

Universidade Federal do Amazonas – UFAM
Instituto de Ciência Exatas e Tecnologia - ICET
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos
Amazônicos - PPGCTRA

Avaliação química e biológica do extrato bruto do fungo endofítico
Phomopsis sp.

Armando da Costa Garcia

Itacoatiara – AM
2018

Universidade Federal do Amazonas – UFAM
Instituto de Ciência Exatas e Tecnologia - ICET
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos
Amazônicos - PPGCTRA

Armando da Costa Garcia

Avaliação química e biológica do extrato bruto do fungo endofítico
Phomopsis sp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos (PPGCTRA) da Universidade Federal do Amazonas no Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre na área de Ciências e Tecnologia para Recursos Amazônicos.

Orientadora: Dra. Camila Martins de Oliveira

Itacoatiara – AM
2018

G216a Garcia, Armando da Costa
Avaliação química e biológica do extrato bruto do fungo endofítico
Phomopsis sp. / Armando da Costa Garcia. 2018
LXXXIII f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Camila Martins de Oliveira
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos
Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas.

1. metabólitos secundários. 2. atividade biológica . 3.
loranthaceae. 4. aedes aegypti. I. Oliveira, Camila Martins de II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

ARMANDO DA COSTA GARCIA

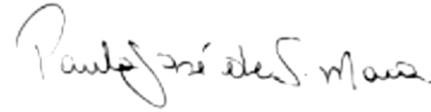
Avaliação química e biológica do extrato bruto do fungo endofítico
Phomopsis sp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, área de concentração Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Recursos Amazônicos.

Aprovado em 13 de dezembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA


Dra. Camila Martins de Oliveira, Presidente
PPGCTRA-Universidade Federal do Amazonas

x 
Dr. Paulo José de Sousa Maia
Universidade Federal do Amazonas

x 
Dra. Renata Takeara Hattori
PPGCTRA-Universidade Federal do Amazonas

x

AGRADECIMENTOS

À minha família.

Ao INPA por ter me dado oportunidade de realizar uma das atividades biológicas realizadas nesse trabalho, especialmente ao Dr. Tadei pela sua compreensão e entendimento das atividades realizadas.

À profa. Dra. Angela pela sua orientação durante minha estadia em Araraquara-SP, muito obrigado pela confiança, sabedoria e apoio.

Aos funcionários e técnicos do Instituto de Química da UNESP de Araraquara por me ajudarem no tempo que estive no local.

À Júlia por ter me aceitado como pupilo em Araraquara e que sem ela meu trabalho não seria concluído e tampouco realizado.

Aos membros da Rep. Lira (João, Thúlio, Vitor, Luís e Rodolfinho) por terem me acolhido no tempo que passei em Araraquara.

À profa. Dra. Camila Martins pela paciência de me orientar e me apoiar em momentos difíceis na realização desse trabalho, me auxiliando com sabedoria e discernimento.

À minha esposa Lissa pela realização de uma das atividades biológicas desse trabalho e por ter me apoiado em todos os momentos com muitos puxões de orelha sendo uma pessoa dedicada, inteligente e um grande exemplo de competência.

A todos que direta e indiretamente contribuíram com esse trabalho.

À FAPEAM pela bolsa concedida e à UFAM pela possibilidade de desenvolvimento desse trabalho.

“Não estou lutando por achar que vou vencer.
Eu tenho que vencer, por isso continuo lutando”

Kurosaki Ichigo - Bleach

RESUMO

Fungos endofíticos são fungos que vivem no tecido interno das plantas sem que lhes causem prejuízo imediato. Esses microrganismos são considerados uma fonte importante para a produção de metabólitos secundários com ação antimicrobiana, antitumoral, entre outras. Este trabalho descreve o estudo químico e biológico dos metabólitos secundários produzidos pelo fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado da planta *Passovia stelis*. Para tanto, o fungo em questão foi cultivado em escala ampliada, utilizando meio líquido de batata dextrose. O caldo obtido foi extraído com acetato de etila fornecendo o extrato bruto. Este foi submetido à ensaio larvicida, frente as larvas do mosquito *Aedes aegypti*, antimicrobiano frente às bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Também foram realizados ensaios anticolinesterase, antioxidante e antifúngico frente aos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*. No ensaio larvicida de dose, o extrato do fungo *Phomopsis* sp. exibiu bioatividade com valores de DL₅₀ de 84,7; 81,6 e 79,5 ppm e DL₉₀ de 147,8; 140,2 e 137,7 ppm respectivamente, nas leituras realizadas após 24, 48 e 72 h. No ensaio larvicida seletivo, três frações obtiveram bioatividade em 100 ppm nas primeiras 24 horas. Após análise por CCD, CLAE e RMN, o extrato bruto foi fracionado por cromatografia em coluna e por CLAE-DAD. Da fração F4 foi isolado o ácido 3-nitropropiónico que é muito utilizado em pesquisas neurológicas. Da fração F7 foi isolado o ácido succínico tido como um dos principais blocos de construção na indústria da síntese química. Outras três substâncias da classe dos ésteres, derivados do tirosol foram isolados da fração F1 sendo uma delas inédita. No ensaio antioxidante duas frações (F5, F6) deram resultado positivo e no ensaio anticolinesterásico quatro frações (F2, F5, F6, F7) mostraram atividade. Estes resultados mostraram a expressiva biopotência do fungo *Phomopsis* sp, abrindo novas perspectivas atrativas para estudos futuros.

Palavras-chave: Metabólito secundário, Atividade biológica, Loranthaceae, *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

Endophytic fungi are microorganisms that live in interne tissues of plants, without causing them immediate damage. They are considered an important source to the production of secondary metabolites with antimicrobial, antitumor activities, among others. The present work describes the chemical and biological study of the secondary metabolites produced by the endophytic fungus *Phomopsis* sp. isolated from the plant *Passovia stelis*. For that, the fungus at hand was cultivated in large scale using the liquid medium of dextrose potato. The ethylacetat crude extract was obtained through extraction from the broth and then submitted to larvicide assay against larvae of the mosquito *Aedes aegypti* and antimicrobial against the pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. It was also performed assays against the enzyme anticholinesterase, antioxidants and antifungal against *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*. In the selective larvicide, 3 fractions showed bioactivity (100 ppm) in 24h. In the dosing assay larvicide, the extract of the fungus *Phomopsis* sp. showed bioactivity with LD₅₀ of 84.7, 81.6 and 79.5 ppm and LD₉₀ de 147.8, 140.2 and 137.7 ppm after 24, 48 e 72 h, respectively. The crude extract was analyzed using TLC, HPLC and NMR and then purified through column chromatography and HLPC-DAD. From F4, the 3-nitropropionic acid was isolated, which is used in neurological research. Succinic acid, which is considered one of the construction blocks in chemical synthesis industry, was isolated from the fraction F7. Other 3 esterified substances, derivatives of tyrosol, were isolated of the fraction F1, and one of them unpublished. In the antioxidant assay, two fractions (F5, F6) showed positive results and in the assay against the enzyme anticholinesterase four fraction (F2, F5, F6, F7) presented bioactivity. These results demonstrate the expressive biopotency of the fungus *Phomopsis* sp. and open a new perspective for further studies.

Keywords: Secondary metabolite, Biological activity, Loranthaceae and *Aedes aegypti*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número de artigos publicados na última década com a palavra “endophytic fungi” (fungos endofíticos) no título.	19
Figura 2 – Estruturas de substâncias produzidas por fungos endofíticos.	20
Figura 3 - Algumas substâncias bioativas identificadas recentemente.....	22
Figura 4 - Substâncias isoladas do gênero <i>Phomopsis</i> com bioatividade.....	24
Figura 5 – Representação esquemática da obtenção dos metabólitos secundários produzidos pelo fungo endofítico <i>Phomopsis</i> sp.	30
Figura 6 – Representação esquemática do fracionamento do extrato do extrato fúngico.	30
Figura 7 – Cromatograma obtido em CLAE-DAD utilizando coluna C18 em gradiente exploratório ($\lambda = 254$ nm) do extrato do fungo endofítico <i>Phomopsis</i> sp.	38
Figura 8 – Espectro de RMN de ^1H com supressão do sinal $\text{H}_2\text{O}/\text{HOD}$ do extrato do fungo <i>Phomopsis</i> sp. em CD_3OD e 300 MHz	39
Figura 9 – Espectro de RMN de ^1H das frações F1, F2 (CDCl_3), F3, F4 ($\text{CD}_3)_2\text{SO}$ em 300 MHz.	41
Figura 10 – Espectro de RMN de ^1H das frações F5, F6, F7, F8 ($\text{CD}_3)_2\text{SO}$ em 300 MHz Erro! Indicador não definido.	
Figura 11 – Representação estrutural da Substância 01.	43
Figura 12 – Espectro de RMN de ^1H em 300 MHz da Fração F7-1 (substância 1) em ($\text{CD}_3)_2\text{SO}$ e 7, 0 T. Corte entre as regiões de δ 12,0 e δ 4,0 ppm.....	43
Figura 13 – Representação estrutural da Substância 02	45
Figura 14 – Espectro de RMN- ^1H utilizando como solvente deuterado ($\text{CD}_3)_2\text{SO}$ e 300 MHz da Fração F4-1.....	46
Figura 15 – Representação estrutural da Substância 03	46
Figura 16 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC da substância 04 (F1-6)	48
Figura 17 – Representação estrutural da Substância 04	49
Figura 18 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC da substância 04 (F1-6)	49
Figura 19 – Representação estrutural da Substância 05	51

Figura 20 - Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC da substância 05 (F1-16)	52
Figura 21 – Mortalidade das larvas de <i>A. aegypti</i> em 100 e 500ppm do extrato bruto e frações do <i>Phomopsis</i> sp.....	53
Figura 22 - Crescimento fúngico em cromatoplasmas contendo extrato e frações.	57
Figura 23 – Ensaio anticolinesterásico realizado em cromatoplasma de sílica-gel.....	58
Figura 24 – Mecanismo de reação no ensaio de antioxidante com DPPH	59
Figura 25 – Ensaio de atividade antioxidante em cromatoplasma de sílica-gel utilizando como controle positivo a Rutina (R).....	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Massas das frações obtidas pelo fracionamento do extrato fúngico.....	31
Quadro 2 – Soluções utilizadas na avaliação de atividade anticolinesterásica.	34
Quadro 3 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura da Substância 01.....	44
Quadro 4 – Valores de deslocamento dos tripletos da substância 02 RMN- ¹ H.....	45
Quadro 5 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura da Substância 03.....	47
Quadro 6 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura da Substância 04.....	50
Quadro 7 – Dados espectrométricos obtidos da Substância 05.....	52
Quadro 9 – Resultado da atividade anticolinesterásica para o extrato bruto e frações.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dose Letal em 50% das larvas de <i>A. aegypti</i> com IC 90, 95 e 99% do extrato de <i>Phomopsis</i> sp.	53
Tabela 2 – Dose Letal em 90% das larvas de <i>A. aegypti</i> com IC 90, 95 e 99% do extrato de <i>Phomopsis</i> sp.....	53
Tabela 3 – Valores referentes a inclinação da reta e Qui-quadrado (X^2).	54

LISTA DE ABREVIATURAS

3-NPA – Ácido 3-nitropropiónico

AcOEt – Acetato de Etila

AChE – acetilcolinesterase

ATCC – American Type Culture Collection

BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CLAE-DAD – Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência com Detector de Foto Diodo

COSY – Espectroscopia de Correlação

DPPH – 2, 2-Difenil-1-Picrilhidrazil

HMBC – Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

HSQC – Heteronuclear Single Quantum Coherence

IC – Intervalo de Confiança

MBC – Concentração Bactericida Mínima

MeOH – Metanol

CIM – Concentração Inibitória Mínima

MRSA – *Staphylococcus Aureus* Resistente à Meticilina

NADPH – Fosfato de Dinucleotideo de Adenina e Nicotinamida

NuBBE – Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais

P.A. – Padrão Analítico

PDA – Batata Dextrose Ágar

PDB – Meio de Batata Dextrose

RMN-¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SDBS – Spectral Database for Organic Compounds

SPE – Extração de Fase Sólida

TMS – Tetrametilsilano

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Espécie Vegetal Hospedeira.....	17
2.2 Fungos Endofíticos e sua Quimiodiversidade.....	17
2.3 Fungo Endofítico do Gênero <i>Phomopsis</i>	23
2.4 Busca por Novos Agentes Antimicrobianos	25
2.5 <i>Aedes aegypti</i>	25
3. OBJETIVO	27
3.1 Objetivo Geral.....	27
3.2 Objetivos Específicos.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Obtenção e Identificação da Cepa.....	29
4.2 Obtenção do Extrato Bruto.....	29
4.3 Fracionamento do Extrato Fúngico	30
4.4 Avaliações Biológicas do Extrato e Frações	31
4.4.1 Larvicida.....	31
4.4.2 Antimicrobiano.....	32
4.4.3 Antioxidante	33
4.4.4 Atividade Antifúngica	33
4.4.5 Anticolinesterase	33
4.5 Avaliação Química do Extrato e Frações.....	34
4.5.1 Avaliação do perfil químico por CLAE-DAD do extrato bruto e suas frações	34
4.5.2 Obtenção das Subfrações.....	35
4.5.3 Análises por RMN- ¹ H e Espectrometria de Massas.....	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	38
5.2 Análises Químicas.....	38

5.2.1 Identificação Fúngica	38
5.2.2 Perfil Químico do Extrato Fúngico	38
5.2.3 Perfil Químico das Frações	39
5.2.4 Identificação e Elucidação Estrutural	43
5.2.4.1 Substância 01 (Subfração F7-1).....	43
5.2.4.2 Substância 02 (Subfração F4-1).....	44
5.2.4.3 Substância 03 (Subfração F1-7).....	46
5.2.4.4 Substância 04 (Subfração F1-6).....	48
5.2.4.5 Substância 05 (Subfração F1-16).....	50
5.3 Análises Biológicas	52
5.3.1 Atividade Larvicida	52
5.3.2 Atividade Antibacteriana.....	55
5.3.3 Atividade antifúngica	56
5.3.4 Atividade anticolinesterase.....	57
5.3.5 Ensaio Antioxidante	59
6. CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS.....	62
APÊNDICE.....	70

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos como os fungos e as bactérias desempenham um importante papel na produção de substâncias que podem ser utilizadas na indústria farmacêutica (LIANG et al., 2012), alimentícia e agrícola (PORRAS-ALFARO & BAYMAN, 2011). Estima-se que mais de 60% dos medicamentos utilizados tem alguma fase de sua origem relacionada a uma fonte natural, como plantas e microrganismos (COSTA-LOTUFO et al. 2010). Nos estudos de Blackwell (2011) foi estimada a existência de até 5,1 milhões de espécies de fungos no mundo em que foram descritas mais de 97 mil, ou seja, apenas 1,9% dos fungos que provavelmente existem são conhecidos. Além dos fungos conhecidos na indústria alimentícia, tem-se também os encontrados no interior de espécies vegetais, denominados fungos endofíticos, que apresentam um enorme potencial na produção de substâncias novas e com atividade biológica (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013).

O termo ‘endophyte’ (endófito) foi introduzido inicialmente por De Bary em 1866 para definir todos os micróbios em que são inclusos fungos, bactérias, cianobactérias, e actinomicetos que residem dentro do tecido das plantas (KHARWAR et al. 2011), distinguindo-se dos epifíticos que vivem na superfície do vegetal (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013). Posteriormente Bacon e White definiram fungos endofíticos como sendo fungos que vivem no tecido interno das plantas sem que lhes cause prejuízo imediato (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013; KHARWAR et al. 2011; KAUL et al. 2012).

Os microrganismos endofíticos, embora já descritos no século XIX começaram a ser efetivamente estudados somente no final dos anos 70. Nos últimos anos, entretanto, eles adquiriram grande importância. Verificou-se que não se tratam de simples espectadores dentro de seus hospedeiros, mas passaram a ser vistos como participantes ativos em importantes processos, como por exemplo na proteção das plantas contra seus inimigos. Mais ainda, foram identificados como realizadores de funções de alto interesse agrônomo, como a fixação de nitrogênio atmosférico e produção de metabólitos úteis para a planta hospedeira (AZEVEDO, 1998). A estrutura química e a bioatividade destes compostos variam muito, possibilitando uma incessante inspiração para inovações na medicina, nutrição, pesquisa agroquímica e nas ciências da vida (XIE et al. 2015).

Os endófitos são acreditados por serem os maiores reservatórios de compostos naturais com potencial biológico. Fungos endofíticos que colonizam inter- e intracelularmente os tecidos das plantas são conhecidos por serem uma fonte rica de novos compostos, incluindo agentes anticancerígenos (GOND; KHARWAR; WHITE, 2014; SAMAGA; RAI; RAI, 2014),

antibióticos (HUSSAIN et al. 2015), antivirais (HUANG et al. 2007), antioxidantes (SADORN et al. 2016), anticolinesterásicos (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011), imunomoduladores (KUMAR et al. 2005), , antidepressivos (SPECIAN et al. 2014), além de serem fontes de compostos larvicida (TIAN et al. 2016) e inseticidas (KUSARI et al. 2008), que demonstram o grande potencial da produção de substâncias com atividades biológicas das mais variadas possíveis de grande importância para o ser humano.

Esses microrganismos despertam o interesse para a atividade larvicida contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti*, um vetor dos vírus da Dengue, Chikungunya e Zika, largamente difundidos no Brasil e que provocam epidemias de doenças causadas por eles, onde as maiores taxas de incidência do vírus da dengue no Brasil estão na região Norte e Centro-Oeste motivando a busca por inibidores do crescimento das larvas de mosquito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Além do vetor dessas doenças epidêmicas, tem-se as infecções hospitalares causadas por bactérias que muitas vezes são resistentes a antibióticos. O uso excessivo de antibióticos desencadeou uma elevada resistência bacteriana, limitando as opções terapêuticas dos processos infecciosos e a resistência a essas drogas estão se tornando uma séria preocupação no mundo, sendo necessário uma urgente busca de novos agentes antibacterianos ou fungicidas efetivos em tratamento de doenças infecciosas (XING et al. 2011; CUNICO et al. 2004). Entre as bactérias que sofrem este tipo de resistência serão abordadas nesse estudo quatro delas que são, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

O interesse biotecnológico nos fungos endofíticos encontra-se em constante crescimento, visto que os metabólitos secundários produzidos por eles são considerados uma fonte inesgotável de compostos químicos que podem ser responsáveis por uma diversidade biológica inestimável.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Espécie Vegetal Hospedeira

O gênero *Passovia* inclui trinta ou mais espécies distribuídas na América Central, Oeste Indiano e na faixa tropical da América do Sul (SUAZA-GAVIRIA; PABÓN-MORA; GONZÁLEZ, 2016), tem como basionímia *Loranthus stelis* L. e sinónímias *Phthirusa stelis* (L.) Kuijt e *Struthanthus stelis* (L.) Blume (TROPICOS.ORG, 2016). Há poucos estudos relacionados ao gênero *Passovia* e todos voltados a sua morfologia ou distribuição geográfica do vegetal.

Loranthaceae é a maior das doze famílias da ordem Santales, é formada por 77 gêneros e cerca de 950 espécies hemiparasitas (SUAZA-GAVIRIA; PABÓN-MORA; GONZÁLEZ, 2016), com exceção de três gêneros monotípicos arbustivos ou arbóreos hemiparasitas de raízes essa família é composta predominantemente por ervas-de-passarinho, que recebem este nome popular, pois têm as aves como principais agentes dispersores de suas sementes (DETTKE; WAECHTER, 2014). Na flora brasileira existem apenas três famílias representadas pelas ervas-de-passarinho que são Loranthaceae, Santalaceae e Viscaceae em que a Loranthaceae é mais representativa em termos de número de gênero e espécie (ARRUDA et al. 2012). Dentre essas espécies está a *Passovia stelis* hospedeira do fungo relacionado a esse trabalho.

As plantas pertencentes a família Loranthaceae têm sido há muito tempo reconhecidas como portadoras de propriedades terapêuticas para tratamento de várias enfermidades, como no conhecimento empírico, em que são utilizadas para diversas inflamações, problemas uterinos, diabetes, gonorreia, limpeza de pele, problemas de espinhas, dores renais, gastrite, tontura, hipertensão, hemorragia uterina, menopausa, úlceras, tumores desconhecidos, entre outros (DIDIER et al. 2009; SILVA; CONCEIÇÃO; ALMEIDA, 2010; VIEIRA et al. 2005). Algumas investigações científicas apontam para a eficácia dessa família para o tratamento de câncer (DIDIER et al. 2009), efeito anti-hipertensivo (BACHHAV et al. 2012), atividade antimicrobiana (VIEIRA et al. 2005) e no trabalho de Ouedraogo et al. (2011), frações de extratos de espécies da Loranthaceae exercem atividades vasorelaxantes e anti-hipertensivas.

2.2 Fungos Endofíticos e sua Quimiodiversidade

Os fungos são utilizados pelo homem como fonte alimentar, também para a produção de alimentos e de drogas. São seres eucariotos que podem ser unicelulares ou multicelulares. Eles têm parede celular composta principalmente por uma substância chamada de quitina. As

formas unicelulares dos fungos, as leveduras, são microrganismos ovais que são maiores que as bactérias. Os mais típicos são os bolores (fungos filamentosos) que formam massas visíveis chamadas de micélios compostos de longos filamentos (hifas) que se ramificam e se entrelaçam. Os fungos podem se reproduzir sexuada ou assexuadamente e obtêm sua alimentação por meio da absorção de soluções de matéria orgânica presente no ambiente, que pode ser do solo, da água do mar, da água doce, um animal ou uma planta (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

No relacionamento simbiótico há formas de microrganismos e plantas se comportarem beneficiando ou não um ao outro, são elas: parasitismo, em que um organismo se beneficia da extração de nutrientes prejudicando o outro; mutualismo, em que há benefício de ambos os organismos; antagonismo ou exclusão competitiva que envolve a competição entre micróbios; e comensalismo, enquanto um dos organismos se beneficia o outro não é afetado de forma alguma (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Muitos compostos bioativos benéficos à indústria farmacêutica, meio-ambiente, agricultura, e a indústria são produzidos por endófitos (NAIR; PADMAVATHY, 2014). Eles constituem um grupo de microrganismos extremamente variados, onipresentes em plantas os quais mantêm uma associação imperceptível com os seus anfitriões por pelo menos uma parte do seu ciclo de vida (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012).

Fungos endofíticos são compostos principalmente de fungos ascomicetos e seus anamorfos e também pequenas quantidades de basidiomicetos e zigomicetos. Eles têm uma relação evolutiva de longa duração com suas plantas hospedeiras. Assim, muitos deles têm os mesmos ou similares componentes bioativos como as suas plantas hospedeiras (KUSARI; PANDEY; SPITELLER, 2013). Este grupo de fungos pode ter várias funções dentro das comunidades de plantas, incluindo efeito nutricional, proteção contra patógenos prejudiciais a raízes, modificação de tolerâncias ambientais e envolvimento na dinâmica da comunidade vegetal (BONFIM et al. 2016). A variabilidade de fatores bióticos como as espécies envolvidas na interação e abióticos, no caso de fatores ambientais, contribuem muito para o incremento da diversidade de metabólitos produzidos durante a interação fungo endofítico-planta (SOLIMAN et al. 2013).

Um estudo bibliométrico realizado na base de dados “Web of Science” (26/10/2016) mostrou que foram publicados nos últimos 10 anos (2007-2016) 1541 artigos (**figura 1**, p. 19) com a palavra “endophytic fungi” (fungos endofíticos) no título, ou seja, com o estudo principal voltado a fungos endofíticos. Esses números mostram o interesse dos pesquisadores na pesquisa

relacionada a fungos endofíticos e o número de resultados, pelo menos satisfatórios resultando em publicações, para essa categoria.

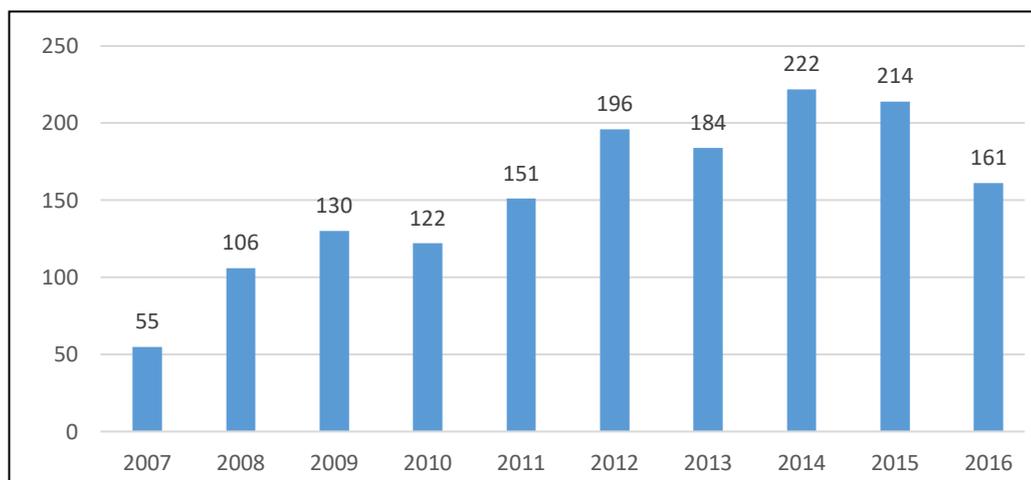


Figura 1 - Número de artigos publicados na última década com a palavra “endophytic fungi” (fungos endofíticos) no título.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2016)

A grande motivação para a busca por novos compostos bioativos a partir de fungos endofíticos aconteceu com a identificação e o re-isolamento do paclitaxel (taxol® - **I, figura 2** – p. 20) entre 1967 e 1971 das cascas da espécie vegetal *Taxus brevifolia* popularmente conhecida como teixo, uma árvore relativamente rara e de crescimento lento. Durante os primeiros estudos sobre sua potencialidade como um novo agente antineoplásico, foi questionada a viabilidade de seu futuro emprego devido à complexidade de sua estrutura e a relativa escassez da fonte natural (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Foi estimado em 2004 que a demanda por paclitaxel chegara a mais de 300 kg de produção, equivalente a 750 mil árvores de teixo por ano, que causaria problemas de abastecimento e implicações ecológicas (STANIEK; WOERDENBAG; KAYSER, 2009). Pesquisas foram realizadas para a procura de fungos endofíticos isolados de espécies de *Taxus* produtores de paclitaxel, bem como de outras espécies de plantas relacionadas a processos de fermentação microbiana e engenharia genética para dessa forma melhorar a produção da droga, e muito progresso foi alcançado durante as últimas duas décadas (ELAVARASI; RATHNA; KALAISELVAM, 2012).

Com o interesse na produção do paclitaxel (**I, figura 2**, p. 20), mencionado anteriormente, um grupo da "Montana State University" nos Estados Unidos relatou sua obtenção e do seu precursor baccatina III (**II, figura 2**, p. 20) a partir de espécies de fungos endofíticos, *Taxomyces andreanae*, isolados das cascas de *T. brevifolia* e *Pestalotiopsis*

microspora isolados da casca da *T. wallichiana* (VIEGAS; DA SILVA BOLZANI; BARREIRO, 2006).

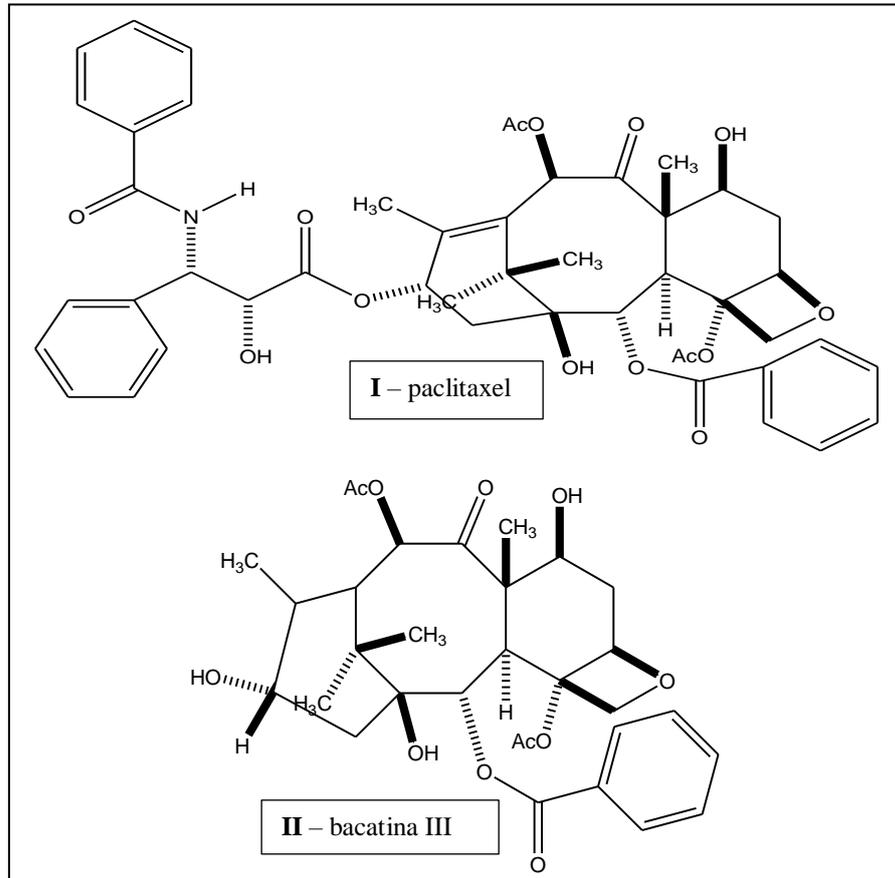


Figura 2 – Estruturas de substâncias produzidas por fungos endofíticos.
Fonte: Viegas, Bolzani e Barreiro (2006)

Para Park et al. (2015), fungos endofíticos podem induzir a produção de fitoquímicos para proteger a planta de fitopatógenos. Eles são capazes de produzir uma série de substâncias bioativas naturais importantes, anteriormente conhecidas pela produção apenas por plantas.

O primeiro caso muito importante para o estudo dos fungos endofíticos foi relatado através da descoberta do composto anticancerígeno paclitaxel (**II, figura 2**, p. 20) (LEDWITCH et al. 2013), e assim outras substâncias produzidas por plantas também são relatadas na literatura por serem produzidas por fungos endofíticos. Sua enorme diversidade biológica, juntamente com a sua capacidade de biossíntese de metabólitos secundários bioativos forneceu o impulso para uma série de investigações sobre este grupo (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012).

Há vários trabalhos publicados demonstrando a eficácia dos fungos endofíticos em produzir substâncias bioativas. No trabalho de Ibrahim et al. (2016) foram isolados dois novos

triterpenoides tetracíclicos com atividades contra leishmaniose e células tumorais (**III e IV, figura 3**, p. 22). Zhao et al. (2015), identificaram quatro novos ácidos tetrâmicos e uma nova furanona isolados do fungo endofítico *Neopestalotiopsis* sp. em que uma delas obteve atividade bactericida (**V, figura 3**, p. 22). No estudo de Zhang et al. (2016) foram identificadas duas novas citocalasinas, periconiasin G (**VI, figura 3**, p. 22) e periconiasin H (**VII, figura 3**, p. 22) isoladas do fungo endofítico *Periconia* sp. com atividade anti-HIV, mencionada no trabalho. E, no estudo de Liu et al. (2016) oito novos sesquiterpenoides cariofilenos (pestaloporinates A-G e 14-acetilhumulane) foram isolados da cultura do fungo endofítico *Pestalotiopsis* sp., dentre essas novas substâncias o pestaloporinate B (**VIII, figura 3**, p. 22) apresentou potente atividade anti-inflamatória. Esses são alguns exemplos da importância dos fungos endofíticos na produção de novas e importantes substâncias bioativas.

A capacidade dos fungos endofíticos crescerem e produzirem seus metabólitos dentro de duas a quatro semanas os torna mais viáveis economicamente (AYOB; SIMARANI, 2016). Além disso, eles tem consideráveis vantagens sobre fontes vegetais como a manipulação de condições de fermentação pela alteração do tipo do meio e condições de cultura como pH, temperatura e tempo de coleta (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012).

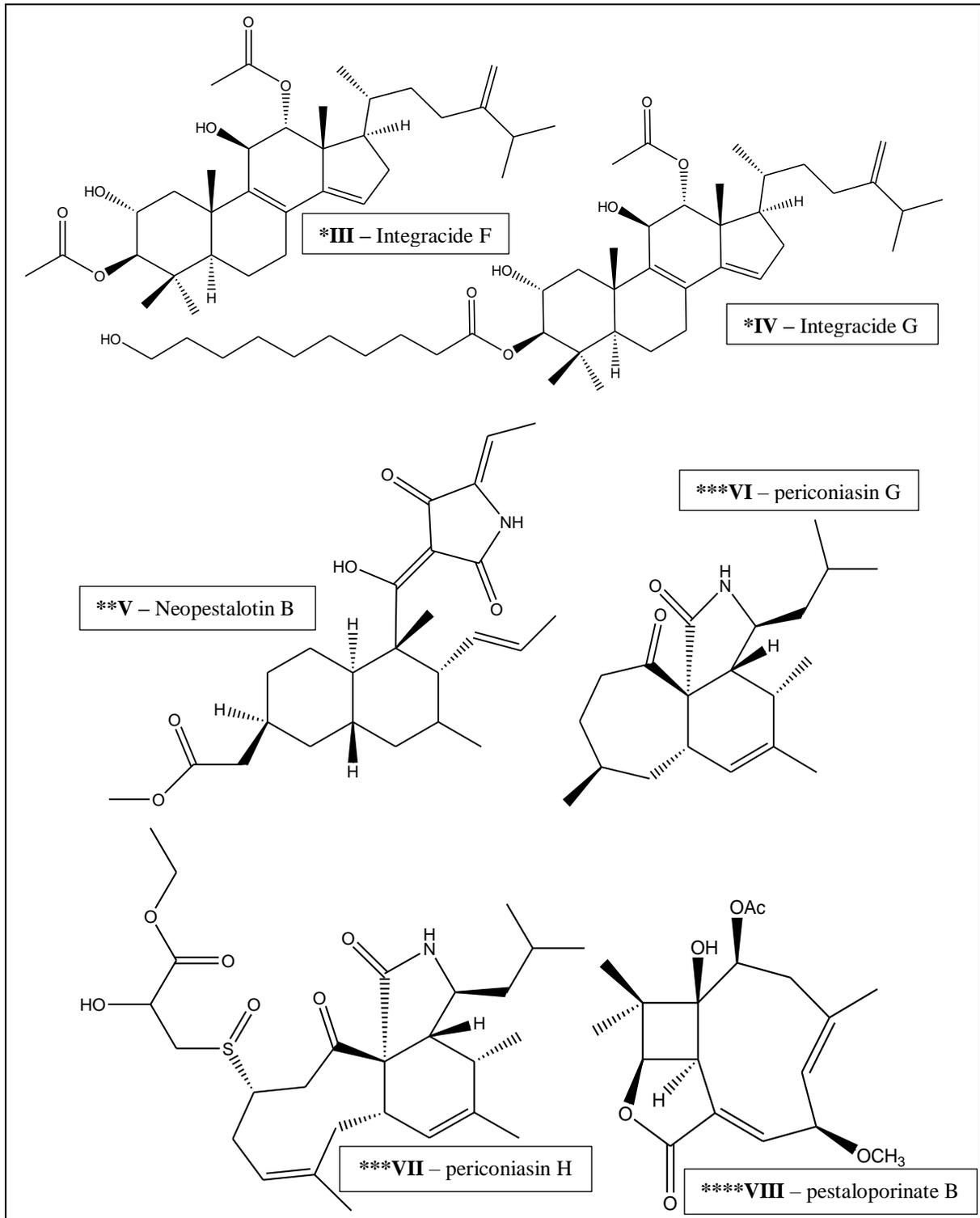


Figura 3 - Algumas substâncias bioativas identificadas recentemente.

Fonte: *Ibrahim, Mohamed e Ross (2016); **Zhao et al. (2015); ***Zhang et al (2016); **** Liu (2016)

Drogas a base de uma fonte microbiana como fungos endofíticos são de interesse imediato para a indústria farmacêutica ajudando a diminuir as várias barreiras geográficas e políticas associadas ao transporte de plantas, bem como das várias condições ambientais que

podem dificultar a qualidade e a produção dos compostos desejados. A produção microbiana tem várias vantagens sobre a utilização de partes das plantas para a produção de fármacos e substâncias bioativas. Pode facilmente acontecer em tanques fermentadores eliminando o requisito de partes da planta. Além disso, diferentes derivados de drogas podem ser obtidos por alteração das condições de cultura e os procedimentos de extração microbianas são mais fáceis requerendo menos solvente para a purificação (KUMAR et al. 2013).

2.3 Fungo Endofítico do Gênero *Phomopsis*

Os fungos endofíticos do gênero *Phomopsis* são relatados em alguns estudos como fungos fitopatogênicos da soja infectando plantações inteiras e reduzindo a qualidade e o rendimento das sementes; JIA et al. 2015). Este gênero tem ganho maior atenção em muitos casos como fungo endofítico na procura de novos compostos, levando a descoberta de vários metabólitos secundários bioativos (HUANG et al. 2015). Compreende um grupo de fungos estudados extensivamente pela sua habilidade de produzir metabólitos para várias aplicações (FLORES et al. 2013).

Phomopsis tem como basônimo, *Phomopsis brassicae* descrito por Toulouse em 1884 e apresenta como sinonímia *Zytilia brassicae* descrito por Abellini em 1884. Sua forma anamórfica pertence ao Reino Fungi, divisão (informal) fungos mistospóricos, subdivisão (informal) Coelomycetes e a teleomórfica pertence ao Reino Fungi, divisão Ascomycota, classe Sordariomycetes, subclasse Sordarimycetidae, Ordem Diaporthales e Família Incertae sedis. O gênero possui 931 espécies, sendo 29 variedades e 16 formae speciales descritas em literatura (CAETANO, 2016).

Este fungo é descrito na literatura como produtor de metabólitos secundários bioativos, como no estudo de Cai et al. (2017) que isolou três compostos químicos, fomopirona A, acropirona e ampelanol que exibiram atividade antioxidante e antibacteriano sobre *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*; Tang et al. (2016) isolaram policetídeos como produto do *Phomopsis* sp. com atividade angiogênica (fator de crescimento endotelial vascular); Chithra et al. (2017) isolaram a substância piperina do extrato bruto do fungo endofítico *Phomopsis* sp. e do extrato bruto vegetal da planta *Oryza sativa*. Peyrat et al. (2016) isolaram o ácido betulínico do fungo *Phomopsis* sp., um metabólito secundário antiviral isolado previamente da planta hospedeira. Essa substância é um triterpeno isolado pela primeira vez a partir de um endófito e vegetal hospedeiro.

Isolamentos de metabólitos secundários do gênero *Phomopsis* sp. no estudo de Chapla et al. (2014) mostrou a produção de citocalasinas conhecidas pela sua potente atividade biológica tal como a citocalasina H que demonstrou atividade contra fungos fitopatogênicos e a produção de micotoxinas; e as citocalasinas J, H e altenariol que obtiveram efeitos inibitórios em neutrófilos o que podem vir a ser promissores agentes anti-inflamatórios. Foram também isoladas novas substâncias desse gênero (**Figura 4**, p. 24) em que apresentaram bioatividade, como no trabalho de Choi et al. (2013) em que foi isolada uma nova substância (**IX**, p. 24) do fungo endofítico *Phomopsis longicolla* que tem atividade bactericida contra a bactéria causadora da ferrugem de folha no arroz. No estudo de Shen et al. (2014) foram isoladas cinco substâncias dentre elas uma inédita (**X**, p. 24) com atividade fraca contra linhagem celular do hepatocarcinoma humano, câncer primário do fígado. Na pesquisa de Du et al. (2016), foram isoladas sete novas substâncias em que três delas não eram conhecidas e dessas três uma nova citocalasina (**XI**, p. 24) exibiu bioatividade contra o vírus do mosaico em folha de tabaco (TMV). E o ácido 3-nitropropiónico (**XII**, p. 24), uma substância muito estudada devido a seu efeitos neurológicos foi isolada no estudo de Lu et al. (2015) e testada com resultado positivo contra células tumorais. Esses resultados abrem novas perspectivas para a produção de novas drogas isoladas por fungos endofíticos do gênero *Phomopsis*.

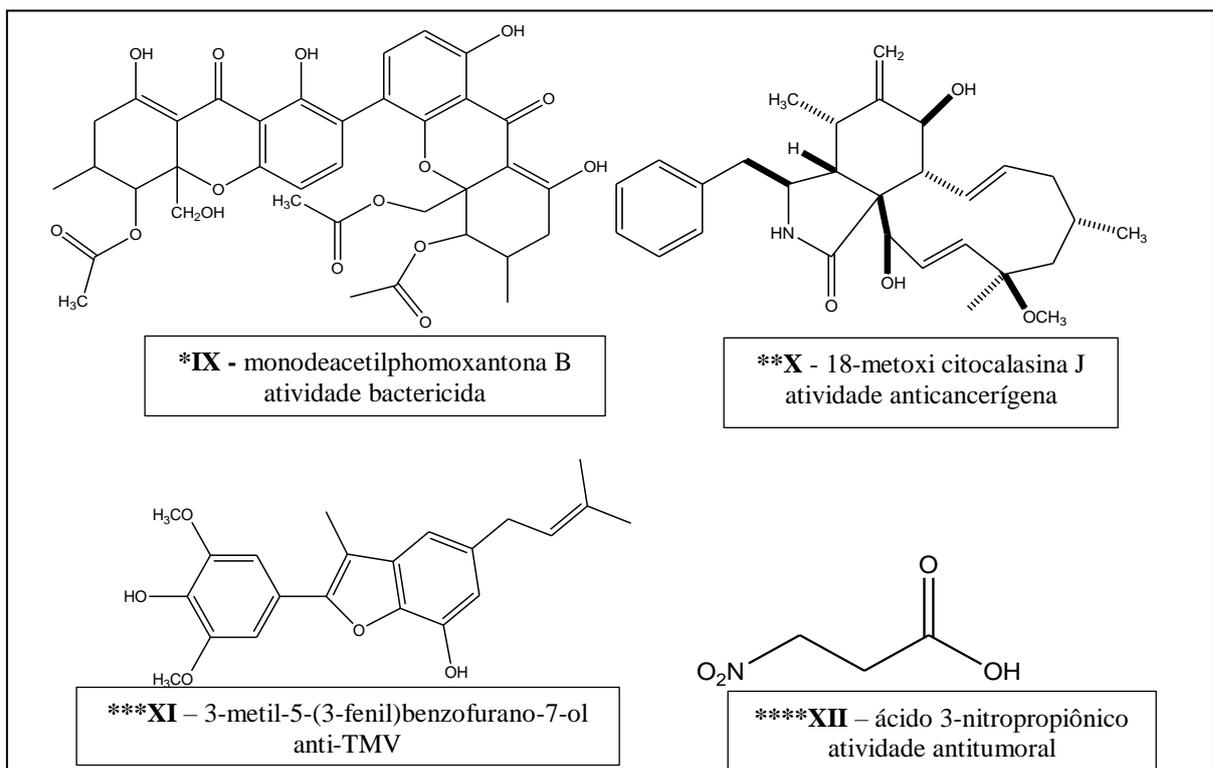


Figura 4 - Substâncias isoladas do gênero *Phomopsis* com bioatividade.

Fonte: *Choi (2013); **Shen (2014); ***Du (2016); ****Lu (2015)

2.4 Busca por Novos Agentes Antimicrobianos

Ao longo das últimas décadas, desde a descoberta da penicilina, o avanço da indústria farmacêutica levou ao surgimento de diversos antimicrobianos. O uso excessivo desses antibióticos desencadeou uma elevada resistência bacteriana, limitando as opções terapêuticas e a resistência a essas drogas está se tornando uma séria preocupação no mundo, sendo necessária uma urgente busca de novos agentes antibacterianos ou fungicidas efetivos em tratamento de doenças infecciosas (XING et al. 2011). Exemplos de bactérias causadoras de doenças infecciosas são bem vastos, uma delas segundo Cunico et al. (2004) é da espécie *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria oportunista associada a uma variedade de infecções em indivíduos debilitados sendo um dos principais agentes isolados em casos de infecção hospitalar em unidades de terapia intensiva. Assim como *P. aeruginosa* a espécie *Staphylococcus aureus* também está associada a infecções adquiridas no ambiente hospitalar e na comunidade, a infecção causada por essa bactéria é uma das maiores causas de mortalidade em área hospitalar (TAKEUCHI; HOSHINO; AKIRA, 2000).

Nos últimos anos, os fungos endofíticos associados a diversas espécies de plantas, têm sido explorados como potenciais produtores de novos compostos antimicrobianos para superar os grandes problemas de resistência dos microrganismos aos antibióticos/antifúngicos. Um exemplo muito importante na busca por substâncias com atividade antimicrobiana é o estudo de Buatong et al. (2011) que testaram o total de 385 extratos de 150 fungos endofíticos com um teste de triagem antimicrobiano coletados de áreas de mangue no sul da Tailândia. A maioria dos extratos (28-32% dos fungos) inibiu *S. aureus* ATCC25923 (CIM/MBC 4-200/64-200 µg/ml). Apenas dois inibiram *P. aeruginosa* ATCC27853 (CIM/MBC 200/>200 µg/ml) e nenhum inibiu a *E. coli* ATCC25922. Os extratos de fungos mais ativos foram de seis gêneros, *Acremonium*, *Diaporthe*, *Hypoxylon*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis* e *Xylaria*. *Phomopsis* sp. MA194 isolado da planta *Rhizophora apiculata* mostrou o mais amplo espectro antimicrobiano com baixos valores de CIM de 8-32 µg/ml contra bactérias Gram-positivas. Esse estudo demonstra o potencial dos fungos endofíticos na produção de substâncias bioativas sendo necessário um estudo mais aprofundado não só contra essas bactérias, mas também contra várias outras que prejudicam a saúde humana.

2.5 *Aedes aegypti*

Os mosquitos são vetores de um grande número de patógenos humanos e de animais, incluindo os parasitas e vírus (ZOUACHE et al. 2011). É estimado que 50 milhões de infecções

por dengue ocorram anualmente e que aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas morrem em países onde a dengue é endêmica (PORTAL SAÚDE, 2015). O mosquito *A. aegypti*, é o principal vetor do vírus da Dengue, Dengue hemorrágica (MARQUES; KAPLAN, 2015), Chikungunya (VASCONCELOS, 2014) e do Zika vírus atualmente bastante difundidos no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). O *A. aegypti* é generalizado em todas as regiões tropicais e subtropicais, e sua prevalência torna a dengue uma das doenças virais mais importantes transmitidas por mosquitos no mundo que ocorrem anualmente em mais de 100 países endêmicos (MARQUES; KAPLAN, 2015).

Segundo o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde (n° 11 de 2017), em 2016, Semana Epidemiológica 1ª a 52ª, foram registrados 1.500.535 casos prováveis de dengue, e em 2015, 1.688.688. Em 2017, até a Semana 12 (1/1/2017 a 27/03/2017), foram registrados 90.281 casos prováveis de dengue no país, sendo que para a região Norte foram 12.893 casos (14,3%) e a análise da incidência de casos prováveis de dengue demonstrou que as regiões Centro-Oeste e Norte apresentam as maiores taxas de incidência: 121,2 casos/100 mil habitantes e 72,8 casos/100 mil habitantes respectivamente. Para os casos do vírus Zika segundo o Boletim Epidemiológico n° 13 de 2017 do Ministério da Saúde entre as Semanas Epidemiológicas 45/2015 e 14/2017 (08/11/2015 a 08/04/2017) foram notificados 13.490 casos suspeitos de alterações no crescimento e desenvolvimento possivelmente relacionados à infecção pelo vírus Zika, a maioria dos casos em monitoramento concentra-se na região Nordeste do país (47,9%), seguindo-se as regiões Sudeste (33,8%) e Norte (8,9%)

O mosquito *A. aegypti* tem se adaptado ao ambiente e tem se tornado altamente resistente, isto faz com que sua erradicação seja mais difícil. Esse surgimento de mosquitos resistentes a inseticidas reforçou o interesse da busca de novos produtos eficazes contra esses mosquitos adultos, bem como no seu estado larval (MARQUES; KAPLAN, 2015).

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Buscar metabólitos secundários, com atividade antimicrobiana e larvicida, obtidos a partir do estudo químico e biológico do extrato bruto produzido pelo fungo endofítico *Phomopsis* sp., isolado da planta *Passovia stelis*.

3.2 Objetivos Específicos

- 1 – Cultivar o fungo *Phomopsis* sp. em escala ampliada para obtenção do extrato bruto;
- 2 – Obter o extrato bruto do fungo *Phomopsis* sp.;
- 3 - Testar o extrato no ensaio larvicida frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti* e antimicrobiano frente às bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e outros ensaios biológicos que forem possíveis a realização;
- 4 - Fazer o fracionamento do extrato e realizar os ensaios biológicos com as frações nos testes em que o extrato se mostrou ativo;
- 5 - Purificar as frações que se mostraram ativas;
- 6 - Identificar os compostos obtidos utilizando técnicas de espectroscopia e espectrometria;
- 7 - Testar as substâncias isoladas em ensaios biológicos realizados anteriormente.

DESENVOLVIMENTO

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia deste trabalho encontra-se também de forma resumida no fluxograma localizado no **apêndice 1** (p.70).

4.1 Obtenção e Identificação da Cepa

O fungo endofítico do gênero *Phomopsis* sp. foi isolado da planta *Passovia stelis* pela aluna de iniciação científica Letícia Corrêa Santiago no projeto de pesquisa intitulado por “Isolamento e identificação dos fungos endofíticos associados a espécies de Loranthaceae”. A exsicata do material vegetal encontra-se depositado no herbário do INPA, nº 244062.

A identificação do fungo foi feita pelo prof. Dr. André Rodrigues do Departamento de Bioquímica e Microbiologia da Universidade Estadual Paulista – UNESP de Araraquara por sequenciamento genético.

4.2 Obtenção do Extrato Bruto

O extrato fúngico foi obtido no Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia na Universidade Federal do Amazonas (UFAM) em Itacoatiara. Para obtenção, fracionamento e purificação foi seguida a metodologia de Oliveira et al. (2011).

Para obtenção do extrato fúngico (**Figura 5**, p. 30), inoculou-se as cepas em placas de Petri contendo meio de cultura PDA (Acumedia ou Oxoid, 39 g L⁻¹ de água) e incubou-se em BOD a 25°C até crescimento significativo. O fungo endofítico crescido foi inoculado em frascos de Erlenmeyer com meio de cultura PDB (Difco, 24 g L⁻¹ de água). Utilizou-se no total 72 frascos de 500 mL com 250 mL do meio PDB e quatro blocos contendo massa micelar de aproximadamente 1 cm² para cada Erlenmeyer. O período de fermentação do endófito seguiu-se por 20 dias em BOD sob modo estático com agitação esporádica à temperatura de 25°C.

O processo de esterilização foi realizado em autoclave da marca Quimis a 121 °C por 15 minutos para meios de cultura líquido ou sólido e 40 minutos para materiais em geral.

Após 20 dias foi adicionado acetato de etila P.A. Um dia após a adição do solvente, o caldo foi filtrado para separar os micélios e o filtrado foi separado por partição líquido-líquido com acetato de etila em funil de separação, em que a fase aquosa foi descartada e a fase orgânica concentrada em evaporador rotatório Fisatom, sob pressão reduzida com auxílio de bomba de vácuo da mesma marca modelo 828T e banho termostático Fisatom modelo 550.

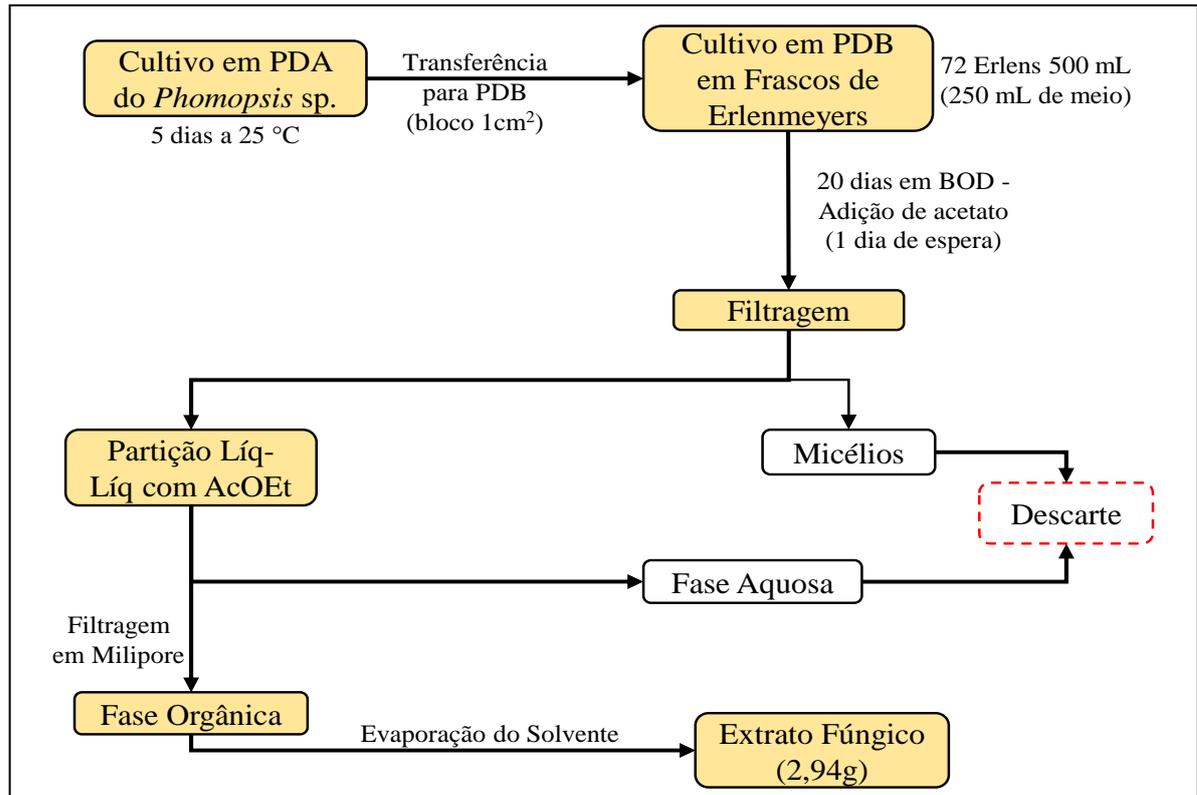


Figura 5 – Representação esquemática da obtenção do extrato fúngico obtido através do cultivo do fungo endofítico *Phomopsis* sp.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017)

4.3 Fracionamento do Extrato Fúngico

O extrato bruto foi fracionado por gradiente de polaridade (**quadro 1**, p. 31) utilizando três solventes, diclorometano, acetato de etila e metanol (**Figura 6**, p. 30) em cartucho de sílica de fase normal Waters Sep-Pak® Silica 35 cc Vac Cartridge (10 g) com tamanhos de partículas entre 55 e 105 μm (270-150 mesh) com porosidade de 125 Å. Foram obtidas dezenove frações.

Para verificar o perfil de cada fração obtida foram feitas placas análises em CCD utilizando os solventes acetato de etila/diclorometano na proporção 2:8. Utilizou-se placas comerciais de sílica gel 60 em fase normal (marca Macherey-Nagel: DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄) e as revelações foram obtidas por irradiação ultravioleta (254 e 366 nm) e revelador anisaldeído. Os perfis semelhantes visualizados com os reveladores tiveram suas frações reunidas obtendo-se oito frações (F1 a F8) ao final do procedimento.

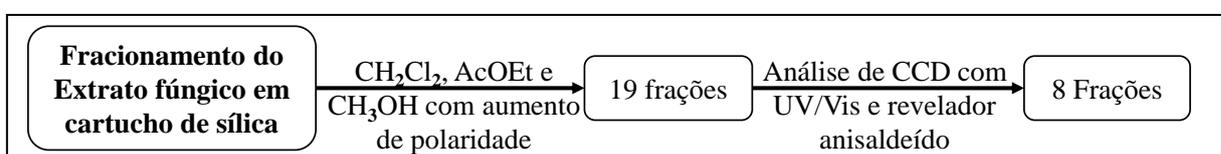


Figura 6 – Representação esquemática do fracionamento do extrato do extrato fúngico.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017)

Quadro 1 – Massas das frações obtidas pelo fracionamento do extrato fúngico.

Frações	Massas obtidas
F1	500, 1 mg
F2	103, 6 mg
F3	29, 7 mg
F4	205, 3 mg
F5	52, 8 mg
F6	62, 9 mg
F7	311, 8 mg
F8	517, 3 mg

Fonte: Quadro elaborado pelo autor (2016)

4.4 Avaliações Biológicas do Extrato e Frações

4.4.1 Larvicida

Os testes foram realizados no Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) sob a supervisão do Dr. Wanderli Tadei, empregando-se larvas de *A. aegypti*. As atividades experimentais foram realizadas pela acadêmica Lissa Apolonia Mariano.

A atividade larvicida foi avaliada por meio de bioensaios por duas modalidades sequenciais: **Seletivo**, cujo objetivo é detectar se o extrato possui atividade sendo um teste qualitativo e **De Dose** para determinar a DL₅₀ e DL₉₀ sendo um teste quantitativo. Os bioensaios descritos são adaptações utilizadas no INPA dos bioensaios descritos por Dulmage et al. (1990) e pela OMS no Guia para Testes Larvicidas de Laboratório e Campo (2005).

- **Bioensaio Seletivo**

Para esse teste foram preparadas as réplicas (em triplicata) para extrato e frações em que foram utilizados, copos plásticos de 50 mL contendo, 10 larvas de terceiro estágio, 40 µL alimento diluído, solução inicialmente preparada com as amostras (50µL-100ppm e 100µL-500ppm) e volume completado para 10mL de água destilada da quantidade correspondente à concentração do extrato ou fração a ser testado (500 e 100 ppm). Esse bioensaio foi realizado em triplicata para cada concentração testada e controle negativo. A determinação da mortalidade foi realizada 24, 48 e 72 horas após a montagem do bioensaio.

- **Bioensaio De Dose**

O extrato bruto foi testado em três repetições em dias alternados. Para a determinação da DL₅₀ e DL₉₀ foi preparada uma diluição inicial de 30 mg de extrato fúngico e 1,5 mL de

DMSO. Foram montadas cinco réplicas para cada concentração em copos plásticos de 50mL, 10 larvas de terceiro estágio, 40 µL alimento diluído, solução inicialmente preparada com as amostras (12,5µL-50ppm, 25µL-75ppm, 37,5µL-100ppm, 50µL-125ppm e 62,5µL-150ppm) e volume completado para 10mL de água destilada. Segundo a WHO o limite para a quantidade de DMSO é de no máximo 1% e nessas diluições foi muito inferior a esse valor permitindo a realização do teste. O controle negativo consistiu em copos com larvas e DMSO em quintuplicata. A leitura da mortalidade foi realizada em 24, 48 e 72 horas após a montagem do biensaio.

- **Análise estatística**

Para determinação dos valores de DL₅₀ e DL₉₀ utilizou-se o Probit Polo-PC versão 1.0, LeOra Software.

4.4.2 Antimicrobiano

Este ensaio foi realizado no Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET) e as cepas-padrões foram obtidas no mestrado da aluna Sanay Ribeiro cedidas pela professora Ma. Ília Gilmará Carvalho dos Santos em parceria com a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Para este teste foram utilizados cepas-padrões da *American Type Culture Collection* (ATCC) (OPLUSTIL et al. 2004) em que *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) são gram-negativas e, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) são gram-positivas.

O teste para determinação da atividade antimicrobiana foi realizado por meio do método de difusão em ágar, utilizando-se discos contendo o extrato fúngico, conforme descrição original de BAUER et al. (1966) e atualizações do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2009). O extrato e frações foram testados em quatro concentrações: 250, 500, 750 e 1000 ppm.

Primeiramente foi preparado o meio de cultura Ágar Mueller-Hinton (38g/L) em placas de Petri (150 x 10 mm) de acordo com as especificações do fabricante e armazenadas em geladeira (2 – 8°C) para uso posterior. Uma dessas placas foi incubada em estufa a 36°C para controle de esterilidade do meio de cultura. Posteriormente, foi preparada uma suspensão de 7mL de solução salina estéril com colônias de bactérias puras até que atingisse turvação semelhante ao da escala de MacFarland, que corresponde a uma suspensão contendo aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL).

Cada amostra fúngica foi diluída em DMSO e, desta solução, aplicou-se 10µL em discos de papel filtro os quais foram organizados em três pontos da placa para cada bactéria, além do disco controle positivo (*S. aureus* e *S. epidermidis* – ciprofloxacina 5µg; *P. aeruginosa* e *E. coli* - amicacina 30µg) e negativo (DMSO). As placas foram incubadas em estufa a 36°C e as leituras dos halos foram realizadas em 24 e 48 horas após a montagem do teste.

4.4.3 Antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química – UNESP – Araraquara/SP. O extrato bruto e frações foram avaliados quanto à reatividade frente ao radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) através do sequestro de radicais livres em Cromatografia em Camada Delgada de forma qualitativa.

No desenvolvimento do método, aplicou-se 300µg do extrato e das frações na cromatoplaça de sílica gel, além de 0,6µg do controle positivo Rutina. Após a eluição do extrato, das frações e do controle na cromatoplaça, na condição de 80:20 CHCl₃/MeOH (v/v), esta foi seca e em seguida nebulizada com solução de DPPH 0,2% (m/v) em metanol. A cromatoplaça foi mantida na ausência de luz por 01 hora, e após esse período observada com luz branca.

4.4.4 Atividade Antifúngica

Este ensaio foi realizado sob a supervisão da Dr^a. Maria Claudia Marx Young (Instituto de Botânica, Seção de Fisiologia Vegetal/SP).

O extrato bruto e frações na concentração de 400 ppm foram eluídos em CCD utilizando fase móvel na condição de CHCl₃/MeOH (80:20 v/v). As cromatoplaças foram nebulizadas com solução de esporos dos fungos fitopatogênicos *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides* (concentração de 5x10⁷ esporos.mL⁻¹ em solução de glicose e sais) (HOMANS e FUCHS, 1970; RAHALISON, 1994). As placas foram incubadas a 25°C por 48 horas, na ausência de luz. O controle positivo utilizado para comparação foi a nistatina (1ppm).

4.4.5 Anticolinesterase

Este ensaio foi realizado sob a supervisão da Dr^a. Maria Claudia Marx Young (Instituto de Botânica, Seção de Fisiologia Vegetal/SP).

A avaliação da atividade anticolinesterásica em potencial do extrato bruto foi realizada seguindo-se a metodologia de Marston, Kissling e Hostettmann (2002) de forma qualitativa. O extrato e as frações foram submetidos à avaliação da inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) utilizando cromatoplas. Foram aplicados 200µg do extrato bruto e 100µg das frações (F1, F2, F4, F5, F6, F7 e F8) em uma cromatoplasca de sílica gel. A placa foi eluída com CHCl₃/MeOH (80:20 v/v) e seca após a eluição. Em seguida foi nebulizada com a Solução A (**quadro 2**), e incubada em câmara úmida fechada, a 37°C por 2 minutos. Após esse período, a cromatoplasca foi nebulizada com uma Solução D (**quadro 2**). Utilizou-se 0,05 µg do controle positivo Fisostigmina.

Quadro 2 – Soluções utilizadas na avaliação de atividade anticolinesterásica.

Solução A	AChE dissolvida em 150 mL do Tampão Tris-HCl (0,05 M; pH = 7,9), estocada a 4 °C. No momento do uso adicionou-se 0,1% de albumina de soro bovino.
Solução B	250 mg de Acetato de 1-naftila em 100 mL de Etanol P.A.
Solução C	400 mg do sal “Fast Blue” B em 160 mL de Água Destilada.
Solução D	Mistura de 10 mL da Solução B e 40 mL da Solução C .

Fonte: Quadro elaborado pelo autor (2016)

4.5 Avaliação Química do Extrato e Frações

4.5.1 Avaliação do perfil químico por CLAE-DAD do extrato bruto e suas frações

Para eliminação de interferentes apolares submeteu-se as amostras (Extrato e frações F1-F8) à extração em fase sólida em cartucho SPE pré-empacotado com Sílica de Fase Reversa (C18) com filtro de membrana Millipore® (0,22 µm) acoplado ao cartucho (técnica de “clean-up”). Utilizou-se CH₃OH/Água 9:1 como eluente. Inicialmente o adsorvente foi ativado com CH₃OH grau HPLC (5mL) e posteriormente equilibrado com 5mL do eluente escolhido. O extrato (10 mg) e frações (5 mg) foram solubilizados em 1mL de CH₃OH/Água 9:1 (v/v), aplicado no cartucho e eluído com 3 mL da fase móvel passando por um filtro de membrana Millipore® e coletada em frascos para CLAE. A solução filtrada então foi seca e a massa obtida foi pesada e posteriormente preparada em uma concentração de 1,5mg/mL em CH₃OH/H₂O 9:1 (v/v). A limpeza do cartucho foi feita com CH₃OH puro e posteriormente com acetona para uma limpeza mais eficiente.

Para essa avaliação de perfil químico foi utilizado Cromatógrafo à Líquido de Alta Eficiência com duas bombas LC-10AD (Bomba A e B), degaseificador DGU-20A, comunicadora CBM-20A, injetor automático SIL-20A e detector de arranjo de diodos SPD-M10A. Foi utilizado o software Shimadzu LC solution versão 1.23 SP1.

Esta análise ocorreu nas seguintes condições:

- **Eluição:** gradiente exploratório (5:95 → 100:0 CH₃OH/H₂O (v/v) em 40 minutos);
- **Coluna:** C18 (Phenomenex LUNA: 250 mm x 4,60 mm e 5 μm 110 Å);
- **Vazão** = 1,0 mL.min⁻¹; **V_{inj}** = 15 μL; **λ** = 200-800 nm; **Amostra** = 1,5 mg.mL⁻¹.

Para o tratamento de todos os dados utilizou-se o software LC Solution.

4.5.2 Obtenção das Subfrações

Após análise dos perfis químicos das frações por CLAE-DAD, três foram selecionadas para serem fracionadas.

Fração F1

A fração F1 foi selecionada devido a sua boa resolução no cromatograma obtido em cromatografia líquida utilizando-se CLAE-DAD semipreparativa com duas bombas LC-8A (Bomba A e B), comunicadora SCL-10A, injetor automático (modo semipreparativo) SIL-10AF, detector de arranjos de diodos SPD-10. O software utilizado foi o Shimadzu CLASS-VP, versão 6.14 SP2. Para desgaseificar os solventes utilizados no modo semipreparativo foram utilizados ultrassom UNIQUE e bomba de vácuo Fisatom.

A fração F1 foi submetida ao procedimento de “clean-up” com concentração final de 20 mg.mL⁻¹, na proporção de 9:1 CH₃OH (v/v). Essa análise seguiu as seguintes condições:

- **Eluição:** gradiente 35-65 a 100-0% CH₃OH/H₂O em 40 minutos;
- **Coluna:** C18 (Phenomenex Luna: 250 mm x 10 mm e 5 μm; 100 Å);
- **Vazão** = 3,0 mL min⁻¹; **V_{inj}** = 150 μL; **λ** = 254 e 210 nm; **Amostra** = 20mg.mL⁻¹.

Algumas substâncias obtidas desse fracionamento, dependendo da quantidade de solvente, foram secas em evaporador rotatório da marca Buchi, sob pressão reduzida com auxílio de bomba de vácuo FABBE e banho termostático Marconi BTC-9090. Em seguida, para uma maior eficiência e rapidez na secagem, foi utilizado Speedvac – Thermo Electron Corporation com armadilha de vapor refrigerado Refrigerated Vapor Trap RVT4104 a -100°C e bomba de vácuo Thermo savant OFP400. Foram obtidas 16 frações que foram submetidas a análise química em RMN de ¹H.

Fração F4

Essa fração foi selecionada devido a ser umas das frações que deu atividade biológica no ensaio larvicida contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti* e por ter apresentado dois sinais tripleto em RMN-¹H semelhantes aos obtidos no extrato fúngico.

Foi visualizado no cromatograma da fração F4 no comprimento de onda de 190 nm, um pico de elevada intensidade nos primeiros 10 minutos de corrida do solvente na condição de gradiente exploratório 5:95 → 100:0 CH₃OH/H₂O (v/v) em 40 minutos. Através dessa análise o fracionamento foi ajustado em 9:1 CH₃OH/Água (v/v) como eluente.

Realizou-se o fracionamento da fração F4 em coluna pré-empacotada com sílica de modo reverso do tipo octadecil silano (C18 – 3 g). Inicialmente o adsorvente foi ativado com CH₃OH puro (5mL) e posteriormente equilibrado com 5mL do eluente escolhido. Toda a fração F4 foi aplicada no cartucho e eluída com 3 mL da fase móvel sendo coletada em frascos para CLAE e secas em Speedvac. As 10 frações obtidas foram submetidas a análise química em RMN de ¹H.

Fração F7

Essa fração foi escolhida pelo seu perfil químico em RMN-¹H o qual apresentou um sinal (singleto) semelhante ao obtido no extrato fúngico e por ter apresentado policristais na sua constituição. Dessa forma, foi realizada uma partição líquido-líquido 1:1 AcOEt/H₂O (v/v) em frasco gota utilizado em SpeedVac para assim separar essa substância das demais que não eram solúveis em água, em que a vidraria (frasco gota) foi utilizada para facilitar a separação das fases e para ser utilizada no aparelho para eliminação da água.

Para substância obtida dessa fração foi realizado um experimento para determinar seu ponto de fusão utilizando o equipamento Ponto de Fusão Marte III.

4.5.3 Análises por RMN-¹H e Espectrometria de Massas

O extrato, frações (F1-F8) e subfrações (das frações F4 e F7) foram analisados em RMN da marca Bruker Fourier de 300 MHz com campo magnético de 7,0 T utilizando-se sonda dual ¹H/¹³C 5 mm. Amostras que continham materiais particulados utilizava-se esferas de algodão para filtrá-lo e assim não fornecer interferência nas análises. As amostras foram diluídas em 650 µL de solvente deuterado em tubos de RMN de 5 mm.

As subfrações da Fração F1 foram analisadas em RMN da marca Bruker Avance III de 600 MHz com campo magnético de 14,1 T utilizando sondas BBFO-Z plus SmartProbe Broadband Observe e Triple Inverse TCI Cryo-probhead, ambas de 5 mm. Para essas amostras serem diluídas foram utilizados 200 µL de solvente deuterado em tubos de RMN de 3 mm. Nesse equipamento foram realizados experimentos 2D (COSY, HMBC, HSQC) para determinar a estrutura completa das subfrações da Fração F1.

Nesses experimentos não foi utilizado TMS, portanto os picos de referência eram dos próprios solventes empregados nas análises.

No experimento realizado em Espectrômetro de Massas apenas a subfração F1-16 foi analisada. O equipamento utilizado foi um Espectrômetro de Massas de alta resolução Bruker Maxis Impact. A faixa de aquisição foi de m/z 50-1500. O software Data Analysis Schorcut 4.2 (Bruker Baltonik®) foi utilizado para a aquisição dos dados e no processamento dos dados espectrométricos. As condições de análise foram: End Plate: -500 Volts; Capilaridade: 4500 Volts; Temp. do Gás: 180 °C; Fluxo de Gás: 4 L.min⁻¹; Pressão de Gás Neb: 0,3 Bar; Gás: N.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.2 Análises Químicas

5.2.1 Identificação Fúngica

O fungo endofítico utilizado nesse trabalho apresentou sequências de nucleotídeos semelhantes em 98% com o gênero *Phomopsis* sp.

5.2.2 Perfil Químico do Extrato Fúngico

Foi obtido 2,94 g de extrato fúngico, a partir do cultivo de 22,5 Litros de meio. Da massa total desse extrato, uma parte foi separada para análises biológicas e análise de perfil químico em CLAE-DAD e RMN-¹H, outra parte foi utilizada para fracionamento como descrito na metodologia (seção 4.3).

O cromatograma obtido em CLAE-DAD do extrato do fungo *Phomopsis* sp. (**figura 7**) apresentou vários picos associados a substâncias com polaridades variando de média a alta e diferentes absorvâncias indicando a produção de diferentes classes de metabólitos.

O espectro de RMN-¹H (**figura 8**, p. 39) do extrato do fungo endofítico *Phomopsis* sp. corroboram com a quimiodiversidade evidenciada pelos dados obtidos na análise por CLAE-DAD, com sinais de deslocamento em RMN de hidrogênio de δ 0,8 a 9,5 ppm sugerindo a possibilidade de várias classes de metabólitos secundários diferentes. Pôde ser observado no espectro de RMN-¹H do extrato fúngico três sinais (**Figura 8**, p. 39), que serão discutidos nas seções posteriores.

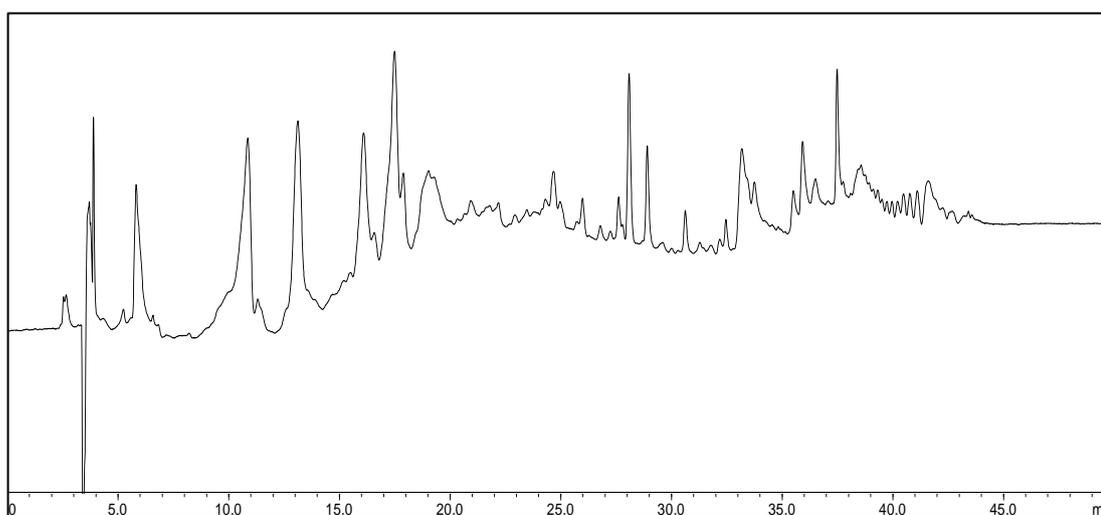


Figura 7 – Cromatograma obtido em CLAE-DAD utilizando coluna C18 em gradiente exploratório ($\lambda = 254$ nm) do extrato do fungo endofítico *Phomopsis* sp.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2016)

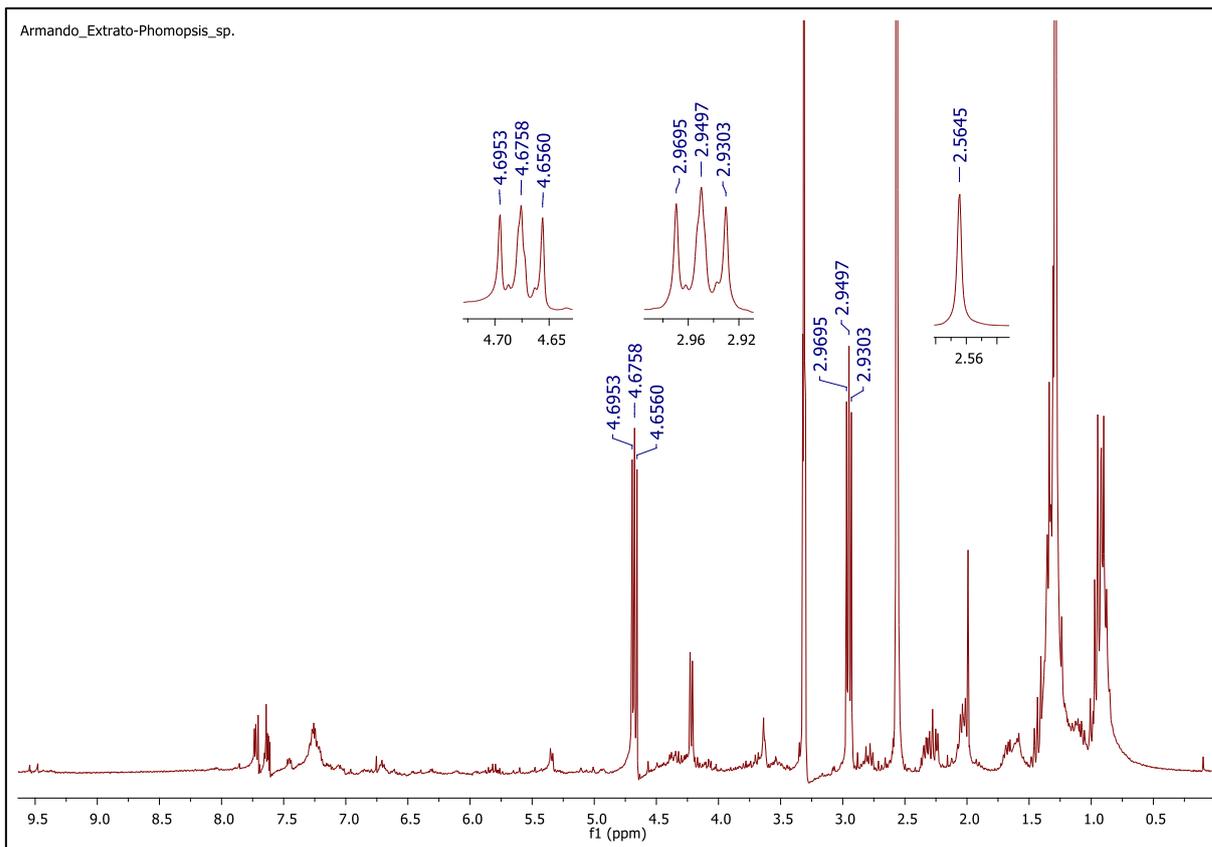


Figura 8 – Espectro de RMN de ^1H com supressão do sinal $\text{H}_2\text{O}/\text{HOD}$ do extrato do fungo *Phomopsis* sp. em CD_3OD e 300 MHz.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017)

5.2.3 Perfil Químico das Frações

As frações F1, F4, F7 e F8 foram as que exibiram a maior quantidade de massa, enquanto que as frações F2, F3, F5 e F6 apresentaram menor quantidade. A fração F3 mostrou a menor quantidade de massa obtida (29,7mg) e por isso, não foi possível realizar as avaliações biológicas de anticolinesterase, antifúngica e antioxidante, análises essas realizadas em parceria com o NUBBE/Araraquara.

No espectro de RMN- ^1H assim como no extrato bruto observou-se uma região complexa associada a hidrogênios aromáticos para as frações F1, F2, F3, F4 (**figura 9**, p. 41), F5, F6, F7 e F8 (**figura 10**, p. 42) sugerindo a presença de várias classes de substâncias. Evidencia-se, dessa forma, a diversidade metabólica que esse fungo pode conter analisando as frações nesse estudo.

Pôde ser observado em espectro de RMN- ^1H das frações F2, F3, F4 e F5 sinais com absorções e padrões diferentes dos encontrados nas frações F5, F6, F7 e F8 indicando a presença de duas substâncias distintas.

Foi visualizado nas frações F2, F3, F4, F5 e F6 (**figuras 9 e 10**, p. 41 e 42) dois sinais em aproximadamente δ_{H} 2,96 ppm (t, H-2) e δ_{H} 4,69 ppm (t, H-3), utilizando como solvente CD_3OD para o experimento de RMN de ^1H .

Nos espectros de RMN de ^1H das frações obtidas em sílica de fase normal foi observado um sinal bem intenso em aproximadamente δ_{H} 2,41 ppm (s, H4, H-2 e H-4 em DMSO-d_6) presente também nas frações F5, F6, F7 e F8 como pode ser observado na **figura 10** (p. 42).

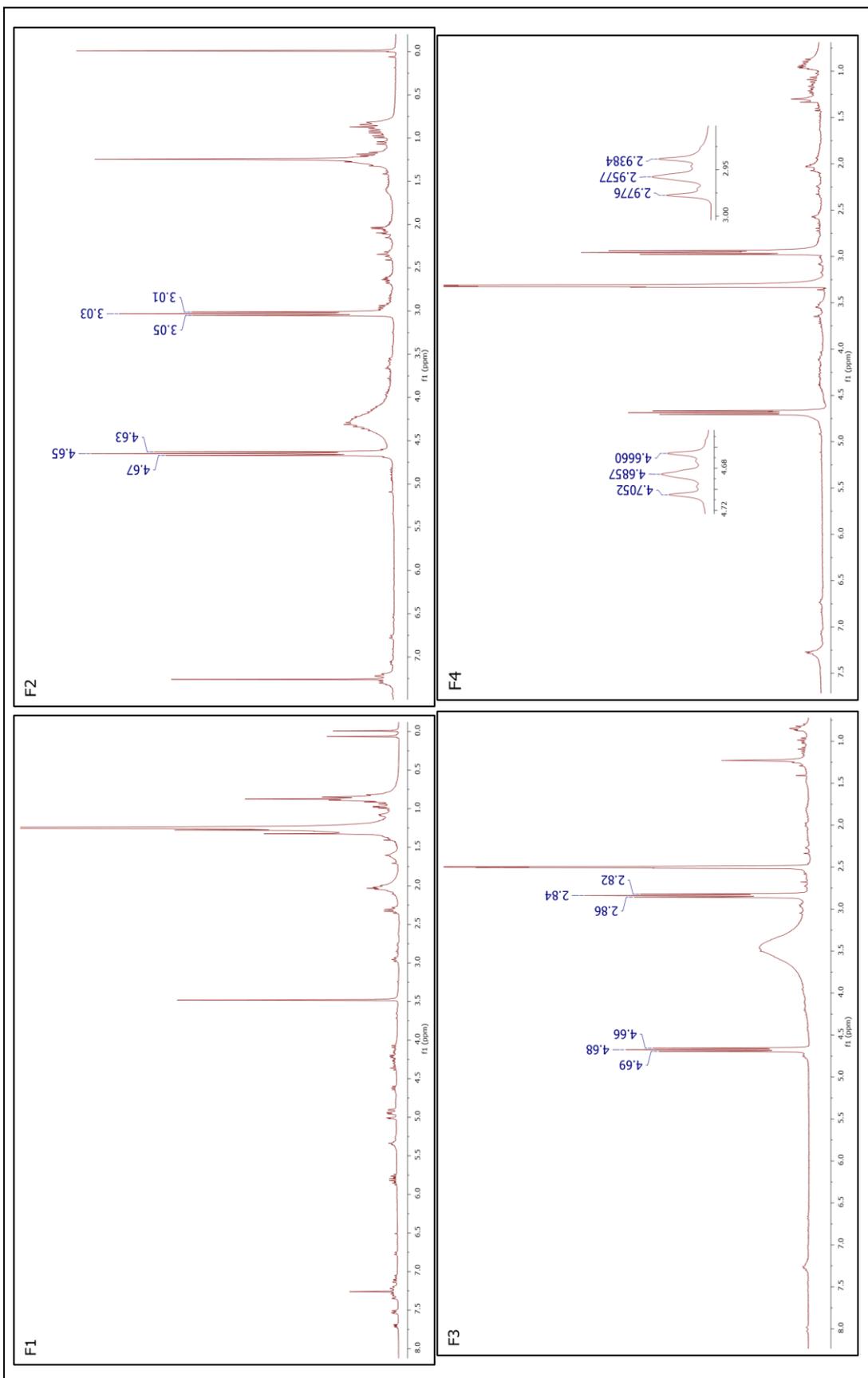


Figura 9 – Espectro de RMN de ¹H das frações F1, F2 (CDCl₃), F3, F4 (CD₃)₂SO em 300 MHz.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017)

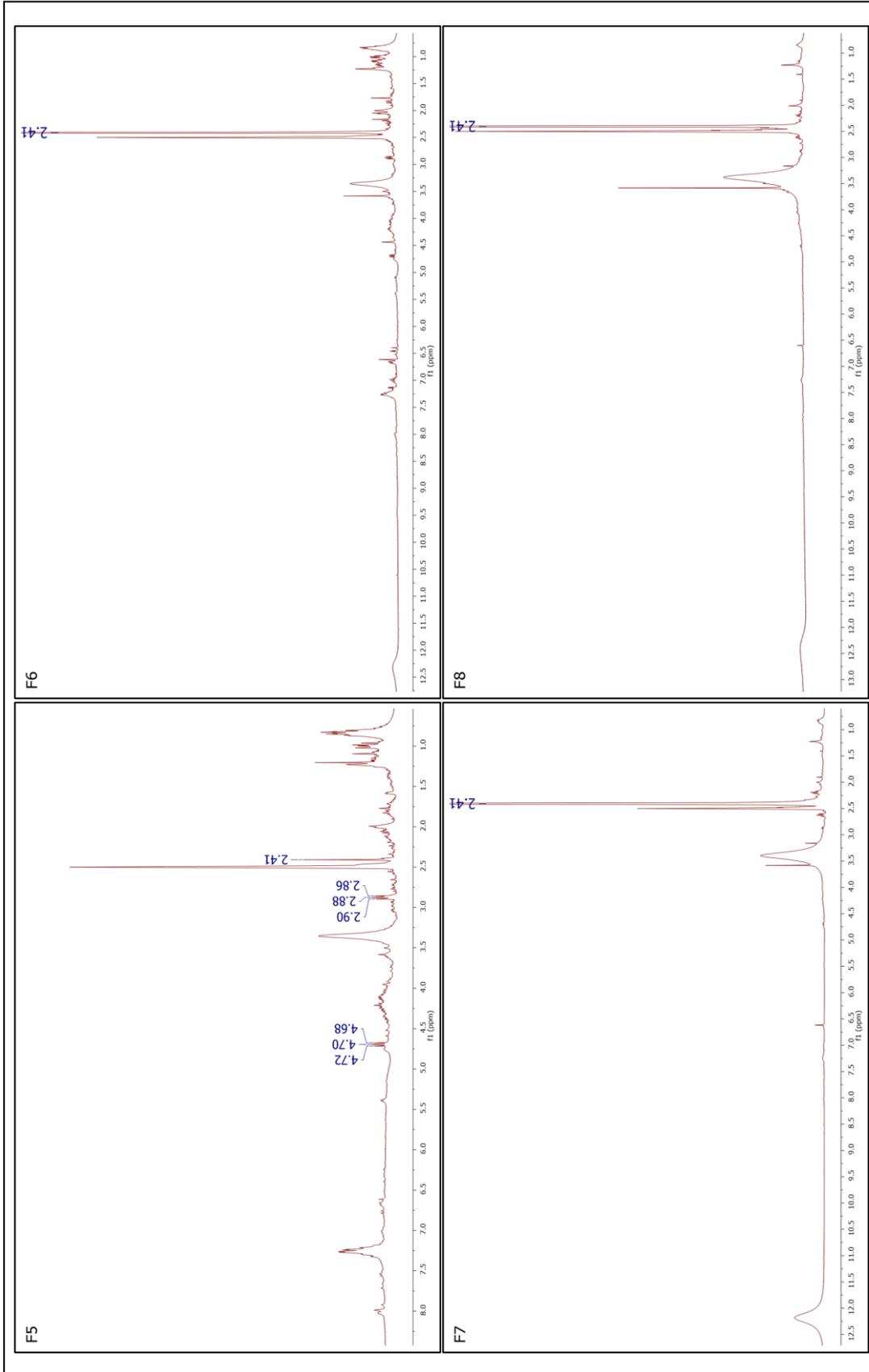


Figura 10 – Espectro de RMN de ¹H das frações F5, F6, F7, F8 (CD₃)₂SO em 300 MHz.
Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017)

5.2.4 Identificação e Elucidação Estrutural

5.2.4.1 Substância 01 (Subfração F7-1)

Através da eliminação da água como um dos solventes da partição líquido-líquido da fração F7 observou-se um sólido-cristalino branco na subfração F7-1, que foi analisado por RMN de ^1H . Seu espectro em DMSO- d_6 mostrou um pico intenso em δ_{H} 2,41 ppm como é mostrado na **figura 12**.

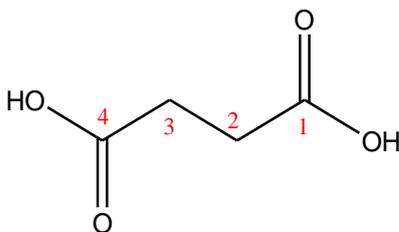


Figura 11 – Representação estrutural da Substância 01.
Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017)

A substância 01 foi identificada como ácido succínico através da análise dos dados espectrais de RMN de ^1H , em comparação com a literatura (CHOI; KIM, 2006).

O espectro de RMN de ^1H (**Quadro 3**, p. 44) apresentou um singlete em δ 2,41 ppm característicos de hidrogênios metilênicos ligados diretamente a um grupo carboxila. O singlete deve-se aos hidrogênios vizinhos H-2 e H-3 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) serem equivalentes quimicamente devido a simetria da molécula (**Figura 11 e 12**).

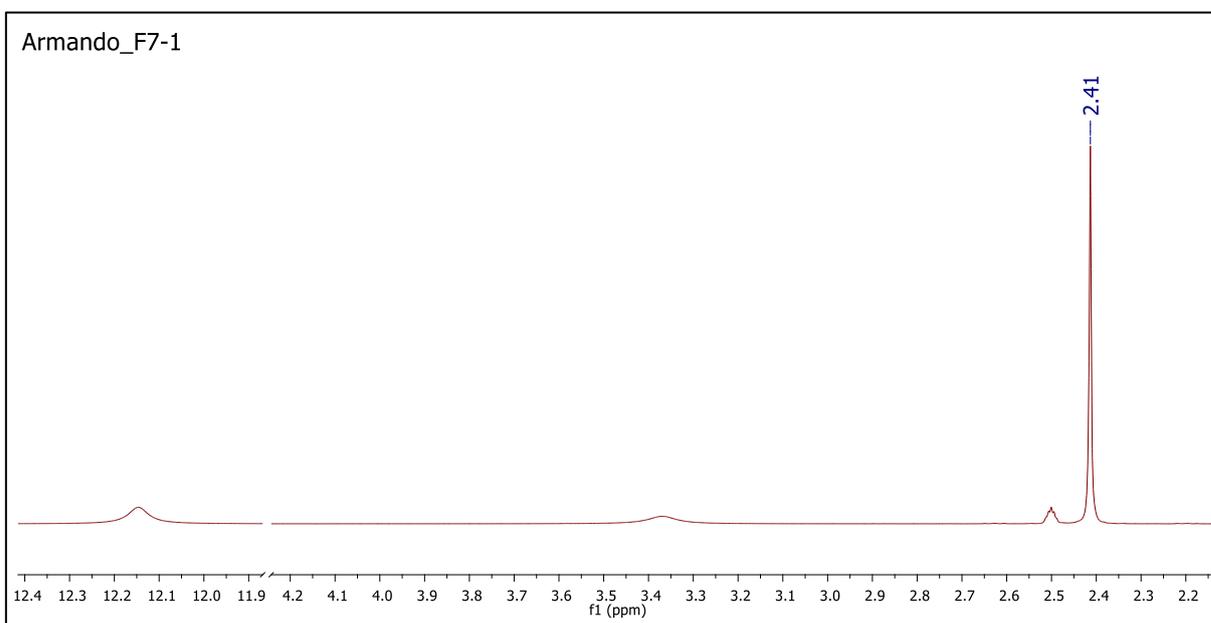


Figura 12 – Espectro de RMN de ^1H em 300 MHz da Fração F7-1 (substância 1) em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ e 7, 0 T. Corte entre as regiões de δ 12,0 e δ 4,0 ppm.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2016)

Quadro 3 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura da Substância 01.

Posição	Experimental		Literatura	
			SDBS***	CHOI; KIM (2006)*
	(CD ₃) ₂ SO (δ _H)*	CD ₃ OD (δ _H)**	(CD ₃) ₂ SO (δ _H)	CD ₃ OD (δ _H)
2,3	2,41 (s, H4)	2,56 (s, H4)	2,42 (s, H4)	2,54 (s, H4)

*em 300 MHz; **sinal visualizado no espectro de RMN-¹H do extrato (figura 8, p. 36); ***em 400 MHz

Fonte: Quadro elaborado pelo autor (2017)

O ácido succínico (**figura 11**, p. 43) também conhecido como ácido butanodióico, com fórmula molecular C₄H₆O₄, muito aplicado na indústria alimentar, farmacêutica, agricultura e tido como precursor de muitos compostos químicos incluindo: ácido adípico, 1,4-butanodiol, tetrahydrofurano, N-metil pirrolidinona, 2-pirrolidinona, sais succinatos, γ-butirolactona, entre outros. Ele é principalmente produzido por processos químicos do n-butano/butadieno via anidrido maléico utilizando a fração-C4 de nafta em produções de 15.000 toneladas por ano, com o preço de 6-9 dólares por quilo (BECHTHOLD et al. 2008). Atualmente é produzido como uma importante plataforma química que poderá vir a ser um precursor para o desenvolvimento de uma indústria química sustentável, já que ele pode ser obtido de fontes renováveis (PATERAKI et al. 2016).

A fim de confirmar a proposta estrutural foi determinado o ponto de fusão dessa substância. O valor experimental obtido em triplicata foi 182,5 ± 2,7 °C. Os dados na literatura indicam 184 °C para o ponto de fusão do ácido succínico, ou seja, muito próxima a encontrada nesse trabalho, já que a substância não se encontra pura.

5.2.4.2 Substância 02 (Subfração F4-1)

Com o fracionamento em coluna C18 da fração F4 foi obtida uma substância amarela. Analisando os dados obtidos em literatura com os espectros de RMN de ¹H, observou-se que hidrogênios metilênicos ligados diretamente a um grupo carboxila (posição α) tem deslocamento próximo a δ_H 2,3 ppm e hidrogênios metilênicos ligados diretamente a um grupo nitro (NO₂) tem deslocamento próximo a δ_H 4,2 ppm, que fica próximo do observado no espectro de RMN de ¹H dessa substância (**figura 14**, p. 46).

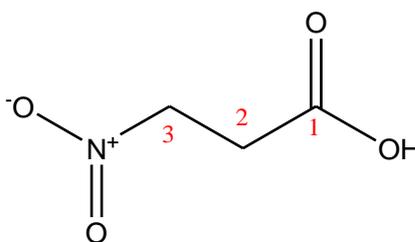
O **quadro 4** (p. 45) contém os deslocamentos dos sinais tripleto para a Substância 2 em dois diferentes solventes em comparação com o encontrado na literatura.

Quadro 4 – Valores de deslocamento dos tripletos da substância 02 RMN-¹H

Posição	Experimental*		Literatura*
			FLORES et al. (2013)
	(CD ₃) ₂ SO (δ _H)	CD ₃ OD**(δ _H)	CD ₃ OD (δ _H)
2	2,87 (t, 2H, J = 5,8 Hz)	2,96 (t, J = 5,9 Hz)	2,84 (t, J = 6,3 Hz)
3	4,69 (t, 2H, J = 5,8 Hz)	4,69 (t, J = 5,9 Hz)	4,64 (t, J = 6,3 Hz)

*em 300 MHz; **sinais visualizados no espectro de RMN-¹H do extrato (figura 8, p. 39)

Fonte: Quadro elaborado pelo autor (2016)

**Figura 13** – Representação estrutural da Substância 02.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017)

A Substância 02 foi obtida como um líquido amarelo-claro e através de estudos realizados anteriormente pelo grupo NUBBE, definiu-se que a substância provável para as multiplicidades observadas é o ácido 3-nitropropiónico de fórmula molecular C₃H₅NO₄, muito conhecido por seus efeitos neurotoxicológicos. Seus dois sinais tripleto se dão pelo acoplamento ³J dos hidrogênios metilênicos vizinhos e seus deslocamentos devem-se aos grupos carboxila (H-2) e nitro (H-3) na estrutura da molécula. O ácido 3-nitropropiónico é potente agente neurotóxico e também é bem conhecido como um inibidor do *Mycobacterium tuberculosis* causador da tuberculose (FLORES et al. 2013). Seus estudos são relacionados principalmente a sua neurotoxicidade sendo utilizado para desenvolver em roedores um modelo com perfis semelhantes de neurotoxicidade observada em doentes com doença de Huntington (TASSET et al. 2011).

O ácido 3-NPA é comumente descrito como um metabólito de planta, originalmente isolado de famílias de plantas forrageiras. Essa substância é altamente neurotóxica em mamíferos (exceto ruminantes) e tem atividade contra insetos fitopatógenos. Essa substância isolada de um fitopatógenos do gênero *Phomopsis*, segundo Flores et al. (2013) também é produzida por alguns fungos especialmente dos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, em que essa substância tem um papel importante na defesa de algumas plantas contra herbívoros (FLORES et al. 2013). De acordo com Chomeheon et al (2005), o 3-NPA pode ser produzido por fungos endofíticos ou pode até mesmo ser o resultado da interação entre

o endófito e a planta, ou seja, compostos diferentes podem ser encontrados em diferentes partes das plantas, especialmente nas folhas, a parte dela onde há maior frequência de espécies endofíticas.

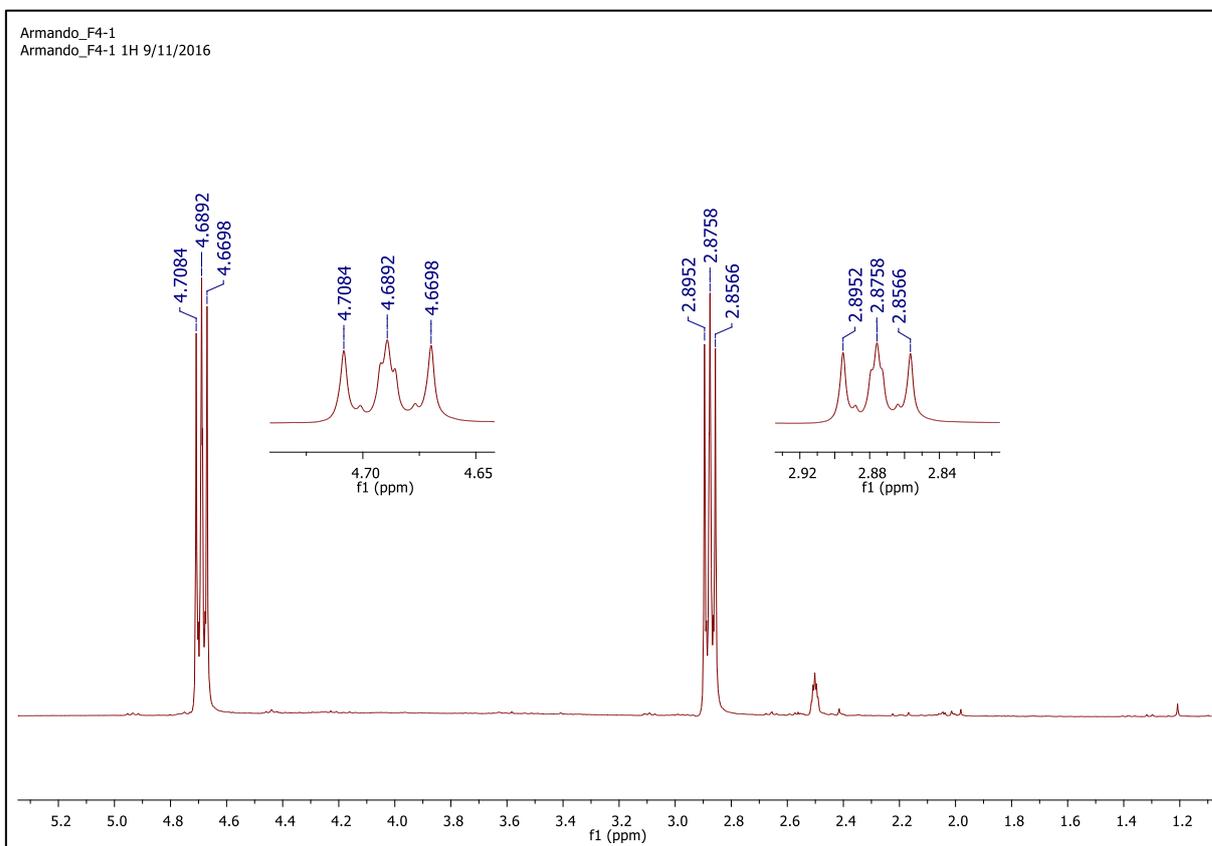


Figura 14 – Espectro de RMN-¹H utilizando como solvente deuterado (CD₃)₂SO e 300 MHz da Fração F4-1.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2016)

5.2.4.3 Substância 03 (Subfração F1-7)

A substância 03 (F1-7, **figura 15**) foi obtida como um sólido amarelo-claro e sua fórmula molecular, C₁₀H₁₂O₃ foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D.

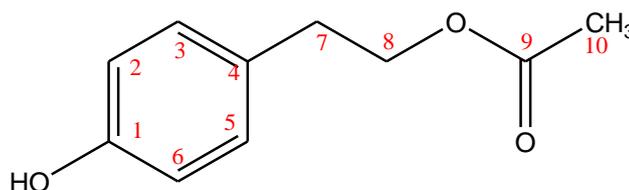


Figura 15 – Representação estrutural da Substância 03.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017)

O espectro de RMN de ^1H da subfração F1-7 (**apêndice 2**, p. 71) apresentou um deslocamento em δ_{H} 1,97 ppm (s, δ_{C} 20, 3H, H-10) sendo uma metila deslocada pelo grupo carbonila, deslocamento em δ_{H} 2,75 ppm (t, δ_{C} 33,0, 2H, H-7; $J = 7,1$ Hz) característico de hidrogênio benzílico, em δ_{H} 4,11 ppm (t, δ_{C} 64, 2H, H-8; $J = 7,1$ Hz) característico de hidrogênio carbinólico, em δ_{H} 6,68 ppm (d, δ_{C} 115, 2H, H-2, H-6, $J = 8,4$ Hz) característico de hidrogênio aromático e δ_{H} 7,01 ppm (d, δ_{C} 129, 2H, H-3, H-5; $J = 8,4$ Hz) também na região de hidrogênio aromático. Com experimento de HSQC (**apêndice 4**, p. 73) foi possível obter os deslocamentos dos carbonos diretamente ligados a hidrogênios nessa molécula. Esses dados foram comparados com a literatura (**quadro 5**).

Quadro 5 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura da Substância 03.

Posição	Experimental**		Literatura
	^{13}C (δ)*	^1H (δ)	MIYAZAWA, et al (2009)***
			^1H (δ)
1	156	–	–
2,6	115	6,68(d, 2H, $J = 8,4$ Hz)	6,68 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz)
3,5	129	7,01(d, 2H, $J = 8,4$ Hz)	7,00 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz)
4	128	–	–
7	33	2,75 (t, 2H, $J = 7,1$ Hz)	2,75 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz)
8	64	4,11 (t, 2H, $J = 7,1$ Hz)	4,12 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz)
9	170	–	–
10	20	1,97 (s, 3H)	1,98 (s, 3H)

*Dados de ^{13}C obtidos em HSQC e HMBC; **em DMSO-d₆, 600 MHz; ***em DMSO-d₆, 500 MHz

Fonte: Quadro elaborado pelo autor (2017)

Pelo mapa de contorno de COSY (**figura 16**, p. 47) foi possível observar as correlações ^1H - ^1H a 3J dos hidrogênios metilênicos H-7 \leftrightarrow H-8 evidenciando uma unidade $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ e dos hidrogênios aromáticos H-3 correlacionando com H-2 e H-5 correlacionando com H-6 em que é visualizado no espectro de RMN de ^1H dois dupletos, o que indica a presença de um benzeno 1,4-dissubstituído.

Pelo mapa de contorno HMBC (**figura 16**, p. 48) foi possível obter a estrutura da Substância 03, em que são dadas as correlações Hidrogênio-Carbono. Como pode-se observar na **figura 15** (p. 46) os fatores determinantes para elaboração dessa estrutura são: H-10 se

correlacionando apenas com C9; H-8 se correlacionando a 2J com C-7 e a 3J com C-9 e C-4, evidenciando dessa forma o grupamento éster ligado a um anel aromático em C-4 (δ_C 128); H-7 se correlaciona a 2J com os carbonos C-8 dado anteriormente e C-4 e a 3J com C-3 (equivalente a C5) comparando com experimento COSY, sabe-se que H-7 se correlaciona com H-8 e seu deslocamento em RMN de 1H é δ_H 2,75 ppm significando que H-7 está diretamente ligado ao anel (hidrogênio benzílico) pára-substituído. No lado oposto ao éster no anel aromático tem-se OH devido a absorção de C-1 em δ_C 156 ppm.

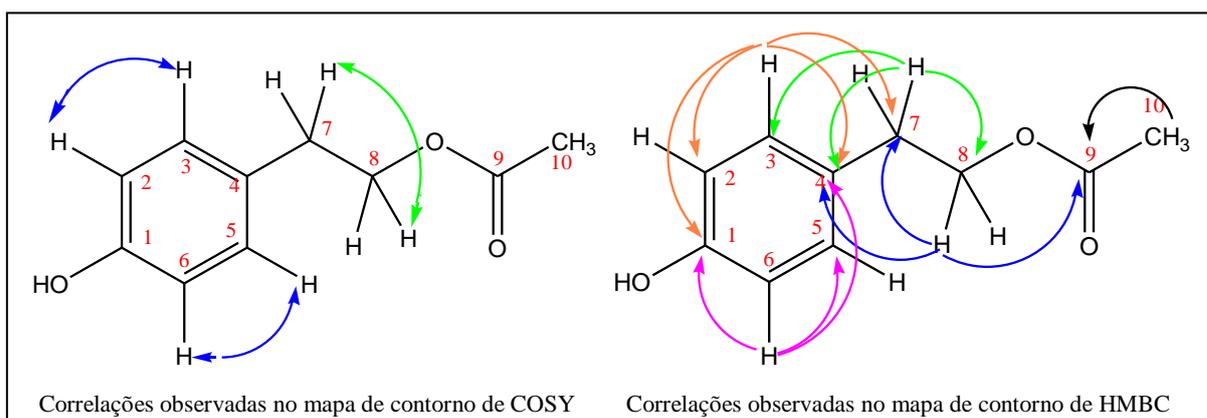


Figura 16 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC da substância 04 (F1-6).
Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017)

Com a comparação dos dados acima com os dados presentes na literatura (**quadro 5**, p. 47) foi possível identificar a substância 03 como sendo a acetato *p*-tiroxil. Essa substância faz parte do grupo do *p*-tiroxil, muito conhecido pelos seus precursores do FTY720 (2-amino-[2-(4-octilfenil) etil]-1,3-propanodiol) um potente agente imunossupressor atualmente empregado no tratamento de esclerose múltipla (NAKAYAMA et al. 2008; SEIDEL; LAURICH; FÜRSTNER, 2004; SUN; BITTMAN, 2006).

5.2.4.4 Substância 04 (Subfração F1-6)

A substância 04 (F1-6, **figura 17**) foi obtida como um sólido amarelo-escuro, e sua fórmula molecular, $C_{11}H_{13}NO_5$, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D e 2D.

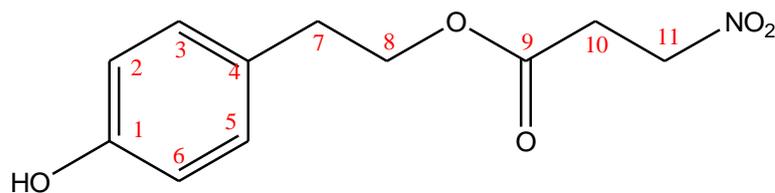


Figura 17 – Representação estrutural da Substância 04.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017)

O espectro de RMN de ^1H da subfração F1-6 (**apêndice 6**, p. 75) apresentou um sinal de hidrogênio em δ_{H} 2,76 ppm (t, δ_{C} 33, 2H, H-7, $J = 7,0$ Hz) característico de hidrogênio benzílico. Em experimento COSY (**apêndice 7**, p. 76) H-7 se correlaciona com H-8 com deslocamento em δ_{H} 4,18 ppm (t, δ_{C} 65, 2H, H-7, $J = 7,0$ Hz) evidenciando a estrutura $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ semelhante a substância 03. Com as correlações dadas pelos experimentos em RMN de COSY para a substância 04, HSQC (**apêndice 8**, p. 77) e HMBC (**apêndice 9**, p. 78) demonstra-se que há semelhança com a substância 03 do H-1 ao H-9 observando no espectro de RMN de ^1H os dois dupletos na região de hidrogênios aromáticos e os dois tripletos de H-7 e H-9 indicando a presença de um benzeno 1,4-dissubstituído e um éster na estrutura. Em adição, no experimento COSY há outros dois grupos de hidrogênios que se correlacionam, H-10 (t, δ_{H} 2,95, δ_{C} 30, 2H, $J = 5,8$ Hz) e H-11 (t, δ_{H} 4,73, δ_{C} 70, 2H, $J = 5,8$ Hz). Observando as correlações em HMBC, H-10 correlaciona com os carbonos C-9 (δ_{C} 170) e C-11 (δ_{C} 70) e H-11 correlaciona com C-9 e C-10, os dois com deslocamento em δ_{C} 30 finalizando a estrutura com o grupo nitro devido ao deslocamento do hidrogênio H-11. Os sinais obtidos dos hidrogênios H-3 e H-5 (d, δ_{H} 6,68, δ_{C} 15, 2H; $J = 8,5$ Hz) e H-2 e H-6 (d, δ_{H} 7,02, δ_{C} 129, 2H; $J = 8,5$ Hz) indicam um anel aromático dissustituído com sinal de carbono em δ_{C} 156 correspondente a substituição de uma hidroxila no anel aromático.

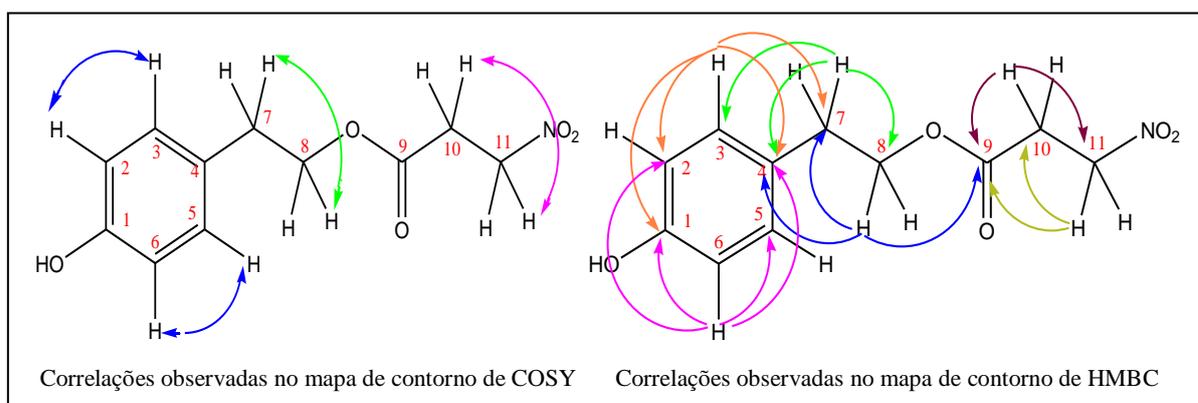


Figura 18 – Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC da substância 04 (F1-6).

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017)

A comparação dos dados obtidos com os dados presentes na literatura (**quadro 6**, p. 50) nos permitiu identificar a substância 04 como 4-hidroxifenetil-3-nitropropanoato conhecido como phomonitroester, que foi isolado pela primeira vez do fungo endofítico *Phomopsis* sp. PSU-D15, isolado da planta *Garcinia dulcis* na Tailândia em 2005 (RUKACHAISIRIKUL et al. 2008). Não foi possível realizar a confirmação do grupo nitro terminal através de espectrometria de massas devido a substância ter sido degradada antes da análise.

No estudo de Klaiklay et al. (2012) o phomonitroester mostrou citotoxicidade seletiva contra linhagens sanguíneas MCF-7 e KB com valores de 43 µg/mL demonstrando o potencial de bioatividade dessa substância.

Quadro 6 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura da Substância 04.

Posição	Experimental**		Literatura***	
			RUKACHAISIRIKUL et al. (2008)	
	¹³ C* (δ)	¹ H (δ)	¹³ C (δ)	¹ H (δ)
1	156	–	153,9	–
2,6	115	6,68 (d, 2H, <i>J</i> = 8,5 Hz)	115,5	6,70 (d, 2H, <i>J</i> = 8,4 Hz)
3,5	129	7,02 (d, 2H, <i>J</i> = 8,5 Hz)	129,9	7,00 (d, 2H, <i>J</i> = 8,4 Hz)
4	130	–	130,0	–
7	33	2,76 (t, 2H, <i>J</i> = 7,0 Hz)	34,1	2,80 (t, 2H, <i>J</i> = 7,2 Hz)
8	65	4,18 (t, 2H, <i>J</i> = 7,0 Hz)	66,1	4,25 (t, 2H, <i>J</i> = 7,2 Hz)
9	170	–	169,0	–
10	30	2,95 (t, 2H, <i>J</i> = 5,8 Hz)	31,1	2,89 (m, 2H, <i>J</i> = 6,3 Hz)
11	70	4,73 (t, 2H, <i>J</i> = 5,8 Hz)	69,7	4,55 (m, 2H, <i>J</i> = 6,3 Hz)

*Dados de ¹³C obtidos em HSQC e HMBC; **em DMSO-d₆, 600 MHz; ***em DMSO-d₆, 300 MHz

Fonte: Quadro elaborado pelo autor (2017)

5.2.4.5 Substância 05 (Subfração F1-16)

A substância 05 (F1-16, **figura 19**) foi obtida como um sólido amarelo-escuro e sua fórmula molecular, C₁₁H₁₃O₄N, foi determinada com base nos experimentos de RMN 1D, 2D e de Espectrometria de Massas, ESI-Qq-TOF, no modo positivo ([M+Na]⁺ em *m/z* 246,03 (**apêndice 14**, p. 83)).

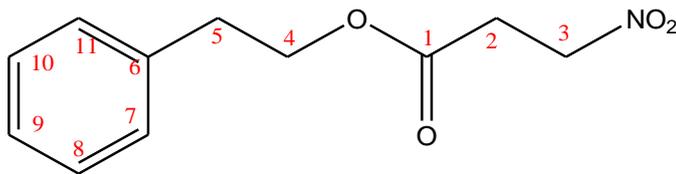


Figura 19 – Representação estrutural da Substância 05.
Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017)

O espectro de RMN de ^1H da subfração F1-16 (**apêndice 10**, p. 79) apresentou semelhança com a substância 04 com sinais em H-3 (t, δ_{H} 4,73, δ_{C} 70, 2H, $J = 5,9$ Hz), H-2 (t, δ_{H} 2,95, δ_{C} 34, 2H, $J = 5,9$ Hz), H-4 (t, δ_{H} 4,26, δ_{C} 65, 2H; $J = 6,9$ Hz) e H-5 (t, δ_{H} 2,88, δ_{C} 34, 2H) característicos de hidrogênios metilênicos devido às suas multiplicidades e correlações em RMN 2D. Em experimento COSY (**apêndice 11**, p. 80) os hidrogênios H-5 e H-4 correlacionam entre si, assim como H-2 e H-3, em que não se correlacionam como mais nenhum hidrogênio adjacente indicando duas estruturas separadas $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$. Há correlação em COSY também na região de anel benzênico, em que H-7 se correlaciona com H-8 e H-9 e; H-11 com H-10 e H-9. No espectro de RMN de ^1H dessa substância há uma região complexa de sinais de absorção de hidrogênio o que indica um anel benzênico monossustituído.

Nas correlações observadas no mapa de contorno HMBC (**apêndice 13**, p. 82) H-4 e H-2 correlacionam com C-1 (δ_{C} 170) evidenciando dessa forma o grupo éster na estrutura também presente nas substâncias 03 e 04 anteriormente definidas e a conexão entre as duas estruturas $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ na molécula. Podemos também observar nas correlações da figura 20 o hidrogênio H-3 se correlaciona com C-2 (δ_{C} 34); H-2 se correlaciona com C-3 (δ_{C} 70) e C-1 (δ_{C} 170); H-4 se correlaciona com C-5 (δ_{C} 34), C-6 (δ_{C} 137,8) e C-1 (δ_{C} 170) e; H-5 se correlaciona com C-4 (δ_{C} 65), C-6 (δ_{C} 137,8) e C-11 (δ_{C} 128,9) definindo assim a estrutura até o anel benzênico.

Para esta estrutura foi observada a absorção do sinal em RMN do hidrogênio H-3 em δ_{H} 4,73 ppm e carbono, obtido dos experimentos de RMN 2D, em δ_{C} 70 característico de ligação com grupo NO_2 ou OH . O grupo nitro foi confirmado em experimento em Espectrômetro de Massas com sinal em $m/z = 246,03$ (**apêndice 14**, p. 83) misturado a outros sinais devido a substância não ser pura.

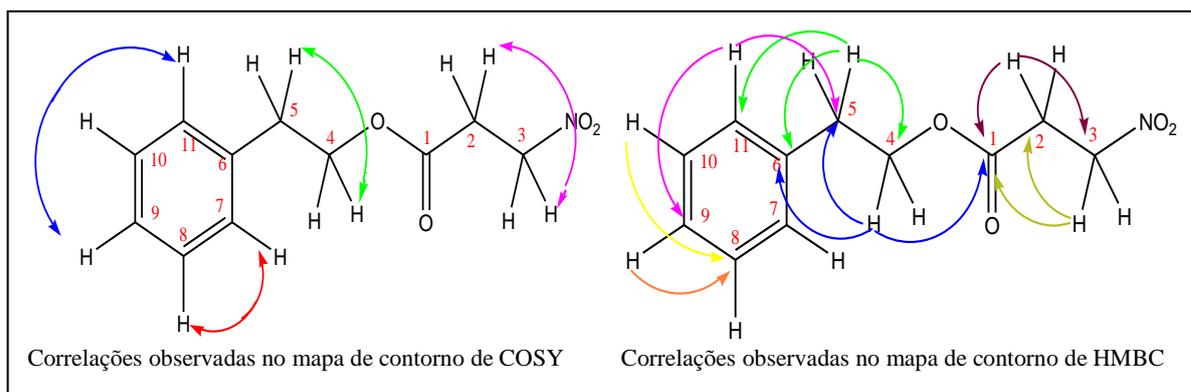


Figura 20 - Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC da substância 05 (F1-16).
Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017)

Com os dados obtidos (**quadro 7**, p. 52) foi realizada uma busca no Scifinder e não foi encontrada estrutura semelhante para a substância com NO₂ no éster (C-3), por isso propõem-se que provavelmente a substância fenetil-3-nitropropanoato seja inédita.

Quadro 7 – Dados espectrométricos obtidos da Substância 05.

Posição	Experimental**	
	¹³ C* (δ)	¹ H (δ)
1	170	–
2	30	2,95 (t, H2, J = 5,9 Hz)
3	70	4,73 (t, H2, J = 5,9 Hz)
4	65	4,26 (t, H2, J = 6,9 Hz)
5	34	2,88 (t, H2, J = 6,9 Hz)
6	137,8	–
7,11	128,9	7,30 (m, H2)
8,10	128,5	7,25 (m, H2)
9	126,5	7,22 (m, H1)

*Dados de ¹³C obtidos em HSQC e HMBC; **em DMSO-d₆, 600 MHz (DMSO-d₆)

Fonte: Quadro elaborado pelo autor (2017)

5.3 Análises Biológicas

5.3.1 Atividade Larvicida

O objetivo do teste foi determinar a biopotência do extrato fúngico e frações contra as larvas do mosquito *A. aegypti*.

A realização do bioensaio seletivo é importante para verificar a proximidade entre a DL₅₀ e as concentrações escolhidas para o bioensaio de dose. Dependendo da quantidade de

mortes, as doses escolhidas são próximas a 100 ou 500 ppm, dessa forma, ocorrerá a economia de extrato bruto, DMSO, alimento para larvas, tempo, entre outros. Conforme pode-se verificar na **figura 21** (p. 53), a concentração de 100 ppm do extrato bruto foi responsável pela morte de 18 larvas das 30 (60%) após 72h de leitura e, em 500 ppm a mortalidade atingiu 100% em apenas 24h. Com isso, conclui-se que a dose letal para 50% das larvas estará mais próxima de 100ppm, uma vez que nessa concentração já houve a morte de mais da metade das larvas utilizadas. Por isso, as concentrações selecionadas para o bioensaio de dose do extrato foram 50, 75, 100, 125 e 150ppm.

Ainda no ensaio seletivo, a fração F1 exibiu mortalidade de 9 larvas em 100ppm após 72 hrs e 28 em 500ppm após 24 horas. Esses valores indicam que sua DL_{50} está próxima a 500ppm, visto que nesta dose houve a morte de mais de 50% dos indivíduos. As frações F2, F3 e F4 apresentaram 100% de mortalidade nas duas doses testadas (100 ppm 48 e 500 ppm após 24 hrs), portanto, sua DL_{50} estará mais próxima a 100ppm e, as frações F5, F6, F7 e F8 exibiram mortalidade somente na dose de 500ppm, com a DL_{50} ficando próxima a esta mesma dose.

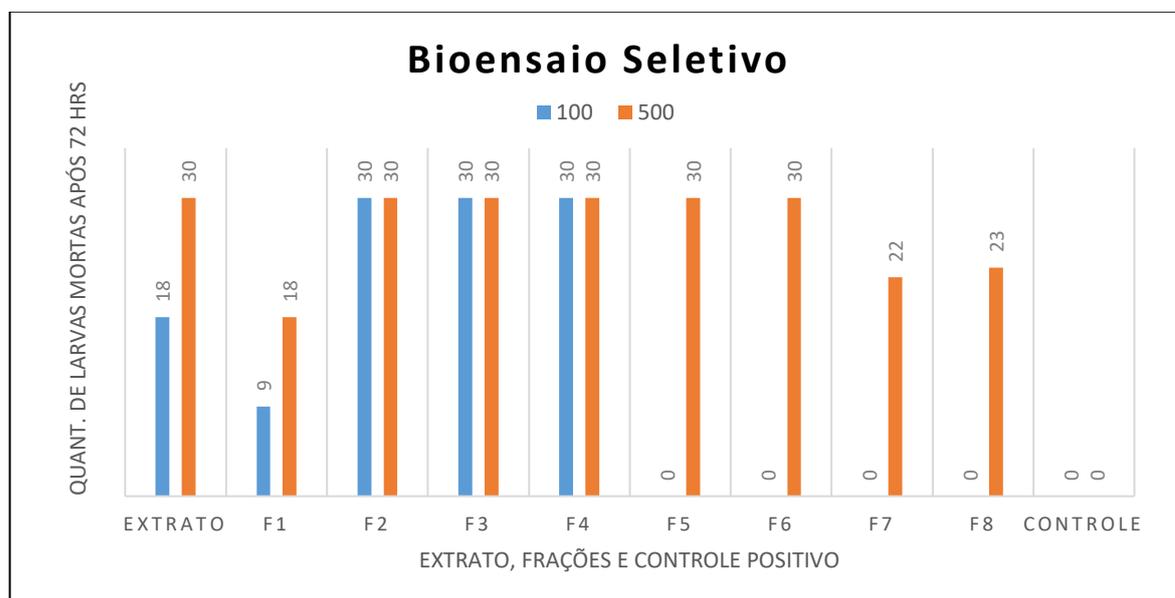


Figura 21 – Mortalidade das larvas de *A. aegypti* em 100 e 500ppm do extrato bruto e frações do *Phomopsis* sp.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017)

As frações F1 à F8 do extrato bruto não foram testadas no ensaio De Dose do presente estudo devido à falta de massa sendo testado somente o extrato fúngico.

A análise da mortalidade das larvas nesta etapa consiste na determinação das DL_{50} e DL_{90} com os seguintes intervalos de confiança: 90, 95 e 99% através do Probit Polo-PC (análise estatística). A DL_{50} indica a dose letal que será responsável pela mortalidade de 50% das larvas

que entrarem em contato com o extrato fúngico (**tabela 1**, p. 54), assim como a DL₉₀ que exibirá 90% de morte larval (**tabela 2**, p. 54). O extrato bruto do *Phomopsis* sp. apresentou DL₅₀ de 84,6ppm em apenas 24h de leitura da mortalidade, e DL₉₀ de 147,8ppm no mesmo período de tempo.

Os valores do intervalo de confiança são referentes a faixa em que a dose letal desse extrato conseguirá obter a mortalidade em 50 e 90% das larvas.

Tabela 1 – Dose Letal em 50% das larvas de *A. aegypti* com IC 90, 95 e 99% do extrato de *Phomopsis* sp.

Leitura	DL ₅₀ (ppm)	IC 90%		IC 95%		IC 99%	
		Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior
24	84,661	77,378	91,664	74,518	94,269	62,748	104,245
48	81,569	76,681	86,265	74,843	87,936	68,179	93,611
72	79,507	74,226	84,525	72,214	86,307	64,739	92,392

Fonte: Quadro elaborado pelo autor (2016)

Como pode ser observado na **tabela 1** após as leituras de mortalidades em 24, 48, e 72 horas os valores para a DL₅₀ estiveram dentro dos Intervalos de Confiança inferiores e superiores calculados no Probit, ou seja, os dados são estatisticamente significativos e estudos posteriores utilizando da mesma metodologia contida nesse trabalho terão essas porcentagens (90, 95 e 99%) de encontrar seus resultados dentro desses Intervalos de Confiança. Os valores para DL₉₀ também foram estatisticamente significativos, como pode ser observado na **tabela 2**.

Tabela 2 – Dose Letal em 90% das larvas de *A. aegypti* com IC 90, 95 e 99% do extrato de *Phomopsis* sp.

Leitura	DL ₉₀ (ppm)	IC 90%		IC 95%		IC 99%	
		Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior
24	147,810	131,912	174,622	127,646	189,451	116,635	297,114
48	140,162	129,488	155,238	126,392	162,247	118,012	196,101
72	137,713	126,517	153,943	123,305	161,683	114,665	201,062

Fonte: Quadro elaborado pelo autor (2016)

O valor do Qui-Quadrado (χ^2) exibido **tabela 3** (p. 55) é responsável pela validação dos dados de mortalidade do extrato fúngico testado. Estatisticamente, os números de X² são tabelados e significam que os valores obtidos no programa Polo-PC devem ser inferiores para que o teste seja possível de ser realizado como Probit.

A procura por compostos naturais como alternativas no controle de mosquitos como o *A. aegypti* cresce cada vez mais, visto que as doenças transmitidas por esta espécie, representam um dos principais problemas de saúde pública em muitos países como na África subsaariana,

bem como em outros países tropicais e subtropicais. A resistência dos mosquitos a produtos químicos sintéticos e a toxicidade ambiental criados pelos produtos químicos é o que justificam essa crescente busca (Kendagor et al. 2013). Estudos como o de Tian et al. (2016) isolaram o endófito *Berkleasmiium* sp. da espécie vegetal *Dioscorea zingiberensis*. De seu extrato bruto, isolou duas substâncias, palmarumicina C₈ e a palmarumicina B₆ que exibiram atividade larvicida com DL₅₀ de 8,83 e 11,51 ppm em 24 horas de exposição, respectivamente, sobre as larvas de quarto instar do mosquito *Aedes albopictus* (mosquito tigre asiático – possível disseminador de febre amarela e dengue).

Tabela 3 – Valores referentes a inclinação da reta e Qui-quadrado (X²).

Leitura	X ²
24	6,2379
48	3,1163
72	3,5929

Fonte: Quadro elaborado pelo autor (2016)

A literatura mostra baixa quantidade de pesquisas envolvendo extratos de fungos endofíticos com aplicabilidade às larvas de *A. aegypti*, entretanto, ainda é possível citar os estudos de Bücken et al. (2013) que obtiveram extratos do fungo endofítico *Pestalotiopsis virgulata* que apresentaram atividade frente as larvas de *A. aegypti* com DL₅₀ de 101,8 ppm. Kendagor et al. (2013) avaliou a atividade larvicida do extrato do fungo *Pezizcula lívida* o qual exibiu 100% de mortalidade a 20 ppm. A partir desse foi isolada a substância maleína, que mostrou DL₅₀ e DL₉₀ em 24 horas de 1,1 e 4,3 ppm, respectivamente.

Como pode ser observado, há resultados satisfatórios para testes larvicidas utilizando extratos e substâncias puras derivadas de fungos endofíticos. Sendo assim, será necessária uma análise das substâncias puras para determinar as DL₅₀ e DL₉₀ que possivelmente esteja ligada ao efeito larvicida indicado nesse trabalho e que está presente nas frações F1, F2, F3 e F4, como podemos ver no gráfico de mortalidade das larvas para as frações do extrato fúngico na **figura 21** (p. 53).

5.3.2 Atividade Antibacteriana

Extratos para serem considerados ativos, devem apresentar qualquer halo de inibição (área sem crescimento detectável a olho nu) do crescimento bacteriano em torno do disco de difusão. As zonas de inibição são registradas em milímetro de diâmetro e é considerada a média dos diâmetros dos respectivos halos de inibição (BAUER et al. 1966).

Os discos que foram embebidos pelo extrato fúngico do *Phomopsis* sp. não obtiveram halo de inibição nas concentrações de 250, 500, 750 e 1000 ppm testadas contra as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.

Autores como Radić e Štrukelj (2012) afirmam que a atividade antibacteriana é mais frequentemente detectada quando testadas a partir do metabólito secundário das espécies pertencentes ao gênero *Fusarium*, *Phomopsis* e *Phoma*. Sousa et al. (2016) encontraram as substâncias Phomosina A e C do extrato de acetato de etila do fungo endofítico *Phomopsis* sp., que apresentaram atividade antibacteriana contra *S. aureus*, *S. oralis*, *E. fecalis*, *E. cloacae*, *M. luteus* e *B. bronchiseptica*. Corrado e Rodrigues (2004) isolaram treze espécies do gênero *Phomopsis* sp. da planta *Aspidosperma tomentosum*. O extrato de acetato de etila de sete destes fungos, exibiram atividade bacteriana frente *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* na concentração de 2000 ppm.

Comparando os resultados obtidos dos estudos citados no parágrafo anterior que realizam testes contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, três das quatro bactérias utilizadas no presente estudo, conclui-se que a diferença dos resultados pode ser associada a diversos fatores, como a concentração testada. Também deve-se levar em consideração que este resultado significa que não houve atividade bacteriana sobre estas cepas testadas podendo haver resultado diferente contra outras espécies de bactérias.

5.3.3 Atividade antifúngica

Este teste em especial, não estava entre os objetivos iniciais do presente estudo, mas obteve-se a oportunidade de realiza-lo a partir da parceria existente.

A revelação da cromatoplaça contendo o extrato bruto e frações do *Phomopsis* sp. não mostrou inibição do crescimento dos fungos testados, *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (**figura 22**, p. 57).

Esses resultados obtidos demonstram que possivelmente a concentração de compostos com atividade antifúngica encontram-se em baixa concentração no extrato do *Phomopsis* sp. associado a *Passovia stelis*, visto que a maioria dos metabólitos secundários deste fungo são descritos na literatura por serem constituídos de substâncias com atividade antifúngica, entretanto, umas das espécies mais utilizadas é a *Candida albicans* para todos os estudos envolvendo os fungos endofíticos. Ainda assim, é possível encontrar estudos que obtiveram atividade antifúngica do extrato e frações do *Phomopsis* sp. contra *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, como em Chapla et al. (2014) que obtiveram este fungo (*Phomopsis*) da

espécie vegetal *Senna spectabilis*, em que isolaram uma citocalasina que exibiu a referida atividade biológica. Outro estudo foi o de Zanardi et al. (2012) que obtiveram as substâncias do fungo *Phomopsis* sp. (7R,9S,10R) -3,9-di-hidroxicalameneno e aristelegona-A que mostraram atividade contra *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

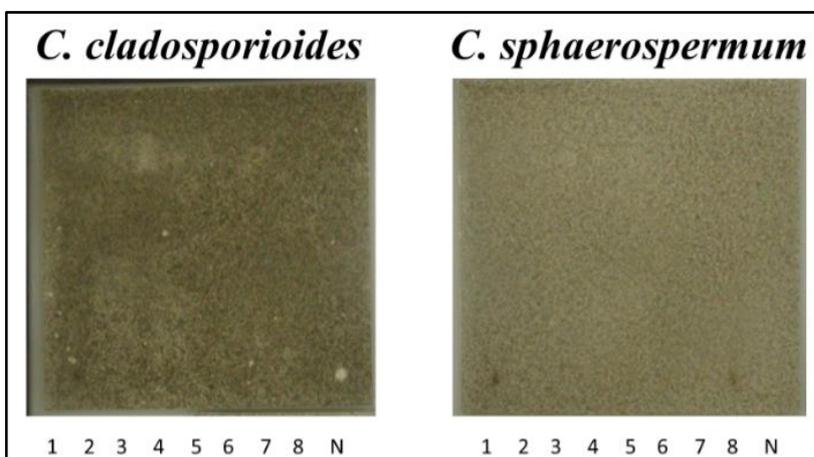


Figura 22 - Crescimento fúngico em cromatoplasas contendo extrato e frações.
Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017)

5.3.4 Atividade anticolinesterase

Estima-se que cerca de 4 milhões de pessoas possuam o mal de Alzheimer, sua incidência duplica a cada 5 anos após os 65 e sugere-se que este grupo aumente ainda mais podendo passar atingir aproximadamente 19 milhões de indivíduos no ano de 2050 (VIEGAS JUNIOR et al., 2004a). Por apresentarem melhores resultados no controle da doença são utilizados fármacos que inibem a enzima acetilcolinesterase (VIEGAS JUNIOR et al., 2004a). Alguns exemplos desses fármacos são a tricina, fisistigmina utilizada como controle positivo nesse trabalho e a galantamina de origem natural (CARDOSO, 2003)

O uso clínico crescente de fármacos inibidores da enzima Acetilcolinesterase (AChE) como terapia para uma variedade de desordens do sistema nervoso central, como a Doença de Alzheimer, Síndrome de Down, Injúria Traumática Cerebral tornam cada vez maior o interesse das indústrias farmacêuticas na obtenção de moléculas que apresentem essa atividade enzimática (GIACOBINI, 2004).

Estudos envolvendo diversas fontes de produtos naturais também mostram interesse em moléculas bioativas que exibem ação contra a AChE. Tan et al. (2007) isolaram um composto não identificado do *Phomopsis* sp. que mostrou atividade enzimática para AChE. Zanardi et al (2012) encontraram as substâncias (7R,9S,10R) -3,9-di-hidroxicalameneno e aristelegona-A do *Phomopsis* sp., as quais inibiram a enzima AChE.

Este ensaio qualitativo, indica que ocorre inibição da enzima AChE quando observa-se o aparecimento de manchas brancas na cromatoplaça com fundo de coloração roxa. Essas manchas foram visualizadas nas amostras do extrato bruto e frações F2, F5, F6 e F7. As demais frações não apresentaram atividade inibitória como demonstrado no **quadro 8** e **figura 23** (p. 58).

Os resultados obtidos neste teste evidenciam a potencialidade do fungo endofítico do gênero *Phomopsis* na produção de metabólitos secundários com potencial anticolinesterásico.

Quadro 8 – Resultado da atividade anticolinesterásica para o extrato bruto e frações.

Código	Massa (µg)	Rf / atividade
Extrato	200	Inativo
F1	100	Inativo
F2	100	0,42 forte
F4	100	Inativo
F5	100	0,75 forte
F6	100	0,75 médio
F7	100	0,45 forte
F8	100	Inativo
Fisostigmina	0,05	0,07 forte
		0,18 forte
		0,48 forte
		0,59 forte

Fonte: Quadro elaborado pelo autor (2016)

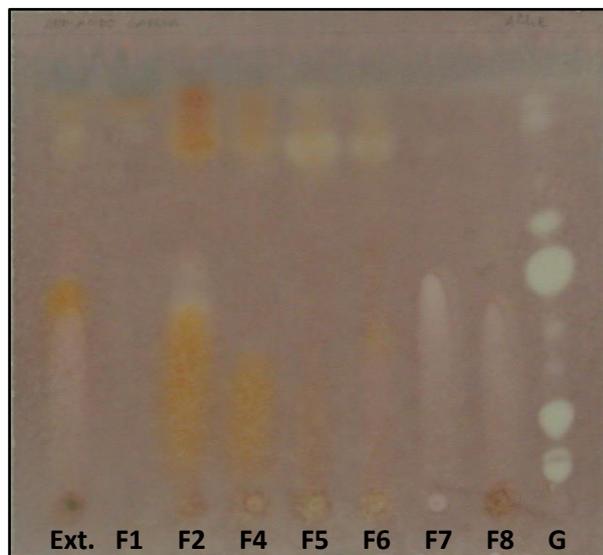


Figura 23 – Ensaio anticolinesterásico realizado em cromatoplaça de sílica-gel.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2016).

5.3.5 Ensaio Antioxidante

A atividade antioxidante de compostos orgânicos depende de algumas características estruturais que incluem, na maioria dos casos, a presença de grupamentos fenólicos. Desta forma, flavonoides, fenilpropanoides e outros aromáticos são os principais alvos na procura por novos compostos antioxidantes (YOKOZAWA et al. 1998).

Para esse estudo como descrito na metodologia foi realizado o ensaio em cromatoplaça de sílica-gel para o extrato bruto e frações, menos para a fração F3.

Na **figura 25** mostra-se o resultado do ensaio antioxidante realizado em cromatoplaça com eluentes descritos na metodologia. Este ensaio baseia-se na mudança de coloração do radical livre (roxo) para o radical reduzido (amarelo) na presença de substâncias antioxidantes (**figura 24**).

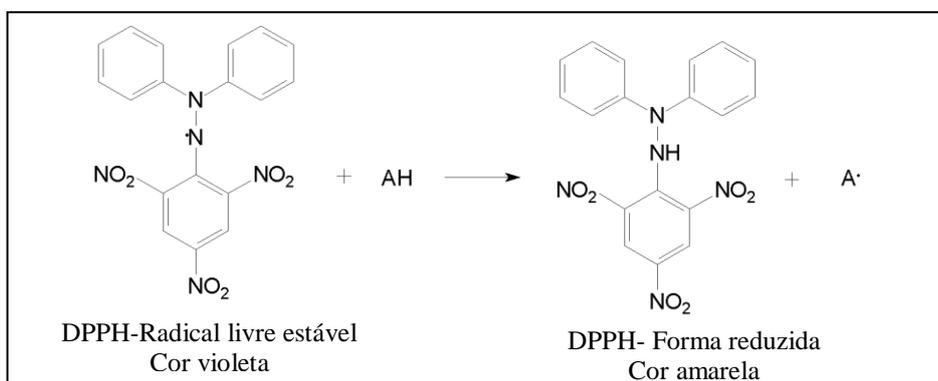


Figura 24 – Mecanismo de reação no ensaio de antioxidante com DPPH.
 Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017)

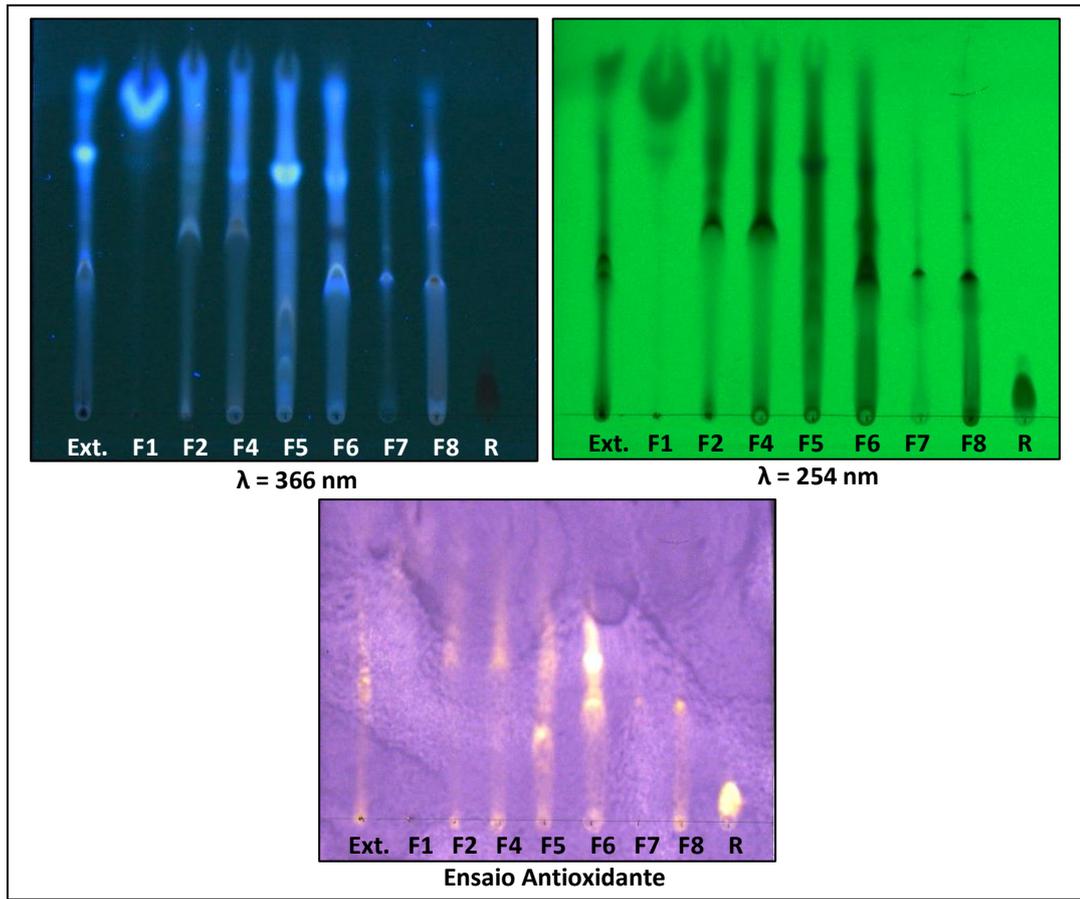


Figura 25 – Ensaio de atividade antioxidante em cromatoplaça de sílica-gel utilizando como controle positivo a Rutina (R).

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017)

Como observado na **figura 25** (p. 60), as frações com atividade antioxidante são as frações F2, F4, F7 e F8 (atividade fraca), F5 (atividade moderada) e F6 (atividade forte), ou seja, as substâncias presentes nessas frações têm atividade contra radicais livres presentes no DPPH• utilizado na análise.

Atualmente, diversas técnicas para detecção de atividade antioxidante de substâncias têm sido utilizadas, pois substâncias que apresentam esse tipo de potencial podem ser utilizadas na prevenção de doenças crônico-degenerativas e prevenir o efeito danoso dos radicais livres. Dentre essas técnicas, pode-se destacar o sequestro de radicais livres, como o DPPH•. Este ensaio evidenciou a presença de substâncias com potencial antioxidante principalmente nas frações F5 e F6, pois foi observado a redução do DPPH• pela presença de manchas amarelas em contraste com o fundo roxo na cromatoplaça. Infelizmente, não foi possível separar subfrações dessa fração para analisar de forma química e biológica as substâncias presentes nela.

6. CONCLUSÃO

As interações que existem entre os fungos endofíticos e seus hospedeiros, resultam na produção de metabólitos secundários muitas vezes biologicamente ativos. Neste estudo, pode-se observar que as frações obtidas a partir da extração com um solvente de média polaridade do produto do fungo endofítico *Phomopsis* sp. apresentou boa resposta biológica, como exemplo, as frações F2, F3 e F4 ativas contra as larvas do mosquito *A. aegypti* na concentração de 100 ppm em 24 horas, e dessas a fração F2 também mostrou inibição da enzima acetilcolinesterase. Outras frações que também mostraram atividade em dois testes biológicos, foram a F5 e F6, sendo positivas para ação antioxidante e anticolinesterase e a F7 que mostrou inibição da enzima acetilcolinesterase.

Esse estudo destacou ainda a eficiência da abordagem que incluiu o estabelecimento do perfil químico do fungo endofítico *Phomopsis* sp. em estudo por CLAE-DAD e por RMN-¹H 1D e 2D, bem como a avaliação preliminar do potencial de bioatividade de seu extrato bruto e frações.

A partir das frações obtidas, foi possível isolar cinco substâncias químicas, são elas: o fenetil-3-nitropropanoato, inédito na literatura; o ácido 3-nitropropiónico, duas substâncias já conhecidas (acetato *p*-tirosool e phomonitroéster) derivadas do grupo *p*-tirosool descrito na literatura por suas atividades biológicas e; o ácido succínico conhecido como “bloco de construção”, ou seja, é uma base para o fornecimento de uma série de substâncias intermediárias e produtos finais importantes na indústria química.

Portanto, os resultados encontrados são considerados satisfatórios, visto que eles vêm a comprovar a versatilidade biológica dos metabólitos dos fungos endofíticos, mais especificamente do gênero endofítico *Phomopsis* indicando a necessidade do estudo químico desta classe de microrganismos.

REFERÊNCIAS

- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: Unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 6, p. 1829–1845, 2011.
- ARRUDA, R.; FADINI, R.F.; CARVALHO, L.N.; DEL-CLARO, K.; MOURÃO, F. A.; JACOBI, C.M.; TEODORO, G.S.; VAN DEN BERG, E.; CAIRES, C.S.; DETTKE, G.A. Ecology of neotropical mistletoes: an important canopy-dwelling component of Brazilian ecosystems. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 2, p. 264–274, 2012.
- AYOB, F. W.; SIMARANI, K. Endophytic filamentous fungi from a *Catharanthus roseus*: Identification and its hydrolytic enzymes. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 3, p. 0–5, 2016.
- BACHHAV, S. S. BHUTADA, M.S.; PATIL, S.D.; BASER, B.; CHAUDHARI, K.B. Effect of *Viscum articulatum* Burm. (Loranthaceae) in N^o- nitro-L-arginine methyl ester induced hypertension and renal dysfunction. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 2, p. 467–473, 2012.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, 1966. vol. 45, n. 4, 493–496 p.
- BECHTHOLD, I.; BRETZ, K.; KABASCI, S.; KOPITZKY, R.; SPRINGER, A. Succinic Acid : A New Platform Chemical for Biobased Polymers from Renewable Resources. n. 5, p. 647–654, 2008.
- BONFIM, J. A.; VASCONCELLOS, R.L.F.; BALDESIN, L.F.; SIEBER, T.N.; CARDOSO, E.J.B.N. Dark septate endophytic fungi of native plants along an altitudinal gradient in the Brazilian Atlantic forest. **Fungal Ecology**, v. 20, p. 202–210, 2016.
- BUATONG, J.; PHONGPAICHIT, S.; RUKACHAISIRIKUL, V.; SAKAYAROJ, J. Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove fungal endophytes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 12, p. 3005–3008, 2011.
- BÜCKER, A.; BÜCKER, N.C.F.; SOUZA, A.Q.L.; GAMA, A.M.; RODRIGUES-FILHO, E.; COSTA, F.M.; NUNEZ, C.V.; SILVA, A.C.; TADEI, W.P. Larvicidal effects of endophytic and basidiomycete fungus extracts on *Aedes* and *Anopheles* larvae (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 4, p. 411–419, 2013.
- CAETANO, A. O. ASPECTOS GERAIS E MORFOLÓGICOS DE *Phomopsis* sp. Disponível em: http://fitopatologia1.blogspot.com.br/2010/12/aspectos-gerais-e-morfol%C3%B3gicos-de_14.html . Acesso em: 05 nov. 2016
- CAI, R. ;LIU, S.C.Z.; TAN, C.; HUANG, X.; SHE, Z. A new α -pyrone from the mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. HNY29-2B. **Natural Product Research**, v. 31, n. 2, p. 124–130, 2017.
- CHAPLA, V. M.; ZERAIK, M.L.; XIMENES, V.F.; ZANARDI, L.M.; LOPES, M.N.;

CAVALHEIRO, A.J.; SILVA, D.H.S.; YOUNG, M.C.M.; FONSECA, L.M.; BOLZANI, V.S.; ARAÚJO, A.R. Bioactive secondary metabolites from *Phomopsis* sp., an endophytic fungus from *Senna spectabilis*. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6597–6608, 2014.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Artigo Fungos Endofíticos : Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais Endophytic Fungi : An Unexplored and Sustainable Source of New and Bioactive Natural Products Resumo Fungos Endofíticos : Uma Fonte Inexplorada e Susten. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 421–437, 2013.

CHITHRA, S.; JASIM B.; MATHEW, J.; RADHAKRISHNAN, E.K. Endophytic *Phomopsis* sp. colonization in *Oryza sativa* was found to result in plant growth promotion and piperine production. *Physiologia Plantarum* - Vol. 160, 2017.

CHOI, J. N.; KIM, J.; PONNUSAMY, K.; LIM, C.; KIM, J.G.; MUTHAIYA, M. J.; LEE, C.H. Identification of a new phomoxanthone antibiotic from *Phomopsis longicolla* and its antimicrobial correlation with other metabolites during fermentation. **Journal of Antibiotics**, v. 66, n. 4, p. 231–233, 2013.

CHOI, Y.; KIM, H. NMR Metabolomics to Revisit the Tobacco Mosaic Virus Infection in *Nicotiana tabacum* Leaves. **Journal of natural ...**, p. 742–748, 2006.

COOPER, R.; NICOLA, G. *Natural Products Chemistry: Sources, Separations and Structures*. New York: Taylor & Francis Group, 2015. 198 p.

CORRADO, M.; RODRIGUES, K. F. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 157–160, 2004.

CUNICO, M.M.; CARVALHO, J.L.S.; KERBER, V.A.; HIGASKINO, C.E.K.; ALMEIDA, S. C..C; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p. 97–103, 2004.

DEWICK, P.M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 2nd. ed. University Of Nottingham, UK: John Wiley & Sons, LTD, 2002. 514 p.

DIDIER, D. S.; LAURIER, E.O.N.; DIN, N.; JULES, P. R.; VICTOR, T.; HENRI, F.; GEORGES, S.; DIDIER, M.A.; JOSEPH, B.I.; AKOA, A. An assessment on the uses of Loranthaceae in ethno pharmacology in Cameroon: A case study made in Logbessou, North of Douala. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 8, p. 592–595, 2009.

DU, G.; WANGA, Z.C.; HUB, W.Y.; YANB, K.L.; WANGB, X.L.; YANGA, H.M.; YANGA, H.Y.; GAOC, Y.H.; LIUB, Q.; HU, Q.F. Three new 3-methyl-2-arylbenzofurans from the fermentation products of an endophytic fungus *Phomopsis* sp. and their anti-TMV activity. **Phytochemistry Letters**, n. 2015, p. 3–6, 2016.

DULMAGE, H.T; YOUSTEN, A.A.; SINGER, S.; LACEY, L.A. Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*. Geneva, **UNDP**, p. 58, 1990.

ELAVARASI, A.; RATHNA, G. S.; KALAISELVAM, M. Taxol producing

mangrove endophytic fungi *Fusarium oxysporum* from *Rhizophora annamalayana*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2 SUPPL., p. S1081–S1085, 2012.

FLORES, A. C.; PAMPHILE, J.A.; SARRAGIOTTO, M.H.; CLEMENTE, E. Production of 3-nitropropionic acid by endophytic fungus *Phomopsis longicolla* isolated from *Trichilia elegans* A. JUSS ssp. *elegans* and evaluation of biological activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 5, p. 923–932, 2013.

GIACOBINI, E. Cholinesterase inhibitors: New roles and therapeutic alternatives. **Pharmacological Research**, v. 50, n. 4, p. 433–440, 2004.

GOND, S. K.; KHARWAR, R. N.; WHITE, J. F. Will fungi be the new source of the blockbuster drug taxol? **Fungal Biology Reviews**, v. 28, n. 4, p. 77–84, 2014.

HUANG, R. ;UDAYANGA, D.; WANG, X.; HOU, X.; MEI, X.; FU, Y.; HYDE, K.D.; LI, H. Secondary Metabolites of an Endophytic Fungus *Phomopsis* sp. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 51, n. 2, p. 392–394, 2015.

HUANG, W.Y.; CAI, Y.Z.; XING, J.; CORKE, H.; SUN, M. A Potential Antioxidant Resource: Endophytic Fungi from Medicinal Plants. **Economic Botany**, v. 61, n. 1, p. 14–30, 2007.

HUSSAIN, H.; JOHN, M.; AL-HARRASI, A.; SHAH, A.; HASSAN, Z.; ABBAS, G.; RANA, U.A.; GREEN, I.R.; SCHULZ, B.; KROHN, K. Antimicrobial constituents from endophytic fungus *Fusarium* sp. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 3, p. 186–189, 2015.

IBRAHIM, S. R. M.; MOHAMED, G. A.; ROSS, S. A. Integracides F and G: New tetracyclic triterpenoids from the endophytic fungus *Fusarium* sp. **Phytochemistry Letters**, v. 15, p. 125–130, 2016.

KAUL, S.; GUPTA, S.; AHMED, M.; DHAR, M.K. Endophytic fungi from medicinal plants: A treasure hunt for bioactive metabolites. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 4, p. 487–505, 2012.

KENDAGOR, A.C.; LANGAT, M.K.; CHEPLOGOI, P.K.; OMOLO, J.O. Larvicidal Activity of Mellein From Cultures of an Ascomycete *Pezizula*. **International Journal Life Science Biotechnology & Pharma Research**. Vol. 2, No. 3, 2013.

KHARWAR, R. N.; MISHRA, A.; GOND, S.K.; STIERLE, A.; STIERLE, D. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Natural product reports**, v. 28, p. 1208–1228, 2011.

KLAIKLAY, S.; RUKACHAISIRIKUL, V.; PHONGPAICHIT, S.; PAKAWATCHAI, C.; SAITHONG, S.; BUATONG, J.; PREEDANON, S.; SAKAYAROJ, J. Anthraquinone derivatives from the mangrove-derived fungus *Phomopsis* sp. PSU-MA214. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 4, p. 738–742, 2012.

KUMAR, A.; PATIL, D.; RAJAMOHANAN, P.R.; AHMAD, A. Isolation, Purification and Characterization of Vinblastine and Vincristine from Endophytic Fungus *Fusarium oxysporum* Isolated from *Catharanthus roseus*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 2013.

KUMAR, D. S. S.; LAU, C.S.; WAN, J.M.F.; YANG, D.; HYDE, K.D. Immunomodulatory compounds from *Pestalotiopsis leucoth?*s, an endophytic fungus from *Tripterygium wilfordii*. **Life Sciences**, v. 78, n. 2, p. 147–156, 2005.

KUSARI, S.; LAMSHÖFT, M.; ZÜHLKE, S.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 2, p. 159–162, 2008.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. **Chemistry and Biology**, v. 19, n. 7, p. 792–798, 2012.

KUSARI, S.; PANDEY, S. P.; SPITELLER, M. Untapped mutualistic paradigms linking host plant and endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites. **Phytochemistry**, v. 91, p. 81–87, 2013.

LEDWITCH, K.; OGBURN, R.; COX, J.; GRAHAM, R.; FRITZSCHE, A.; GOSNELL, D.; Manning, T. Taxol : Efficacy Against Oral Squamous Cell Carcinoma. n. 2, p. 509–521, 2013.

LEE, J. H.; HWANGA, S.R.; LEE, Y.H.; KIMA, K.; CHOB, K.M.; LEE, Y.B. Changes occurring in compositions and antioxidant properties of healthy soybean seeds [*Glycine max* (L.) Merr.] and soybean seeds diseased by *Phomopsis longicolla* and *Cercospora kikuchii* fungal pathogens. **Food Chemistry**, v. 185, p. 205–211, 2015.

LIU, Y.; YANG, M.H.; WANG, X.B.; LI, T.X.; KONG, L.Y. Caryophyllene sesquiterpenoids from the endophytic fungus, *Pestalotiopsis* sp. **Fitoterapia**, v. 109, n. April 2014, p. 119–124, 2016.

LU, F. T.; MA, D.C.; YAN, W. ; GUO, J.; BAI, L.H. Antitumour activity of 3-nitropropionic acid from *Phomopsis* sp. and optimization of fermentation conditions. **Lett Appl Microbiol**, v. 61, n. 2, p. 165–170, 2015.

MALHADAS, C.; MALHEIRO, R.; PEREIRA, J.A.; PINHO, P.G.; BAPTISTA, P. Antimicrobial activity of endophytic fungi from olive tree leaves. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 0, 2017.

MARQUES, A. M.; KAPLAN, M. A. C. Active metabolites of the genus *Piper* against *Aedes aegypti* : natural alternative sources for dengue vector control. **Universitas Scientiarum**, v. 20, n. 1, p. 61–82, 2015.

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 1, p. 51–54, 2002.

Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. ISSN 2358-9450, Vol. 48, n. 11, 2017.

Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. ISSN 2358-9450, Vol. 48, n. 13, 2017.

MIYAZAWA, T.; YAMAMOTO, M.; MAEDA, Y. Microwave-Accelerated Selective

Acylation of (Hydroxyalkyl) phenols Using Acid Chlorides. **Synthetic Communications**, v. 39, n. 6, p. 1092–1099, 2009.

NAIR, D. N.; PADMAVATHY, S. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

NAKAYAMA, S.; UTO, Y.; TANIMOTO, K.; OKUNOA, Y.; SASAKI, Y.; NAGASAWA, H.; NAKATA, E. ARAI, K.; MOMOSEA, K.; FUJITA, T.; HASHIMOTO, T.; OKAMOTOD, Y.; ASAKAWAD, Y.; GOTO, S.; HORI, H. TX-2152: A conformationally rigid and electron-rich diyne analogue of FTY720 with in vivo antiangiogenic activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 16, p. 7705–7714, 2008.

NCBI, National Center For Biotechnology Information. *Phomopsis*. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=34399>. Acesso em: 05 nov. 2016.

NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, nineteenth informational supplement. Approved Standard M100-S19 National Committee for Clinical Standards. **Wayne, P.A**, January. 2009.

OLIVEIRA, C. M.; SILVA, G.H.; REGASINI, L.O.; FLAUSINO, O. JR.; LÓPEZ, S.N.; ABISSI, B.M.; BERLINCK, R.G.S.; SETTE, L.D.; BONUGLI-SANTOS, R.C.; RODRIGUES, A.; BOLZANI, V.S.; ARAUJO, A.R. Xylarenones C – E and an unprecedented dihydrofuran derivative from an endophytic fungus isolated from *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae). p. 1353–1357, 2011.

OMS (World Health Organization), Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides, 2005

OPLUSTIL. C. P.; ZOCCOLI, C. M.; TOBOOUTI, N. R.; SINTO, S. I. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. 2ª ed. rev. e ampl. São Paulo. **Sarvier**, 2004.

OUEDRAOGO, M.; RUIZ, M.; VARDELLE, E.; CARREYRE, H. ; COUSTARD, J.M.; POTREAU, D.; SAWADOGO, L.L.; COGNARD, C.; BECQ, F.; VANDEBROUCK, C.; BESCOND, J. From the vasodilator and hypotensive effects of an extract fraction from *Agelanthus dodoneifolius* (DC) Danser (Loranthaceae) to the active compound dodoneine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 345–352, 2011.

PARK, Y. H.; CHUNGB, J.Y.; AHNC, D.J.; KWONC, T.R.; LEE, S.K.; BAE, I.; YUNF, H.K.; BAE, H. Screening and characterization of endophytic fungi of *Panax ginseng* Meyer for biocontrol activity against ginseng pathogens. **Biological Control**, v. 91, p. 71–81, 2015.

PATERAKI, C. PATSALOU, M.; VLYSIDIS, A.; KOPSAHELIS, N.; WEBB, C.; KOUTINASA, A.A.; KOUTINAS, M. *Actinobacillus succinogenes*: Advances on succinic acid production and prospects for development of integrated biorefineries. **Biochemical Engineering Journal**, v. 112, p. 285–303, 2016.

PEYRAT, L.A.; EPARVIERA, V.; EYDOUX C.; GUILLEMOT, J.C.; LITAUDON, M.; STIEN, D. Betulinic acid, the first lupane-type triterpenoid isolated from both a *Phomopsis* sp. and its host plant *Diospyros carbonaria* Benoist. **Chemistry & Biodiversity**, p.

in press, 2016.

PINHEIRO, E. A. A.; PINA, J.R.S.; FEITOSA, A.O.; CARVALHO, J.M.; BORGES, F.C.; MARINHO, P.S.B.; MARINHO, A.M.R. Bioprospecting of antimicrobial activity of extracts of endophytic fungi from *Bauhinia guianensis*. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 49, n. 1, p. 3–6, 2017.

PORRAS-ALFARO, A.; BAYMAN, P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. **Phytopathology**, 49(1), 291, 2011

Portal Saúde, SUS. Dengue: Saúde registra aumento de casos e redução de mortes. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/dengue>. Acesso em 04 de maio 2017.

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

RUKACHAISIRIKUL, V.; SOMMART, U.; PHONGPAICHT, S.; SAKAYAROJ, J.; KIRTIKARA, K. Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. **Phytochemistry**, v. 69, n. 3, p. 783–787, 2008.

SADORN, K.; SAEPUA, S.; BOONYUEN, N.; LAKSANACHAROEN, P.; RACHTAWEE, P.; PRABPAI, S.; KONGSAEREE, P.; PITTAYAKHAJONWUT, P. Allahabadolactones A and B from the endophytic fungus, *Aspergillus allahabadii* BCC45335. **Tetrahedron**, v. 72, n. 4, p. 489–495, 2016.

SAMAGA, P. V.; RAI, V. R.; RAI, K. M. L. *Bionectria ochroleuca* NOTL33 - An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* producing antimicrobial and free radical scavenging metabolites. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 275–285, 2014.

SANTALACEAE, I. L.; DETTKE, G. A.; WAECHTER, J. L. Estudo taxonômico das ervas-de-passarinho da Região sul do Brasil : Apresenta-se aqui o estudo taxonômico de Loranthaceae e Santalaceae para a Região Sul do Brasil . Para. v. 65, n. 4, p. 939–953, 2014.

SDBS Web, Disponível em: <http://sdfs.db.aist.go.jp>, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology. Acesso em: 21 de junho e 2017

SEIDEL, G.; LAURICH, D.; FÜRSTNER, A. Iron-catalyzed cross-coupling reactions. A scalable synthesis of the immunosuppressive agent FTY720. **The Journal of organic chemistry**, v. 69, n. 11, p. 3950–3952, 2004.

SHEN, L.; LUO, Q.; SHEN, Z.P.; LI, L.Y.; ZHANG, X.J.; WEI, Z.Q.; FU, Y.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. A new cytochalasin from endophytic *Phomopsis* sp. IFB-E060. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 12, n. 7, p. 512–516, 2014.

Sigma-Aldrich. A Part of Merck. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n5636?lang=pt®ion=BR>. Acesso em: 20 de nov. de 2016.

SILVA, F. N. DOS S.; CONCEIÇÃO, G. M.; ALMEIDA, D. B. DE. Ocorrência Da Família Loranthaceae No Município De Caxias , Maranhão , Brasil. **Cadernos de geociências**, v. 7, n. 2, p. 131–135, 2010.

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

SOUSA, J. P. B.; Aguilar-Pérez, M.M.; Arnold, A.E.; Rios, N.; Coley5, P.D.; Kursar, A.; Cubilla-Rios, L. Chemical constituents and their antibacterial activity from the tropical endophytic fungus *Diaporthe* sp. F2934. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 6, p. 1501–1508, 2016.

SPECIAN, V.; ORLANDELLI, R.C.; FELBER, A.C.; AZEVEDO, J.L.; PAMPHILE, J.A. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos Secondary Metabolites Produced by Endophytic Fungi of Pharmaceutical Interest. **Biologia**, n. 345, p. 345–352, 2014.

STANIEK, A.; WOERDENBAG, H. J.; KAYSER, O. *Taxomyces andreanae*: A presumed paclitaxel producer demystified? **Planta Medica**, v. 75, n. 15, p. 1561–1566, 2009.

SUAZA-GAVIRIA, V.; PABÓN-MORA, N.; GONZÁLEZ, F. Development and morphology of flowers in Lorantheae. **International Journal of Plant Sciences**, v. 177, n. 7, p. 559–578, 2016.

SUN, C.; BITTMAN, R. A Photoreactive Analogue of the Immunosuppressant FTY720 An azido group was incorporated into the immunomodulatory agent FTY720 , accomplishing the first synthesis of a key steps are formation of a primary amine at a quaternary center of aniline derivativ. n. 3, p. 2200–2202, 2006.

TAKEUCHI, O.; HOSHINO, K.; AKIRA, S. Cutting Edge: TLR2-Deficient and MyD88-Deficient Mice Are Highly Susceptible to *Staphylococcus aureus* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 10, p. 5392–5396, 2000.

TAN, Q.; YAN, X.; LIN, X.; HUANG, Y.; ZHENG, Z.; SONG, S.; LU, C.; SHEN, Y. Chemical constituents of the endophytic fungal strain *Phomopsis* sp. NXZ-05 of *Camptotheca acuminata*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 90, n. 9, p. 1811–1817, 2007.

TANG, J. W.; WANG, W.G.; LI, A.; YAN, B.C.; CHEN, R.; LI, X.N.; DU, X.; SUN, H.D.; PU, J.X. Polyketides from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. sh917 by using the one strain/many compounds strategy. **Tetrahedron**, 2016.

TASSET, I. AGÜERA, E.; CAMACHO, R.O.; ESCRIBANO, B.; LÓPEZ, F.S.; DELGADO, M.J.; CRUZ, A.H.; GASCÓN, F.; LUQUE, E.; PEÑA, J.; JIMENA, I.M.; TÚNEZ, I. Melatonin improves 3-nitropropionic acid induced behavioral alterations and neurotrophic factors levels. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 8, p. 1944–1949, 2011.

TIAN, J.; LIU, X.C.; LIU, Z.L.; LAIA, D.; ZHOU, L. Larvicidal spirobisanthralenes from the endophytic fungus *Berkleasium* sp. against *Aedes albopictus*. **Pest Management Science**, v. 72, n. 5, p. 961–965, 2016.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. [s.l: s.n.].

TROPICOS.ORG. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/100355638>. Acesso em: 07 nov. 2016.

VASCONCELOS, P. F. D. C. Emergência do vírus Chikungunya: risco de introdução no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 9–10, 2014.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V.; BARREIRO, E. J. OS produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E.J. Produtos naturais como candidatos a farmacos uteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 655–660, 2004

VIEIRA, O. M. C.; SANTOS, M.H. ; SILVA, G.A.; SIQUEIRA, A.M. Atividade antimicrobiana de *Struthanthus vulgaris* (erva-de-passarinho). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 149–154, 2005.

XING, Y. M.; CHEN, J.; CUI, J.L.; CHEN, X.M.; GUO, S.X. Antimicrobial activity and biodiversity of endophytic fungi in *Dendrobium devonianum* and *Dendrobium thyrsiflorum* from Vietman. **Current Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1218–1224, 2011.

YOKOZAWA, T.; CHEN, C.P.; DONG, E.; TANAKA, T.; NONAKA, G.I.; NISHIOKA, I. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, n. 2, p. 213–222, 1998.

ZANARDI, L.M.; BOLZANI, V.S.; CAVALHEIRO, A.J.; SILVA, D.H. S.; TREVISAN, H.C. ; ARAUJO, A.R. Sesquiterpenos produzidos pelo fungo endofítico *phomopsis cassiae* com atividade antifúngica e inibidora de acetilcolinesterase. **Química Nova**, Vol. 35, No. 11, 2233–2236, 2012.

ZHANG, D.; TAO, X.; LIU, J.; CHENA, R.; ZHANG, M.; LI, L.; FANG, X.; YUB, L.Y.; DAI, J. Periconiasin G, a new cytochalasan with unprecedented 7/6/5 tricyclic ring system from the endophytic fungus *Periconia* sp. **Tetrahedron Letters**, v. 57, n. 7, p. 796–799, 2016.

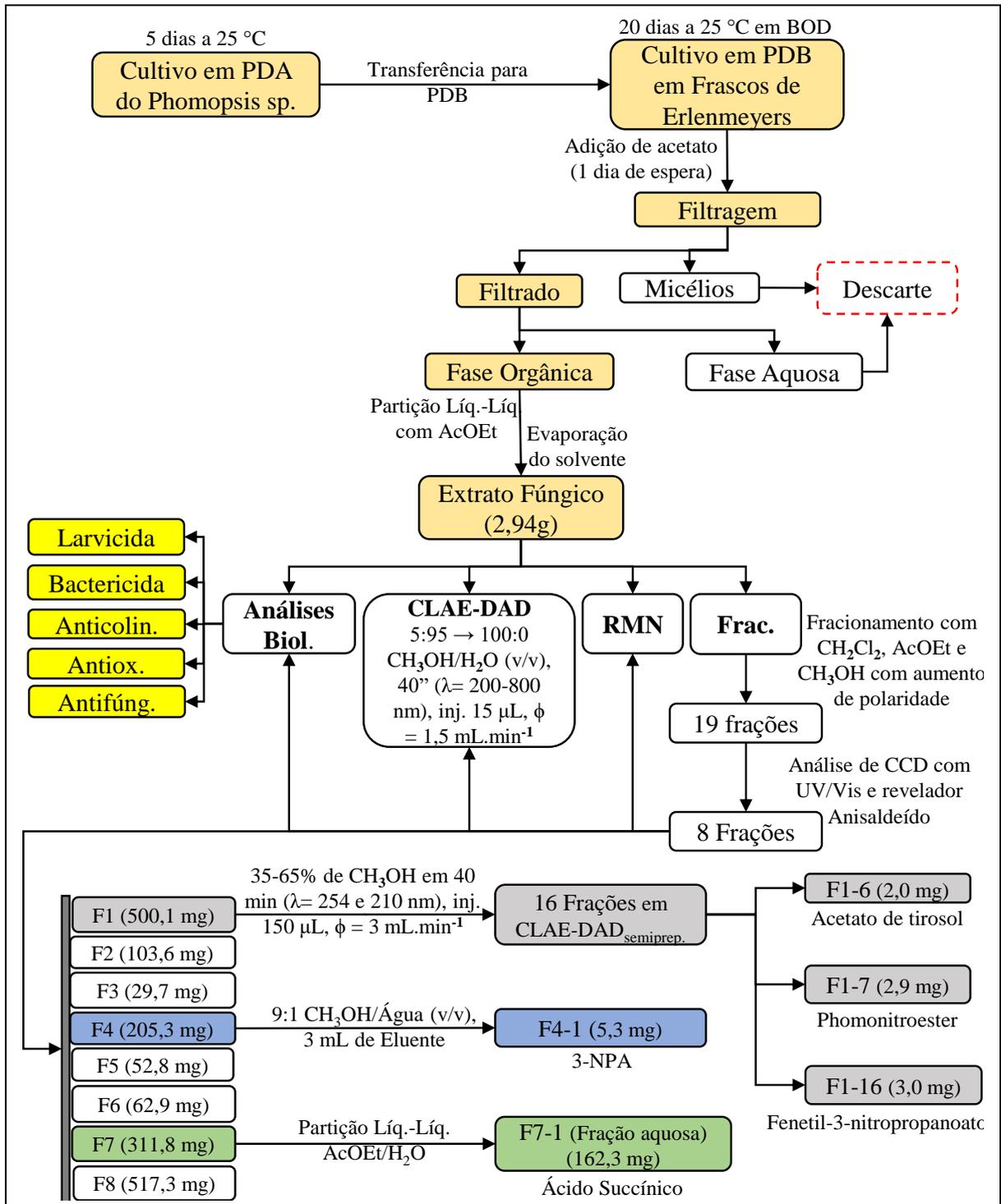
ZHANG, R.J.; ZHONG, J.; SHANG, H.H.; PAN, X.T.; ZHU, H.J.; GAO, B.D. The complete nucleotide sequence and genomic organization of a novel victorivirus with two non-overlapping ORFs , identified in the plant-pathogenic fungus *Phomopsis vexans*. **Archives of Virology**, p. 1805–1809, 2015.

ZHAO, S.; CHENA, S.; WANG, B.; NIUA, S.; WUC, W.; GUOA, L.; CHE, Y. Four new tetramic acid and one new furanone derivatives from the plant endophytic fungus *Neopestalotiopsis* sp. **Fitoterapia**, v. 103, p. 106–112, 2015.

ZOUACHE, K.; RAHARIMALALA, F.N.; RAQUIN, V.; TRAN-VAN, V.; RAVELOSON, L.H.R.; RAVELONANDRO, P.; MAVINGUI, P. Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 75, n. 3, p. 377–389, 2011.

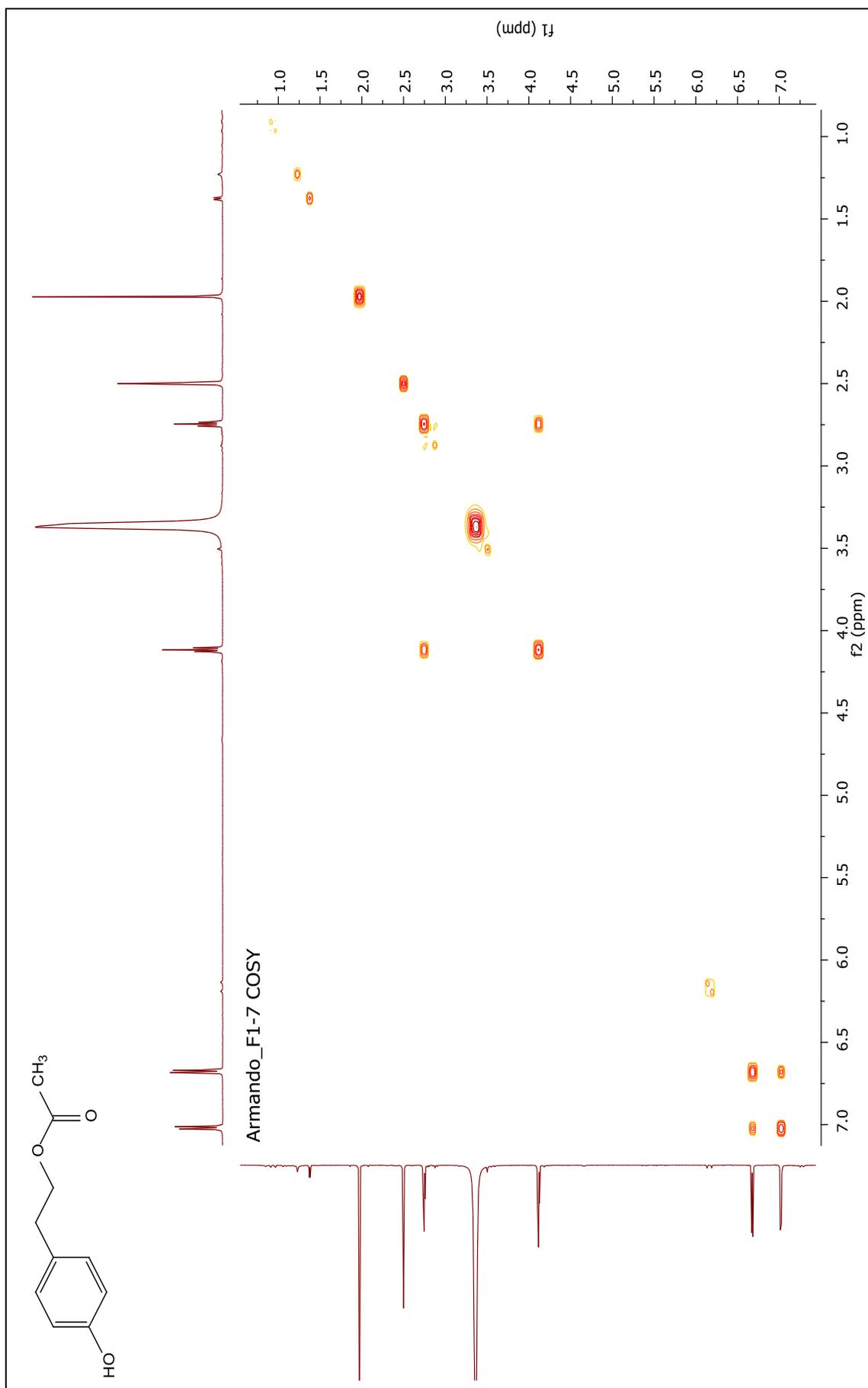
APÊNDICE

Apêndice 1 – Fluxograma da metodologia empregada nesse trabalho e resultados químicos.



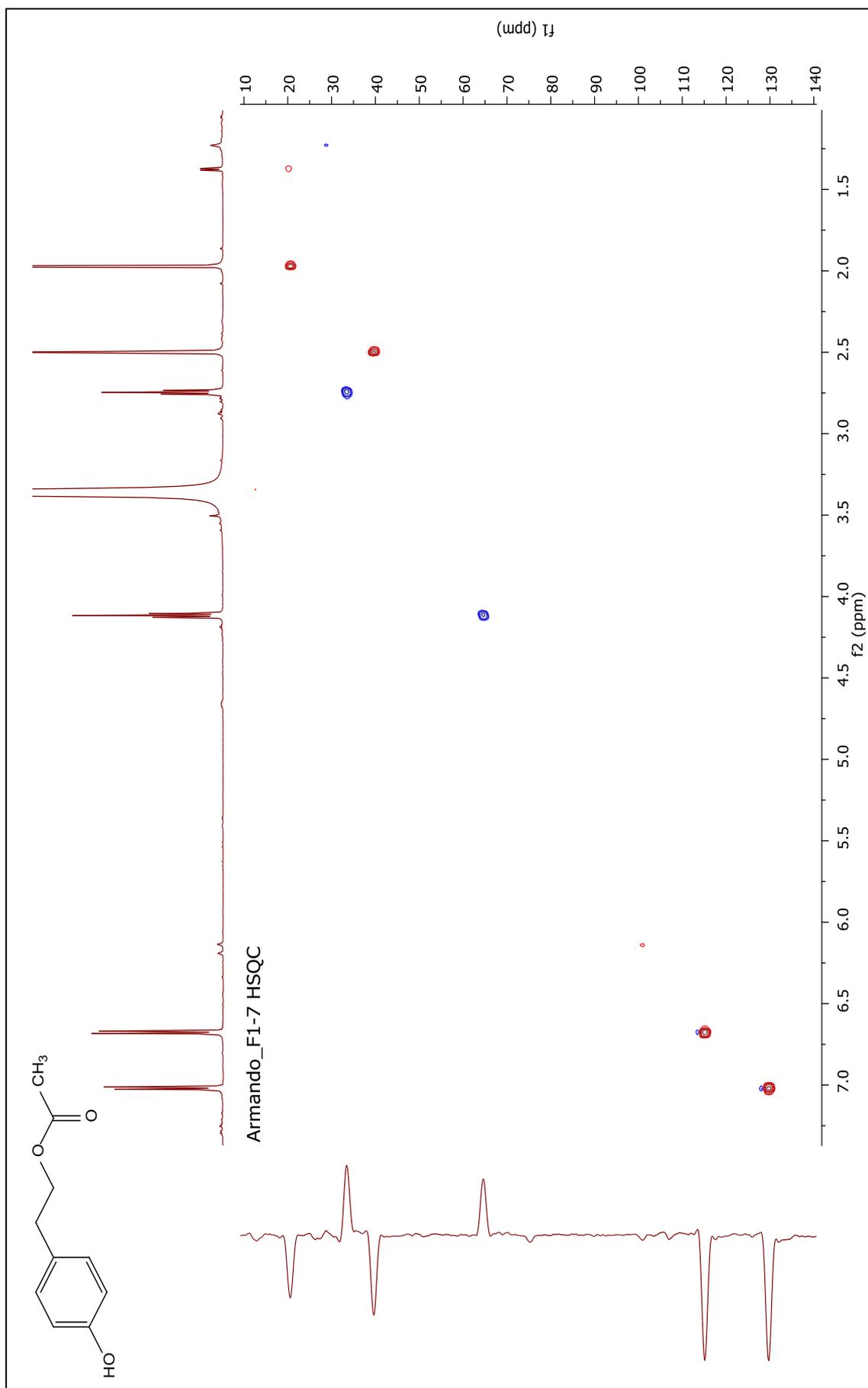
Fonte: Fluxograma elaborado pelo autor (2017)

Apêndice 3 – Experimento COSY em RMN da subfração F1-7 utilizando como referência o solvente deuterado DMSO-d₆, 600 MHz.



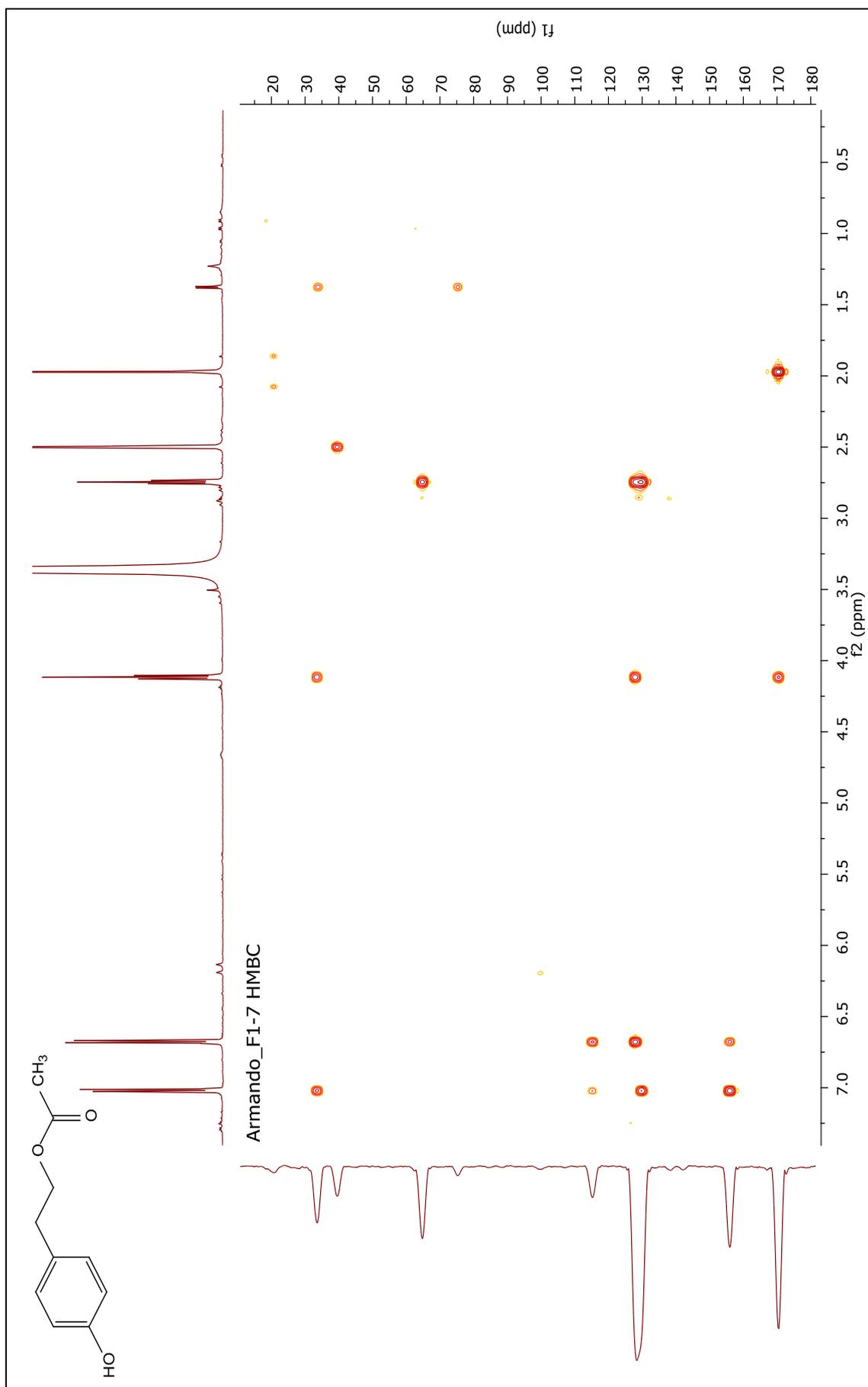
Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017).

Apêndice 4 – Experimento HSQC em RMN da subfração F1-7 utilizando como referência o solvente deuterado DMSO-d₆, 600 MHz.



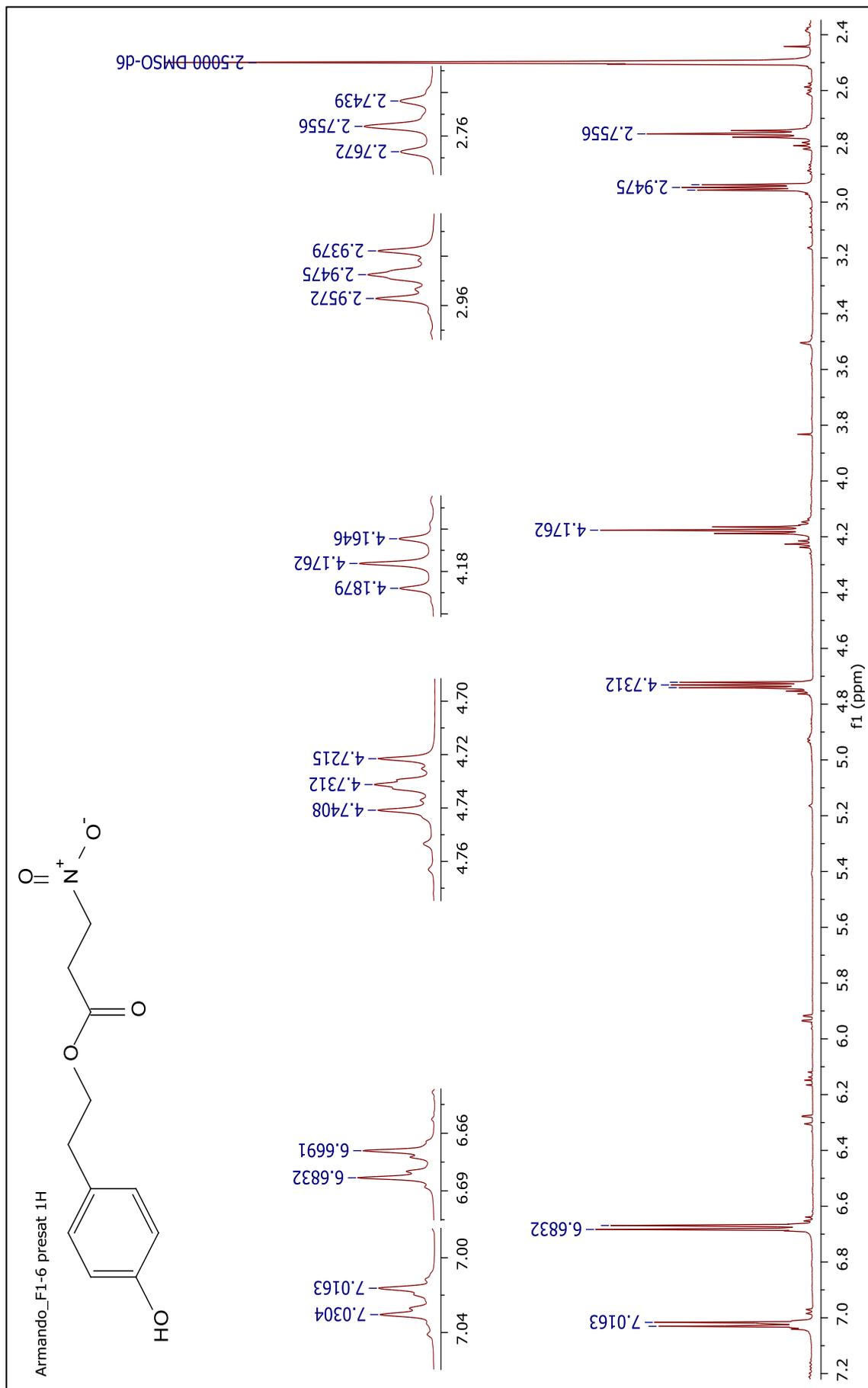
Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017)

Apêndice 5 – Experimento HMBC em RMN da subfração F1-7 utilizando como referência o solvente deuterado DMSO-d₆, 600 MHz.



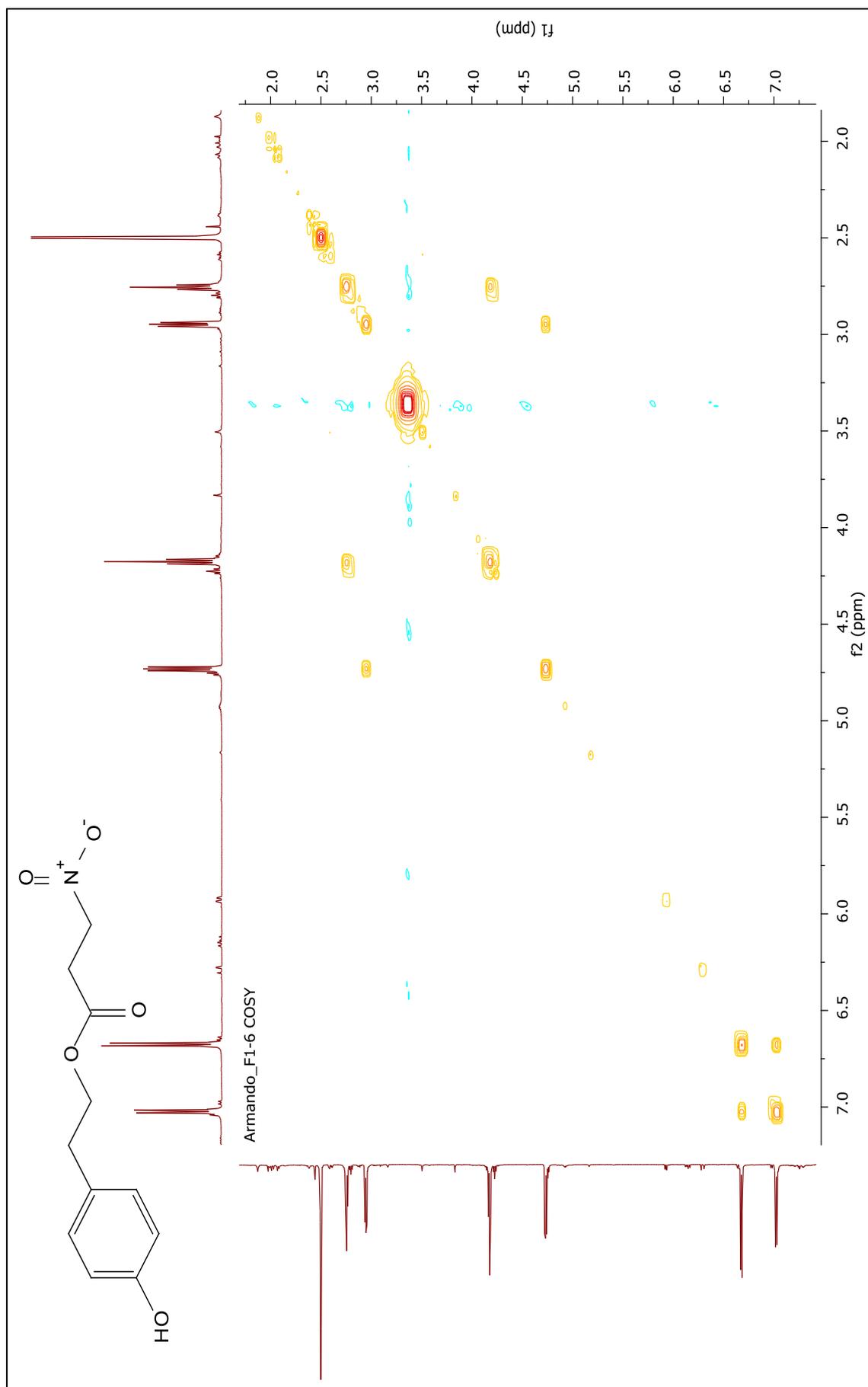
Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017)

Apêndice 6 – Espectro de RMN-¹H da subfração F1-6 utilizando como referência o solvente deuterado DMSO-d₆, 600 MHz.



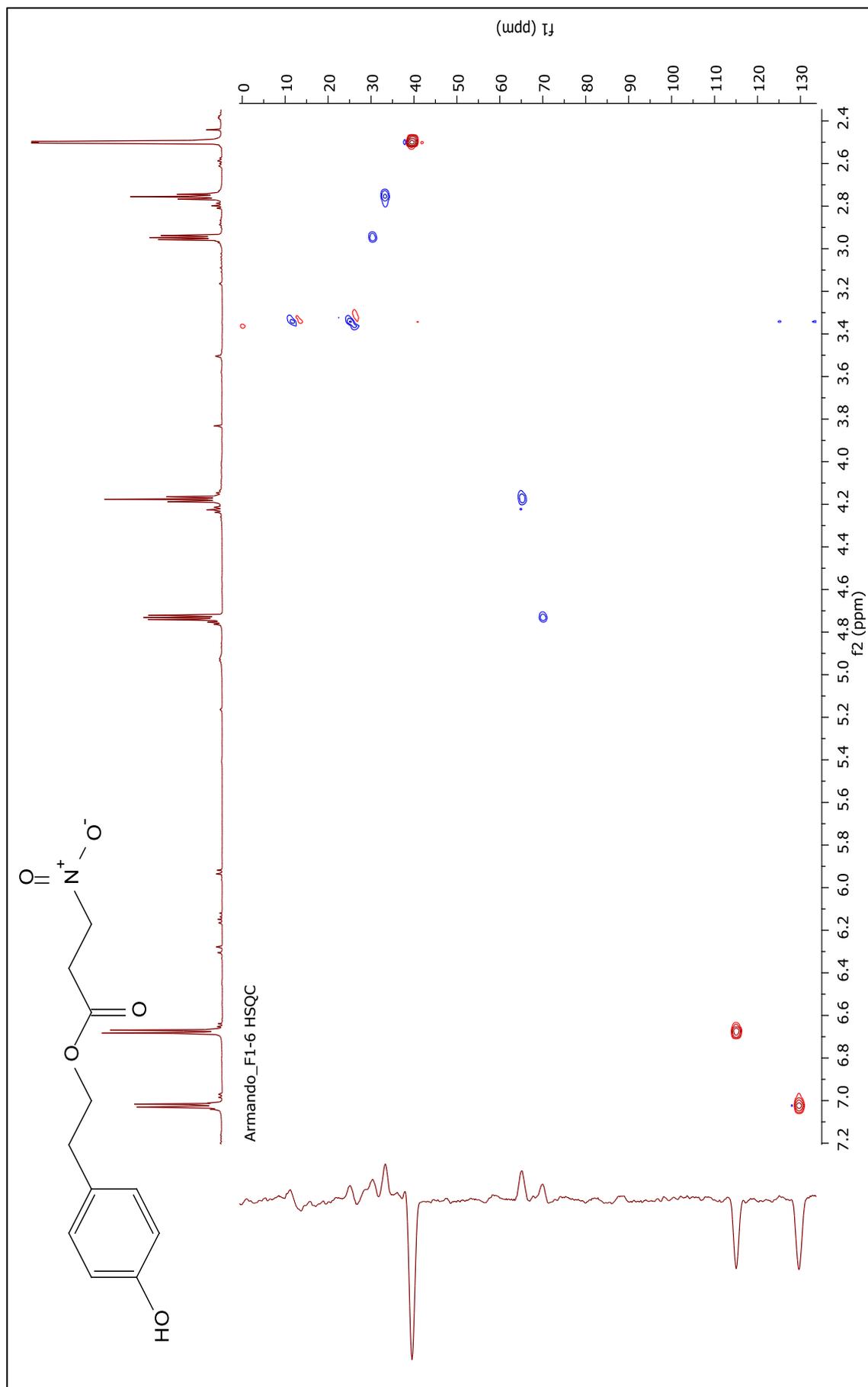
Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017)

Apêndice 7 – Experimento COSY em RMN da subfração F1-6 utilizando como referência o solvente deuterado DMSO-d₆, 600 MHz.



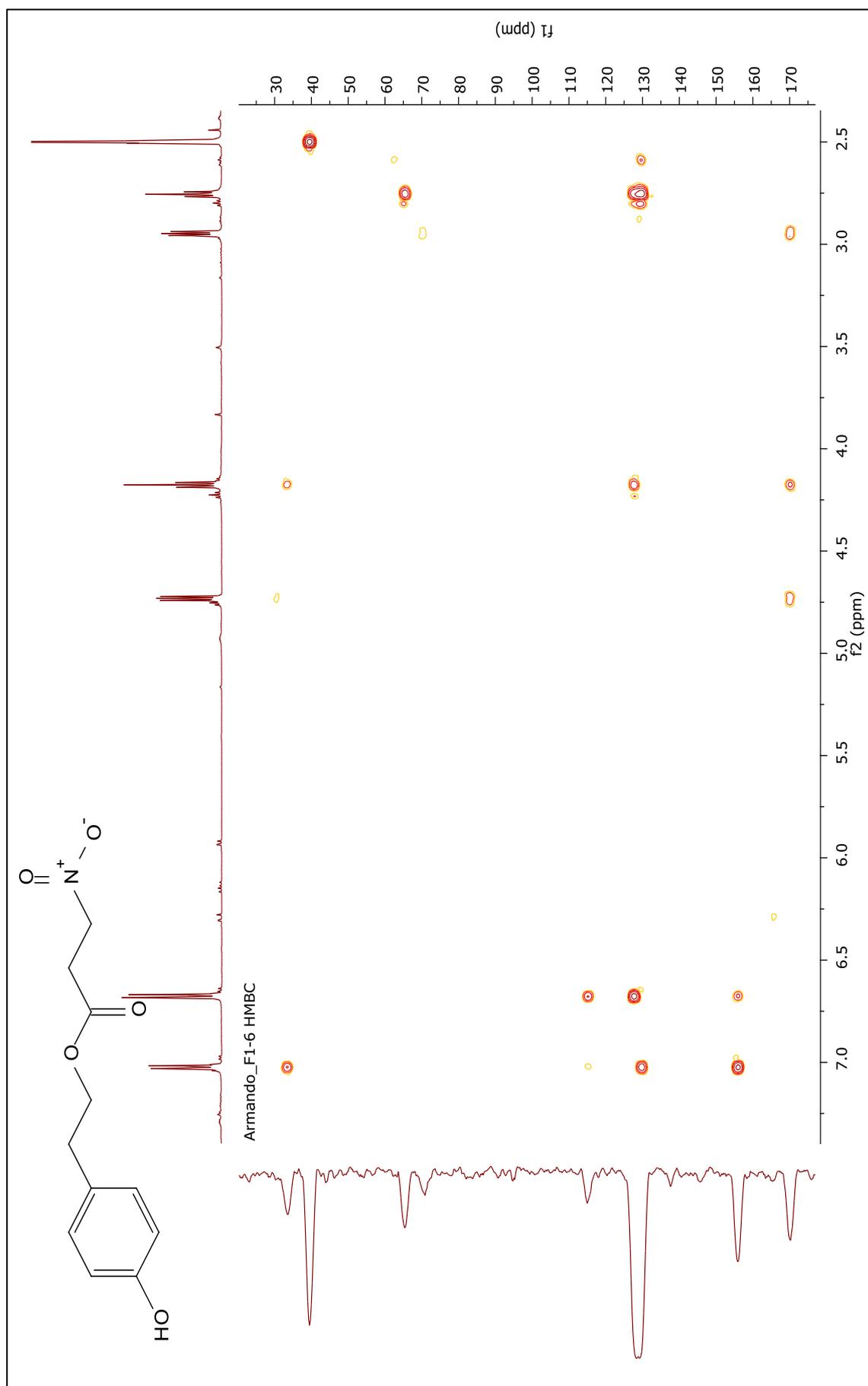
Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017)

Apêndice 8 – Experimento HSQC em RMN da subfração F1-6 utilizando como referência o solvente deuterado DMSO-d₆, 600 MHz.



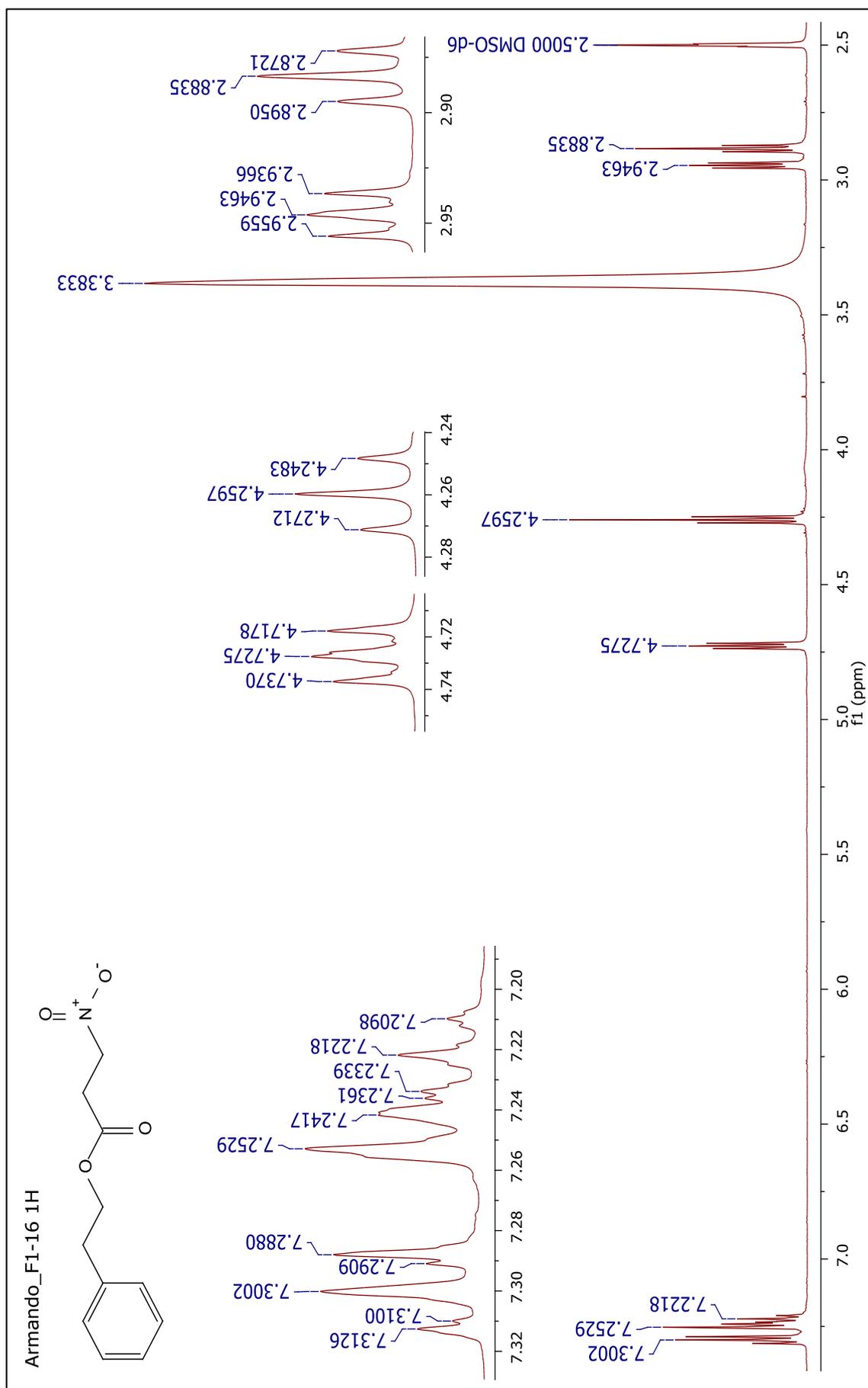
Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017).

Apêndice 9 – Experimento HMBC em RMN da subfração F1-6 utilizando como referência o solvente deuterado DMSO-d₆, 600 MHz.



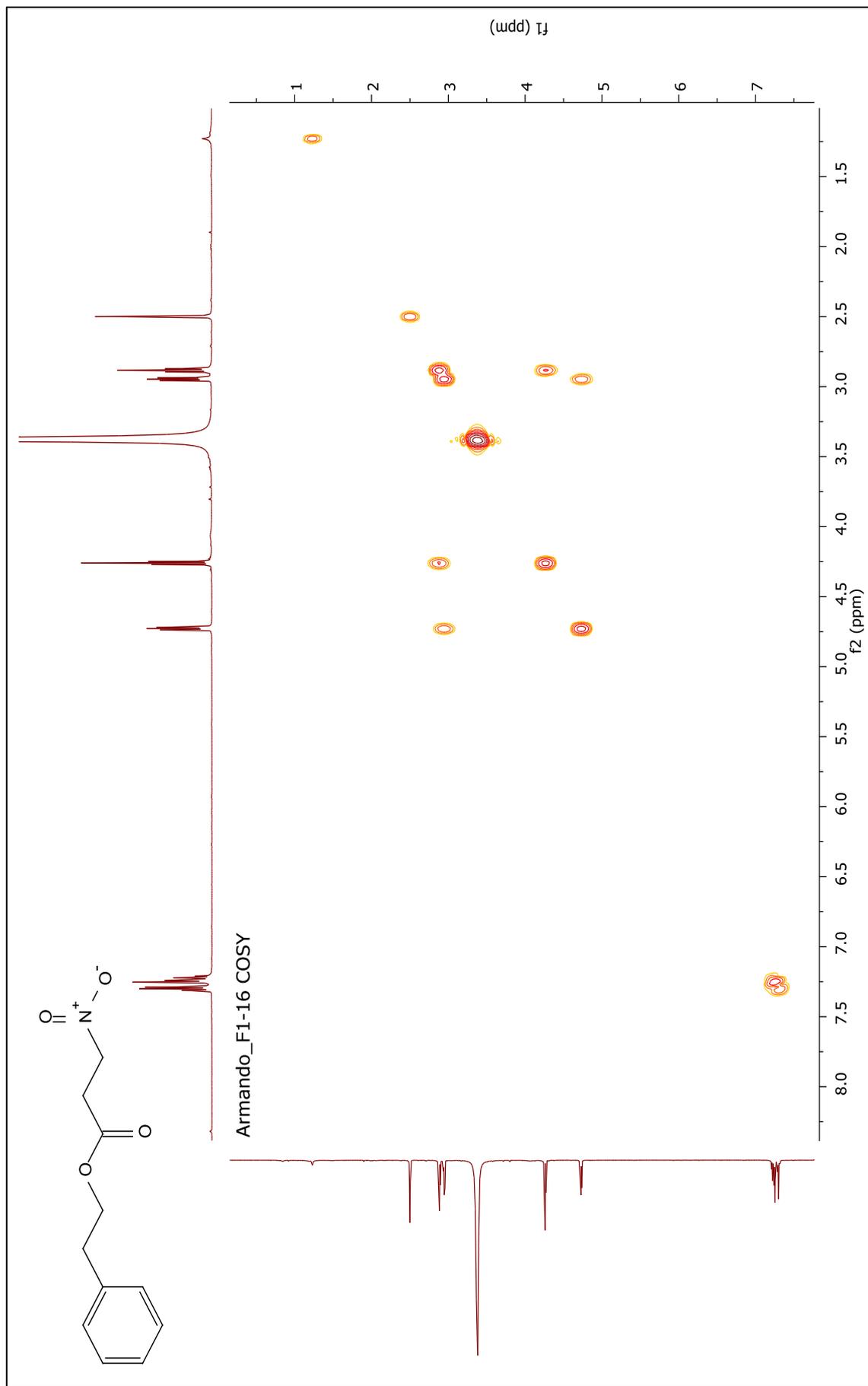
Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017).

Apêndice 10 – Espectro de RMN-¹H da subfração F1-16 utilizando como referência o solvente deuterado DMSO-d₆, 600 MHz.



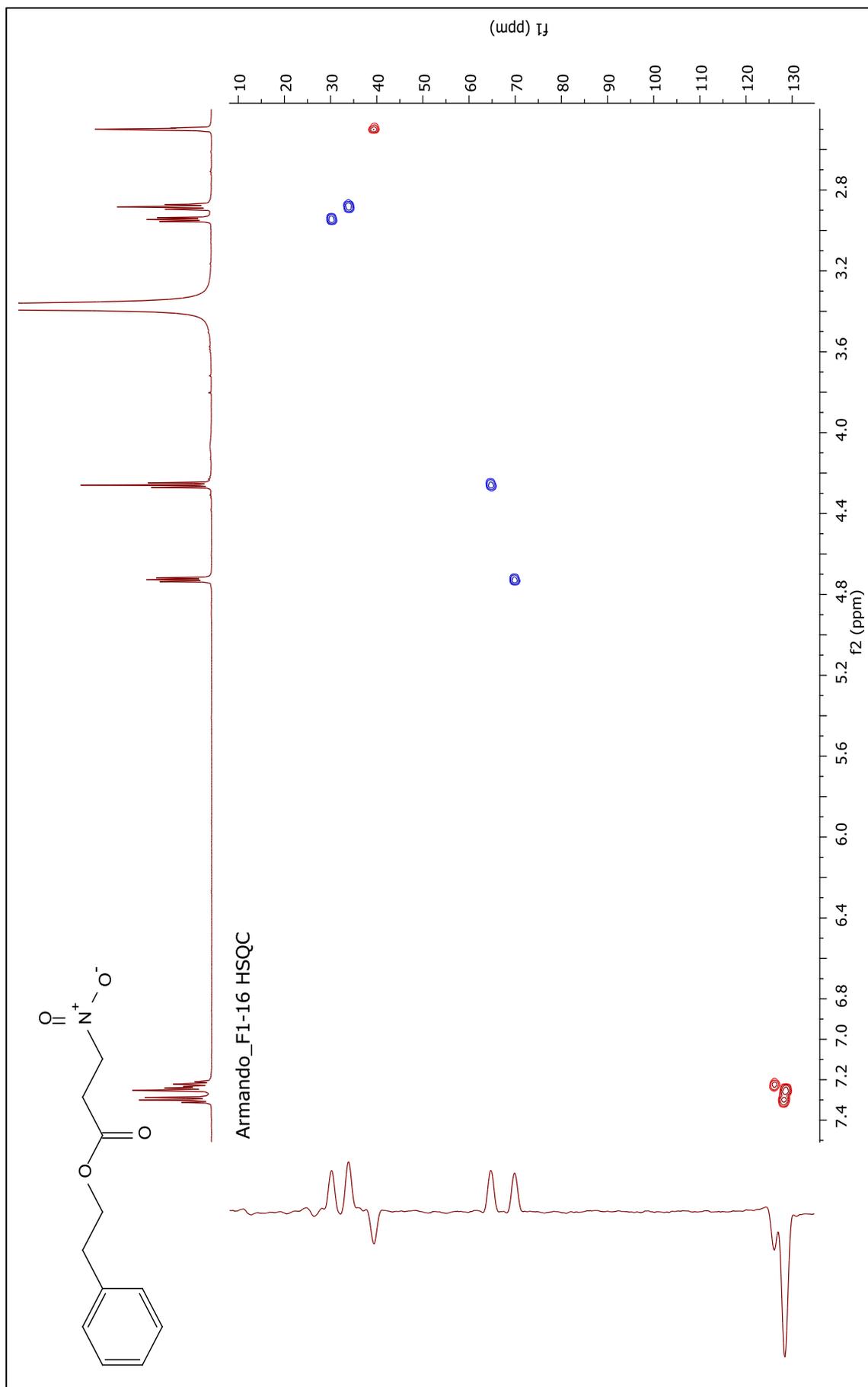
Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017).

Apêndice 11 – Experimento COSY em RMN da subfração F1-16 utilizando como referência o solvente deuterado DMSO-d₆, 600 MHz.

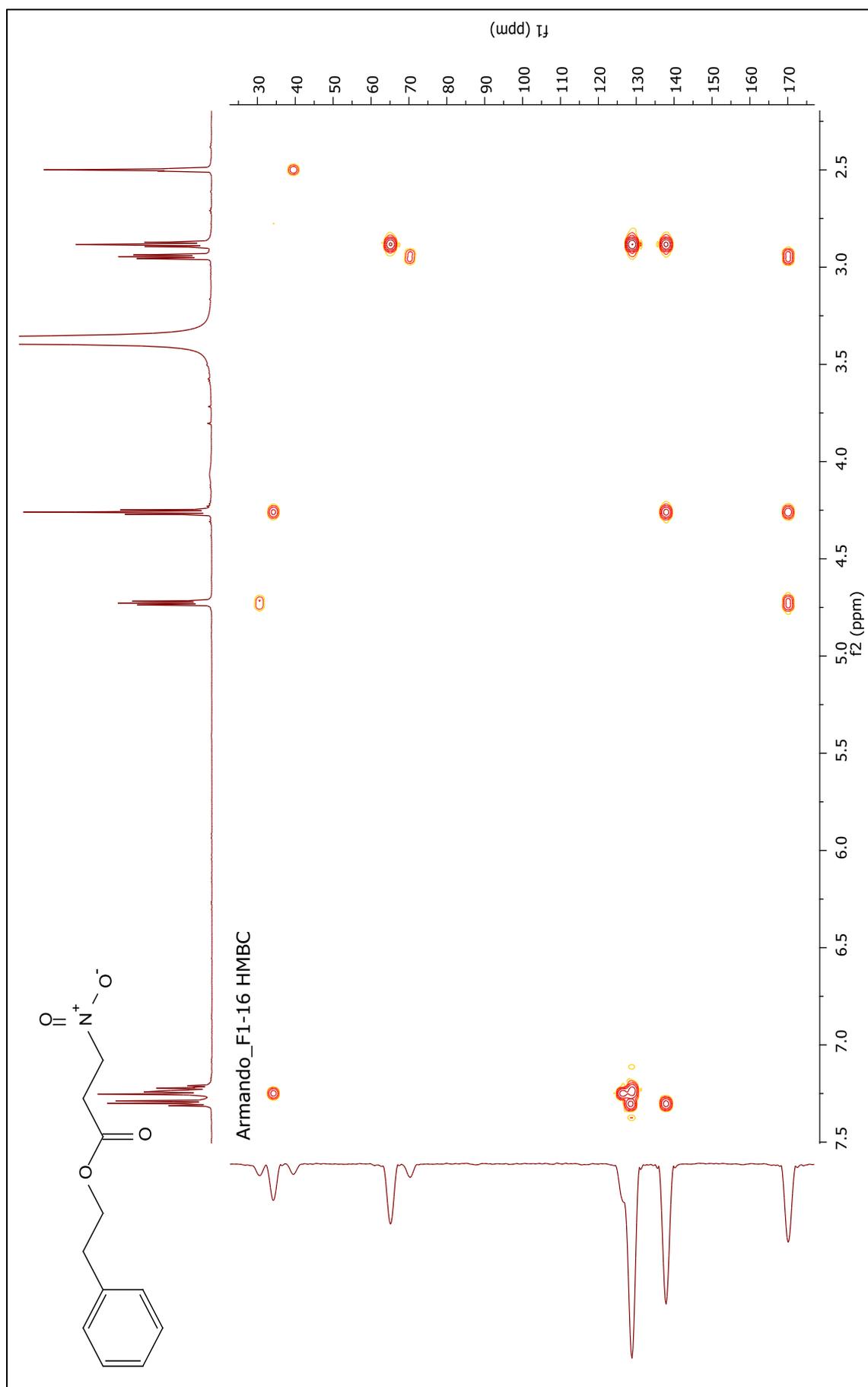


Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017).

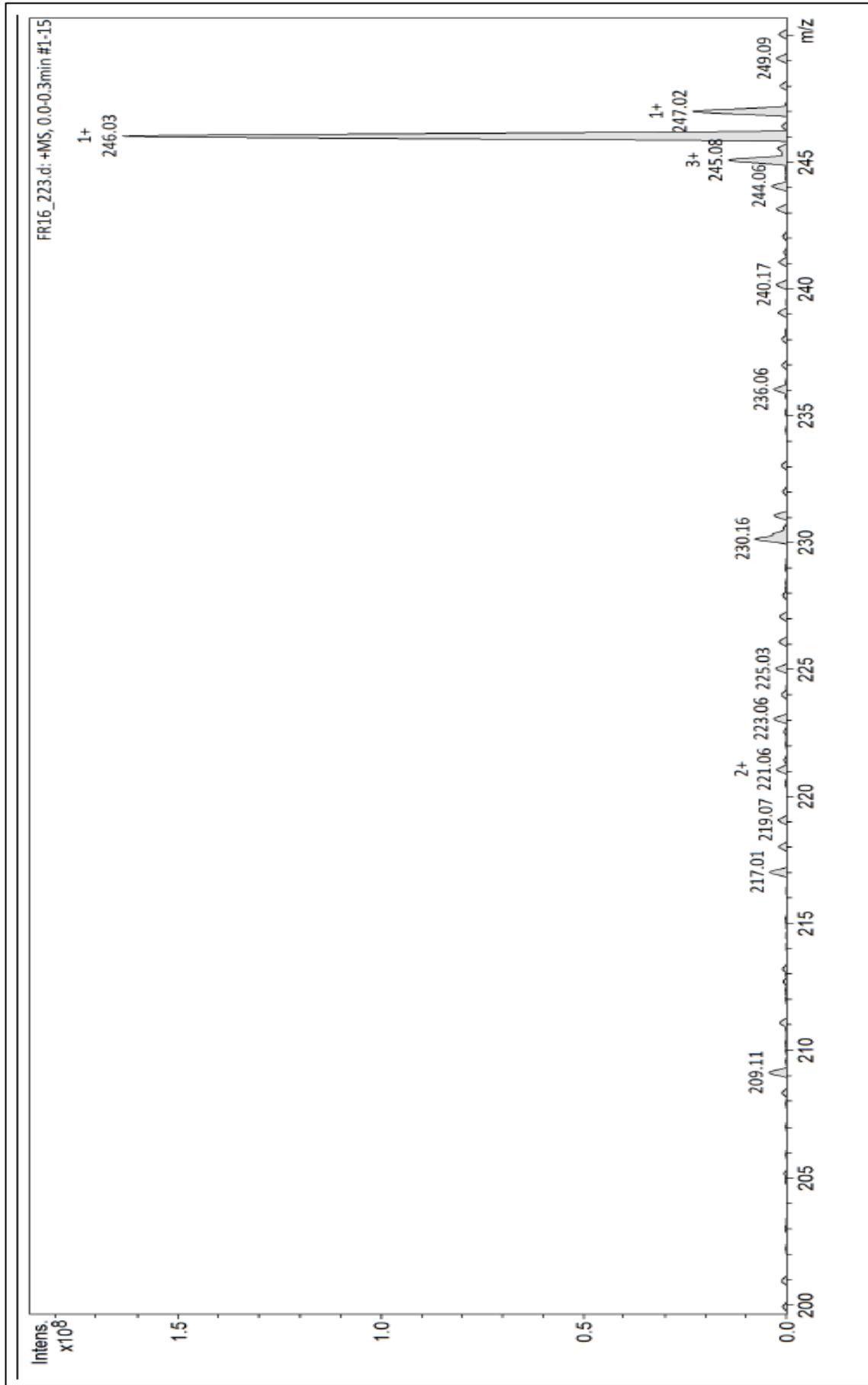
Apêndice 12 – Experimento HSQC em RMN da subfração F1-16 utilizando como referência o solvente deuterado DMSO-d₆, 600 MHz.



Apêndice 13 – Experimento HMBC em RMN da subfração F1-16 utilizando como referência o solvente deuterado DMSO-d6, 600 MHz.



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017).

Apêndice 14 – Espectro de Massas de alta resolução, no modo positivo da subfração F1-16.

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2017).