgânica (WANG et al., 2010; ENTRENA et al., 2005; CAMACHO et al., 2002). A *L*-quinurenina possui atividade biológica relacionada a dilatação dos vasos sanguíneos durante a inflamação (WANG et al., 2010), a regulação da resposta imune, e pode estar associados a perda de memória em pacientes com Alzheimer (WANG et al., 2010; NGUYEM et al., 2010).

Como principal componente da LMWF5A, a *N*-acetil-quinurenina possui diversas aplicações biológicas. Destaca-se no tratamento contra dores, inflamações, traumas e sepses. Quando administrada em sucessivas injeções em pacientes com osteoartrite severa do joelho, levou ao alívio de dor e da inflamação (BAR-OR et al., 2018). Recentemente, em testes para determinação da atividade antiproliferativa conduzidos pela Dr^a. Jonna Burdette, utilizando-se células normais de câncer de ovário humano (OVCAR-3), foi possível determinar a atividade antiproliferativa da *N*-acetil-quinurenina isolada do fungo endofítico *Byssochlamys spectabilis* Aa1 com IC₅₀ de 1.073 µM.

Além disso, embora a (*S*)-*N*-acetil-quinurenina (**77**) ainda não tenha sido relatada como um metabólito secundário, a *N*-acetil-quinurenina (sem atribuição de configuração) foi encontrada como um agente protetor solar UV nos olhos do esquilo terrestre *Spermophilus tridecemlineatus* (HAINS et al., 2006). Previamente esta molécula foi relatada em culturas do fungo patogênico *Batrachochytrium dendrobatidis*, causador da quitridiomycose em anfíbios. O fungo tem a capacidade de se instalar na pele de anfíbios adultos, prejudicando o processo respiratório dos animais, levando a morte por parada cardíaca. Quando o fungo se instala ainda na fase de girino, o patógeno dificulta a alimentação e compromete o crescimento. É considerado uma das maiores ameaças relacionada à extinção de anfíbios em todo o mundo. Aqui no Brasil, pelo menos 50 espécies de anfíbios possuem suas populações afetadas pelo fungo *B. dendrobatidis*, sendo que dentre delas 38 sofreram grande declínio e 12 foram completamente extintas.

Algumas populações mostram indícios de uma lenta recuperação, enquanto outras permanecem desaparecidas (SCHEELE et al., 2019). Além disso quando testadas conjuntamente, a quinurenina e a metil-tioadenosina inibiram significativamente a sobrevivência e a proliferação de linfócitos anfíbios, sugerindo que esses compostos são os metabólitos tóxicos que afetam a sobrevivência dos anfíbios (ROLLINS-SMITH et al., 2015).

Figura 45 - Rota de fragmentação da *N*-acetil-quinurenina proposta por RAEL et al. (2018), com modificação.



Análise física dos compostos isolados de *B. spectabilis* Aa1

Ciclo-(D-Trp-L-Glu) (68). pó amorfo; $[\alpha]_D^{24} +81.33$ (*c* 0.15, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} nm (log ϵ) 220 (2,11), 280 (1,40), 290 (1,34), IF 2950, 2835, 2036, 1673, 1440, 1415, 1120, 1030, 670 cm^{-1} ; HRESITOFMS m/z 314,1140 [M - H]⁻ (calculado C₁₆H₁₇N₃O₄, 314,1146).

Formil-L-triptofil-L-alanina (76). Oléo amarelado; $[\alpha]_D^{24} +2.22$ (*c* 0.10, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} nm (log ϵ) 220 (2,45), 280 (1,72), 290 (1,66), IF ν_{\max} 2945, 2828, 2590, 2510, 1673, 1452, 1406, 1115, 1037 cm^{-1} ; ¹HRESITOFMS m/z 342,0846 [M + K]⁺ (calculado C₁₅H₁₇N₃O₄, 342,0842).

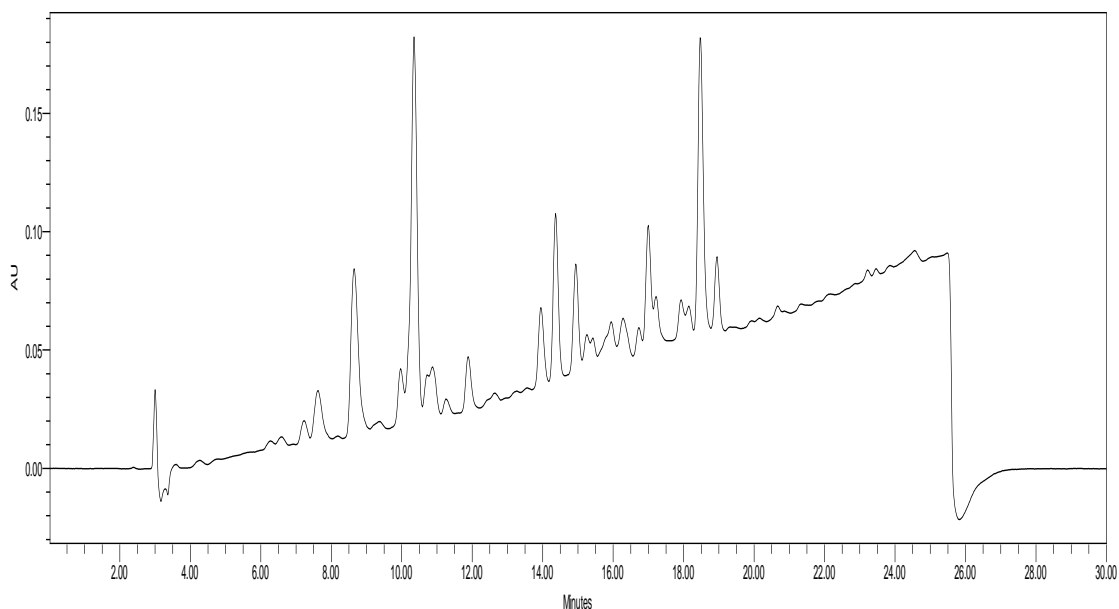
(2S)-N-acetil-quinurenina (77). Oléo amarelado; $[\alpha]_D^{24} +97.62$ (*c* 0.21, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} nm (log ϵ) 228 (1,84), 257 (1,37), 365 (1,06), IF ν_{\max} 2938, 2828, 2594, 2523, 2043, 1660, 1460, 1406, 1024 cm^{-1} ; HRESITOFMS m/z 273,0855 [M + Na]⁺ (calculado C₁₂H₁₄N₂O₄, 273,0846).

1.4.4. Análise do perfil químico da linhagem SDC28

O fungo **SDC28** foi isolado de amostras de sedimentos coletadas na zona crepuscular dentro da caverna Catão, estado da Bahia, Brasil (PAULA et al., 2019; PAULA et al., 2016; GUBIANI et al., 2022). E teve seu gênero identificado utilizando dois marcadores genéticos de identificação (β -tubulina). A análise da árvore filogenética sugeriu que esse fungo provavelmente pertence a uma nova espécie. O fungo é mantido no acervo do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar, São Carlos, SP, Brasil) e depositado na Coleção Brasileira de Microrganismos Ambientais e Industriais sob o número de acesso CBMAI 1926. A sequência da β -tubulina usado para identificar a cepa foi depositado no GenBank (MF134413). Nas figuras abaixo podemos observar o comportamento cromatográfico do extrato acetato de etila obtido a partir do fungo *Aspergillus* sp., quando o mesmo foi submetido a separação cromatográfica em coluna pré-empacotada de com sílica gel derivatizada com grupos cianopropila.

Figura 46 - Cromatograma da fração **SDC28M1** em 240 nm.

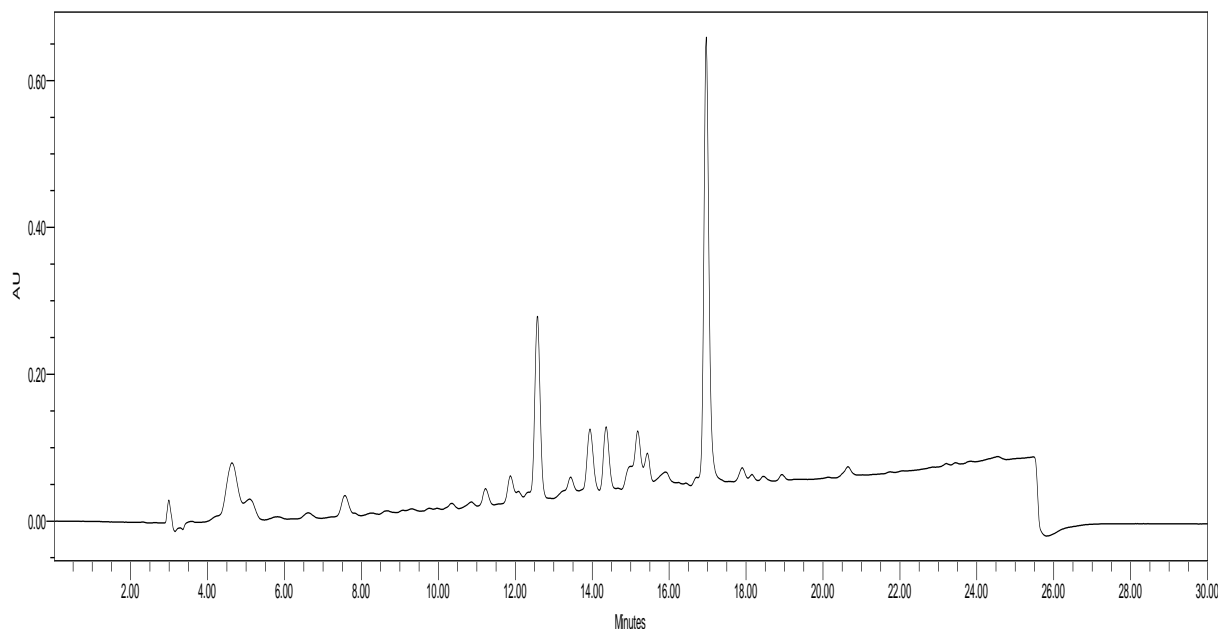
Condição: coluna X-Terra RP 18 (4,6 x 250 mm; 5 μ m; 1 mL min⁻¹), $\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm e gradiente de eluição de MeOH/MeCN em H₂O (0,1% de ácido fórmico): 0-1 min 10% MeOH/MeCN, 1-21 min de 10% à 100% de MeOH/MeCN, 21-23 min 100% de MeOH/MeCN, 23-30 min condição inicial.



FONTE: Autoria própria.

Figura 47 - Cromatograma da fração **SDC28M2** em 240 nm.

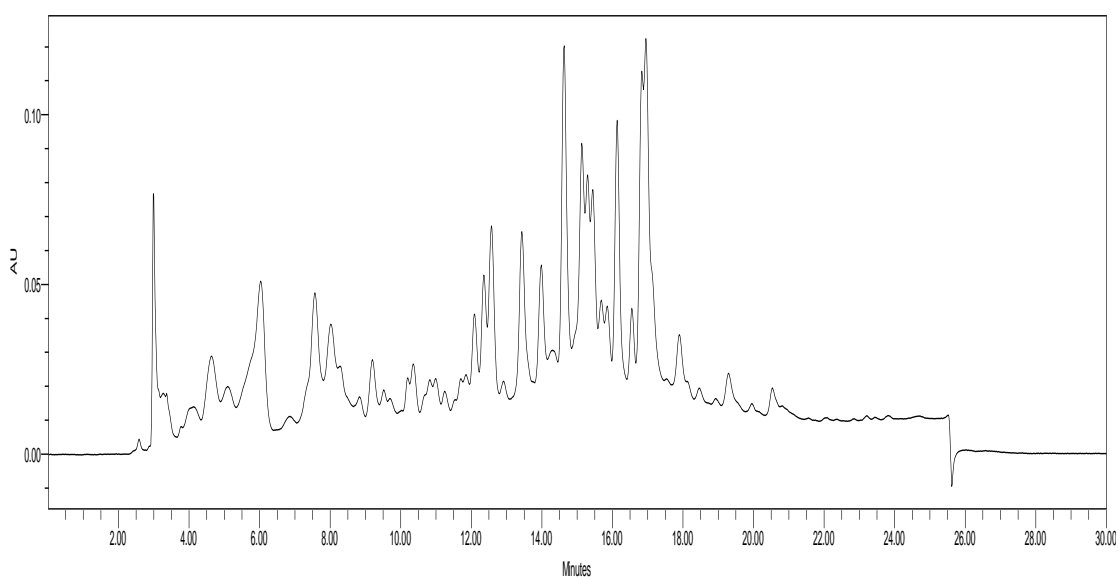
Condição: coluna X-Terra RP 18 (4,6 x 250 mm; 5 μ m; 1 mL min⁻¹), $\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm e gradiente de eluição de MeOH/MeCN em H₂O (0,1% de ácido fórmico): 0-1 min 10% MeOH/MeCN, 1-21 min de 10% à 100% de MeOH/MeCN, 21-23 min 100% de MeOH/MeCN, 23-30 min condição inicial.



FONTE: Autoria própria.

Figura 48 - Cromatograma da fração **SDC28M3** em 240 nm.

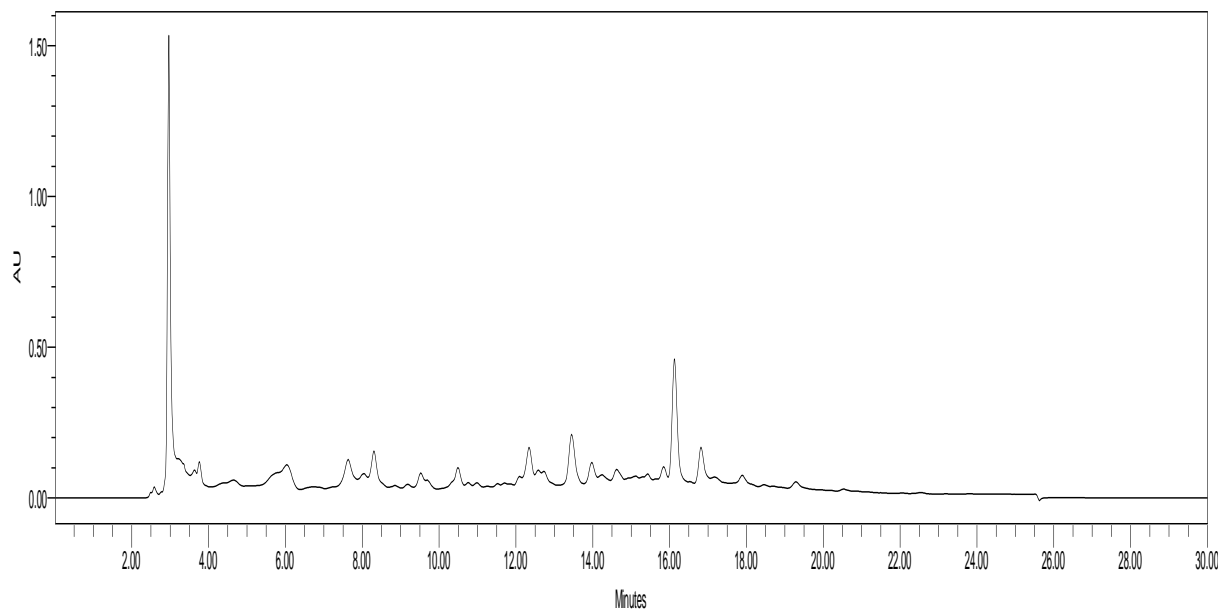
Condição: coluna X-Terra RP 18 (4,6 x 250 mm; 5 μ m; 1 mL min⁻¹), $\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm e gradiente de eluição de MeOH/MeCN em H₂O (0,1% de ácido fórmico): 0-1 min 10% MeOH/MeCN, 1-21 min de 10% à 100% de MeOH/MeCN, 21-23 min 100% de MeOH/MeCN, 23-30 min condição inicial.



FONTE: Autoria própria.

Figura 49 - Cromatograma da fração **SDC28M4** em 240 nm.

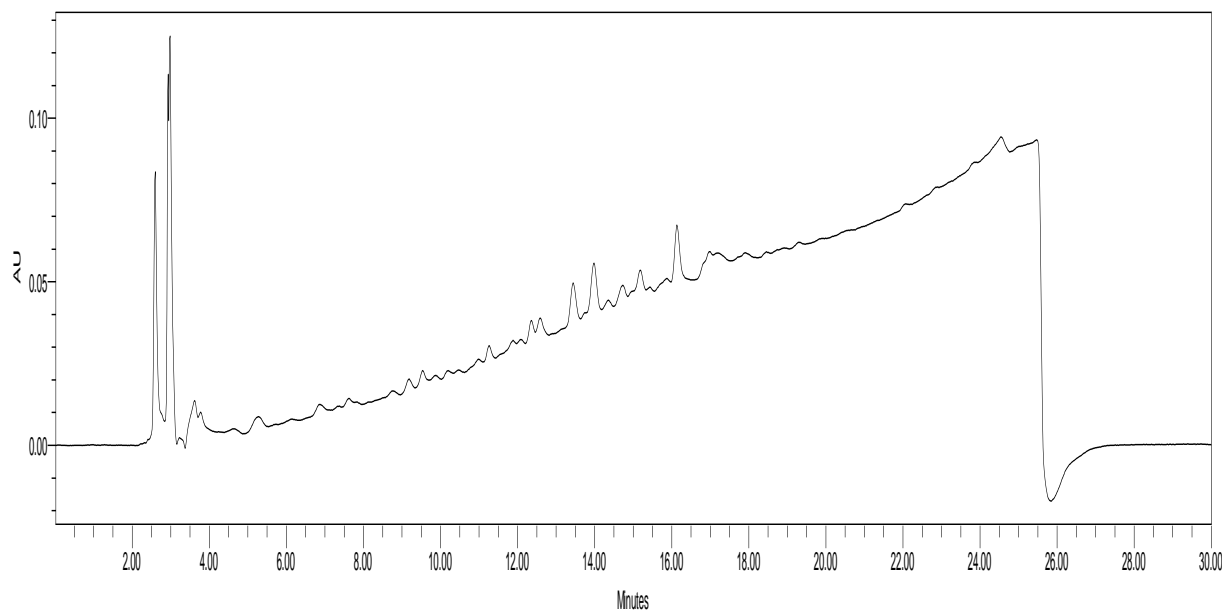
Condição: coluna X-Terra RP 18 (4,6 x 250 mm; 5 μ m; 1 mL min⁻¹), $\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm e gradiente de eluição de MeOH/MeCN em H₂O (0,1% de ácido fórmico): 0-1 min 10% MeOH/MeCN, 1-21 min de 10% à 100% de MeOH/MeCN, 21-23 min 100% de MeOH/MeCN, 23-30 condição inicial.



FONTE: Autoria própria.

Figura 50 - Cromatograma da fração **SDC28M5** em 240 nm.

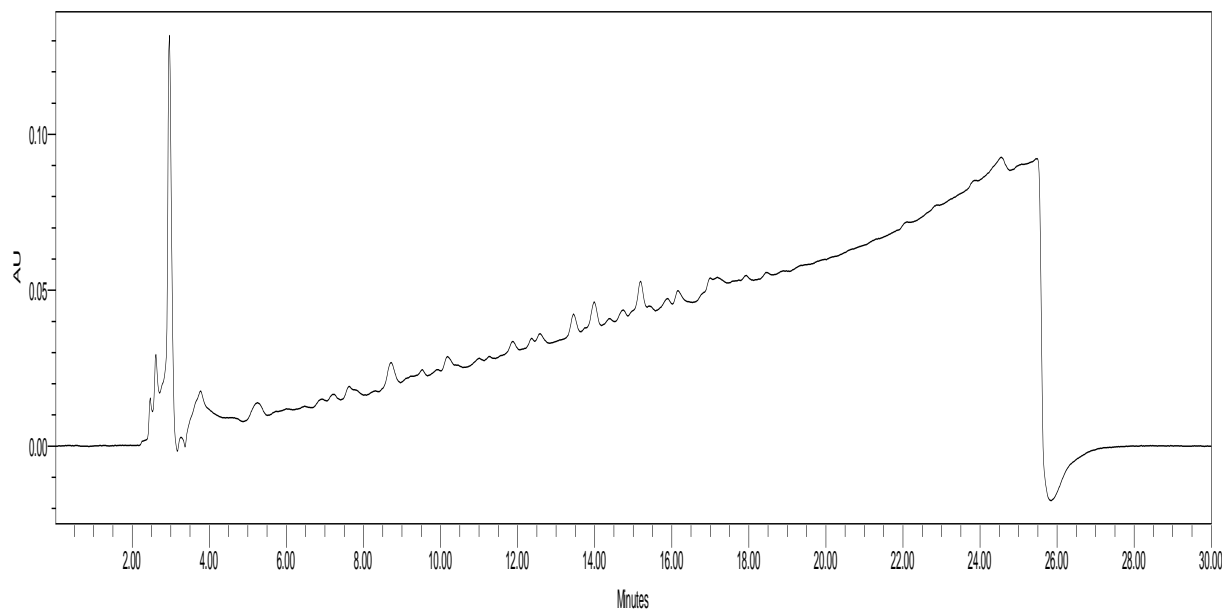
Condição: coluna X-Terra RP 18 (4,6 x 250 mm; 5 μ m; 1 mL min⁻¹), $\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm e gradiente de eluição de MeOH/MeCN em H₂O (0,1% de ácido fórmico): 0-1 min 10% MeOH/MeCN, 1-21 min de 10% à 100% de MeOH/MeCN, 21-23 min 100% de MeOH/MeCN, 23-30 condição inicial.



FONTE: Autoria própria.

Figura 51 - Cromatograma da fração **SDC28M6** em 240 nm.

Condição: coluna X-Terra RP 18 (4,6 x 250 mm; 5 μ m; 1 mL min⁻¹), $\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm e gradiente de eluição de MeOH/MeCN em H₂O (0,1% de ácido fórmico): 0-1 min 10% MeOH/MeCN, 1-21 min de 10% à 100% de MeOH/MeCN, 21-23 min 100% de MeOH/MeCN, 23-30 condição inicial.

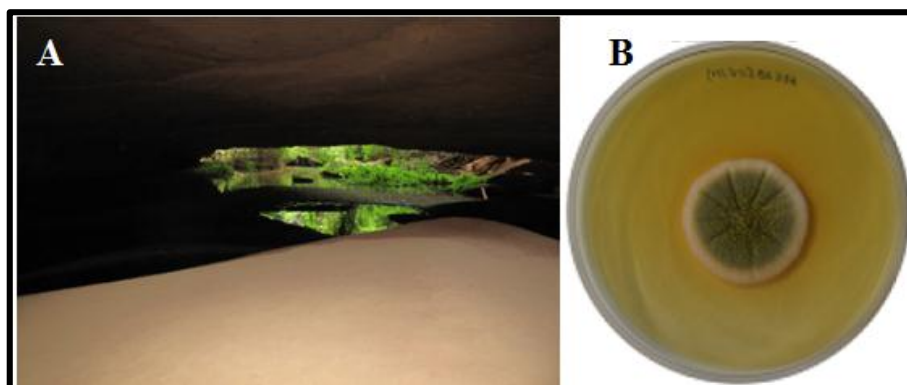


FONTE: Autoria própria.

1.4.4.1. Isolamento dos metabólitos secundários produzidos pela linhagem isolada de solo de caverna *Aspergillus* sp. SDC28

Devido a relevância biológica encontrada nos extratos de *Aspergillus* sp. SDC28, o estudo químico objetivando o isolamento de metabólitos secundários foi realizado com a combinação das frações denominadas **SDC28M3**, **SDC28M4** e **SDC28M5**. A seguir pode-se visualizar uma fotografia da caverna do Catão (**A**), bem como as características morfológicas do fungo em cultura única (**B**).

Figura 52 - (A) Imagem da área amostrada da zona de penumbra da Gruta do Catão. (B) Aparência morfológica de *Aspergillus* sp. SDC28.



FONTE: Autoria própria.

1.4.4.1.1. Análise das frações SDC28M35-257EF4 e SDC28M35-23B

O composto (**78**) foi isolado de diversas frações (**SDC28M35-257EF5**, **SDC28M35-2889B**, **SDC28M35-302FG5** e **SDC28M35-302FG7**), como um pó amorfo alaranjado e seu espectro de massas de alta resolução apresentou um íon molecular desprotonado $[M - H]^-$ com razão massa carga m/z 339.0506, correspondente à fórmula molecular $C_{18}H_{12}O_7$ (**Anexo 40**). O cálculo do índice de deficiência de hidrogênio (IDH) indicou que a estrutura apresenta treze insaturações. A análise dos espectros de ressonância magnética nuclear unidimensional de 1H , ^{13}C (**Anexo 41-42**) e bidimensional HSQC (**Anexo 43**) apresentou dois grupos metileno sp^3 δ_H 4,10/3,50 (t, $J = 8,0$, m; δ_C 67,2, CH_2-3') e δ_H 2,18 (m; δ_C 30, 4, CH_2-4'), bem como dois sinais de hidrogênios sp^3 metínicos δ_H 4,14 (m; δ_C 43,5, $CH-2'$) e δ_H 6,54 (d, $J = 5,7$; δ_C 113,5, $CH-1'$), indicando a presença de um anel furano substituído. Foram observados ainda sinais para três hidrogênios sp^2 metínicos δ_H 6,60 (d, $J = 2,3$; δ_C 109,1, $CH-7$), δ_H 7,10 (d, $J = 2,3$; δ_C 108,7, $CH-5$) e δ_H 7,09 (s; δ_C 101,6, $CH-4$) e dois carbonos carbinólicos em δ_C 181,2 (C-10) e δ_C 189, 4 (C-9), bem como nove carbonos quaternários sp^2 δ_C 159,2 (C-1), δ_C 120,4 (C-2), δ_C 165,6 (C-3), δ_C 135,7 (C-4a), δ_C 165,5 (C-6), δ_C 164,5 (C-8), δ_C 108,3 (C-8a), δ_C 111,1 (C-9a) e δ_C 135,1 (C-10a). Os espectros de RMN de 1H e ^{13}C indicam que o composto possui um esqueleto de antraquinona.

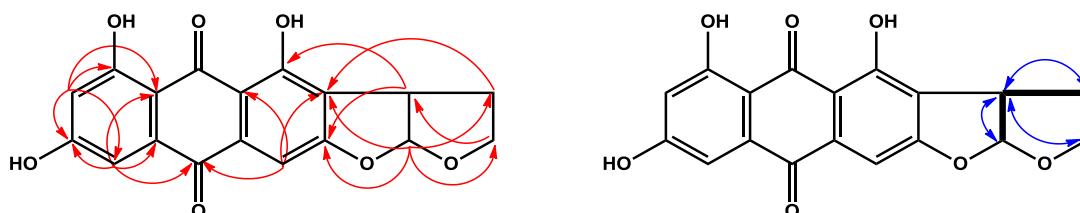
O padrão 1,3,4,5-tetrasubstituído do esqueleto da antraquinona pôde ser baseado nos sinais de hidrogénios em δ_H 6,60 (d, $J = 2,3$; δ_C 109,1, $CH-7$) e δ_H 7,13 (d, $J = 2,3$; δ_C

108,7, CH-5). O espectro de correlação HMBC (**Anexo 44**) mostrou interações entre H-5 e C-8a, C-10 e C-10a; e entre H-7 e C-8a, estabelecendo assim a conectividade entre o benzeno 1,3,4,5-substituído e a porção quinona. Esta conectividade também pôde ser comprovada pelas correlações observadas no espectro de HMBC com base nos sinais do hidrogênio em δ_H 7.09 (s; δ_C 101,6, CH-4). Foram observadas correlações de HMBC entre H-4 e C-2 (δ_C 120,4), C-3 (δ_C 165,6), C-4a (δ_C 135,7), C-9a (δ_C 111,1), e C-10 (δ_C 181,2), indicando a conectividade entre as duas porções da molécula.

A análise do espectro de correlação COSY (**Anexo 45**) construíram o sistema de spin CH₂-CH₂-CH-CH do hidrogênio δ_H 4,10/3,50 (δ_C 67,2, CH₂-3'), δ_H 2,18 (m; δ_C 30,4, CH₂-4'), δ_C 4,14 (m; δ_C 43,7, CH-2') e δ_H 6,54 (d, J = 5,7; δ_C 113,5 CH-1') indicando a presença de dois anéis furanos. Esta porção da estrutura foi confirmada pelo espectro de correlação de HMBC, que mostrou correlações entre o hidrogênio H-1' e os carbonos C-2', C-3' e C-4', bem como entre o hidrogênio H-2' e os carbonos C-3' e C-4', correlações entre H-3' e os carbonos C-1' e C-2', bem como entre o hidrogênio H-4' e os carbonos C-1', C-2' e C-3'. Os picos cruzados de HMBC observados entre o hidrogênio H-1' com o carbono C-3, hidrogênio H-2' com os carbonos C-1, C-2 e C-3, e entre o hidrogênio H-4' com o carbono C-2, possibilitaram a ligação dos dois anéis furano com a porção de benzeno 1,2,3,4,5-substituído.

As constantes de acoplamento entre os hidrogênios H-1' e H-2' (J = 5,7 Hz) e as correlações NOESY (**Anexo 46**) destes dois hidrogênios revelaram uma fusão cis entre os dois anéis furano. Permitiu a atribuição da estereoquímica relativa em C-1' e C-2' como (*S**, *R**). A análise de todos estes dados confirmam a estrutura do composto isolado como a versicolorina C.

Figura 53 - Correlações HMBC (setas vermelhas), COSY (negrito) e NOESY (setas azuis) observadas para a versicolorina C (**78**).



FONTE: GUBIANI et al., 2022.

O composto (**79**) foi isolado também em diversas frações (**SDC28M35-24F**, **SDC28M35-24G**, **SDC28M35-257EF2**, **SDC28M35-302B5** e **SDC28M35-302B4**), como um pó amorfo alaranjado, apresentando um íon molecular desprotonado $[M - H]^-$ de razão massa carga de m/z 361,0926, correspondente à uma fórmula molecular $C_{18}H_{16}O_8$ (**Anexo 49**). O cálculo de índice de deficiência de hidrogênio foi obtido onze insaturações. A análise dos espectros de ressonância magnética nuclear 1H , ^{13}C e HSQC (**Anexos 50-52**), revelou sinais de dois carbonos carbonílicos, nove carbonos quaternários sp^2 , três carbonos metínicos sp^2 , um metínico sp^3 e três agrupamentos metilênicos sp^3 .

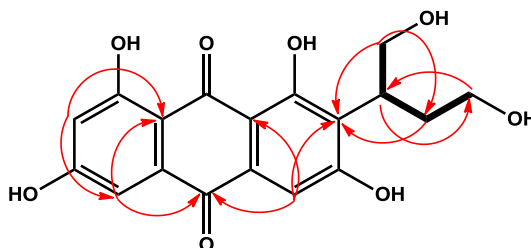
A análise dos espectros 1H e os mapas de contorno HMBC (**Anexo 53**) e COSY (**Anexo 54**) indicaram também a presença de uma unidade de benzeno 1,3,4,5-tetrasubstituído e outra unidade de benzeno 1,2,3,4,5-pentasubstituído. Foram observados sinais de hidrogênios metínicos ressonando em δ_H 7,06 (d, $J = 2,2$; C 108,9, CH-5) e δ_H 6,54 CH-7 (d, $J = 2,2$; C 108,0, δ_H 6,54). O espectro de correlações HMBC mostrou correlações entre o hidrogênio H-5 e os carbonos C-6 (C 165,2), C-8a (C 108,7), C-10 (C 181,4) e C-10a (C 135,1), e entre o hidrogênio H-7 e os carbonos C-5, C-6, C-8 (C 164,3) e C-8a. Este padrão de substituição permitiu a construção da porção de benzeno 1,3,4,5-tetrasubstituído.

Foram observados correlações cruzadas de HMBC entre o hidrogênio H-4 (H 7,17) e os carbonos C-2 (C 123,0), C-3 (C 163,6), C-4a (C 132,3), C-9a (C 108,4) e C-10 (C 181,4), indicando a presença de um benzeno 1,2,3,4,5-pentasubstituído e a presença dos sinais dos carbonos carbonílicos em δ_C 189,2 (C-9) e δ_C 181,4 (C-10) sugeriram a presença de um anel quinona. O posicionamento dos anéis benzênicos substituídos foram atribuídos devido as correlações de HMBC entre os hidrogênios H-4 e H-5 com o carbono C-10, indicando que a porção quinona está fundida à ambos anéis aromáticos substituídos.

A presença de correlações cruzadas entre hidrogênios no espectro de COSY permitiram o estabelecimento do sistema de spin $CH_2-CH-CH_2-CH_2$ entre os hidrogênios δ_H 3,73 (m; δ_C 62,9, CH_2-1'), δ_H 3,48 (m; δ_C 35,4, $CH-2'$), δ_H 1,93 (m; δ_C 32,7, CH_2-3') e δ_H 3,30 (m; δ_C 60,2 CH_2-4'). Esta porção alifática do composto foi confirmada pelas correlações cruzadas presentes no espectro HMBC, que mostrou correlações entre o hidrogênio H-1' e os carbonos C-2' e C-3', bem como dos hidrogênio H-2' com os carbonos C-1' e C-4', entre o hidrogênio H-3' e os carbonos C-1', C-2' e C-4', bem como do hidrogênio H-4' e os carbonos C-2' e C-3'. As correlações de HMBC observados entre os hidrogênios H-1' e H-3' com o carbono C-2, permitiram a ligação do sistema de spin

alifático ao grupo benzeno 1,2,3,4,5-substituído. A análise dos espectros de RMN permitiram a identificação do composto como sendo a versiconol.

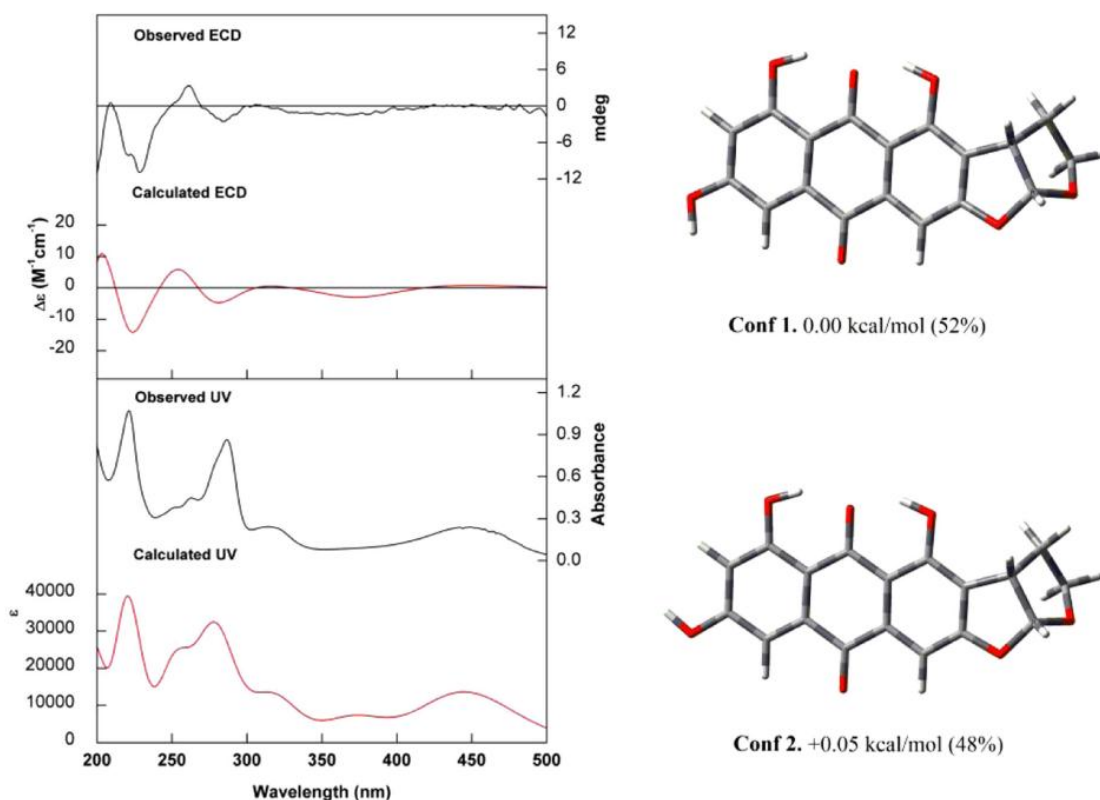
Figura 54 - Correlações HMBC (setas vermelhas) e COSY (negrito) observadas para o versiconol (**79**).



FONTE: GUBIANI et al., 2022

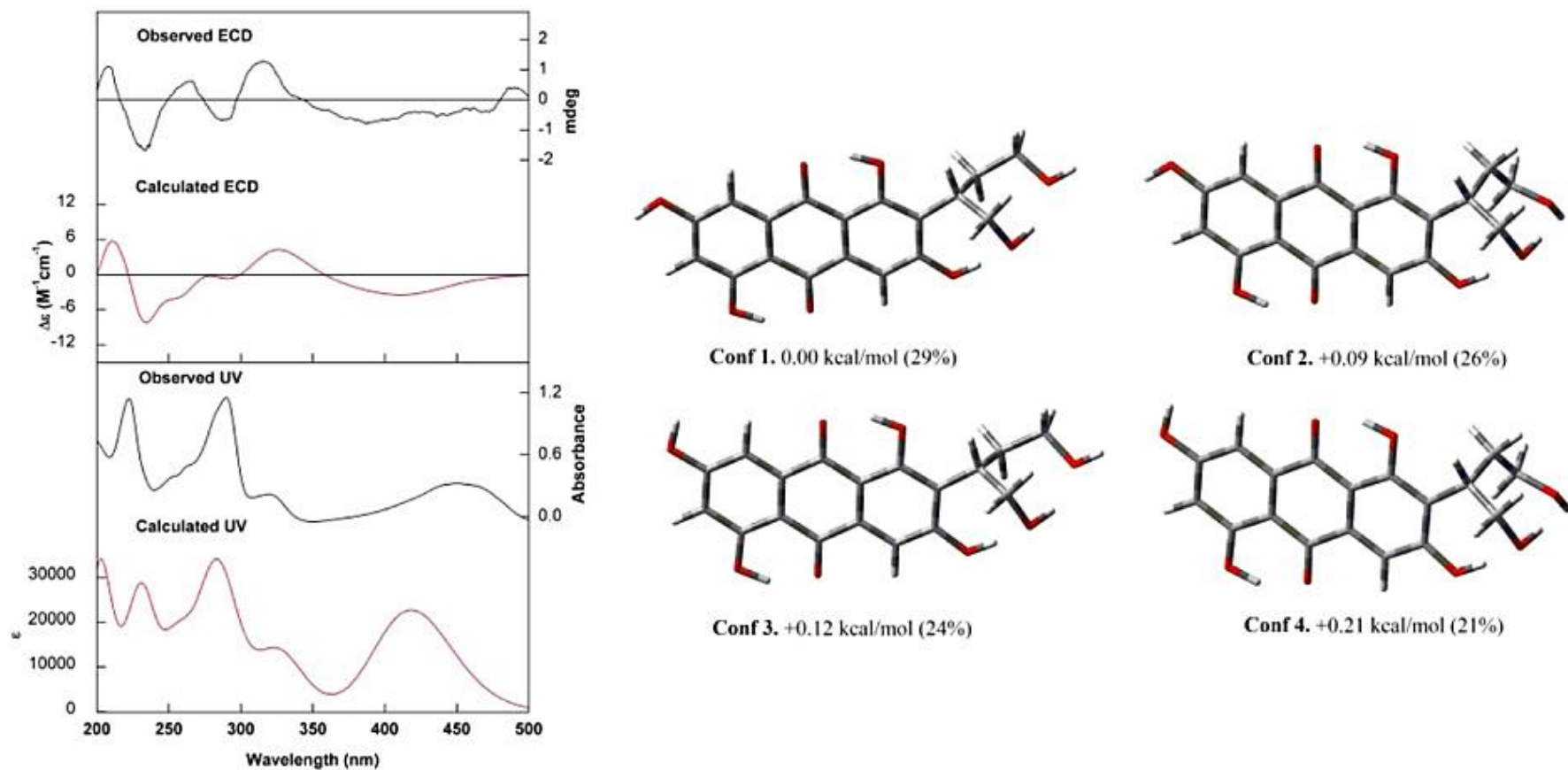
A determinação inequívoca dos centros estereogênicos da versicolorina C (**78**) e versiconol (**79**), foi realizada em colaboração com o professor Dr. João Marcos Batista da Universidade Federal de São Paulo. Comparações de dados experimentais e simulados de ECD usando a teoria funcional de densidade (DFT) foram realizadas para determinar a configuração absoluta de ambas as antraquinonas isoladas. Os espectros experimentais de ECD foram obtidos em MeOH. Os cálculos dos espectros de ECD teóricos foram realizados através de CAM-B3LYP/PCM(MeOH)/TZVP//B3LYP/PCM(MeOH)/6-31G(d) para ambos os compostos. Uma vez que a configuração parcial na fusão do anel da versicolorina C foi estabelecida por análise de RMN, os cálculos foram efetuados apenas para o composto com configuração $1'S,2'R$. O espectro do seu enantiômero foi obtido simplesmente multiplicando o espectro de ECD calculado para $1'S,2'R$ por (-1). A concordância entre os dados de UV/ECD observados e simulados, levou à atribuição dos compostos como (-)-versicolorina C (**78**) como $1'R,2'S$ (**Anexo 48**) e (-)-versiconol (**79**) como $2'S$ (**Anexos 56-57**).

Figura 55 - (Esquerda) Comparação dos espectros experimentais de UV e dicroísmo circular eletrônico (ECD) de (-)-versicolorina C em MeOH (preto) com os espectros calculados (CAM-B3LYP/PCM(MeOH)/TZVP, vermelho) para (1'*R*,2'*S*)-versicolorina C. (Direita) Estruturas otimizadas, energias relativas e populações de Boltzmann dos confôrmeros de energia mais baixa identificados para (1'*R*,2'*S*)-versicolorina C pelo B3LYP/PCM(MeOH)/6-31G(d).



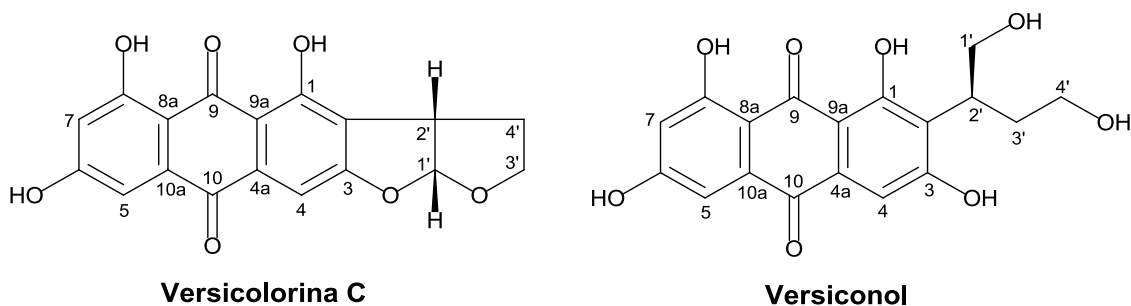
FONTE: GUBIANI et al., 2022

Figura 56 - (Esquerda) Comparação dos espectros experimentais de UV e dicroísmo circular eletrônico (ECD) do (-)-versiconol em MeOH (preto) com espectros calculados (CAM-B3LYP/PCM(MeOH)/TZVP, vermelho) para (2'S)-versiconol. (Direita) Estruturas otimizadas, energias relativas e populações de Boltzmann dos confôrmeros de menor energia identificados para (2'S)-versiconol no B3LYP/PCM(MeOH)/6-31G(d).



FONTE: GUBIANI et al., 202

Figura 57 - Estruturas finais dos compostos versicolorina C (**78**) e versiconol (**79**) isolados de *Aspergillus* sp. SDC28.



FONTE: GUBIANI et al., 2022

Tabela 12 - Dados de RMN para os compostos isolados de *Aspergillus* sp. SDC28 em DMSO- d_6 .

Posição	Versicolorina C (78)		Versiconol (79)	
	δ_C (ppm)	δ_H (J em Hz)	δ_C (ppm)	δ_H (J em Hz)
1	159,2		163,2	
2	120,4		123,0	
3	165,6		163,6	
4	101,6	7,09 (s)	108,8	7,17 (s)
4a	135,7		132,3	
5	108,9	7,13 (d, 2,3)	108,9	7,06 (d, 2,2)
6	165,2		165,2	
7	109,1	6,60 (d, 2,3)	108,2	6,54 (d, 2,2)
8	164,5		164,3	
8a	108,3		108,7	
9	189,4		189,2	
9a	111,1		108,4	
10	181,2		181,4	
10a	135,1		135,1	
1'	113,5	6,54 (d, 5,7)	62,9	3,73 (m)
2'	43,7	4,14 (t, 7,0)	35,0	3,48 (m)
3'	67,4	4,10 (t, 8,0); 3,50 (m)	32,7	1,93 (m)
4'	30,4	2,17 (m)	60,2	3,30 (m)

FONTE: Gubiani et al., 2022.

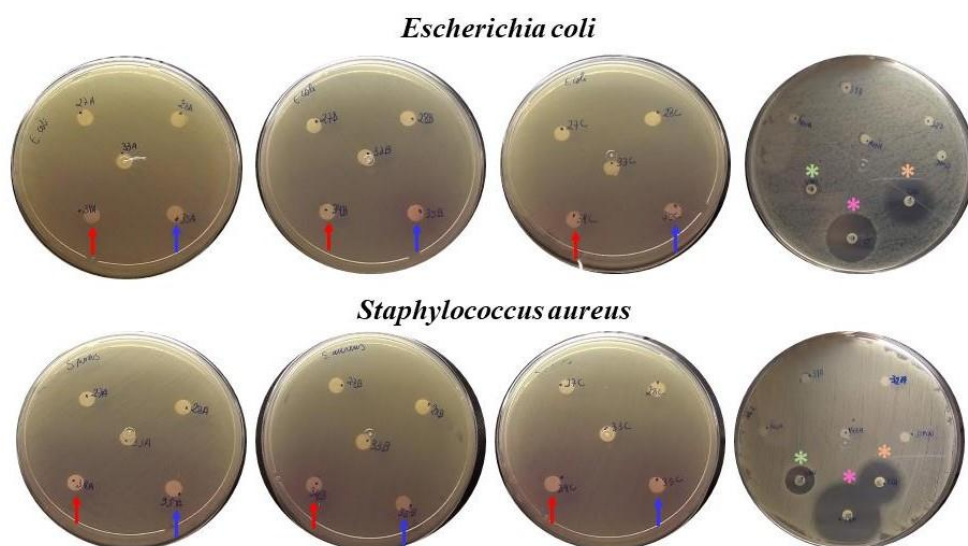
Versicolorin C (**78**) e versiconol (**79**) são pigmentos encontrados em diversos fungos filamentosos e estão relacionados à biossíntese da aflatoxina em diversas espécies de fungos do gênero *Aspergillus*: *A. versicolor*, *A. parasiticus*, *A. sp. F40*, *A. ustus* e *A. nidulans* (FUKUYAMA et al., 1975; SCHABORT e ROBERTS, 1971; SHIER et al., 2005; KOZLOVSKII et al., 2017; STEYN et al., 1979; PETERSEN et al., 1995; LEE et al., 2010; TIAN et al., 2018; YAE, ANDO, HAMASAKI, 1991; GRAU et al., 2019; HATSUDA et al., 1969; YABE e NAKAJIMA, 2004). A descoberta do grupo de aflatoxinas começou após infestações de diversos tipos de culturas de grãos pós-colheita em meados de 1960. A doença foi chamada de doença “X” dos perus e acabou sendo atribuída a uma farinha brasileira de amendoim importada pela Inglaterra. O primeiro relato do isolamento de aflatoxina é proveniente da farinha de amendoim que estava contaminada com o fungo *Aspergillus flavus* (RICHARD, 2008).

Os dados espectroscópicos como medidas de UV-VIS, RMN de ^{13}C e de relação m/z destes compostos estão em concordância com os dados reportados pela literatura específica (HAMASAKI et al., 1965; HAMASAKI et al., 1967; COX et al., 1977; STEYN et al., 1979; SCHABORT e ROBERTS, 1971; FUKUYUMA et al., 1975; SHIER et al., 2005).

A versicolorina C (**78**) e versiconol (**79**) foram testados quanto à sua atividade antiproliferativa *in vitro* contra células neoplásicas humanas. Ambos os compostos exibiram atividade antiproliferativa *in vitro* contra células neoplásicas humanas de câncer de ovário humano (OVCAR-3), após 72 h de tratamento. Apresentando valores de IC_{50} de 0,24 μM e de 1,07 μM para versicolorina C e versiconol, respectivamente. O controle utilizado foi taxol apresentando valor de IC_{50} de $7,0 \pm 2$ nM.

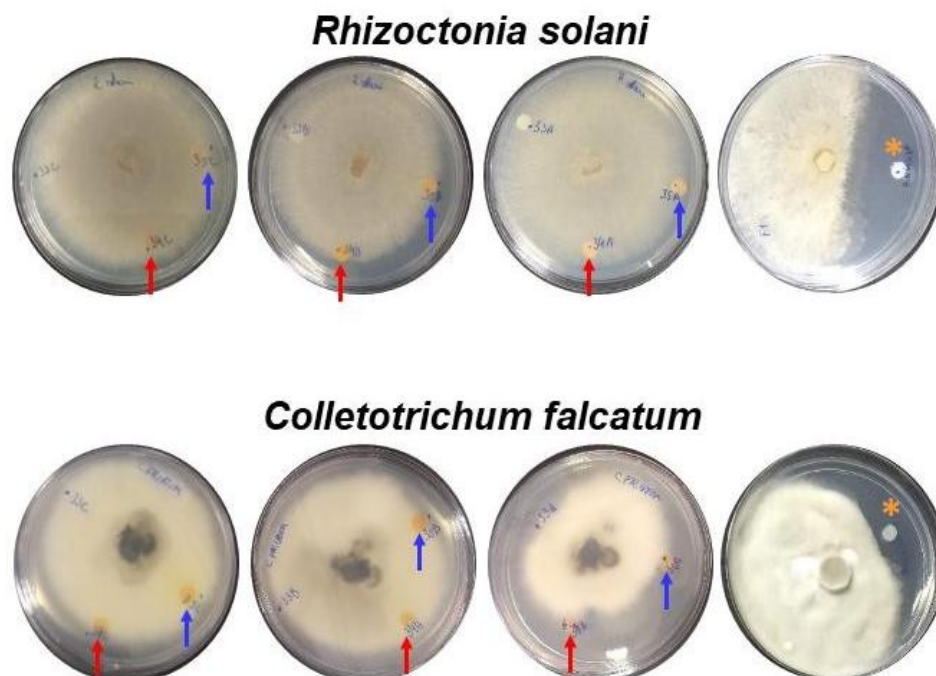
Ambos compostos também tiveram seus potenciais antibacteriano (**Figura 58**) e antifúngicos (**Figura 59**) avaliados em colaboração com a Profa. Dra. Simone Possedente de Lira da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ (Piracicaba, SP). A versicolorina C (**78**) e versiconol (**79**) foram testados *in vitro* frente às cepas de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* BW25113, *E. coli* ATCC 10536, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Rhizoctonia solani* CMAA 1589 e *Colletotrichum falcatum*. Os resultados sugeriram que ambos os compostos não apresentaram atividade inibitória antibacteriana e nem antifúngica. Os compostos isolados também foram enviados ao bioensaio de inibição dos ligantes da penicilina realizado em colaboração com a Profa. Dra. Andrea Dessen no LNBio-CNPq (Campinas, SP), mas também não se mostraram ativos.

Figura 58 - Resultado dos ensaios antibacteriano dos compostos isolados de *Aspergillus* SDC28. Seta azul: versiconol; seta vermelha: versicolorina C; Controle positivo: vancomicina (ponto verde); tetraciclina (ponto rosa); cloranfenicol (ponto alaranjado).



FONTE: Autoria própria.

Figura 59 - Resultado dos ensaios antibacteriano dos compostos isolados de *Aspergillus* SDC28. Seta azul: versiconol; seta vermelha: versicolorina C; Controle positivo: fungicida FOX (ponto alaranjado).



FONTE: Autoria própria.

Análise física dos compostos isolados do fungo *Aspergillus* sp. SDC28

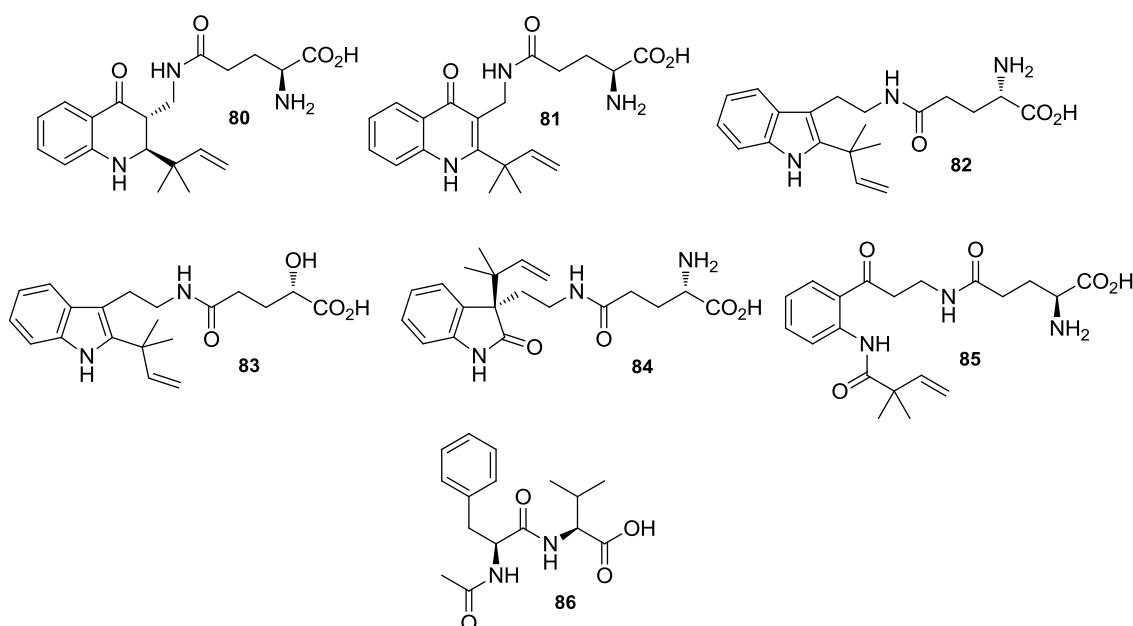
Versicolorina C (78). Pó alaranjado; $[\alpha]_D^{25}$ -123.5 (*c* 0.20, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} nm (log ϵ) 222 (6,24), 289 (6,36), 319 (6,40), 451 (6,55); HRESITOFMS *m/z* 339.0551 [M - H]⁻ (calculado C₁₈H₁₂O₇, 339.0510).

Versiconol (79). Pó alaranjado; $[\alpha]_D^{25}$ -113,0 (*c* 0.20, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} nm (log ϵ) 222 (6,09), 292 (6,21), 321 (6,25), 458 (6.40); HRESITOFMS *m/z* 361,0926 [M + H]⁺ (calculado C₁₈H₁₆O₈, 361.0918).

1.4.5. Investigação da adsorção dos metabólitos hidrossolúveis da linhagem da antártica *Penicillium solitum* IS1-A

O fungo *P. solitum* IS1-A foi isolado de uma amostra marinha (isópode) coletada na Ilha Rei George (Baía do Almirantado, Punta Plaza) na Antártica Marítima durante a expedição brasileira no verão austral de 2010 (OPERANTAR XXVIII; DUARTE et al., 2018). Recentemente a Dr. Julie Rodriguez ao estudar esta linhagem isolou e identificou seis novos alcaloides peptídicos (**80-85**), além do isolamento do dipeptídeo acetilado (**86**) que tiveram suas estruturas completamente estabelecidas. Afim, de podermos avaliarmos a relação da capacidade adsortiva das resinas XAD-2,-4,-7 com a estrutura química dos metabólitos secundários produzidos pelas linhagem *P. solitum* IS1-A, o composto denominado de solitumina A (**80**) foi utilizado (RODRÍGUEZ et al., 2019).

Figura 60 - Metabólitos hidrossolúveis produzidos por *Penicillium solitum* IS1-A.



FONTE: Autoria própria.

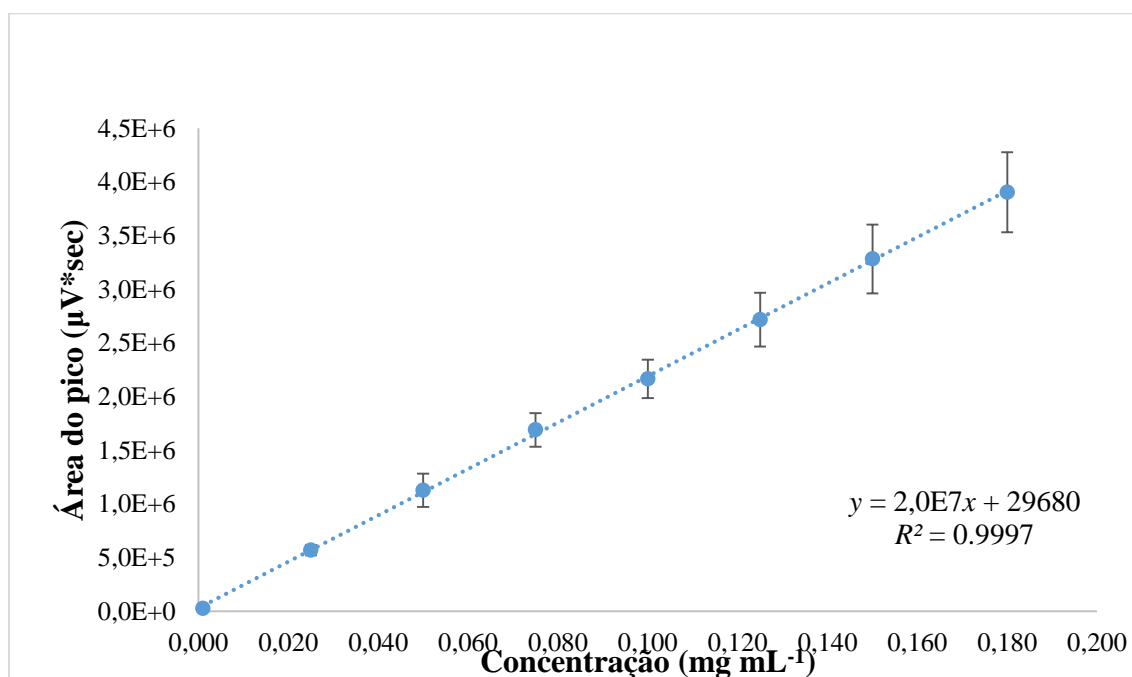
1.4.5.1. Avaliação da seletividade extrativa das resinas XAD-2, XAD-4 e XAD-7

Por utilizarmos uma mistura de três resinas para capturar metabólitos secundários que permanecem no meio de cultivo aquoso dos micro-organismos após extração com AcOEt, também é objetivo deste projeto conhecer qual resina captura determinados tipos de metabólitos, ou se as três são capazes de capturar os mesmos tipos de compostos.

Desenvolvemos a metodologia para a quantificação destes metabólitos por HPLC-UV como pôde ser observado na parte metodológica. A solitumina A (**80**) foi isolada em bom rendimento a partir do meio de cultura de *P. solitum* IS1-A e selecionada para determinação quantitativa por HPLC-UV. O objetivo foi investigar se existe uma correlação entre estrutura química da solitumina A (**80**) e a natureza da resina macroporosa XAD-2, XAD-4, XAD-7, de forma a verificar se o metabólito solitumina A 31) seria capturado por uma das três resinas de maneira mais seletiva.

A curva de calibração da solitumina A (**80**) (**Figura 61**) foi construída plotando-se as áreas de pico (y) *versus* a concentração padrão correspondente (x , mg mL^{-1}), utilizando-se um modelo de regressão de ajuste de mínimos quadrados lineares que forneceu a seguinte equação da reta $y = 2,0E7x + 29680$. O valor do coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,9997, indica que a curva de calibração apresentou excelente linearidade com alto coeficiente de correlação nas faixas de concentração testadas: 0,01 a 0,180 mg mL^{-1} .

Figura 61 - Curva analítica para solitumina A (**80**).



FONTE: A autoria própria.

Os testes de estabilidade das amostras foram realizados em três níveis de concentração diferentes e não apresentaram diferenças significativas nos valores de concentração de solitumina A (**80**) durante os intervalos de tempo analisados. Os valores

de RSD variaram entre 0,26 e 0,52% para concentrações de 0,180 e 0,100 mg mL⁻¹, respectivamente. Para a menor concentração testada, 0,001 mg mL⁻¹, foi encontrado um RSD de 5,10%. Os resultados do estudo de estabilidade indicaram que as amostras são muito estáveis em solução aquosa.

A precisão foi estimada pela medida da repetibilidade (mesmo dia) e da precisão intermediária (três dias consecutivos) em três níveis de concentração (0,180; 0,100 e 0,001 mg mL⁻¹). A precisão do método foi determinada e os desvios padrão relativos (% RSD) para repetibilidade e precisão intermediária foram inferiores a 5,80% (**Tabela 13**). Esses dados são consideráveis e aceitáveis para as diretrizes da EMA.

Tabela 13 - Comparação dos dados de precisão e estabilidade para análise quantitativa considerando solitumina A (**80**) como padrão.

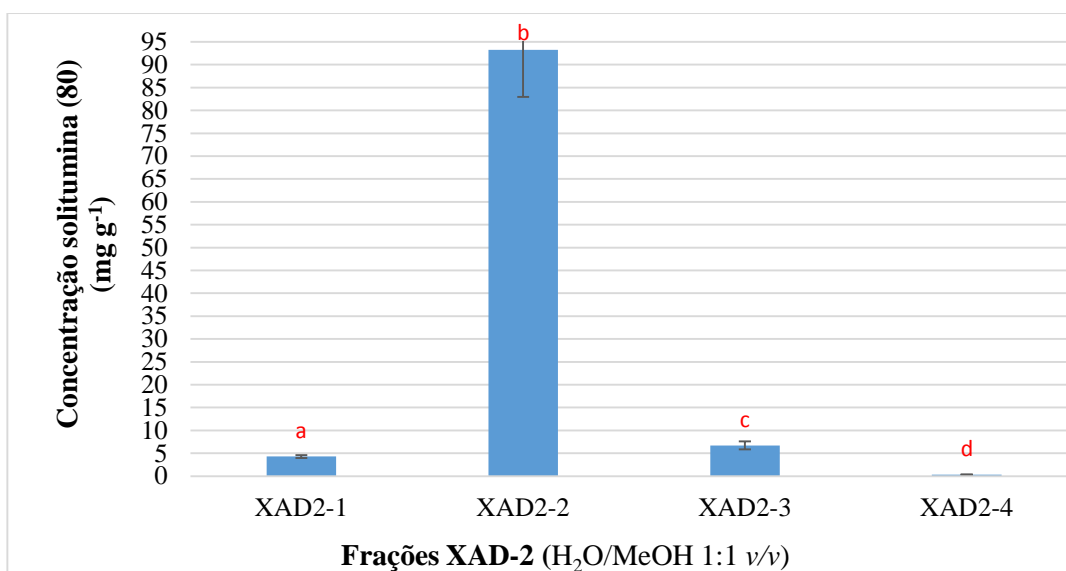
Concentração (mg mL ⁻¹)	Precisão		Estabilidade (% RSD)
	Respetibilidade (% RSD)	Precisão Intermediária (% RSD)	
0.180	1,87	2,04	0,26
0.100	2,70	2,33	0,52
0.001	3,68	5,80	5,10

FONTE: Autoria própria.

O método validado foi aplicado para a quantificação da solitumina A (**80**) em três diferentes frações (frações-2 de cada extrato, H₂O/MeOH 1:1), resultantes da dessorção dos metabólitos adsorvidos pelas resinas XAD2, XAD4 e XAD7. Primeiramente, aplicou-se o teste *t* de *Student* para todas as frações eluídas da dessorção dos metabólitos secundários capturados pelas resinas XADs, levando em consideração a quantidade de solitumina A (**80**) presente em cada fração, para verificar se essas frações foram consideradas estatisticamente diferentes. Todos os valores do parâmetro *p* encontrados foram menores que 0,05, representando diferenças estatisticamente significantes entre as quatro frações obtidas em suas composições. Estes dados confirmam que a nossa estratégia cromatográfica de separação utilizando fase reversa é eficiente ao ponto de concentrar os analitos em frações distintas devido à sua polaridade, o que pode ser observado também nos cromatogramas obtidos após o fracionamento do extrato de *B. spectabilis* Aa1 (**item 1.5.2; Figuras 33-36**). Um gráfico representativo (**Figura 62**) obtido para os valores de concentração de solitumina A (**80**) em XAD-2 demonstrou sua

presença majoritária na **fração 2** (H₂O/MeOH 1:1). O mesmo resultado foi observado quando foram utilizadas as resinas XAD-4 e XAD-7.

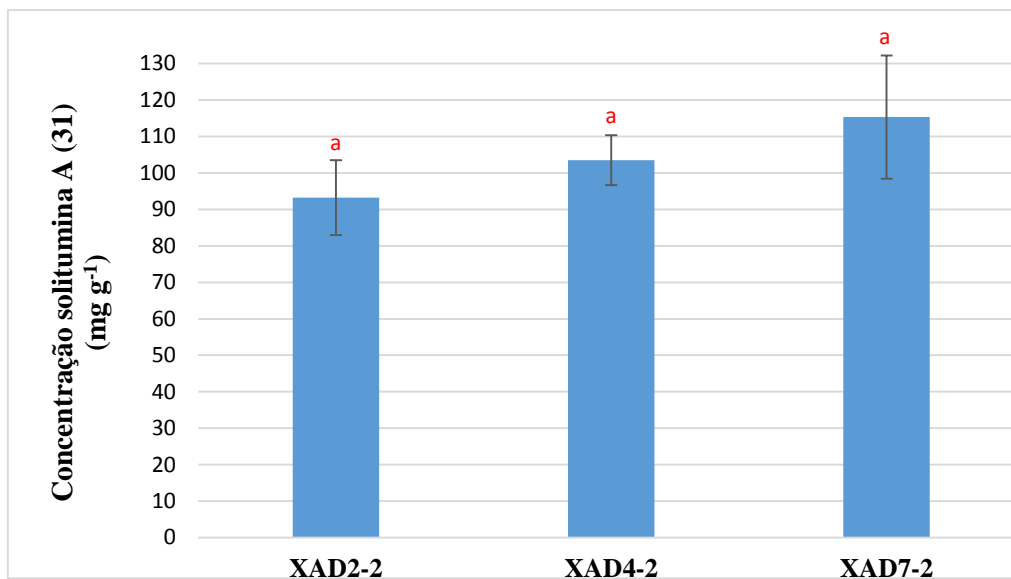
Figura 62 - Presença de solitumina A (**80**) nas frações XAD2 (XAD2-1: H₂O:MeOH 75:25 v/v; XAD2-2: H₂O:MeOH 50:50 v/v; XAD2-3: H₂O:MeOH 75:25 v/v; XAD2-4: MeOH 100%), pelo teste t de *Student* não-pareado (p <0,05).



FONTE: Autoria própria.

A presença do analito quantificado é da mesma ordem de grandeza nas frações oriundas das três resinas (XAD2-2, XAD4-2 e XAD7-2), com concentração de 93,23, 103,51 e 115,33 mg g⁻¹, respectivamente (**Figura 63**). Todos os RSD foram inferiores a 15%, de acordo com as diretrizes do EMA. As frações 1, 3 e 4 (75:25, 25:75 e MeOH, respectivamente) têm uma presença muito pequena de solitumina A (**80**) e não é um resultado expressivo a ser quantificado.

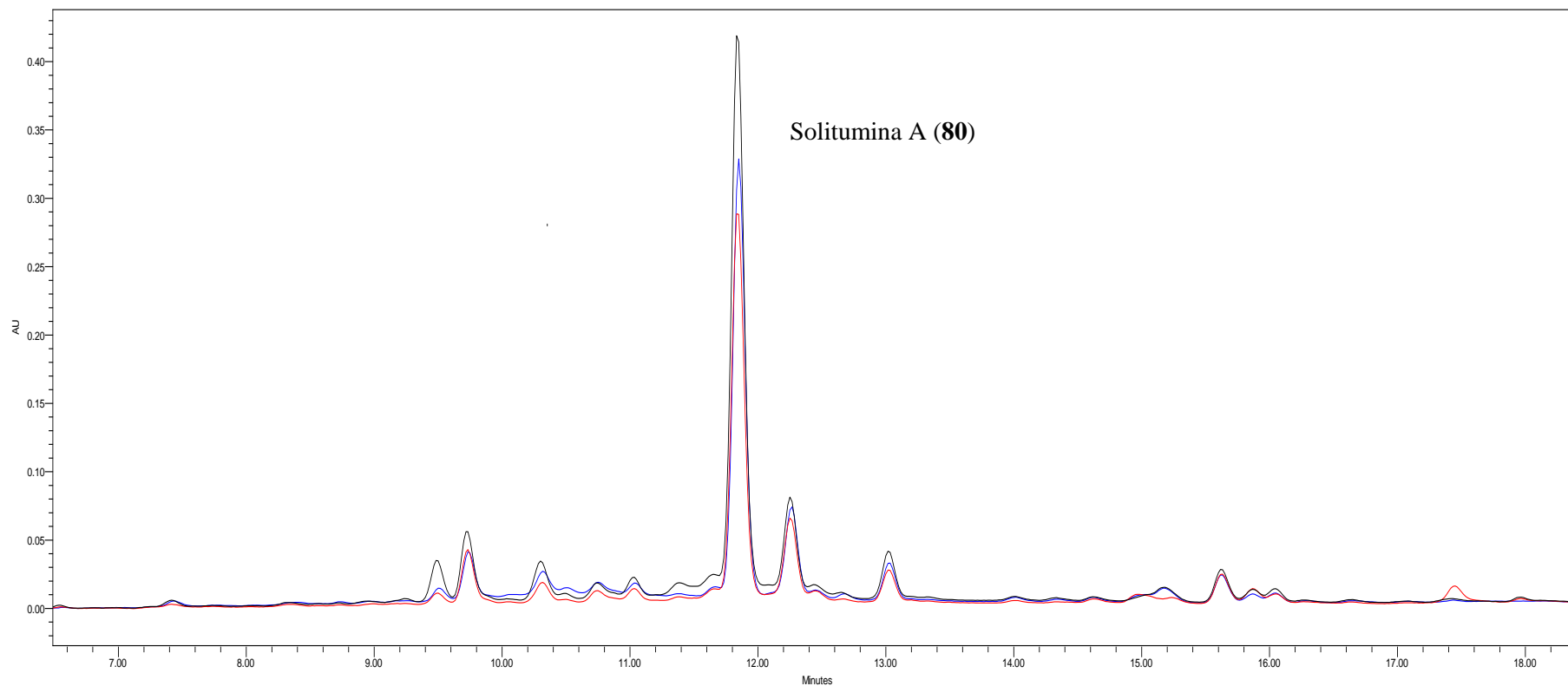
Figura 63 - Presença e comparação de solitumina A (**80**) nas **frações 2** (H₂O/MeOH 1:1) pelo teste t de *Student* não-pareado ($p > 0,05$).



FONTE: Autoria própria.

Era esperado que uma das três resinas poliméricas fosse mais seletiva para a adsorção do composto majoritário do extrato de *P. solitum* IS1-A, uma vez que cada resina possui uma faixa de polaridade no qual a adsorção pode ocorrer. No entanto, quando analisamos os cromatogramas individuais das três frações XAD2-2, XAD4-2 e XAD7-2, notamos que são praticamente idênticos (**Figura 64**). Concluímos dessa maneira que a solitumina A (**80**) foi capturada da mesma forma pelas três resinas (**Figura 63**). De fato, quando o teste *t* de *Student* foi aplicado para comparar as três frações que continham solitumina A (**80**), não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Figura 64 - Comparação do perfil cromatográfico das três frações **XAD2-2** (linha preta), **XAD4-2** (linha azul) e **XAD7-2** (linha vermelha) contendo solitumina A (**80**), adsorvida de extratos aquosos do fungo *P. solitum* IS1-A, detecção por HPLC-UV com $\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm.



FONTE: Autoria própria.

1.5. Conclusões

A linhagem endofítica de *Anthurium alcatrazense*, foi identificada como *Byssoclamys spectabilis* e foi selecionada para isolamento dos compostos bioativos do extrato hidrossolúvel. Foi possível isolar dois compostos inéditos, uma dicetopiperazina, a *ciclo*-(D-Trp-L-Glu) e outro derivado peptídico de triptofano. A estereoquímica absoluta destes compostos pode em partes ser estabelecida através de reações de derivatização com reagente de Marfey e análises de ECD/CD. Um composto já conhecido foi isolado, a *N*-acetil-quinureína, entretanto seus dados espectroscópicos de RMN e configuração absoluta estão sendo relatados pela primeira vez. Tanto a *N*-acetil-quinureína, como a nova dicetopiperazina *ciclo*-(D-Trp-L-Glu) foram avaliadas frente às células cancerígenas de ovário, e ambos os metabólitos secundários se mostraram potencialmente ativos.

O estudo dos metabólitos secundários lipofílicos produzidos a partir do meio de cultura do fungo *Aspergillus* sp. SDC28 resultou no isolamento de dois compostos conhecidos, a versicolorina C e versiconol. Ambos não possuíam suas configurações absolutas determinadas, o que foi relatado por GUBIANI et al. (2022). Foi possível igualmente determinar seus potenciais citotóxicos, frente às células cancerígenas de ovário OVCAR-3, e ambos os metabólitos secundários se mostraram potencialmente promissores.

Quanto à seletividade das resinas XAD-2, -4, -7 para a adsorção do alcaloide peptídico solitumina A (**80**), foi possível desenvolver e validar um método de quantificação do composto após sua adsorção/dessorção pela mistura de resinas XAD-2, XAD-4, XAD-7 de maneira independente. Observou-se não-seletividade das resinas XAD2, XAD4 e XAD7 na adsorção de solitumina A (**80**) a partir do meio de cultivo de *P. solitum* IS1-A. Essa não-seletividade pode ser explicada devido à característica estrutural do composto, que apresenta sítios de alta polaridade e baixa polaridade em sua estrutura química, podendo ser igualmente adsorvido pelas resinas utilizadas.

Ademais, o estudo conduzido possibilitou expandir o entendimento do espaço químico que linhagens de fungos filamentosos podem produzir, a partir do estudo de bioprospecção tanto de extratos hidrossolúveis, quanto lipofílicos, uma vez que foi possível o isolamento de metabólitos que possuem ou estruturas novas, ou atividade biológica que seja relevante. O estudo da quantificação do alcaloide hidrossolúvel produzido por *Penicillium solitum* IS1-A, é importante pois nos permite direcionar a utilização das resinas não-íonicas de adsorção XAD para a captura de metabólitos secundários hidrossolúveis.

Referências bibliográficas

ALBRECHTSEN, B. R.; BJORKEN, L.; VARAD, A.; HAGNER, A.; WEDIN, M.; KARLSSON, J.; JANSSON S. Endophytic fungi in European aspen (*Populus tremula*) leaves: diversity, detection, and a suggested correlation with herbivory resistance. **Fungal Diversity**, New York, v. 41, n. 1, p. 17–28, 2010.

ALVI, K. A.; PETERSON, J.; HOFMANN, B. Rapid identification of elaiophylin and geldanamycin in *Streptomyces* fermentation broths using CPC coupled with a photodiode array detector and LC-MS methodologies. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, Oxford, v. 15, n. 2, p. 80-84, 1995.

ANDRADE, P. A. M.; DE SOUZA, A. J.; LIRA, S. P.; ASSIS, M. A.; BERLINCK, R. G. S.; ANDREOTE, F. D. The bacterial and fungal communities associated with *Anthurium* ssp. leaves: insights into plant endemism and microbe association. **Microbiological research**, Munich, n. 244, v. 1, p. 126667-126677, 2021.

AQUINO, R.; MORELLI, S.; LAURO, M. R.; ABDO, S.; SAIJA, A.; TOMAINO, A. Phenolic constituents and antioxidant activity of an extract of *Anthurium versicolor* leaves. **Journal of natural products**, Washington, v. 64, n. 8, p. 1019-1023, 2001.

ARAÚJO, W. L.; LACAVA, P. T.; MARCON, J.; LIMA, A. O. S.; SOBRAL, J. K.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: Calq, 2010.

ARAÚJO, W. L.; QUECINE, M. C.; LACAVA, P. T.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; MARCON, J.; LIMA, A. O. S.; KULINSKY-SOBRAL, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J.L. **Micro-organismos endofíticos: aspectos teóricos e práticos de isolamento e caracterização**. Santarem: Editora UFOPA, 2014. p. 257

ARNOLD, A. E.; MEJÍA, C. L.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 26, p. 15649-15654, 2003.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI J. R. W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L.
Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic journal of biotechnology**, Valparaíso, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR, W.; ARAÚJO, W. L.; PEREIRA, J. O.
Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. *In*: SERAFINI, L. A.; BARROS, M. N.; AZEVEDO, J. L. (ed.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: Educs, 2002. p. 233-268.

BABA, K.; TANIGUTI, M.; YONEDA, Y.; KOZAWA, M. Coumarin glycosides from *Edgeworthia chrysantha*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 247-249, 1990.

BAKER, S. E.; BENNETT, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. *In*: GOLDMAN, G. H.; OSMANI, S. A. (ed.). **The Aspergilli: Genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods**. New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2007. p. 3-13.

BANDEIRA, K. F.; CAVALHEIRO, A. J. An LC–DAD fingerprinting method for alkaloids, flavonoids and styrylpyrones from *Cryptocarya mandiocana*. **Chromatographia**, Heidelberg, v. 70, n. 9, p. 1455-1460, 2009.

BARAN, H.; JELLINGER, K.; DEECKE, L. Kynurenine metabolism in Alzheimer's disease. **Journal of neural transmission**, Wien, v. 106, n. 2, p. 165-181, 1999.

BAR-OR, D.; THOMAS, G.; RAEL, L. T.; FREDERERICK, E.; HAUS-BURG, M.; BAR-OR, R.; BRODY, E. On the mechanisms of action of the low molecular weight fraction of commercial human serum albumin in osteoarthritis. **Current rheumatology reviews**, Sharjah, v. 15, n. 3, 189-200, 2018.

BARROW, R. A. Isolation of microbial natural products. *In*: SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. **Methods in biotechnology**. 2. ed. Totowa: Humana Press Inc., 2007. v. 20, p. 391-415.

BELYAGOUBI, L.; BELYAGOUBI-BENHAMMOU, N.; JURADO, V.; DUPONT, J.; LACOSTE, S.; DJEBBAH, F.; OUNADJELA, F. Z.; BENAÏSSA, S.; HABI, S.;

ABDELOUAHID, D. E.; SAIZ-JIMENEZ, C. Antimicrobial activities of culturable microorganisms (actinomycetes and fungi) isolated from Chaabe Cave, Algeria. **International journal of speleology**, Bologna, v. 47, n. 2, p. 189-199, 2018.

BERGSTROM, J. D.; KURTZ, M. M.; REW, D. J.; AMEND, A. M.; KARKAS, J. D.; BOSTEDOR, R. G.; BANSAL, V. S.; DUFRESNE, C.; VAN MIDDLESWORTH, F. L.; HENSENS, O. D. Zaragozic acids: a family of fungal metabolites that are picomolar competitive inhibitors of squalene synthase. **Proceedings of the national academy of sciences**, Washington, v. 90, n. 1, 80-84, 1993.

BERLINCK, R. G. S.; CRNKOVIC, C. M.; GUBIANI, J. R.; BERNARDI, D. I.; IÓCA, L. P.; QUINTANA-BULLA, J. I. The isolation of water-soluble natural products - challenges, strategies and perspectives. **Natural product reports**, Cambridge, v. 38, n. 3, p. 1952-2061, 2021.

BEUTLER, J. A.; MCKEE, T. C.; FULLER, R. W.; TISCHLER, M.; CARDELLINA, J. H.; SNADER, K. M.; MCCLOUD, T. G.; BOYD, M. R. Frequent occurrence of HIV-inhibitory sulphated polysaccharides in marine invertebrates. **Antiviral chemistry and chemotherapy**, London, v. 4, n. 3, p. 167-172, 1993.

BORGES, W. S.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; SAID, S.; PUPO, M. T. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation. **Current organic chemistry**, Sharjah, v. 13, n. 12, p.1137-1163, 2009.

BRITTON, R.; DE OLIVEIRA, J. H.; ANDERSEN, R. J.; BERLINCK, R. G. S. Granulatimide and 6-bromogranulatimide, minor alkaloids of the Brazilian Ascidian *Didemnum granulatum*. **Journal of natural products**, Washington, v. 64, n. 2, p. 254-255, 2001.

CAMACHO, M. E.; LEÓN, J.; CARRIÓN, M. D.; ENTRENA, A.; ESCAMES, G.; KHALDY, H.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; GALLO, M. A.; ESPINOSA, A. Inhibition of nNOS activity in rat brain by synthetic kynurenines: structure-activity dependence. **Journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 2, p. 263-274, 2002.

CAMACHO, M. E.; LEÓN, J.; ENTRENA, A.; VELASCO, G.; CARRIÓN, M. D.; ESCAMES, G.; VIVO, A.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; GALLO, M. A.; ESPINOSA, A. 4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives with inhibitory nNOS activity in rat brain: synthesis and structure activity relationships. **Journal of medicinal chemistry**, v.47, n. 23, p. 5641-5650, 2004.

CAO, J.; LI, X-M.; MENG, L-H.; KONUKLUGIL, B.; LI, X.; LI, H-L.; WANG, B-G. Isolation and characterization of three pairs of indolediketopiperazine enantiomers containing infrequent N-methoxy substitution from the marine algal-derived endophytic fungus *Acrostalagmus luteoalbus* TK-43. **Bioorganic chemistry**, San Diego, v. 90, n. 1, p. 103030-103036, 2019.

CARDELLINA, J. H.; MUNRO, M. H.; FULLER, R. W.; MANFREDI, K. P.; MCKEE, T. C.; TISCHLER, M.; BOKESCH, H. R.; GUSTAFSON, K. R.; BEUTLER, J. A.; BOYD, M. R. A chemical screening strategy for the dereplication and prioritization of HIV-inhibitory aqueous natural products extracts. **Journal of natural products**, Washington, v. 56, n. 7, p. 1123-1129, 1993.

CARROLL, G. C.; CARROLL, F. E. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian journal of botany**, Ottawa, v. 56, n. 24, p. 3034- 3043, 1978.

CHEHADE, C. C.; DIAS, R. L. A.; BERLINCK, R. G. S.; FERREIRA, A. G.; COSTA, L. V.; RANGEL, M.; MALPEZZI, E. L. A.; FREITAS, J. C.; HAJDU, E. 1,3-dimethylisoguanine, a new purine from the marine sponge *Amphimedon, viridis*. **Journal of natural products**, Washington, v. 60, n. 7, p. 729-731, 1997.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved Standard. M7–A9. Wayne: CLSI, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Twenty-First Informational Supplement**. Approved Standard. M100-S21. CLSI, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. Approves Standard- 11^a ed. M02-A11.

Wayne: CLSI, 2012.

COELHO, M. A. N.; CATHARINO, E. L. M. Duas espécies novas de *Anthurium* (Araceae) endêmicas do litoral de São Paulo, Brasil. **Química nova**, São Paulo, v. 54, n. 4, p. 829-833, 2008.

CONSTANT, H. L.; BEECHER, C. W. A method for the dereplication of natural product extracts using electrospray HPLC/MS. **Natural product letters**, Abingdon, v. 6, n. 3, p. 193-196, 1995.

CONTRERAS-MARTEL, C.; AMOROSO, A.; WOON, E. C.; ZERVOSEN, A.; INGLIS, S.; MARTINS, A.; VERLAINE, O.; RYDZIK, A. M.; JOB, V.; LUXEN, A.; JORIS, B.; SCHOFIELD, C. J.; DESSEN, A. Structure-guided design of cell wall biosynthesis inhibitors that overcome β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus* (MRSA). **ACS chemical biology**, Washington, v. 6, n. 9, p. 943-951, 2011.

CORREIA, A. M.; LIRA, S. P.; ASSIS, M. A.; RODRIGUES, A. Fungal endophyte communities in Begonia species from the Brazilian Atlantic rainforest. **Current microbiology**, New York, v. 75, n. 1, p. 441-449, 2018.

COX, R.H.; CHURCHILL, F.; COLE, R.J. E DORNER, J.W. Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of the structure and biosynthesis of versiconal acetate. **Journal of the American chemical society**, Washington, v. 99, n. 9, p. 3159-3161, 1977.

DAVEY, M. L.; CURRAH, R. S. Interactions between mosses (*Bryophyta*) and fungi. **Canadian journal of botany**, Ottawa, v. 84, n. 10, p. 1509–1519, 2006.

DE ANDRADE, P. A. M.; DE SOUZA, A. J.; LIRA, S. P.; ASSIS, M. A.; BERLINCK, R. G. S.; ANDREOTE, F. D. The bacterial and fungal communities associated with *Anthurium* ssp. leaves: insights into plant endemism and microbe association. **Microbiological research**, Munich, v. 244, n. 1, p. 126667-126676, 2021.

DEFRANK, J.; EASTON-SMITH, V. A.; HIGAKI, T.; IMAMURA, J. S. Response of anthurium and weeds to four preemergence herbicides. **HortScience**, Alexandria, v. 24, n. 6, p. 1044-1044, 1989.

DUARTE, A. W. F.; BARATO, M. B.; NOBRE, F. S.; POLEZEL, D. A.; OLIVEIRA, T. B.; SANTOS, J. A.; RODRIGUES, A.; SETTE, L. D. Production of cold-adapted enzymes by filamentous fungi from King George Island, Antarctica. **Polar biology**, New York, v. 41, n. 9, p. 2511-2521, 2018.

EL-SAYED, A.; CORDELL, G. A. *Catharanthus alkaloids*. XXXIV. Catharanthamine, a new antitumor bisindole alkaloid from *Catharanthus roseus*. **Journal of natural products**, Washington, v. 44, n. 3, p. 289-293, 1981.

ENTRENA, A.; CAMACHO, M. E.; CARRIÓN, M. D.; LÓPEZ-CARA, L. C.; VELASCO, G.; LÉON, J.; ESCAMES, G.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; TAPIAS, V.; GALLO, M. A.; VIVÓ, A.; ESPINOSA, A. Kynurenamines as neural nitric oxide synthase inhibitors. **Journal of medicinal chemistry**, Washington, v. 48, n. 26, p. 8174-8181, 2005.

FAROOQ, S.; QAYUM, A.; NALLI, Y.; LAURO, G.; CHINI, M. G.; BIFULCO, G.; CHAUBEY, A.; SINGH, S. K.; RIYAZ-UL-HASSAN, S.; ALI, A. Discovery of a secalonic acid derivative from *Aspergillus aculeatus*, an endophyte of *Rosa damascena* Mill., triggers apoptosis in MDA-MB-231 triple negative breast cancer cells. **ACS omega**, Washington, v. 5, n. 38, p. 24296-24310, 2020.

FEDAROVICH, A.; DJORDJEVIC, K. A.; SWANSON, S. M.; PETERSON, Y. K.; NICHOLAS, R. A.; DAVIES, C. High-throughput screening for novel inhibitors of *Neisseria gonorrhoeae* penicillin-binding protein 2. **PLoS one**, Washington, v. 7, n. 9, p. e44918, 2012.

FERREIRA, R. L.; SILVA, M. S.; BERNARDI, L. F. O. Contexto bioespeleológico. In: DRUMMOND, G. M.; MARTINS, C. S.; GRECO, M. B.; VIEIRA, F.(ed). **Biota Minas: diagnóstico do conhecimento sobre a biodiversidade no estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas, 2009. p. 160-179.

FONTANALS, N.; MARCÉ, R.M; BORRULL, F. New hydrophilic materials for solid-phase extraction. **Trends in Analytical Chemistry**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 394-406, 2005.

FONTANALS, N.; MARCÉ, R.M; BORRULL, F. New materials in sorptive extraction techniques for polar compounds. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1152, n. 1-2, p.14-31, 2007.

FUKUYAMA, K.; TOMITAKE, T.; YUKITERU, K.; TAKASHI, H.; YUICHI, H. The crystal and molecular structure of versicolorin C, a metabolite of *Aspergillus versicolor*. **Bulletin of the chemical society of Japan**, Tokyo, v. 48, n. 10, p. 2648-2652, 1975.

FUKUYAMA, K.; TSUKIHARA, T.; KATSUBE, Y.; HAMASAKI, T.; HATSUDA, Y. The crystal and molecular structure of versicolorin C, a metabolite of *Aspergillus versicolor*. **Bulletin of the chemical society of Japan**, Tokyo, v. 48, n. 10, p. 2648-2652, 1975.

GEISER, D. M.; KLICH, M. A.; FRISVAD, J. C.; PETERSON, S. W.; VARGA, J.; SAMSON, R. A. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. **Studies in mycology**, Utrecht, v. 59, n. 1, p. 1-10, 2007.

GIBBONS, J. G.; ROKAS, A. The function and evolution of the *Aspergillus* genome. **Trends in microbiology**, Oxford, v. 21, n. 1, p. 14-22, 2013.

GIRLANDA, M.; PEROTTO, S.; BONFANTE, P. *Mycorrhizal Fungi: Their Habitats and Nutritional Strategies*. In: KUBICEK, C. P.; DRUZHININA, I. S. (ed). **Environmental and microbial relationships**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007, p. 229-256.

GORBUSHINA, A. A. Life on the rocks. **Environmental microbiology**, Hoboken, v. 9, n. 7, p. 1613-31, 2007.

GOSTINČAR, C.; ZALAR, P.; GUNDE-CIMERMAN, N. No need for speed: Slow development of fungi in extreme environments. **Fungal biology reviews**, London, v. 39, n. 1, p. 1-14, 2022.

GRAU, M. F.; ENTWISTLE, R.; OAKLEY, E.; WANG, C. C. C.; OAKLEY, B. R. Overexpression of an LaeA-like methyltransferase upregulates secondary metabolite production in *Aspergillus nidulans*. **ACS chemical biology**, Washington, v. 14, n. 7, p. 1643-1651, 2019.

GRIGOLETTO, D. F.; TRIVELLA, D. B.; TEMPONE, A. G.; RODRIGUES, A.; CORREIA, A. M. L.; LIRA, S. P. Antifungal compounds with anticancer potential from *Trichoderma* sp. P8BDA1F1, an endophytic fungus from *Begonia venosa*. **Brazilian journal of microbiology**, New York, v. 51, n. 1, p. 989-997, 2020.

GUBIANI, J. R.; BERNARDI, D. I.; DE PAULA, C. C.; SELEGHIM, M. H.; FERREIRA, A. G.; BATISTA, A. N.; BATISTA JR, J. M.; OLIVEIRA, L. F.; LIRA, S. P.; BURDETTE, J. E.; BERLINCK, R. G. Absolute configuration of cytotoxic anthraquinones from a Brazilian cave soil-derived fungus, *Aspergillus* sp. SDC28. **Archiv der Pharmazie**, Weinheim, v. 355, n. 4, p. 2100441, 2022.

GUCHI, E. Aflatoxin contamination in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) caused by *Aspergillus* species in Ethiopia. **Journal of applied & environmental microbiology**, Newark, v. 3, n. 1, p. 11-19, 2015.

GUIMARÃES, D. O.; BORGES, W. S.; VIEIRA, N. J.; OLIVEIRA, L. F. de.; SILVA, C. H. T. P. da.; LOPES, N. P.; DIAS, L. G.; DURÁN-PÁTRON, R.; COLLADO, I. G.; PUPO, M. T. Diketopiperazines produced by endophytic fungi found in association with two Asteraceae species. **Phytochemistry**, Oxford, v. 71, n. 11-12, p. 1423-1429, 2010.

GUO, L. D.; HUANG, G. R.; WANG, Y. Seasonal and tissue age influences on endophytic fungi of *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in Dongling Mountain, Beijing. **Journal of integrative plant biology**, Hoboken, v. 50, n. 8, p. 997–1003, 2008.

HAINS, P. G.; SIMPANYA, M. F.; GIBLIN, F.; TRUSCOTT, R. J. W. UV filters in the lens of the thirteen lined ground squirrel (*Spermophilus tridecemlineatus*). **Experimental eye research**, London, v. 82, n. 4, p. 730-737, 2006.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian journal of microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 10, p. 895–914, 1997.

HAMASAKI, T.; HATSUDA, Y.; TERASHIMA, N.; RENBUTSU, M. Studies on the metabolites of *Aspergillus versicolor* (Vuillemin) Tiraboschi: Part V. Isolation and structures of three new metabolites, versicolorins A, B and C. **Agricultural and biological chemistry**, Tokyo, v. 31, n. 1, p.11-17, 1967.

HAMASAKI, T.; HATSUDA, Y.; TERASHIMA, N.; RENBUTSU, M. The structure of a new metabolite of *Aspergillus versicolor*. **Agricultural and biological chemistry**, Tokyo, v. 29, n. 7, p. 696-697, 1965.

HASHIMOTO, T.; TORI, M.; ASAKAWA, Y. Piscicidal sterol acylglucosides from *Edgeworthia chrysantha*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 30, n. 9, p. 2927-2931, 1991.

HATFIELD, M. J.; UMANS, R. A.; HYATT, J. L.; EDWARDS, C. C.; WIERDL, M.; TSURKAN, L.; TAYLOR, M. R.; POTTER, P. M. Carboxylesterases: General detoxifying enzymes. **Chemico-biological interactions**, Clare, v. 259, n. 1, p. 327-331, 2016.

HATSUDA, Y.; HAMASAKI, T.; ISHIDA, M.; YOSHIKAWA, S. The structure of a new metabolite from *Aspergillus versicolor*. **Agricultural and biological chemistry**, Tokyo, v. 33, n. 1, p. 131-133, 1969.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1- 5 million species estimate revisited. **Mycological research**, Kidlington, v. 105, n. 12, p.1422-1432, 2001.

HEDAYATI, M. T.; PASQUALOTTO, A. C.; WARN, P. A.; BOWYER, P.; DENNING, D. W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, New York, v. 153, n. 6, p. 1677-1692, 2007.

HOCHLOWSKI, J. E.; HILL, P.; WHITTERN, D. N.; SCHERR, M. H.; RASMUSSEN, R. R.; DORWIN, S. A. MCALPINE, J. B. Aselacins, novel compounds that inhibit binding of endothelin to its receptor II. Isolation and elucidation of structures. **The journal of antibiotics**, London, v. 47, n. 5, p. 528-535, 1994.

HOLTON, R. A.; SOMOZA, C.; KIM, H. B.; LIANG, F.; BIEDIGER, R. J.; BOATMAN, P. D.; SHINDO, M.; SMITH, C. C.; KIM, S.; NADIZADEH, H.; SUZUKI, Y.; TAO, C.; VU, P.; TANG, S.; ZHANG, P.; MURTHI, K. K.; GENTILE, L. N.; LIU, J. H. First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring. **Journal of the american chemical society**, Washington, v. 116, n. 4, 1597-1598, 1994.

HOOPER, I. R. Aminoglycoside antibiotics. *In*: UMEZAWA, H.; HOOPER, I. R. (ed.). **The naturally occurring aminoglycoside antibiotics**. Berlin: Springer-Verlag, 1982. p. 1-35.

HOUBRAKEN, J.; VARGA, J.; RICO-MUNOZ, E.; JOHNSON, S.; SAMSON, R. A. Sexual reproduction as the cause of heat resistance in the food spoilage fungus *Byssochlamys spectabilis* (Anamorph *Paecilomyces variotii*). **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 74, n. 5, p. 1613-1619, 2008.

HUBERT, J.; NUZILLARD, J. M.; RENAULT, J. H. Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept? **Phytochemistry reviews**, Dordrecht, v. 16, n. 1, p. 55-95, 2017.

KARVE, M.; RAJGOR, R. V. Amberlite XAD-2 impregnated organophosphinic acid extractant for separation of uranium (VI) from rare earth elements. **Desalination**, Amsterdam, v. 232, n. 1-3, p.191-197, 2008.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial microbiology & biotechnology**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 155-176, 2016.

KHAN, M. S.; GAO, J.; ZHANG, M.; CHEN, X.; MOE, T. S.; DU, Y.; YANG, F.; XUE, J.; ZHANG, X. Isolation and characterization of plant growth-promoting endophytic

bacteria *Bacillus stratosphericus* LW-03 from *Lilium wardii*. **3 Biotech**, Heidelberg, v. 10, n. 305, p. 1-15, 2020.

KOCSUBÉ, S.; PERRONE, G.; MAGISTÀ, D.; HOUBRAKEN, J.; VARGA, J.; SZIGETI, G.; HUBKA, V.; HONG, S-B.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. *Aspergillus* is monophyletic: evidence from multiple gene phylogenies and extrolites profiles. **Studies in mycology**, Utrecht, v. 85, n. 1, p. 199-213, 2016.

KODJA, G.; GIBRAN, F. Z.; LEITE, K. L.; MOURA, R. L.; FRANCINI-FILHO, R. B. **Alcatrazes**. São Paulo: Ed. Cultura Sub, 2012. p. 208.

KOGEL, K. H.; FRANKEN, P.; HUCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite - what decides? **Current opinion in plant biology**, London, v. 9, n. 4, p. 358-363, 2006.

KOSUGE, T.; ZENDA, H.; OCHIAI, A.; MASAKI, N.; NOGUCHI, M.; KIMURA, S.; NARITA, H. Isolation and structure determination of a new marine toxin, surugatoxin from the Japanese Ivory shell, *Babylonia japonica*. **Tetrahedron letters**, Kidlington, v. 13, n. 25, p. 2545-2548, 1972.

KOZLOVSKII, A. G.; ANTIPOVA, T. V.; ZHELIFONOVA, V. P.; BASKUNOV, B. P.; IVANUSHKINA, N. E.; KOCHKINA, G. A.; OZERSKAYA, S. M. Secondary metabolites of fungi of the *Usti* section, genus *Aspergillus* and their application in chemosystematics. **Microbiology**, New York, v. 86, n. 1, p. 176-182, 2017.

KRINGS, M.; TAYLOR, T.N.; HASS, H.; KERP, H.; DOTZLER, N.; HERMSEN, E.J. Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. **New phytologist**, Hoboken, v. 174, n. 3, p. 648-657, 2007.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & biology**, Cambridge, v. 19, n. 7, p. 792-798, 2012.

LEE Y. M., LI H., HONG J., CHO H. Y., BAE K. S., KIM M. A., KIM D. K., JUNG J. H. Bioactive metabolites from the sponge-derived fungus *Aspergillus versicolor*. **Archives of pharmacal research**, Seoul, v. 33, n. 2, p. 231-235, 2010.

LI, X-B.; LI, Y-L.; ZHOU, J-C.; YUAN, H-Q.; WANG, X-N.; LOU, H-X. A new diketopiperazine heterodimer from an endophytic fungus *Aspergillus niger*. **Journal of asian natural products research**, Abingdon, v. 17, n. 2, p. 182-187, 2015.

LIN, S. H.; JUANG, R. S. Adsorption of phenol and its derivatives from water using synthetic resins and low-cost natural adsorbents: a review. **Journal of environmental management**, London, v. 90, n. 3, p.1336-1349, 2009.

MACCHERONI J. R. W.; ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S. Ecologia: habitat e interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias. *In*: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educ, 2010. p. 638.

MACIEJEWSKA, M.; ADAM, D.; MARTINET, L.; NAÔMÉ, A.; CAŁUSINSKA, M.; DELFOSSE, P.; CARNOL, M.; BARTON, H. A.; HAYETTE, M.-P.; SMARGIASSO, N.; DE PAUW, E.; HANIKENNE, M.; BAURAIN, D.; RIGALI, S. A Phenotypic and genotypic analysis of the antimicrobial potential of cultivable streptomyces isolated from cave Moonmilk deposits. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 7, n. 1, p. 1455-1474, 2016.

MAN, B., WANG, H., XIANG, X., WANG, R., YUN, Y., & GONG, L. Phylogenetic diversity of culturable fungi in the Heshang Cave, central China. **Frontiers in microbiology**, London, v. 6, n. 1, p. 1158-1168, 2015.

MARTINS, L. M.; SANT'ANA, A. S.; FUNGARO, M. H. P.; SILVA, J. J.; DO NASCIMENTO, M. da S.; FRISVAD, J. C.; TANIWAKI, M. H. The biodiversity of *Aspergillus* section Flavi and aflatoxins in the Brazilian peanut production chain. **Food Research international**, Amsterdam, v. 94, n. 1, p. 101-107, 2017.

- MARUTANI, M.; TANG, C. S.; PAULL, R.; KAMEMOTO, H. Anthocyanins in the lavender *Anthurium*. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 4, p. 620-622, 1987.
- METWALY, A. M.; GHONEIM, M. M.; MUSA, A. Two new antileishmanial diketopiperazine alkaloids from the endophytic fungus *Trichosporum* sp. **Der pharmaceutica**, India, v. 7, n. 11, p. 322, 2015.
- MIGUEL, D. C.; ZAULI-NASCIMENTO, R. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K.; PEREIRA, L. I.; JERÔNIMO, S. M.; RIBEIRO-DIAS, F.; ULIANA, S. R. Clinical isolates of New World *Leishmania* from cutaneous and visceral leishmaniasis patients are uniformly sensitive to tamoxifen. **International journal of antimicrobial agents**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 93-94, 2011.
- MILLER, T. W.; GOEGELMAN, R. T.; WESTON, R. G.; PUTTER, I.; WOLF, F. J. Cephamycins, a new family of β -Lactam antibiotics II. Isolation and chemical characterization. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 2, n. 3, 132-135, 1972.
- TAKAKI, M.; WILLIAMS, D. E.; FREIRE, V. F.; SARTORI, S. B.; LIRA, S. P.; BIZARRIA JR, R.; RODRIGUES, A.; GONÇALVES DA COSTA, D. R.; AMORIM, M. R.; FERREIRA, A .G.; ANDERSEN, R. J.; LININGTON, R. G.; BERLINCK, R. G. S. Metabolomics reveals a 26-membered macrolactone produced by endophytic *Colletotrichum* spp. from Alcatrazes Island, Brazil. **Organic letters**, Washington, v. 24, n. 51, p. 9381–9385, 2022.
- MOHAMED R.; JONG P. L.; ZALI, M. S. Fungal diversity in wounded stems of *Aquilaria malaccensis*. **Fungal diversity**, New York, v. 43, n. 1, p. 67–74, 2010.
- MOORE, R. E.; SCHEUER, P. J. Palytoxin: a new marine toxin from a Coelenterate. **Science**, Washington, v. 172, n. 3982, p. 495-498, 1970.
- MOOTZ, H. D.; MARAHIEL, M. A. Biosynthetic systems for nonribosomal peptide antibiotic assembly. **Current opinion in chemical biology**, Oxford, v. 1, n. 4, p. 543-551, 1997.

MORAIS, R. P.; LIRA, S. P.; SELEGHIM, M. H. R.; BERLINCK, R. G. S. A method for dextruxin analysis by HPLC-PDA-ELSD-MS. **Journal of the brazilian chemical society**, São Paulo, v. 12, n. 12, p. 2262-2271, 2010.

MÜLLER C. B.; KRAUSS J. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. **Current opinion in plant biology**, London, v. 8, n. 4, p. 450–456, 2005.

NEUVONEN, P. J.; BACKMAN, J. T.; NIEMI, M. Pharmacokinetic comparison of the potential over-the-counter statins simvastatin, lovastatin, fluvastatin and pravastatin. **Clinical pharmacokinetics**, Auckland, v. 47, n. 1, p. 463-474, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, Washington, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NGUYEN, N. T.; KIMURA, A.; NAKAHAMA, T.; CHINEN, I.; MASUDA, K.; NOHARA, K.; FUJII-KIRIYAMA, Y.; KISHIMOTO, T. Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism. **Proceedings of the national academy of sciences**, Minsk, v. 107, n. 46, p. 19961-19966, 2010.

NICACIO, K. J.; IÓCA, L. P.; FRÓES, A. M.; LEOMIL, L.; APPOLINARIO, L. R.; THOMPSON, C. C.; THOMPSON, F. L.; FERREIRA, A. G.; WILLIAMS, D. E.; ANDERSEN, R. J.; EUSTAQUIO, A. S.; BERLINCK, R. G. S. Cultures of the Marine Bacterium *Pseudovibrio denitrificans* Ab134 Produce Bromotyrosine-derived alkaloids previously only isolated from marine sponges. **Journal of natural products**, Washington, v. 80, n. 2, p. 235-240, 2017.

NICOLAOU, K. C.; YANG, Z.; LIU, J. J.; UENO, H.; NANTERMET, P. G.; GUY, R.K.; CLAIBORNE, C. F.; RENAUD, J.; COULADOUROS, E. A.; PAULVANNAN, K.; SORENSEN, E. J. Total synthesis of taxol. **Nature**, Berlin, v. 367, n. 6464, p. 630-634, 1994.

NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography–UV–mass spectrometry methodology. **Journal of chromatography A**, Amsterdam, v. 1002, n. 1, p. 111-136, 2003.

OARG, A. Life in extreme environments. **Revista de biologia e ciências da terra**, Campina Grande, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2009.

O'BRIEN, H. E.; PARRENT, J. L.; JACKSON, J. A.; MONCALVO, J. M.; VILGALYS, R. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **applied and environmental microbiology**, Washington, v. 71, n. 9, p. 5544-5550, 2005.

OGÓREK, R.; DYLAG, M.; KOZAK, B.; VISNOVSKA, Z.; TANCINOVA, S.; LEJMAN, A. Fungi isolated and quantified from bat guano and air in Harmanecka and Driny Caves (Slovakia). **Journal of cave and karst studies**, Huntsville, v. 78, n. 1, p. 41–49, 2016.

OGÓREK, R.; DYLAĞ, M.; VIŠŇOVSKÁ, Z.; TANCINOVÁ, D.; ZALEWSKI, D. Speleomycology of air and rock surfaces in Driny Cave (Lesser Carpathians, Slovakia). **Journal of cave and karst studies**, Huntsville, n. 78, n. 1, p. 119–127, 2016.

OJIMA, I.; HABUS, I.; ZHAO, M.; GEROG, G. I.; JAYASINGHE, L. R. Efficient and practical asymmetric synthesis of the taxol C-13 side chain, N-benzoyl-(2R, 3S)-3-phenylisoserine, and its analogs via chiral 3-hydroxy-4-aryl- β -lactams through chiral ester enolate-imine cyclocondensation. **The journal of organic chemistry**, Washington, v. 56, n. 5, p. 1681-1683, 1991.

ORTEGA, H. E.; TORRES-MENDONZA, D.; CABALLERO, Z.; CUBILLA-RIOS, L. Structurally uncommon secondary metabolites derived from endophytic fungi. **Journal of fungi**, Basel, v. 7, n. 7, p. 570, 2021.

PAULA, C. C. P. de.; MONTOYA, Q. V.; MEIRELLES, L. A.; FARINAS, C. S.; RODRIGUES, A.; SELEGHIM, M. H. R. High cellulolytic activities in filamentous fungi isolated from an extreme oligotrophic subterranean environment (Catão cave) in

Brazil. **Anais da academia brasileira de ciências**, Rio de Janeiro, v. 91, n 3, p. 1-11, 2019.

PAULA, C. C. P. de; MONTOYA, Q. V.; RODRIGUES, A.; BICHUETTE, M. E.; SELEGHIM, M. H. R. Terrestrial filamentous fungi from Gruta do Catão (São Desidério, Bahia, Northeastern Brazil) show high levels of cellulose degradation. **Journal of cave and karst studies**, Huntsville, v. 78, n. 3, p. 208-217, 2016.

PELOSO, E. F.; DIAS, L.; QUEIROZ, R. M.; LEME, A. F.; PEREIRA, C. N.; CARNIELLI, C. M.; WERNECK, C. C.; SOUSA, M. V.; RICART, C. A.; GADELHA, F. R. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial tryparedoxin peroxidase is located throughout the cell and its pull down provides one step towards the understanding of its mechanism of action. **Biochimica et biophysica acta: proteins and proteomics**, Amsterdam, v. 1864, n. 1, p. 1-10, 2016.

PETERSEN, F.; FREDENHAGEN, A.; METT, H.; LYDON, N. B.; DELMENDO, R.; JENNY, H-B.; PETER, H. H. Paecilquinones A, B, C, D, E and F: New Potent Inhibitors of Protein Tyrosine Kinases Produced by *Paecilomyces carneus* I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activity. **The journal of antibiotics**, London, v. 48, n. 3, p. 191-198, 1995.

PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural toxins**, Sussex, v. 1, n. 3, p. 185-196, 1993.

PYE, C. R.; BERTIN, M. J.; LOKEY, R. S.; GERWICK, W. H.; LININGTON, R. G. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. **Proceedings of the national academy of sciences**, Minsk, v. 114, n. 22, p. 5601-5606, 2017.

R.A. HOLTON, Eur. Pat. Appl., EP 0 400 971 A2, 1990.

RAEL, L.T.; BAR-OR, R.; BANTON, K. L.; MAINS, C. W.; ROSHON, M.; TANNER, A. H.; LIESER, M. J.; ACUNA, D. L.; BAR-OR, D. The anti-inflammatory effect of

LMWF5A and *N*-acetyl kynurenine on macrophages: involvement of aryl hydrocarbon receptor in mechanism of action. **Biochemistry and biophysics reports**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p.61-67, 2018.

REKHA, K. J.; BALA, M.; ARYA, V. Endophytic fungus: a potential source of biologically synthesized nanoparticle. **Journal of microbiology**, Seoul, v. 1, n. 1, p. 1– 7, 2013.

RICHARD, J. L. Discovery of aflatoxins and significant historical features. **Toxin reviews**, Philadelphia, v. 27, n. 3-4, p. 171-201, 2008.

RODRÍGUEZ, J. P. G.; BERNARDI, D. I.; GUBIANI, J. R.; OLIVEIRA, J. M.; MORAIS-URANO, R. P.; BERTONHA, A. F.; BANDEIRA, K. F.; BULLA, J. I. Q.; SETTE, L. D.; FERREIRA, A. G.; BATISTA, J. M.; SANTOS, R.; MARTINS, C. H.; DESSEN, A.; TRIVELLA, D. B. B.; CICCONE, D. M.; BROCCHI, M.; BERLINCK, R.G S. Water-soluble glutamic acid derivatives produced in culture by *Penicillium Solitum* IS1-A from King George Island, Maritime Antarctica. **Journal of natural products**, Washington, n. 83, n. 1, p. 55-65, 2020.

ROLLINS-SMITH, L. A.; FITES, J. S.; REINERT, L. K.; SHIAKOLAS, A. R.; UMILE, T. P.; MINBIOLE, K. P.C. Immunomodulatory metabolites released by the frog-killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Infection and immunity**, Washington, v. 83, n. 12, p. 4565-4570, 2015.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; VARGA, J.; FRISVAD, J. C. Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssochlamys* and its *Paecilomyces* anamorphs. **Persoonia-molecular phylogeny and evolution of fungi**, Leiden, v. 22, n. 1, p. 14-27, 2009.

SAMSON, R. A.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S-B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; SUSCA, A.; TANNEY J. B.; VARGA, J.; KOCSUBÉ S.; SZIGETI G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J. C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in mycology**, Utrecht, v. 78, n. 1, p. 141-173, 2014.

SANTOS, M. F.; HARPER, P. M.; WILLIAMS, D. E.; MESQUITA, J. T.; PINTO, E. G.; DA COSTA-SILVA, T. A.; HADJU, E.; HARPER, P. M.; MURPHY, P. J.; MESQUITA, J. T.; ANDERSEN, R. J.; BERLICK, R. G. S. Anti-parasitic guanidine and pyrimidine alkaloids from the marine sponge *Monanchora arbuscula*. **Journal of natural products**, Washington, v. 78, n. 5, p. 1101-1112, 2015.

SANTOYOYA, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; OROZCO-MOSQUEDA, M. C.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological research**, Munich, v. 183, n. 1, p. 92–99, 2016.

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

SCHABORT, J. C.; e ROBERTS, H. A. Effect of versicolorin C, rosenonolactone and cyclopiazonic acid on bovine pancreas deoxyribonuclease. **Biochemical pharmacology**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 243-246, 1971.

SCHEELE, B. C.; PASMANS, F.; SKERRATT, L. F.; BERGER, L.; MARTEL, A.; BEUKEMA, W.; ACEVEDO, A. A.; BURROWES, P. A.; CARVALHO, T.; CATENAZZI, A.; LA RIVA, I de.; FISHER, M. C.; FLECHAS, S. V.; FOSTER, C. N.; FRÍAS-ÁLVAREZ, P.; GARNER, T. W. J.; GRATWICKE, B.; GUAYASAMIN, J. M.; HIRSCHFELD, M.; KOLBY, J. E.; KOSCH, T. A.; LA MARCA, E.; LINDENMAYER, D. B.; LIPS, K. R.; LONGO, A. V.; MANEYRO, R.; MCDONALD, C. A.; MENDELSON III, J.; PALACIOS-RODRIGUEZ, P.; PARRA-OLEA, G.; RICHARDS-ZAWACKI, C.; RÖDEL, M-O.; ROVITO, S. M.; SOTO-AZAT, C.; TOLEDO, L. F.; VOYLES, J.; WELDON, C.; WHITFIELD, S. M.; WILKINSON, M.; ZAMUDIO, K. R.; CANESSA, S. Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. **Science**, Washington, v. 363, n. 6434, p. 1459-1463, 2019.

SCHIFF, P. B.; FANT, J.; HORWITZ, S. B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. **Nature**, Berlin, v. 277, n. 5698, p. 665-667, 1979.

SCHIFF, P. B.; HORWITZ, S. B. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. **Proceedings of the national academy of sciences**, Washington, v. 77, n. 3, p. 1561-1565, 1980.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A. K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological research**, Kidlington, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A. K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological research**, Kidlington, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

SEDLOCK, D. M.; SUN, H. H.; SMITH, W. F.; KAWAOKA, K.; GILLUM, A. M.; COOPER, R. Rapid identification of teleocidins in fermentation broth using HPLC photodiode array and LC/MS methodology. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 45-52, 1992.

SEGURA, L.; VILA, R.; GUPTA, M. P.; ESPÓSITO-AVELLA, M.; ADZET, T.; CAÑIGUERAL, S. Antiinflammatory activity of *Anthurium cerrocampaense* Croat in rats and mice. **Journal of ethnopharmacology**, Clare, v. 61, n. 3, p. 243-248, 1998.

SHIER, W. T.; LAO, Y.; STEELE, T. W. J.; ABBAS, H. K. Yellow pigments used in rapid identification of aflatoxin-producing *Aspergillus* strains are anthraquinones associated with the aflatoxin biosynthetic pathway. **Bioorganic chemistry**, San Diego, v. 33, n. 6, p. 426-438, 2005.

SHIMIZU, Y. Bioactive marine natural products, with emphasis on handling of water-soluble compounds. **Journal of natural products**, Washington, v. 48, n. 2, p. 223-235, 1985.

SHOTWELL, O. L.; HESSELTINE, C. W.; STUBBLERFIELD, R. D.; SORENSON, W. G. Production of aflatoxin on rice. **Applied microbiology**, New York, v. 14, n. 3, p. 425-428, 1966.

SINCLAIR, J. B.; CERKAUSKAS, R. F. Latent infection vs. endophytic colonization by fungi. *In*: REDLIN, S. C.; CARRIS, L. M. (ed.). **Endophytic fungi in grasses and woody plants: systematics, ecology, and evolution**. Saint Paul: APS Press, 1996. p. 3–29.

SOLIMAN, S. S. M.; RAIZADA, M. N. Interactions between co-habiting fungi elicit synthesis of Taxol from an endophytic fungus in host *Taxus* plants. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 4, n.1, p. 3, 2013.

STEYN, P.; VLEGGAR, R.; WESSELS, P.; SCOTT, D. B. Biosynthesis of versiconal acetate, versiconol acetate, and versiconol, metabolites from cultures of *Aspergillus parasiticus* treated with dichlorvos. The role of versiconal acetate in aflatoxin biosynthesis. **Journal of the chemical society, perkin transactions 1**, Cambridge, v. 1, n. 1, p. 460-463, 1979.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D.; GROTHAUS, P.; BIGNAMI, G. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. **Journal of natural products**, Washington, v. 58, n. 9, p. 1315-1324, 1995.

STOMEIO, F.; ELLERSDORFER, G.; STERFLINGER, K; GONZALEZ, J. M.; SAIZ-JIMENEZ, C. A preliminar survey on the fungi of Doña Trinidad Cave, Ardales, Malaga, Spain. *In*: **Current research topics in applied microbiology and microbial biotechnology**, Sevilla, p. 153-156, 2009.

STONE, J. K.; BACON, C. W.; WHITE, J. F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. *In*: BACON, C. W.; WHITE, J. F. (ed.). **Microbial endophytes**. New York: Marcel Dekker, 2000. p. 3-29.

STONE, T. W.; DARLINGTON, L. G. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. **Nature reviews drug discovery**, Berlin, v. 1, n. 8, p. 609-620, 2002.

SU, Y. Y.; GUO, L. D.; HYDE, K. D. Response of endophytic fungi of *Stipa grandis* to experimental plant function group removal in Inner Mongolia steppe, China. **Fungal diversity**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 93–101, 2010.

SUN, X.; GUO, L. D.; HYDE, K. D. Community composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. **Fungal diversity**, Oxford, v. 47, n. 1, p. 85–95, 2011.

SURYANARAYANAN, T. S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; HARIHARAN, G. N.; BALAJI, P. Occurrence of non-obligate microfungi inside lichen thalli. **Sydowia**, Horn, v. 57, n. 1, p. 119–129, 2005.

SZLISZKA, E.; KROL, W. Polyphenols isolated from propolis augment TRAIL-induced apoptosis in cancer cells. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, London, v. 2013, n.1, p. 1-10, 2013.

TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; MAGAN, N. *Aspergillus* species and mycotoxins: occurrence and importance in major food commodities. **Current opinion in food science**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 38-43, 2018.

TAVARES, D. G.; BARBOSA, B. V. L.; FERREIRA, R. L.; DUARTE, W. F.; CARDOSO, P. G. Antioxidant activity and phenolic compounds of the extract from pigment-producing fungi isolated from Brazilian caves. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 148-154, 2018.

TAYLOR, E. L. S.; FERREIRA, G. F.; DE FREITAS, G. J. C.; FERREIRA, R. L.; SANTOS, D. A.; RESENDE-STOIANOFF, M. A. Screening of antifungal susceptibility in cave-dwelling aspergilli and report of an amphotericin B-resistant *Aspergillus flavus*. **International journal of speleology**, Bologna, v. 46, n. 3, p. 369-378, 2017.

TIAN, Y-Q.; LIN, S-T.; KUMARAVEL, K.; ZHOU, H.; WANG, S-Y.; LIU, Y-H. Polyketide-derived metabolites from the sponge-derived fungus *Aspergillus* sp. F40. **Phytochemistry letters**, Amsterdam, v. 27, n. 1, p. 74-77, 2018.

TORRES, A. M.; BARROS, G. G.; PALACIOS, S. A.; CHULZE, S. N.; BATTILANI, P. Review on pre-and post-harvest management of peanuts to minimize aflatoxin contamination. **Food research international**, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 11-19, 2014.

TSUCHIYA, K.; KOBAYASHI, S.; KUROKAWA, T.; NAKAGAWA, T.; SHIMADA, N.; NAKAMURA, H.; ITAKA, Y.; KITAGAWA, N.; TATSUTA, K. Gualamycin, a novel acaricide produced by *Streptomyces* sp. NK11687. **The journal of antibiotics**, London, v. 48, n. 7, p. 630-634, 1995.

WANG, M.; SUN, M.; HAO, H.; LU, C. Avertoxins A–D, prenyl asteltoxin derivatives from *Aspergillus versicolor* Y10, an endophytic fungus of *Huperzia serrata*. **Journal of natural products**, Washington, v. 78, n. 12, p. 3067-3070, 2015.

WANG, Y.; LIU, H.; MCKENZIE, G.; WITTING, P. K.; STASCH, J-P.; HAHN, M.; CHANGSIRIVATHANATHAMRONG, D.; WU, B. J.; BALL, H. J.; THOMAS, S. R.; KAPOOR, V.; CELERMAJER, D. S.; MELLOR, A. L.; KEANEY, J. F.; HUNT, N. H.; STOCKER, R. Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation. **Nature medicine**, Berlin, v. 16, n. 3, p. 279-286, 2010.

WU, Y-Z.; ZHANG, H-W.; SUN, Z-H.; DAI, J-G.; HU, Y-C.; LI, R.; LIN, P-C.; XIA, G-Y.; WANG, L-Y.; QIU, B-L.; ZHANG, J-F.; GE, G-B.; LIN, S. Bysspectin A, an unusual octaketide dimer and the precursor derivatives from the endophytic fungus *Byssochlamys spectabilis* IMM0002 and their biological activities. **European journal of medicinal chemistry**, Issy-les-Moulineaux, v. 145, n. 1, p. 717-725, 2018.

YABE, K.; ANDO, Y.; HAMASAKI, T. A metabolic grid among versiconal hemiacetal acetate, versiconol acetate, versiconol and versiconal during aflatoxin biosynthesis. **Microbiology**, New York, v. 137, n. 10, p. 2469-2475, 1991.

YABE, K.; NAKAJIMA, H. Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis. **Applied microbiology and biotechnology**, New York, v. 64, n. 1, p. 745-755, 2004.

YANG, Y-H.; YANG, D-S.; LI, G-H.; PU, X-J.; MO, M-H.; ZHAO, P-J. Antibacterial diketopiperazines from an endophytic fungus *Bionectria* sp. Y1085. **The journal of antibiotics**, London, v. 72, n. 10, p. 752-758, 2019.

YILMAZ, N.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. **Studies in mycology**, Utrecht, v. 78, n. 1, p. 175-341, 2014.

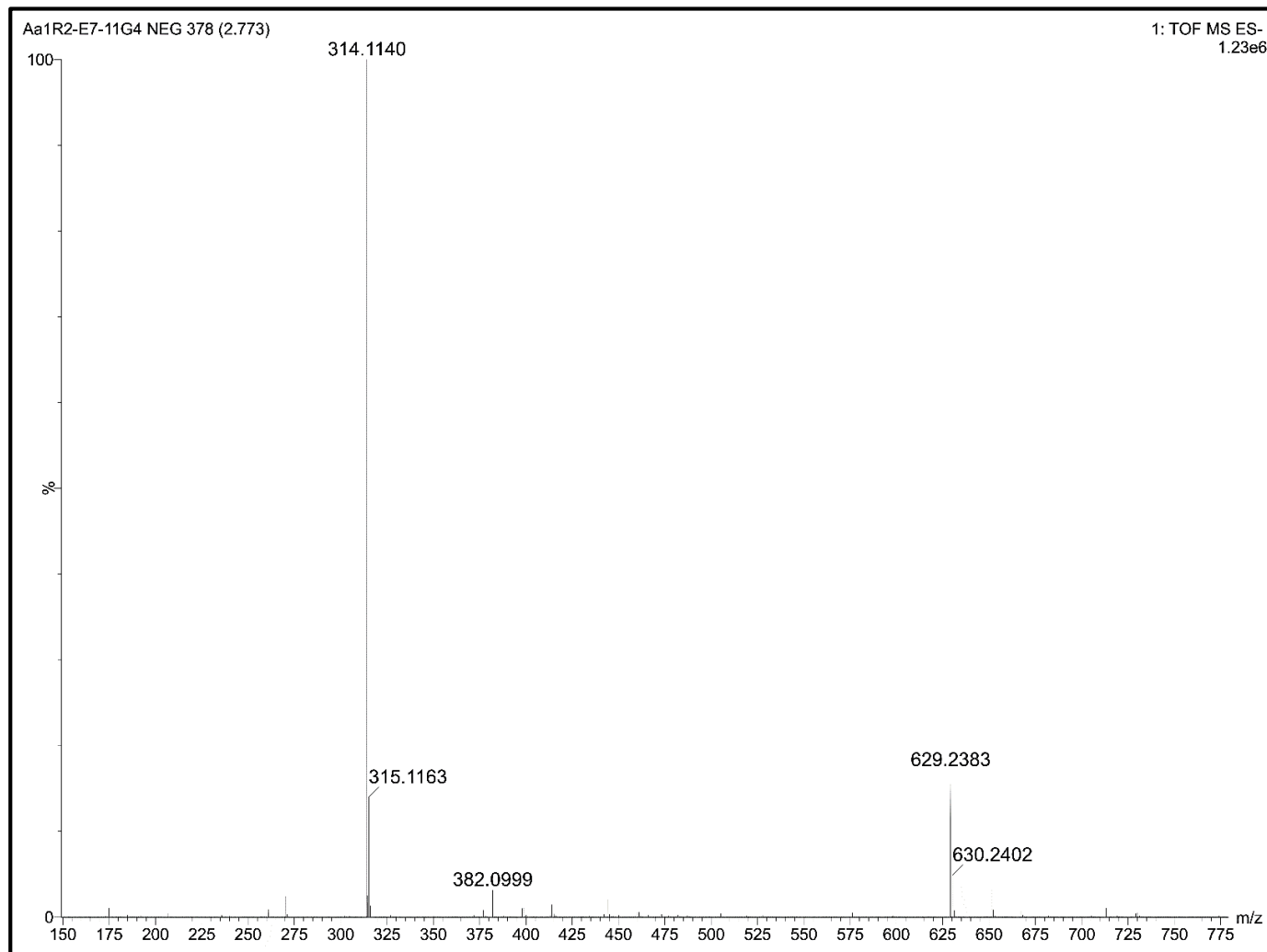
YU, J.; WHITELAW, C. A.; NIERMAN, W. C.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E. *Aspergillus flavus* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in aflatoxin contamination of crops. **FEMS microbiology letters**, Oxford, v. 237, n. 2, p. 333-340, 2004.

ZAULI - NASCIMENTO, R. C.; MIGUEL, D. C.; YOKOYAMA - YASUNAKA, J. K.; PEREIRA, L. I.; PELLI DE OLIVEIRA, M. A.; RIBEIRO - DIAS, F.; ULIANA, S. R. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. **Tropical medicine & international health**, Hoboken, v. 15, n. 1, p. 68-76, 2010.

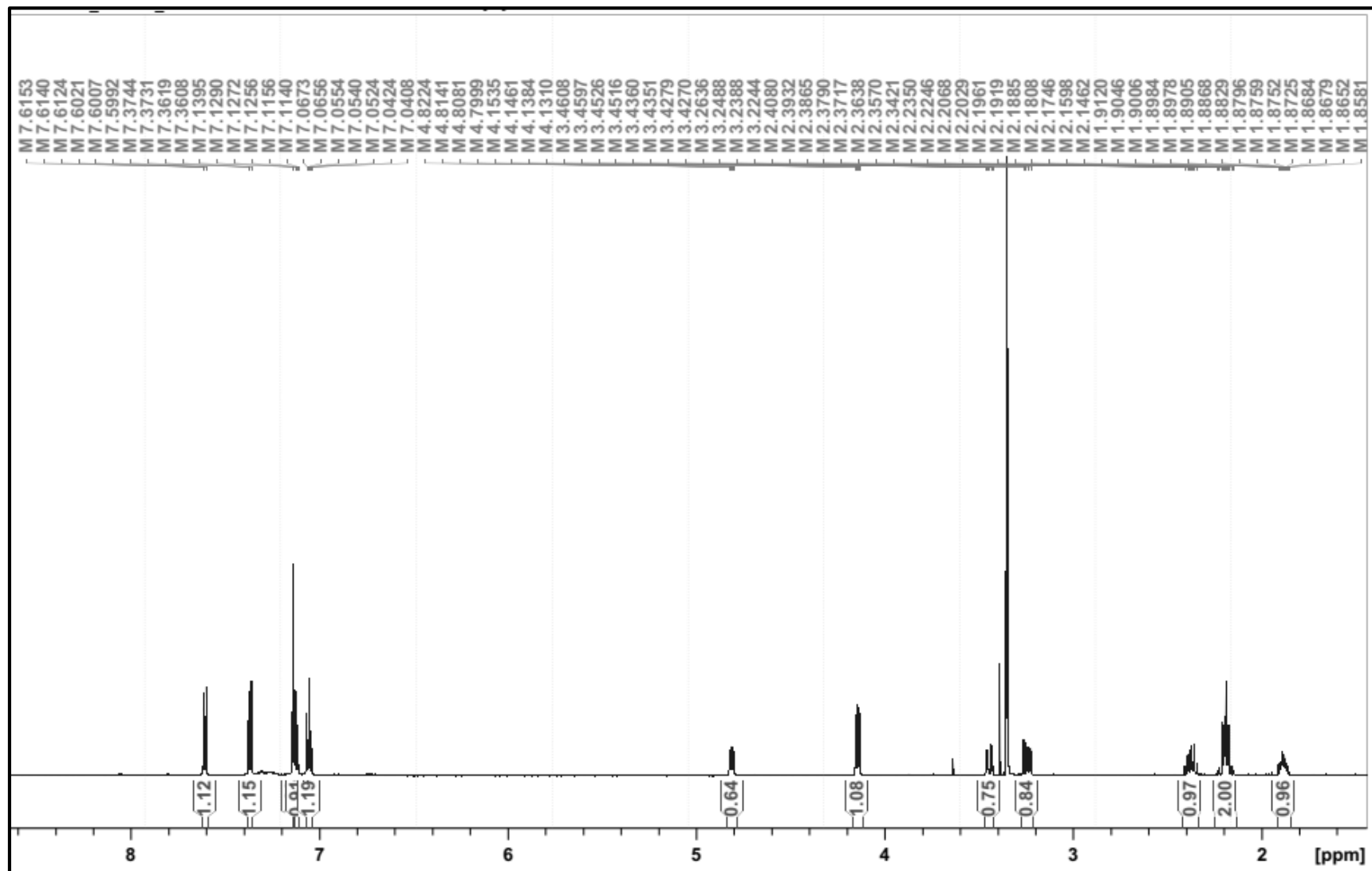
ZHENG R. Y.; JIANG, H. *Rhizomucor endophyticus* sp. nov., an endophytic zygomycetes from higher plants. **Mycotaxon**, Hythaca, v. 56, n. 1, p. 455-466, 1995.

ANEXOS

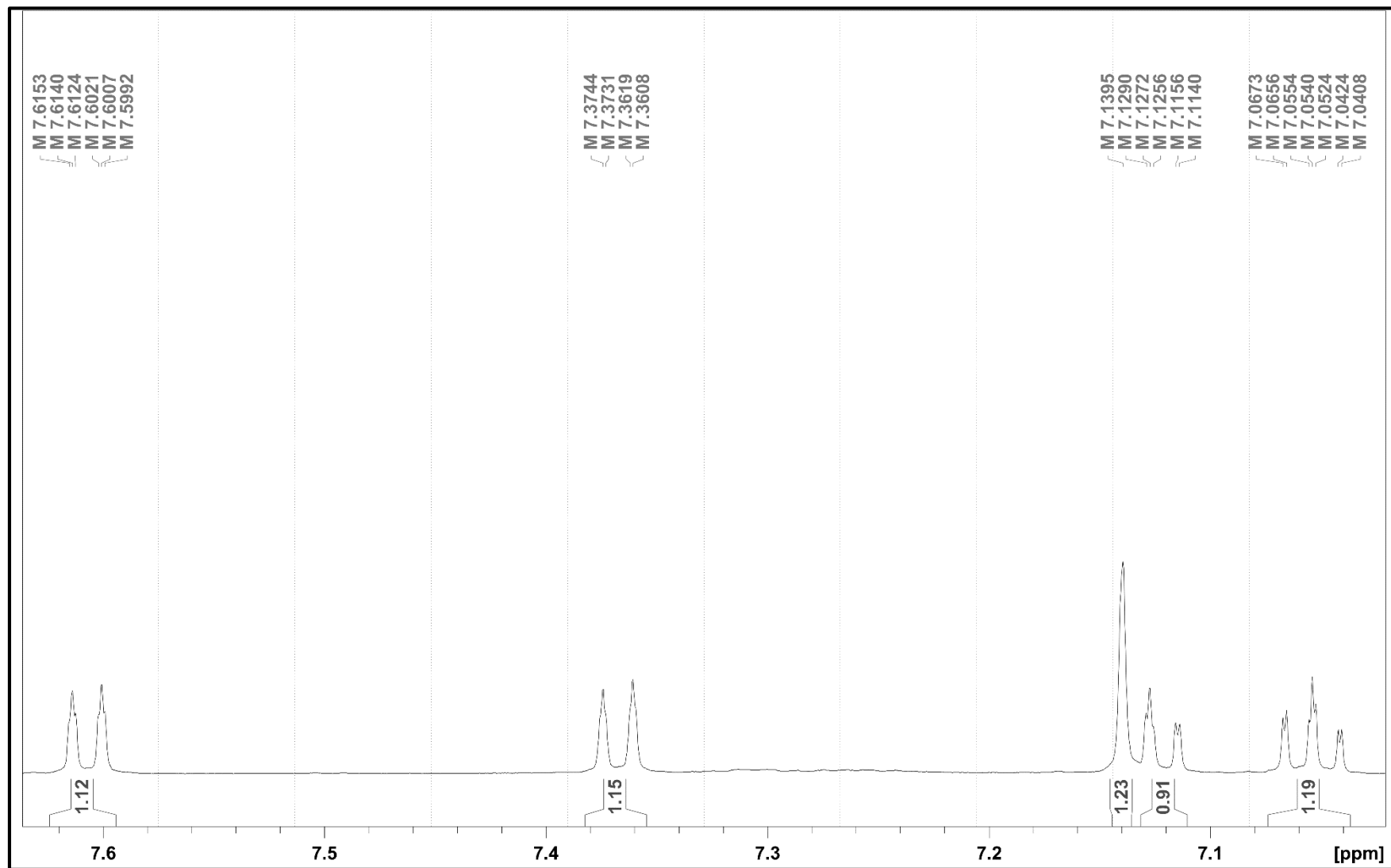
Anexo 1: Espectro de massas de alta resolução (ESI-) de **Aa1R2E7-11G4**.



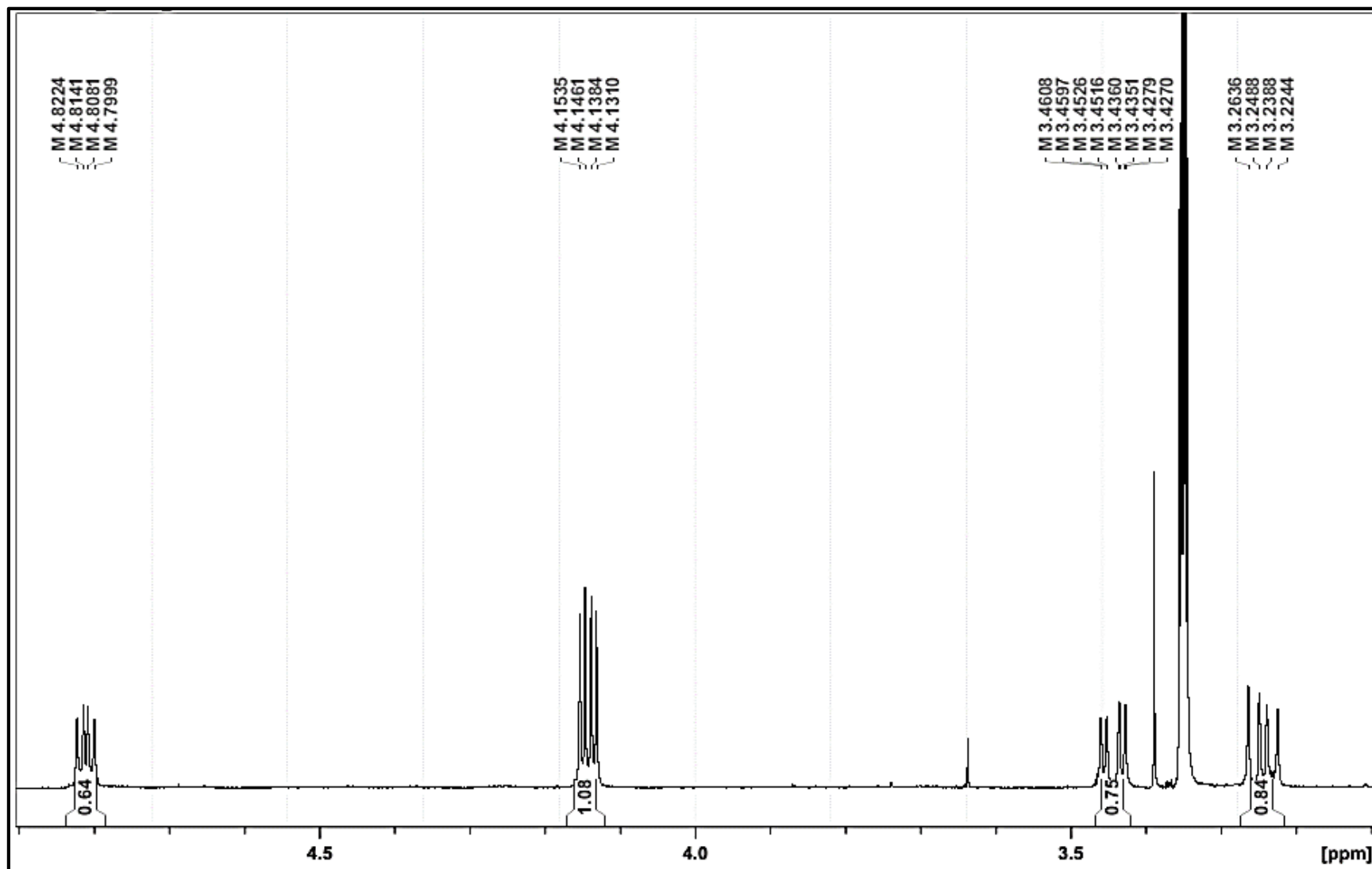
Anexo 2: Espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para Aa1R2E7-11G4.



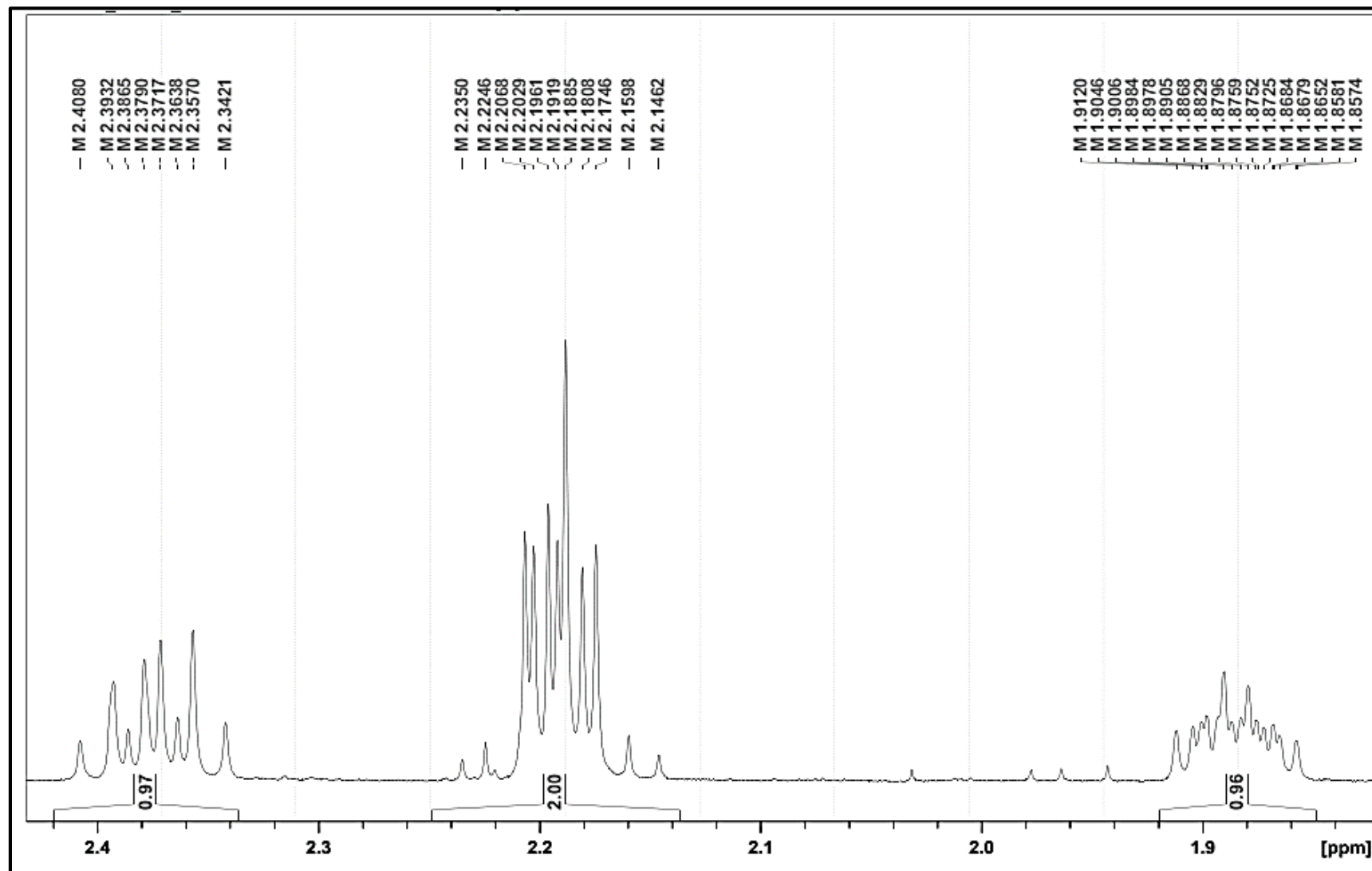
Anexo 3: Expansão do espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para Aa1R2E7-11G4.



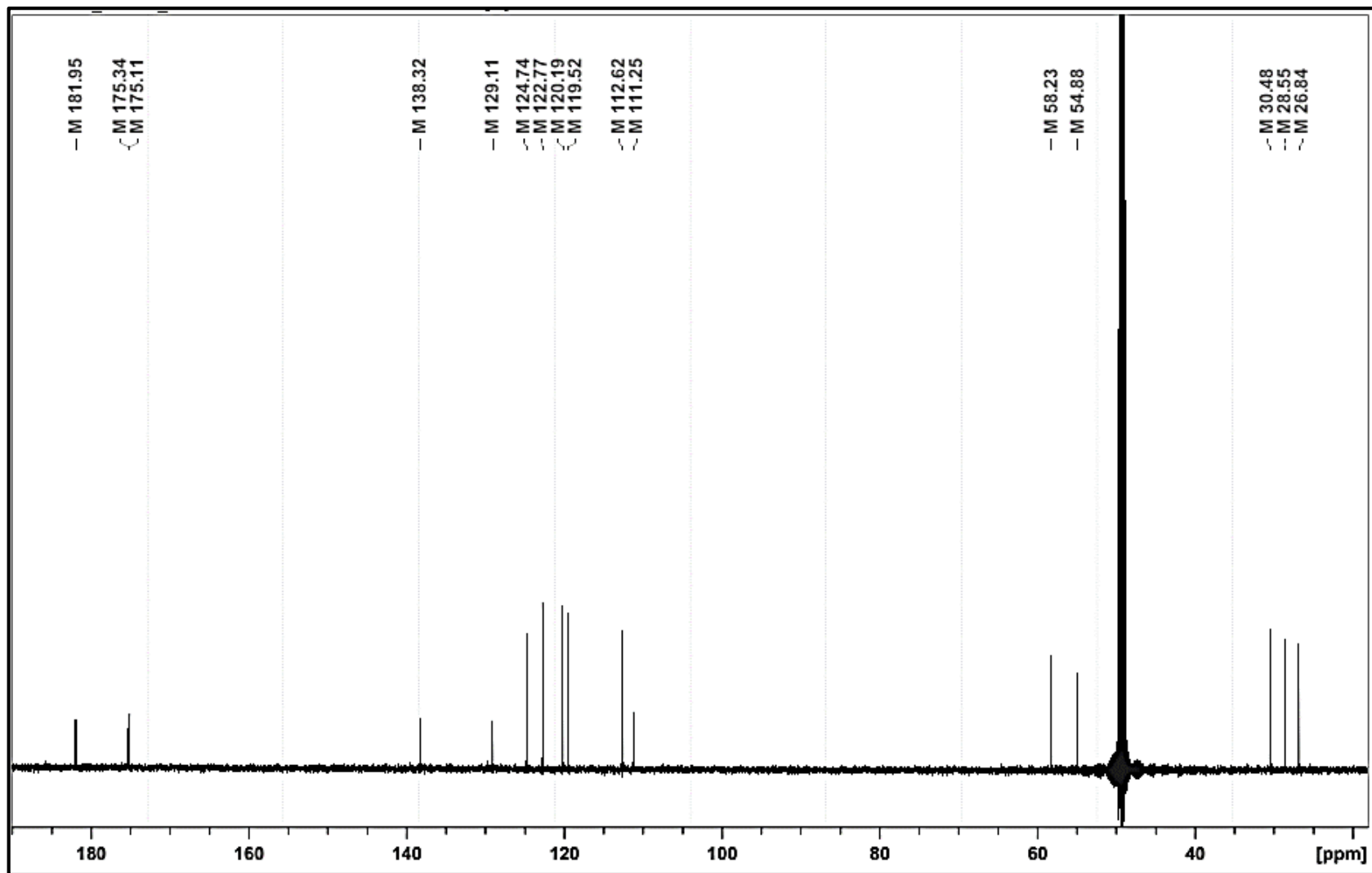
Anexo 4: Expansão do espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para Aa1R2E7-11G4.



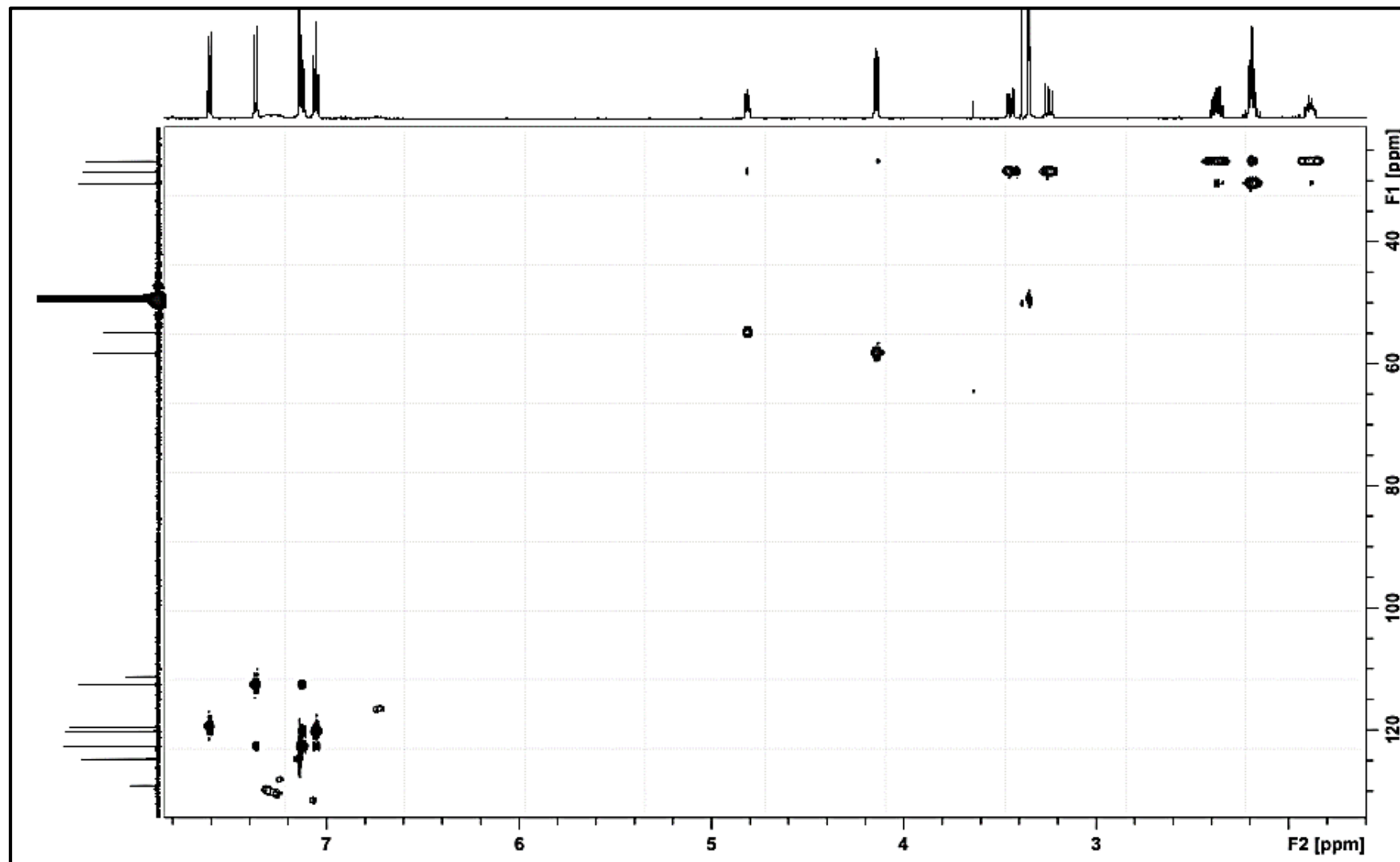
Anexo 5: Expansão do espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para Aa1R2E7-11G4.



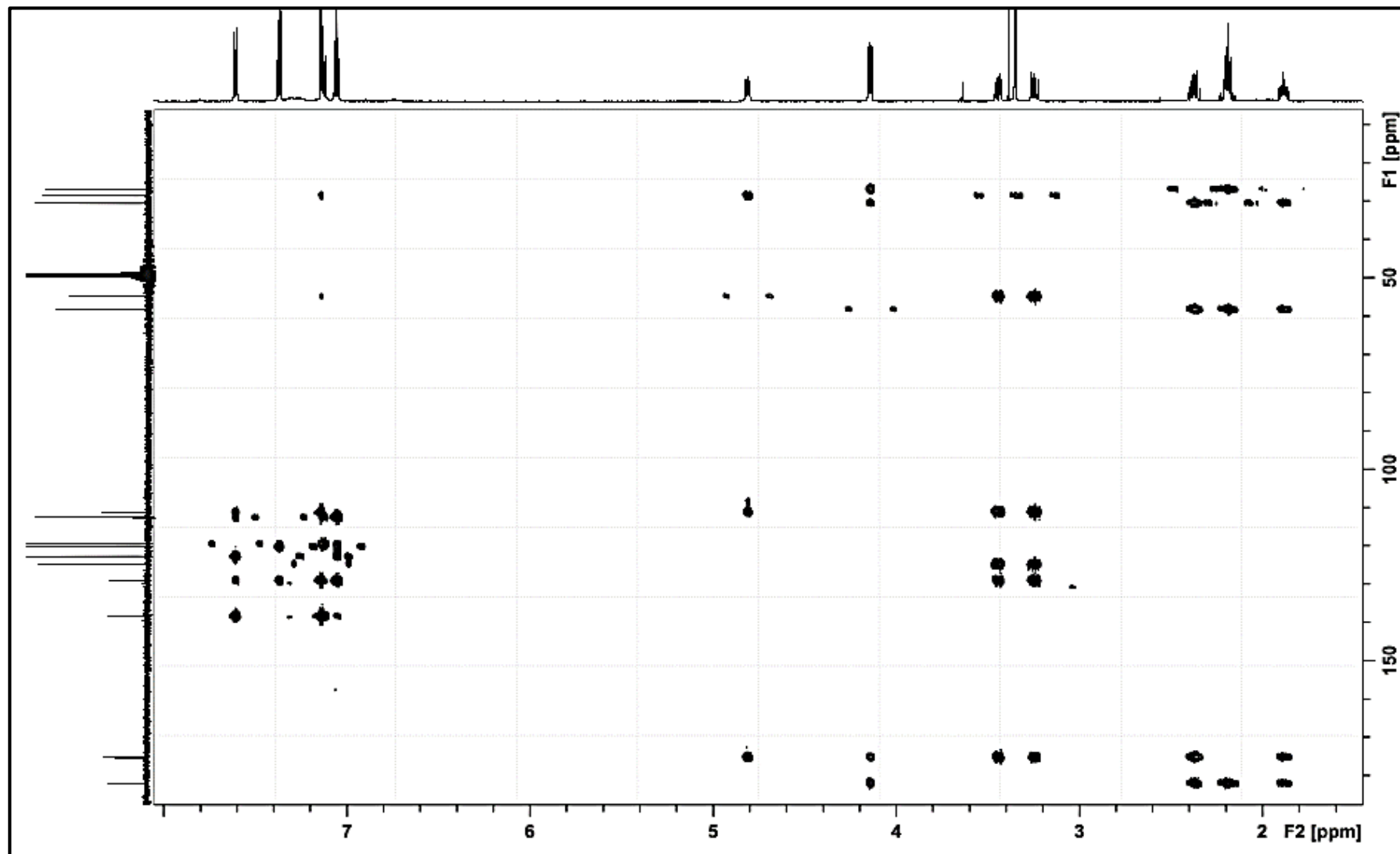
Anexo 6: Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) obtido para Aa1R2E7-11G4.



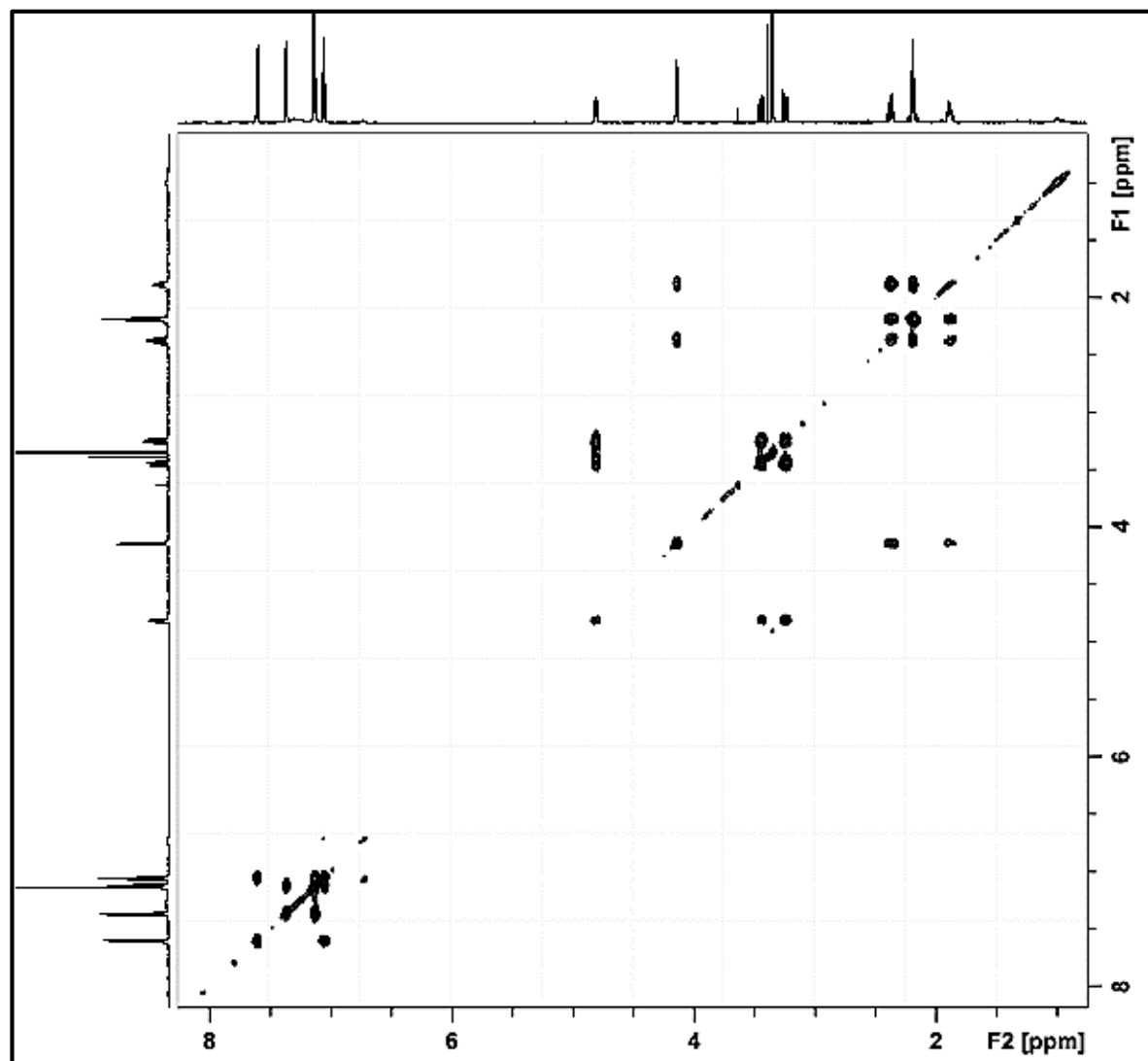
Anexo 7: Espectro de HSQC obtido para Aa1R2E7-11G4.



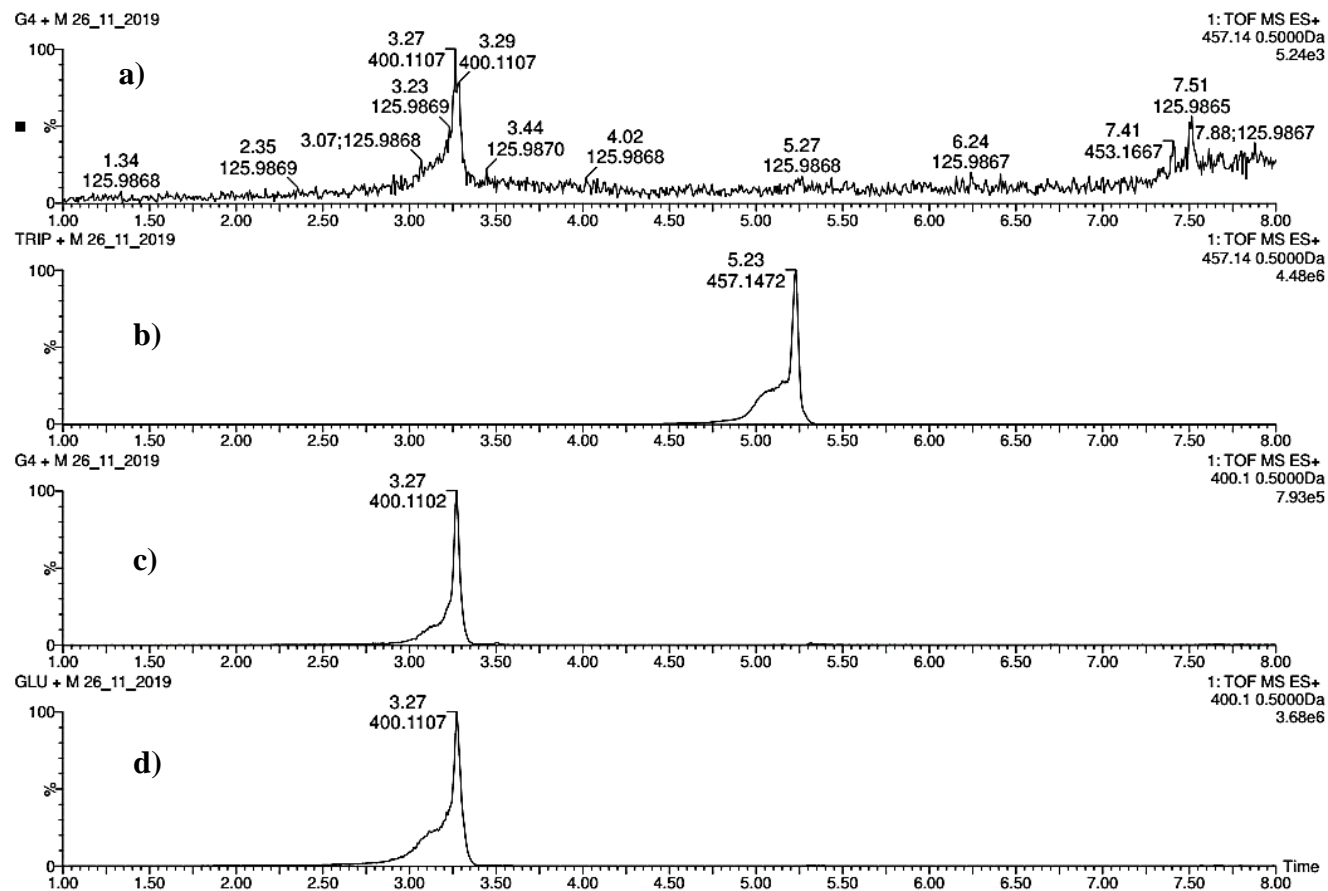
Anexo 8: Espectro de HMBC obtenido para Aa1R2E7-11G4.



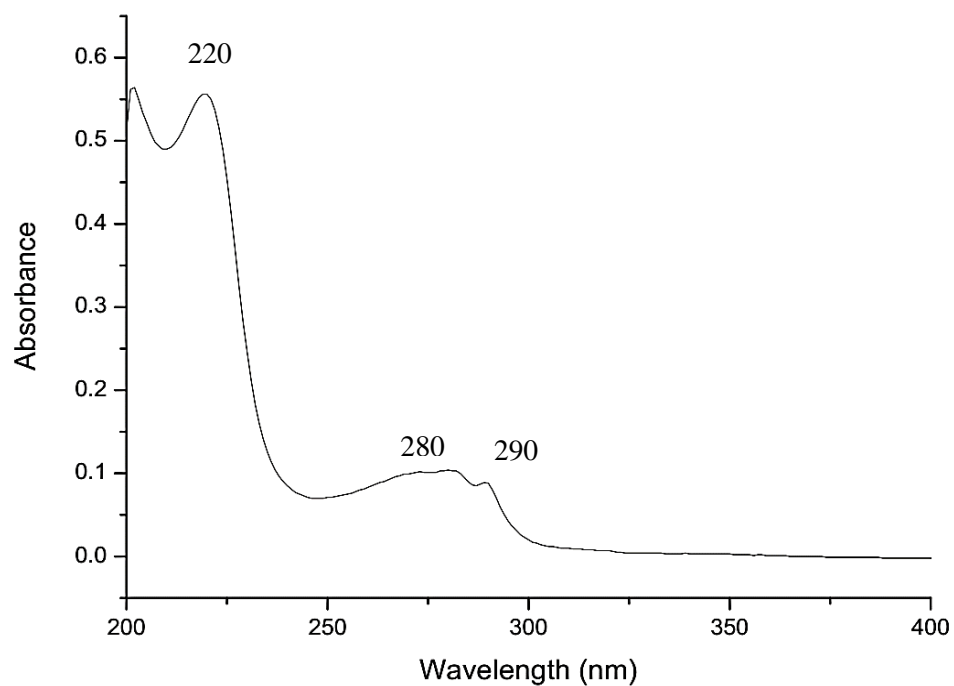
Anexo 9: Espectro de COSY obtenido para Aa1R2E7-11G4.



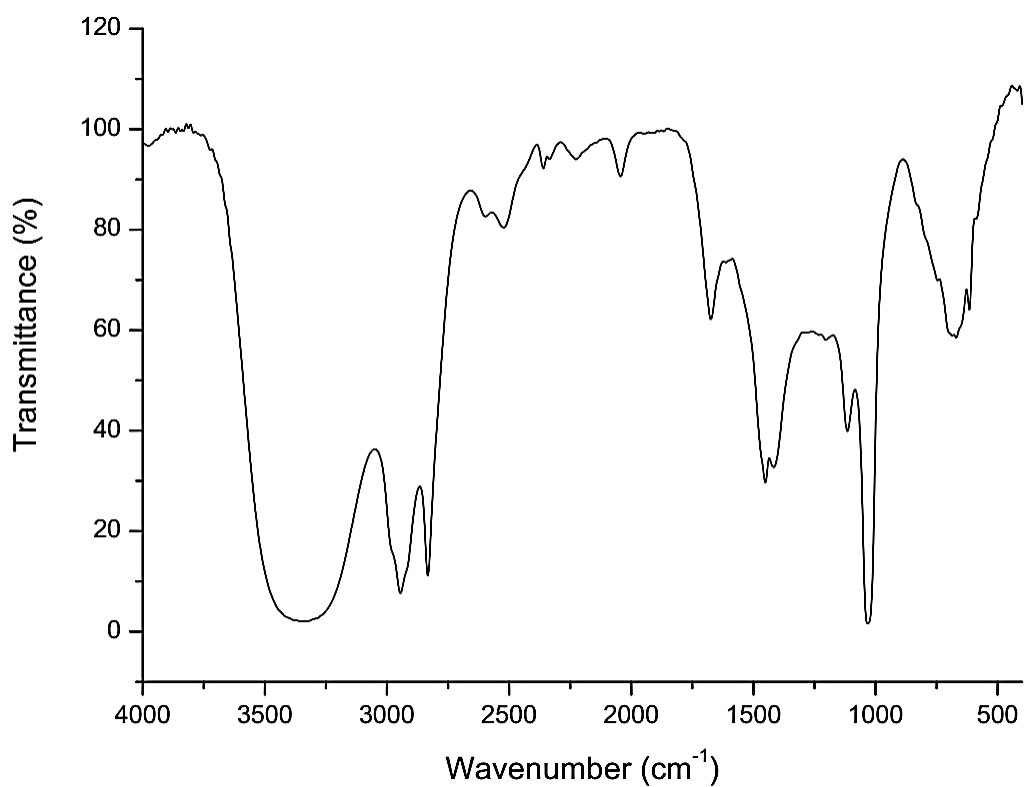
Anexo 10: Análise de Marfey de **Aa1R2E7-11G4**. Análise por LC-MS dos derivados de *L*-FDAA de a) hidrolisado de **Aa1R2E7-11G4**, b), Triptofano (EIC m/z 457,14), c) hidrolisado de **Aa1R2E7-11G4** (EIC m/z 400,11) e d) ác. Glutâmico (EIC m/z 400,11)



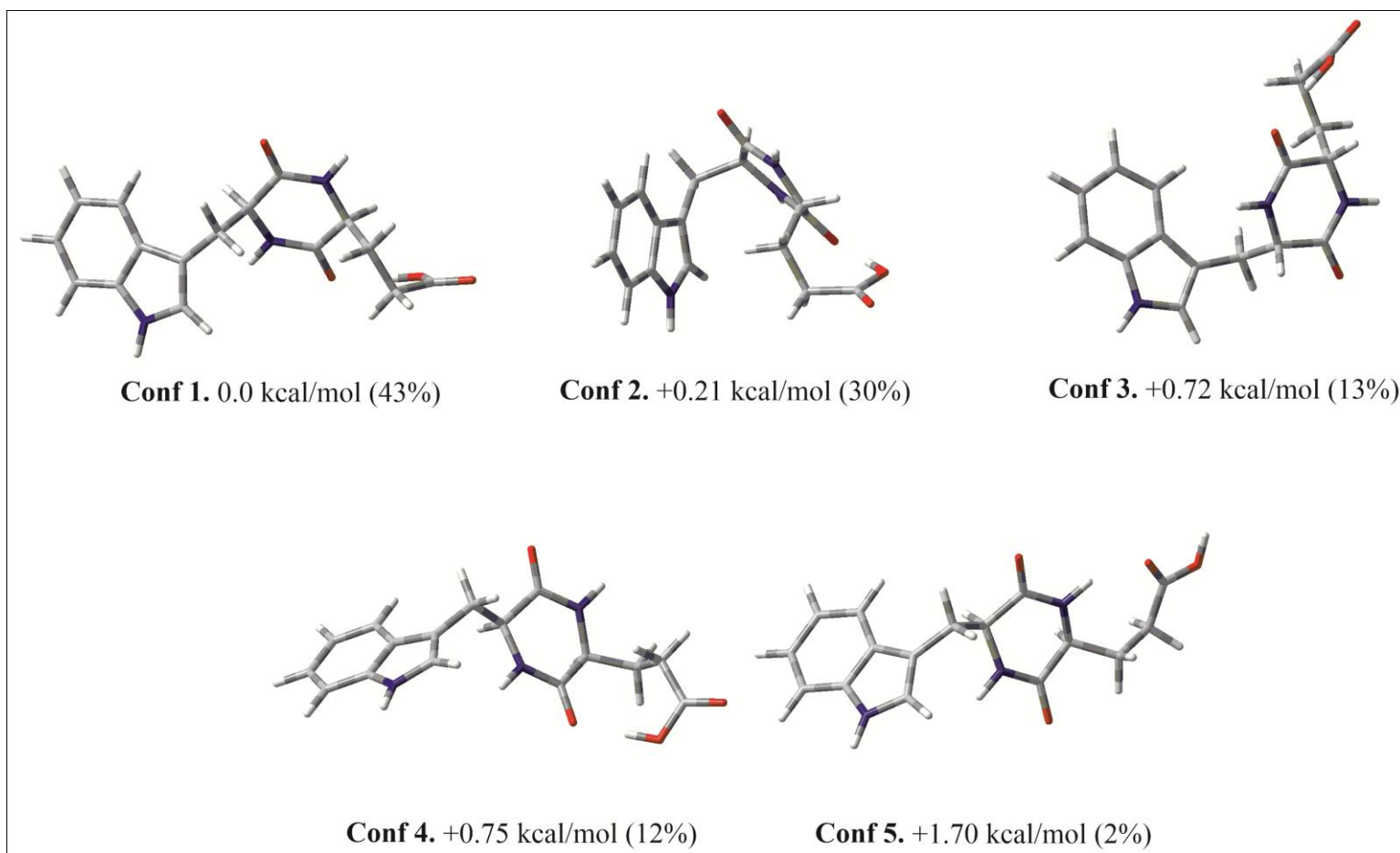
Anexo 11: Espectro de UV em MeOH da *ciclo*-(Trp-Glu) (**68**)



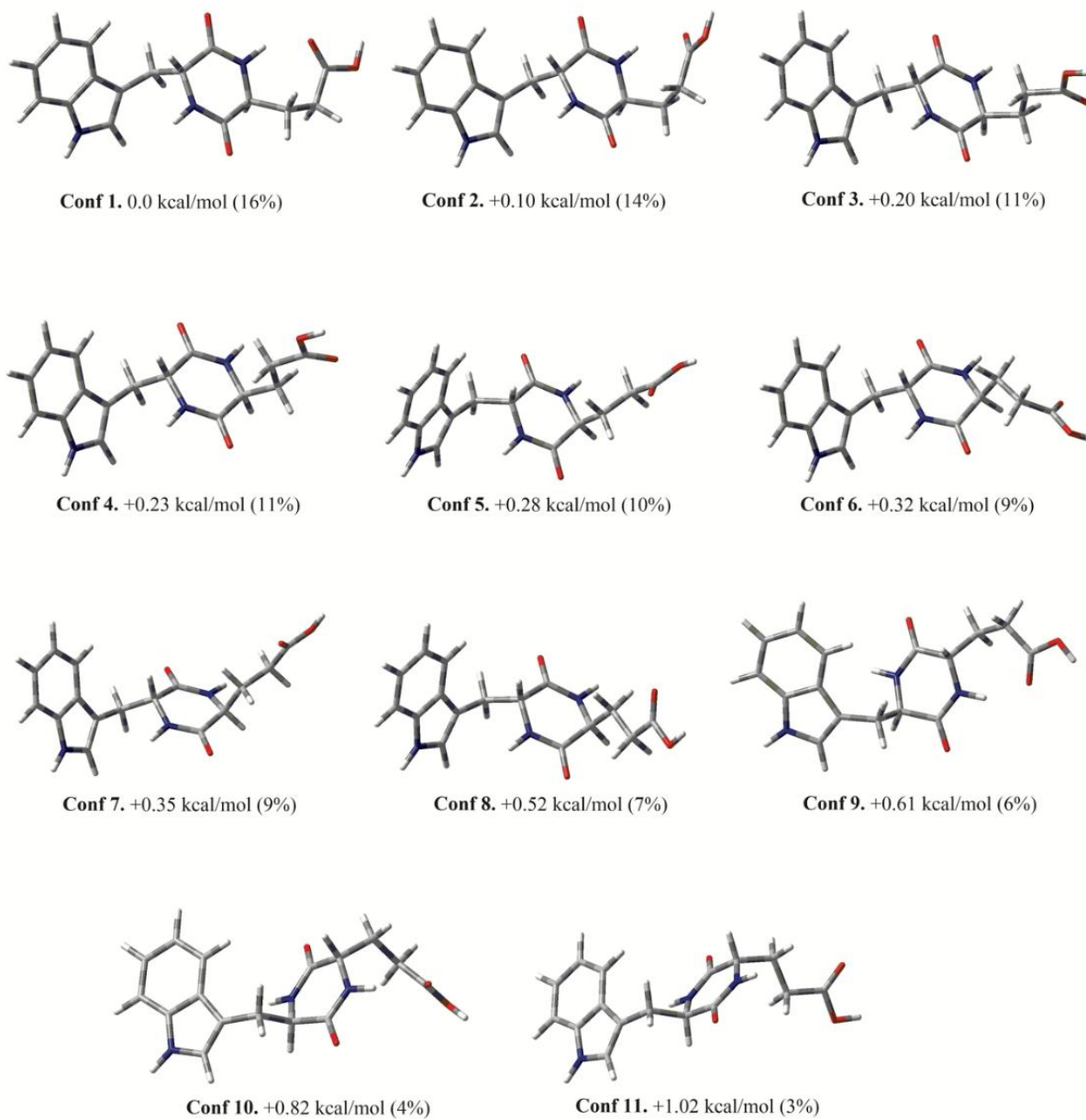
Anexo 12: Espectro de FTIR da *ciclo*-(Trp-Glu) (**68**) obtido em placa de sílica



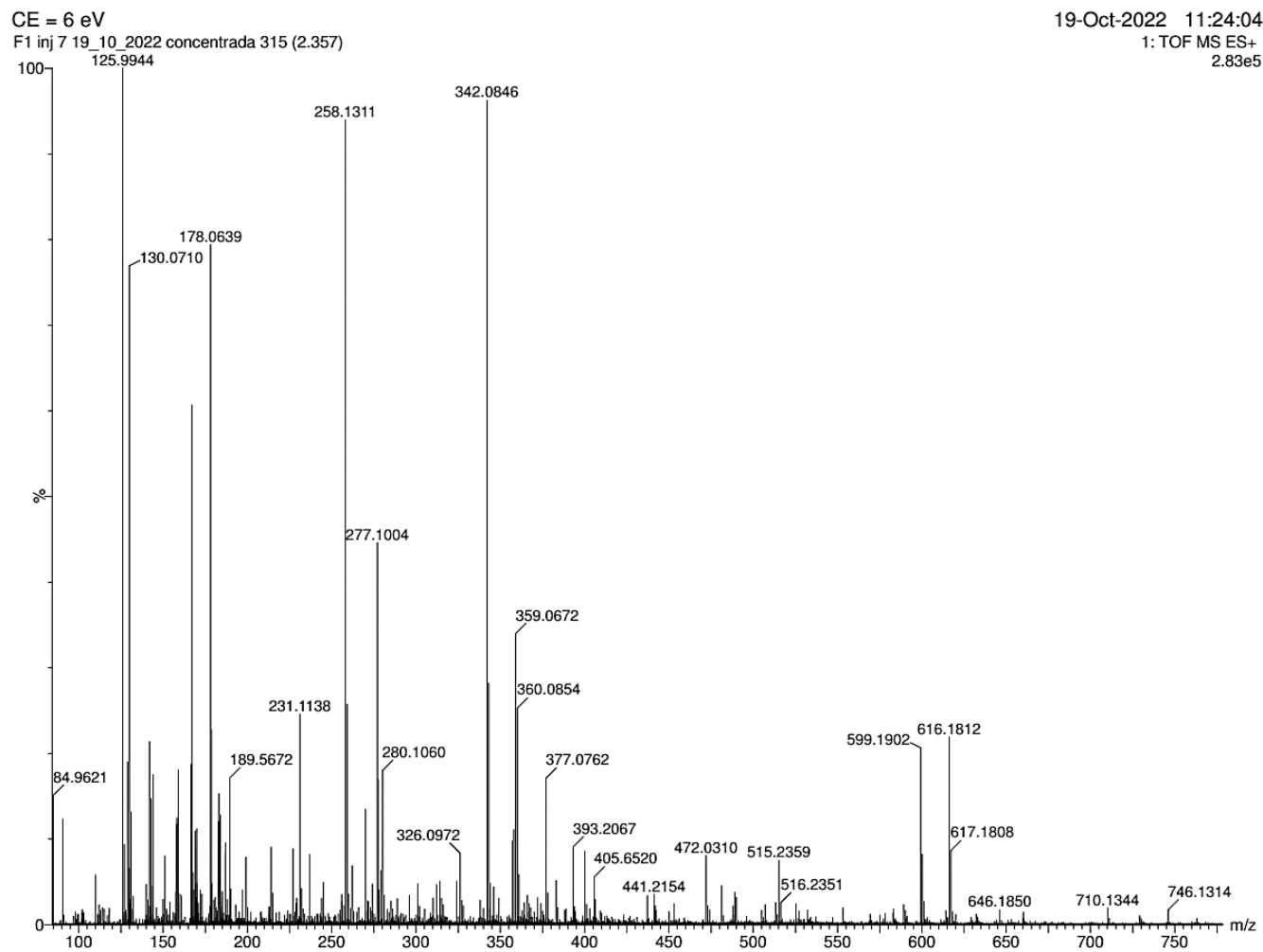
Anexo 13: Estruturas otimizadas [B3LYP/PCM(MeOH)/6-31G(d)], energias relativas e populações de Boltzmann dos conformêros de menor energia de (3*S*,6*S*)-(68) selecionados para cálculos de UV/ECD no CAM-B3LYP/PCM (MeOH)/nível TZVP.



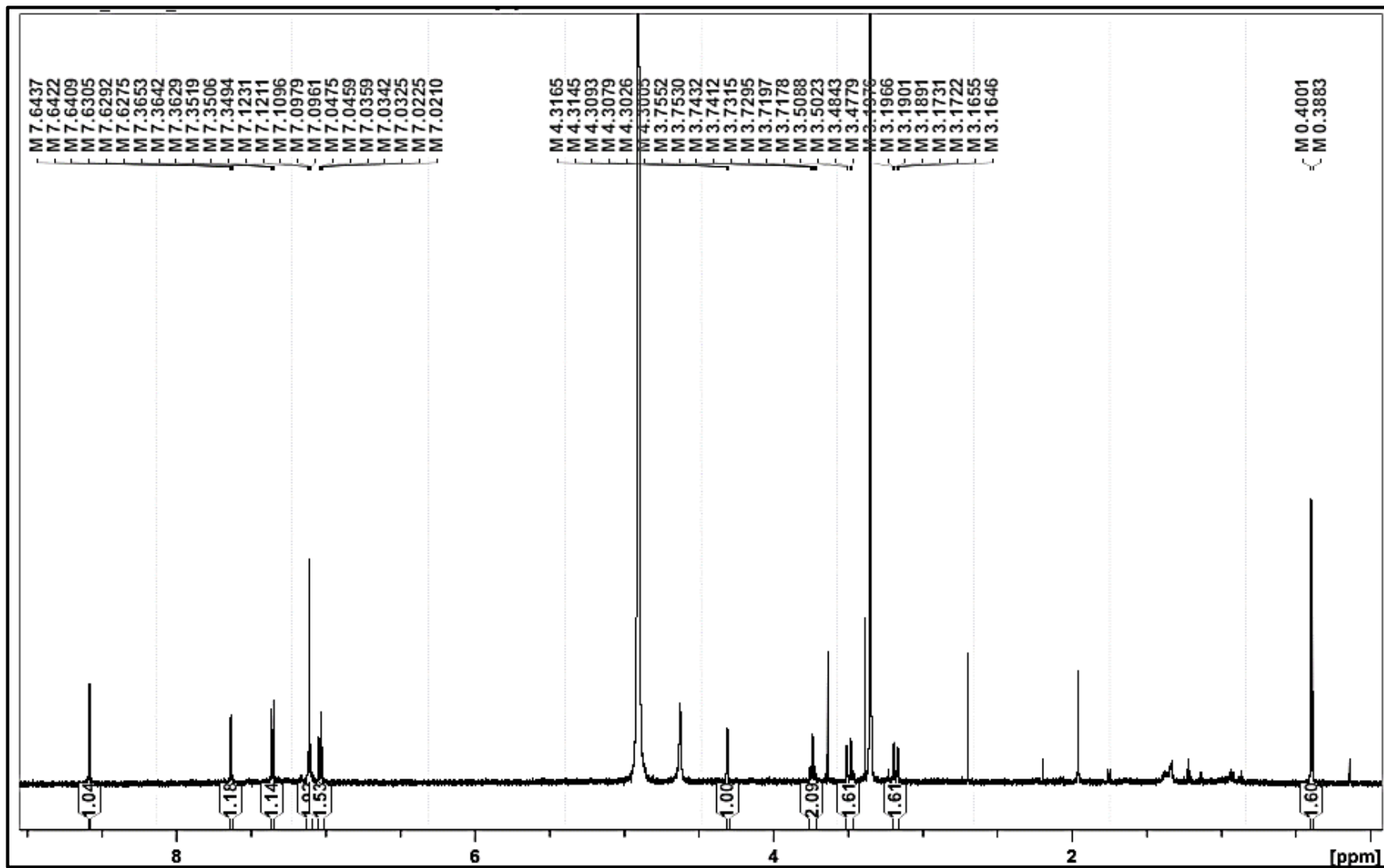
Anexo 14: Estruturas otimizadas [B3LYP/PCM(MeOH)/6-31G(d)], energias relativas e populações de Boltzmann dos conformêros de menor energia de (3*R*,6*S*)-(68) selecionados para cálculos de UV/ECD no CAM-B3LYP/PCM (MeOH)/nível TZVP



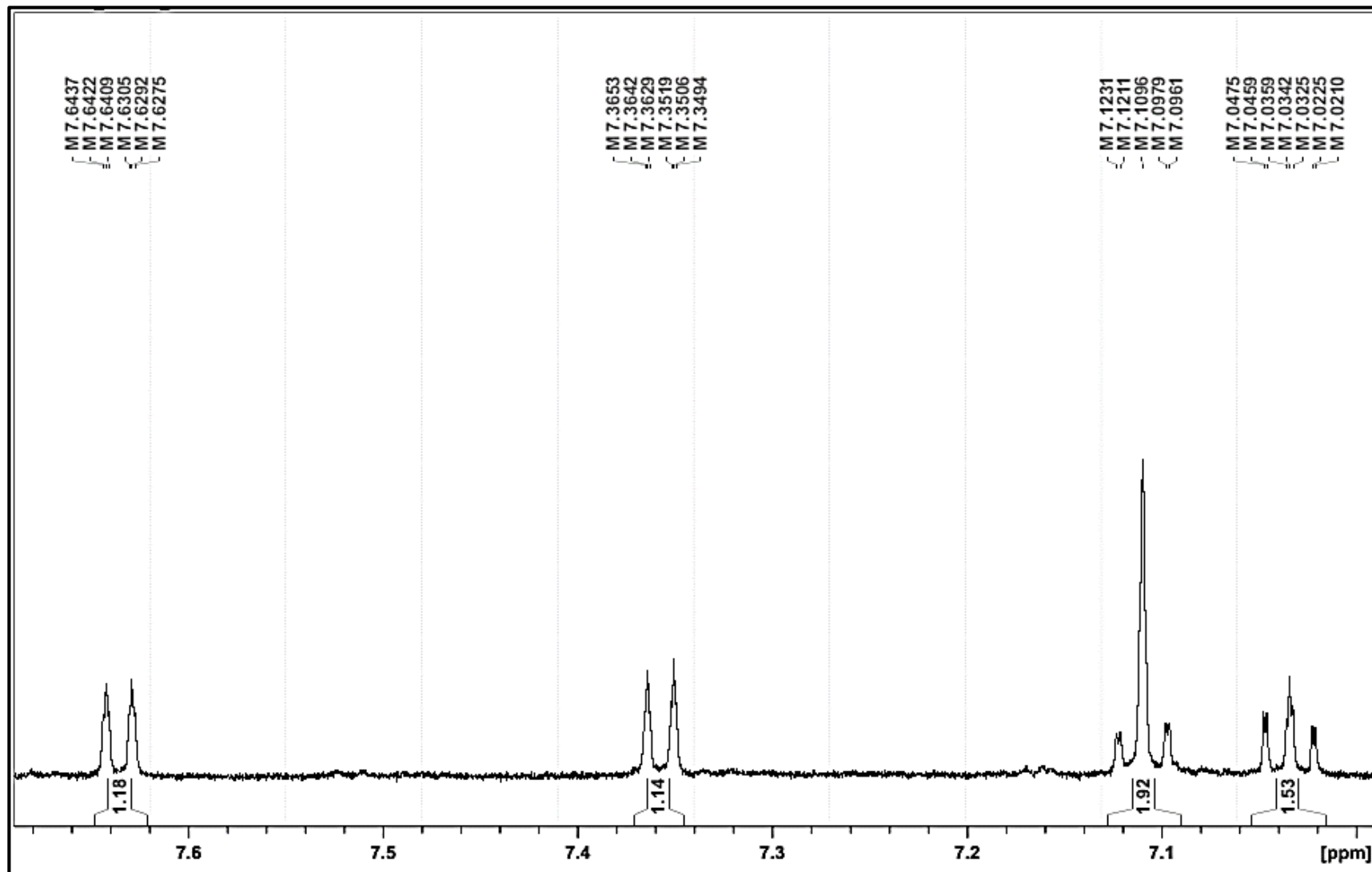
Anexo 15: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) de Aa1R2E7-11F1 (76)



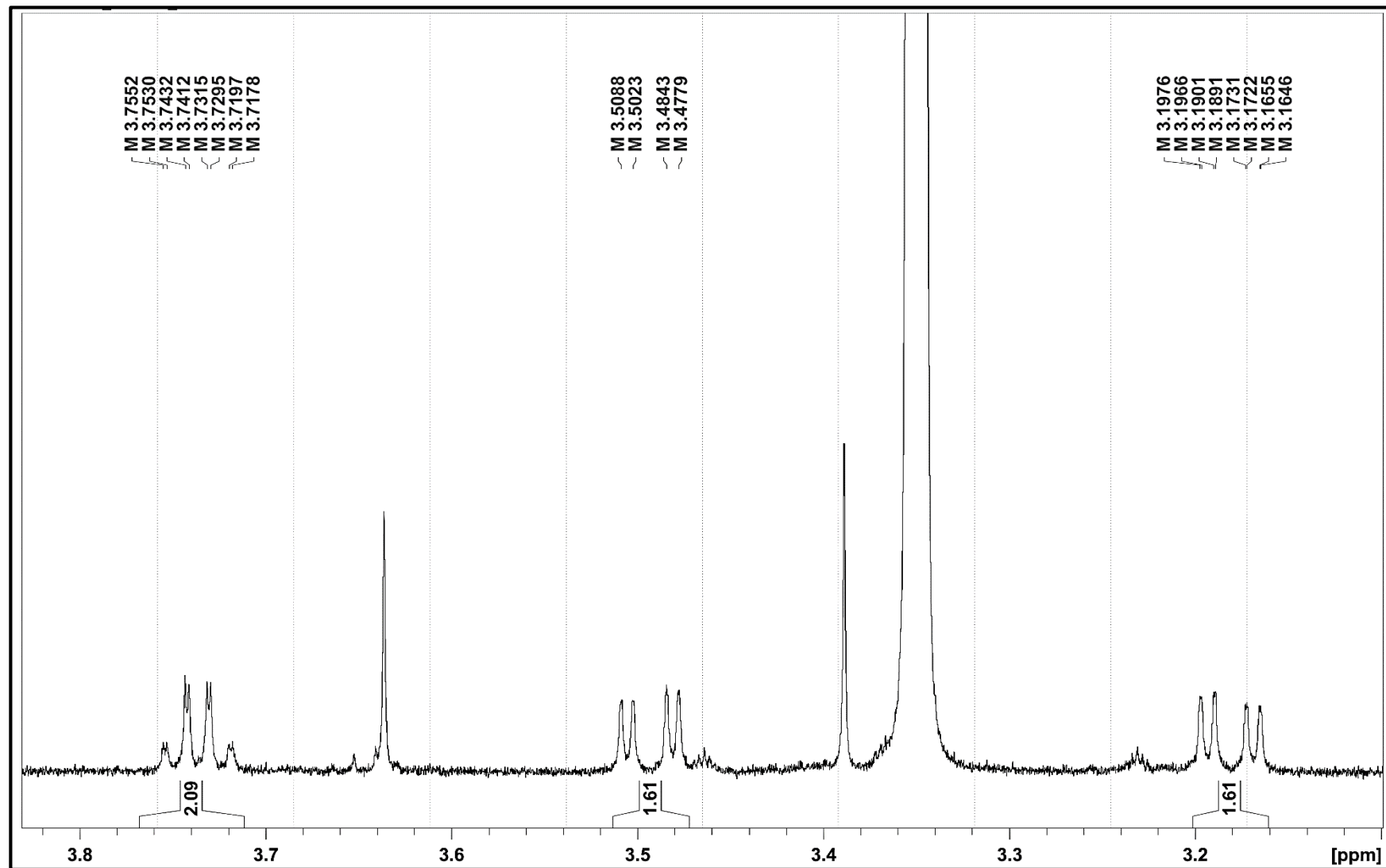
Anexo 16: Espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para Aa1R2E7-11F1 (76)



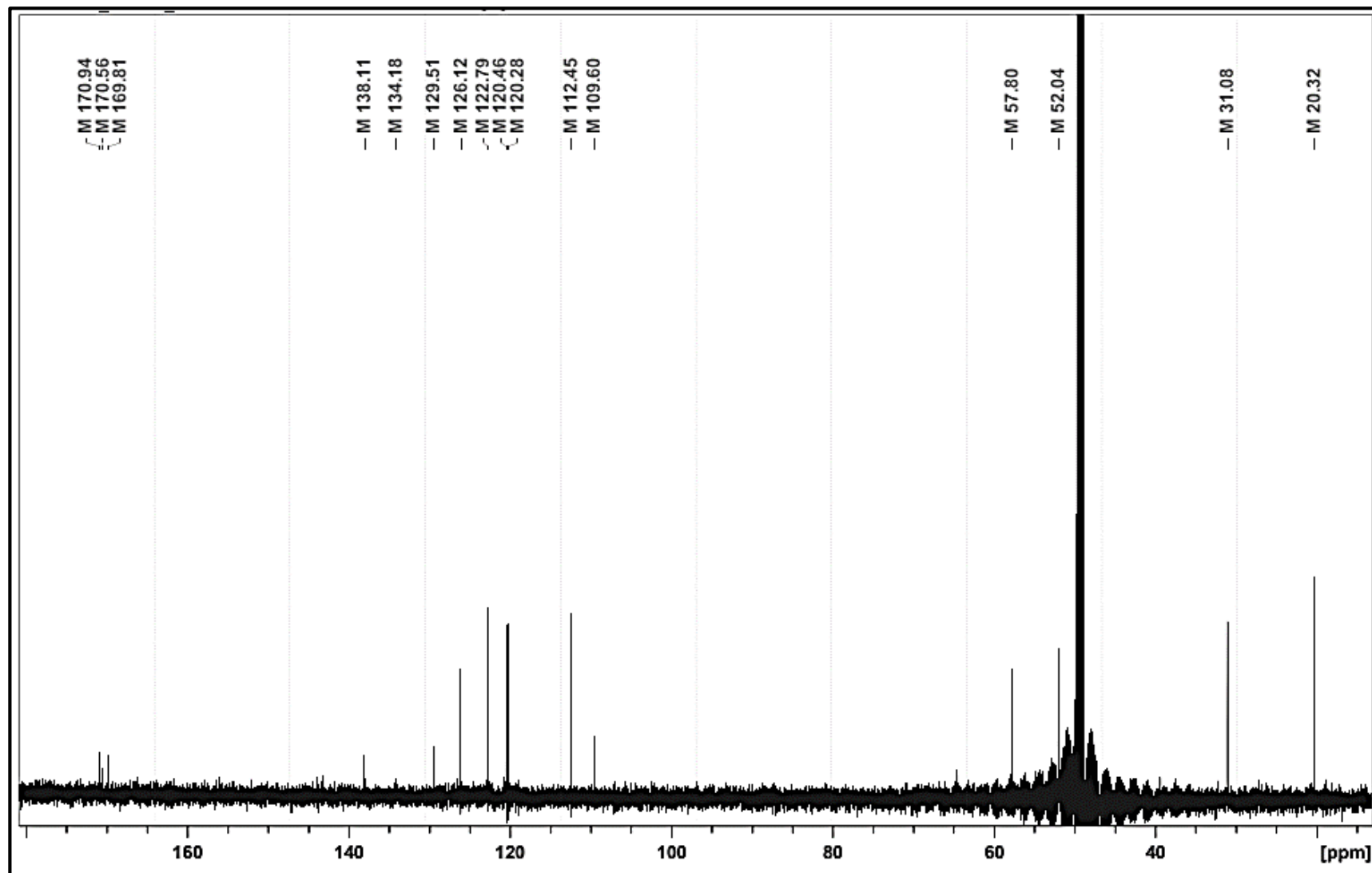
Anexo 17: Expansão do espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para Aa1R2E7-11F1 (76)



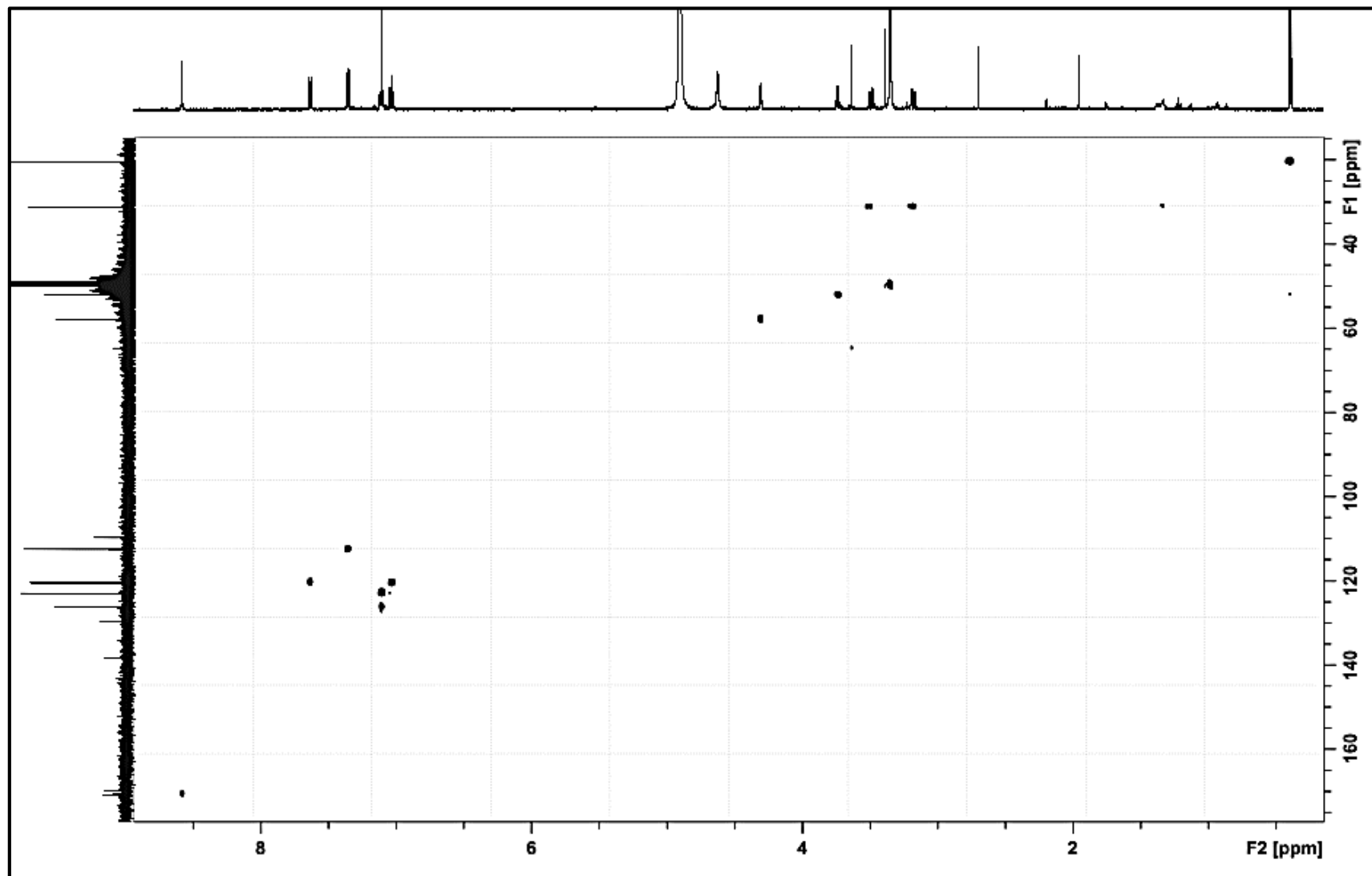
Anexo 18: Expansão do espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para Aa1R2E7-11F1 (76)



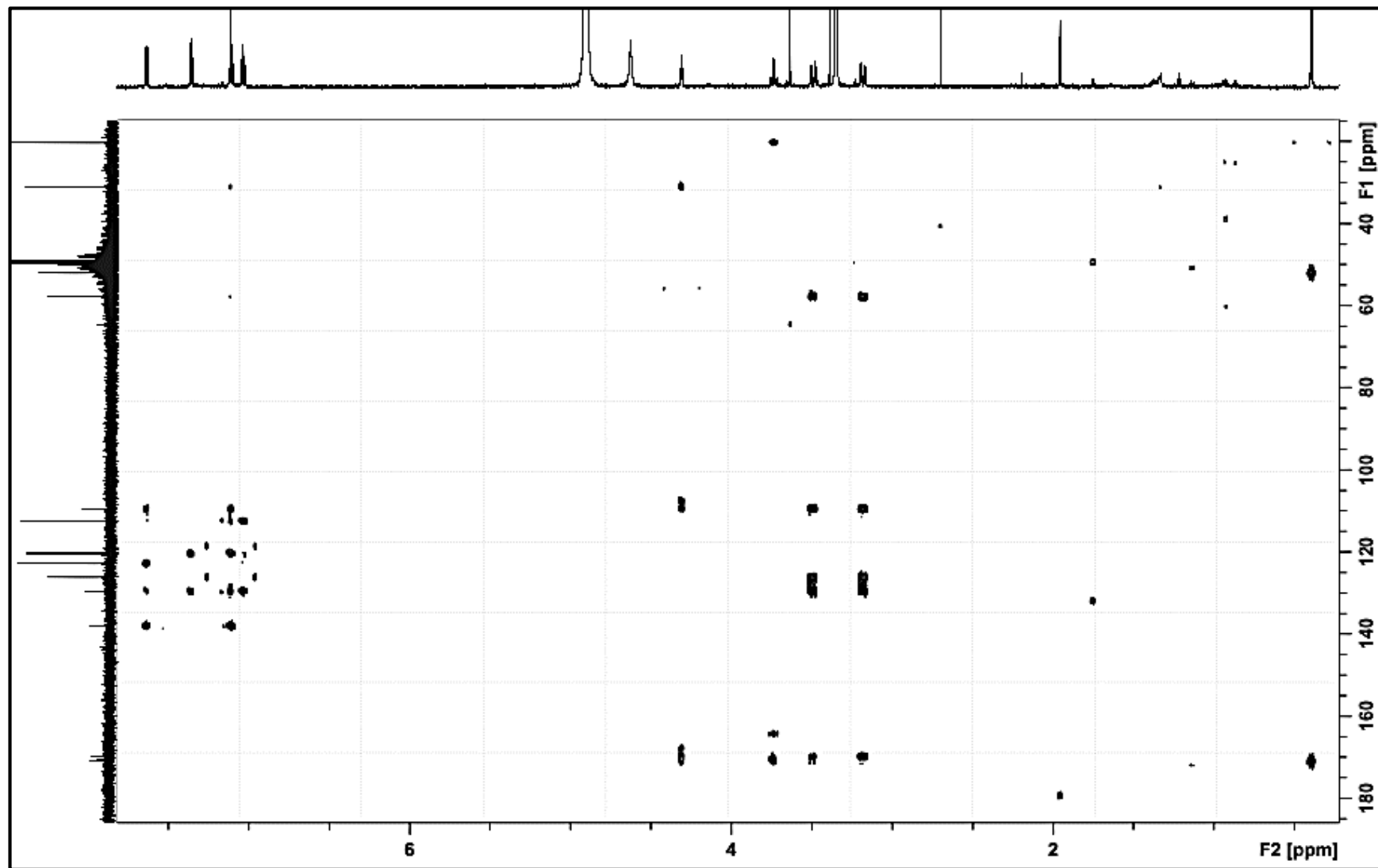
Anexo 19: Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) obtido para Aa1R2E7-11F1 (76)



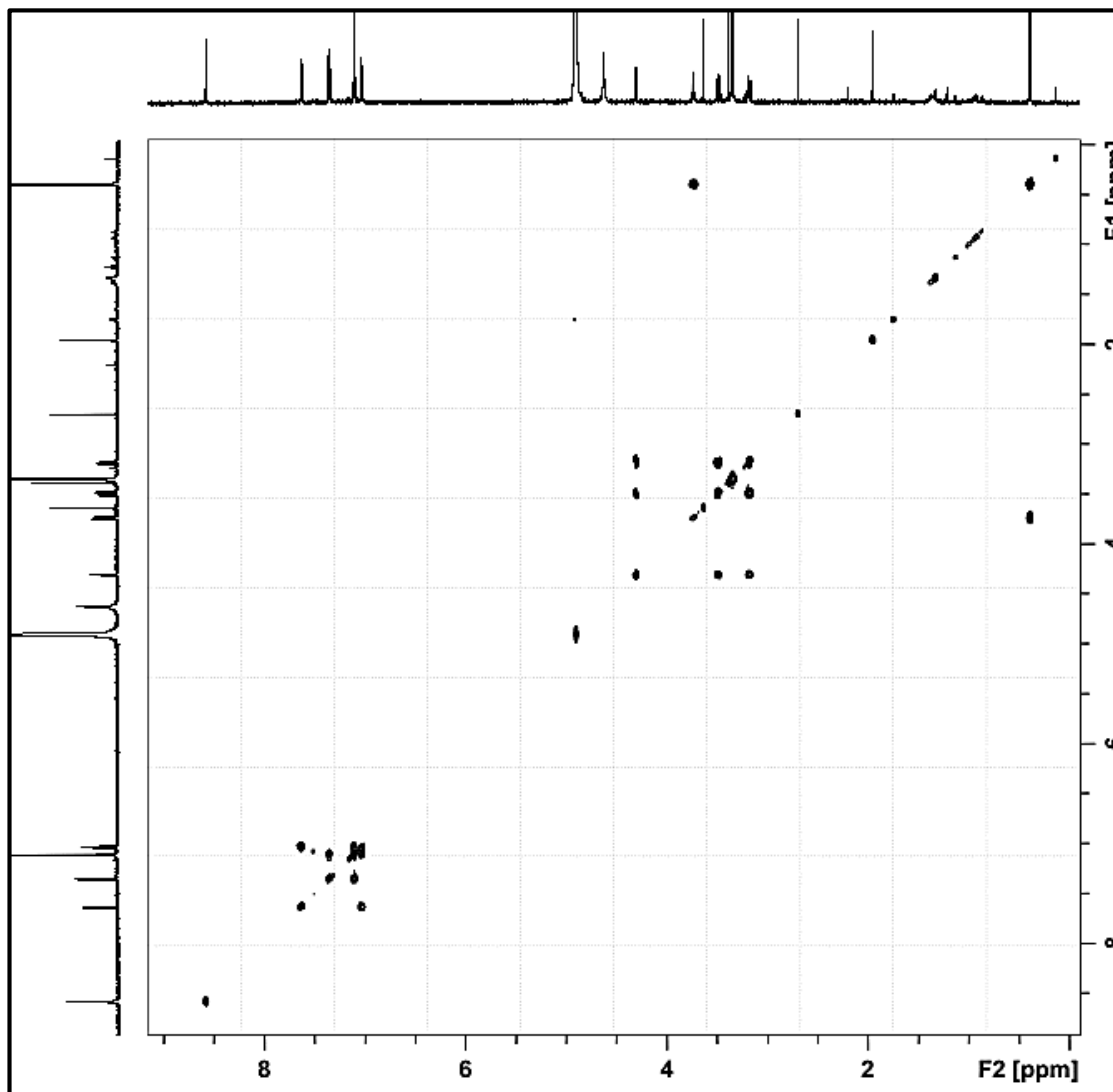
Anexo 20: Espectro de HSQC obtenido para Aa1R2E7-11F1 (76)



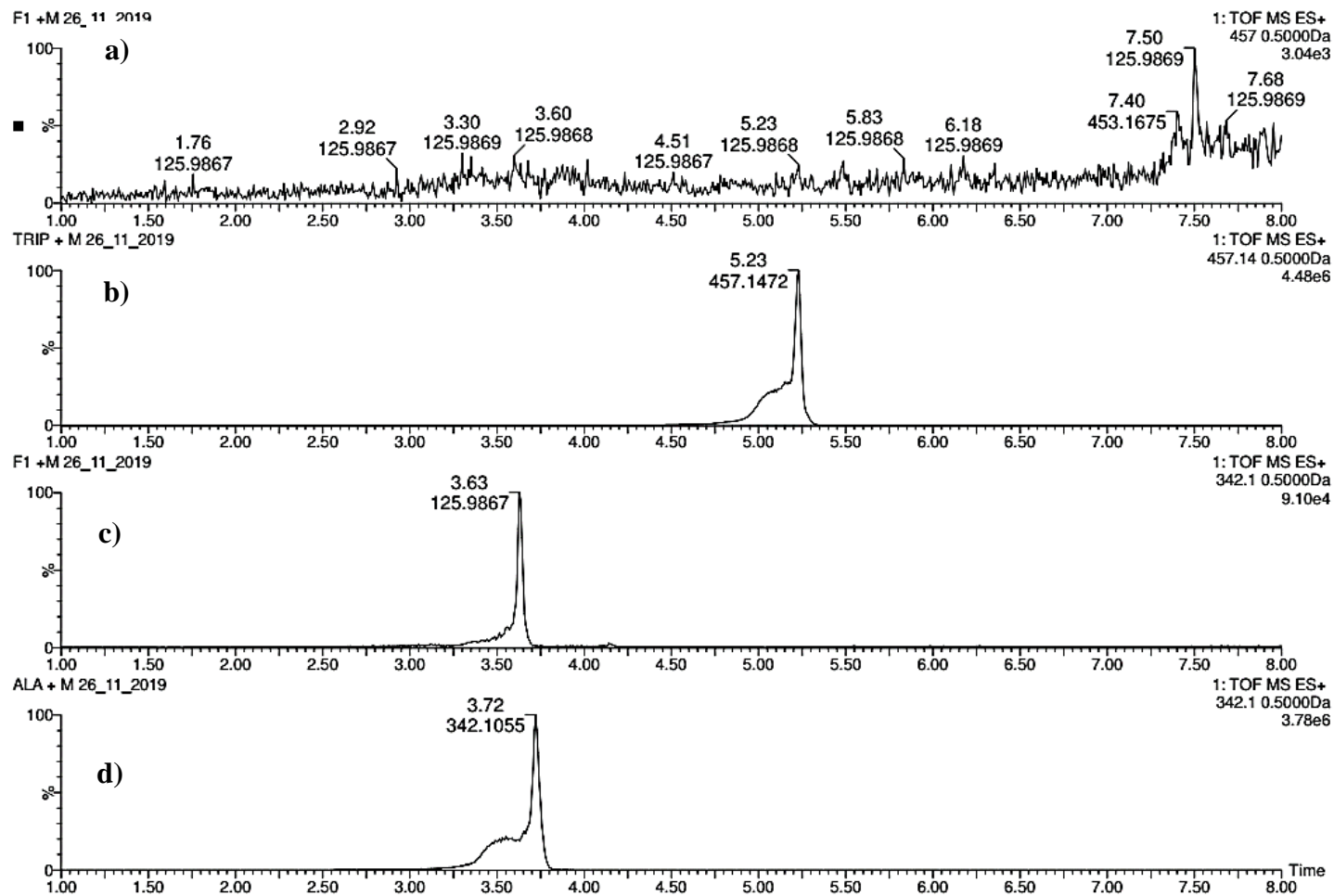
Anexo 21: Espectro de HMBC obtido para Aa1R2E7-11F1 (76)



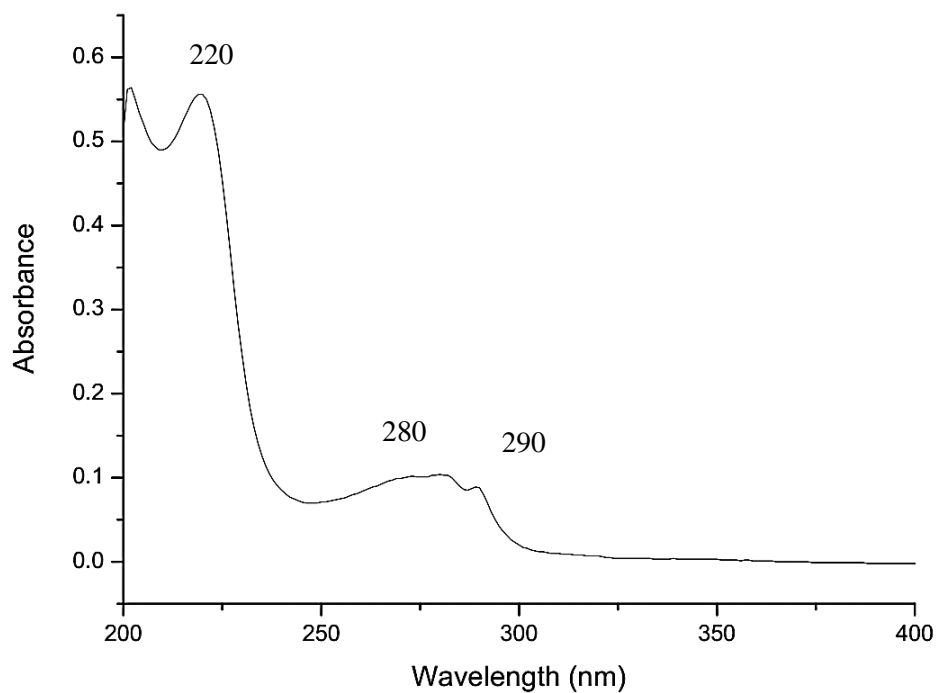
Anexo 22: Espectro de COSY obtenido para Aa1R2E7-11F1 (76)



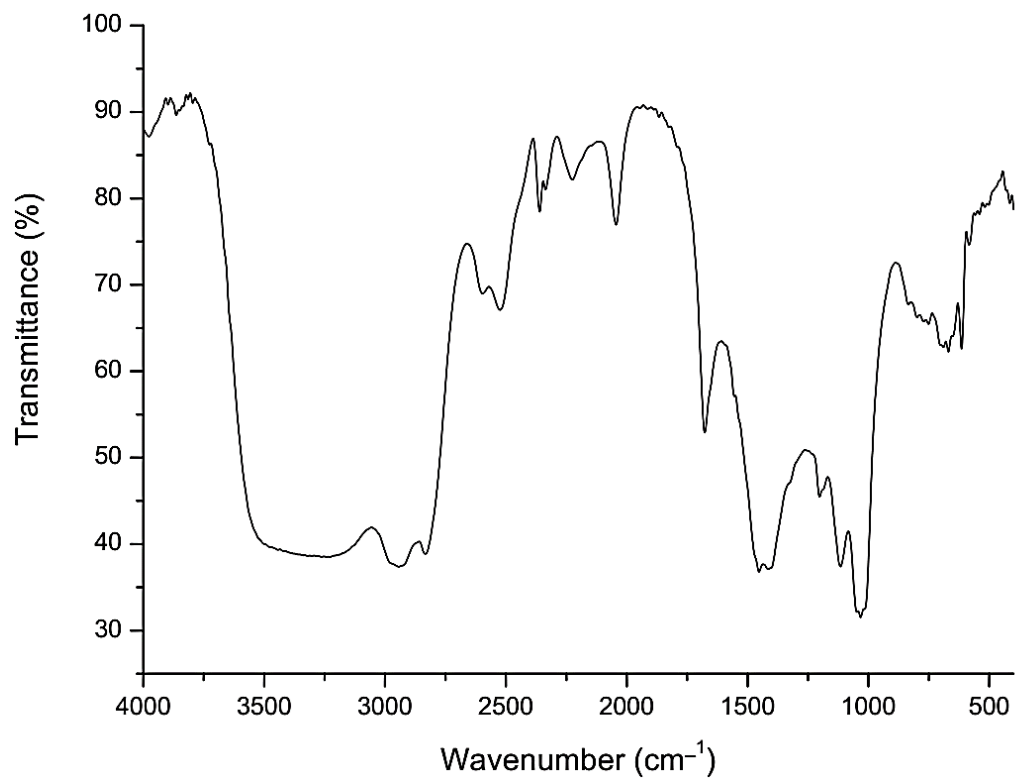
Anexo 23: Análise de Marfey de **Aa1R2E7-11F1**. Análise por LC-MS dos derivados de *L*-FDAA de a) hidrolisado de **Aa1R2E7-11F1**, b), Triptofano (EIC m/z 457,14), c) hidrolisado de **Aa1R2E7-11F1** (EIC m/z 342,10) e d) Alanina (EIC m/z 342,10)



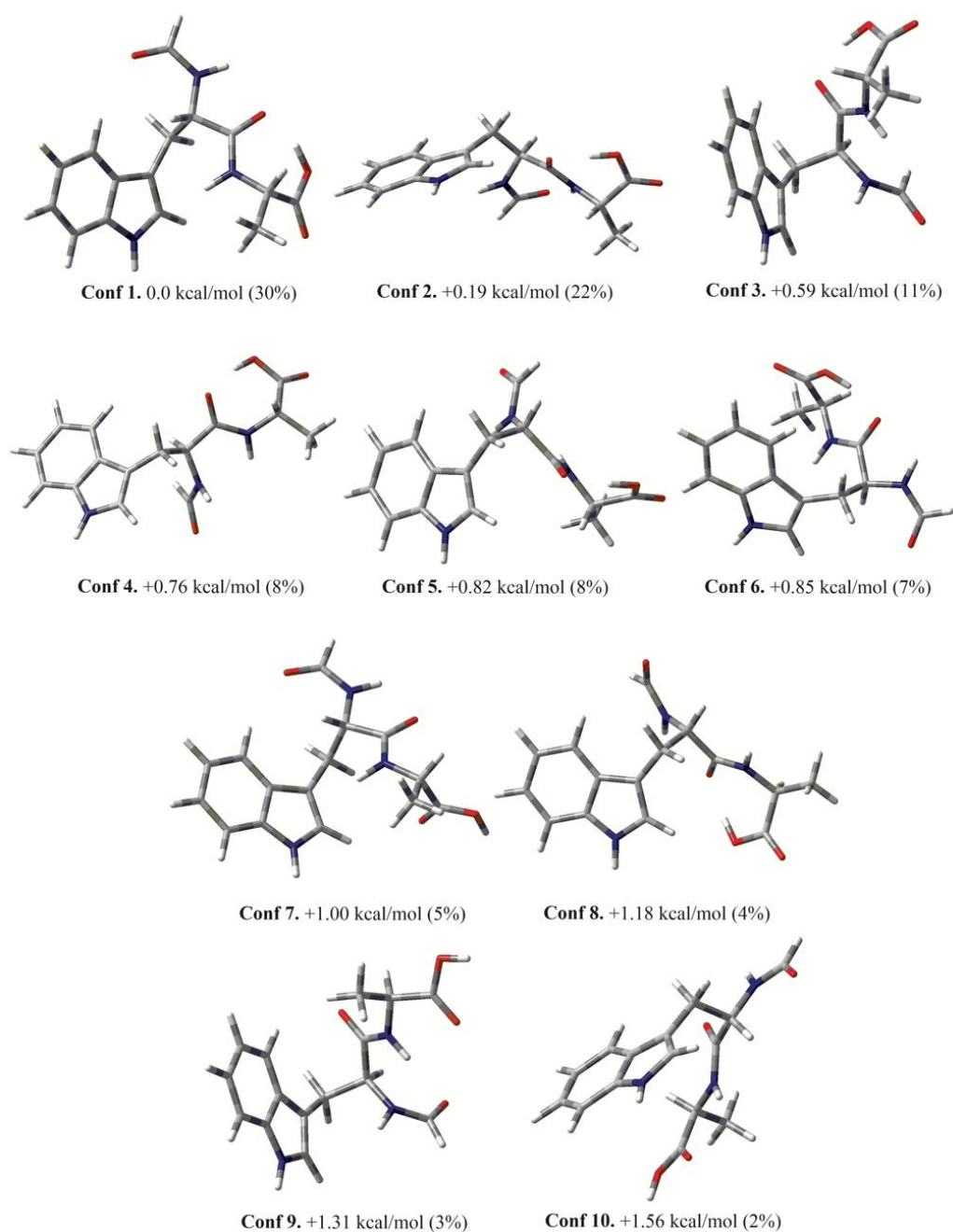
Anexo 24: Espectro de UV em MeOH Aa1R2E7-11F1 (76)



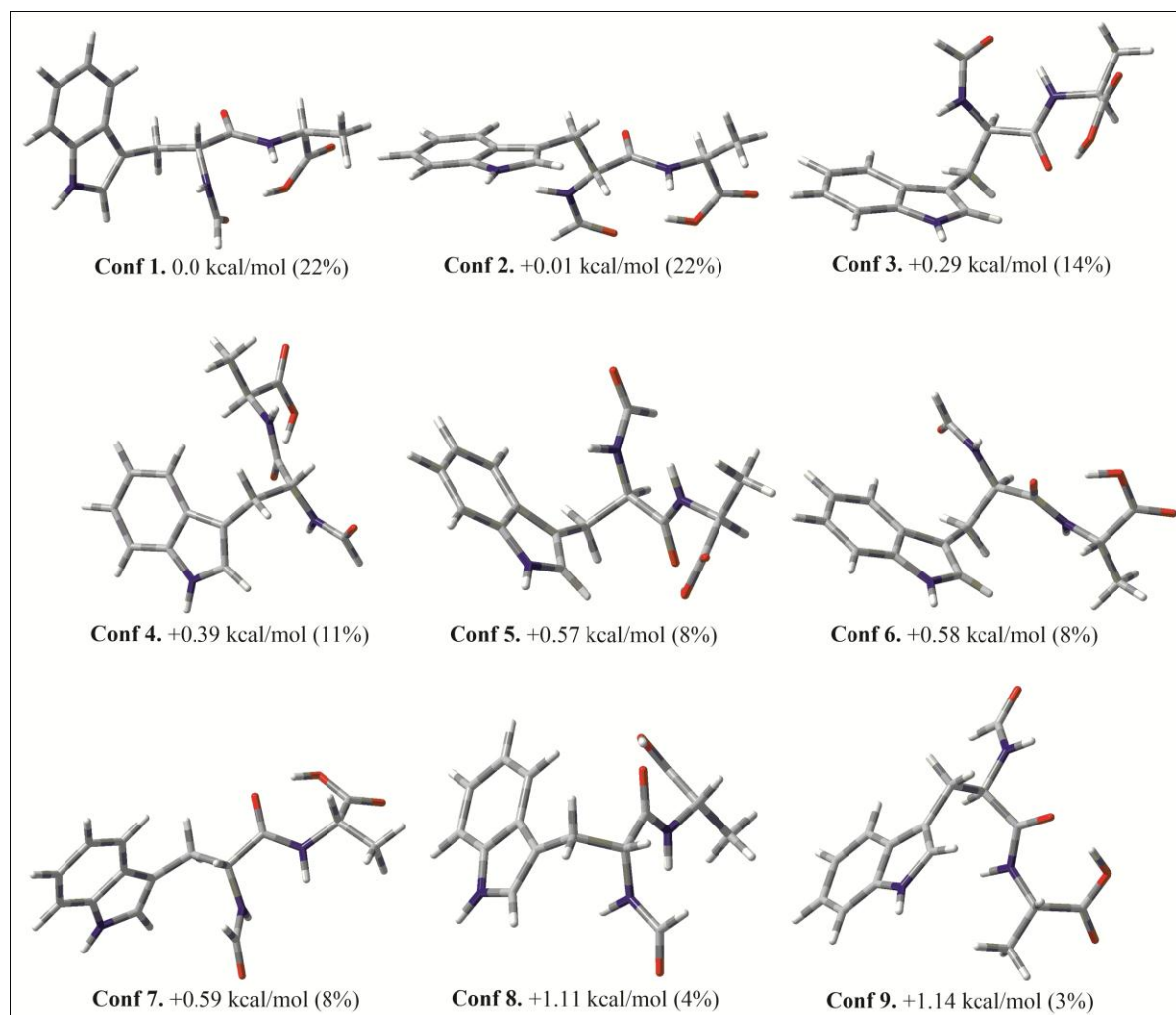
Anexo 25: Espectro de FTIR de Aa1R2E7-11F1 (76) obtido em placa de sílica



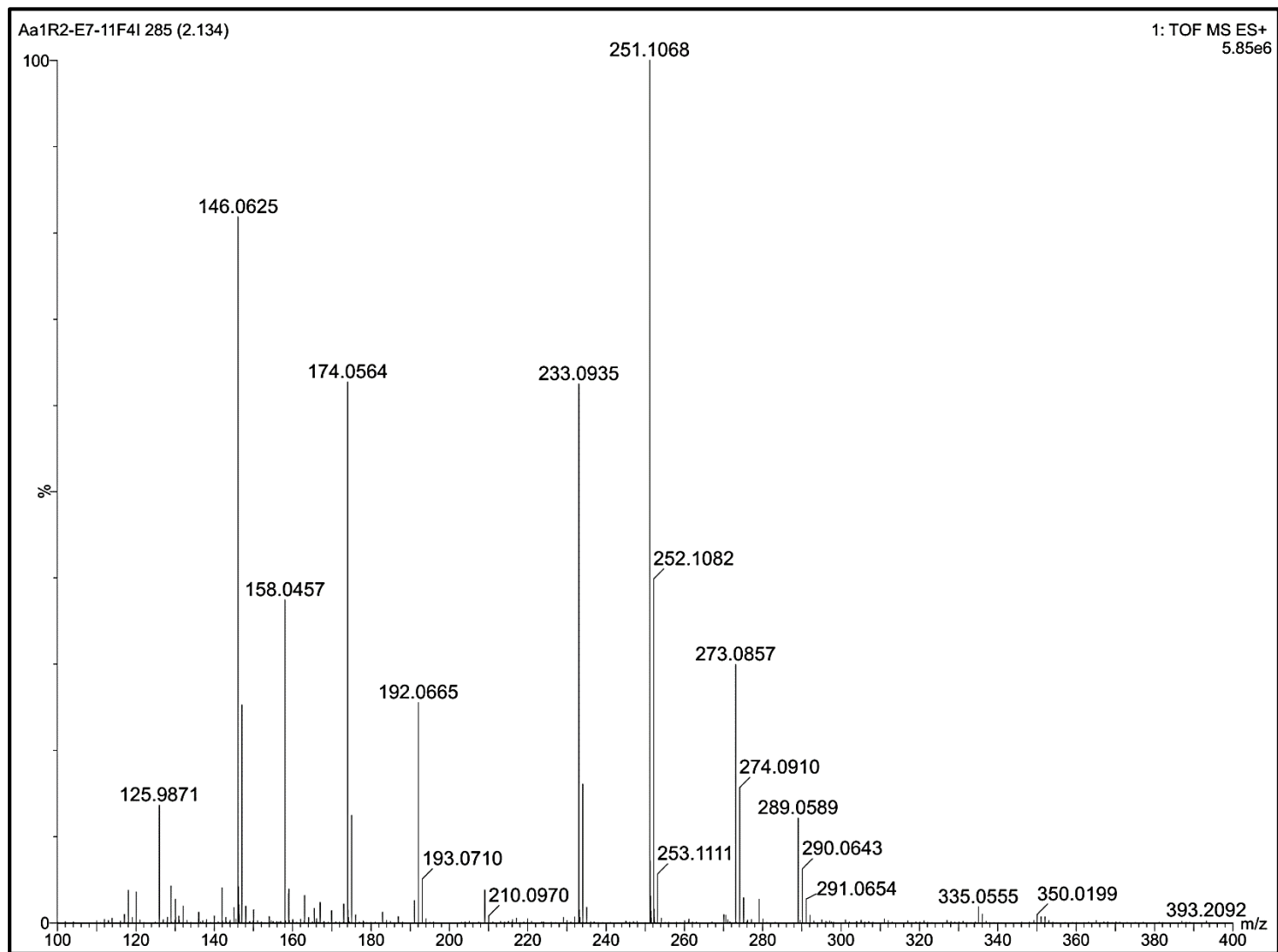
Anexo 26: Estruturas otimizadas [B3LYP/PCM(MeOH)/6-31G(d)], energias relativas e populações de Boltzmann dos confôrmeros de menor energia de (9*S*,14*S*)-**76** selecionados para cálculos de UV/ECD no CAM-B3LYP/PCM (MeOH)/nível TZVP



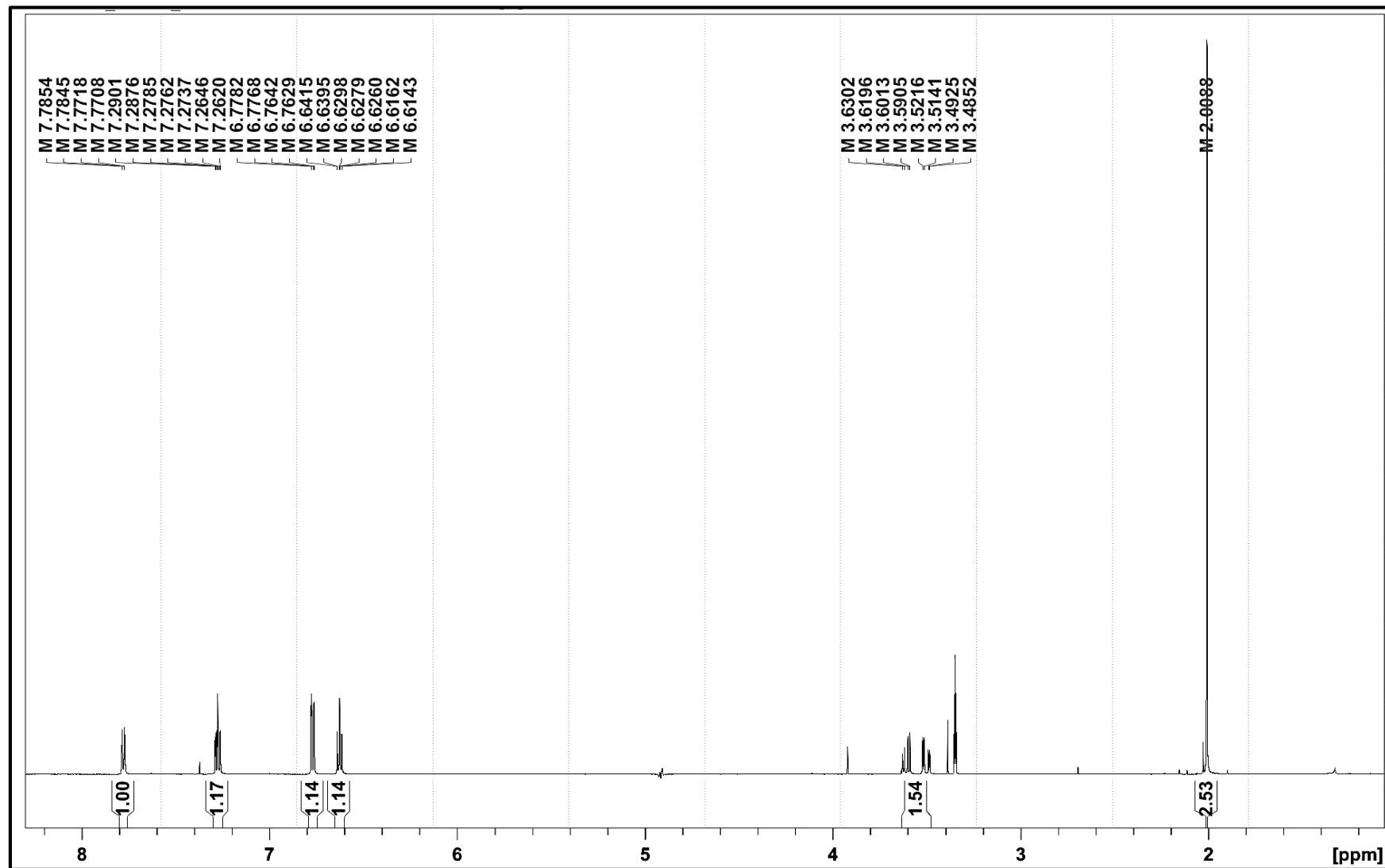
Anexo 27: Estruturas otimizadas [B3LYP/PCM(MeOH)/6-31G(d)], energias relativas e populações de Boltzmann dos conformadores de menor energia de (9*R*,14*S*)-**76** selecionados para cálculos de UV/ECD no CAM-B3LYP/PCM (MeOH)/nível TZVP



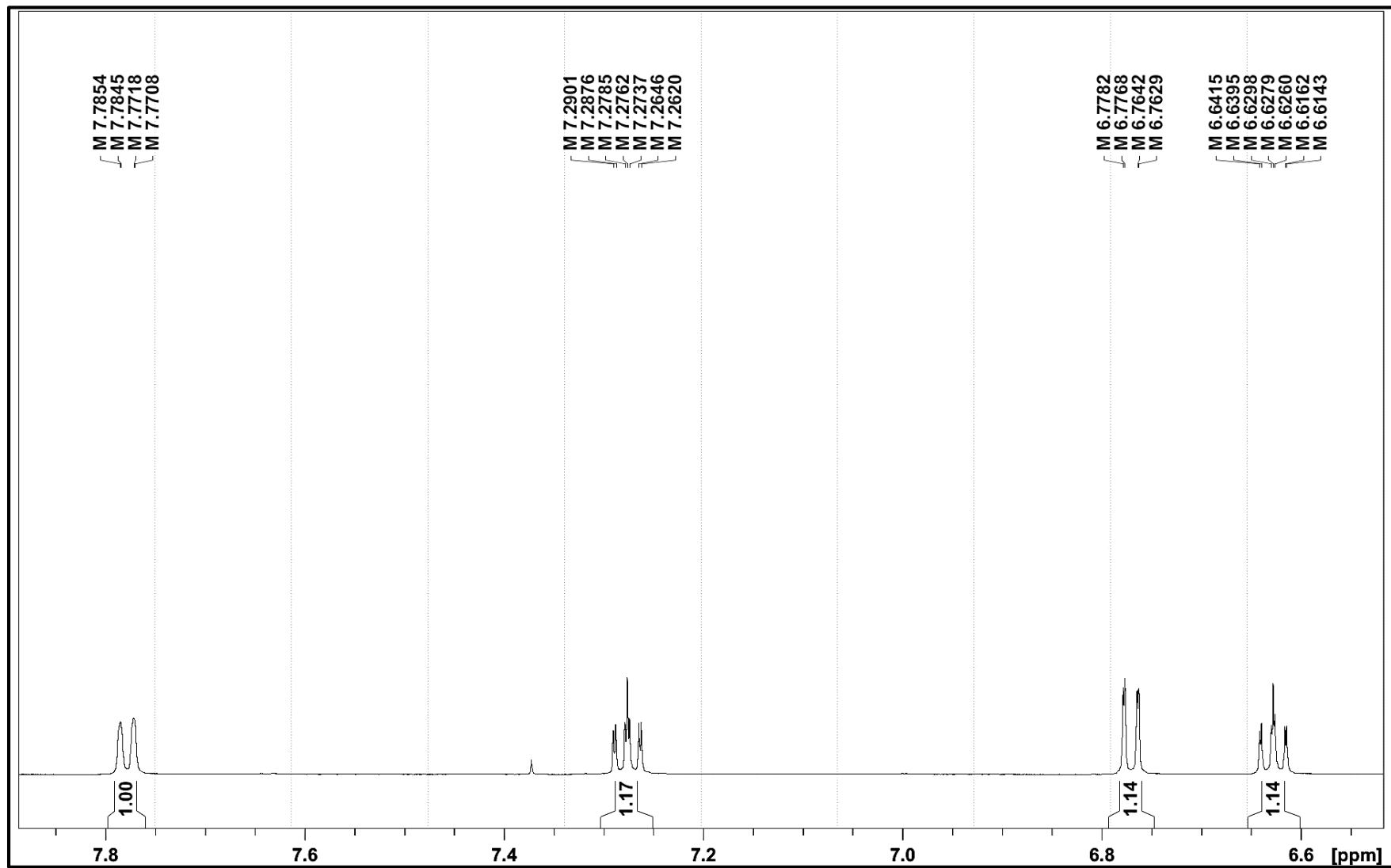
Anexo 28: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) de Aa1R2E7-11F1 (77)



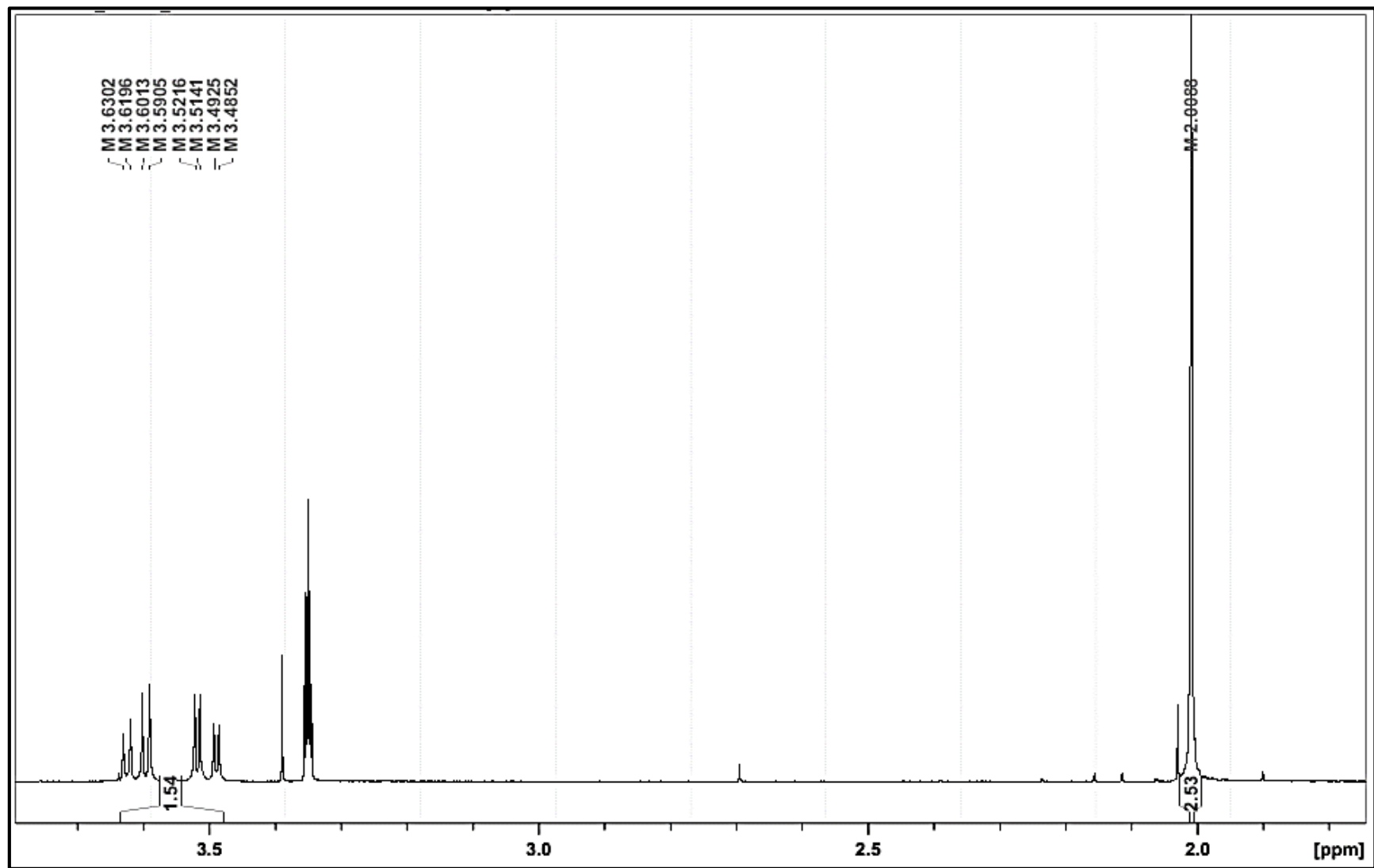
Anexo 29: Espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para **Aa1R2E7-11F4I** (77)



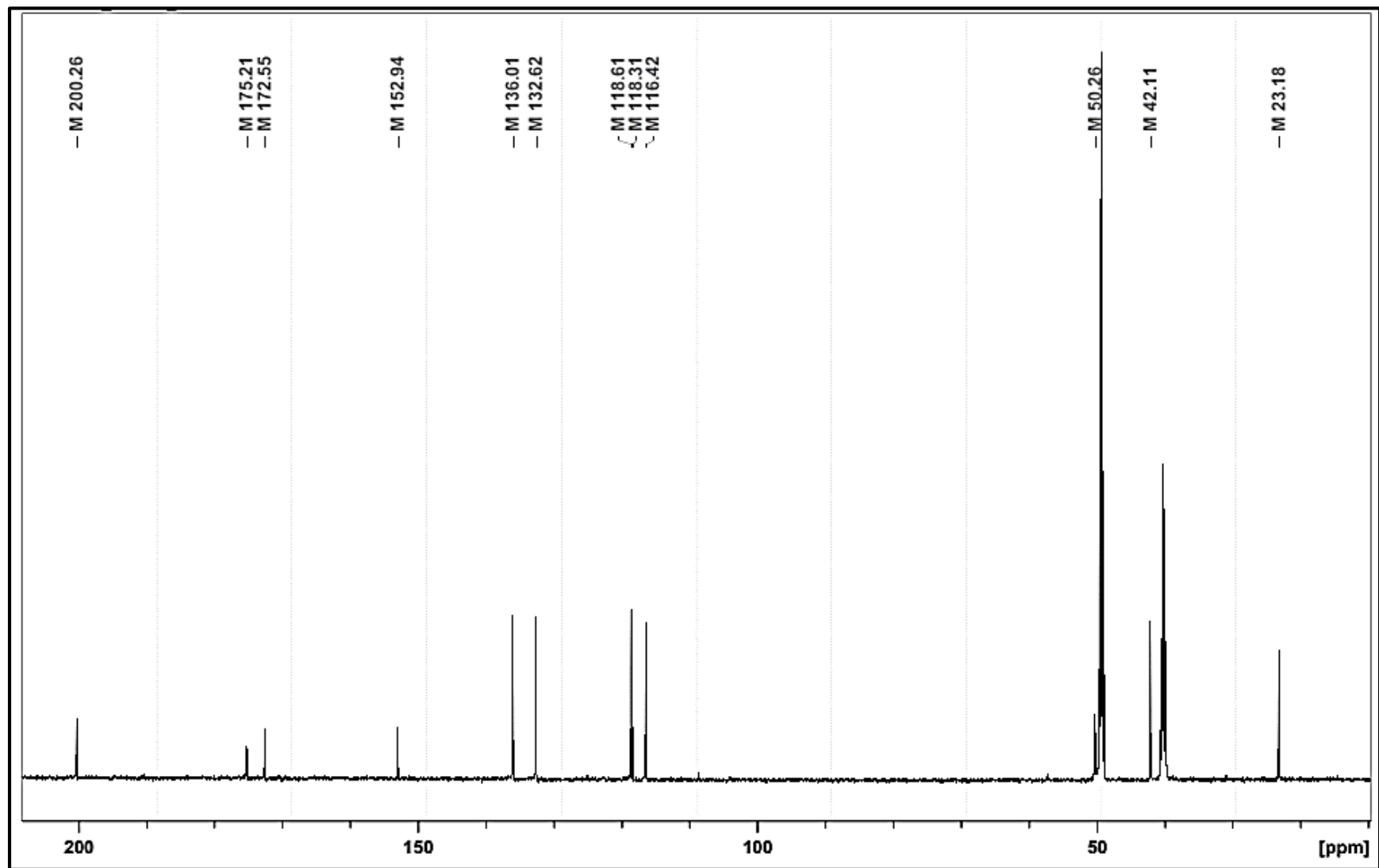
Anexo 30: Expansão do espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para Aa1R2E7-11F4I (77)



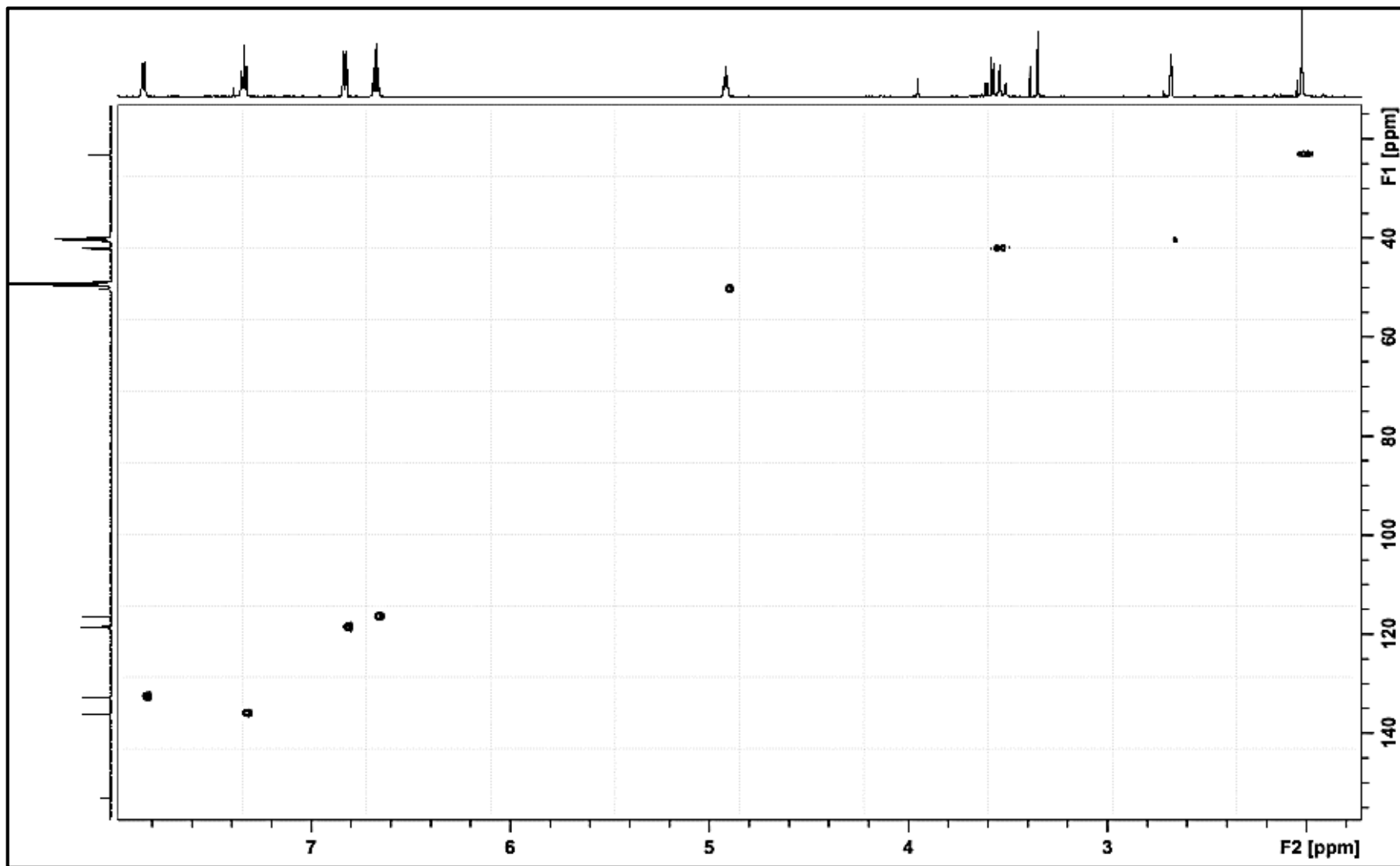
Anexo 31: Expansão do espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 600 MHz) obtido para Aa1R2E7-11F4I (77)



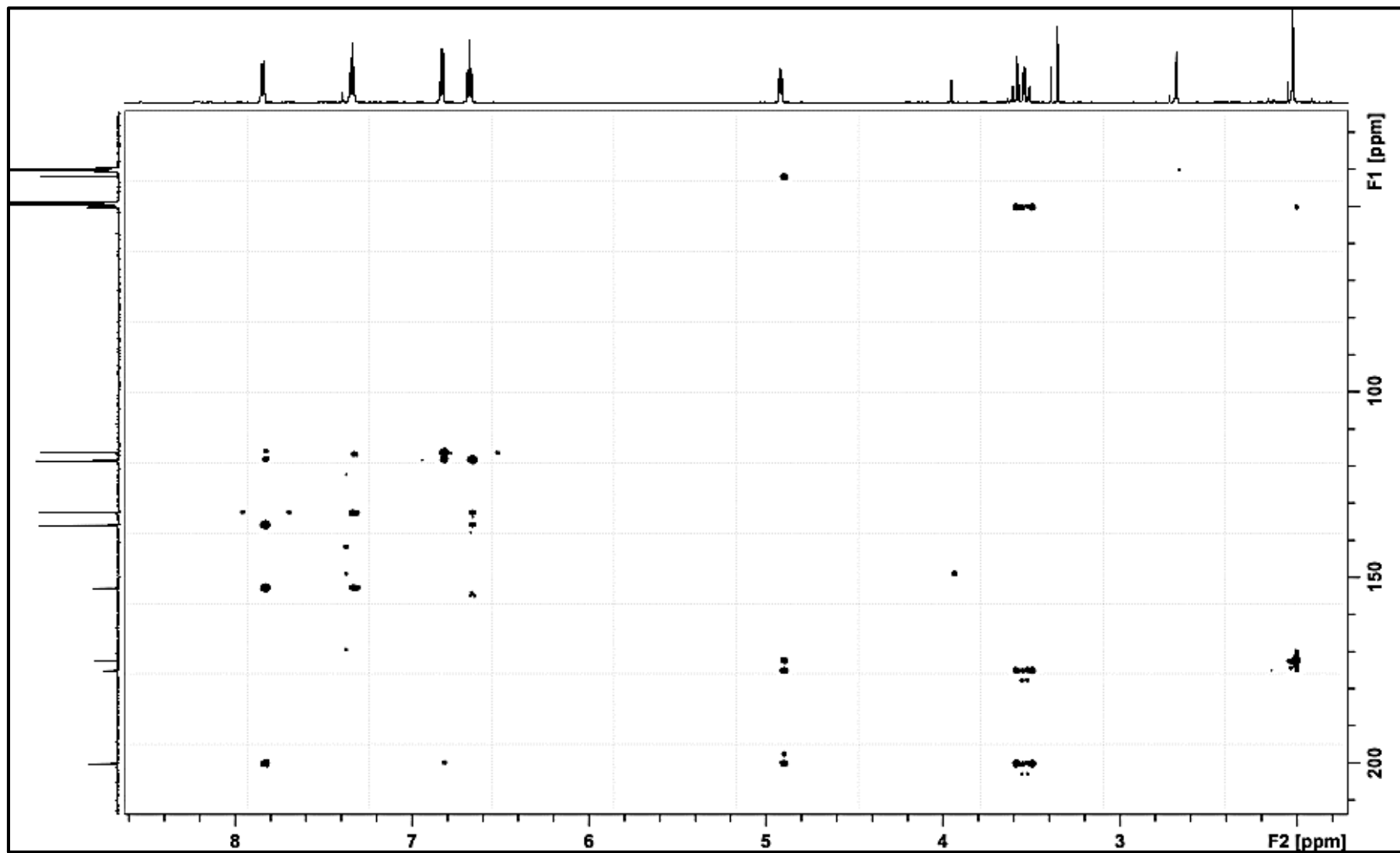
Anexo 32: Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , 150 MHz) obtido para obtido para **Aa1R2E7-11F4I** (77)



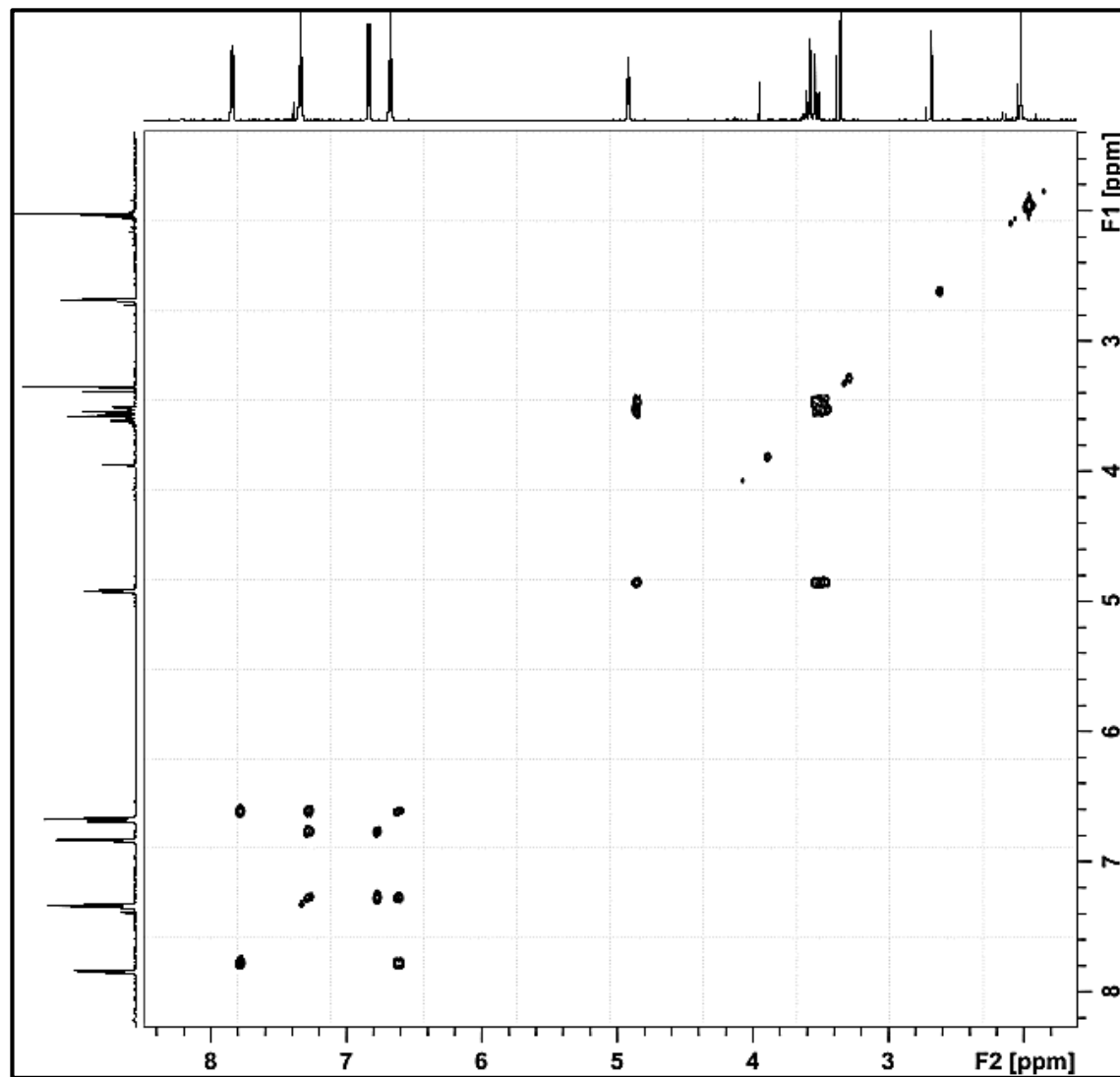
Anexo 33: Espectro de HSQC obtido para Aa1R2E7-11F4I (77)



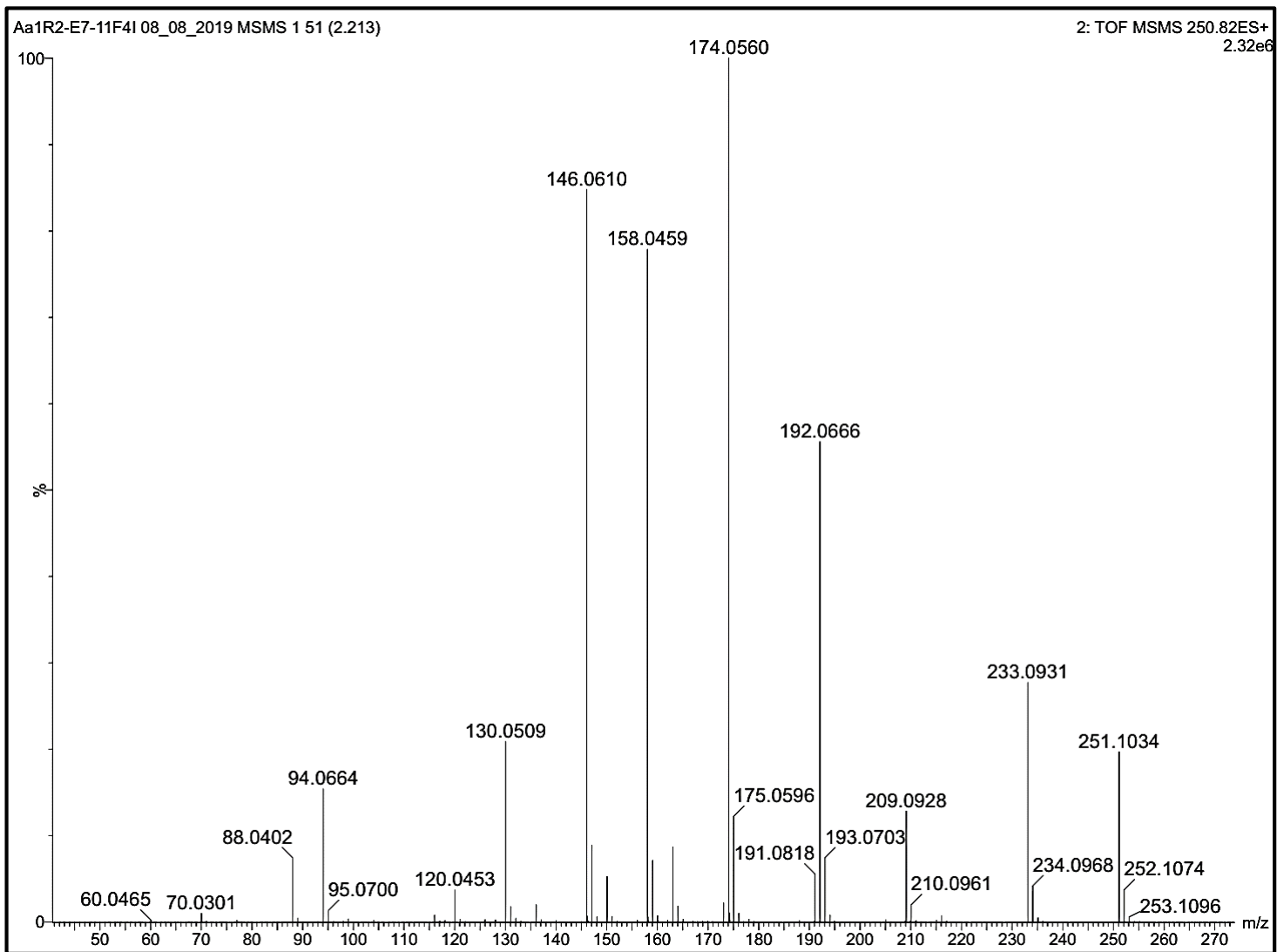
Anexo 34: Espectro de HMBC obtido para Aa1R2E7-11F4I (77)



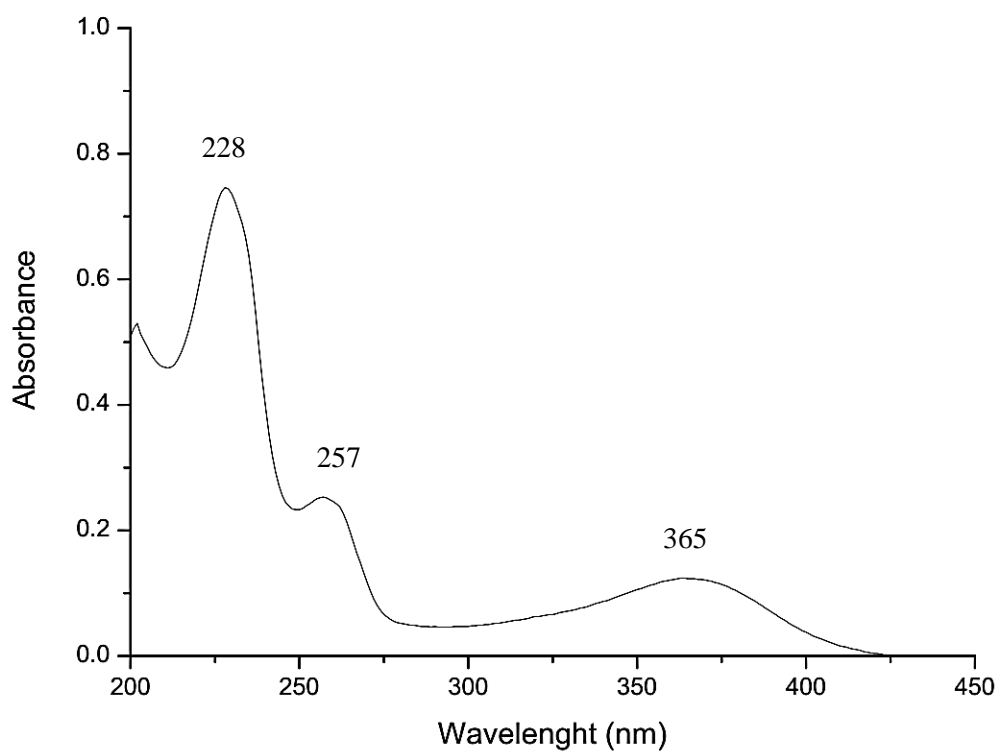
Anexo 35: Espectro de COSY obtenido para Aa1R2E7-11F4I (77)



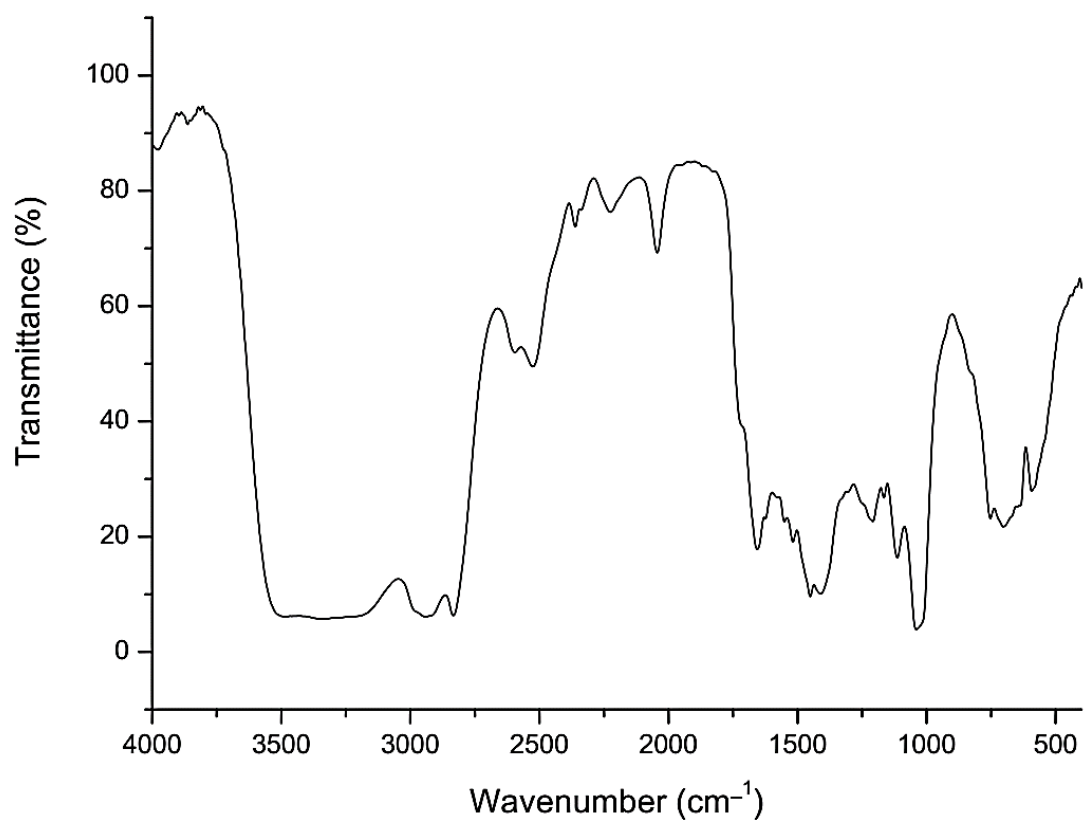
Anexo 36: Espectro de fragmentação MS/MS (ESI+) de Aa1R2E7-11F4I (77)



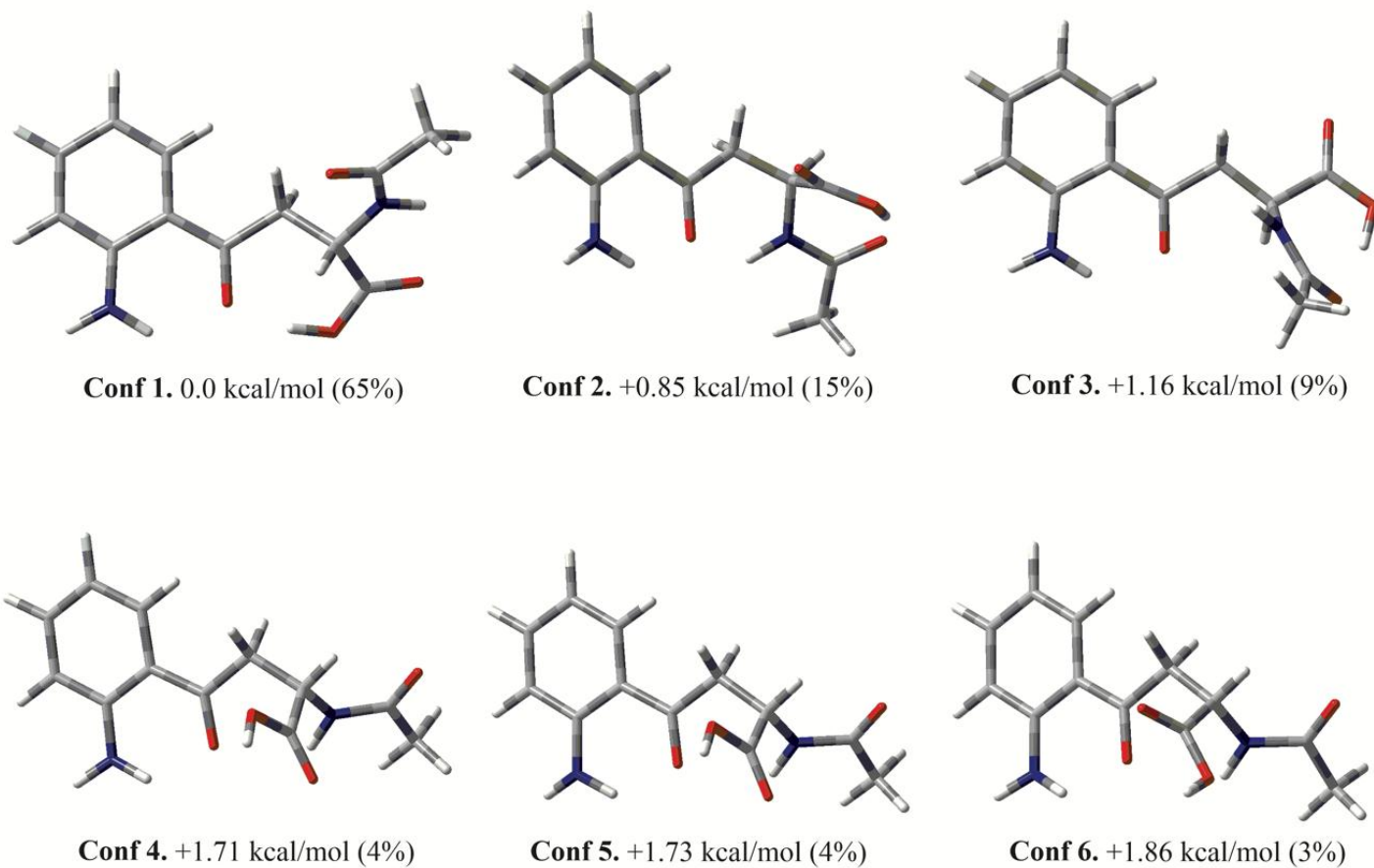
Anexo 37: Espectro de UV obtido para *N*-acetil-quinurenina (**77**)



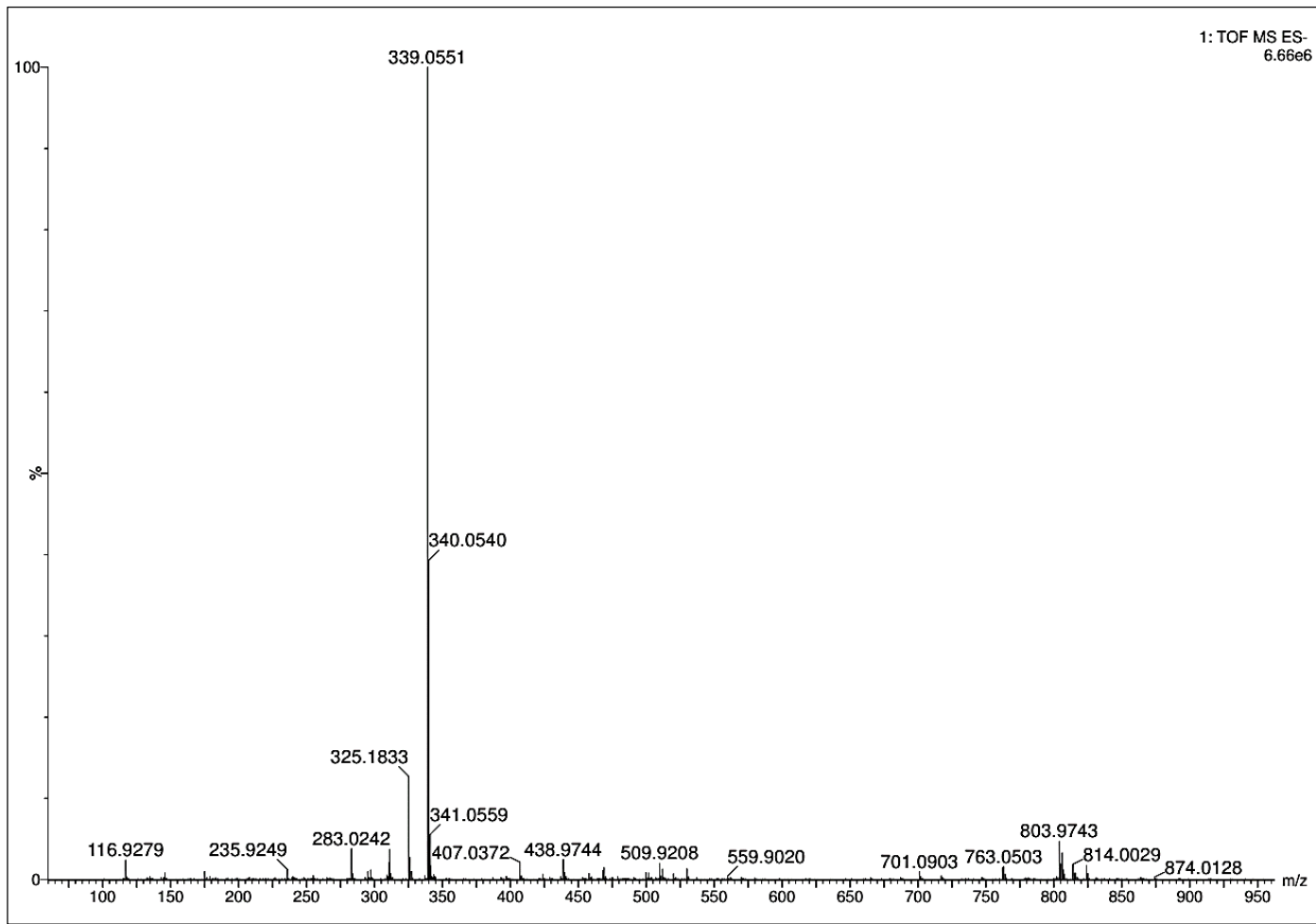
Anexo 38: Espectro de FTIR obtido para *N*-acetil-quinurenina (**77**) em placa de sílica



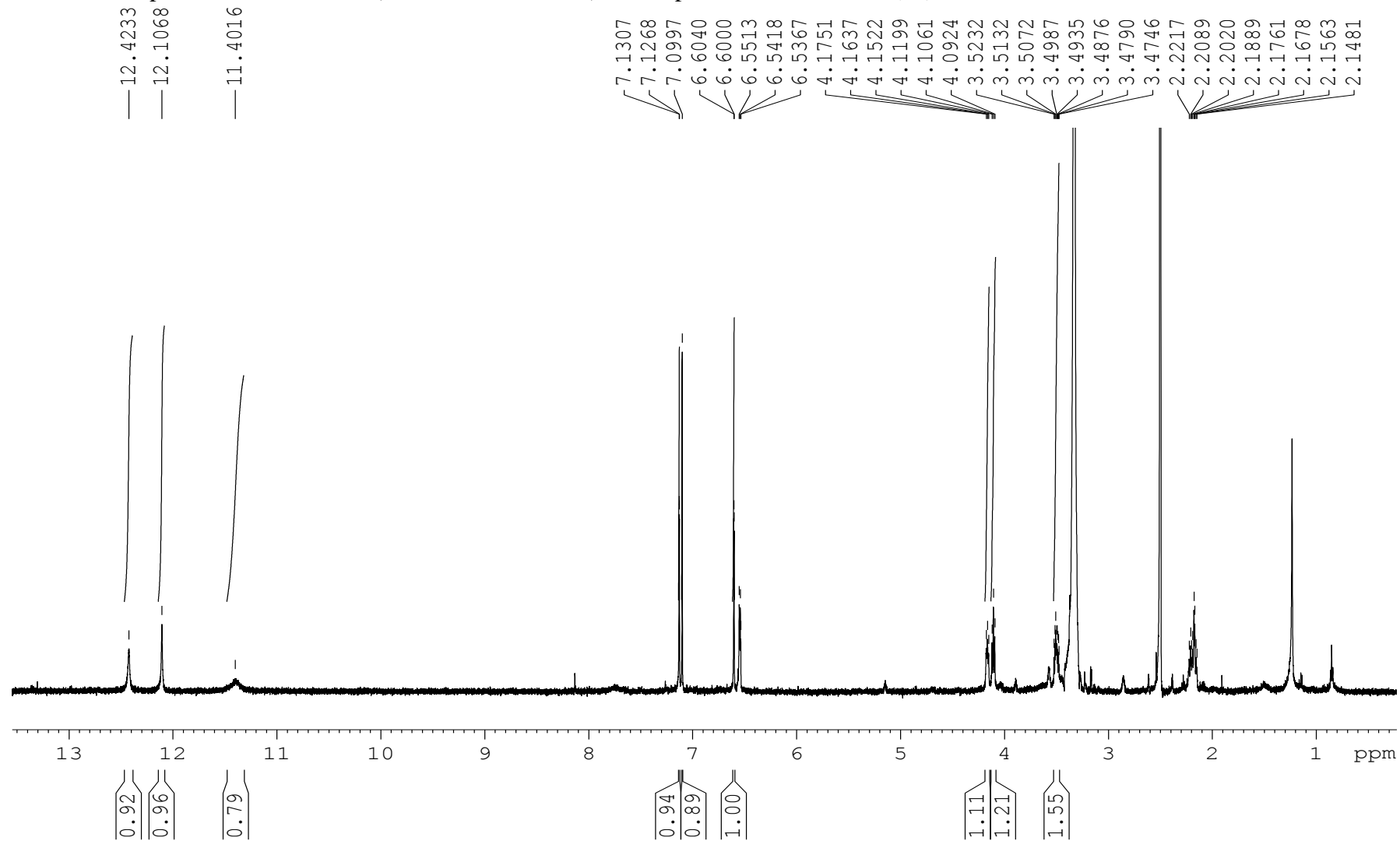
Anexo 39: Estruturas otimizadas [B3LYP/PCM(MeOH)/6-31G(d)], energias relativas e populações de Boltzmann dos conformadores de menor energia de (9*S*)-**77** selecionados para cálculos de UV/ECD no CAM-B3LYP/PCM(MeOH) /nível TZVP.



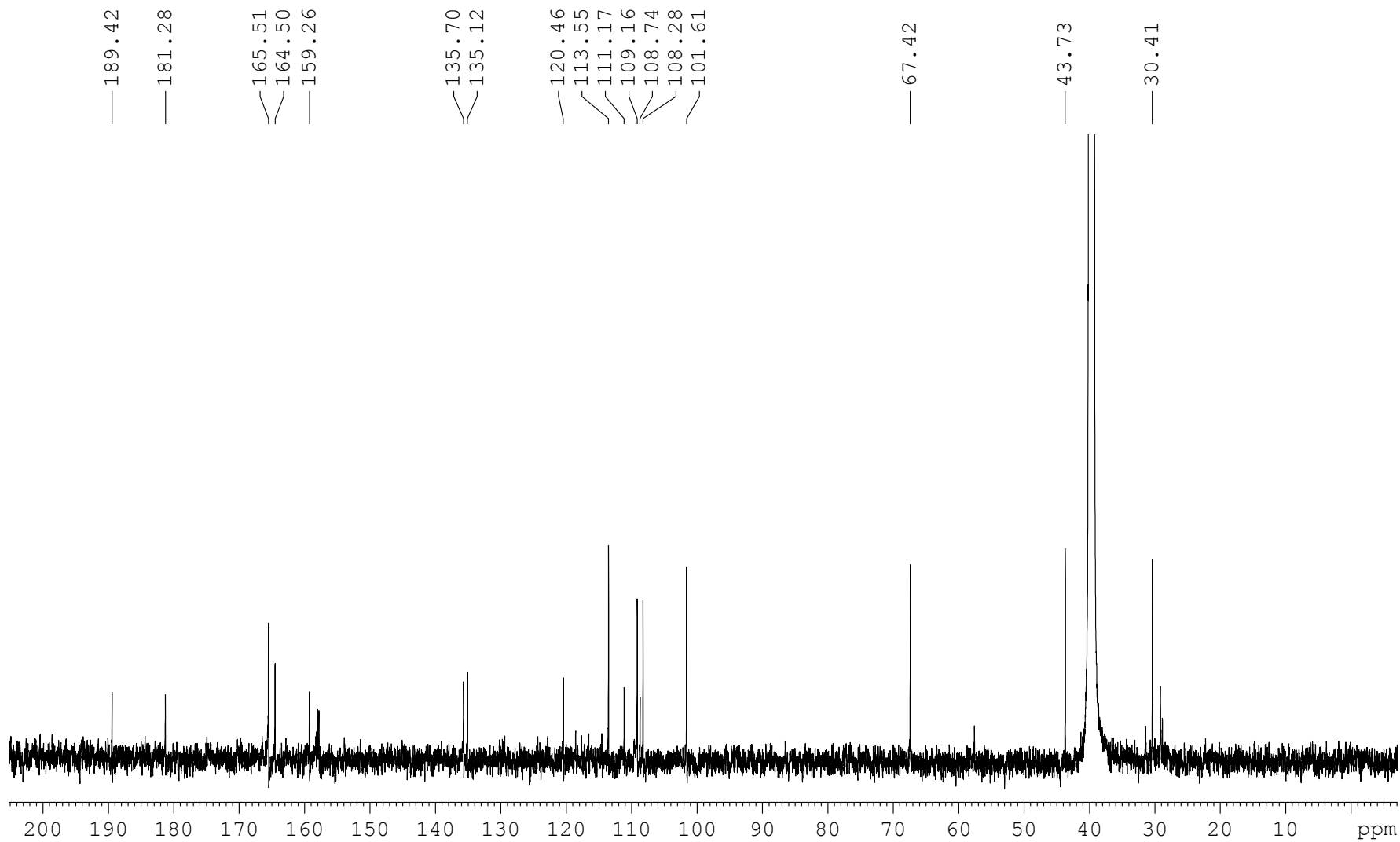
Anexo 40: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) de versicolorina C (78)



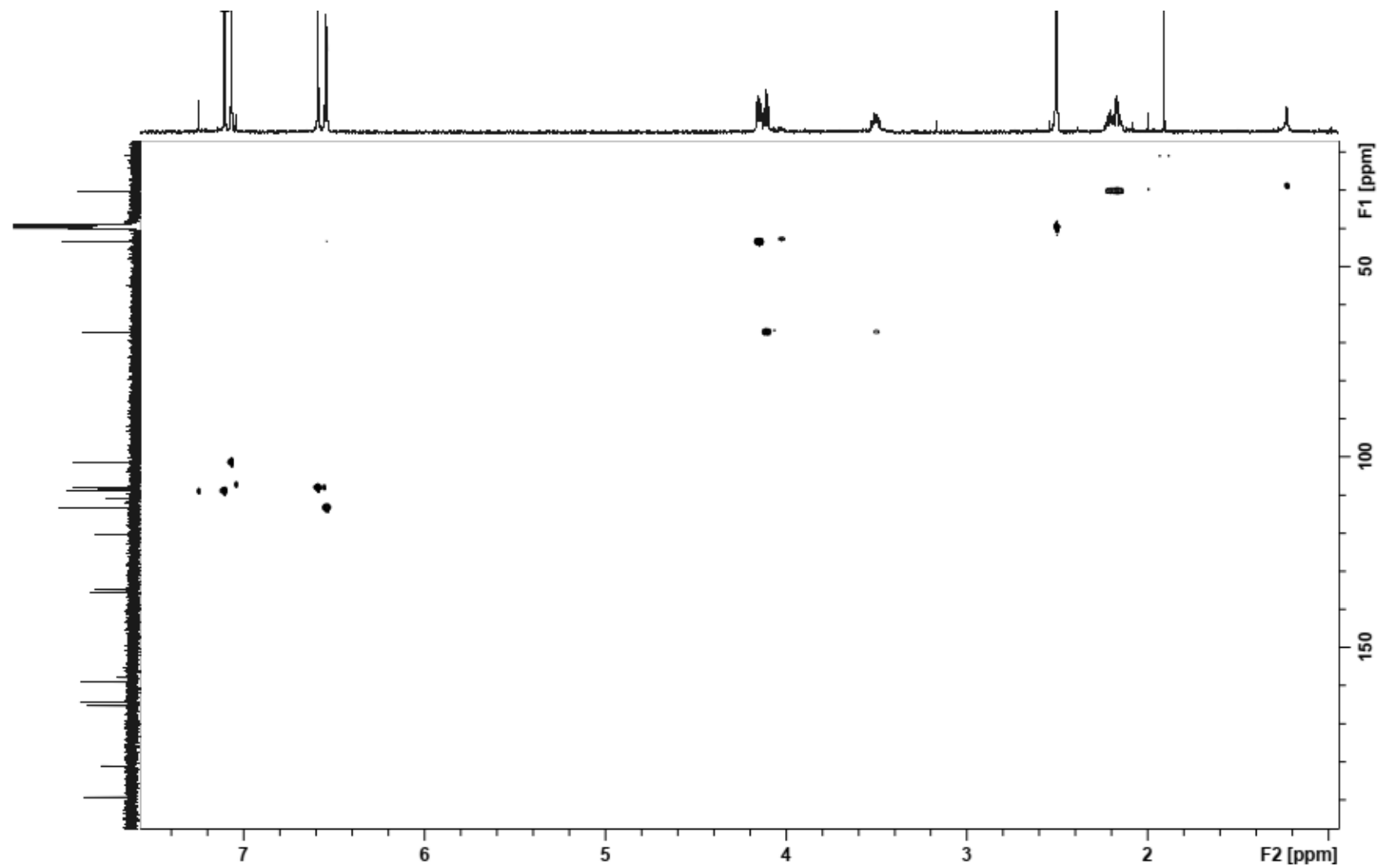
Anexo 41: Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para **versicolorina C (78)**



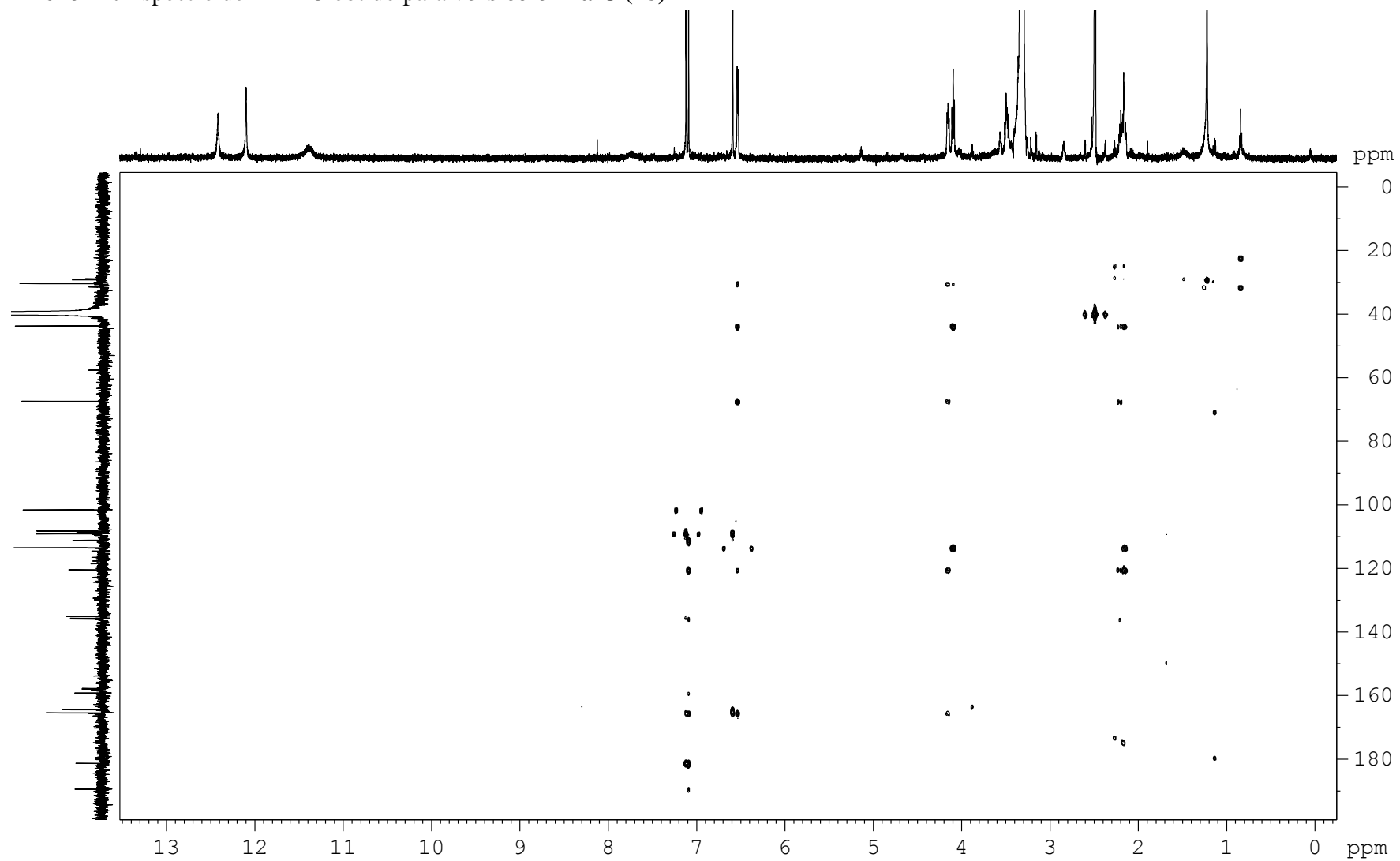
Anexo 42: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) obtido para obtido para **versicolorina C (78)**



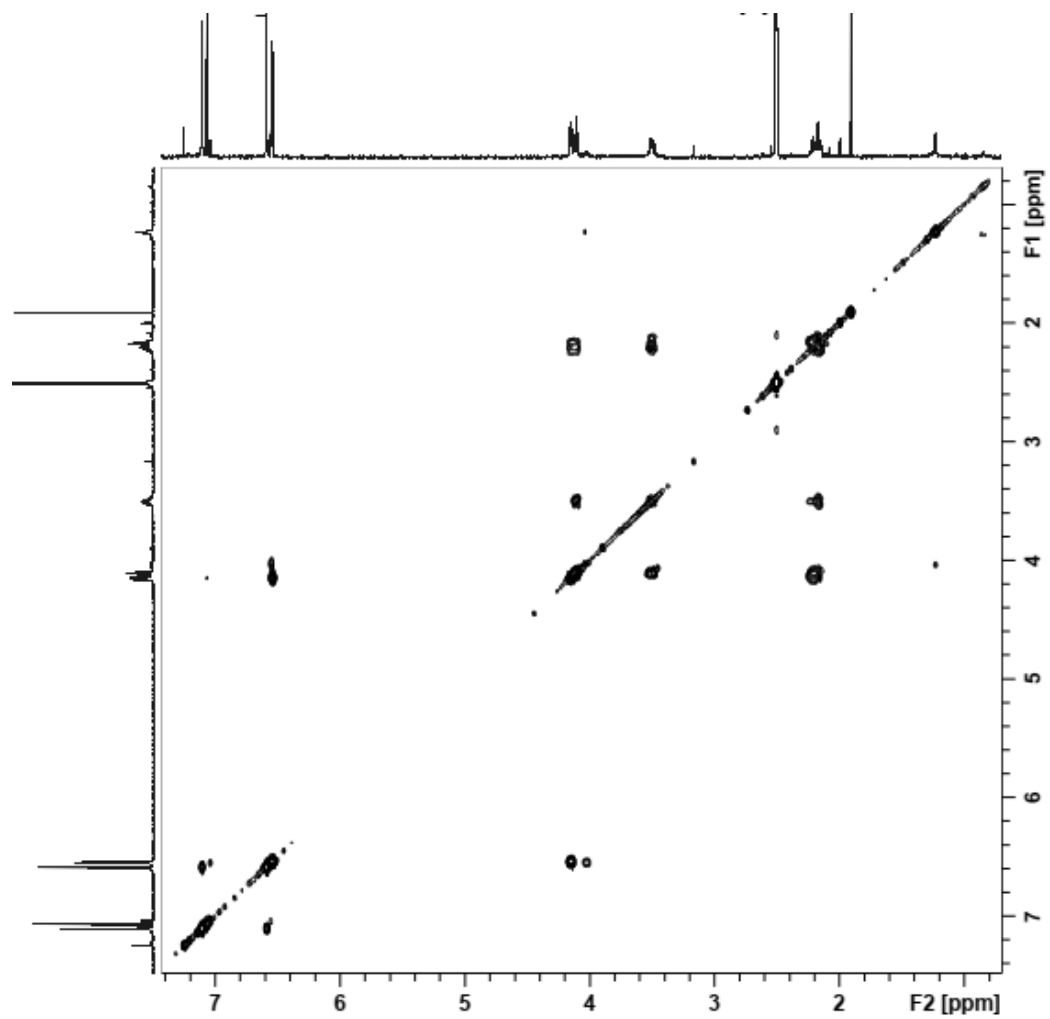
Anexo 43: Espectro de HSQC obtido para **versicolorina C (78)**



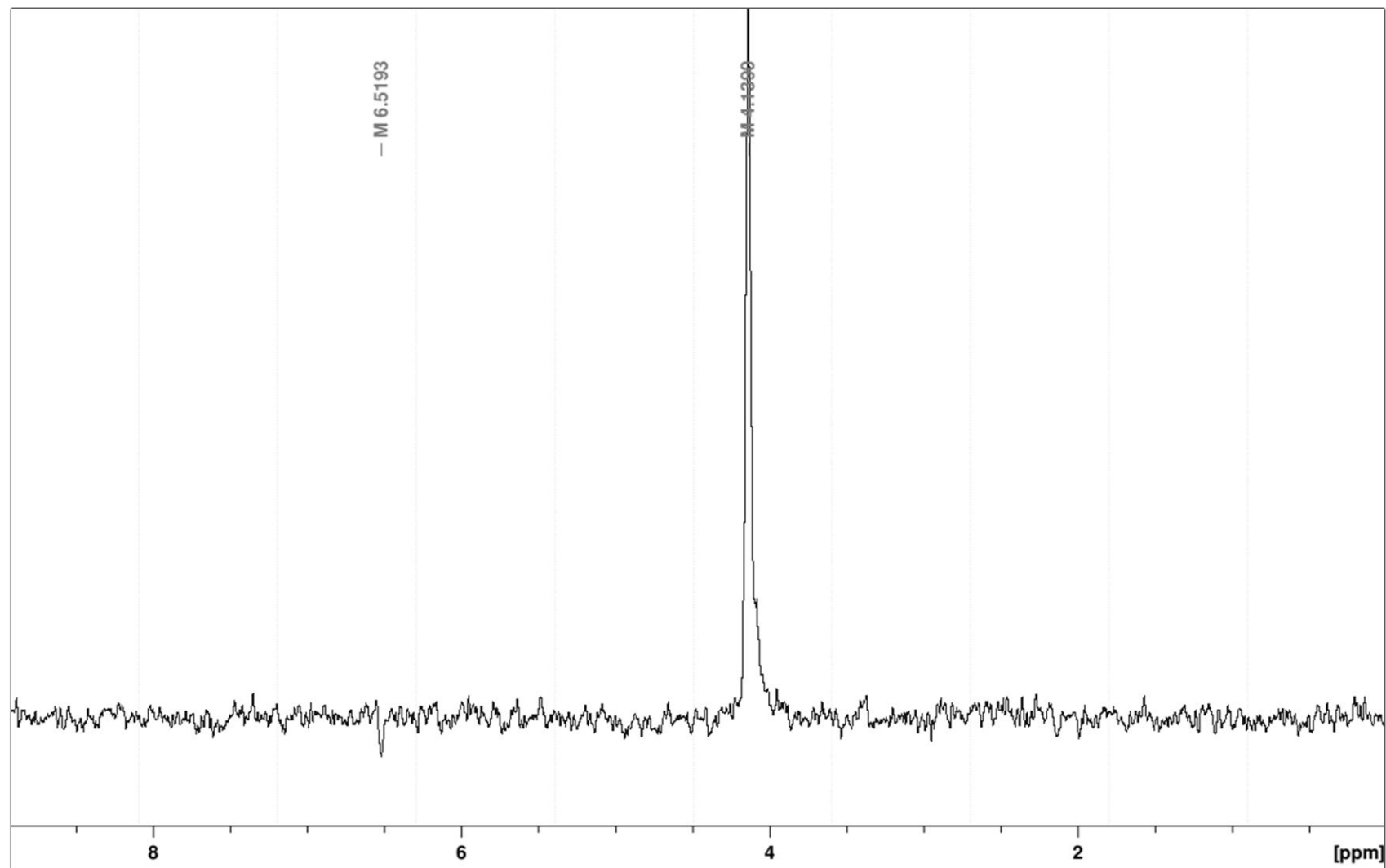
Anexo 44: Espectro de HMBC obtido para **versicolorina C (78)**



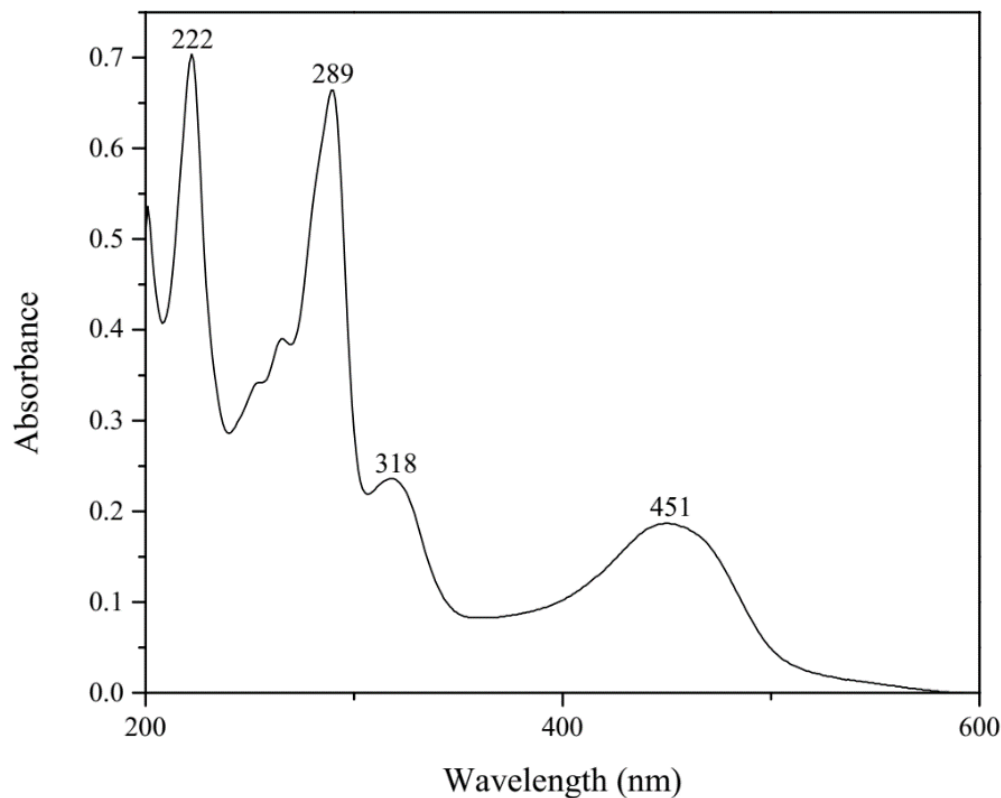
Anexo 45: Espectro de COSY obtenido para versicolorina C (78)



Anexo 46: Espectro NOESY obtenido para versicolorina C (78)



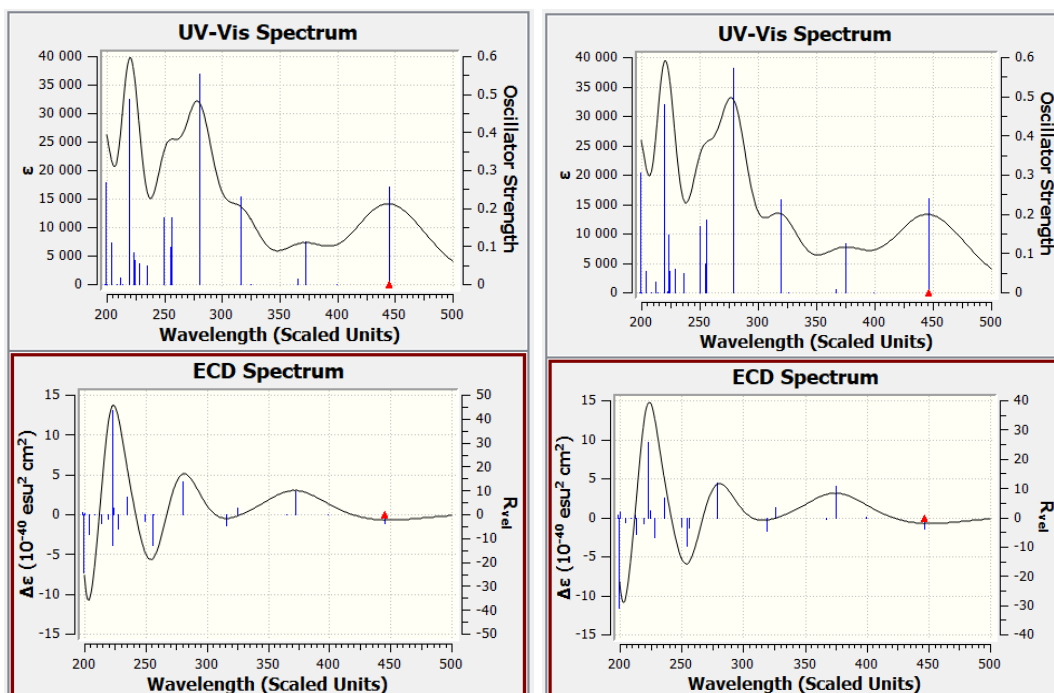
Anexo 47: Espectro de UV obtido em metanol para versicolorina C (**78**)



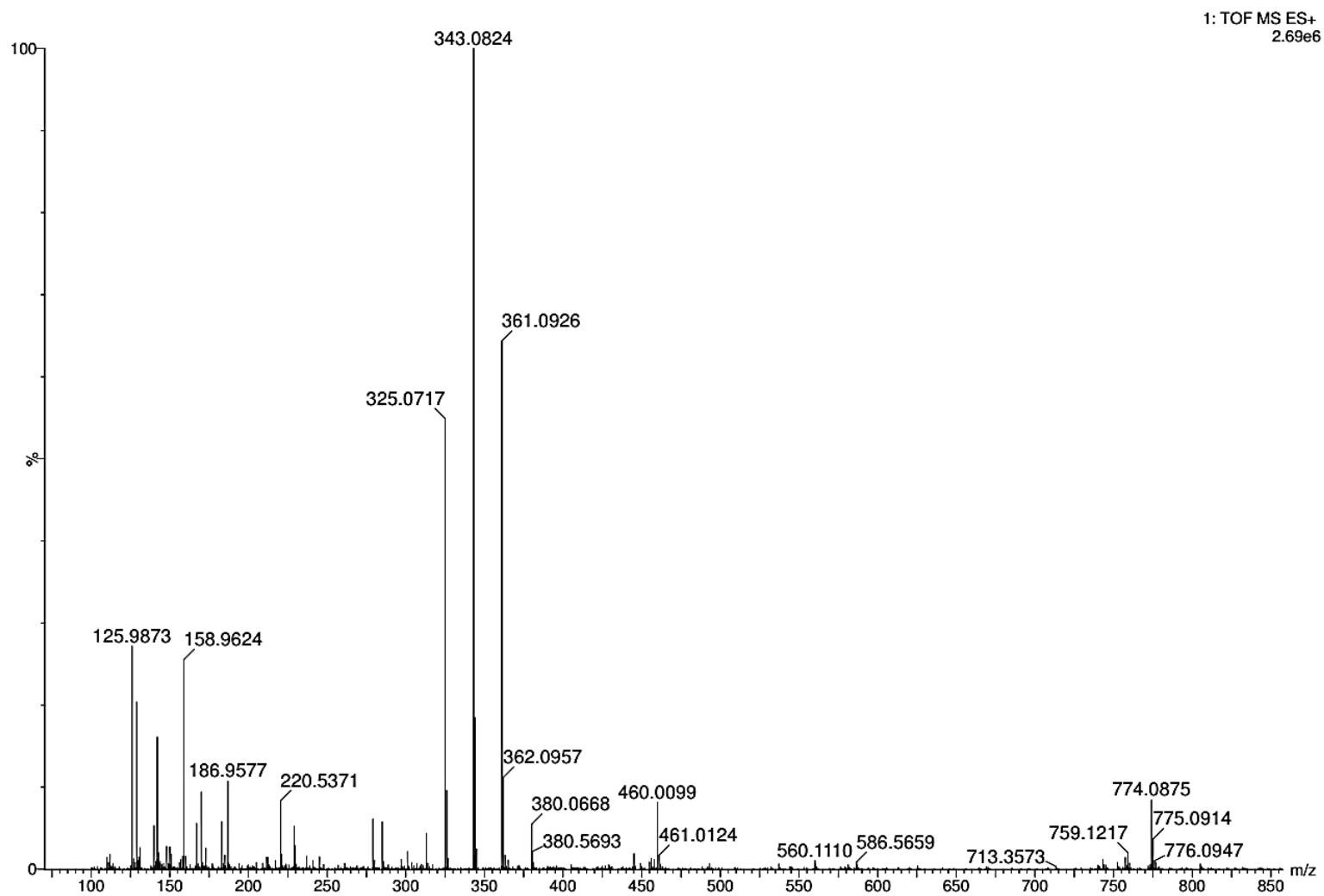
Anexo 48: Espectros de UV e ECD (CAM-B3LYP/PCM(MeOH)/TZVP) calculados dos confômeros de menor energia identificados para (1*S*,2'*R*)-**78**. As barras representam as forças rotacionais calculadas. Os espectros apresentados na Figura 2 foram obtidos multiplicando os espectros de (1*S*,2'*R*)-1 por (-1)

Confômero 1 (1*S*,2'*R*)-**78**

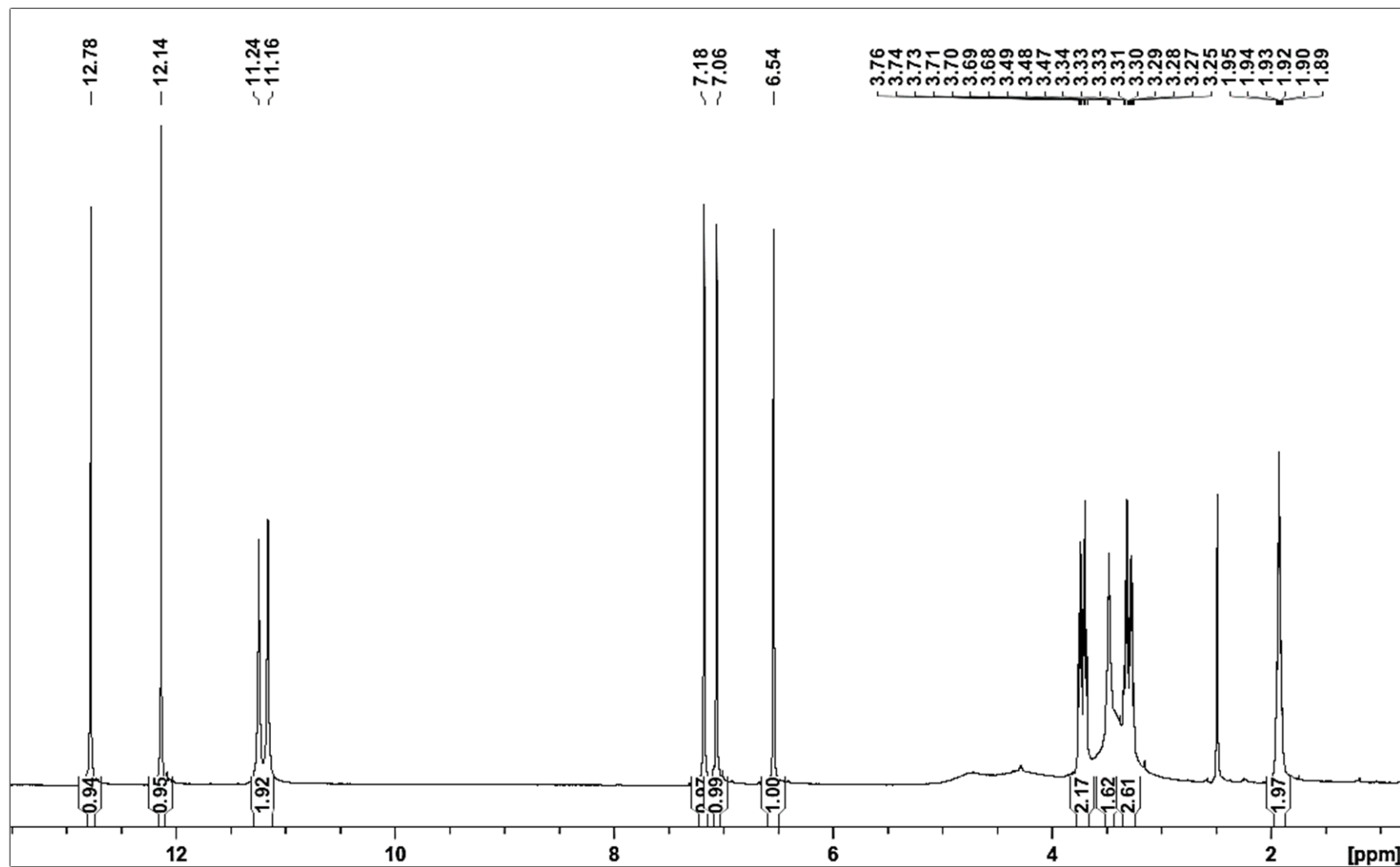
Confômero 2 (1*S*,2'*R*)-**78**



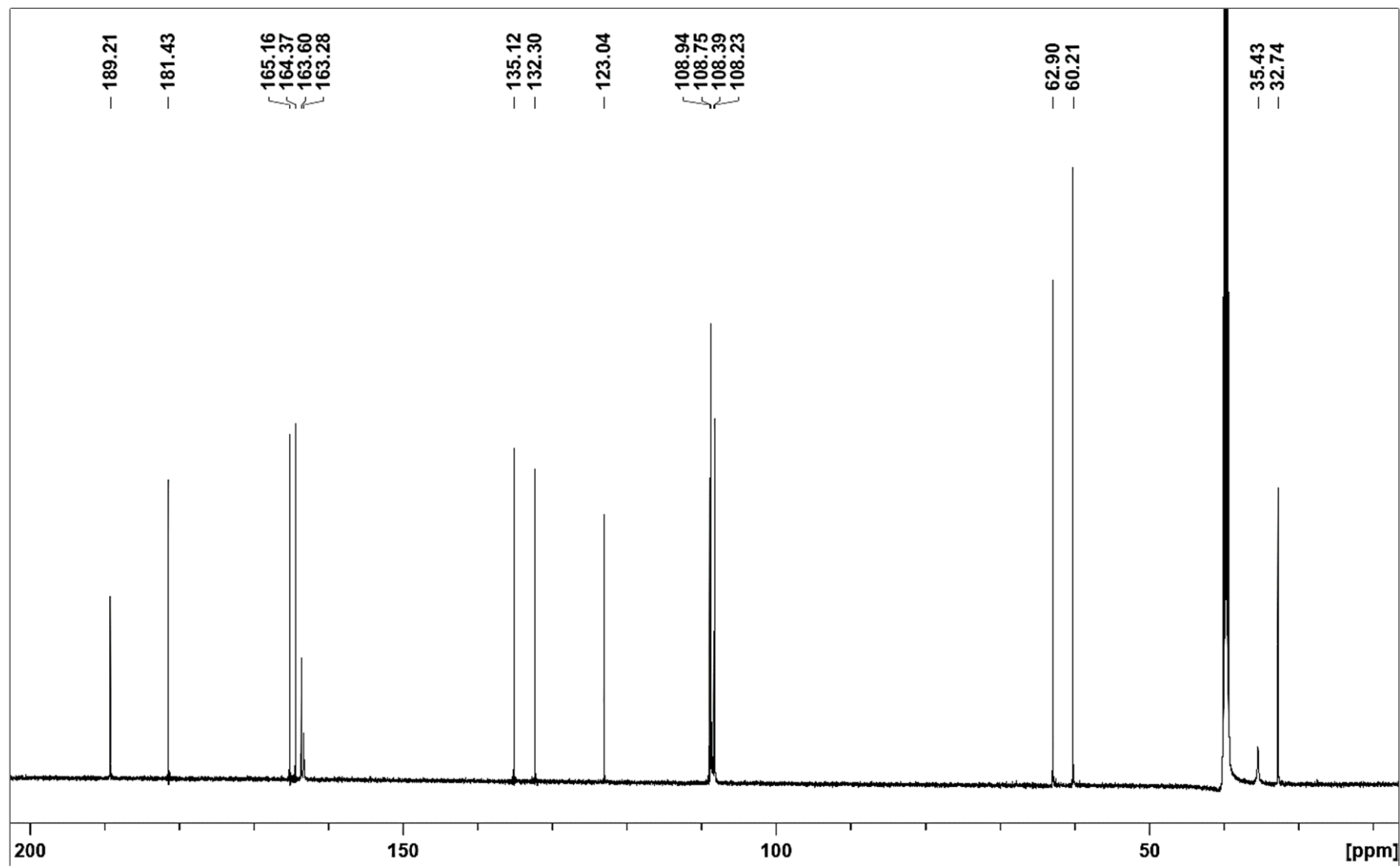
Anexo 49: Espectro de massas de alta resolução (ESI+) de versiconol (79)



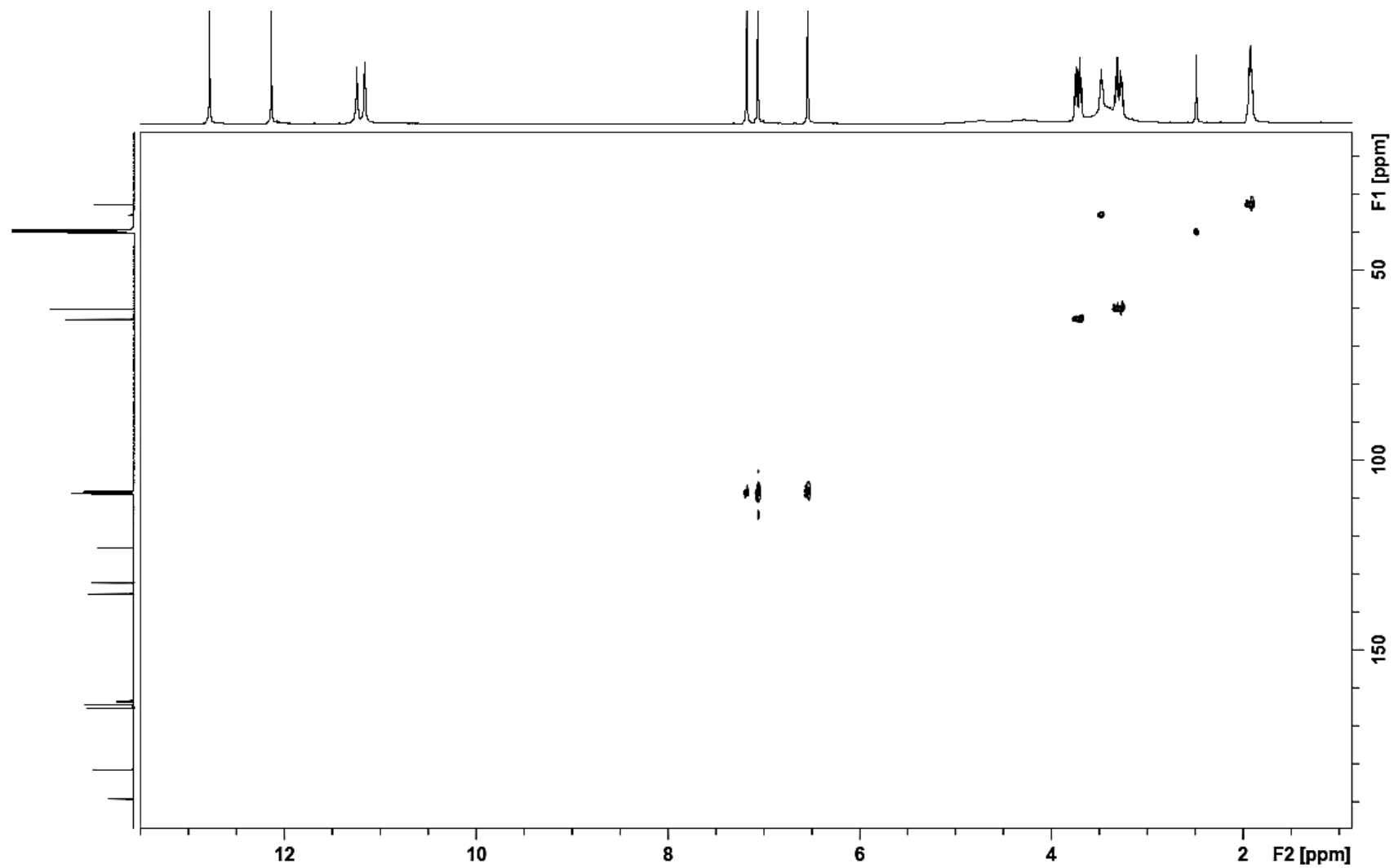
Anexo 50: Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) obtido para versiconol (79)



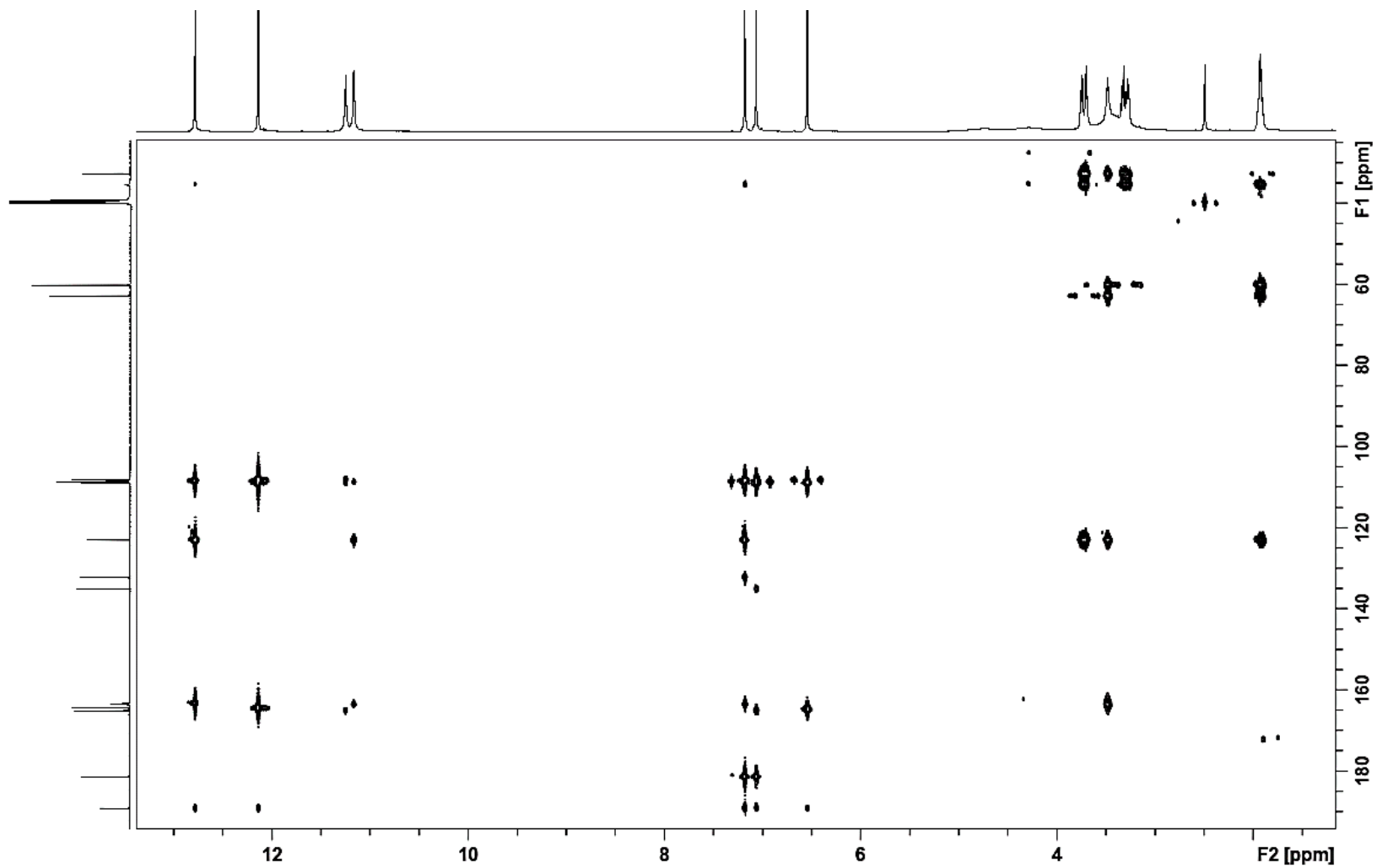
Anexo 51: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) obtido para obtido para **versiconol (79)**



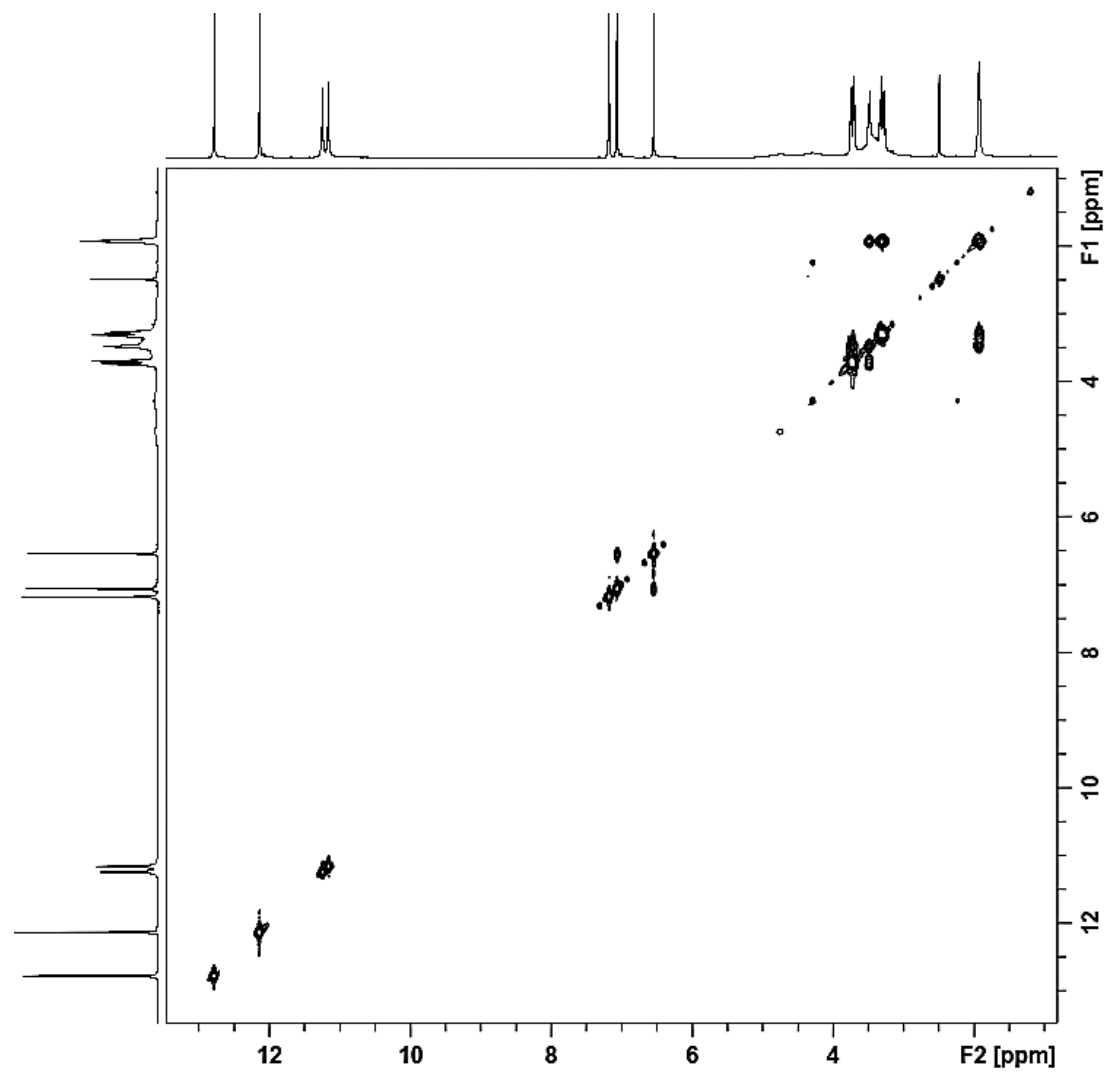
Anexo 52: Espectro de HSQC obtido para versiconol (79)



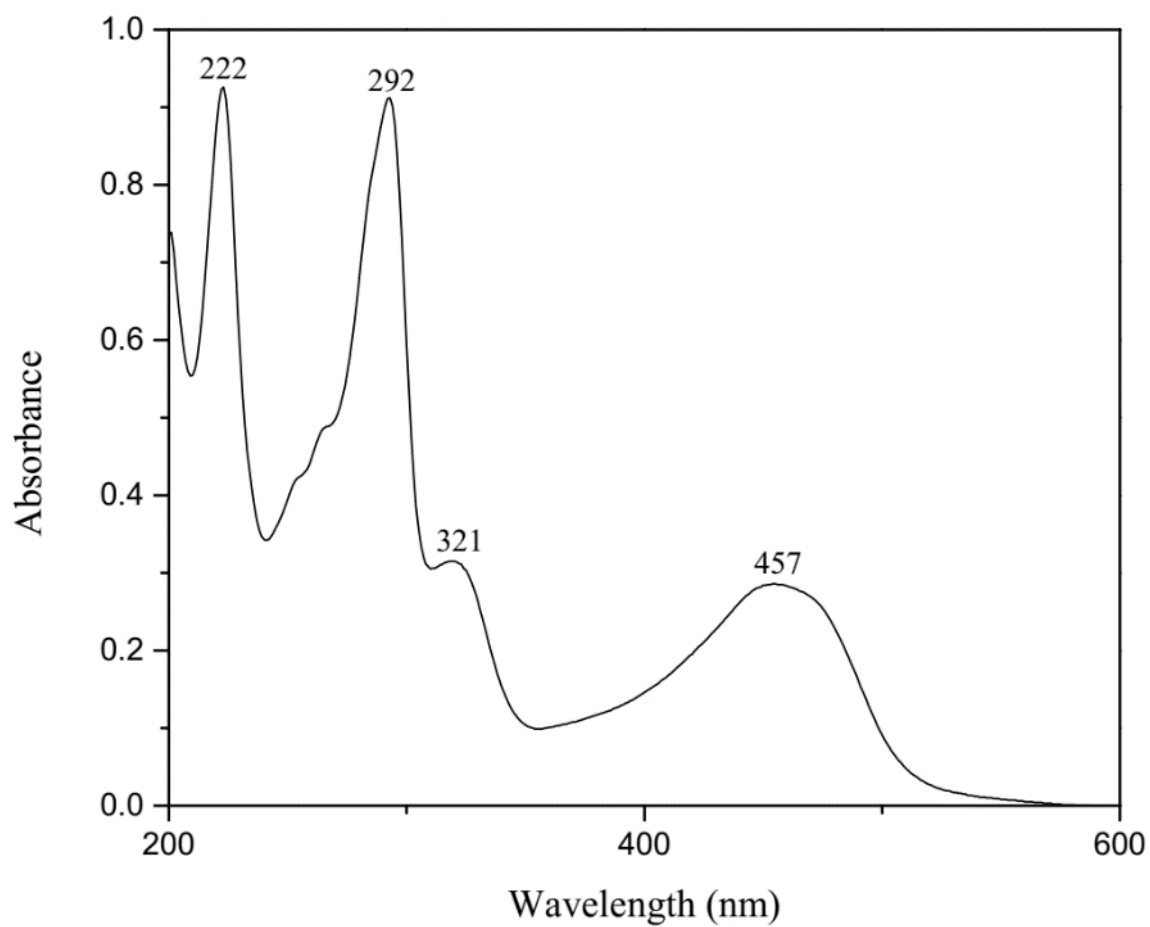
Anexo 53: Espectro de HMBC obtido para versiconol (79)



Anexo 54: Espectro de COSY obtenido para versiconol (79)



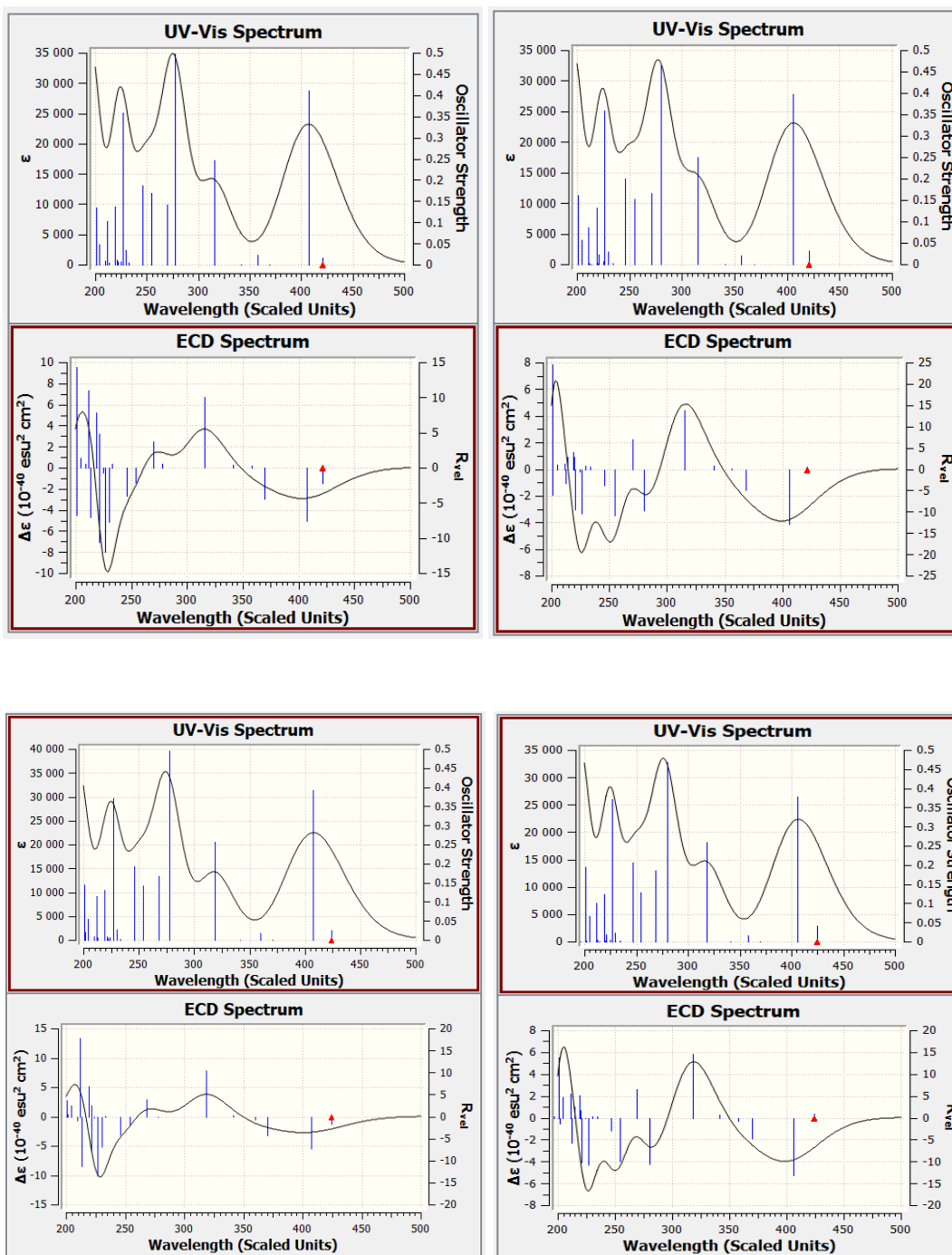
Anexo 55: Espectro de UV obtido em metanol para o versiconol (**79**)



Anexo 56: Espectros de UV e ECD (CAM-B3LYP/PCM(MeOH)/TZVP) calculados dos conformêros de menor energia identificados para (2'S)-**79**. As barras representam as forças rotacionais calculadas.

Confômero 1 - (2'S)-**79**

Confômero 2 - (2'S)-**79**



Anexo 57: (Esquerda) Comparação dos espectros experimentais de IR e VCD de (-)-**79** em DMSO-*d*₆ (preto) com espectros calculados de [B3PW91/PCM(DMSO)/6-31G(d,p), vermelho] para (2'*S*)-**79**. (Direita) Estruturas otimizadas dos conformêros de menor energia identificados para (2'*S*)-**79** no B3PW91/PCM(DMSO)/6-31G(d,p). As setas indicam a correspondência entre as bandas experimentais e calculadas.

