



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS
DO FUNGO *Actinomucor elegans* AcCC18.1A ENDOFÍTICO DE
Rhizophora mangle L. (Rhizophoraceae)**

KATHIA RAQUEL MURILLO PADILLA

*Bolsista CAPES

BELÉM – PA
2024

KATHIA RAQUEL MURILLO PADILLA

**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS
DO FUNGO *Actinomucor elegans* AcCC18.1A ENDOFÍTICO DE
Rhizophora mangle L. (Rhizophoraceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química do Instituto de Ciências Exatas e Naturais da Universidade Federal do Pará como parte do requisito para obtenção do título de mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Andrey Moacir do Rosario Marinho

BELÉM – PA
2024

KATHIA RAQUEL MURILLO PADILLA

**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS
DO FUNGO *Actinomucor elegans* AcCC18.1 A ENDOFÍTICO DE
Rhizophora mangle L. (Rhizophoraceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química do Instituto de Ciências Exatas e Naturais da Universidade Federal do Pará c como parte do requisito para obtenção do título de mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Andrey Moacir do Rosario Marinho

Data de aprovação:26/02/2024.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Andrey Moacir do Rosario Marinho (Presidente - UFPA)



Profa. Dra. Gisele da Costa Ramos (IFPA)



Profa. Dra. Luana Cardoso de Oliveira (UNIFESSPA)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M977e Murillo Padilla, Kathia Raquel.
ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS
EXTRATOS DO FUNGO *Actinomucor elegans* AcCC18.1A
ENDOFÍTICO DE *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae) /
Kathia Raquel Murillo Padilla. — 2024.
164 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Andrey Moacir do Rosario Marinho
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Programa de Pós-
Graduação em Química, Belém, 2024.

1. *Actinomucor elegans*. 2. Amazônia. 3. Substâncias
isoladas. 4. *Rhizophora mangle* L. 5. Atividade biológica.. I.
Título.

CDD 547

Dedico este trabalho aos meus pais, Yolany Padilla e Napoleón Murillo, e ao meu irmão José Murillo, pelo apoio incondicional durante este período longe do meu país. Vocês são sempre a minha eterna fonte de inspiração, iluminando o meu caminho com amor e sabedoria.

‘Los amo con todo mi corazón’

AGRADECIMIENTOS

Agradeço profundamente a Deus por ser minha fonte inesgotável de fortaleza e sabedoria, guiando meus passos ao longo desta jornada acadêmica.

Aos meus queridos pais, Napoleón Murillo e Yolany Padilla, pelo constante apoio em minhas decisões e por exemplificarem o verdadeiro significado de disciplina, esforço, trabalho e, especialmente, pelo amor incondicional, mesmo à distância.

Ao meu irmão José Murillo, agradeço por ser meu exemplo a seguir, especialmente nos estudos.

Ao meu orientador, prof. Dr. Andrey Marinho, expresso minha sincera gratidão por acreditar em mim, pela paciência e pelos valiosos ensinamentos ao longo deste período. Tenho profunda admiração pelo seu profissionalismo, ética e, acima de tudo, sua qualidade humana.

A Prof.^a Dra. Patrícia Marinho por seus importantes ensinamentos e, especialmente, por sua colaboração neste trabalho, o qual não poderia ter sido realizado sem sua contribuição.

Prof. Dr. Heriberto Bitencourt, que me acolheu em seu laboratório e prestou auxílio em todo o processo de obtenção das derivações estruturais deste trabalho.

Ao meu amigo, Edson Siqueira, que foi uma parte essencial neste trabalho, me orientou e ajudou diretamente em todas as etapas. Sua amizade tornou-se inestimável ao longo deste tempo de convivência.

À minha amiga Rayanne Vieira, com quem iniciei este trabalho, que se tornou um anjo neste caminho que percorremos juntas. Agradeço pela paciência em me compreender, mesmo sem falar a mesma língua. E também por todos os momentos de confraternização que compartilhamos.

Aos meus queridos amigos do LaBQuiM, Joselina Carvalho, Viviane Garcia e Diego Maciel, que foram fundamentais para a elaboração deste trabalho, ajudando com as dúvidas, treinamentos e dicas que surgiam, tornando-se pessoas muito valiosas. Além dos momentos inesquecíveis de convivência e parcerias.

Aos meus amigos Tesla Gutierrez, Emmanuel Paz e Yarineldi Valencia, que se tornaram uma família multicultural para mim, agradeço pelo carinho e apoio nos momentos difíceis e pelas boas experiências compartilhadas.

Ao programa de pós-graduação de química da UFPA por permitir a realização do meu mestrado.

A OEA-PAC e Capes pelo apoio financeiro.

"Nossa maior fraqueza está em **desistir**. A maneira mais certa de ter sucesso é sempre tentar mais uma vez."

Thomas Edison

RESUMO

O estudo de fontes naturais pouco exploradas, especialmente na região amazônica, tem adquirido relevância nos últimos anos. Considerando a Amazônia como a maior floresta do mundo, é notável que muitas espécies ainda permaneçam por descobrir. Nesse contexto, a pesquisa sobre os metabólitos secundários de fungos endofíticos tem despertado crescente interesse na comunidade científica, impulsionada pelo potencial que esses microrganismos apresentam na área da saúde. Os microrganismos têm sido uma fonte rica de metabólitos bioativos com várias aplicações, como agroquímicos, antibióticos, imunossuppressores, antiparasitários e agentes anticâncer. O objetivo deste estudo foi contribuir para a investigação de fungos endófitos em plantas de mangue da Amazônia brasileira através do isolamento identificação de compostos com atividades antimicrobianas, alelopáticas e anticancerígenas do do fungo *Actinomucor elegans* AcCC181.A o qual foi isolado como endófito da planta *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae). Através de técnicas de cromatografia, foram isolados os compostos fenólicos tirosol (S-1), ácido 4-hidroxifenilacético (S-2), 4-formilfenil 2-phenylacetate (S-3) e ácido fenilacético (S-4). A partir do tirosol, foram obtidas as substâncias 4-(2-acetoxietil)-fenilacetato (S-5), 4-(2-(butiriloxy)etil)-fenilbutirato (S-6) e 4-(2-(benzoiloxy)etil) fenilbenzoato (S-7) por meio de derivatização estrutural. As substâncias tiveram suas estruturas elucidadas por meio da utilização de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e de Espectrometria de Massas (EM). As substâncias e o extrato bruto foram testados frente às bactérias *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *S. typhimurium*, *S. aureus* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, apresentando resultados de atividade antimicrobiana. Também foram realizados ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular das substâncias isoladas S-1, S-2 e S-3. Todas as substâncias testadas demonstraram possuir atividade citotóxica potencial sobre linhagens de câncer gástrico. Além disso, foi avaliado o potencial alelopático do extrato bruto, o qual apresentou atividade com as sementes de alface. É importante notar que os compostos S-6, S-3 e S-7 estão sendo testados pela primeira vez em ensaios antimicrobianos. Além disso, é relevante ressaltar que este estudo representa o primeiro relato de ensaios antimicrobianos realizados com as substâncias isoladas neste trabalho frente às bactérias *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*.

Palavras chaves: Amazônia; fungo *Actinomucor elegans*; *Rhizophora mangle* L.; Substâncias isoladas; Atividade biológica.

SUMMARY

The study of underexplored natural sources, especially in the Amazon region, has gained significance in recent years. Considering the Amazon as the largest forest in the world, it is notable that many species still remain undiscovered. In this context, research on secondary metabolites of endophytic fungi has sparked growing interest in the scientific community, driven by the potential these microorganisms hold in the field of health. Microorganisms have been a rich source of bioactive metabolites with various applications such as agrochemicals, antibiotics, immunosuppressants, antiparasitic, and anticancer agents. The aim of this study was to contribute to the investigation of endophytic fungi in mangrove plants of the Brazilian Amazon through the isolation and identification of compounds with antimicrobial, allelopathic, and anticancer activities from the fungus *Actinomucor elegans* AcCC181A, which was isolated as an endophyte from the plant *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae). Using chromatography techniques, the phenolic compounds tyrosol (S-1), 4-hydroxyphenylacetic acid (S-2), 4-formylphenyl 2-phenylacetate (S-3), and phenylacetic acid (S-4) were isolated. From tyrosol, the substances 4-(2-acetoxyethyl)-phenylacetate (S-5), 4-(2-(butyryloxy)ethyl)-phenylbutyrate (S-6), and 4-(2-(benzoyloxy)ethyl)phenylbenzoate (S-7) were obtained through structural derivatization. The structures of the substances were elucidated using Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Mass Spectrometry (MS) techniques. The substances and crude extract were tested against the bacteria *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, and *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, showing antimicrobial activity results. Cytotoxicity and cell viability assays of the isolated substances S-1, S-2, and S-3 were also performed. All tested substances demonstrated potential cytotoxic activity on gastric cancer cell lines. Additionally, the allelopathic potential of the crude extract was evaluated, showing activity with lettuce seeds. It is important to note that compounds S-6, S-3, and S-7 are being tested for the first time in antimicrobial assays. Furthermore, it is relevant to emphasize that this study represents the first report of antimicrobial assays conducted with the substances isolated in this work against the bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*.

Keywords: Amazon; fungus *Actinomucor elegans*; *Rhizophora mangle* L.; Isolated substances; Biological activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Lactona de <i>Pestalotiopsis</i> spp. PSU-MA92 e PSU-MA119	32
Figura 2- Cromona de <i>Pestalotiopsis</i> sp.....	32
Figura 3- Substâncias obtidas de <i>Pestalotiopsis</i> spp.	33
Figura 4- Antibióticos descobertos de produtos naturais microbiano	35
Figura 5- Fotografia microscópica de <i>Bacillus subtilis</i>	37
Figura 6- Imagem é uma micrografia óptica de bactérias <i>Escherichia coli</i>	38
Figura 7- Fotografia de <i>Salmonella typhimurium</i>	39
Figura 8- <i>Staphylococcus aureus</i> em uma célula epitelial.....	40
Figura 9- Mancha bacteriana, doença do maracujá (<i>Passiflora edulis</i>).....	41
Figura 10- Estrutura molecular da camptotecina	44
Figura 11- Fracionamento de substância por CCVU.....	47
Figura 12- Cromatoplaça das frações	47
Figura 13- fungo <i>Actinomucor elegans</i> AcCC18.1A em placa de Petri contendo meio BDA após 14 dias de incubação (A) frente, (B) verso.....	49
Figura 14- Crescimento das colônias do fungo <i>Actinomucor elegans</i> em meio sólido (arroz) após 30 dias de incubação.....	52
Figura 15- Solução evaporada em evaporador rotativo	53
Figura 16- Filtração à vácuo para obtenção da solução ETOH	53
Figura 17- Fluxograma de obtenção dos extratos fúngicos de <i>Actinomucor elegans</i> AcCC18.1A cultivado em arroz.....	54
Figura 18- Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato etanolico da fase acetato AcCC18.1A (AC18.1A FAET)	55
Figura 19- Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração 4AC18AC1	56
Figura 20- Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração 3AC181AC1	57
Figura 21- Esquema geral de mecanismo da reação de substituição	58
Figura 22- Representação da microdiluição realizada em placa de Elisa.....	60
Figura 23- Representação das atividades observadas	61
Figura 24- Sementes feltrin empregadas no ensaio	62
Figura 25- Sementes <i>Lactuca sativa</i>	63
Figura 26- Sementes de <i>Lactuca sativa</i> em placa de petri.....	64
Figura 27- Número de Espécies de Fungos com Similaridade de 97% na Busca da Base de Dados NCBI utilizando a Ferramenta BLAST	68

Figura 28- Substâncias isoladas e identificadas neste trabalho	69
Figura 29- Estrutura de S-1	71
Figura 30- Principais correlações de COSY de S-1	72
Figura 31- principais correlações de HMBC de S-1	73
Figura 32- Espectro de RMN ^1H de S-1 (CDCl_3 , 400 MHz).....	74
Figura 33- Espectro de RMN ^{13}C de S-1 (CDCl_3 , 100 MHz).....	75
Figura 34- Espectro de COSY de S-1	76
Figura 35- Espectro de HSQC de S-1	77
Figura 36- Espectro de HMBC de S-1	78
Figura 37- Estrutura de S-2	79
Figura 38- Principais correlações de HMBC de S-2	80
Figura 39- Espectro de RMN ^1H de S-2 (CDCl_3 , 400 MHz).....	82
Figura 40- Espectro de RMN ^{13}C de S-2 (CDCl_3 , 100 MHz).....	83
Figura 41- Espectro de COSY de S-2	84
Figura 42- Espectro de HSQC de S-2	85
Figura 43- Espectro de HMBC de S-2	86
Figura 44- Estrutura de S-3	87
Figura 45- Principais correlações de COSY de S-3	88
Figura 46- Principais correlações de HMBC de S-3	89
Figura 47- Espectro de RMN ^1H de S-3 (CDCl_3 , 400 MHz).....	90
Figura 48- Espectro de RMN ^{13}C de S-3 (CDCl_3 , 100 MHz).....	91
Figura 49- Espectro de COSY de S-3	92
Figura 50- Espectro de HSQC de S-3	93
Figura 51- Espectro de HMBC de S-3	94
Figura 52- Espectro de massas ESI (+) de S-3	95
Figura 53- Estrutura de S-4	96
Figura 54- Principais correlações de COSY de S-4	97
Figura 55- Principais correlações de HMBC de S-4	97
Figura 56- Espectro de RMN ^1H de S-4 (CDCl_3 , 400 MHz).....	99
Figura 57- Espectro de RMN ^{13}C de S-4 (CDCl_3 , 100 MHz).....	100
Figura 58- Espectro de COSY de S-4	101
Figura 59- Espectro de HSQC de S-4	102
Figura 60- Espectro de HMBC de S-4	103
Figura 61- Estrutura de S-5	104

Figura 62- Principais correlações de COSY de S-5	106
Figura 63- Principais correlações de HMBC de S-5	106
Figura 64- Comparação dos espectros de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de S-1 e S-5	109
Figura 65- Espectro de RMN ^1H de S-5 (CDCl_3 , 400 MHz).....	110
Figura 66- Espectro de RMN ^{13}C de S-5 (CDCl_3 , 100 MHz).....	111
Figura 67- Espectro de COSY de S-5	112
Figura 68- Espectro de HSQC de S-5	113
Figura 69- Espectro de HMBC de S-5	114
Figura 70- Espectro de massas ESI (+) de S-5	115
Figura 71- Estrutura de S-6	116
Figura 72- Principais correlações de COSY de S-6	118
Figura 73- Principais correlações de HMBC	118
Figura 74- Comparação dos espectros de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de S-1 e S-6	120
Figura 75- Espectro de RMN ^1H de S-6 (CDCl_3 , 400 MHz).....	121
Figura 76- Expansão do espectro de RMN ^1H de S-6 (CDCl_3 , 400 MHz).....	122
Figura 77- Espectro de RMN ^{13}C de S-6 (CDCl_3 , 100 MHz).....	123
Figura 78- Espectro de COSY de S-6	124
Figura 79- Espectro de HSQC de S-6	125
Figura 80- Espectro de HMBC de S-6	126
Figura 81- Espectro de massas ESI (+) de S-6	127
Figura 82- Estrutura de S-7	128
Figura 83- Principais correlações de COSY de S-7	130
Figura 84- Principais correlações de HMBC de S-7	130
Figura 85- Comparação dos espectros de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de S-1 e S-7	132
Figura 86- Espectro de RMN ^1H de S-7 (CDCl_3 , 400 MHz).....	133
Figura 87- Expansão do espectro de RMN ^1H de S-7 (CDCl_3 , 400 MHz).....	134
Figura 88- Espectro de RMN ^{13}C de S-7 (CDCl_3 , 100 MHz).....	135
Figura 89- Espectro de COSY de S-7	136
Figura 90- Espectro de HSQC de S-7	137
Figura 91- Espectro de HMBC de S-7	138
Figura 92- Espectro de massas ESI (+) de S-7	139
Figura 93- Gráfico de viabilidade celular de das substâncias isoladas do fungo <i>Actinomucor elegans</i> AcCC18.1A, S-1 (C3-05), S-2 (C3-R2) e S-3 (C4-R13), após 72 horas de tratamento em linhagem de câncer gástrico metastático AGP01. Cada ponto equivale à média de três	

replicatas	145
Figura 94- Gráfico de viabilidade celular de das substâncias isoladas do fungo <i>Actinomucor elegans</i> AcCC18.1A, S-1 (C3-05), S-2 (C3-R2) e S-3 (C4-R13), após 72 horas de tratamento em linhagem de câncer gástrico primário ACP02. Cada ponto equivale à média de três replicatas	146
Figura 95- Gráfico de viabilidade celular de das substâncias isoladas do fungo <i>Actinomucor elegans</i> AcCC18.1A, S-1 (C3-05), S-2 (C3-R2) e S-3 (C4-R13), após 72 horas de tratamento em linhagem não tumoral MRC5. Cada ponto equivale à média de três replicatas.....	147
Figura 96- Índice de velocidade de germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i> , em concentrações diferentes, do extrato do fungo <i>Actinomucor elegans</i> AcCC18.1A.	151
Figura 97- Germinação de sementes de alface pelo extrato etanólico na concentração de 2.000 e 3.000 µg/mL no primeiro dia de contagem.....	151

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Exemplos de metabólitos secundários de grande relevância isolados de fungos endofíticos.....	28
Tabela 2- Alguns compostos fenólicos de importância terapêutica.....	30
Tabela 3- Componentes e respectivas concentrações utilizadas em uma reação de PCR	50
Tabela 4- Etapas do PCR para amplificação de DNA, utilizando os primers ITS1 e ITS4.....	50
Tabela 5- Identificação do fungo endofítico AcCC18.1A de <i>Rhizophora mangle</i>	68
Tabela 6- Dados de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de S-1 em comparação com a literatura (Park <i>et al.</i> , 2011).....	73
Tabela 7- Dados de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de S-2 em comparação com a literatura (Zhang <i>et al.</i> , 2023)	81
Tabela 8- Dados de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de S-3	89
Tabela 9- Dados de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de S-4 em comparação com a literatura Sajid, <i>et al.</i> , 2011	98
Tabela 10- Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C (400 MHz e 100 MHz, CDCl_3) de S-1 e S-5	107
Tabela 11- Dados de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de S-5 em comparação com a literatura (Kashyap; Phukan, 2013)	108
Tabela 12- Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C (400 MHz e 100 MHz, CDCl_3) de S-1 com S-6	119
Tabela 13- Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C (400 MHz e 100 MHz, CDCl_3) de S-1 com S-7	131
Tabela 14- Resultados antimicrobianos do extrato e substâncias obtidas no trabalho	144
Tabela 15- Influência do extrato na promoção do crescimento vegetal das sementes de alface	149
Tabela 16- Classificação dos experimentos quanto aos coeficientes de variação	150

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AcCC	Acarajó casca do caule
AcOEt	Acetato de Etila
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
BHI	Brain Heart Infusion (em Português; Infusão de Cérebro e Coração)
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCUV	Cromatografia em Coluna por Via Úmida
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CIM	Concentração Inibitória Mínima
cm	Centímetro
<i>d</i>	Duplete
<i>dd</i>	Duplo duplete
DMSO	Dimetilsulfóxido
EtOH	Etanol
FAET	Fase acetato de etilo
g	Gramas
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HOMO-COSY	Homonuclear Correlation Spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
IEC	Instituto Evandro Chagas
IVG	Índice de velocidade de germinação
<i>J</i>	Constantes de acoplamento
LaBQuiM	Laboratório de Bioensaios e Química de Microrganismos
<i>m</i>	Multiplete
mg	Miligramas
°C	Graus Celsius
δ	Deslocamento químico
δ_c	Deslocamento químico dos sinais de carbono
δ_H	Deslocamento químico dos sinais de hidrogênio

%	Porcentagem
µL	Microlitro
mL	Mililitro
p.	Página
ppm	Partes por milhão
RESEX	Reserva Extrativista
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1
s	Singleto
t	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
TTC	2,3,5-triphenyltetrazolium chloride
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFPA	Universidade Federal do Pará
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	OBJETIVOS.....	22
2.1	Objetivo geral.....	22
2.2	Objetivos específicos	22
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
3.1	Manguezal.....	23
3.2	<i>Rhizophora mangle</i> L.	24
3.3	Fungos endofíticos.....	25
3.3.1	Considerações gerais.....	25
3.3.2	Fungos endófitos e suas propriedades antimicrobianas	26
3.3.3	Metabólitos secundários de fungos endofíticos	26
3.3.4	Compostos Fenólicos	29
3.4	Aspectos fundamentais das bactérias.....	34
3.5	Resistência bacteriana	35
3.5.1	<i>Bacillus subtilis</i>	37
3.5.2	<i>Escherichia coli</i>	38
3.5.3	<i>Salmonella typhimurium</i>	39
3.5.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	40
3.5.5	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	41
3.6	Neoplasias e compostos de fungos com atividade anticâncer	42
3.7	O Impacto dos microrganismos no Crescimento das Plantas: Potencial alelopático	44
3.8	Ressonância magnética nuclear (RMN).....	45

4	METODOLOGIA	47
4.1	Materiais, reagentes e solventes utilizados	47
4.1.1	Materiais de cromatografia	47
4.1.2	Solventes	48
4.2	Métodos	48
4.2.1	Reativação do Fungo	48
4.2.2	Identificação molecular do fungo endofítico <i>Actinomucor elegans</i> AcCC18.1A	49
4.2.2.1	Extração de DNA	49
4.2.2.2	Reação em Cadeia da Polimerase	50
4.2.2.3	Purificação do DNA	51
4.2.2.4	Sequenciamento e análise das sequências	51
4.2.3	Cultivo do fungo endofítico <i>Actinomucor elegans</i> AcCC18.1A em meio sólido (arroz)	51
4.2.4	Obtenção dos extratos Etanolicos e Fracionamentos	52
4.2.5	Fracionamento dos extratos do fungo <i>Actinomucor elegans</i> AcCC18.1A	55
4.2.6	Derivatização estrutural de substâncias	58
4.2.7	Ensaio antimicrobianos	59
4.2.7.1	Ativação das bactérias	59
4.2.7.2	Padronização das culturas	59
4.2.7.3	Preparo das amostras	59
4.2.7.4	Ensaio para medir a concentração inibitória mínima (CIM)	60
4.2.7.5	Tipo de atividade	61
4.2.8	Ensaio da inibição do crescimento vegetal (alelopatia)	62
4.2.8.1	Análise da inibição do crescimento vegetal do extrato do fungo <i>Actinomucor elegans</i> AcCC 18.1A sobre a germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i>	62
4.2.8.1.1	Preparação da solução do extrato	62
4.2.8.1.2	Condicionamentos das sementes	62
4.2.8.2	Análise da taxa e do índice de velocidade de germinação	65
4.2.9	Ensaio de citotoxicidade por MTT	66
4.2.9.1	Cultura Celular	66
4.2.9.2	Avaliação da Atividade citotóxica – Ensaio do MTT	66
4.2.9.3	Análise dos Dados	67

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
5.1	Identificação molecular do fungo <i>Actinomucor elegans</i> AcCC18.1A.....	68
5.2	Identificação das substâncias obtidas no trabalho.....	69
5.2.1	Substância S-1: Tirosol.....	71
5.2.2	Substância S-2: Acido 4-hidroxifenilacético.....	79
5.2.3	Substância S-3: 4-formilfenil-2-fenilacetato	87
5.2.4	Substancia S-4: Ácido fenilacético	96
5.2.5	Substância S-5: 4-(2-acetoxietil) -fenilacetato.....	104
5.2.6	Substância S-6: 4-(2-(butiriloxy)etil) fenilbutirato	116
5.2.7	Substancia S-7: 4-(2-(benzoyloxy)etil) fenilbenzoato	128
5.3	Ensaio Biológicos	140
5.3.1	Ensaio antimicrobianos	140
5.3.2	Atividade citotóxica	145
5.3.3	Atividade alelopática do extrato do fungo <i>Actinomucor elegans</i> AcCC18.1A.....	148
6	CONCLUSÕES.....	152
	REFERENCIAS	153

1 INTRODUÇÃO

A natureza oferece substância bioativas obtidas, principalmente, de plantas e microrganismos, e que são, historicamente, utilizadas no tratamento de diversas doenças. A pesquisa sobre endófitos fúngicos e compostos é limitada, devido à ênfase atual no isolamento de moléculas bioativas de plantas. Apesar disso, os endófitos fúngicos desempenham um papel crucial no desenvolvimento de novos produtos naturais para tratar doenças crônicas (Shah *et al.*, 2023).

A Floresta Amazônica é a maior floresta tropical do mundo e, sem dúvida, o ecossistema terrestre mais rico em diversidade de espécies vegetais e animais do planeta, cuja maioria ainda não é conhecida. Diante disso, torna-se evidenciada a importância de se promoverem estudos que visem contribuir para o conhecimento e prospecção de fungos endofíticos associados a espécies vegetais medicinais (Souza *et al.*, 2018).

Cribb e Cribb (1955) conduziram o primeiro estudo sobre os fungos endofíticos isolados de plantas de mangue e solos de manguezais. Desde então, vários estudos sobre esses fungos marinhos têm sido conduzidos ao longo da costa dos oceanos Índico, Pacífico e Atlântico. Diante disso, torna-se relevante realizar pesquisas sobre os fungos dos manguezais brasileiros, visto que a flora endêmica desses ecossistemas representa uma grande fonte de moléculas com potencial biológico, produzidas pela biossíntese de plantas, interação microbiana e coabitação com outras espécies (Cadamuro *et al.*, 2021).

Os fungos endofíticos são definidos como organismos que vivem dentro dos tecidos vegetais em algumas fases do seu ciclo de vida sem causar dano aparente aos seus hospedeiros (Petrini, 1991). A utilização desses fungos tem proporcionado novas oportunidades na exploração biotecnológica, através do isolamento de metabólitos secundários que podem ser aplicados nas indústrias farmacêuticas e agrícolas. Isso é especialmente relevante em ambientes ainda pouco explorados, como as florestas tropicais (Chapla; Biasetto; Araujo, 2013; Souza *et al.*, 2018).

O primeiro metabólito fúngico eficaz foi a penicilina, produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum* e descoberto por Fleming em 1928, sendo também o primeiro medicamento produzido em larga escala já na década de 1940 (Specian *et al.*, 2014). Com o crescente interesse em pesquisas envolvendo microrganismos endofíticos, os estudos químicos de fungos endofíticos desempenham um papel significativo na descoberta de novas moléculas biologicamente ativas.

A agricultura enfrenta desafios significativos devido ao impacto das plantas daninhas,

que resultam em custos elevados associados ao seu controle e redução na produtividade. O manejo eficaz dessas plantas é crucial para mitigar os prejuízos. Neste contexto, a pesquisa sobre espécies com potencial alelopático emerge como uma promissora abordagem sustentável para o controle dessas plantas na agricultura. Além disso, doenças como a mancha bacteriana representam sérias ameaças para cultivos importantes, como o maracujá, especialmente no estado do Pará, que é o décimo segundo maior produtor do Brasil. Esta doença limita o cultivo, principalmente em regiões quentes, devido à sua difícil controle (Oliveira *et al.*, 2023; Pereira *et al.*, 2018).

Estudos apontam que até 2050 as superbactérias matarão cerca de 10 milhões de pessoas por ano, um índice maior que o do câncer. Uso indiscriminado de antibióticos está associado ao aumento da resistência bacteriana, causando a ineficácia dos antimicrobianos (Correa *et al.*, 2017).

Outro grande problema de saúde em nível mundial é o câncer, com uma incidência anual de 6-7 milhões de novos casos e responsável por 8,2 milhões de mortes em 2012. Nos Estados Unidos, em 2017, foram registrados aproximadamente 1.690.000 novos casos, resultando em 600 óbitos (Gouveia *et al.*, 2018). Em 2020, quase 10 milhões de casos foram registrados globalmente. Esses números destacam a urgência de abordagens globais para enfrentar esse desafio de saúde crítico (Who, 2022).

Em resumo, tanto o câncer quanto a resistência bacteriana são considerados sérios problemas de saúde pública em escala global. Na agricultura, diversas doenças, como a mancha bacteriana e o impacto das plantas daninhas, afetam negativamente os cultivos. Suprir a necessidade de novos agentes terapêuticos para essas doenças, bem como de novos compostos bioherbicidas, é um desafio a ser enfrentado pela ciência. Portanto, este estudo tem como objetivo contribuir para novas pesquisas que possam ajudar a resolver esses problemas de saúde e agrícolas, seja desenvolvendo novos compostos ou identificando novas fontes de compostos existentes.

Em estudos realizados por Ramos (2021) vários fungos endofíticos foram obtidos de *Rhizophora mangle* e demonstrou atividade antibacteriana e citotóxica para alguns isolados. Então esta Dissertação se propõe a apresentar o estudo do fungo *Actinomucor elegans* AcCC18.1A a fim de investigar a utilização de seus extratos e compostos puros contra doenças infecciosas bacterianas e citotóxicas, com o intuito de contribuir para a descoberta de novos agentes terapêuticos. Adicionalmente, busca-se avaliar o potencial alelopático do extrato, o que poderia levar à identificação de novos agentes com atividade bioherbicida.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Contribuir para a investigação de fungos endófitos de plantas de mangue da Amazônia brasileira, através do isolamento e identificação de compostos com propriedades antimicrobianas, alelopáticas e anticancerígenas do fungo *Actinomucor elegans* AcCC18.1A, o qual foi isolado como endófito da planta *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae).

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar a identificação do microrganismo.
- ✓ Isolar os constituintes químicos dos extratos do fungo endofítico *Actinomucor elegans* AcCC18.1A através de cromatografia em coluna por via úmida.
- ✓ Identificar os constituintes químicos isolados por técnicas espectroscópicas e espectrométricas.
- ✓ Realizar modificações estruturais de uma das substâncias isoladas visando melhorar as atividades biológicas.
- ✓ Realizar ensaios antimicrobianos e citotóxicos com os extratos brutos e as substâncias isoladas.
- ✓ Avaliar o potencial alelopático do extrato bruto de *Actinomucor elegans* AcCC18.1A na germinação e vigor de sementes.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Manguezal

O mangue pode ser definido de várias maneiras, mas de acordo com o ponto de vista imediato, o mangue ou estuário pode ser caracterizado como sendo um ambiente costeiro semifechado com uma ligação livre com o oceano aberto, no interior do qual a água do mar é imensuravelmente diluída pela água doce oriunda da drenagem continental (Cavalcante *et al.*, 2013).

O manguezal é um ambiente atípico com características peculiares, adaptado a condições extremas, com vegetação que suporta a água salgada e equilibra as raízes na lama trazidas pelos rios, abrigo para centenas de espécies marinhas (Cavalcante *et al.*, 2013). De acordo com o Atlas dos Manguezais do Brasil, esse ecossistema abrange aproximadamente 14.000 km² ao longo do litoral do país. Cerca de 80% dos manguezais brasileiros estão localizados em três estados do bioma amazônico: Maranhão (36%), Pará (28%) e Amapá (16%). Essa extensa área de manguezais no norte do Brasil representa a maior porção contínua do ecossistema sob proteção legal em todo o mundo, conforme o Atlas de Manguezais (Brasil, 2018).

Os manguezais são identificados como uma unidade ecológica da qual dependem dois terços da população pesqueira do mundo, constituindo conseqüentemente o ponto de partida para o sustento nutricional de uma enorme diversidade de animais, muitos dos quais de grande importância econômica. Dentre as diversas razões para se estudar os manguezais, destaca-se o fato de que muitas comunidades humanas têm uma dependência tradicional desses ecossistemas para a sua subsistência, sendo um dos recursos pesqueiros mais explorados desde o estado do Amapá até Santa Catarina (Cavalcante *et al.*, 2013).

O manguezal é considerado um ecossistema de preservação permanente. Na cidade de Bragança, localiza-se a Reserva Extrativista (RESEX) Marinha de Caeté-Taperaçu que é uma Unidade de Conservação Federal de Uso Sustentável (Abdala; Saraiva; Wesley, 2012). O município fica a 215 km de distância da capital do estado (Belém) no litoral nordeste do estado do Pará, com uma área de aproximadamente 42.489,81 hectares. Estende-se: no limite com o Oceano Atlântico, e com os municípios de Tracuateua, Augusto Corrêa, Viseu e Santa Luzia do Pará (Brasil, 2005; Brasil, 2018) na Mesorregião do Nordeste Paraense e dentro desta, na Microrregião Bragantina.

O litoral do Pará apresenta a segunda maior extensão de manguezais do país com aproximadamente 39 mil hectares (Brasil, 2018). A zona costeira Bragantina está inserida no

maior e mais bem preservado ambiente tropical úmido do planeta (a Região Amazônica), ao longo da costa de manguezais do nordeste do estado do Pará. A área desse ecossistema é extremamente irregular e recortada, com inúmeras baías e estuários, com cerca de 7.500 km² (Souza-Filho; Paradella, 2005).

A vegetação de mangue ocupa toda a Planície Costeira de Bragança-PA, penetrando em direção ao continente ao longo dos canais estuarinos. Esta vegetação ocorre nas áreas com influência de águas salinas e salobras, sendo constituídas por comunidades típicas, como *Rhizophora*, *Avicennia* e *Laguncularia* (Bardosa *et al.*, 2015).

3.2 *Rhizophora mangle* L.

Rhizophora mangle L., conhecida como mangue vermelho, é uma planta do reino Plantae e da família Rhizophoraceae. Este arbusto, parte do gênero *Rhizophora*, atinge mais de 10 metros de altura. Estudos científicos evidenciam seu potencial terapêutico, principalmente nas cascas, utilizadas tradicionalmente para astringência, hemostasia, febrífugo, antifúngico, anti-inflamatório e antidiarreico, incluindo tratamento para angina de peito. A família Rhizophoraceae, à qual pertence, possui cerca de 120 espécies distribuídas em 16 gêneros (Regalado; Sánchez; Mancebo, 2016).

Em um estudo acerca da estrutura do bosque da península de Bragança-PA, foi possível constatar a presença de três espécies típicas de mangue: *R. mangle*, *Avicennia germinans* e *Laguncularia racemosa*. A planta mais abundante nessa região é a *R. mangle* ocupando 77,5% do bosque na Vila do Acarajó, 63,8% no furo do meio e 85% no furo grande (Matni; Menezes; Mehlig, 2006).

De acordo com o Manual Técnico de Vegetação Brasileira (2012), a vegetação no manguezal brasileiro mais frequentemente encontrada é a *R. mangle*, sendo amplamente distribuída ao longo das costas tropicais e subtropicais da América Central e do Sul, Flórida, África Ocidental e nas ilhas de Fidji, Tonga e Nova Caledônia (Silva; Bernini; Carmo, 2005).

Na medicina tradicional *R. mangle* L. tem sido utilizada para tratamento contra úlceras gástricas (De-Faria, *et al.*, 2012; Perera *et al.*, 2016) cicatrização de feridas cutâneas (Silva, 2019) antioxidante (González-Ocampo *et al.*, 2022), antidiarreico (Wendel *et al.*, 2013) e citotóxica (Santana, *et al.*, 2023). Esta planta pode ser uma importante fonte de novos produtos destinados a solucionar problemas de saúde de grande relevância atual.

3.3 Fungos endofíticos

3.3.1 Considerações gerais

O termo “fungos endofíticos” refere-se a fungos que vivem nos tecidos vegetais durante todo ou parte do ciclo de vida, estabelecendo uma relação simbiótica mutuamente benéfica com sua planta hospedeira sem causar qualquer efeito adverso ou doença (Wen *et al.*, 2022). A relação de um endófito com o hospedeiro pode variar de um hospedeiro para outro, e as interações entre eles ainda são pouco compreendidas. Esta associação sugere que estes microrganismos coevoluíram com os seus hospedeiros, apresentando uma íntima relação mutualística, onde os endófitos recebem nutrientes e proteção enquanto a planta tem vantagens decorrentes dessa interação, como a maior resistência em ambientes com intenso estresse causado por fatores bióticos (insetos, herbívoros, nematoides parasitas e microrganismos fitopatogênicos) ou abióticos (pH, temperatura, estresse hídrico, ventos fortes, salinidade etc.) (Chapla; Biasetto; Araujo, 2013).

O termo endófito foi mencionado pela primeira vez no início do século XIX, para definir todos aqueles organismos que colonizam tecidos internos de plantas (Azevedo, 1998). Nessa associação simbiótica, a planta hospedeira abriga e fornece nutrientes para o desenvolvimento do fungo, que por sua vez ajuda na proteção contra herbívoros e patógenos da planta.

Microrganismos endofíticos são capazes de viver nos tecidos de praticamente todas as plantas ao redor do mundo (Petrini, 1991). Entre os micróbios endofíticos, os fungos têm sido estudados como simbioses, incluindo espécies que podem ser mutualistas, decompositores ou parasitas quando associados aos seus hospedeiros (Ferreira *et al.*, 2015).

Os fungos endofíticos são capazes de produzir diferentes compostos bioativos, importantes do ponto de vista ecológico bem como do ponto de vista biotecnológico. A capacidade destes fungos endofíticos de produzir compostos bioativos pode ser parte de sua defesa química e resposta adaptativa para sobreviver e colonizar a planta hospedeira em ambiente selvagem (Ferreira *et al.*, 2015).

A extrema diversidade permite a oportunidade de descobrir novos microrganismos que possam ser potenciais produtores de compostos bioativos para a agricultura, indústria e medicina. Existe um grande interesse no estudo de microrganismos endofíticos, incluindo sua aplicação no biocontrole de pragas. Devemos reconhecer a Amazônia como um patrimônio natural inestimável que requer uma gestão cuidadosa e proteção para as gerações futuras, já que ela nos proporciona a oportunidade de descobrir novos compostos, neste caso, a partir de fungos endofíticos (Shah *et al.*, 2023; Pereira *et al.*, 2018; Souza Filho, 2007).

3.3.2 Fungos endófitos e suas propriedades antimicrobianas

A descoberta acidental da penicilina, por Fleming em 1928, isolada do fungo *Penicillium notatum*, deu início aos estudos de fungos na busca por compostos bioativos. A partir destes organismos, ocorreu um grande avanço nas áreas dos antibióticos, imunossupressores e medicamentos antineoplásicos (Tulp; Bohlin, 2004; Strohl *et al.*, 2004). Alguns fármacos bem conhecidos e derivados de fungos são os antibióticos da classe das penicilinas e cefalosporinas, os redutores de colesterol como a mevastatina e lovastatina, imunossupressores como a ciclosporina e rapamicina, entre outros (Cragg; Newman, 2005; Greve *et al.*, 2010).

Pretsch e colaboradores (2014) relataram a notável atividade antimicrobiana do *Talaromyces wortmannii*, um fungo endofítico isolado de uma planta de *Aloe vera* no Egito. Eles observaram uma significativa atividade antibacteriana ao testarem o extrato de acetato de etila contra diversas cepas Gram-positivas, incluindo *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pneumoniae*.

O fungo endofítico *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da planta medicinal *Vitex negundo* L. coletada na Índia, demonstrou atividade antibacteriana contra uma variedade de espécies tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas, incluindo *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, além de atividade antifúngica contra o patógeno *Candida albicans* (Arivudainambi *et al.*, 2011).

Zhang e colaboradores (2021) descreveram o isolamento do fungo endofítico *Gelasinospora endodonta*, obtido de *Bruguiera sexangula*, uma espécie de mangue coletada na Ilha de Hainan, China. Este fungo demonstrou uma atividade inibitória significativa contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*.

O fungo endofítico *Aspergillus* sp., isolado de *Hibiscus sabdariffa* L. coletada no município de São Luís, no Brasil, demonstrou atividade inibitória contra a bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692, tanto em meio sólido quanto em meio líquido (Borges *et al.*, 2023).

3.3.3 Metabólitos secundários de fungos endofíticos

Os metabólitos secundários são moléculas sintetizadas por plantas e microrganismos, geralmente na fase estacionária de crescimento. Esses compostos, incluindo antibióticos, toxinas, alcaloides e pigmentos, são cruciais para diversos processos biológicos e têm importância significativa para a saúde humana (Rosales, 2019). Muitos endofíticos possuem a capacidade de sintetizar vários metabólitos bioativos que podem ser usados direta ou

indiretamente como agentes terapêuticos (Khawar *et al.*, 2011).

Os fungos emergem como uma promissora fonte de produtos naturais bioativos devido à sua notável capacidade de produção metabólica diversificada. A descoberta da penicilina, produzida pelo fungo *Penicillium notatum*, desencadeou um maior enfoque nos estudos relacionados à identificação e aplicação dos metabólitos provenientes de Microrganismos (Strobel *et al.*, 2004).

Os compostos produzidos pelos fungos endofíticos, já descritos na literatura (tabela 1, p. 28), podem ser agrupados em diversas categorias, incluindo alcaloides, esteroides, terpenoides, isocumarinas, quinonas, fenilpropanoides, ligninas, compostos fenólicos como fenol e ácidos fenólicos, metabólitos alifáticos, lactonas, entre outros produtos metabólicos com uma ampla variedade de atividades biológicas (Oliveira *et al.*, 2015).

Tabela 1- Exemplos de metabólitos secundários de grande relevância isolados de fungos endofíticos

Metabólito	Bioatividade	Cepa
Azadiractin A e B	Pesticida natural	<i>Eupenicillium parvum</i>
Camptotecina	Anticâncer	<i>Diversas cepas</i>
Diosgenin	Precursor de progesterona; redutor do colesterol	<i>Cephalosporium sp.</i>
Emodin	Antidiabético, antiviral e anticancerígeno	<i>Paecilomyces sp</i>
Gentiopirrin	Anti-malarial, fungicida e larvicida	<i>Thielavia subthermophila</i> <i>INFU/Hp/KF/34B</i>
Hypericin	Antidepressivo, anti-inflamatório, antimicrobiano, antiviral e antioxidante	<i>Thielavia subthermophila</i> <i>INFU/Hp/KF/34B</i>
Kaempferol	Antioxidante; anticancerígeno	<i>Fusarium chlamydosporum</i>
Lapachol	Anticancerígeno	<i>Aspergillus niger</i> <i>Alternaria alternata</i>
Rhein	Antitumoral; anti-inflamatório; antimicrobiano; homeostático	<i>Fusarium solani R13</i>
Sanguinarine	Anticancerígeno	<i>F. proliferatum BLH51</i>
Taxol	Anticancerígeno	<i>Diversas cepas</i>
Tirosol	Antioxidante, antimicrobiano	<i>Asordaria conoidea</i> <i>Colletotrichum coccodes</i>

Fonte: Venugopalan *et al.*, (2015) modificado

3.3.4 Compostos Fenólicos

O termo "compostos fenólicos" abrange todas as substâncias que contêm múltiplos grupos fenol, que é o nome comum do hidroxibenzeno, ligados a estruturas aromáticas ou alifáticas (Creus, 2004).

Compostos fenólicos são normalmente metabólitos secundários de plantas, geralmente envolvidos na defesa contra organismos patogênicos e raios ultravioleta. Os ácidos fenólicos podem ser divididos em derivados de ácido hidroxibenzóico e hidroxicinâmico que conferem propriedades antioxidantes aos vegetais que os possuem (Oliveira, 2018).

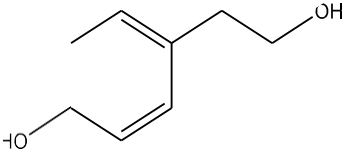
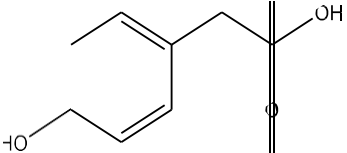
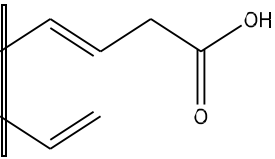
As principais propriedades benéficas dos compostos fenólicos são suas propriedades antioxidantes. Essas propriedades antioxidantes são a razão de suas possíveis implicações na saúde humana, como a prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e até mesmo doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer (Creus, 2004).

Os dois principais grupos de polifenóis são os ácidos fenólicos e flavonoides, sendo os primeiros classificados em ácidos benzoicos e derivados e ácidos cinâmicos e derivados. Já os flavonoides encontram-se divididos nas subclasses flavonóis, flavanonas, isoflavanos, flavanois, isoflavanos e antocianinas (Hoensch *et al.*, 2015; Johnston, 2015).

Os ácidos fenólicos são algumas das substâncias que constituem o grupo dos compostos fenólicos. Caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes tanto para os alimentos como para o organismo, sendo, por isso, indicados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e outras doenças (Soares, 2002).

Na tabela 2 (p. 30) representa-se alguns dos compostos fenólicos de importância terapêutica, juntamente com suas estruturas e os impactos que exercem na saúde.

Tabela 2- Alguns compostos fenólicos de importância terapêutica

Compostos fenólicos	Estrutura	Impactos na saúde	Referencia
Tirosol (p-hidroxi-fenil- etílico)		O tirosol é um composto fenólico bem conhecido com potencial antioxidante e antimicrobiano. Há uma ampla quantidade de publicações que destacam suas diversas atividades, como antioxidantes, anti-inflamatórias, anticarcinogênicas, antiplaquetárias, antimicrobianas e antifúngicas.	Arruda <i>et al.</i> (2021) Fernández <i>et al.</i> (2022)
Ácido 4- hidroxifenilacéti- co		O ácido 4-hidroxifenilacético (4-HPA) foi identificado como um antioxidante, agente antimicrobiano e indutor de enzimas da fase 2. De acordo com Liu et al., o 4-HPA demonstrou forte ação antimicrobiana contra a <i>Listeria monocytogenes</i> , inibindo seu crescimento de maneira dose-dependente, levando a uma proliferação mínima após um período de tratamento.	Liu <i>et al.</i> , (2021)
Ácido fenilacético		De acordo com a pesquisa conduzida por Kim et al., foi demonstrado que o ácido fenilacético produzido por <i>B. licheniformis</i> durante o processo de fermentação da soja possui propriedades antibióticas. Esse composto revelou atividade antimicrobiana contra várias bactérias e leveduras, incluindo <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Candida albicans</i> .	Kim <i>et al.</i> (2004)

3.3.4 Potencial químico e biológico de fungos endofíticos associados a plantas de mangue

Os estudos sobre fungos endofíticos isolados de plantas de mangue e solos de manguezais foram iniciados há 69 anos atrás, na Austrália (Cribb; Cribb, 1955). Estudos ecológicos e taxonômicos têm sido conduzidos desde 1980, nos oceanos Pacífico e Índico. Esses trabalhos têm contribuído para a identificação de espécies de fungos de manguezais (Abdel-Wahab, 2005; Parrent *et al.*, 2004). Vários artigos foram publicados nas duas últimas décadas sobre os fungos marinhos de manguezais tropicais (Cavalcante *et al.*, 2009; Gilbert; Ryvarden, 2008; Harvey; Goff, 2010; Kumaresan; Suryanarayanan, 2001) entretanto, esses aspectos têm sido pouco explorados nos manguezais brasileiros.

Os fungos marinhos desempenham importante papel no ciclo de regeneração de nutrientes para decompor a matéria orgânica morta. O estudo da diversidade da comunidade fúngica marinha, abrangendo a diversidade genética e riqueza de espécies, é o primeiro passo para o modelamento dinâmico da comunidade fúngica em termos de abundância e distribuição espacial e temporal de espécies e na ciclagem de nutrientes. Tais modelos são essenciais para o manejo e conservação eficientes de ambientes marinhos, florestais e agrários, os quais são importantes economicamente (Pang; Mitchell, 2005).

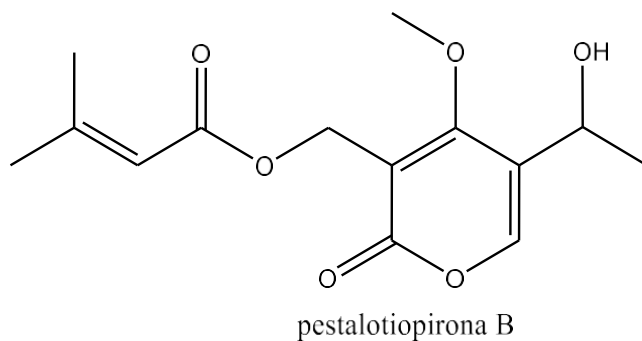
O ecossistema de manguezal é um atrativo ponto de biodiversidade para a prospecção de novos e úteis bioativos e estruturas químicas, incluindo aquelas com potencial aplicação medicinal. No geral, nas últimas duas décadas, bactérias/fungos associados a manguezais têm recebido considerável atenção devido às suas características ecológicas únicas, diversidade e abundância de novos metabólitos secundários bioativos, conforme demonstrado pelo aumento no número de publicações na literatura (Cadamuro *et al.*, 2021).

Apesar da pesquisa limitada sobre a química dos fungos endofíticos de manguezais, mais de 200 espécies foram identificadas em árvores de mangue, destacando-se como uma fonte confiável de metabólitos secundários diversos e biologicamente ativos. Esses fungos são considerados novas fontes de substâncias químicas ativas, com atividade biológica e potencial biotecnológico. Apesar disso, seu potencial completo ainda não foi totalmente explorado. Os fungos endofíticos mais comuns e cultiváveis em manguezais incluem *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Clolletotrichum*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Phyllosticta* e *Trichoderma* (Elkhateeb; El-Ghwas; Daba, 2022). Diante da falta de estudos sobre fungos endofíticos de manguezais brasileiros, ressalta-se a importância da avaliação da diversidade nos manguezais do estado do Pará.

Pesquisas mostram que fungos endofíticos isolados de plantas de manguezais são importantes fontes de metabólitos com diversas atividades biológicas (Chen *et al.*, 2007; Lin *et al.*,

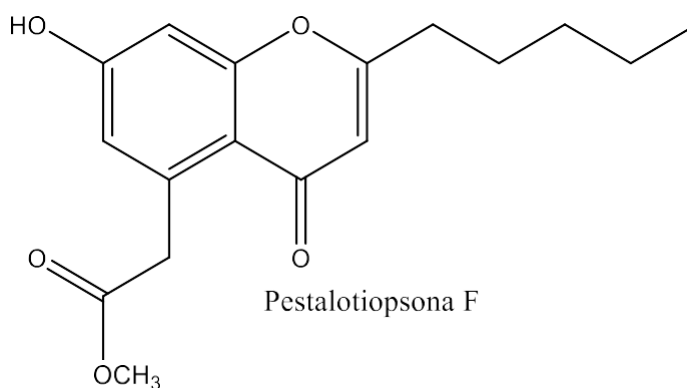
2008). A substância pestalotiopirona B (figura 1) foi obtida dos fungos endofíticos *Pestalotiopsis* spp. PSU-MA92, PSU-MA119 obtidos, respectivamente, das plantas de mangue *Rhizophora apiculata* e *R. mucronata*, esse produto natural apresenta atividade antibacteriana e antifúngica. (Rukachaisirikul *et al.*, 2012). Enquanto, que a pestalotiopsona F (figura 2) isolada do endófito *Pestalotiopsis* sp. de *R. mucronata* apresenta atividade antitumoral frente às linhagens de células L5178Y (Xu *et al.*, 2009).

Figura 1- Lactona de *Pestalotiopsis* spp. PSU-MA92 e PSU-MA119



Fonte: Rukachaisirikul *et al.*, 2012

Figura 2- Cromona de *Pestalotiopsis* sp.

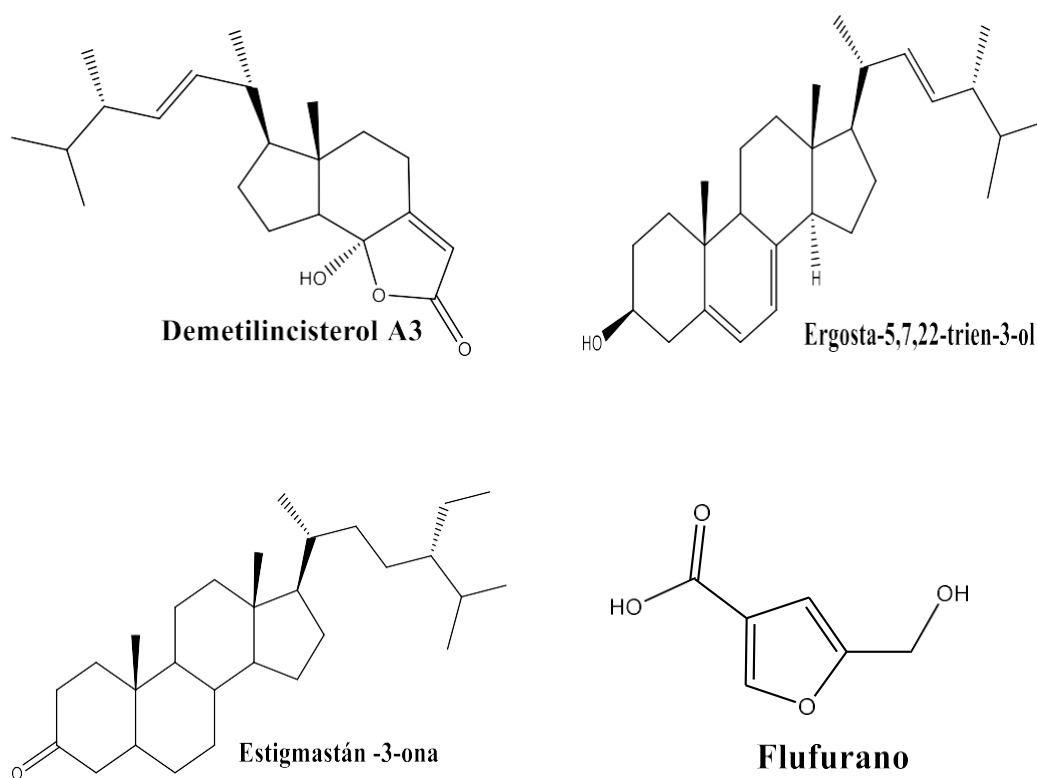


Fonte: (Xu *et al.*, 2009)

A espécie *Pestalotiopsis* é amplamente reconhecida como produtora prolífica de uma gama diversificada de metabólitos que incluem alcaloides, cromonas, cumarinas, derivados isocumarinas, lactonas, peptídeos, fenóis, ácidos fenólicos, quinonas, semiquinonas, xantonas, terpenóides e derivados de xantona, juntamente com uma variedade de compostos antimicrobianos, antifúngicos, antitumorais, antivirais, antineoplásicos e antioxidantes (Xu *et al.*, 2010; Deshmukh *et al.*, 2017).

Zhou e seus colaboradores (2017) conduziram um estudo sobre o fungo *Pestalotiopsis* spp., associado ao manguezal chinês *Rhizophora mucronata*. Neste estudo, eles conseguiram isolar as substâncias demetilincisterol A3, ergosta-5,7,22-trien-3-ol, stigmasteran-3-ona e flufurano, as quais mostraram citotoxicidade contra linhagens de células cancerosas humanas HeLa, A549 e HepG, com valores de IC50 na faixa de 11,44 a 102,11 μ M. É importante destacar que o demetilincisterol A3 demonstrou o maior potencial, com valores de IC50 atingindo níveis de atividade na faixa de nM, variando de 0,17 a 14,16 nM (figura 3).

Figura 3-Substâncias obtidas de *Pestalotiopsis* spp.



Fonte: Zhou *et al.* (2017)

3.4 Aspectos fundamentais das bactérias

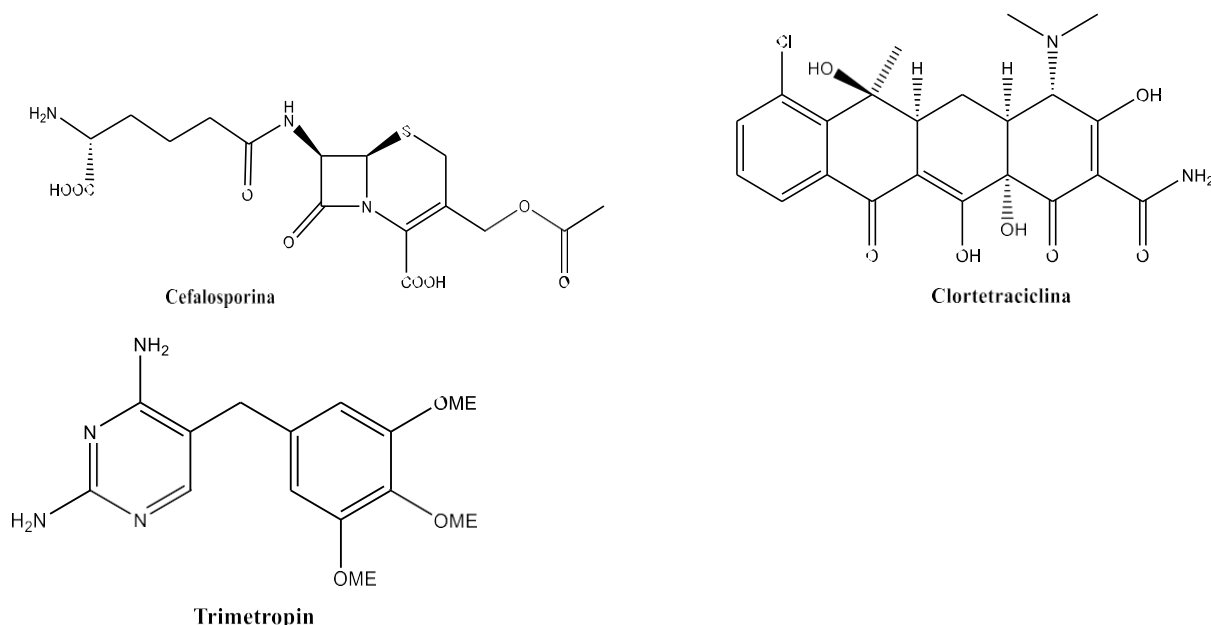
As bactérias são organismos unicelulares e procariontes, podendo ser classificadas como aeróbias, anaeróbias ou até mesmo anaeróbias facultativas. Elas representam alguns dos organismos mais antigos da Terra, com evidências de sua presença encontradas em rochas com cerca de 3,8 bilhões de anos (Crapez, 2002). As bactérias foram inicialmente observadas por volta de 1670, graças à invenção do microscópio pelo pesquisador van Leeuwenhoek. No entanto, somente no século XIX, Louis Pasteur, em seus experimentos, levantou a hipótese de que esses microrganismos poderiam ser patogênicos (Correa *et al.*, 2017).

Após a segunda metade do século XIX, cientistas como Robert Koch identificaram microrganismos responsáveis por doenças como tuberculose, cólera e febre tifoide. Nessa época, as pesquisas eram conduzidas na busca de agentes químicos que apresentassem atividade antibiótica. (Guimarães *et al.*, 2010).

Paul Enrich, considerado o pai da quimioterapia, foi responsável pelos conceitos fundamentais de que uma substância química poderia interferir na proliferação de microrganismos patogênicos, como as bactérias, em concentrações toleráveis pelo hospedeiro (Patrick, 2009).

A penicilina G, ou Benzilpenicilina, foi descrita em 1929 como agente antibiótico, porém somente foi introduzida como agente terapêutico nos anos 1940. Após o processo de industrialização da penicilina, especialmente em consequência da Segunda Guerra Mundial, foi observado um rápido crescimento na descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos. (Projan; Shlaes, 2004).

Várias abordagens relacionando a química dos produtos naturais e técnicas de biologia molecular têm sido desenvolvidas visando a obtenção de moléculas naturais, que possam ser usadas como protótipos para o desenvolvimento de novos antibióticos. Entre os anos 1940-1960 muitos antibióticos (figura 4, p. 35). foram descobertos por meio de triagens de produtos naturais microbianos, com a maioria deles sendo eficazes no tratamento de bactérias Gram-positivas, tais como os β -lactâmicos cefalosporina, tetraciclina clortetraciclina e outros como cloranfenicol e clindamicina. Nesse período, apenas três derivados sintéticos foram introduzidos no mercado: isoniazida, trimetopim e metronidazol (Guimarães *et al.*, 2010).

Figura 4- Antibióticos descobertos de produtos naturais microbiano

Fonte: Guimarães *et al.* (2010)

3.5 Resistência bacteriana

Microrganismos, especialmente bactérias, têm a capacidade de criar mecanismos de resistência a fármacos. A resistência pode ser intrínseca, quando as bactérias já possuem informações genéticas que anulam a eficácia do antimicrobiano, ou adquirida, quando recebem informações de outras células, independentemente da espécie (Abrantes; Nogueira, 2021).

A eficácia generalizada da penicilina resultou em seu uso disseminado, frequentemente sem critérios definidos. Além de tratar infecções, começou a ser utilizada para aliviar dores e febre. Com o tempo, surgiram as primeiras cepas de bactérias resistentes à penicilina, como o *Staphylococcus* sp., tornando alguns tratamentos ineficazes devido à produção de enzimas, como as beta-lactamases (Correa *et al.*, 2017).

O primeiro exemplo de aquisição de resistência por bactérias foi dado pela *Staphylococcus aureus*. No início da utilização da penicilina G em grande escala, durante a Segunda Guerra Mundial, quase 100% desses microrganismos eram sensíveis. Seis anos depois cerca de 5% das cepas já eram conhecidas, em 1959 já se contavam um valor de 80% e, atualmente, a resistência atinge quase 100% (Salles, 2000).

A resistência bacteriana emerge como um problema mundial de saúde pública atraindo a atenção de órgãos governamentais nacionais e internacionais como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Organização Mundial de Saúde (OMS), o CDC e associações de controladores de infecções hospitalares, além da indústria farmacêutica internacional (Oliveira; Souza da Silva, 2008).

Do ponto de vista epidemiológico, segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) de Atlanta, nos Estados Unidos, microrganismos resistentes são aqueles resistentes a uma ou mais classes de antimicrobianos. Sob a perspectiva laboratorial, entende-se como o crescimento de uma bactéria *in vitro* na presença de concentrações séricas de antibiótico ou quando se mostram resistentes a duas ou mais classes de drogas que interfeririam em suas funções de crescimento e, às quais seriam habitualmente sensíveis (Oliveira; Souza da Silva, 2008).

Para que ocorra a resistência adquirida a antibióticos é necessário ganho ou alteração temporária ou permanente da informação genética bacteriana. A maioria dos genes de resistência está presente em plasmídeos, que podem ser trocados com elementos cromossomais (Strohl *et al.*, 2004).

Estudos apontam que até 2050 as superbactérias matarão cerca de 10 milhões de pessoas por ano, um índice maior que o do câncer. Uso indiscriminado de antibióticos está associado ao aumento da resistência bacteriana, causando a ineficácia dos antimicrobianos. Outro fator importante está na falta de inovação medicamentosa por parte das indústrias farmacêuticas, pois ao longo do tempo, as bactérias adquiriram resistência às várias classes de antibióticos, inibindo as formas de interação do fármaco (Correa *et al.*, 2017).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) avalia a resistência de bactérias aos antibióticos uma séria ameaça (Camara *et al.*, 2009). Ultimamente, o problema tem chamado a atenção depois de casos recorrentes de infecção por microrganismos resistentes em hospitais. De acordo com a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), no Brasil, a taxa de infecção hospitalar é de 15% mais alta do que em países da Europa e nos Estados Unidos, onde o mesmo índice é de 10% (Moutinho, 2015).

A resistência aos antibióticos é vista como inevitável e irreversível, sendo uma consequência natural da adaptação das bactérias à exposição a esses medicamentos. O uso excessivo de antibióticos na medicina, na produção de alimentos para animais e na agricultura tem provocado um aumento global na resistência a essas substâncias (Santos, 2004).

Estudos mostram que bactérias resistentes a antimicrobianos podem ser transmitidas aos humanos pela cadeia alimentar (Leverstein-van *et al.*, 2011; Verraes *et al.*, 2013). Alguns tipos de enterococos são usados em alimentos e rações, mas podem deteriorar os alimentos e indicar contaminação fecal. Eles também são preocupantes devido à resistência que apresentam a vários antibióticos, representando uma ameaça à saúde pública, especialmente em ambientes de saúde (Costa *et.al.*,2022).

Segue abaixo uma breve descrição de cinco bactérias que foram utilizadas nos ensaios antimicrobianos do extrato bruto, das substâncias isoladas e das substâncias obtidas da derivatização estrutural neste trabalho.

3.5.1 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis (figura 5), uma bactéria gram-positiva não patogênica, desempenha um papel significativo na produção global de enzimas extracelulares. Reconhecida como segura pela Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA), esta bactéria é uma das mais estudadas, com seu genoma e características minuciosamente elucidados. Antes da era dos antibióticos, as culturas de *B. subtilis* eram amplamente populares em escala global. Sua utilização como agentes imunoestimulantes para auxiliar em tratamentos do trato gastrointestinal tornou-se proeminente em toda a América e Europa a partir de 1946 (Alves *et al.*, 2018).

Figura 5- Fotografia microscópica de *Bacillus subtilis*



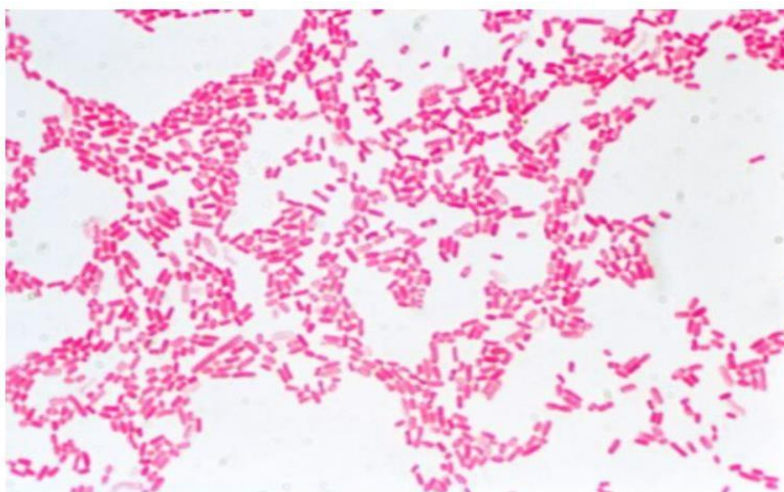
Fonte: Araujo, 2010. Disponível em: [Bacillus subtilis - Bactérias – InfoEscola](#)
Acesso em: 25/10/2023

A utilização industrial do *B. subtilis* remonta a mais de mil anos, destacando-se a produção de natto por fermentação da soja em 1982 no Japão. Em ambientes com escassez de nutrientes, o *B. subtilis* desenvolve uma célula morfolologicamente única chamada esporo. Esses esporos demonstram notável resistência, capazes de sobreviver a extremos de temperatura e outras condições adversas. Além disso, o *B. subtilis* é reconhecido por sua segurança, sendo amplamente utilizado como probiótico em alimentos na Ásia e na África, regiões onde o consumo de produtos à base de esporos é significativo (Alves *et al.*, 2018).

3.5.2 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia*, em homenagem ao pediatra alemão Theodor Escherich, é composto por bacilos Gram-negativos facultativos anaeróbicos pertencentes à família Enterobacteriaceae. A espécie típica desse gênero, a *Escherichia coli* (figura 6), está amplamente distribuída e é o principal bacilo facultativo anaeróbico que habita o intestino grosso de seres humanos e animais de sangue quente. Embora a maioria das cepas de *E. coli* seja inofensiva no cólon e raramente cause doenças em indivíduos saudáveis, algumas cepas patogênicas podem causar doenças intestinais e extraintestinais, afetando tanto pessoas saudáveis quanto indivíduos imunocomprometidos (Gomes *et al.*, 2016).

Figura 6- Imagem é uma micrografia óptica de bactérias *Escherichia coli*



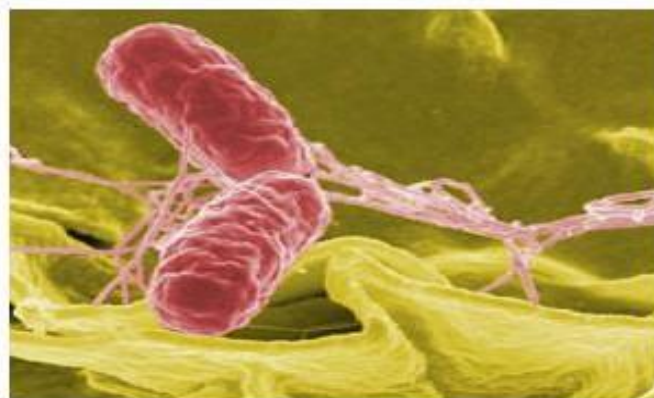
Fonte: KING, 2022. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-br/profissional/multimedia/image/colora%C3%A7%C3%A3o-de-gram-escherichia-coli->
Acesso em: 25/10/2023

A *E. coli* comensal, que faz parte da microbiota intestinal, não é patogênica e desempenha um papel fisiológico importante no funcionamento do organismo. Existem seis categorias patogênicas de *E. coli* que causam infecções intestinais em humanos e animais, sendo diferenciadas pela presença de fatores de virulência, como adesinas fimbriais e afimbriais, toxinas e invasinas. Essas categorias incluem a *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* aderente difusa (DAEC) (Souza *et al.*, 2016).

3.5.3 *Salmonella typhimurium*

As espécies de *Salmonella* são bactérias Gram-negativas, flageladas, e bacilos anaeróbios facultativos. Atualmente, existem mais de 1.800 sorotipos conhecidos, considerados como espécies distintas na classificação atual. Quando cultivadas em meios artificiais, as bactérias formam colônias. Por exemplo, a *Salmonella typhimurium* (figura 7) multiplica-se no trato gastrointestinal de muitas espécies animais, onde geralmente não causa doença. No entanto, seu crescimento nos seres humanos pode levar ao desenvolvimento de gastroenterite. Devido ao período de incubação que varia entre 6 a 48 horas após a ingestão de água ou alimentos contaminados, frequentemente provenientes de aves ou carne, a manifestação da doença pode se iniciar com sintomas como náuseas e vômitos, seguidos comumente por quadros de diarreia. É relevante notar que os casos de isolamento de *Salmonella* associados à ocorrência de gastroenterite em seres humanos têm apresentado um aumento significativo nos países desenvolvidos nos últimos anos. Essa tendência pode ser em grande parte atribuída aos métodos modernos de criação de animais, ao preparo de alimentos e à distribuição, que podem favorecer a disseminação das salmonelas. (McGarvey *et al.*, 2009).

Figura 7- Fotografia de *Salmonella typhimurium*



Fonte: Pinheiro, 2016

As *Salmonella* não tifoide, como a *Salmonella* entérica do sorotipo *Typhimurium* (*S. typhimurium*), são importantes patógenos transmitidos por alimentos em todas as regiões do mundo. A mortalidade e a morbidade causadas pela infecção por *Salmonella* representam uma carga considerável tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Mais gravemente, o impacto na saúde pública causado pela *Salmonella* é agravado pela resistência antimicrobiana (Sun *et al.*, 2019).

3.5.4 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* (figura 8) é uma bactéria esférica, do grupo dos cocos gram-positivos, frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Entretanto pode provocar doenças, que vão desde uma simples infecção (espinhas, furúnculos e celulites) até infecções graves (pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras). A gravidade das doenças causadas por essa bactéria é evidente, uma vez que elas podem levar à morte. Essas infecções se caracterizam pela dificuldade de tratamento, que pode incluir intervenções cirúrgicas e longos períodos de antibioticoterapia. Os antibióticos ainda são administrados por via intravenosa, especialmente para garantir uma ação rápida. Geralmente, são utilizados antibióticos glicopeptídicos, cuja escolha e administração podem variar dependendo do estágio e da gravidade da infecção (Santos *et al.*, 2007).

Figura 8-*Staphylococcus aureus* em uma célula epitelial



Legenda: Imagem obtida por microscópio eletrônico de varredura Fonte: Camara, 2013, disponível em <https://www.biomedicinapadiao.com.br/2013/08/imagens-incriveis-feitas-com.html>. Acesso: 15/02/2024

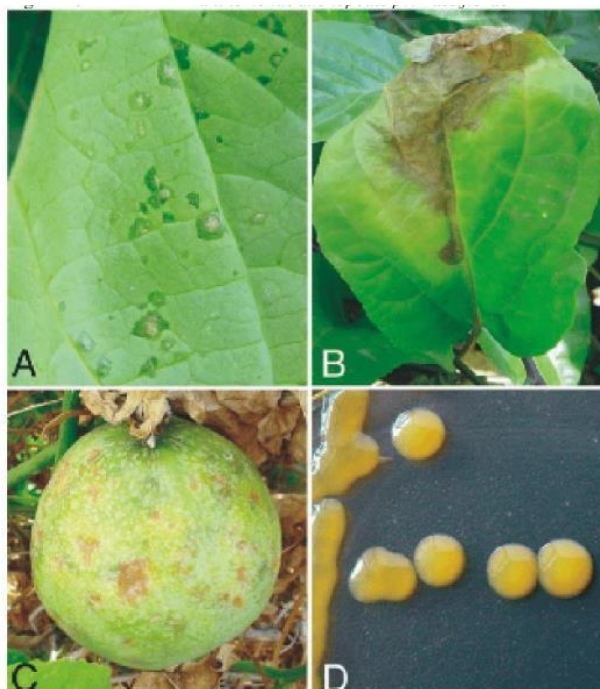
A história do tratamento dessas infecções é marcada pela descoberta da sulfanilamida por Gerard Domagk em 1932, que inicialmente parecia indicar o fim das doenças infecciosas com a implementação da antimicrobiana terapia. No entanto, o final daquela década viu o surgimento das primeiras cepas de *S. aureus* resistentes a esse quimioterápico. Desde então, essa bactéria em continuado a evoluir, com novas cepas resistentes surgindo em resposta a cada novo antibiótico introduzido no tratamento de suas patologias (Santos *et al.*, 2007).

3.5.5 *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*

O gênero *Xanthomonas* (*Xanthomonadaceae*) é composto por bactérias aeróbias obrigatórias. Suas células móveis possuem um único flagelo Polar. Espécies do gênero são produtoras de goma xantana, um exopolissacarídeo de alto interesse industrial, principalmente para as indústrias alimentícia, farmacêutica, agroquímica e petroquímica (Oliveira *et al.*, 2023).

Xanthomonas axonopodis pv. *passiflorae* (figura 9) é uma bactéria encontrada especificamente no gênero *Passiflora* (Liberato, 2002). A infecção ocorre através de lesões e aberturas naturais na planta, resultando em uma sintomatologia típica nas folhas caracterizada por necrose, imersão e lesões oleosas de forma irregular, cercadas por áreas cloróticas. Nos frutos, ocorre o surgimento de manchas oleosas duras, tornando-os inadequados para consumo e processamento industrial (Gonçalves; Rosato, 2000).

Figura 9- Mancha bacteriana, doença do maracujá (*Passiflora edulis*)



Legenda: a. sintomas iniciais da mancha bacteriana do maracujazeiro; b. queima foliar severa; c. sintomas em fruto de maracujá; d. colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em meio 523 de kado & heskett. fonte: Halfeld-Vieira; Nechet (2006).

Outra característica típica das bactérias deste gênero é a produção de um grupo de pigmentos semelhantes aos carotenóides denominado xantomonadina, um pigmento amarelo associado exclusivamente à membrana externa da parede celular bacteriana (Wang et al., 2017).

A mancha bacteriana é uma importante doença do maracujá (*Passiflora edulis*) causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. O estado do Pará é o décimo segundo maior produtor de maracujá do Brasil (IBGE, 2022). Sua produção concentra-se principalmente no maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), variedade mais apreciada no Brasil. Entretanto, a mancha bacteriana tem limitado o cultivo de vários pomares de maracujazeiro no Brasil, principalmente porque é uma doença de difícil controle, agravando-se em regiões mais quentes (Oliveira et al., 2023).

3.6 Neoplasias e compostos de fungos com atividade anticâncer

Câncer é o termo genérico utilizado para fazer referência a um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. Outros termos usados são tumores malignos e neoplasias. Uma característica dessa doença é a criação de células anormais que crescem além de seus limites usuais e que podem invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar para outros órgãos; o último processo é conhecido como metástase. As metástases são a principal causa de morte por câncer (Who, 2022).

Para o Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2023-2025, aponta que ocorrerão 704 mil casos novos de câncer, com destaque para as regiões Sul e Sudeste, que concentram cerca de 70% da incidência. O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (31,3% do total de casos), seguido pelos cânceres de mama (10,5% do total de casos) e próstata (10,2% cada), cólon e reto (6,5% do total de casos), pulmão (4,6% do total de casos) e estômago (3,1% do total de casos) (Inca, 2022).

Alguns estudos mostram que os fungos endofíticos são capazes de produzir um grande número de importantes metabólitos secundários bioativos, conhecidos apenas em plantas. Um exemplo bem conhecido é a produção do taxol, um importante fármaco anticancerígeno, pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, isolado da planta *Taxus brevifolia*, que também produz esta substância (Chapla; Biasetto; Araujo, 2013).

Há registros também de que alguns metabólitos secundários foram isolados primeiramente de plantas e posteriormente foram isolados de fungos endofíticos de seus hospedeiros, tornando-se uma vantagem, já que alguns fatores tais como geográfico, variações sazonais ou preservação ambiental, tornam o reisolamento de um composto a partir de uma planta um problema complexo (Kharwar et al., 2011).

Como exemplo, tem-se a vincristina (Oncovin®), também conhecido como leurocristina, é um alcaloide, originalmente isolado das folhas da planta *Catharanthus roseus*, (Apocyanaceae). Em 2013, um artigo relatou seu isolamento do fungo endófito *Fusarium oxysporum* de *Catharantus roseus* (Kumar *et al.*, 2013). A vincristina interfere na formação do fuso mitótico e, conseqüentemente, prende células tumorais na metáfase (Kharwar *et al.*, 2011). É eficaz no tratamento da leucemia linfocítica aguda celular e doença de Hodgkin (Shams *et al.*, 2009).

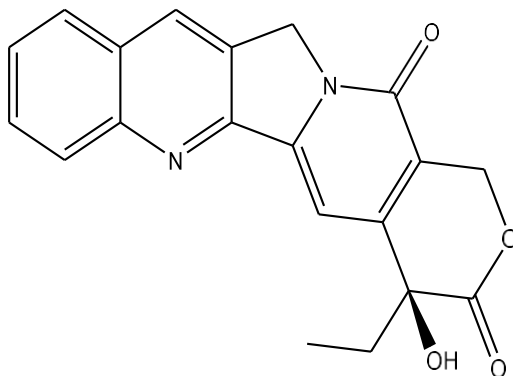
Podofilotoxina, também utilizada no tratamento de câncer, é encontrada em espécies vegetais do gênero *Podophyllum* e também relatada nos endófitos *Trametes hirsuta* e *Phialocephala fortinii*. (Chapla; Biasetto; Araujo, 2013).

Há relatos de outros compostos isolados de endófitos com atividade anticâncer tais como paclixatel (Li; Tao, 2009.) radicicol e monocilina I (Turbyville *et al.*, 2006) ; sequoiatones A e B (Stierle; Stierle; Bugni, 1999); camptotecina (Amna *et al.*, 2006.); chaetopiranina; 9-deacetoxifumigaclavina C; beauvericina; globosumona A e B; brefeldina A (Khawar *et al.*, 2011).

Com o crescente número de novos casos de câncer no mundo é um desafio tratar dessa doença, visto que esta é uma enfermidade complexa e de complicada terapia, pois é classificada por ser um processo progressivo de um conjunto de diferentes doenças que envolvem uma sequência de interações gene ambiente, disfunção de vários sistemas, incluindo o reparo de DNA, funções apoptóticas e imunológicas (Knox, 2010).

Como outro exemplo, temos a camptotecina (figura 10, p. 44), isolada da planta chinesa *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae), que exibe potencial antileucêmico e atividade antitumoral em animais (WALL *et al.*, 1966). Em 2005, este metabólito foi isolado do fungo endofítico *Entrophosphora infrequens*, encontrado na entrecasca de *Nothapodytes foetida* (Icacinaeae) (Puri *et al.*, 2005).

Figura 10- Estrutura molecular da camptotecina



Fonte: Puri *et al.*, 2005

3.7 O Impacto dos microrganismos no Crescimento das Plantas: Potencial alelopático

A alelopatia é um fenômeno ecológico que engloba a produção e liberação de biomoléculas por diversas fontes, como plantas cultivadas, bactérias e fungos, na rizosfera do solo, afetando outros organismos próximos. Este fenômeno refere-se ao impacto, seja benéfico ou prejudicial, da liberação de aleloquímicos que influenciam o crescimento de plantas (Hussain *et al.*, 2021).

Outra fonte que tem sido explorada com esse fim são as toxinas produzidas por fungos patogênicos de plantas. Muitos patógenos produzem substâncias tóxicas, as quais são responsáveis por muitos dos efeitos nocivos diretos nas espécies cultivadas. Essas toxinas podem agir sinergicamente com outras atividades do patógeno, desde que invada o tecido das plantas. Suas utilizações diretas como bioherbicidas ou como estrutura básica para o desenvolvimento de novas classes de herbicidas (Souza Filho, 2007).

As plantas daninhas têm um impacto direto na agricultura devido aos custos significativos associados ao seu controle, resultando em redução na produtividade. O manejo eficaz dessas plantas é essencial para minimizar esses prejuízos. Apesar de os métodos convencionais de controle terem contribuído para melhorar a produtividade das culturas, eles enfrentam desafios que ressaltam a necessidade de opções de manejo diversificadas. A pesquisa sobre espécies com potencial alelopático está ganhando destaque devido à sua capacidade de oferecer soluções práticas e sustentáveis para o controle de plantas daninhas na agricultura (Pereira *et al.*, 2018).

Souza Filho e colaboradores (2007) estudaram a atividade aleopática do filtrado de cultura produzido pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. Foram avaliados os efeitos das toxinas, nas concentrações de 1,0 e 4,0%, sobre a germinação de sementes das plantas daninhas

malícia (*Mimosa pudica*) e mata-pasto (*Senna obtusifolia*). Os resultados mostraram presença de atividade alelopática inibitória, com variações de acordo com a concentração e a planta receptora. A intensidade dos efeitos inibitórios induzidos pelo extrato esteve positivamente associada à concentração, com efeitos mais intensos verificados a 4,0%.

3.8 Ressonância magnética nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é a ferramenta mais poderosa para a determinação de estruturas orgânicas. Assim como na espectroscopia infravermelha, na RMN utiliza-se uma quantidade muito pequena de amostra, e esta não é danificada. O espectro de RMN fornece uma grande quantidade de informações sobre a estrutura do composto, e muitas estruturas podem ser determinadas usando apenas o espectro de RMN (Wade, 2012).

A RMN é usada para estudar uma grande variedade de núcleos, incluindo ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F e ^{31}P . Os químicos orgânicos encontram a RMN do próton (^1H) e do carbono-13 (^{13}C) como as mais úteis, uma vez que o hidrogênio e o carbono são os principais componentes dos compostos orgânicos. Do ponto de vista histórico, a RMN foi inicialmente usada para estudar prótons (os núcleos dos átomos de hidrogênio), e os espectrômetros de ressonância magnética de próton (RMN- ^1H) são os mais comuns. Assume-se que "ressonância magnética nuclear" se refere à "ressonância magnética de próton", a menos que seja especificado um núcleo diferente. (Wade, 2012).

Os espectrômetros comerciais mais potentes no momento são de 1000 MHz ou 1GHz, sendo que 44 equipamentos com maiores frequências estão em desenvolvimento. Os instrumentos acima de 100 MHz usam ímãs supercondutores resfriados com hélio e operam no modo pulsado com transformações de Fourier (FT). A amostra é inserida em uma sonda de RMN (em solução deuterada) em campo magnético e irradiada com pulso curto (da ordem de microssegundos) de radiofrequência de alta energia. O pulso excita simultaneamente os núcleos de um mesmo tipo (por exemplo ^1H) da amostra. Imediatamente após o pulso, os spins excitados sofrem juntos precessão no campo magnético externo, criando uma corrente na bobina da sonda de RMN. O sinal resultante, conhecido como sinal de decaimento livre (FID), é registrado e digitalizado em um computador, o qual executa as transformações de Fourier e processa os espectros resultantes (Silverstein *et al.*, 2019).

O experimento de RMN mais comum nos laboratórios de pesquisa em química orgânica é o de RMN de ^1H , o qual é registrado como uma série de picos cujas áreas são proporcionais ao número de hidrogênios que eles representam. A contagem dos hidrogênios é realizada a

partir da integração que é útil para determinar ou confirmar fórmulas moleculares, detectar picos sobrepostos e efetuar análises quantitativas. As posições dos picos são medidas em unidades de frequência (em Hz) ou de deslocamento químico (em ppm) a partir de um pico de referência, geralmente o pico do tetrametilsilano (TMS), composto de referência em que a absorção dos hidrogênios é zero na escala de RMN. (Silverstein *et al.*, 2019).

O experimento de RMN de ^{13}C fornece informações do esqueleto molecular e apresenta o mesmo embasamento teórico que RMN de ^1H , porém com alguns aspectos distintos como: a) os picos de ^{13}C são singletos e distribuem-se em uma faixa mais ampla (0 a 220 ppm) em comparação com a faixa dos hidrogênios (0 a 16 ppm); b) as intensidades dos picos de ^{13}C não se correlacionam com o número de átomos de carbono na molécula; c) os núcleos de ^{13}C são menos abundantes e sensíveis, logo maiores quantidades de amostra e tempos de irradiação são necessários e d) as multiplicidades dos picos de ^1H e ^{13}C podem ser verificadas em diferente solventes (Silverstein *et al.*, 2019).

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais, reagentes e solventes utilizados

4.1.1 Materiais de cromatografia

- Cromatografia em Coluna por Via Úmida (CCVU): colunas de vidro, diâmetro e altura conforme o peso da amostra (figura 11)

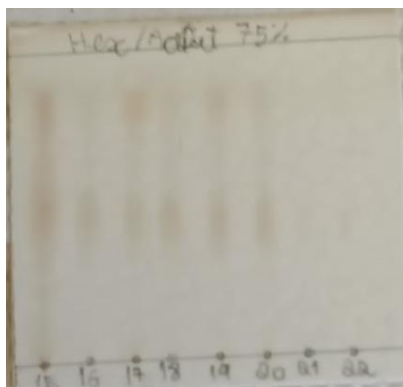
Figura 11-Fracionamento de substância por CCVU



Fonte: Autora (2023)

- Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA): Placas cromatográficas em folhas de alumínio medindo 4 x 4 cm (Silicycle®) (figura 12)

Figura 12- Cromatoplaça das frações



Fonte: Autora (2023)

4.1.2 Solventes

- Metanol, etanol, acetato de etila, hexano e diclorometano de grau PA (TEDIA BRAZIL®) para a extração e procedimentos cromatográficos;
- Álcool 96° (álcool etílico 92,8° INPM) (Santa Cruz®);
- Solventes deuterados: Clorofórmio (CDCl₃) e Metanol (CD₃OD) (Cambridge Isotope Laboratories®) para análise de RMN;
- Solução ácida de Ce(SO₄)₂ para a revelação das placas cromatográficas (Dinâmica®).

4.2 Métodos

4.2.1 Reativação do Fungo

Foi utilizada uma cepa de *A. elegans* codificada como AcCC18.1A, pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Bioensaios e Química de Microrganismos (LaBQuiM) da Universidade Federal do Pará (UFPA). Esta cepa fúngica foi isolada da casca do caule de *Rhizophora mangle* (Ramos, 2021).

O fungo *Actinomucor elegans* foi reativado em meio de cultura sólida composto por Batata, Dextrose e Ágar, utilizando placas de Petri (9 x 9 cm) previamente esterilizadas. O meio foi preparado com 2,925 g de BDA para 75 mL de água destilada, esterilizados em autoclave vertical (PRISMATIC®) a 121 °C e 1 atm. por 15 minutos. Em seguida, em uma capela de fluxo laminar (PANCHANE PA 320), esterilizada com álcool 70% e luz ultravioleta, 25 mL de meio de cultura foram cuidadosamente vertidos em cada placa de Petri, deixando solidificar. Posteriormente, um pequeno disco do material fúngico, com cerca de 0,5 cm de diâmetro, foi inoculado em cada placa de Petri contendo o meio de cultura. As placas foram guardadas em condições estáticas, abrigadas da luz, por um período de 14 dias para o crescimento do micélio em estufa BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) – (Quimis®). Vale ressaltar que, embora o crescimento normal dos fungos seja de 7 dias, este fungo específico apresenta um crescimento mais retardado (figura 13, p. 49).

Figura 13- fungo *Actinomucor elegans* AcCC18.1A em placa de Petri contendo meio BDA após 14 dias de incubação (A) frente, (B) verso



Fonte: Autora (2023)

4.2.2 Identificação molecular do fungo endofítico *Actinomucor elegans* AcCC18.1A

A identificação do fungo endofítico *A. elegans* AcCC18.1A foi realizada através de técnicas de biologia molecular no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental.

4.2.2.1 Extração de DNA

A extração de DNA do fungo a ser identificado foi realizada utilizando o protocolo de Gibbs e Mackenzie (1997) modificado. O fungo foi cultivado no meio BD por 7 dias. Depois desse período o micélio foi filtrado e armazenado em freezer. Em seguida, o micélio foi triturado em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo. Foram adicionados 1.600 µL de tampão de lavagem Wash buffer (10 mM de Tris-HCl pH 8,0; 1 mM de EDTA pH 8,0; 2 M de NaCl) e transferido para microtubo de 2,0 mL e centrifugada a 13.200 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e a amostra ressuspensa com 800 µL de tampão CTAB (2% de CTAB; 1,4 M de NaCl; 0,1 M de Tris-HCl pH 8,0). A amostra foi incubada sob agitação em agitador de tubos por 30 min a 55°C. Após este período, foi centrifugado a 13.200 rpm por 10 min. Foram adicionados 800 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e amostra foi centrifugada a 13.200 rpm por 10 min. Posteriormente, a fase aquosa superior foi transferida para um novo microtubo de 2 mL, foram adicionados 600 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e amostra foi centrifugada a 13.200 rpm por 10 min. A fase aquosa superior foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, foi adicionado 700 µL de isopropanol e 60 µL acetato de amônio, e a amostra incubada por 20 min a -80°C. Após este período, foi centrifugada

a 13.200 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o DNA foi lavado com 1 mL de etanol 70%. Foi centrifugada a 13.200 rpm por 2 min e o sobrenadante foi novamente descartado. O DNA foi seco, ressuspendido em 50 µL água ultrapura e armazenados a -20°C.

4.2.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase

As reações em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) foram realizadas com os *primers* ITS1 e ITS4. As reações foram elaboradas em microtubos de 0,6 mL em um volume total de 25 µL contendo 1 X de tampão Green Go Taq®, 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,1 µM de cada primer, 0,03 U de *Taq* DNA Polymerase (Ludwig) e 2 µL de DNA fúngico (tabela 3). Foram elaborados 2 microtubos para o fungo.

Tabela 3-Componentes e respectivas concentrações utilizadas em uma reação de PCR

Componentes	[] inicial	Volume (µL)
Água ultrapura	-	13,85
Tampão	5 X	5
MgCl ₂	25 mM	3
dNTPs	10 mM	0,5
ITS1	10 µM	0,25
ITS4	10 µM	0,25
Taq DNA Polimerase	5 U	0,15
DNA	-	2
Total	-	25

A amplificação de DNA foi realizada em termociclador Biocycler, seguindo as condições descritas na tabela 4.

Tabela 4- Etapas do PCR para amplificação de DNA, utilizando os primers ITS1 e ITS4

	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo
30 ciclos {	Desnaturação inicial	94	3 min
	Desnaturação	94	30 s
	Anelamento	52	30 s
	Extensão	72	30 s
	Extensão final	72	5 min

Os produtos de amplificação foram avaliados em gel de agarose 0,8% corado com GelRed (Biotium), utilizando o marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). As bandas amplificadas foram visualizadas sob luz UV e fotografadas em fotodocumentador Loccus Biotecnologia Modelo L-Pix Chemi utilizando-se o programa L-Pix Image.

4.2.2.3 Purificação do DNA

A limpeza do produto de PCR foi realizada utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega). Foram adicionados às reações de PCR 40 µL de Membrane Binding Solution. As soluções foram transferidas para um conjunto formado por um microtubo e minicoluna e centrifugadas a 13.200 rpm por 1 min. A solução precipitada foi descartada e foram realizadas 2 lavagens com 700 µL e 500 µL de Membrane Wash Solution, respectivamente. Entre cada uma das lavagens as amostras foram centrifugadas. A minicoluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e foram adicionados 30 µL de Nuclease-Free Water. A amostra foi centrifugada a 13.200 rpm por 1 min, descartada a minicoluna e o DNA purificado foi armazenado a -20°C.

A quantificação de DNA foi realizada em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotium), utilizando o marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). As bandas amplificadas foram visualizadas sob luz UV e fotografadas em fotodocumentador Loccus Biotecnologia Modelo L-Pix Chemi utilizando o programa L-Pix Image. E a quantificação das bandas foi realizada utilizando-se o programa LabImage 1D.

4.2.2.4 Sequenciamento e análise das sequências

A amostra purificada de DNA do fungo endofítico *A. elegans* AcCC18.1A foi encaminhada para a empresa ACTGene (Alvorada, RS) (<https://actgene.com.br/>) para sequenciamento.

As sequências de nucleotídeos foram comparadas com o banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com o auxílio da ferramenta BLAST.

4.2.3 Cultivo do fungo endofítico *Actinomucor elegans* AcCC18.1A em meio sólido (arroz)

Após o décimo quarto dia de incubação em meio BDA, foi feito o cultivo em meio sólido em arroz (Tio João® parbolizado). Foram usados 2 kg que foram distribuídos uniformemente em 11 frascos de Erlenmeyer de 1000 mL, 200 g de cereal por frasco, em seguida adicionou-se 75 mL de água destilada. Todos os frascos de Erlenmeyer foram

autoclavados a 121 °C por 45 minutos. Deixou-se o material atingir a temperatura ambiente e introduziram-se por frasco três pequenos fragmentos de aproximadamente 0,5 cm² do fungo para 10 frascos, sendo utilizado 1 frasco para o controle (branco) sem a adição do fungo. O fungo foi cultivado por 25 dias em modo estático e ausente de luz (figura 14).

Figura 14- Crescimento das colônias do fungo *Actinomucor elegans* em meio sólido (arroz) após 30 dias de incubação



Fonte: Autora (2023)

4.2.4 Obtenção dos extratos Etanolicos e Fracionamentos

Após o tempo de incubação, foram obtidos os extratos da biomassa. Inicialmente foram acrescentados 400 mL de etanol (92,8° INPM, Santa Cruz®) (figura 17, p. 54) em cada frasco de Erlenmeyer com o objetivo de matar os microrganismos garantindo não haver risco de contaminação durante a manipulação e obter o extrato orgânico. Após 72 horas, o material foi filtrado à vácuo com o uso de papel de filtro e de funil de Büchner, (figura 16, p.53) obtendo uma solução de EtOH e a solução obtida foi evaporada em evaporador rotativo (figura 15, p.53). Esse procedimento foi realizado por 2 (duas) vezes. As soluções etanólicas concentradas foram submetidas a partição líquido – líquido com hexano e acetato de etila (AcOEt), para obtenção das fases hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica, em seguida concentradas para a obtenção dos extratos.

Figura 15- Solução evaporada em evaporador rotativo



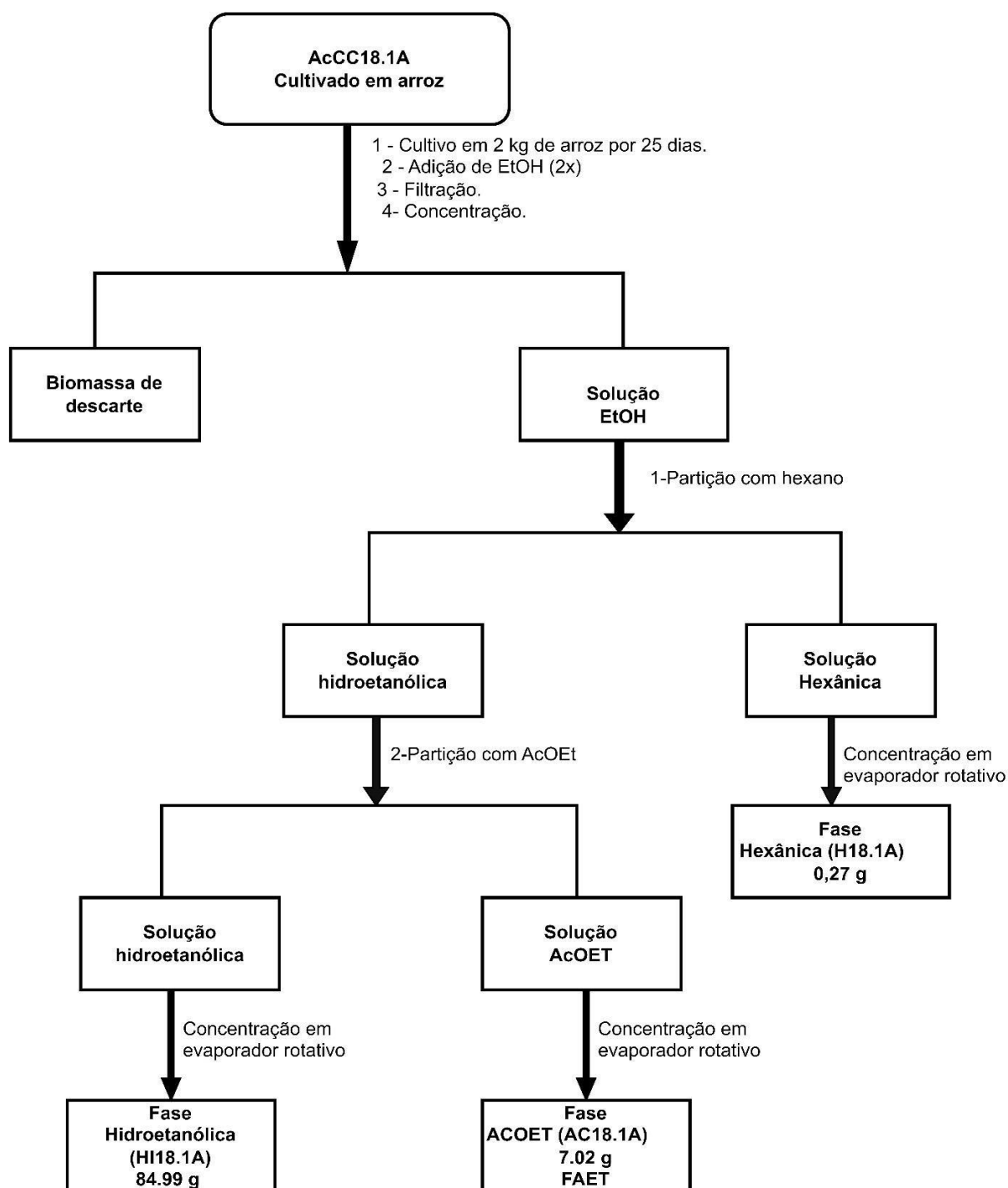
Fonte: Autora (2023)

Figura 16- Filtração à vácuo para obtenção da solução ETOH



Fonte: Autora (2023)

Figura 17- Fluxograma de obtenção dos extratos fúngicos de *Actinomucor elegans* AcCC18.1A cultivado em arroz.

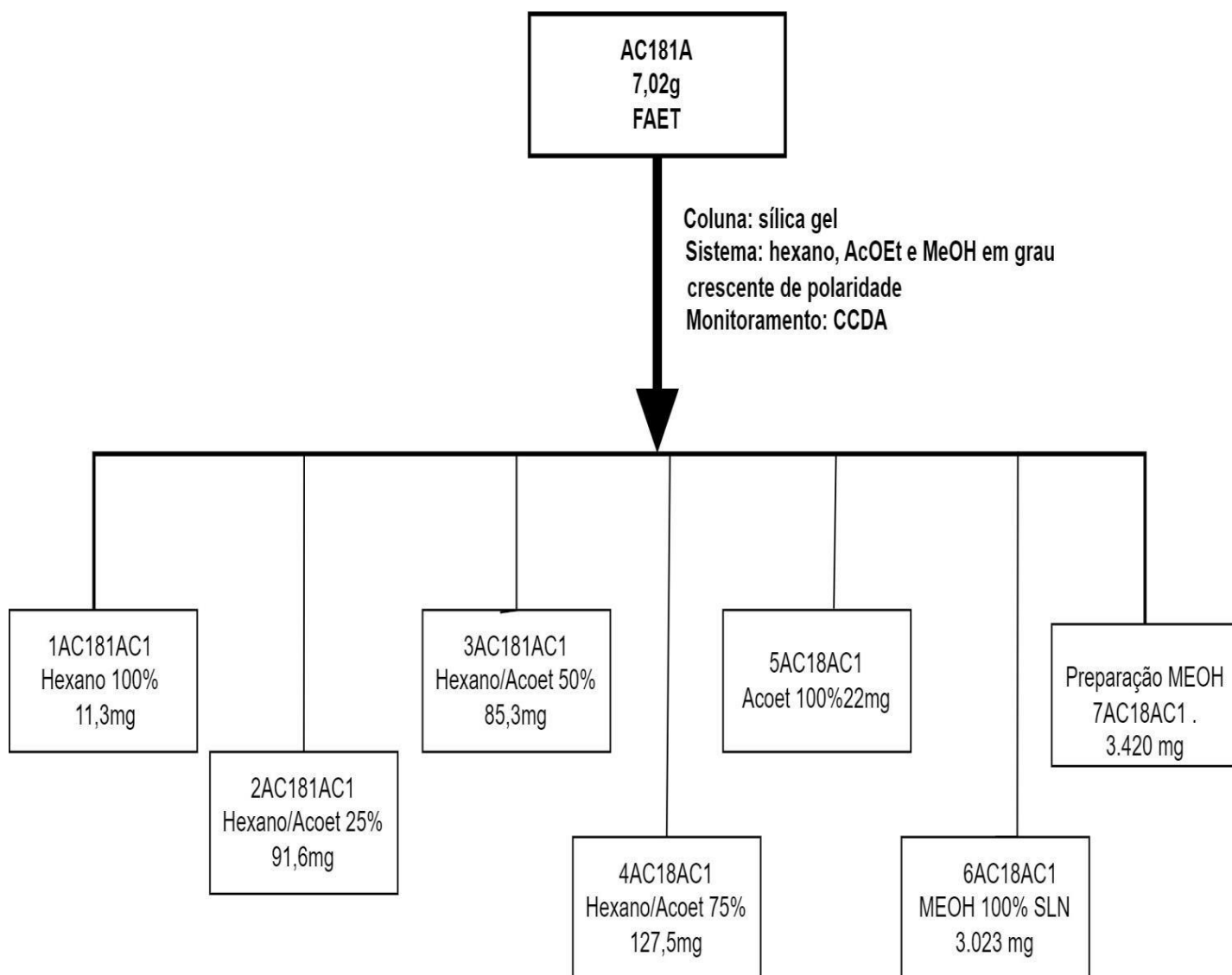


Fonte: Autora (2023)

4.2.5 Fracionamento dos extratos do fungo *Actinomucor elegans* AcCC18.1A

A fase acetato de etila (FAET) foi fracionada utilizando cromatografia em coluna por via úmida (as fases estacionárias e móvel foram escolhidas de acordo com a polaridade do extrato) (figura 18) e monitorados por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA). As substâncias isoladas foram identificadas através de técnicas espectroscópicas de RMN e EM.

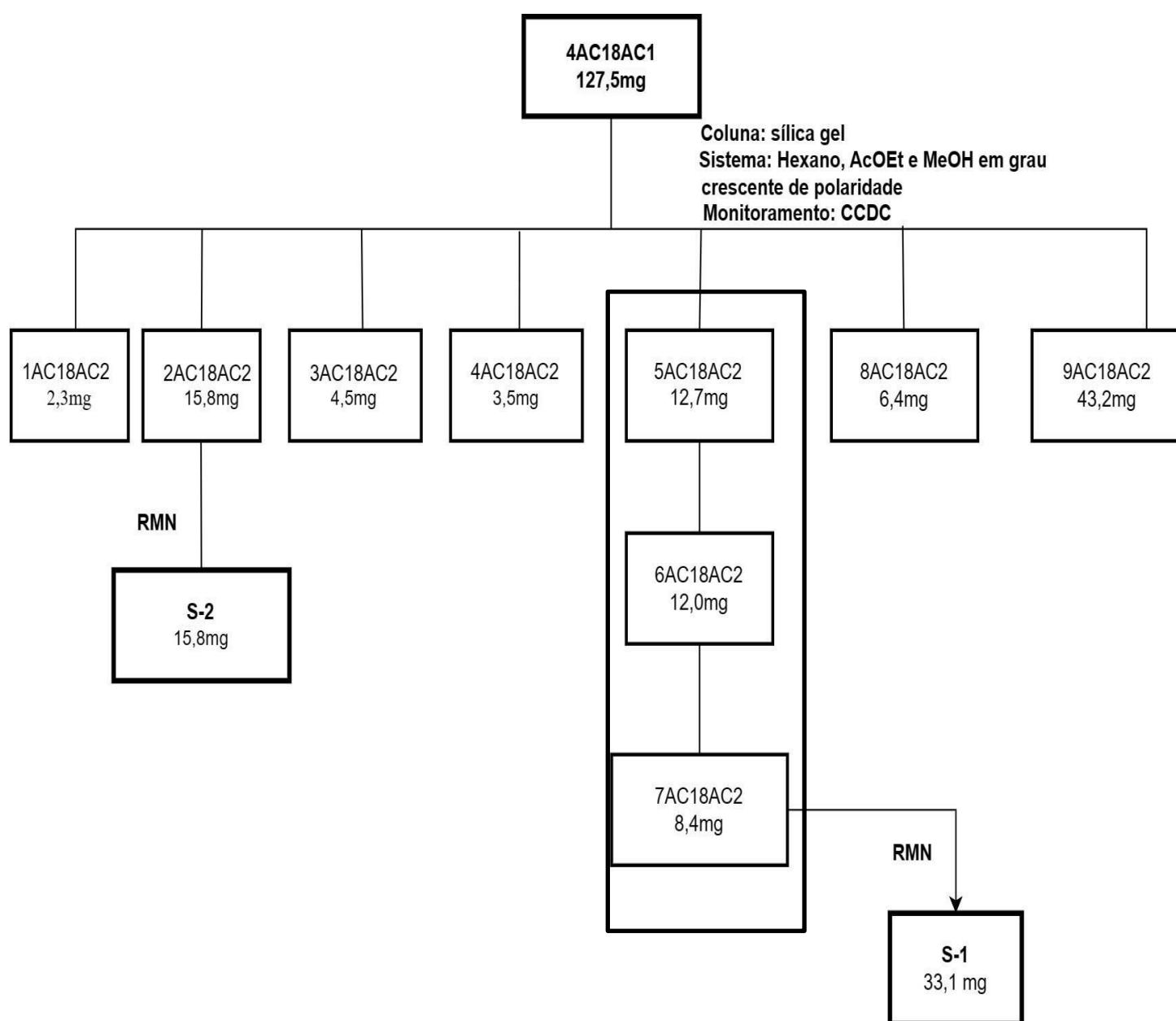
Figura 18- Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato etanolico da fase acetato AcCC18.1A (AC18.1A FAET).



Fonte: Autora (2023)

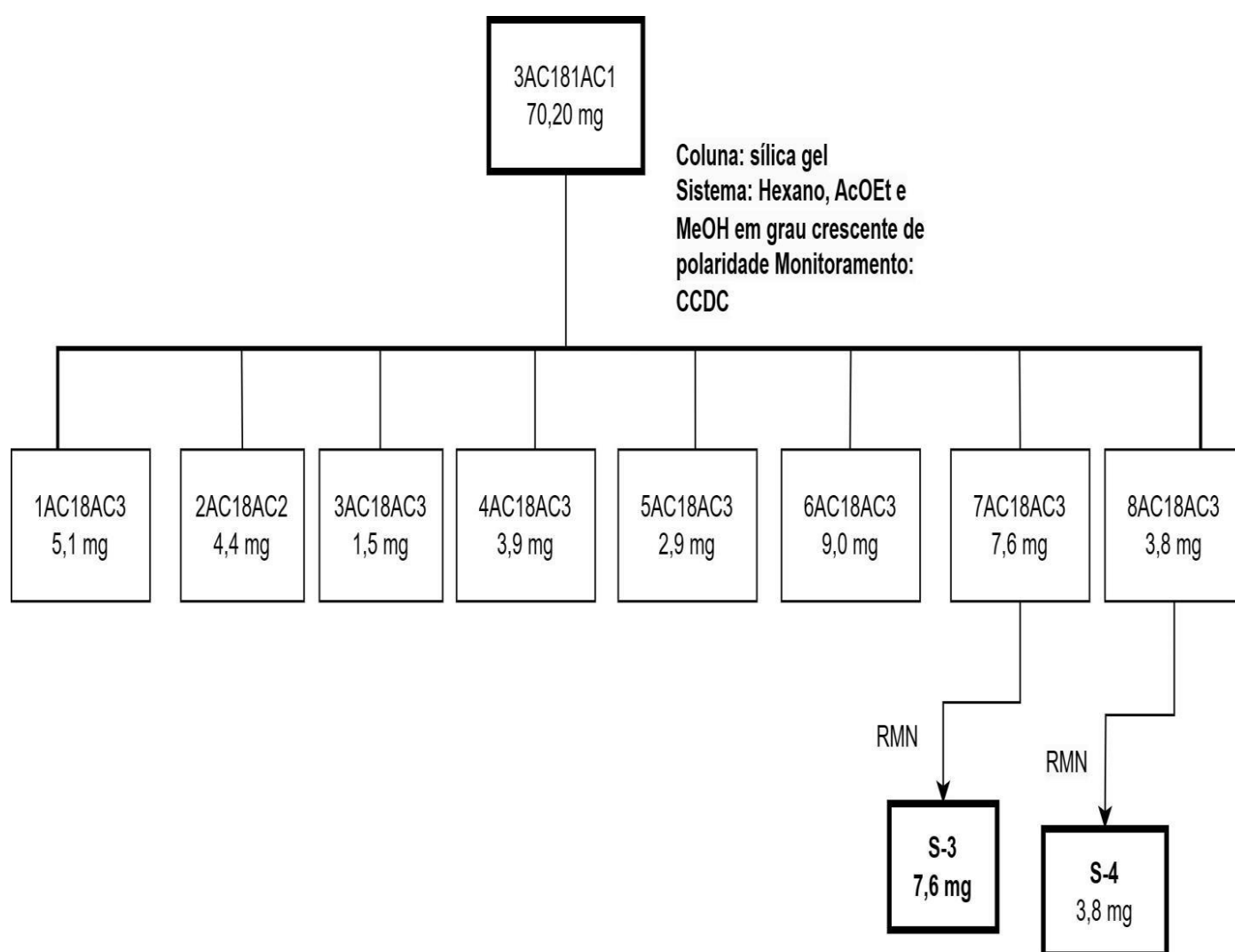
A amostra 4AC18AC1 (127,5 mg) foi fracionado utilizando cromatografia em coluna por via úmida (CCVU 01) com sílica gel como fase estacionária e misturas de hexano, AcOEt e MeOH em grau crescente de polaridade como eluentes. Esse processo resultou em 69 subfrações, as quais foram evaporadas em uma Capela de Fluxo, posteriormente analisadas por CCDA e agrupadas em 9 conjuntos (figura 19). As subfrações 2AC18AC2 (15,8 mg) e 5AC18AC2 (33,1 mg), solúveis em diclorometano, foram analisadas por RMN e denominadas de S-1 e S-2, respectivamente.

Figura 19- Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração 4AC18AC1



A amostra 3AC181AC1 (85,3 mg) foi submetido à fracionamento utilizando cromatografia em coluna por via úmida (CCVU 02) com sílica gel como fase estacionária e misturas de hexano, AcOEt e MeOH, em grau crescente de polaridade como eluentes. Esse processo resultou em 51 subfrações, as quais foram evaporadas em uma Capela de Fluxo, posteriormente analisadas por CCDA e agrupadas em 8 conjuntos (figura 20). As subfrações 7AC18AC3 (7,6 mg) e 8AC18AC3 (3,8 mg), solúveis em diclorometano, foram analisadas por RMN e denominadas como **S-3** e **S-4**, respectivamente.

Figura 20- Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração 3AC181AC1



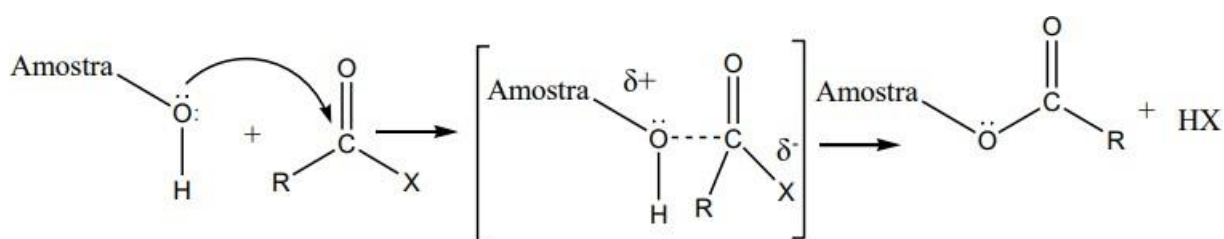
Fonte: Autora (2023)

4.2.6 Derivatização estrutural de substâncias

Para as derivatizações estrutural foi escolhida a substância **S-1** por apresentar atividade antimicrobiana e anticâncer. Utilizado os reagentes anidrido acético (Tedia®), anidrido butírico (Sigma®) e cloreto de benzoila (Aldrich®).

As reações realizadas foram do tipo substituição nucleofílica ao grupo acila (figura, 21) que consiste na substituição de X no $R - CO - X$ [grupo acetil (CH_3CO-), butanoil (C_4H_7O-) ou benzoil (C_6H_5CO-)] por um nucleófilo.

Figura 21- Esquema geral de mecanismo da reação de substituição



Fonte: Feitosa *et al.* (2016) modificado

Para as reações de acetilação, butanoilação e benzoilação foram utilizados 20 mg da substância **S-1**, que foram solubilizados em 100 μL de piridina (Tedia®), em seguida adicionou-se 250 μL de reagente (anidrido acético ou anidrido butírico ou cloreto de benzoila) agitou-se e aguardou um período de 5 dias em temperatura ambiente para ocorrer a reação. Após esse período o material foi transferido para um balão de decantação e adicionou-se 15mL de H_2O ultrapura e realizou-se extração com diclorometano (Tedia®) (3x 15 mL) (FEITOSA *et al.*, 2016, modificado), filtrou-se o material e o solvente foi evaporado, obtendo-se 33,8 mg do produto **S-5**; 42,5 mg do produto **S-6** e 158,6 mg do produto **S-7** posteriormente as substâncias foram analisadas por CCDA e RMN. A substância **S7** foi purificada utilizando Cromatografia em Coluna por Via Úmida usando Sistema: hexano, AcOEt e MeOH em grau crescente de polaridade. A substância de interesse foi recuperada na fração Hex/AcOEt 30%. Após a purificação, a massa obtida foi de 30,51 mg.

4.2.7 Ensaios antimicrobianos

Os ensaios antimicrobianos foram realizados no LaBQuiM, sendo utilizadas cepas certificadas das bactérias *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) cedidas pelo Instituto Evandro Chagas-PA. A Doutora Alessandra Keiko Nakasome da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Pará (EMBRAPA-PA) cedeu quatro isolados de cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae* de diferentes municípios do estado Pará, cujos códigos foram: PA 1, Igarapé-Açu; PA 5.2, Maracanã; PA 18, São Francisco do Pará; e PA 20, Tomé-Açu.

O extrato e as substâncias obtidas foram avaliados pelo método de diluição sucessiva em micro caldo recomendada pela Subcomissão de Teste à Susceptibilidade Antifúngica do Comitê Nacional dos EUA para Padrão Clínico Laboratorial (CLSI, 2017).

4.2.7.1 Ativação das bactérias

As bactérias testadas nos ensaios foram ativadas em placa Petri de 9 cm de diâmetro, contendo ágar BHI (5 g de ágar em 100 mL de caldo BHI, ambos da KASVI®), sendo incubadas por um período de 24 h, a 37 °C em BOD (Biochemical Oxygen Demand, QUIMIS®). Após esse tempo foram transferidas aproximadamente três colônias de cada bactéria para tubos de ensaio contendo 3 mL de caldo BHI (37 g de BHI em 1 L água destilada), com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril; a solução foi homogeneizada e incubadas por 24 h, a 37 °C.

4.2.7.2 Padronização das culturas

Após 24 h foi realizada a padronização das concentrações das culturas para aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC (unidades formadoras de colônias), por meio da comparação com o grau de turvação da solução de BaSO₄ a 1%, padrão 0,5 da escala McFarland (CLSI, 2017). A solução de sulfato de bário foi obtida da mistura das soluções de H₂SO₄ a 1% (9,95 mL) e BaCl₂, também a 1% (0,05 mL). Por fim, a solução bacteriana foi diluída, sucessivamente com caldo BHI, até a concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL.

4.2.7.3 Preparo das amostras

Foram utilizados 0,5 mg do extrato a ser testado e de cada substância isolada e purificada para serem dissolvidas em 100 µL de DMSO (Tedia®), contidos em tubos de Eppendorf. Posteriormente foram adicionados 900 µL de caldo BHI esterilizado. A cada adição de solução ao extrato, foram homogeneizadas em agitador tipo Vórtex – (IKA genus 3®). Sendo obtido

uma solução de 500 µg/mL para os extratos e para as substâncias isoladas (PINHEIRO et al. 2017). Foram utilizados como controle positivo Terramicina (Tetramed®) e Amoxicilina (OCYLIN®) sendo preparadas da mesma forma que as amostras.

4.2.7.4 Ensaios para medir a concentração inibitória mínima (CIM)

Nas placas de Elisa de 96 furos foram adicionados 100 µL de caldo BHI em cada cavidade. Em seguida acrescentou-se na primeira cavidade da coluna A 100 µL da solução contendo as amostras a serem testadas e homogeneizou-se essa solução. Após isso foram realizadas diluições sucessivas, retirando-se 100 µL da primeira cavidade (A) transferindo esse volume para a próxima, homogeneizando. Esse procedimento é repetido até a penúltima cavidade da placa, de onde foram retirados 100 µL de solução e descartados (figura 22). A última linha da placa foi usada como controle negativo.

Em cada cavidade foi adicionado 5 µL da suspensão bacteriana e as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A leitura dos resultados foi realizado adicionando 10 µL TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride; cloreto de 2,3,5- trifeniltetrazólico).

Figura 22- Representação da microdiluição realizada em placa de Elisa

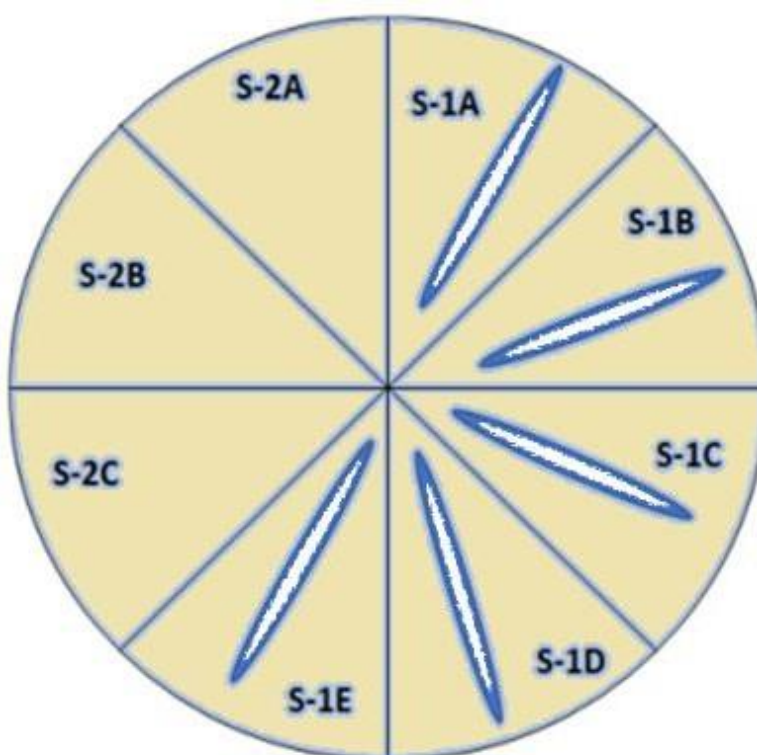
Concentrações		Amostras										Controle positivo Antibióticos	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
250 µg/mL	A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
125 µg/mL	B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
62,5 µg/mL	C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
31,2 µg/mL	D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
15,6 µg/mL	E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
7,8 µg/mL	F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
3,9 µg/mL	G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Controle negativo Bactéria + meio	H	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Fonte: Marinho (2005) modificado

4.2.7.5 Tipo de atividade

Após a adição do corante foi realizada a leitura do ensaio, a solução ficou vermelha quando não houve atividade e nas cavidades em que não apresentou mudança de coloração as amostras foram inoculadas em placa Petri contendo meio de cultura ágar BHI e incubadas a 37 °C por 24h (figura 23). Onde houve crescimento bacteriano registrou-se que a substância possui efeito bacteriostático, e onde não houve crescimento de bactéria registrou-se que a substância possui efeito bactericida.

Figura 23- Representação das atividades observadas

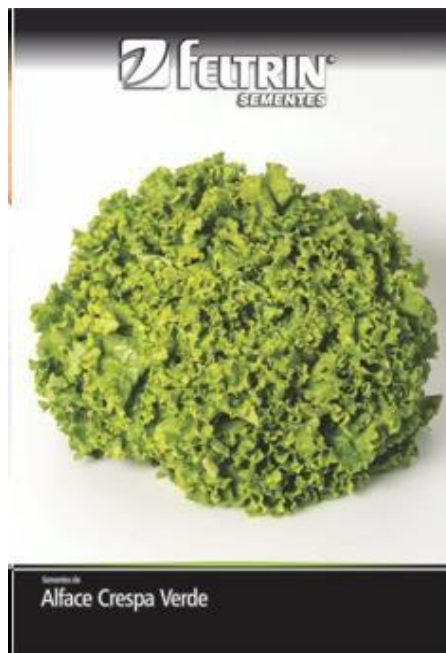


Fonte: Marinho (2005) modificado

4.2.8 Ensaio da inibição do crescimento vegetal (alelopatia)

A inibição do crescimento vegetal foi verificada através da avaliação dos efeitos do extrato do fungo *Actinomucor elegans* sobre a germinação de sementes de *Lactuca sativa* (Feltrin sementes de alface crespa verde (figura 24), de acordo com a metodologia descrita nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009).

Figura 24- Sementes feltrin empregadas no ensaio



Fonte: Disponível em: <https://loja.sementesfeltrin.com.br/>, acessado no dia 10/11/2023

4.2.8.1 Análise da inibição do crescimento vegetal do extrato do fungo *Actinomucor elegans* AcCC 18.1A sobre a germinação de sementes de *Lactuca sativa*.

4.2.8.1.1 Preparação da solução do extrato

O extrato foi preparado nas concentrações de 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL, 2000 µg/mL e 3000 µg/mL, em solução de Tween 80 (Tedia®), à 5,3 %.

4.2.8.1.2 Condicionamentos das sementes

O delineamento foi realizado para cinco repetições de cada concentração e cinco controles, sendo utilizadas 25 sementes por repetição. As quais foram imersas em um recipiente contendo as soluções de suas específicas concentrações durante 24 horas (figura 25, p.63)

Figura 25- Sementes *Lactuca sativa*



Legenda: Sementes *Lactuca sativa* imersas em solução do extrato de diferentes concentrações.

Fonte: Autora 2023

As 125 sementes utilizadas no controle foram mergulhadas em 10 mL de solução de Tween 80, 5,3 %, sem contato com o extrato, durante o mesmo tempo das sementes submersas nas soluções com extrato.

Após o período de imersão, as sementes foram removidas e distribuídas sobre papel de filtro para eliminar o excesso de substâncias. Em seguida, as sementes foram colocadas para germinar entre três camadas de papel para germinação circular com diâmetro de 9 cm (marca J Prolab), sendo duas camadas na base e uma para cobrir, todas previamente umedecidas com 4 mL de água destilada. Os papéis contendo as sementes foram acondicionados em placas de Petri (figura 26, p.64), cobertos e mantidos no escuro dentro de uma estufa a uma temperatura constante de 20 °C.

Figura 26- Sementes de *Lactuca sativa* em placa de petri



Legenda: Sementes de *Lactuca sativa* acondicionadas em placa de Petri, antes de serem cobertas com papel de germinação e tampadas.

Fonte: Autora 2023

A avaliação foi realizada diariamente, começando no 1º dia após a semeadura até o 7º dia através da contagem do número de sementes germinadas. A cada 48 h acrescentou-se 1 mL de água destilada às placas para garantir a umidade necessária para germinação (Almeida *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2017, modificado).

4.2.8.2 Análise da taxa e do índice de velocidade de germinação

Com os números de sementes germinadas foi calculada a taxa de germinação (G) e o índice de velocidade de germinação (IVG). A taxa de germinação foi calculada utilizando a equação 2 de Labouriau e Valadares (1976):

$$G (\%) = (N/A) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

N = Número de sementes germinadas ao final do experimento;

A = Número de sementes dispostas para germinar.

O índice de velocidade de germinação foi calculado utilizando a equação 3 de Maguire (1962):

$$IVG = \sum(N_i/i) \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

N_i = Número de sementes germinadas no dia i ;

i = Número de dias após a semeadura.

Foi realizada a análise de variância e agrupamento das médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico da Ufscar (Disponível em: <https://www.cca.ufscar.br/pt-br/servicos/teste-de-tukey>), acesso: 26/01/2024

4.2.9 Ensaio de citotoxicidade por MTT

Foi verificada a citotoxicidade das substâncias, **S-1**, **S-2** e **S-3** em duas linhagens celulares tumorais e uma linhagem não neoplásica para comparação por meio do ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il) -2,5-defenitetrazolio) realizado em parceria com o professor André Salim Khayat no Núcleo de Pesquisas em Oncologia (NPO).

4.2.9.1 Cultura Celular

As linhagens celulares tumorais utilizadas no estudo foram AGP-01 (adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal), ACP02 (Adenocarcinoma gástrico do tipo difuso) e a linhagem não tumoral MRC5 (fibroblasto pulmonar humano). As células foram cultivadas em culturas aderentes de monocamada em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco®), suplementado com soro bovino fetal a 10% e penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL) (Gibco®), sendo mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂.

4.2.9.2 Avaliação da Atividade citotóxica – Ensaio do MTT

Ensaio de citotoxicidade têm como objetivo central avaliar a atividade citotóxica de diferentes compostos, a fim de analisar danos que podem afetar a viabilidade da célula, alterando sua integridade estrutural e/ou metabólica. O ensaio do MTT consiste em um método colorimétrico que se baseia na redução do sal brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-defenitetrazolio, que é hidrossolúvel e de cor amarela em cristais de formazan, um produto cromogênico e insolúvel de coloração púrpura, por células metabolicamente ativas (Kumar; Nagarajan; Uchil, 2018).

Inicialmente foi realizado um experimento de curva dose-resposta, com o objetivo de avaliar o padrão de viabilidade celular frente ao tratamento com as substâncias. Para tanto, as células foram semeadas em placas de 96 cavidades a uma densidade de 3×10^3 células/poço por 24 horas para adesão na placa. Posteriormente, as células foram tratadas com as moléculas em teste em uma curva de concentrações indo de 3,125 - 20 µg/mL, com incubação a 37°C por 72 horas.

As substâncias testadas foram dissolvidas em dimetil sulfóxido (DMSO) para obtenção da concentração estoque e os experimentos foram realizados em triplicata. O controle negativo foi à amostra não tratada. Após o período de tratamento foram adicionados 100 µL da solução de MTT (solução estoque 5 mg/mL, diluída 1:10 em meio DMEM) a cada poço da placa e incubados a 37 ° C por 3 h. A análise foi realizada em espectrofotômetro de placa (SYNERGY/HT microplate reader) a um comprimento de onda de 570 nm.

4.2.9.3 Análise dos Dados

O percentual de inibição induzido pelas substâncias em teste sobre as linhagens, no experimento em dose única, foi obtido por meio da equação 1 no programa Microsoft Excel versão 10.

$$ABS\ Tratado \times 100 \div ABS\ CN \quad \text{Equação 1}$$

Onde: ABS –Absorbância, CN – Controle Negativo.

Já a concentração inibitória média (CI₅₀) e seus respectivos intervalos de confiança (CI_{95%}) foram determinados por meio de uma equação sigmoidal de dose-resposta (regressão não linear), dada por meio da equação 2 no Programa GraphPad Prism, versão 8.

$$Y = 100 \div 1 + 10^{(LogCI_{50} - x) * HillSlope} \quad \text{Equação 2}$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação molecular do fungo *Actinomucor elegans* AcCC18.1A

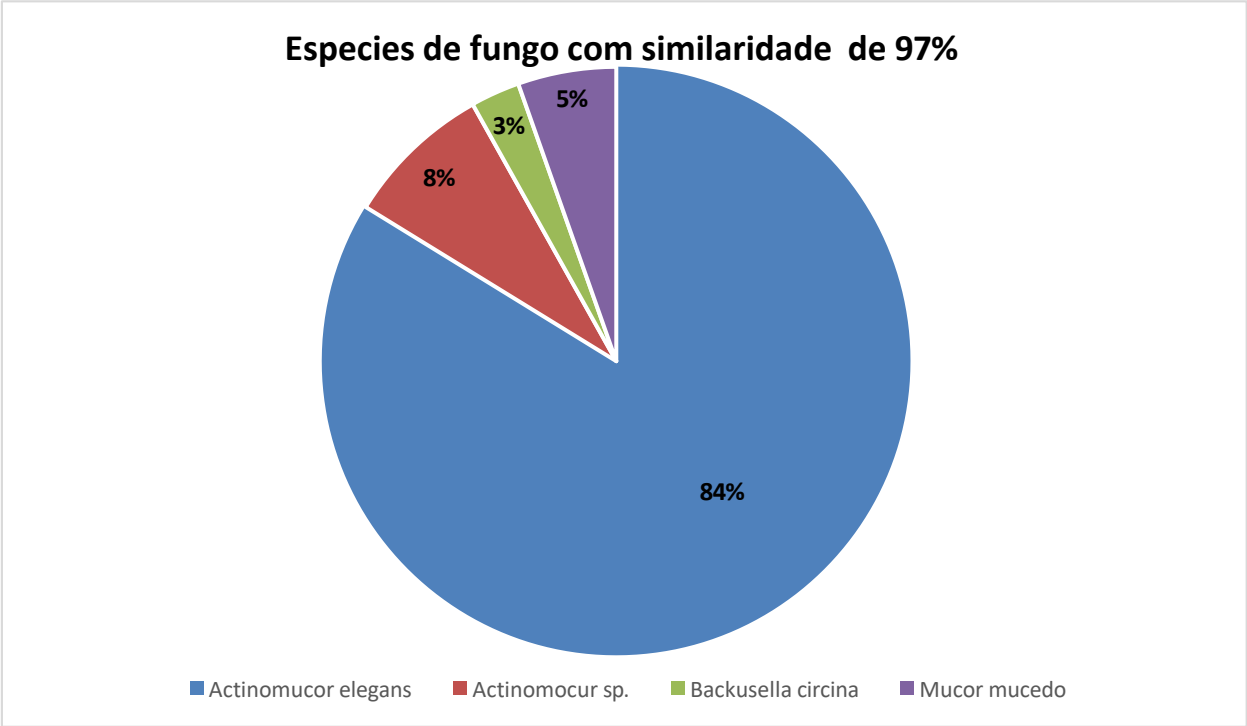
Na análise das sequências do fungo AcCC18.1A, identificou-se uma similaridade de 97% com 4 espécies distintas (tabela 5). Do banco de dados, foram recuperadas 100 sequências de nucleotídeos, sendo que 37 delas apresentaram uma similaridade de 97%. A espécie predominante entre essas sequências foi a *Actinomucor elegans* (figura 27). No entanto, para uma identificação precisa da espécie, seria necessário realizar uma análise filogenética mais detalhada.

Tabela 5- Identificação do fungo endofítico AcCC18.1A de *Rhizophora mangle*

Isolado	Espécie	Número de Ocorrências	% de similaridade
AcCC18.1A	<i>Actinomucor elegans</i>	31	97%
	<i>Actinomocur sp.</i>	3	
	<i>Backusella circina</i>	1	
	<i>Mucor mucedo</i>	2	

Fonte: Autora (2023), disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
Acesso em: 15/02/2024

Figura 27- Número de Espécies de Fungos com Similaridade de 97% na Busca da Base de Dados NCBI utilizando a Ferramenta BLAST

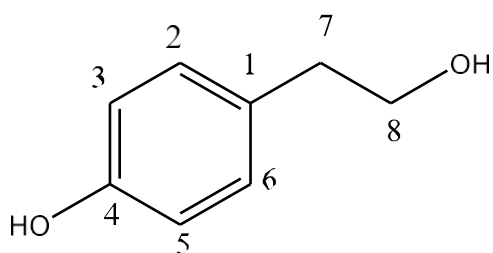


Fonte: Autora (2023)

5.2 Identificação das substâncias obtidas no trabalho

O estudo químico do fungo *Actinomucor elegans* AcCC18.1A resultou no isolamento de quatro substâncias e na Semissíntese de três substâncias, todas pertencentes às classes de compostos fenólicos (figura 28).

Figura 28-Substâncias isoladas e identificadas neste trabalho

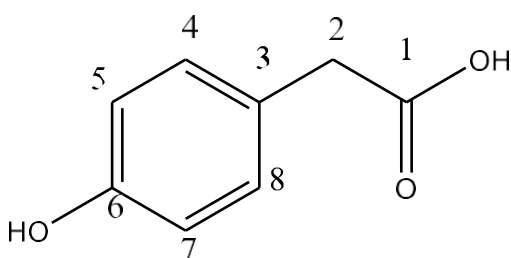


Substância **S-1**: Tirosol

Origem: Extrato FAET fração Hex/AcOEt 75%

Discussão espectral (p. 71)

Massa obtida: 33,1 mg



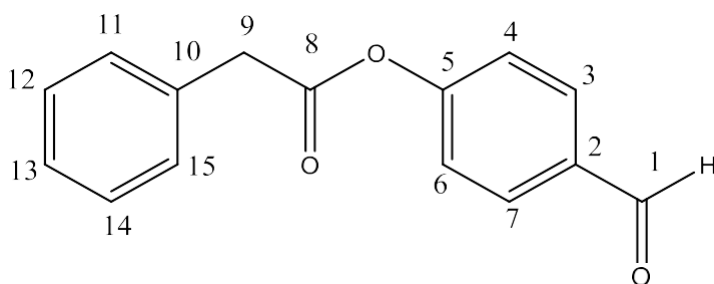
Substância **S-2**: Ácido 4-hidroxifenilacético

Origem: Extrato FAET fração Hex/AcOEt

75%

Discussão espectral (p. 79)

Massa obtida: 15,8 mg



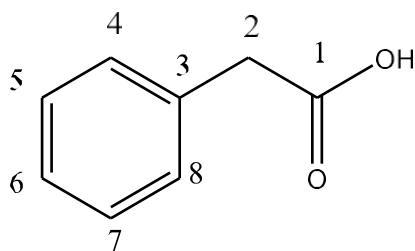
Substância **S-3**: 4-formilfenil-2-fenilacético

Origem: Extrato FAET da fração Hex/AcOEt

50%

Discussão espectral (p. 87)

Massa obtida: 7,3 mg



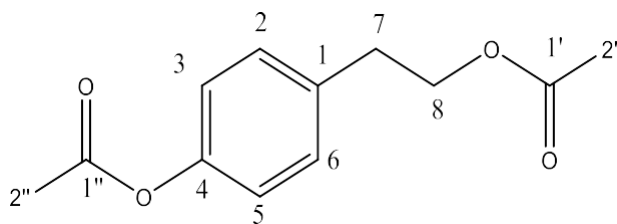
Substância **S-4**: ácido fenilacético

Origem: Extrato FAET da fração Hex/AcOEt

50%

Discussão espectral (p. 96)

Massa obtida: 3,8 mg

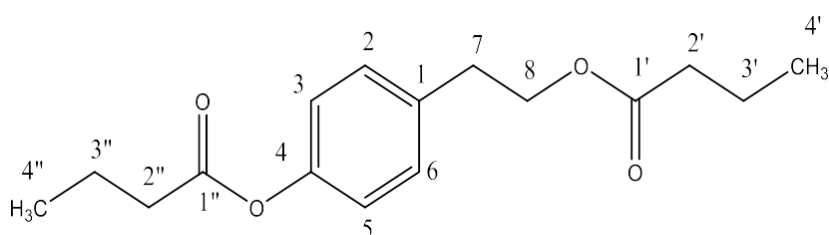


Substância **S-5**: 4-(2-acetoxietil) fenilacetato

Origem: Modificação estrutural, reação de acetilação da substância **S-1**

Discussão espectral (p. 104)

Massa obtida: 33,8 mg

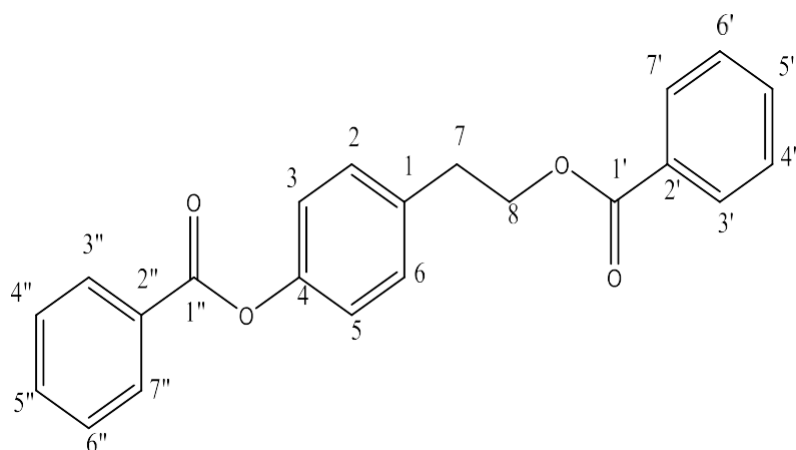


Substância **S-6**: 4-(2-(butiriloxy)etil) fenilbutirato

Origem: Modificação estrutural, reação de butanoilação da substância **S-1**

Discussão espectral (p. 116)

Massa obtida: 42,5 mg



Substância **S-7**: 4-(2-(benzoiloxy)etil) fenilbenzoato

Origem: Modificação estrutural, reação de benzoilação da substância **S-1**

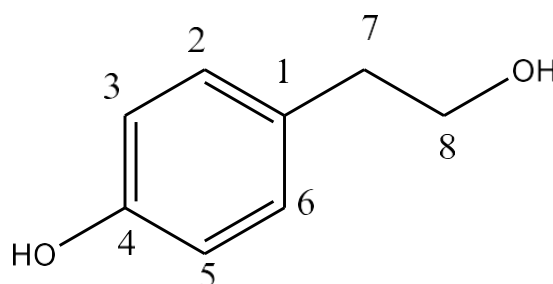
Discussão espectral (p. 128)

Massa obtida: 30,51 mg

5.2.1 Substância S-1: Tirosol

A substância S-1 (figura 29), isolada do extrato FAET da fração Hex/AcOEt 75% como um sólido marrom claro, demonstrou solubilidade em diclorometano. A análise do espectro de RMN ^1H (figura 32, p. 74) revelou características típicas de compostos aromáticos, notavelmente dois dupletos em δ_{H} 7,04 (2H, *d*, 8,4 Hz; H-2 e H-6) e δ_{H} 6,73 (2H, *d*, 8,4 Hz; H-3 e H-5), indicando a presença de um anel aromático *para*-substituído. Além disso, foram observados sinais de hidrogênios metilênicos em δ_{H} 3,71 (2H, *t*, 7,2 Hz; H-8) e em δ_{H} 2,73 (2H, *t*, 7,2 Hz; H-7). Esses hidrogênios metilenos apresentaram correlação por COSY, sugerindo a existência de um grupo $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ benzílico.

Figura 29- Estrutura de S-1



Fonte: Autora (2023)

No espectro de RMN de ^{13}C (figura 33, p. 75), é possível observar seis sinais correspondentes para oito carbonos, dos quais seis são aromáticos e dois são alifáticos, com deslocamentos químicos em δ_{C} de 114,7 (C-3 e C-5), 129,5 (C-2 e C-6), 155,3 (C-4), 129,6 (C-1), 37,9 (C-7) e 63,2 (C-8). Nota-se a presença de dois carbonos equivalentes, C-3 e C-5 e C-2 e C-6.

Ao analisar o espectro de COSY (figura 34, p. 76) observou-se correlações entre os sinais δ_{H} 2,73 (H-7) e os sinais δ_{H} 3,71 (H-8), bem como correlações entre os sinais dos hidrogênios aromáticos, com deslocamentos químicos em δ_{H} 7,04 (H-2 e H-6) e δ_{H} 6,73 (H-3 e H-5).

No espectro de HSQC (figura 35, p. 77), destaca-se as correlações dos sinais dos hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,04 (H-2 e H-6) com sinal em δ_{C} 129,5 (C-2 e C6) e δ_{H} 6,73 (H-3 e H-5) com sinal em δ_{C} 114,7 (C-3 e C-5). Também foi possível determinar as correlações dos hidrogênios metilênicos em δ_{H} 3,71 (H-8) com sinal em δ_{C} 63,2 (C-8) e o sinal em δ_{H} 2,73 (H-7) com sinal em δ_{C} 37,9 (H-7).

No espectro de HMBC (figura 36, p. 78), apresenta a correlação entre o sinal do hidrogênio em δ_H 7,04 (H-2 e H-6) com os sinais de carbonos em δ_C 37,9 (H-7) e δ_C 129,6 (C-1), verificou-se também correlação do sinal de hidrogênio em δ_H 6,73 (H-3 e H-5) com os sinais em δ_C 129,5 (C-2 e C-6) e δ_C 155,3 (C-4), bem como a correlação do sinal em δ_H 2,73 com os sinais em δ_C 63,2 (C-8) e δ_C 129,6 (C-1). Destaca-se a presença de um carbono oxiquaternário a δ_C 155,3 (C-4), indicando que um dos substituintes é o grupo hidroxila (-OH). Com base nessas análises espectroscópicas, confirma-se que o tirosol (**S-1**) é um composto com um anel aromático para-dissubstituído, sendo um dos substituintes, sendo um dos substituintes o grupo hidroxila (-OH), conforme indicado pelo sinal de carbono oxiquaternário.

A análise dos dados espectroscópicos e a comparação com a literatura (Park *et al.*, 2011) permitiram identificar a substância **S-1** como o álcool *p*-hidroxi-fenil-etílico, também conhecido como tirosol. O tirosol é um composto fenólico associado a quorum-sensing de origem fúngica, além de ser encontrado em azeites, apresentando potencial antioxidante, propriedades antimicrobianas e a capacidade de promover o crescimento de fungos (Arruda *et al.*, 2021).

A seguir encontram-se as representações de todas as correlações de COSY (figura 30) e HMBC (figura 31, p.73), além da tabela 6 (p. 73) que contém a descrição dos dados de RMN 1H e ^{13}C da substância **S-1** comparados com os dados da literatura (Park *et al.*, 2011).

Figura 30- Principais correlações de COSY de **S-1**

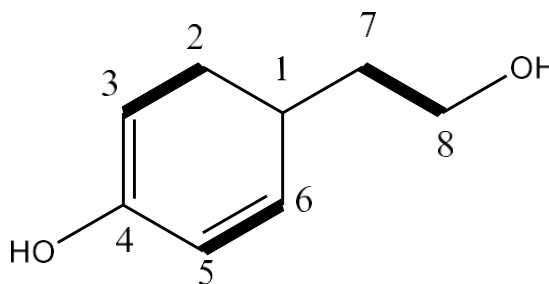
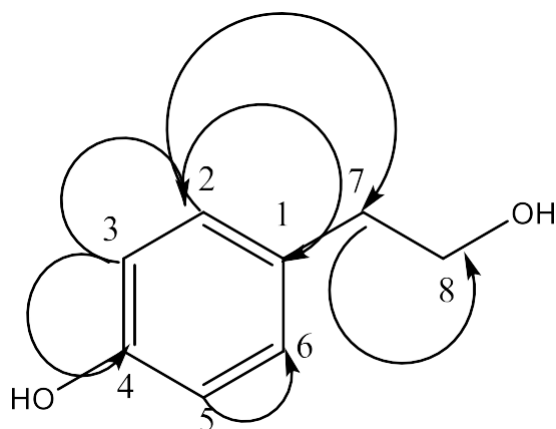


Figura 31- principais correlações de HMBC de **S-1**

Fonte: Autora (2023)

Tabela 6- Dados de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de **S-1** em comparação com a literatura (Park *et al.*, 2011)

	S-1	Park <i>et al.</i>, 2011	S-1	Park <i>et al.</i>, 2011
	<i>H</i> (δ , mult., <i>J</i> em Hz)	<i>H</i> (δ , mult., <i>J</i> em Hz)	<i>C</i>	<i>C</i>
1	-	-	129,6	130,7
2	7,04 (<i>d</i> , 8,4)	7,02 (<i>dd</i> , 8,0; 2,1)	129,5	129,7
3	6,73 (<i>d</i> , 8,4)	6,70 (<i>dd</i> , 8,0; 2,1)	114,7	114,9
4	-	-	155,3	155,6
5	6,78 (<i>d</i> , 8,4)	6,70 (<i>dd</i> , 8,0; 2,1)	114,7	114,9
6	7,04 (<i>d</i> , 8,4)	7,02 (<i>dd</i> , 8,0; 2,1)	129,5	129,7
7	2,80 (<i>t</i> , 7,2)	2,71 (<i>t</i> , 7,0)	37,9	38,2
8	3,83 (<i>t</i> , 7,2)	3,67 (<i>t</i> , 7,3)	63,2	63,4

Em Park *et al.*, (2011), O RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em CD_3OD (500 MHz e 125 MHz)
 Fonte: Autora (2023)

74

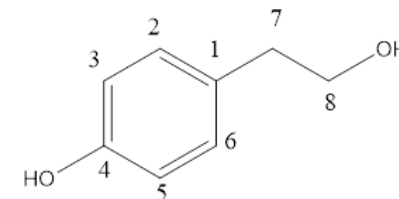


Figura 32- Espectro de RMN ^1H de S-1 (CDCl_3 , 400 MHz)

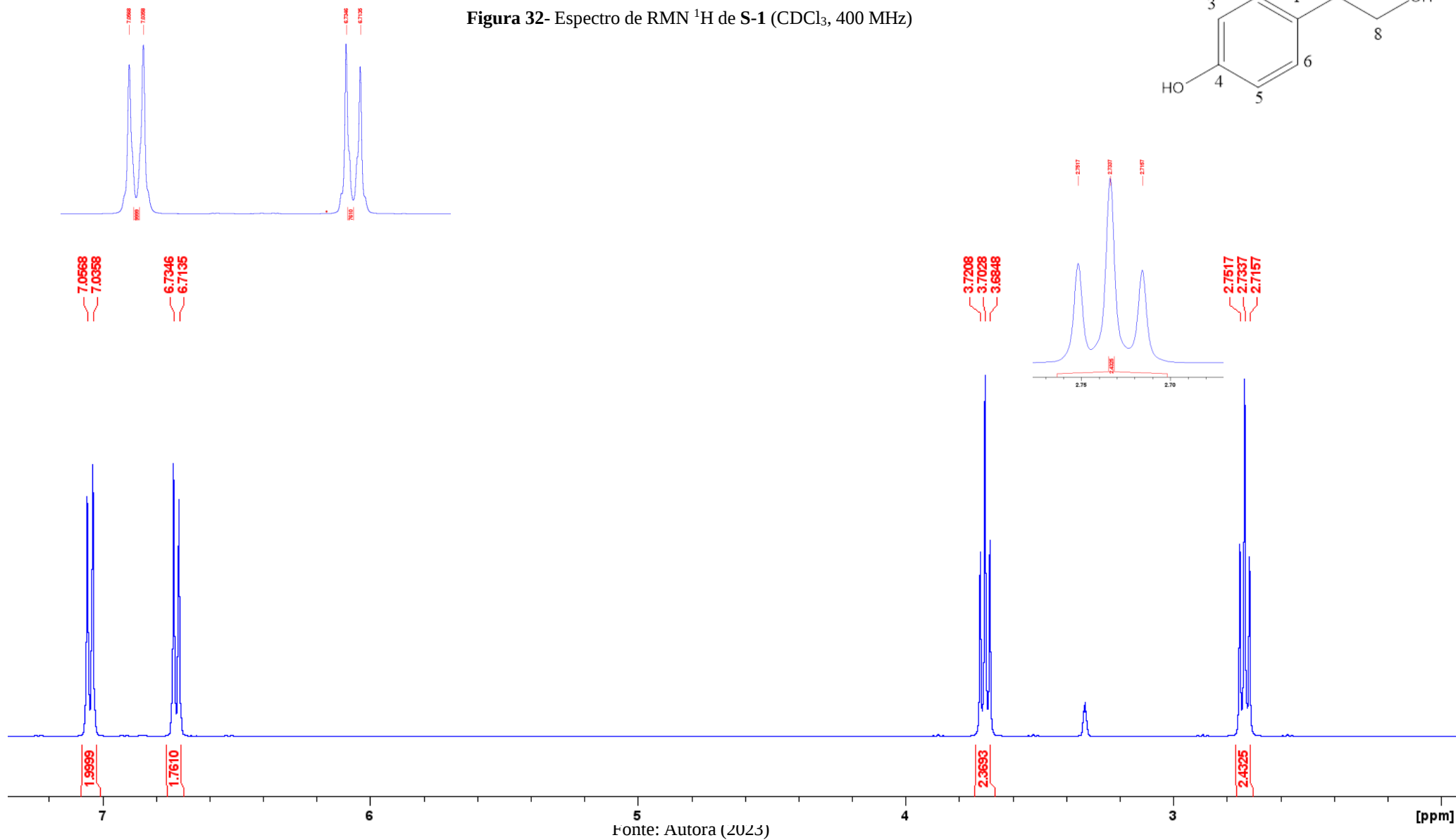
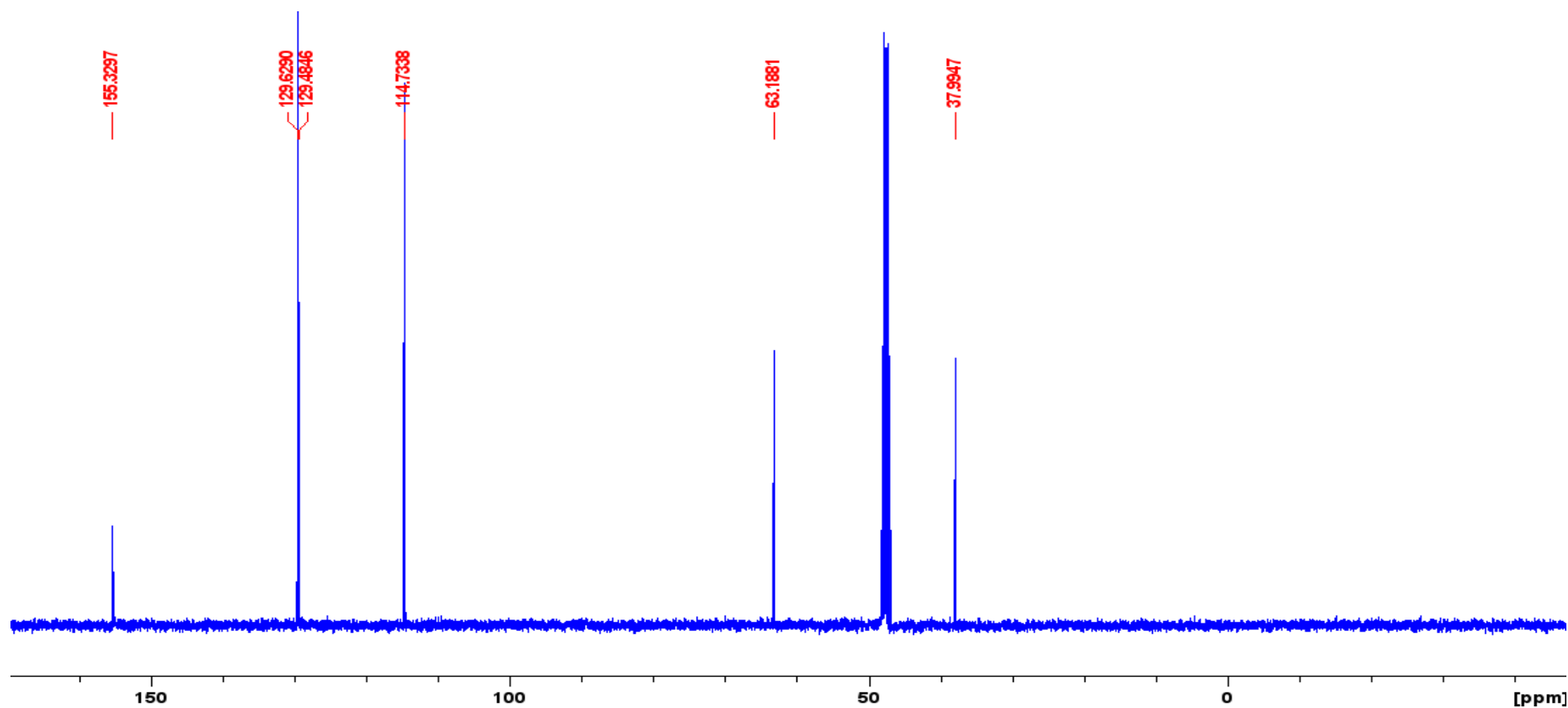
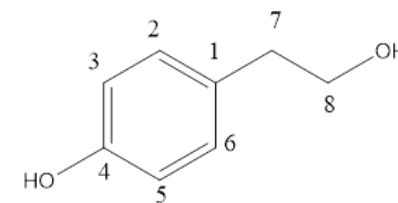


Figura 33- Espectro de RMN ^{13}C de S-1 (CDCl_3 , 100 MHz)



Fonte: Autora (2023)

Figura 34- Espectro de COSY de S-1.

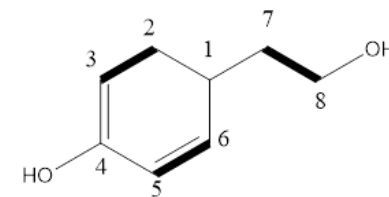
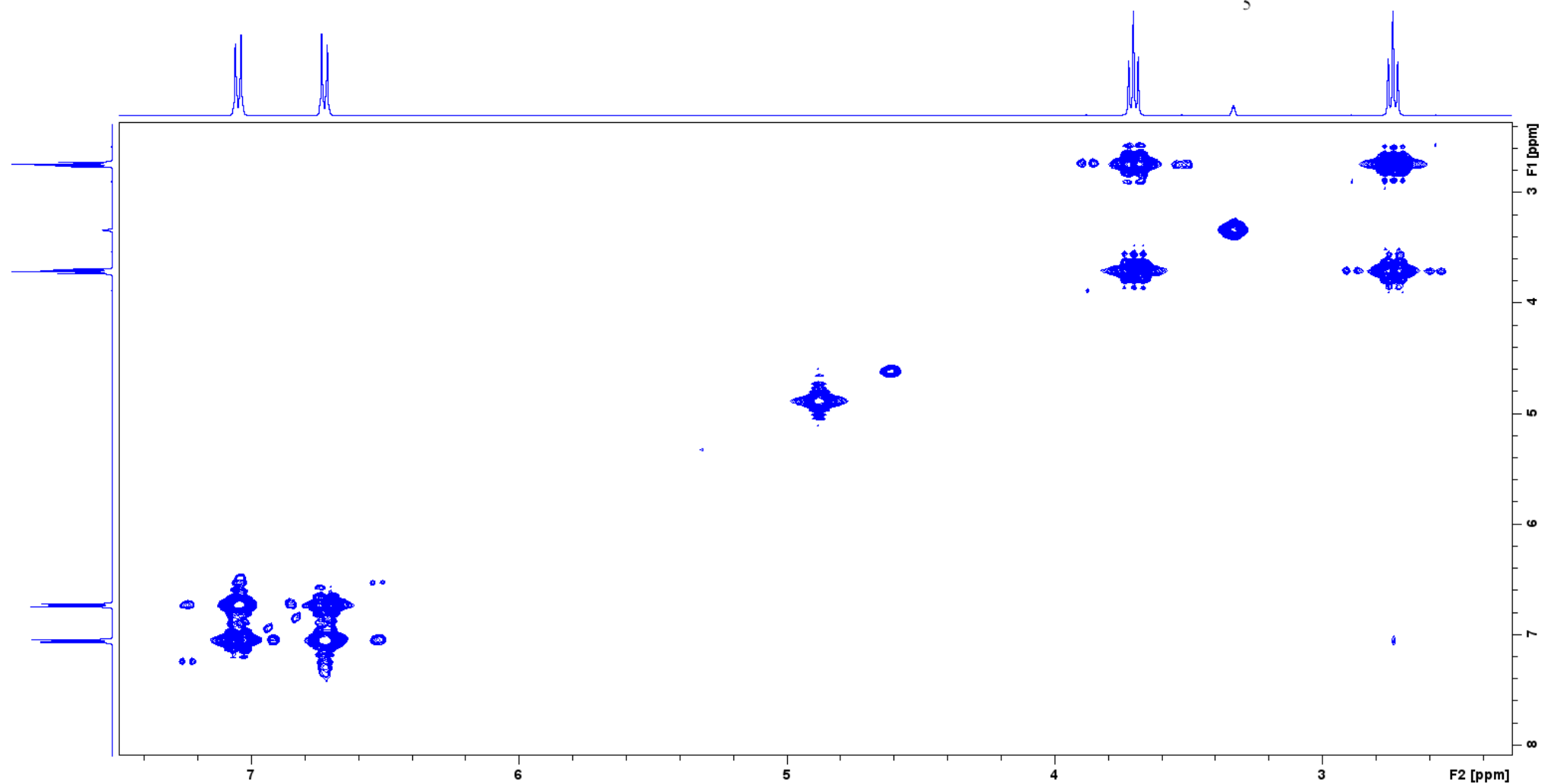
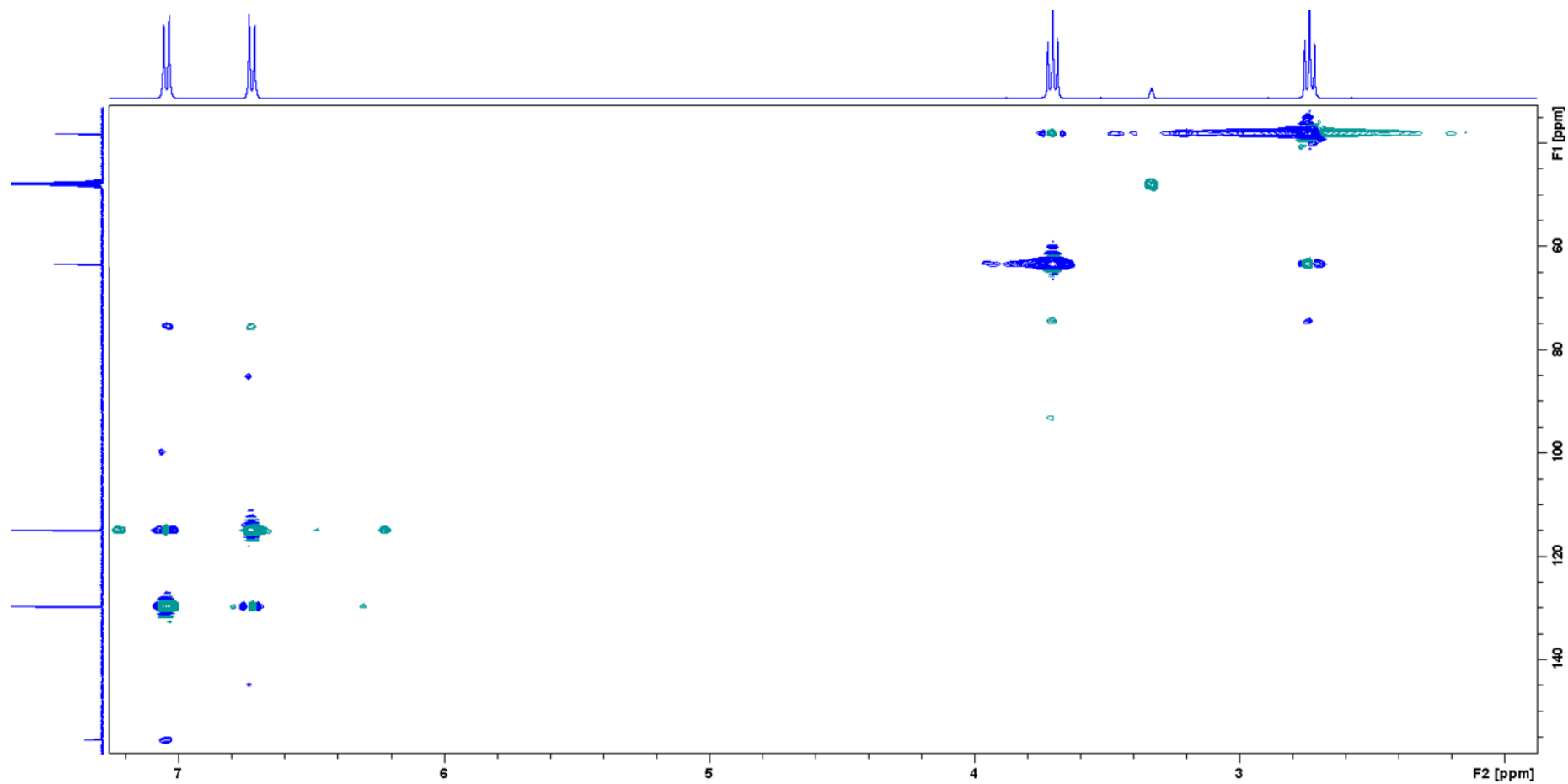
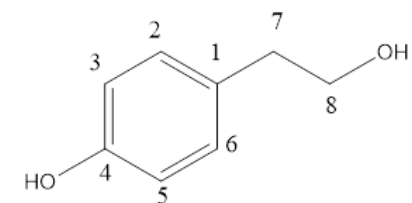
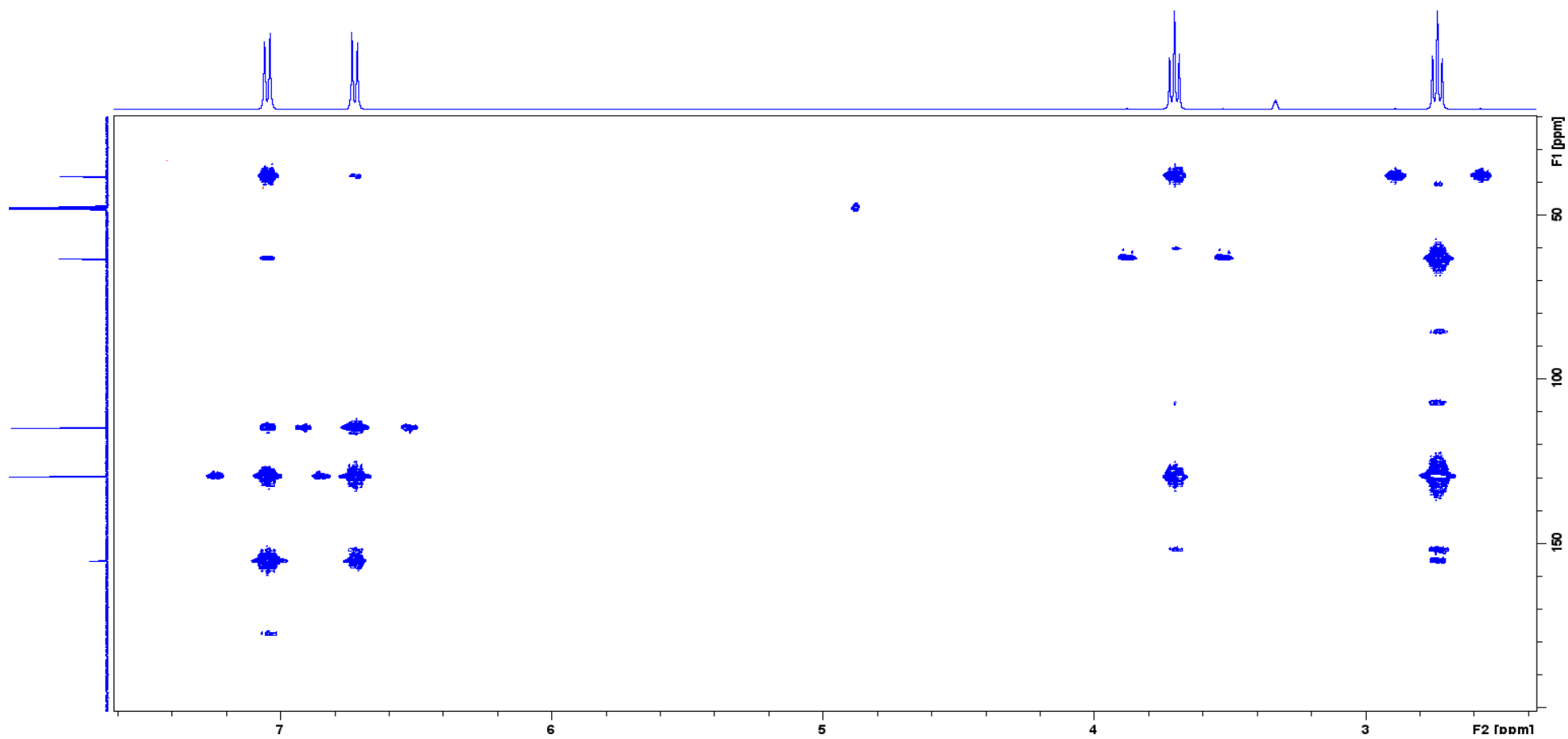


Figura 35- Espectro de HSQC de S-1

Fonte: Autora (2023)

Figura 36- Espectro de HMBC de S-1

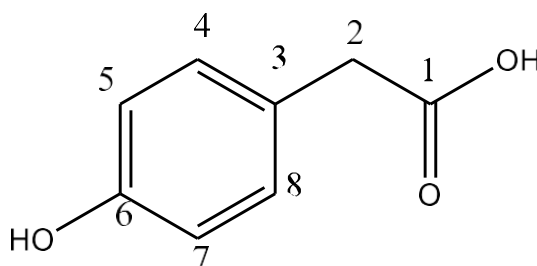


Fonte: Autora (2023)

5.2.2 Substância S-2: Ácido 4-hidroxifenilacético

O Ácido 4-hidroxifenilacético S-2 (figura 37), isolado do extrato FAET da fração Hex/AcOEt 75% como um óleo viscoso marrom claro, solúvel em diclorometano. A análise do espectro de RMN ^1H (figura 39, p. 82) revelou características típicas de compostos aromáticos, com dois dupletos em δ_{H} 7,15 (2H, d, 8,5 Hz; H-4 e H-8) e δ_{H} 6,79 (2H, d, 8,5 Hz; 4,3 Hz; H-5 e H-7), indicando a presença de um anel aromático *para*-substituído. Adicionalmente, foi observado um singlete em δ_{H} 3,57, característico de um hidrogênio CH_2 adjacente a um carbono carboxílico.

Figura 37- Estrutura de S-2



Fonte: Autora (2023)

No espectro de RMN ^{13}C (figura 40, p. 83) pode-se observar seis sinais referentes a 8 carbonos, sendo 6 carbonos aromáticos um alifático e outro característico de grupo carboxila δ_{C} 115,7 (C-5 e C-7); δ_{C} 130,8 (C-4 e C-8); δ_{C} 155,13 (C-6); δ_{C} 125,7 (C-3); δ_{C} 40,1 (C-2); δ_{C} 176,3 (C-1).

A análise do espectro de COSY (figura 41, p. 84) observou-se a correlação entre o sinal em δ_{H} 7,15 (H-4 e H-8) com δ_{H} 6,79 (H-5 e H-7).

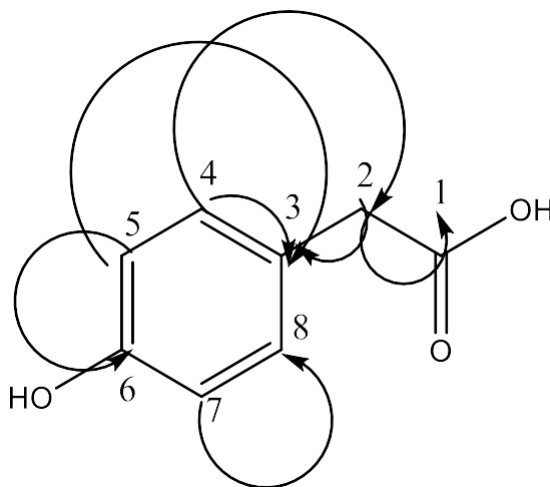
Analizando o espectro de HSQC (figura 42, p. 85) destaca-se as correlações dos sinais com deslocamento químico em δ_{H} 7,15 (H-4 e H-8) com δ_{C} 130,8 (C-4 e C-8), em δ_{H} 6,79 (H-5 e H-7) com δ_{C} 115,72 (C-5 e C-7) e em δ_{H} 3,57 (H-2) com δ_{C} 40,11 (C-2).

O espectro de HMBC (figura 43, p. 86) apresenta a correlação entre o sinal em δ_{H} 7,15 (H-4 e H-8) com os sinais de carbonos em δ_{C} 115,7 (C-5 e C-7), δ_{C} 40,1 (C-2) e em δ_{C} 125,7 (C-3). Além da correlação do sinal em δ_{H} 6,79 (H-5 e H-7) está correlacionado com os carbonos em δ_{C} 130,8 (C-4 e C-8), δ_{C} 125,7 (C-3), e δ_{C} 155,1 (C-6). E correlação do sinal de hidrogênio em δ_{H} 3,57 (H-2) com os sinais de carbonos em δ_{C} 130,8 (C-4 e C-8), δ_{C} 125,7 (C-3) e em δ_{C} 176,3 (C-1), sendo este último referente a um carbono carboxílico.

A substância **S-2**, identificada como ácido 4-hidroxifenilacético por meio da análise dos dados espectroscópicos e da comparação com a literatura (Zhang et al., 2023), é um composto fenólico reconhecido por suas propriedades como antioxidante e agente antimicrobiano. Pesquisas indicam que o ácido 4-hidroxifenilacético exerce efeitos inibitórios contra patógenos alimentares, como *E. coli* e do gênero *Lactobacillus*, ressaltando seu potencial na inibição do crescimento bacteriano (Liu et al., 2021).

A seguir encontram-se as representações de todas as correlações de HMBC (figura 38), além da tabela 7 (p.81) que contém a descrição dos dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **S-2** comparados com os dados da literatura (Zhang et al., 2023)

Figura 38- Principais correlações de HMBC de **S-2**



Fonte: Autora (2023)

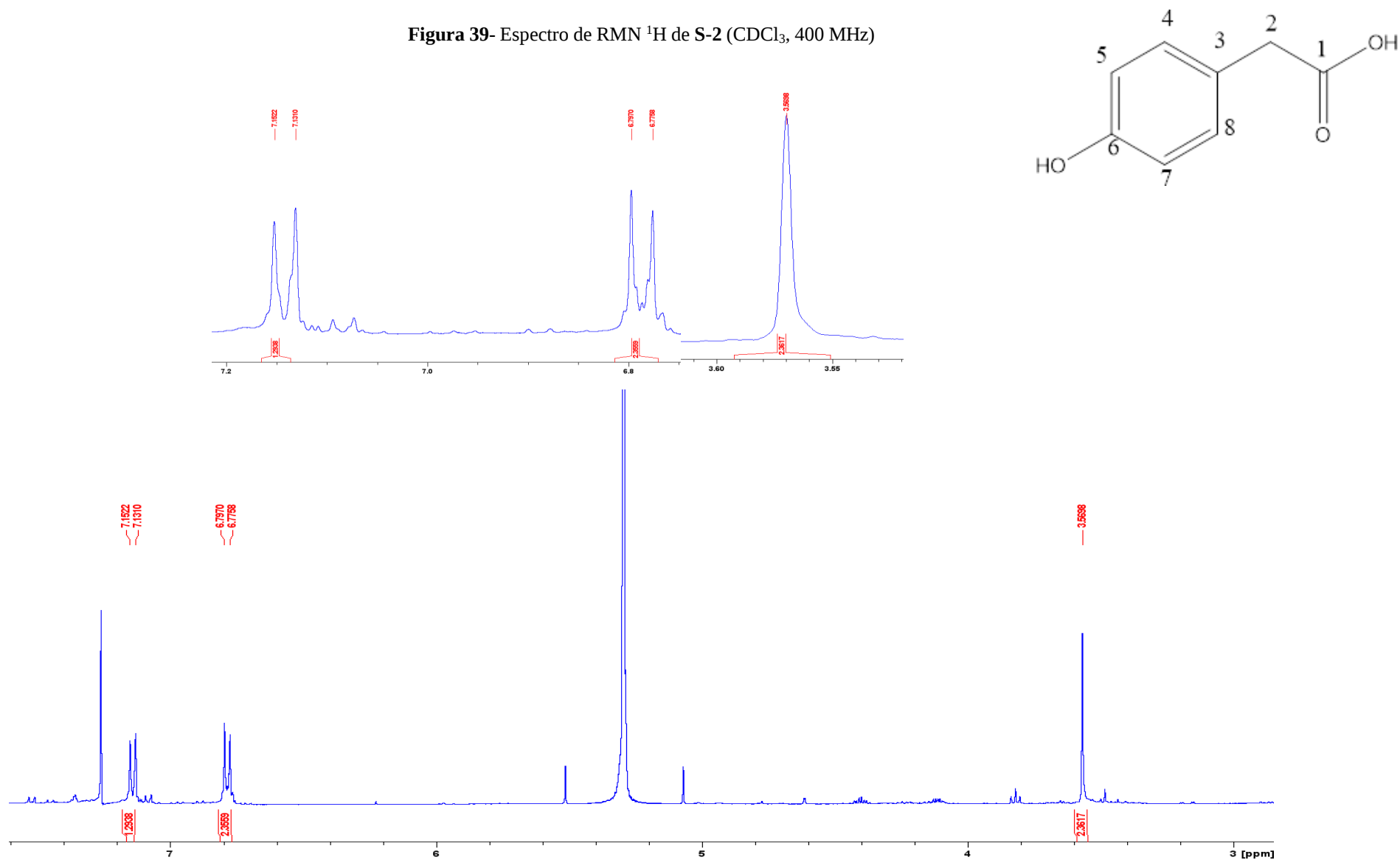
Tabela 7- Dados de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de **S-2** em comparação com a literatura (Zhang *et al.*, 2023)

	S-2	Zhang <i>et al.</i> , 2023	S-2	Zhang <i>et al.</i> , 2023
	<i>H</i> (δ , mult., <i>J</i> em Hz)	<i>H</i> (δ , mult., <i>J</i> em Hz)	<i>C</i>	<i>C</i>
1	-	-	176,2	175,4
2	3,57 (s)	3,51 (s)	40,1	39,7
3	-	-	125,6	125,5
4	7,15 (d, 8,46)	7.12 (d, 8,2)	130,7	130.2
5	6,79 (d, 8,49)	6,81 (d, 8,2)	115,7	115.0
6	-	-	155,1	155,8
7	6,79 (d, 8,49))	6,81 (d, 8,2)	115,7	115.0
8	7,15 (d, 8,46)	7.12 (d, 8,2)	130,7	130.2

Em Zhang *et al.*, (2023) O RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em CD_3OD (400 MHz e 100 MHz, CD_3OD)

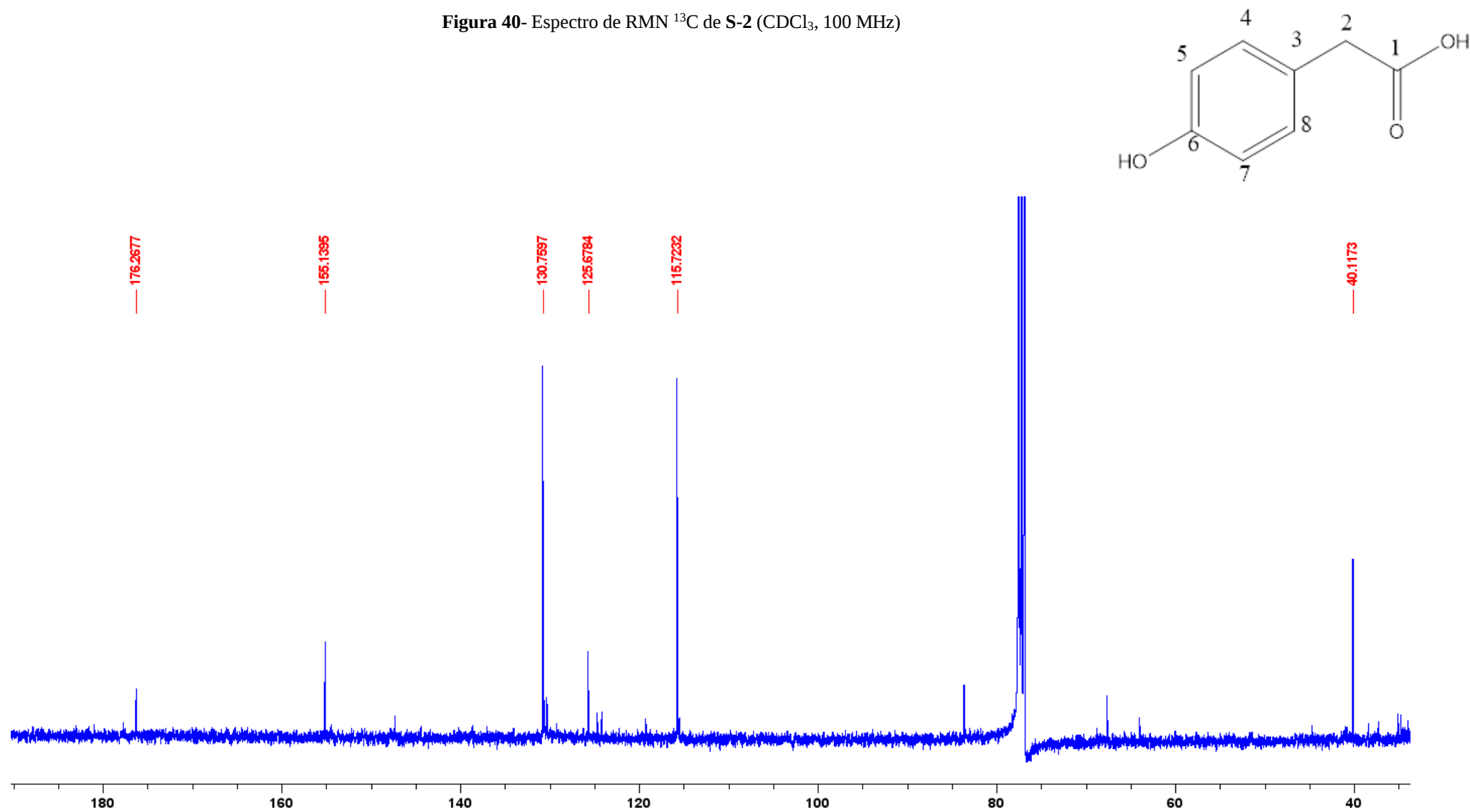
Fonte: Autora (2023)

Figura 39- Espectro de RMN ^1H de S-2 (CDCl_3 , 400 MHz)

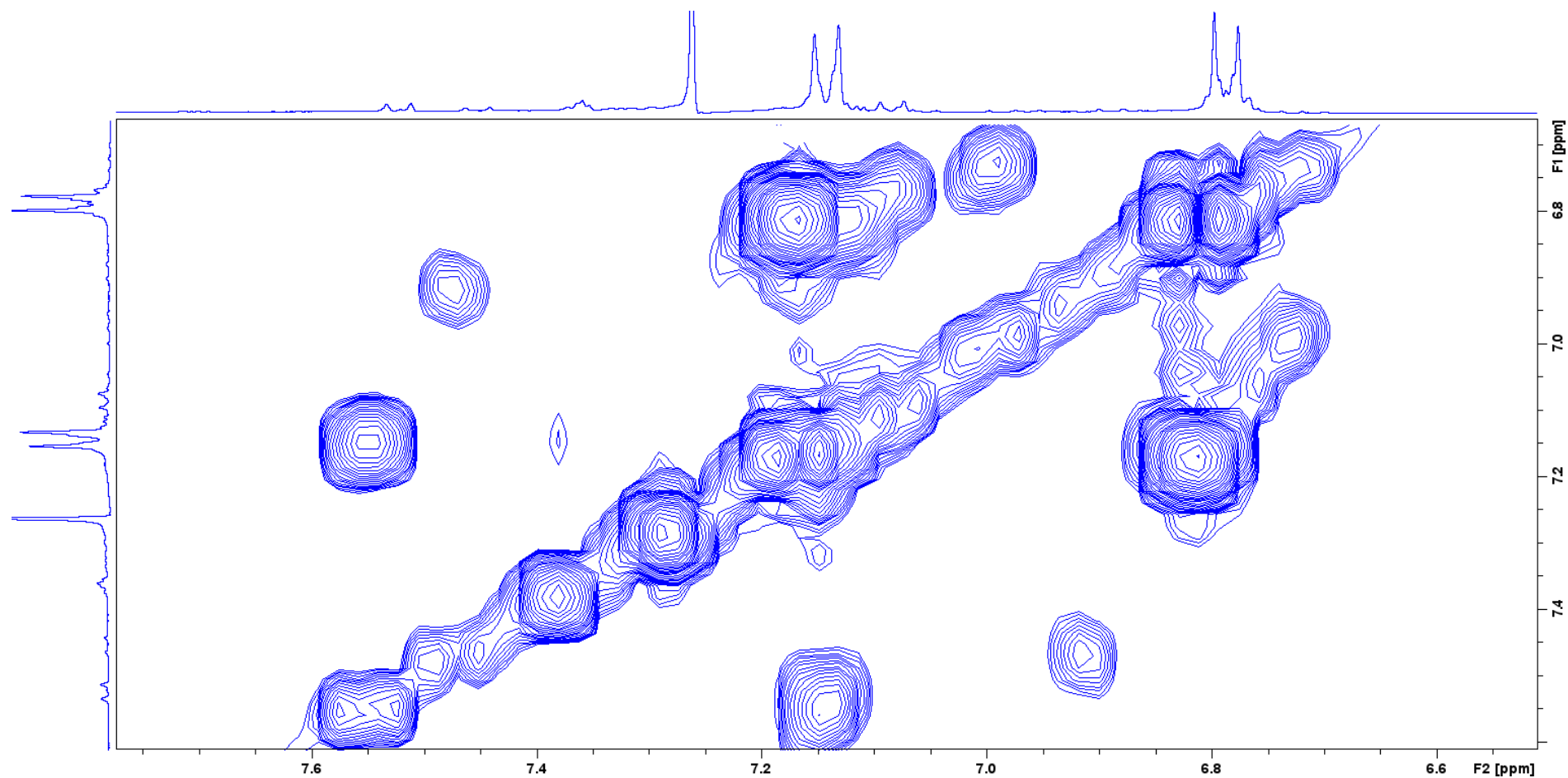
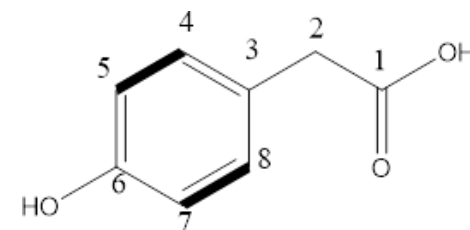


Fonte: Autora (2023)

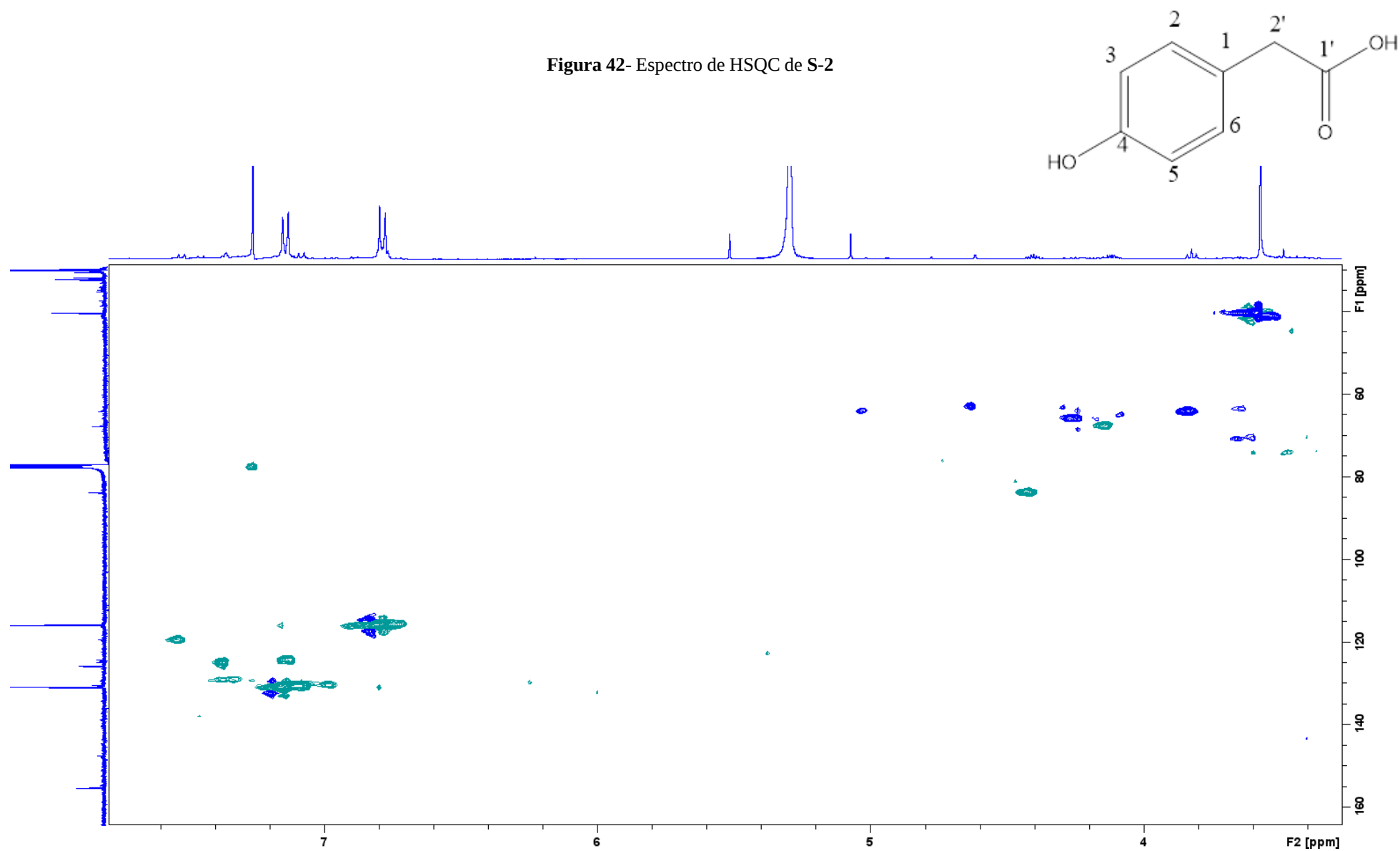
Figura 40- Espectro de RMN ^{13}C de S-2 (CDCl_3 , 100 MHz)



Fonte: Autora (2023)

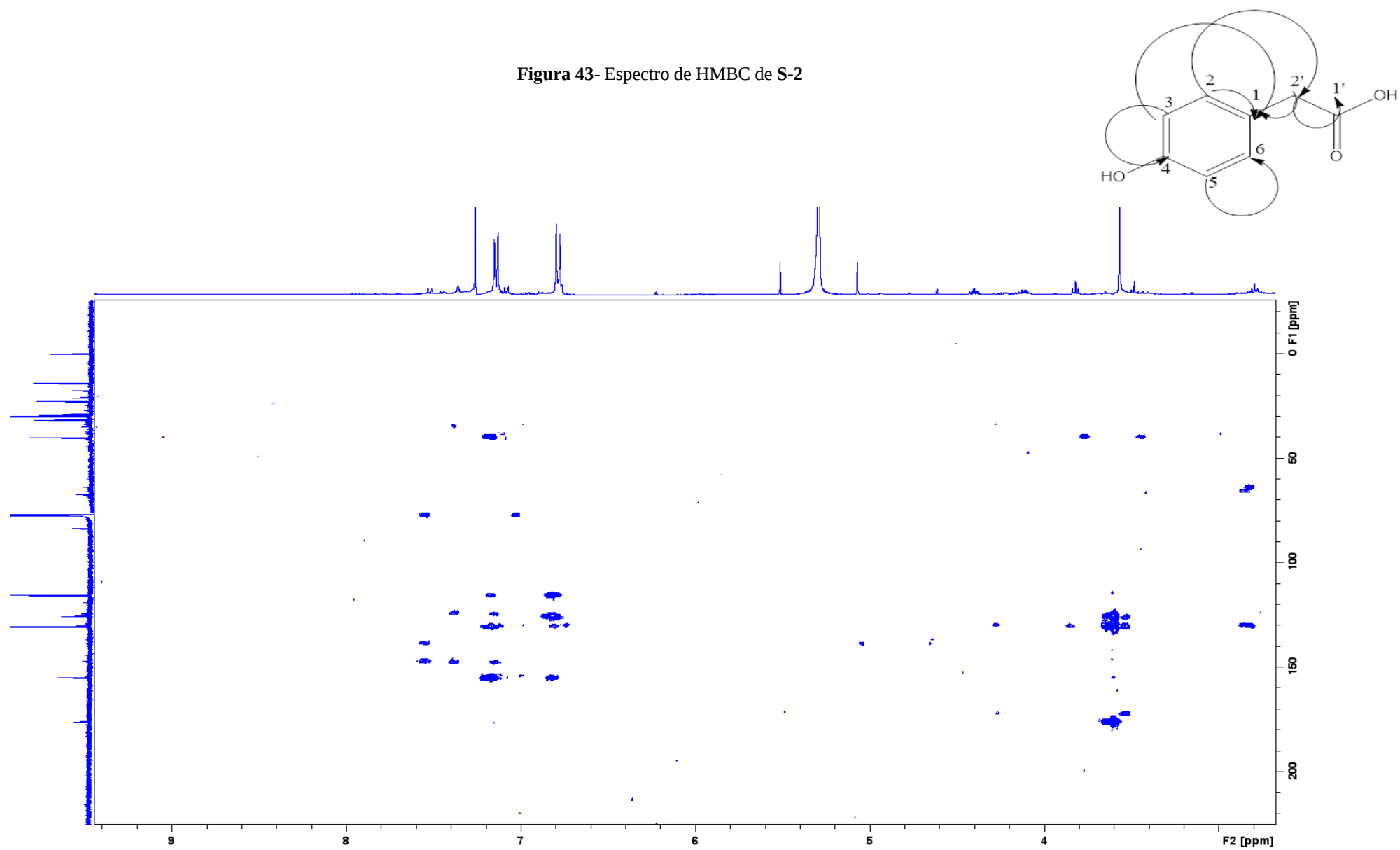
Figura 41- Espectro de COSY de S-2

Fonte: Autora (2023)

Figura 42- Espectro de HSQC de S-2

Fonte: Autora (2023)

Figura 43- Espectro de HMBC de S-2



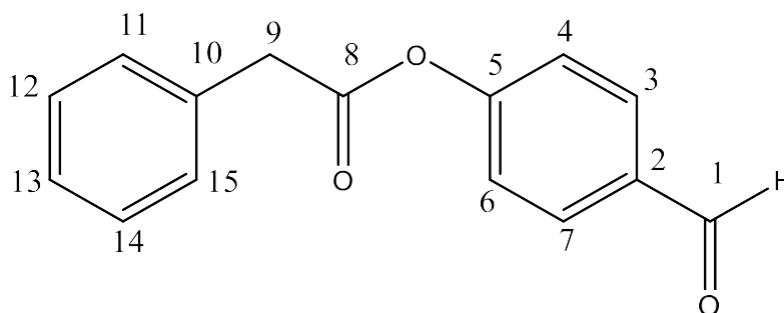
Fonte: Autora (2023)

5.2.3 Substância S-3: 4-formilfenil-2-fenilacetato

O 4-formilfenil-2-fenilacetato S-3 (figura 44) foi isolado do extrato FAET da fração Hex/AcOEt 50% na forma de um óleo viscoso amarelado e solúvel em diclorometano. A análise do espectro de RMN ^1H (figura 47, p. 90) apresentou sinais típicos de compostos aromáticos: dois dupletos em δ_{H} 7,79 (2H, *d*, 8,4 Hz; H-3 e H-7) e δ_{H} 6,93 (2H, *d*, 8,4 Hz; H-4 e H-6) e um multiplete em δ_{H} 7,27-7,34 (5H, *m*, H-11 - H-15), além de um singlete em δ_{H} 3,66 (2H, *s*, H-9) típico de hidrogênio CH_2 vizinho de carbonila. Também mostrou um sinal em δ_{H} 9,86 (1H, *s*, H-1) típico de hidrogênio aldeído.

A fórmula molecular da substância S-3 foi determinada como $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_2$ por meio da análise dos dados de RMN, assim como pelo espectro de massas ESI (+), o qual exibiu um pico com m/z 241,0860 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (figura 52, p. 95), indicando uma massa de 240,0860 Da para a substância S-3.

Figura 44- Estrutura de S-3



Fonte: Autora (2023)

A partir da análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 48, p. 91), foram observadas dez sinais, destacando-se dois sinais característicos de carbonila em δ_{C} 176,0 (C-8) e em δ_{C} 191,1 (C-1), sendo este último associado a carbonila do grupo formila. Adicionalmente, foram identificados sete sinais de carbonos aromáticos com deslocamento químico em δ_{C} 129,4 (C-11 e C-15), δ_{C} 127,3 (C-12 e C-14), δ_{C} 128,0 (C-13), δ_{C} 132,4 (C-10 e C-2), δ_{C} 116,0 (C-4 e C-6), δ_{C} 133,4 (C-3 e C-7) e em δ_{C} 161,7 (C-5). Além disso, foi observado um sinal na região de carbono alifático em δ_{C} 41,0 (C-9).

Ao analisar o espectro COSY (Figura 49, p. 92), observou-se a correlação entre o sinal em δ_{H} 3,66 (H-9) com δ_{H} 7,27-7,34 (H-11 - H-15). Verificou-se também a correlação do hidrogênio aromático em δ_{H} 7,79 (H-3 e H-7) correlaciona com o sinal de hidrogênio em δ_{H} 6,93 (H-4 e H-6).

No espectro de HSQC (figura 50, p. 93) foi possível destacar a correlação direta do sinal do hidrogênio alifático em δ_H 3,66 (H-3) com o sinal de carbono em δ_C 41,0 (C-9). Também foi possível determinar as correlações dos hidrogênios aromáticos com seus respectivos carbonos, onde observou-se os sinais com deslocamento químicos dos hidrogênios em δ_H 7,27-7,34 (H-11 e H-15), δ_H 7,27-7,34 (H-12 e H-14), δ_H 7,27-7,34 (H-13) δ_H 6,93 (H-4 e H-6'') e δ_H 7,79 (H-3 e H-7) se correlacionam, respectivamente, com os sinais em δ_C 129,4 (C-11 e C-15), δ_C 127,3 (C-12 e C-14), δ_C 128,0 (C-13), δ_C 116,0 (C-4 e C-6) e δ_C 133,4 (C-3 e C-7).

O espectro de HMBC (figura 51, p. 94) apresenta a correlação entre o sinal do hidrogênio em δ_H 7,27-7,34 (H-11- H15) com os sinais de carbono em δ_C 41,00 (C-9), δ_C 132,4 (C-10), δ_C 127,3 (C-3' e C-5') e δ_C 128,0 (C-4'), verificou-se também correlação do sinal de hidrogênio em δ_H 7,79 (H-3 e H-7) com os sinais de carbono em δ_C 116,00 (C-2'' e C-6''), δ_C 132,4 (C-2) e δ_C 191,0 (C-1), bem como a correlação em δ_H 6,93 (H-4 e H-6) com os sinais de carbono em δ_C 133,4 (C-3 e C-7) e δ_C 161,7 (C-5). Também foi observado o sinal do hidrogênio em δ_H 3,66 (H-9) com os sinais de carbono em δ_C 132,4 (C-10), δ_C 129,4 (C-11 e C-15) e δ_C 176,0 (C-8).

A seguir, apresentam-se as representações de todas as correlações de COSY (figura 45) HMBC (figura 46, p. 89), bem como a tabela 8 (p. 89) contém os dados de RMN 1H e RMN ^{13}C da substância S-3. Com base na análise espectrométrica de RMN de HSQC, COSY e HMBC, foi possível propor a estrutura de S-3. Os dados foram comparados com o banco de dados do Scifinder e PubMed, não sendo encontrado nenhum relato anterior sobre sua identificação por ressonância magnética. Esta é a primeira vez que ele é isolado naturalmente, e não foram encontradas informações relevantes sobre suas propriedades.

Figura 45- Principais correlações de COSY de S-3

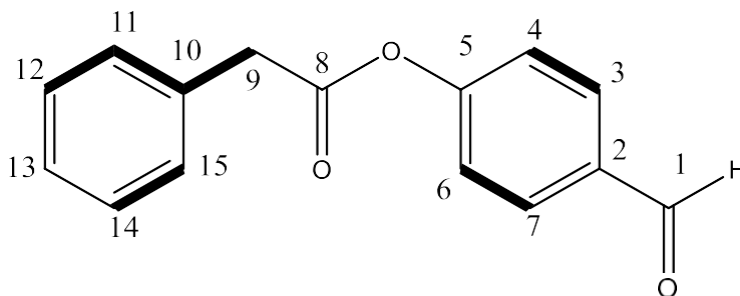
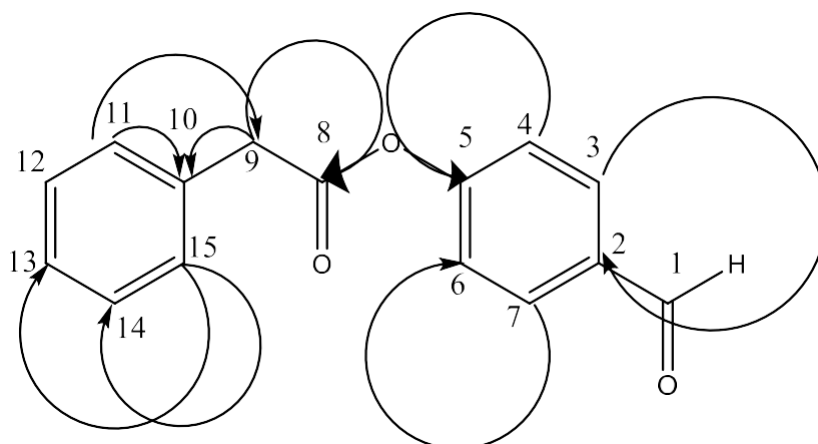


Figura 46-Principais correlações de HMBC de S-3

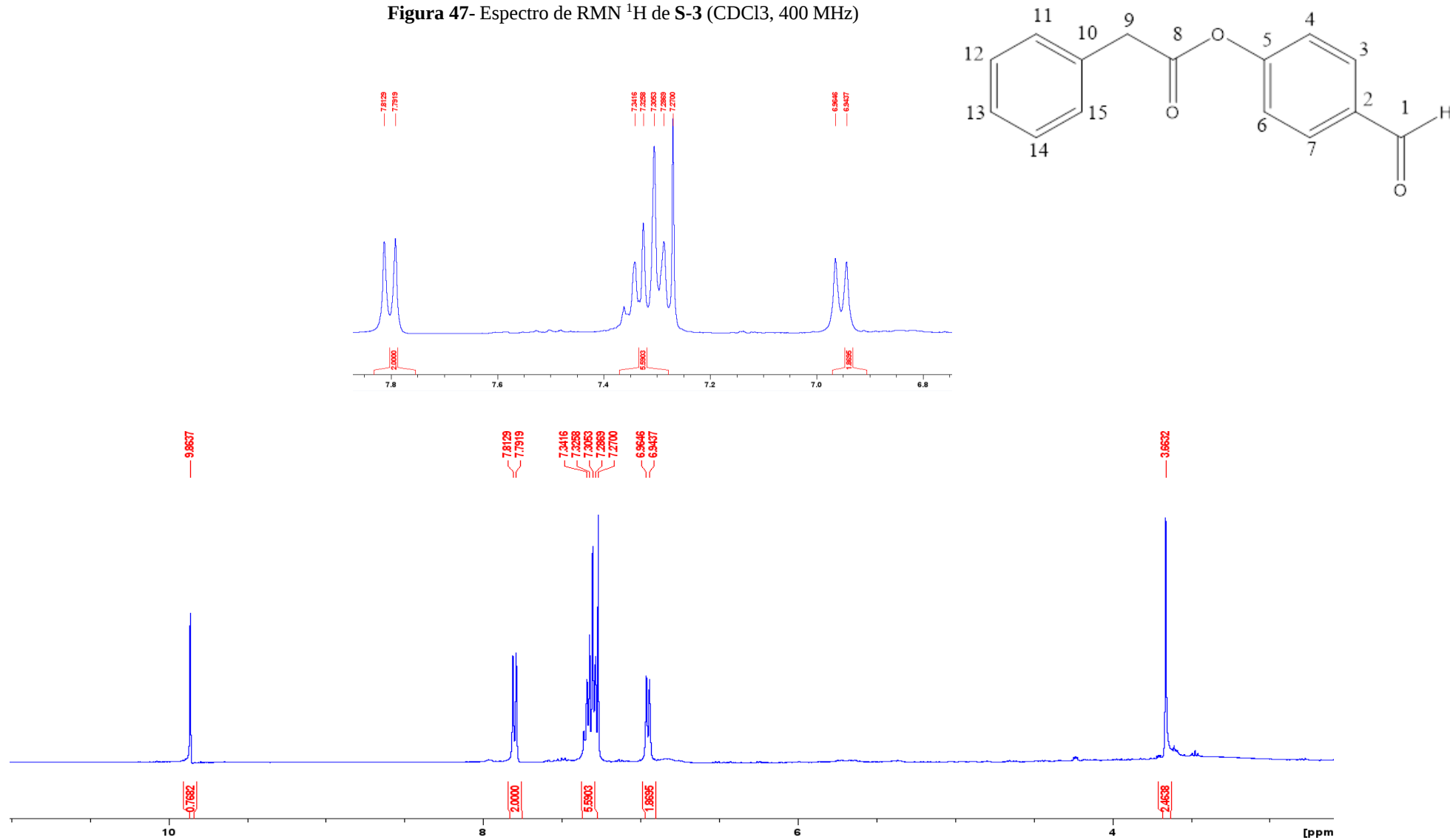
Fonte: Autora (2023)

Tabela 8- Dados de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de S-3

S-3		
	<i>H</i> (δ , mult., <i>J</i> em Hz)	C
1	9,86 (s)	191,0
2 e 10	-	132,4
3 e 7	7,79 (<i>d</i> , 8,39)	133,4
4 e 6	6,93 (<i>d</i> , 8,36)	116,0
5	-	161,7
8	-	176,0
9	3,66 (s)	41,0
11 e 15	7,27-7,34 (<i>m</i>)	129,3
12 e 14	7,27-7,34 (<i>m</i>)	127,3
13	7,27-7,34 (<i>m</i>)	128,0

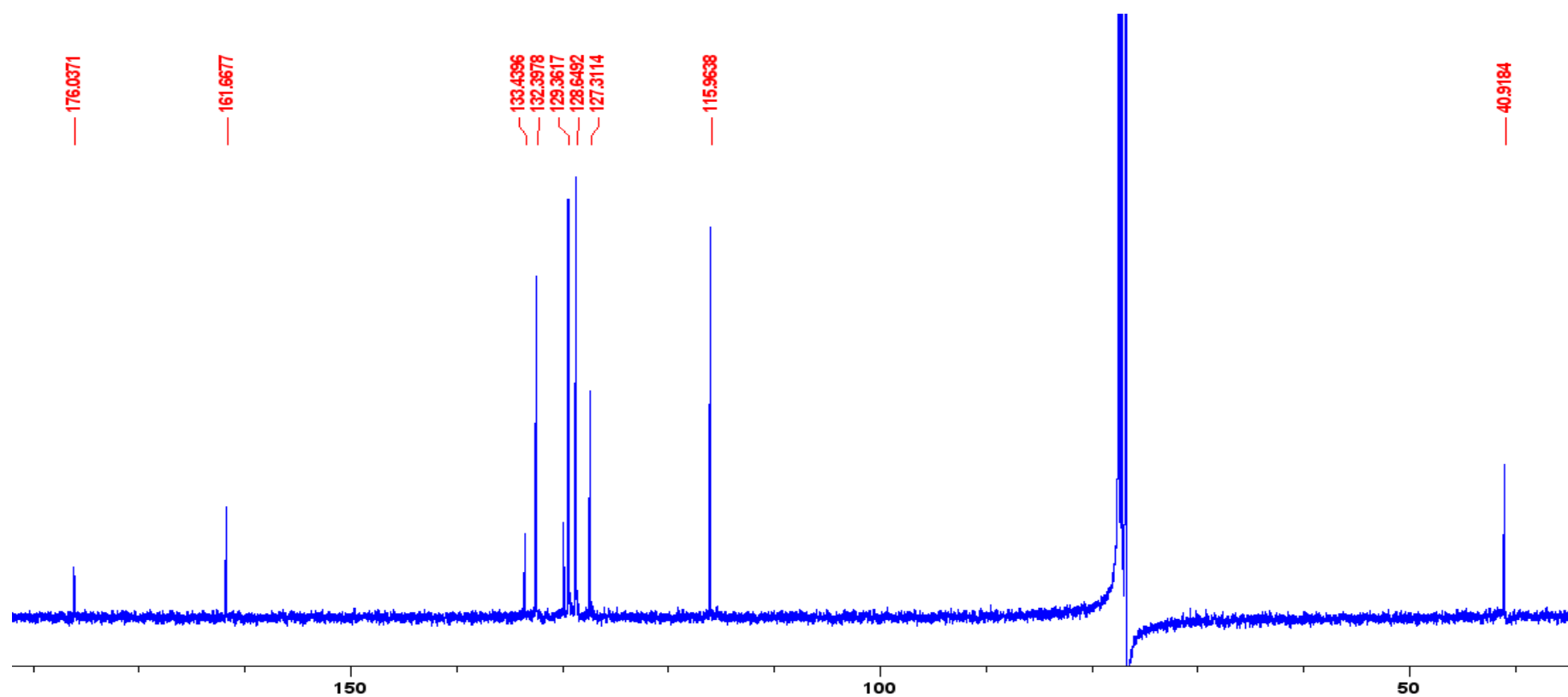
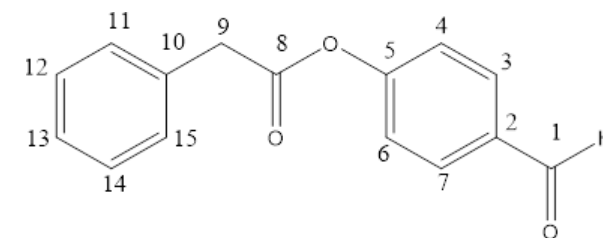
Fonte: Autora (2023)

Figura 47- Espectro de RMN ^1H de S-3 (CDCl_3 , 400 MHz)

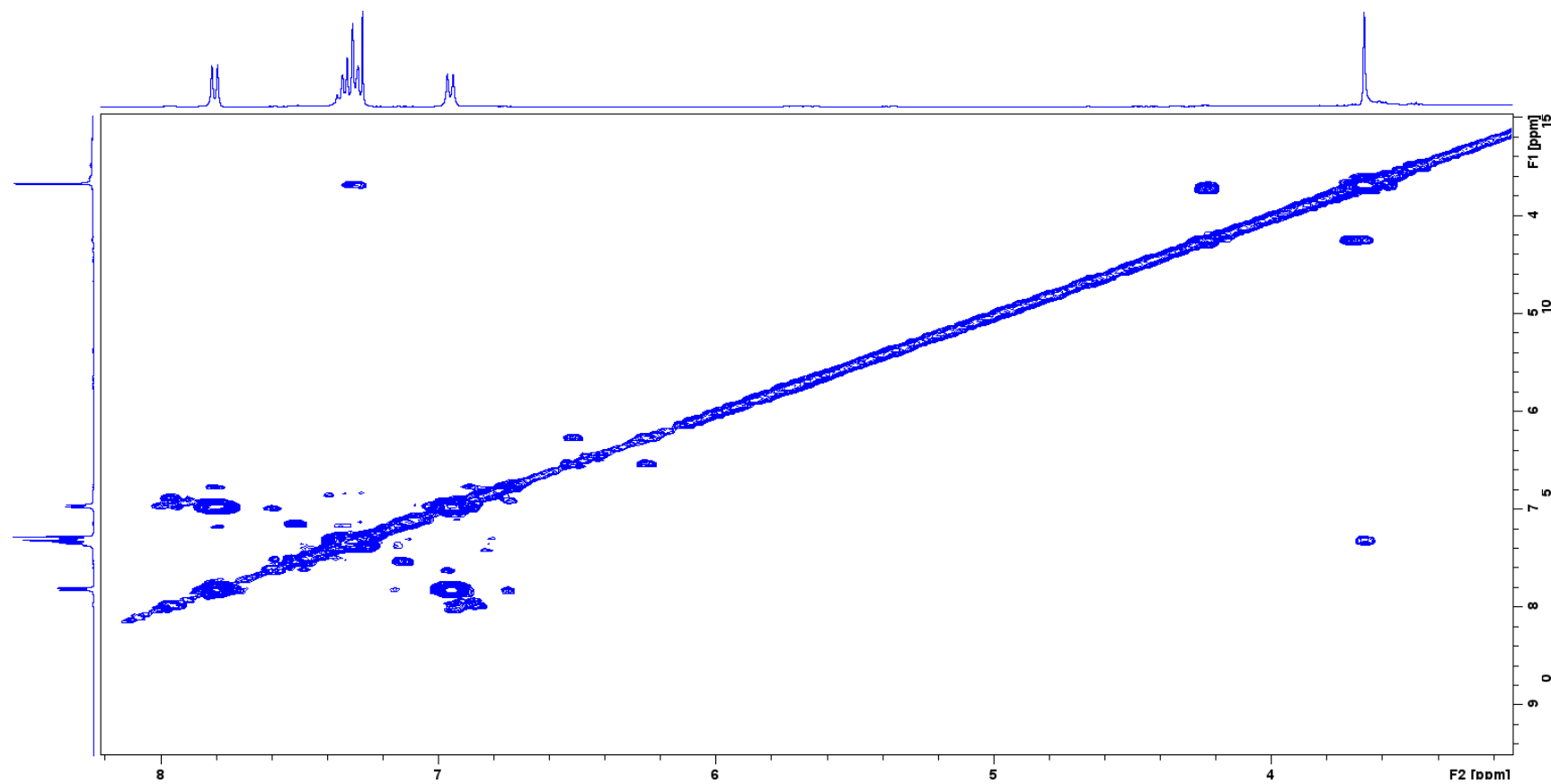
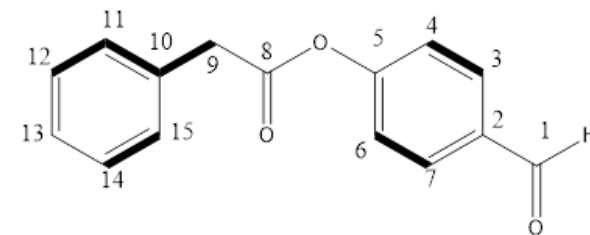


Fonte: Autora (2023)

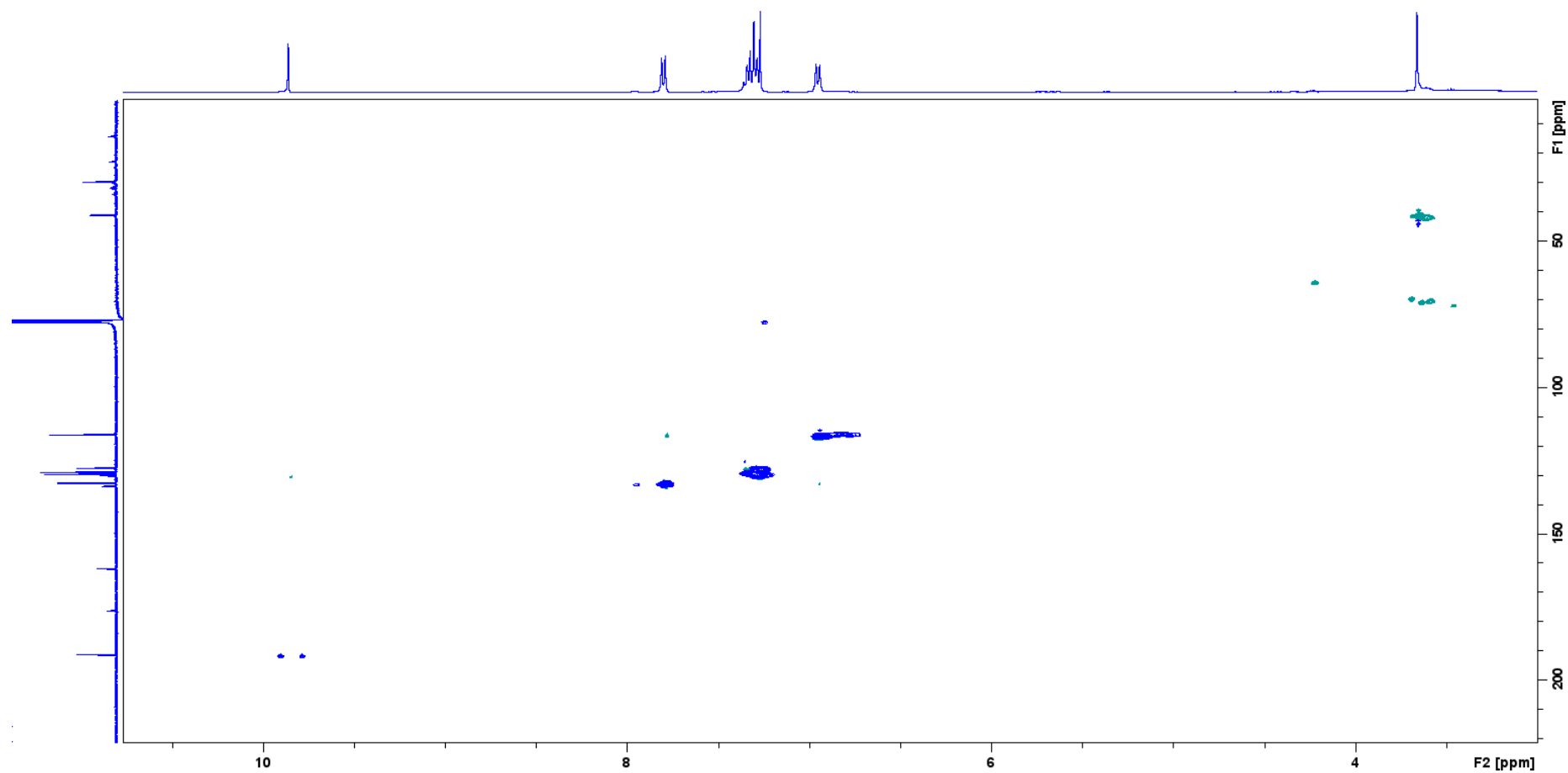
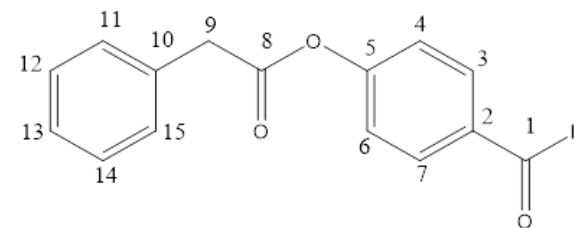
Figura 48- Espectro de RMN ^{13}C de S-3 (CDCl_3 , 100 MHz)



Fonte: Autora (2023)

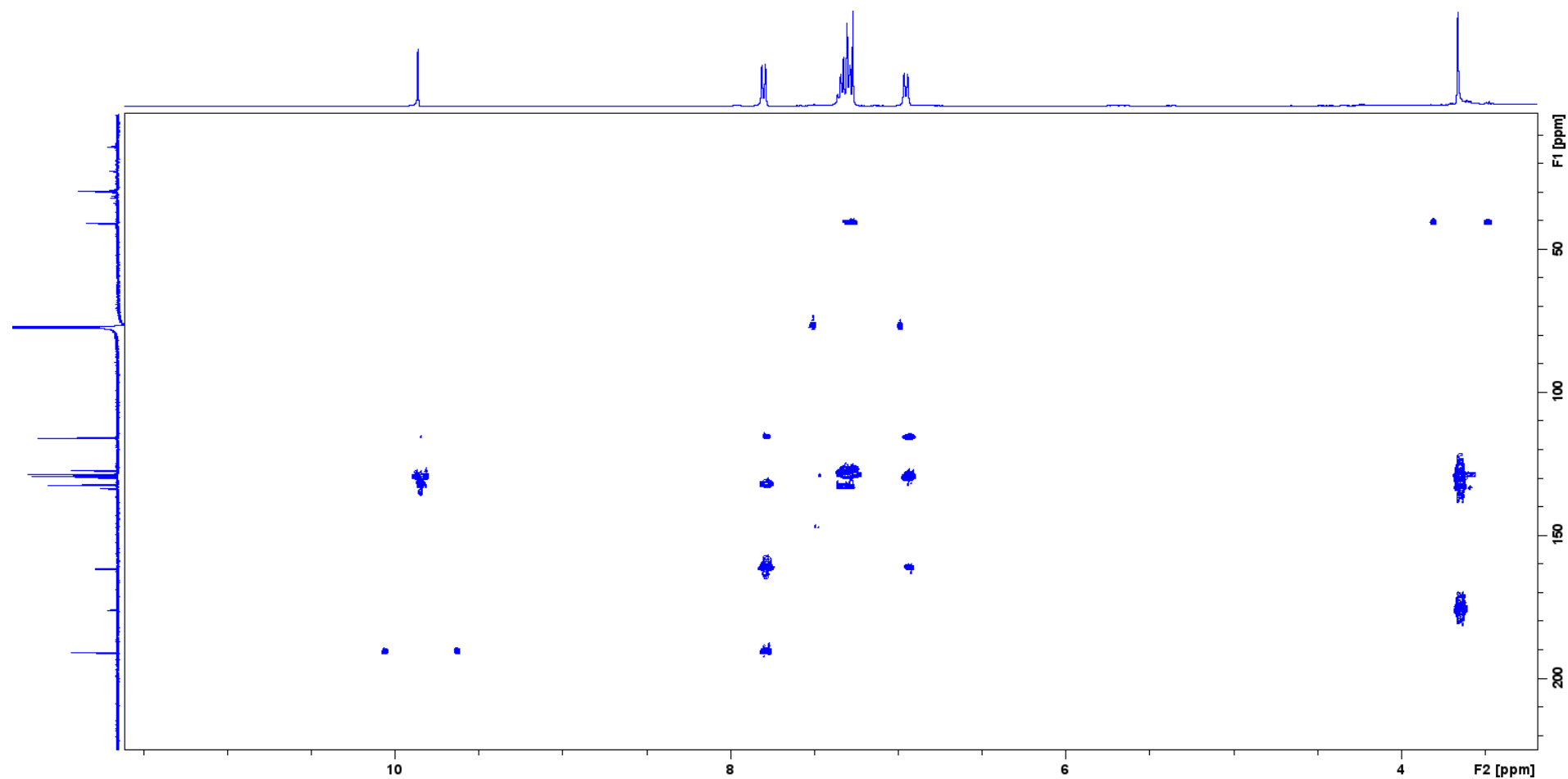
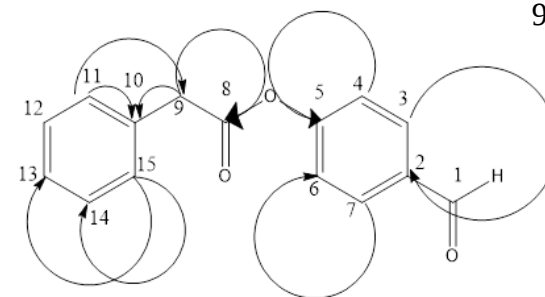
Figura 49- Espectro de COSY de S-3

Fonte: Autora (2023)

Figura 50- Espectro de HSQC de S-3

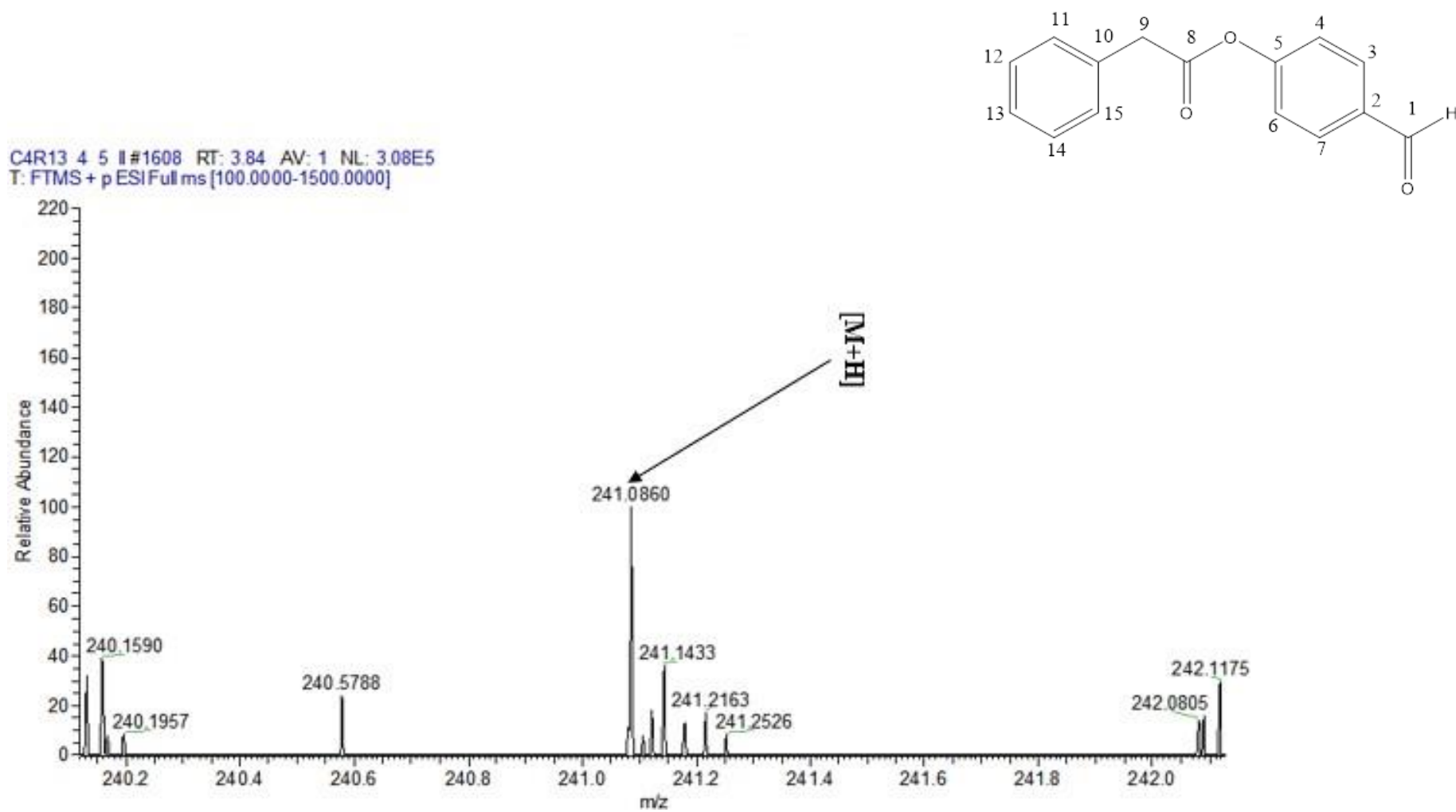
Fonte: Autora (2023)

Figura 51- Espectro de HMBC de S-3



Fonte: Autora (2023)

Figura 52- Espectro de massas ESI (+) de S-3

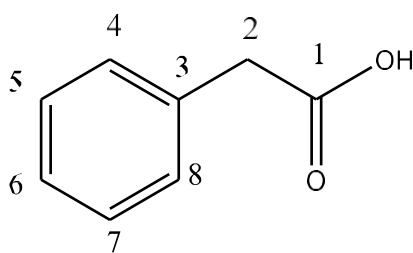


Fonte: Autora (2023)

5.2.4 Substancia S-4: Ácido fenilacético

O ácido fenilacético **S-4** (figura 53) foi isolado do extrato FAET da fração Hex/AcOEt 50% na forma de um sólido cristalino marrom, sendo solúvel em diclorometano. A análise do espectro ^1H (figura 56, p. 99) revelou características típicas de compostos aromáticos, apresentando um multiplete em δ_{H} 7,28-7,36 (5H, *m*, H-4-H-8), Além de um singlete em δ_{H} 3,66 (2H, *s*, H-2) típico de hidrogênio CH_2 vizinho de carboxila. Também mostrou-se um sinal em δ_{H} 9,87 relacionado ao hidrogênio da hidroxila.

Figura 53- Estrutura de **S-4**



Fonte: Autora (2023)

A partir das análises do espectro de RMN de ^{13}C (figura 57, p. 100), nota-se seis sinais referentes a oito carbonos, dos quais seis são aromáticos, um alifático e um característico de grupo carboxila. Os deslocamentos químicos são os seguintes: δ_{C} 128,8 (C-2 – C-6), δ_{C} 129,5 (C-3 – C-5), δ_{C} 127,4 (C-4), δ_{C} 133,7 (C-1), δ_{C} 41,2 (C-2') e δ_{C} 176,6 (C-1').

O espectro de COSY (figura 58, p. 101) foi analisado e observou-se a correlação entre os hidrogênios com deslocamento químico em δ_{H} 7,28-7,36 (H-4-H-8).

No espectro de HSQC (figura 59, p. 102), observou-se a correlação direta do sinal do hidrogênio aromático em δ_{H} 7,28-7,36 (H-4 - H-8) com os sinais em δ_{C} 128,8 (C-4 e C-8), δ_{C} 129,5 (C-5 e C-7) e δ_{C} 127,4 (C-6). Também foi possível determinar a correlação entre a sinal de hidrogênio em δ_{H} 3,66 (H-2) com δ_{C} 41,2 (C-2).

O espectro de HMBC (figura 60, p. 103) apresenta a correlação entre o sinal do hidrogênio aromático em δ_{H} 7,28-7,36 (H-4 - H-8) com os sinais de carbonos em δ_{C} 41,2 (C-2), δ_{C} 133,7 (C-3), δ_{C} 129,5 (C-5 e C-7) e δ_{C} 127,4 (C-6). Além disso, o hidrogênio δ_{H} 3,66 (H-2) se correlaciona com os sinais de carbono em δ_{C} 128,8 (C-4 e C-8), δ_{C} 133,7 (C-3) e δ_{C} 176,6 (C-1), sendo este último característico de carbonos carboxílicos.

A substância **S-4**, identificada como ácido fenilacético (sua sigla em inglês PAA) por meio da análise dos dados espectroscópicos e da comparação com a literatura (Sajid *et al.*,

2011), é um composto aromático volátil e hormônio de crescimento vegetal, com fórmula molecular $C_8H_8O_2$. Além de promover o crescimento de plantas como pimentão, ervilha e tabaco, o PAA possui notável atividade antibacteriana, sendo presente em diversos organismos. Ele é eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vários patógenos de plantas. Além do seu papel nas plantas, o PAA é usado na produção de penicilina G em fábricas farmacêuticas e pode ser produzido por microrganismos dos gêneros *Bacillus* e *Burkholderia*. A síntese do PAA em bactérias e fungos ocorre principalmente pela transaminação da fenilalanina, descarboxilação do fenilpiruvato e subsequente oxidação do fenilacetaldeído (Equal *et al.*, 2022)

A seguir encontram-se as representações de todas as correlações de COSY (figura 54) e HMBC (figura 55), além da tabela 9 (p. 98) que contém a descrição dos dados de RMN 1H e ^{13}C da substância S-4 comparados com os dados da literatura (Sajid *et al.*, 2011).

Figura 54- Principais correlações de COSY de S-4

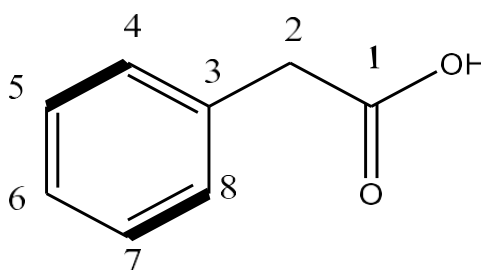
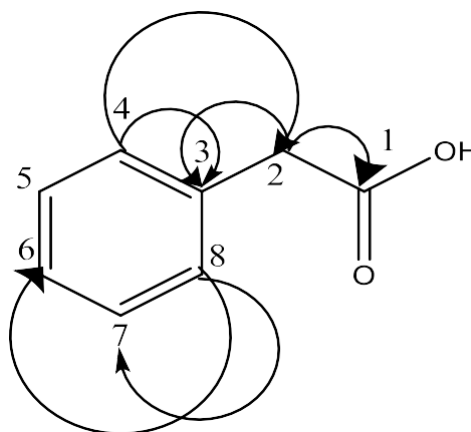


Figura 55- Principais correlações de HMBC de S-4



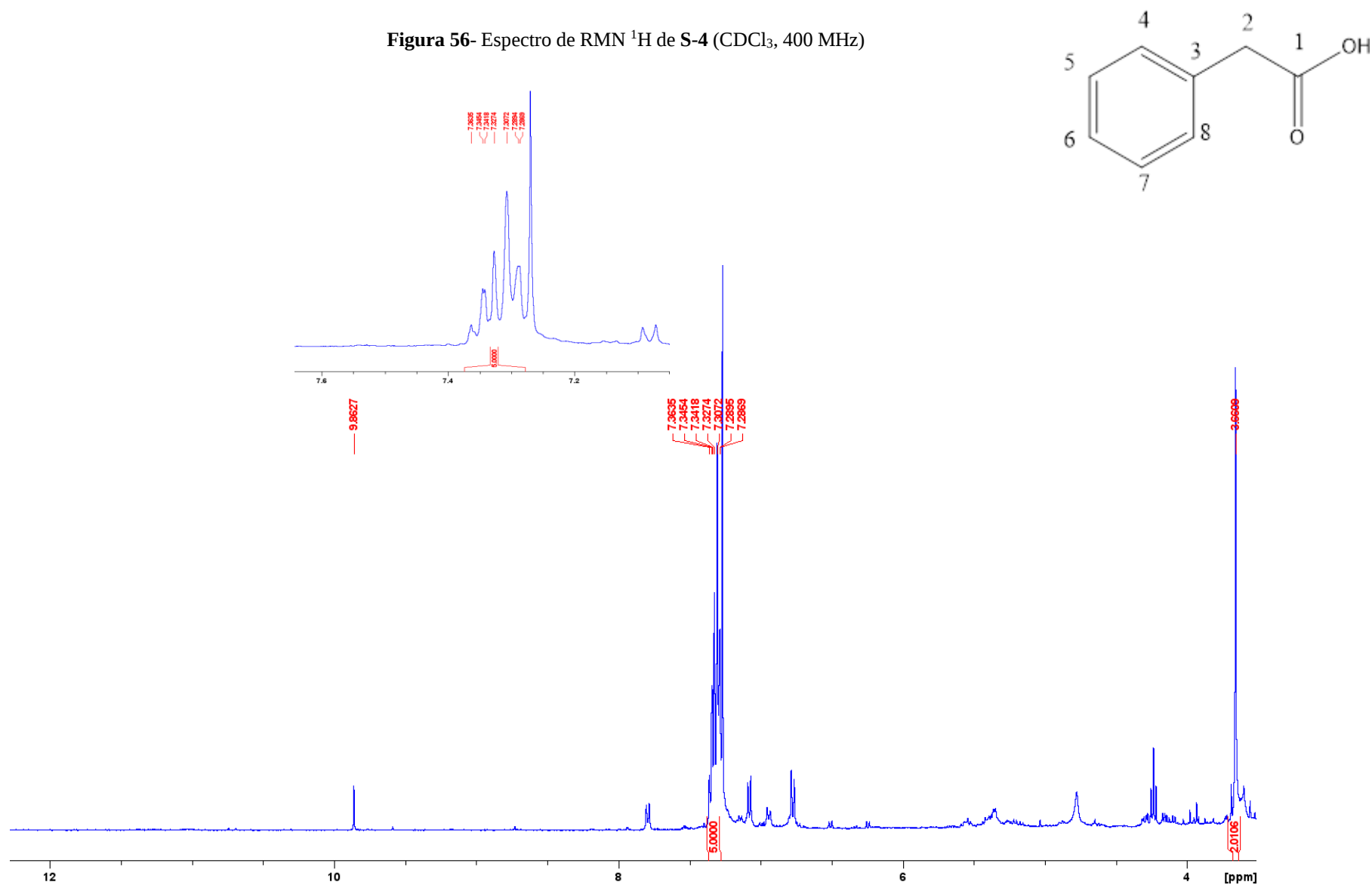
Fonte: Autora (2023)

Tabela 9- Dados de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de **S-4** em comparação com a literatura Sajid, *et al.*, 2011

	S-4	Sajid, <i>et al.</i>, 2011	S-4	Sajid, <i>et al.</i>, 2011
	<i>H</i> (δ, mult., <i>J</i> em Hz)	<i>H</i> (δ, mult., <i>J</i> em Hz)	<i>C</i>	<i>C</i>
1	-	-	176,6	178,3
2	3,66 (s)	3,62 (s)	41,2	41,1
3	-	-	133,7	133,2
4 e 8	7,28-7,36 (m)	7.30-7.20 (m)	128,8	128,6
5 e 7	7,28-7,36 (m)	7.30-7.20 (m)	129,5	129,3
6	7,28-7,36 (m)	7.30-7.20 (m)	127,4	127,3
OH-1	9,86 (s)	9,50 (s)	-	-

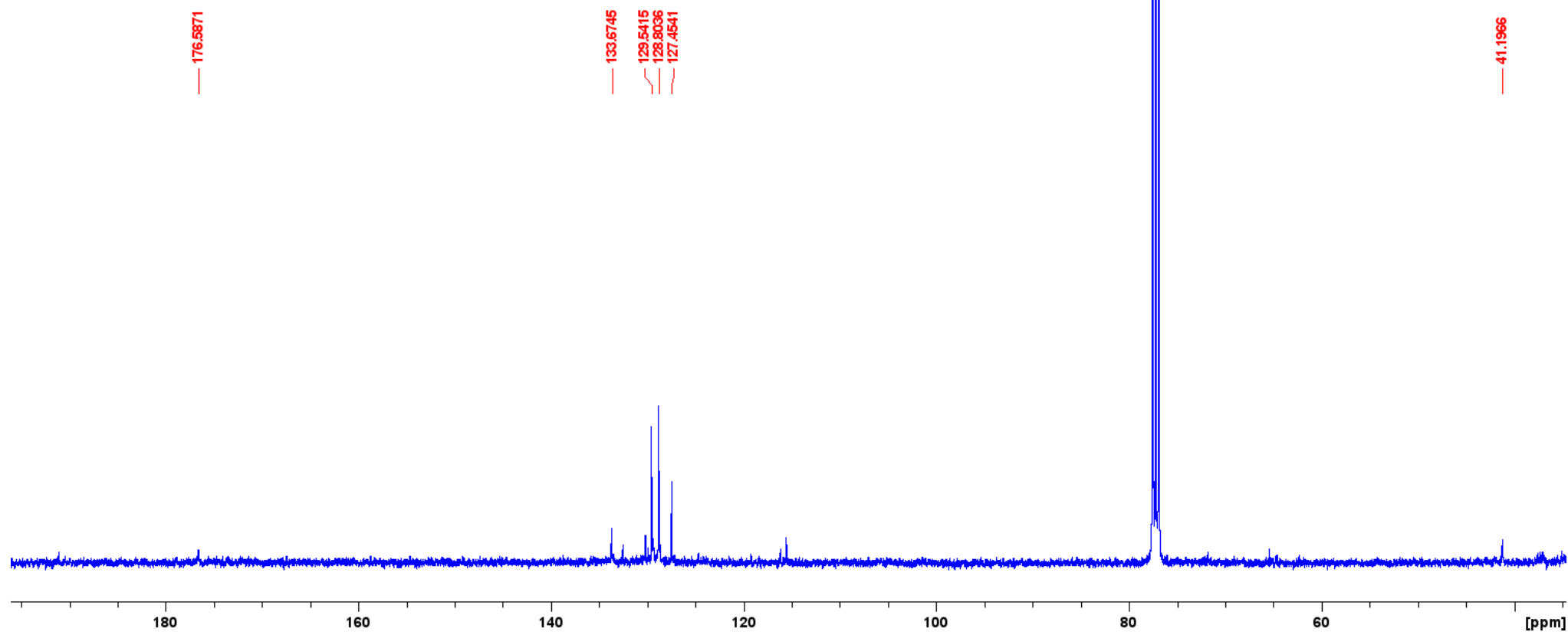
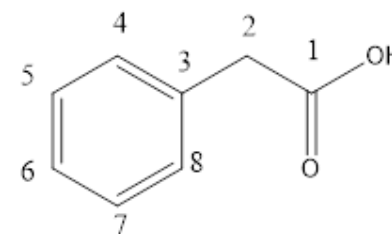
Em Sajid, *et al.*, 2011 O RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em CDCl_3 (300 MHz e 50 MHz, CDCl_3)
 Fonte: Autora (2023)

Figura 56- Espectro de RMN ^1H de S-4 (CDCl_3 , 400 MHz)

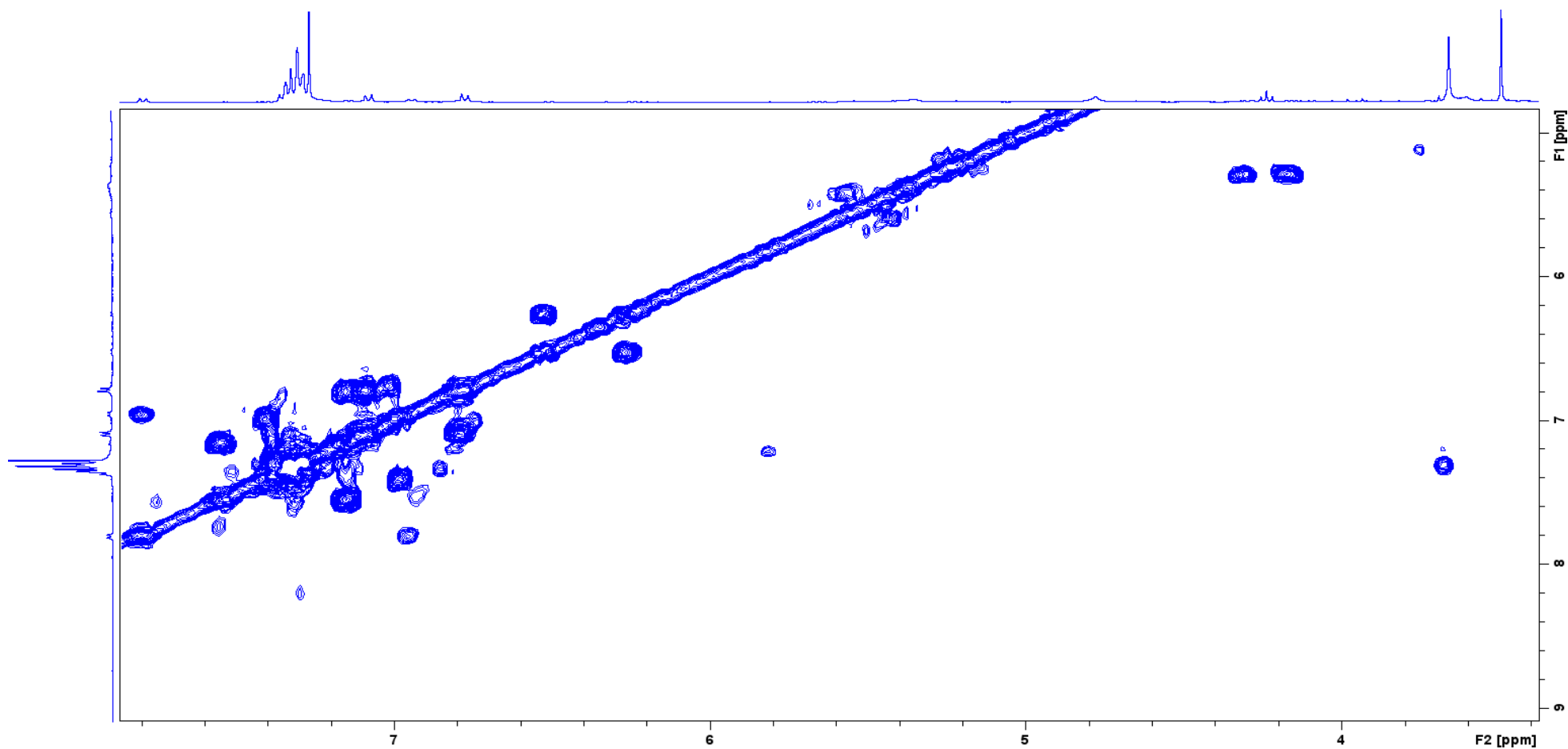
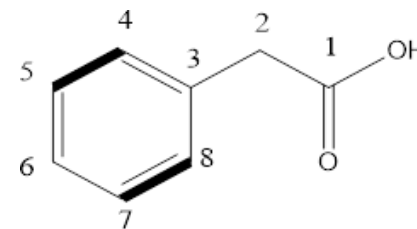


Fonte: Autora (2023)

Figura 57- Espectro de RMN ^{13}C de S-4 (CDCl_3 , 100 MHz)

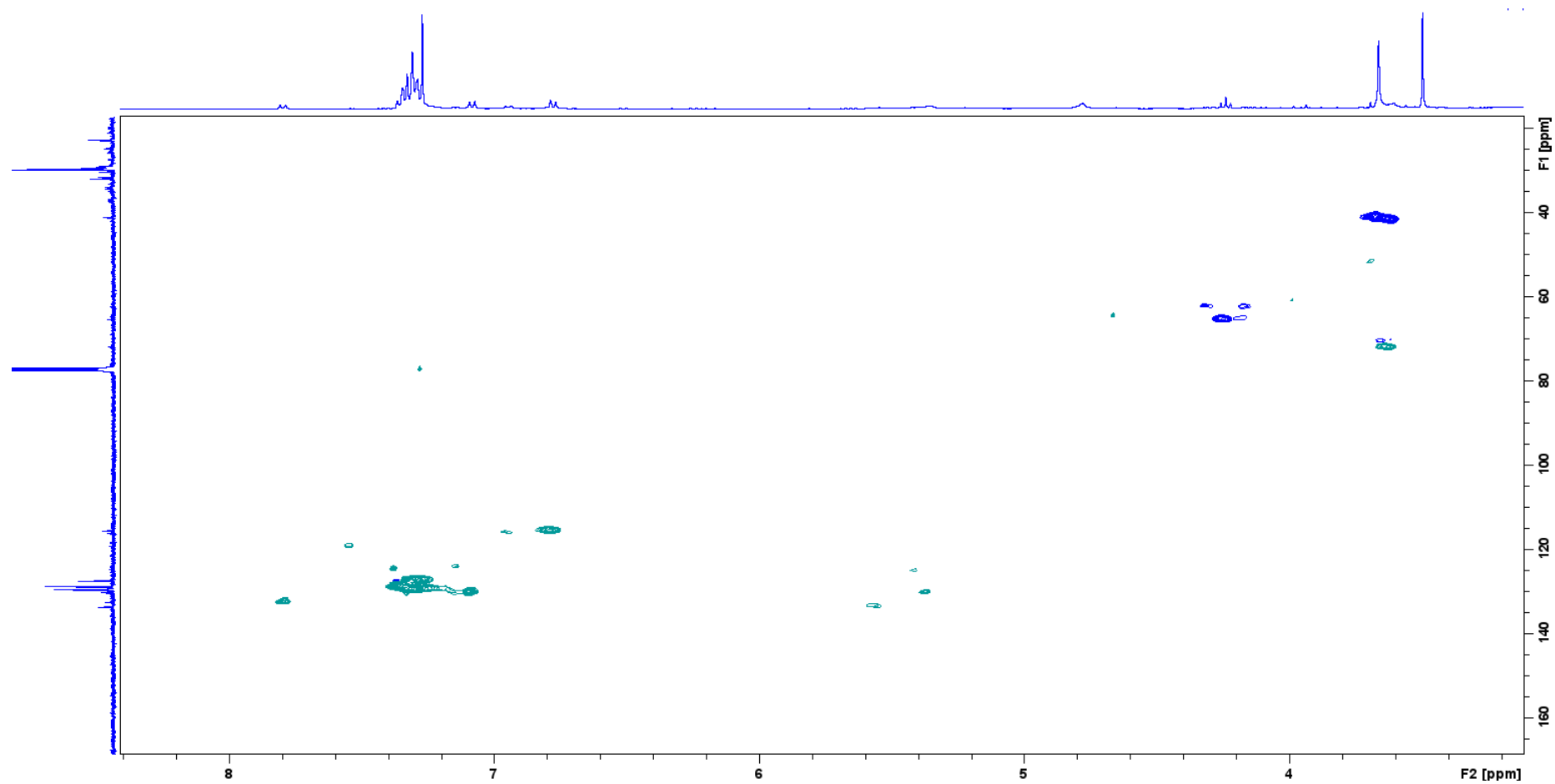
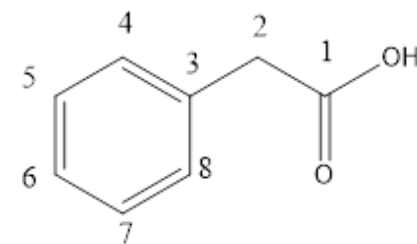


Fonte: Autora (2023)

Figura 58- Espectro de COSY de S-4

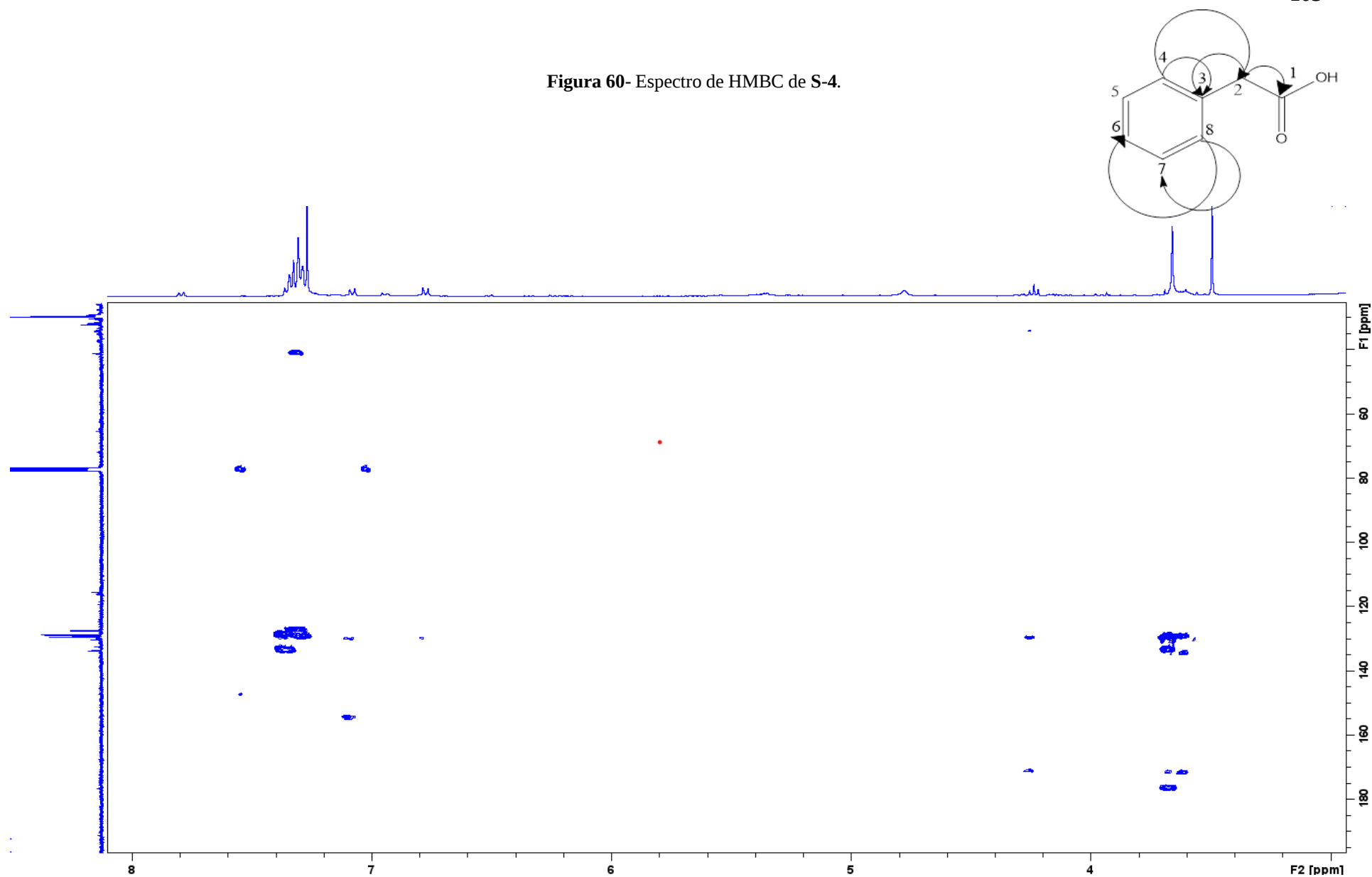
Fonte: Autora (2023)

Figura 59- Espectro de HSQC de S-4.



Fonte: Autora (2023)

Figura 60- Espectro de HMBC de S-4.



5.2.5 Substância S-5: 4-(2-acetoxietil) -fenilacetato

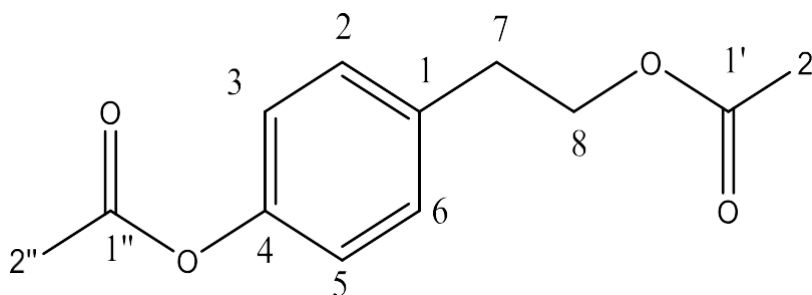
A substância S-5 (figura 61) foi obtida por meio da reação de acetilação de S-1, apresentando-se como um sólido oleoso de cor amarela. Ao comparar os espectros de RMN ^1H da substância S-1 com o produto resultante da reação (figura 64, p. 109), observou-se o surgimento de dois singletos atribuídos a hidrogênios de metila, com deslocamento químico em δ_{H} 2,30 (3H; s; H-2'') e em δ_{H} 2,04 (3H; s; H-2').

Ao analisar os espectros de RMN de ^1H (figura 65, p. 110) da substância S-5, observa-se que os sinais são semelhantes aos da substância S-1. Por exemplo, os sinais dos hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,23 (2H, *d*, 8,4 Hz; H-2 e H-6) e em δ_{H} 7,03 (2H, *d*, 8,5 Hz; H-3 e H-5). Também observou-se a presença de um sinal oximetilênico em δ_{H} 4,28 (2H, *t*, 7,03 Hz; H-8) e um sinal de hidrogênio metilênico em δ_{H} 2,93 (2H, *t*, 7,0 Hz; H-7). Além disso, o espectro de HMBC demonstrou correlação do sinal δ_{H} 4,28 com δ_{C} 171,8, um carbono característico de carbono carbonila.

A fórmula molecular da substância S-5 foi determinada como $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4$ por meio da análise dos dados de RMN, assim como pelo espectro de massas ESI (+), o qual exibiu um pico com m/z 223,0963 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (figura 70, p. 115), indicando uma massa de 222,0963 Da para a substância S-5.

O espectro de RMN de ^{13}C (figura 66, p. 111) foi analisado e observou-se o surgimento de quatro sinais de carbonos em δ_{C} 21,1 (C-2'), δ_{C} 21,3 (C-2''), δ_{C} 171,2 (C-1') e em δ_{C} 169,8 (C-1'').

Figura 61- Estrutura de S-5



Fonte: Autora (2023)

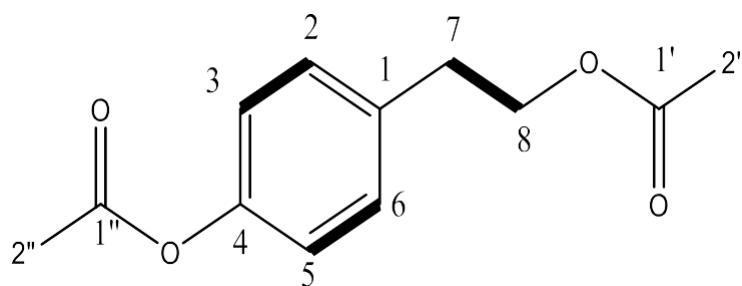
A análise do espectro de COSY (figura 67, p. 112) revela a correlação entre o sinal de hidrogênio em δ_H 2,93 (H-7) com o sinal em δ_H 4,28 (H-8). Além disso, foi observada a correlação do hidrogênio aromático em δ_H 7,23 (H-2 e H-6) com o sinal em δ_H 7,03 (H-3 e H-5).

A partir de análise do espectro de HSQC (figura 68, p. 113) evidenciou-se as correlações dos sinais de hidrogênio em δ_H 7,23 (H-2 e H-6) com o sinal de carbono em δ_C 130,0 (C-2 e C-6), sinal com deslocamento químico em δ_H 7,04 (H-3 e H-5) com o sinal de carbono em δ_C 121,8 (C-3 e C-5), sinal com deslocamento químico em δ_H 2,93 (H-7) com o sinal de carbono em δ_C 34,6 (C-7), sinal com deslocamento químico em δ_H 4,28 (H-8) com o sinal de carbono em δ_C 64,9 (C-8), sinal com deslocamento químico em δ_H 2,30 (H-2'') com o sinal de carbono em δ_C 21,3 (C-2'') e sinal de hidrogênio em δ_H 2,04 (H-2') com o sinal em δ_C 21,1 (C-2').

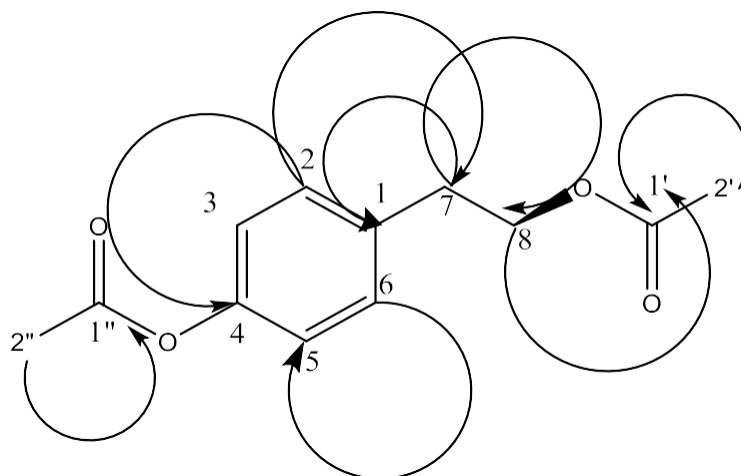
O espectro de HMBC (figura 69, p. 114) apresenta a correlação entre o sinal do hidrogênio em δ_H 7,23 (H-2 e H-6) com os sinais de carbonos em δ_C 34,6 (C-7), δ_C 149,5 (C-4) e em δ_C 121,8 (C-2 e C-6), verificou-se também correlação do sinal de hidrogênio em δ_H 2,93 (H-7) com os sinais de carbonos em δ_C 64,9 (C-8), δ_C 130,0 (C-2 e C-6) e em δ_C 135,6 (C-1); observa-se também a correlação das metilas terminais δ_H 2,30 (H-2'') e δ_H 2,04 (H-2') respectivamente com os sinais em δ_C 171,2 (C-1') e em δ_C 169,8 (C-1''); bem como a correlação em δ_H 4,28 (H-8) com o sinal em δ_C 171,2 (C-1') determinando assim a posição dos carbonos carbonílicos.

A substância S-5, identificada como 4-(2-acetoxietil) fenilacetato por meio da análise dos dados espectroscópicos e da comparação com a literatura (Kashyap; Phukan, 2013), é um composto fenólico acetilado encontrado tanto de forma natural quanto sintética. Fragopoulou e colaboradores (2007) conduziram um estudo com o objetivo de examinar a atividade biológica do tirosol e de seus derivados acetilados. No estudo, o derivado diacetilado do tirosol foi avaliado em relação à sua atividade antitrombótica, observando-se que esse derivado induziu a agregação de plaquetas de coelhos. Esses resultados indicam uma mudança na atividade biológica em comparação com o tirosol não modificado, sugerindo que a adição de dois grupos acetila à estrutura do tirosol pode inverter sua atividade biológica, passando de inibição para indução de agregação plaquetária.

A seguir, apresentam-se as representações de todas as correlações de COSY (figura 62, p.106) e HMBC (figura 63, p. 106), bem como as Tabelas 10 (p. 107) e 11 (p. 108). A primeira tabela compara os dados de RMN 1H e RMN ^{13}C da substância S-1 com os da substância S-5, resultante da acetilação. A tabela 6 descreve os dados de RMN 1H e ^{13}C da substância S-5 e os compara com os dados da literatura (Kashyap; Phukan, 2013).

Figura 62- Principais correlações de COSY de S-5

Fonte: Autora (2023)

Figura 63- Principais correlações de HMBC de S-5

Fonte: Autora (2023)

Tabela 10- Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C (400 MHz e 100 MHz, CDCl_3) de **S-1** e **S-5**

	S-1	S-5	S-1	S-5
	<i>H</i> (δ , mult., <i>J</i> em Hz)	<i>H</i> (δ , mult., <i>J</i> em Hz)	C	C
1	-	-	129,6	135,6
2	7,04 (<i>d</i> , 8,4)	7,23 (<i>d</i> , 8,44)	129,5	130,0
3	6,78 (<i>d</i> , 8,4)	7,04 (<i>d</i> , 8,47)	114,7	121,8
4	-	-	155,3	149,5
5	6,78 (<i>d</i> , 8,4)	7,04 (<i>d</i> , 8,47)	114,7	121,8
6	7,04 (<i>d</i> , 8,4)	7,23 (<i>d</i> , 8,44)	129,5	130,0
7	2,80 (<i>t</i> , 7,2)	2,93 (<i>t</i> , 7,02)	37,9	34,6
8	3,83 (<i>t</i> , 7,2)	4,28 (<i>t</i> , 7,3)	63,2	64,9
1'	-	-	-	171,2
2'	-	2,30 (<i>s</i>)	-	21,3
1''	-	-	-	169,8
2''	-	2,04 (<i>s</i>)	-	21,1

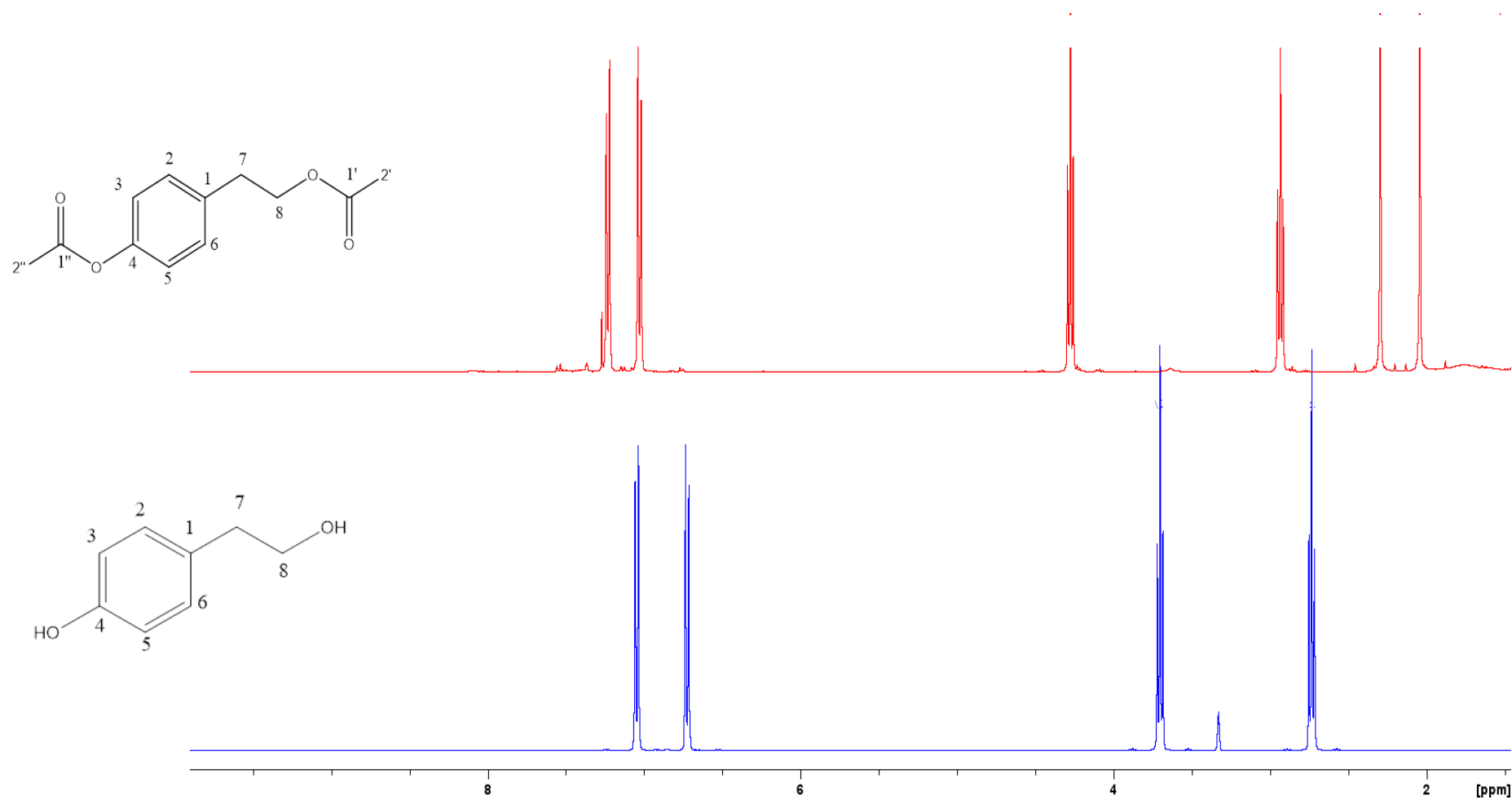
Fonte: Autora (2023)

Tabela 11- Dados de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de S-5 em comparação com a literatura (Kashyap; Phukan, 2013)

	S-5	Kashyap; Phukan, 2013	S-5	Kashyap; Phukan, 2013
	<i>H</i> (δ , mult., <i>J</i> em Hz)	<i>H</i> (δ , mult., <i>J</i> em Hz)	<i>C</i>	<i>C</i>
1	-	-	135,6	135,3
2	7,23 (<i>d</i> , 8,44)	7.22 (<i>d</i> , 9,0)	130,0	129.7
3	7,04 (<i>d</i> , 8,47)	7.02 (<i>d</i> , 9,0)	121,8	121.4
4	-	-	149,5	149,2
5	7,04 (<i>d</i> , 8,47)	7.02 (<i>d</i> , 9,0)	121,8	121.4
6	7,23 (<i>d</i> , 8,44)	7.22 (<i>d</i> , 9,0)	130,0	129.7
7	2,93 (<i>t</i> , 7,02)	2,92 (<i>t</i> , 6,0)	34,6	34,3
8	4,28 (<i>t</i> , 7,03)	4,25 (<i>t</i> , 6,0)	64,9	64,6
1'	-	-	171,1	170,9
2'	2,30 (<i>s</i>)	2,28 (<i>s</i>)	21,3	21,0
1''	-	-	169,7	169,5
2''	2,04 (<i>s</i>)	2,03 (<i>s</i>)	21,1	21,0

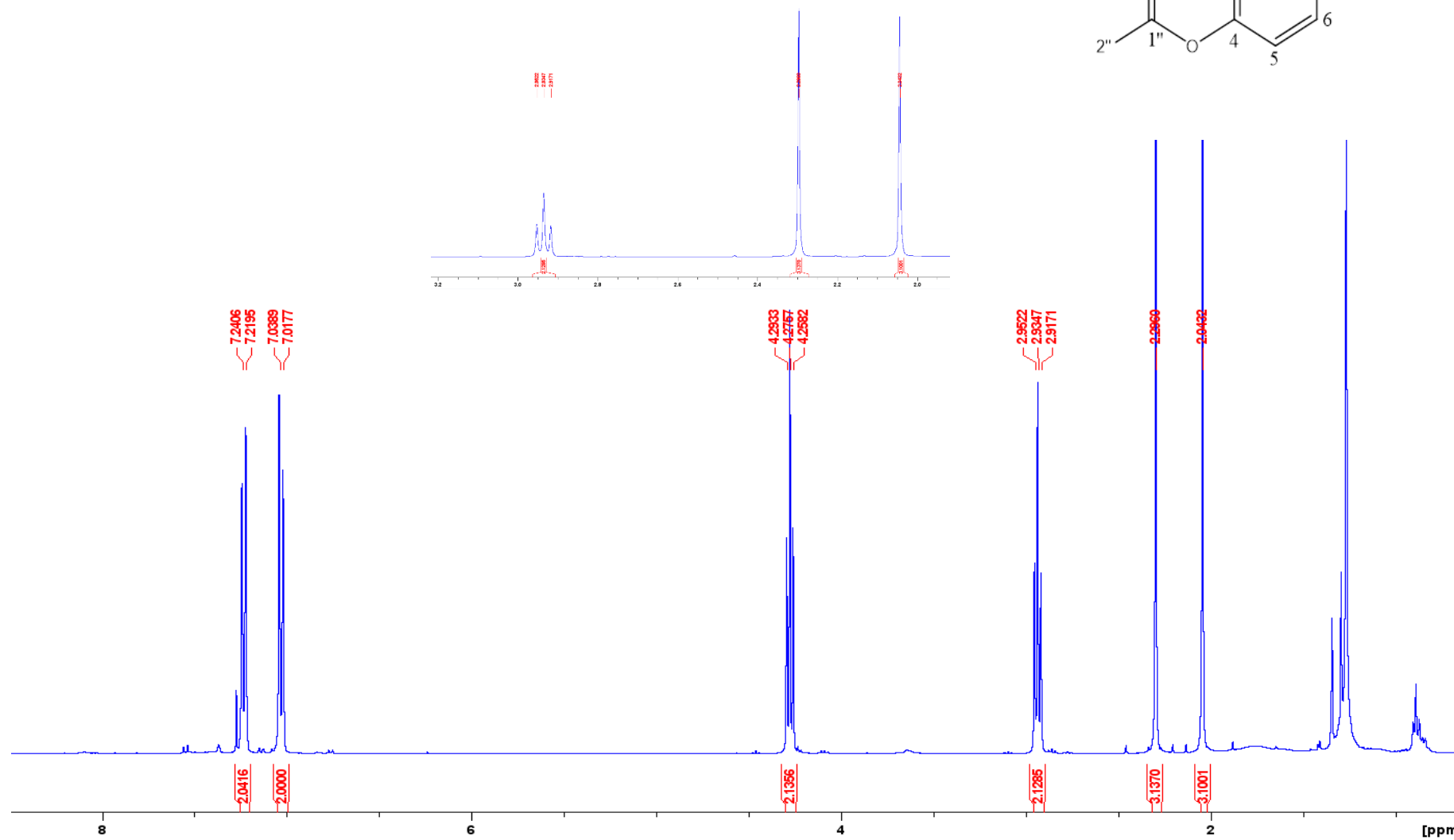
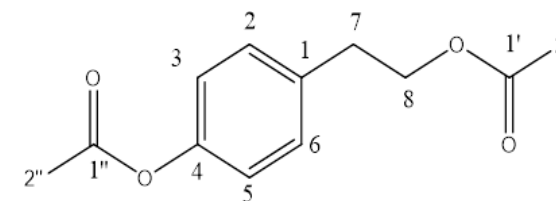
Em Kashyap; Phukan (2013) , o RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em CDCl_3 (300 MHz e 75 MHz).
 Fonte: Autora (2023)

Figura 64- Comparação dos espectros de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de S-1 e S-5



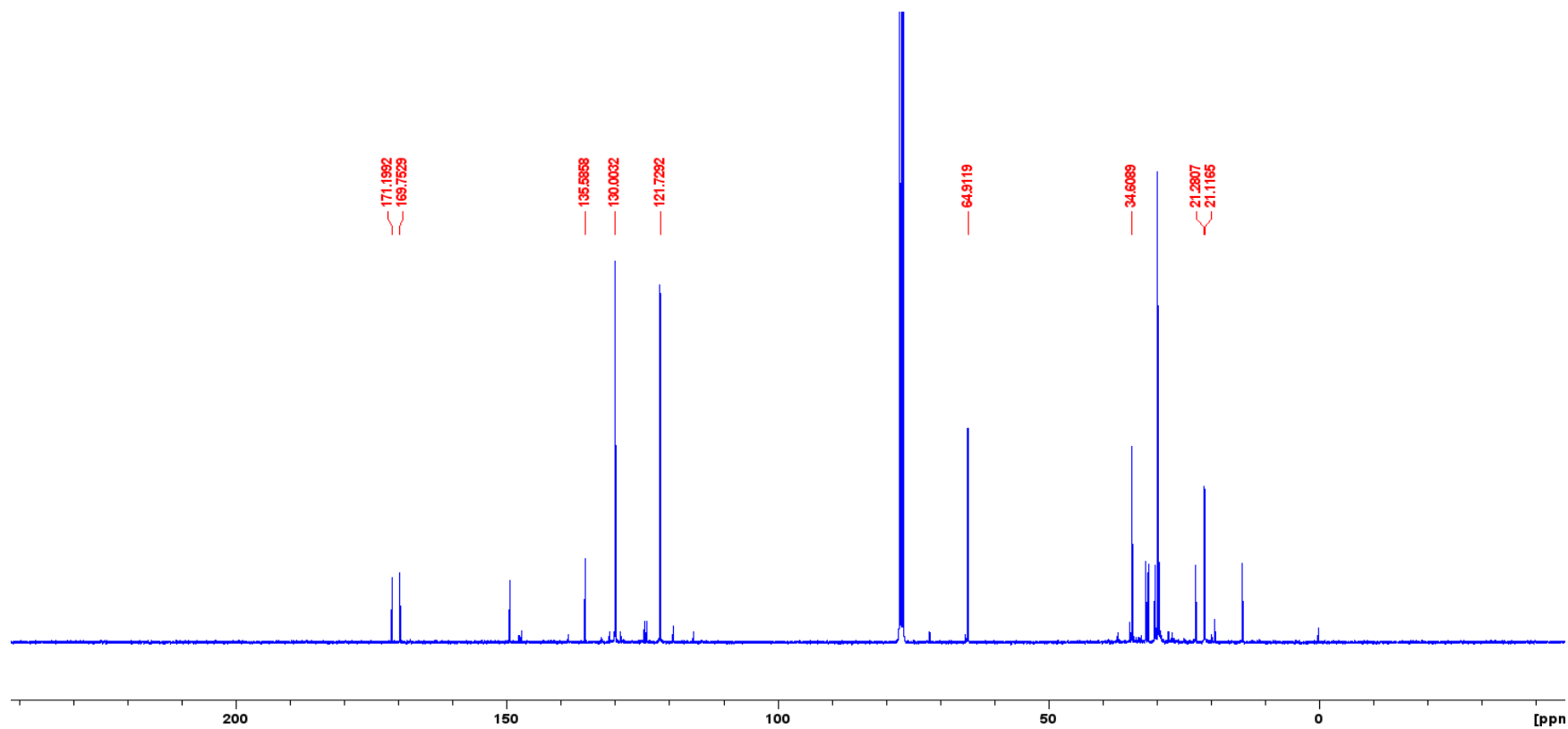
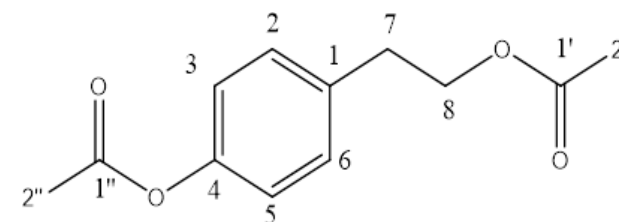
Fonte: Autora (2023)

Figura 65- Espectro de RMN ^1H de S-5 (CDCl_3 , 400 MHz)

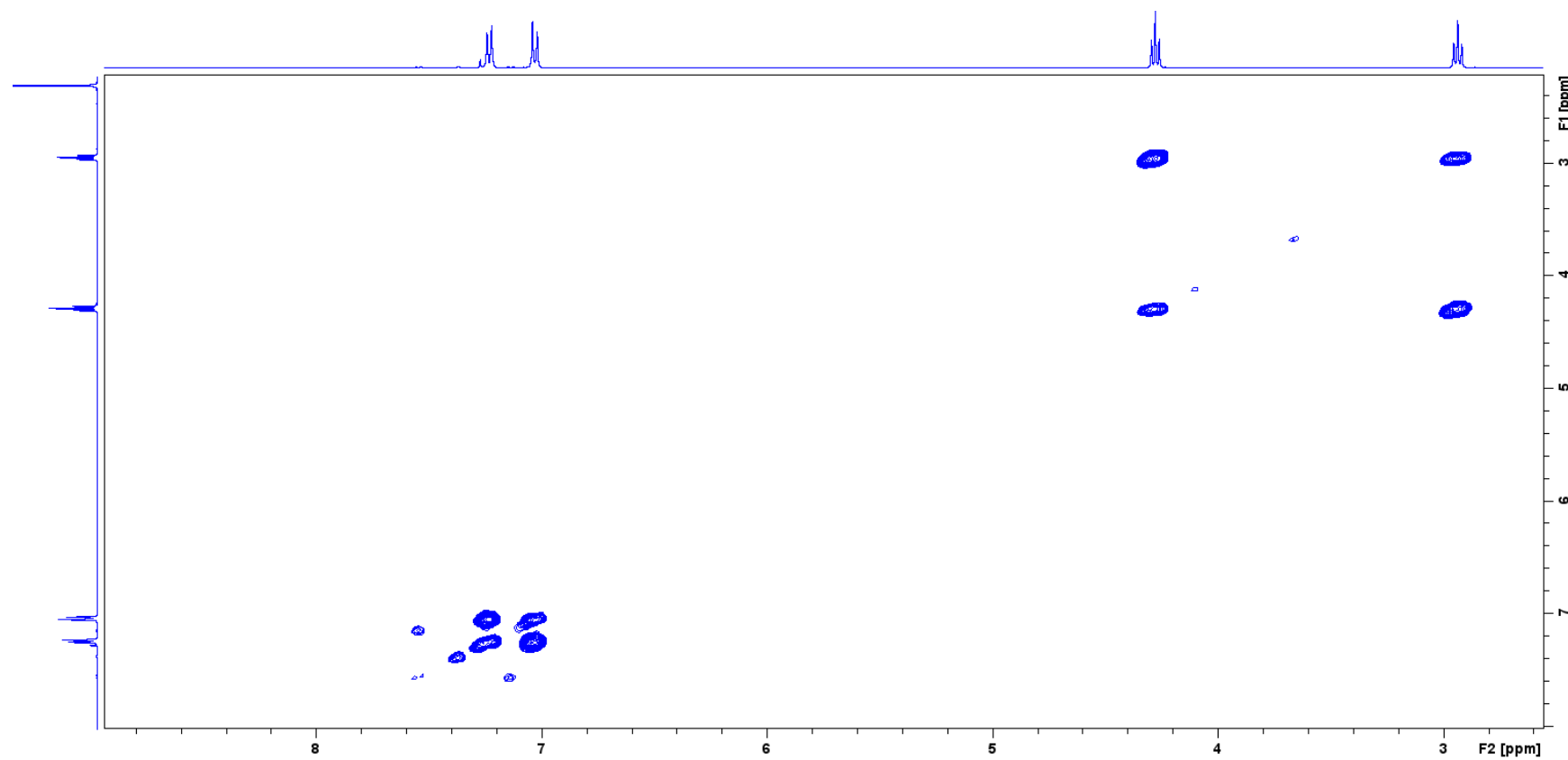
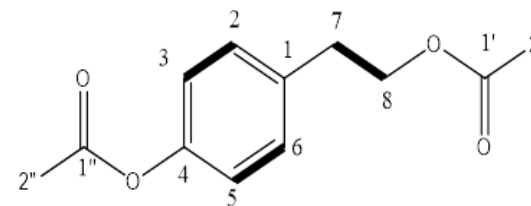


Fonte: Autora (2023)

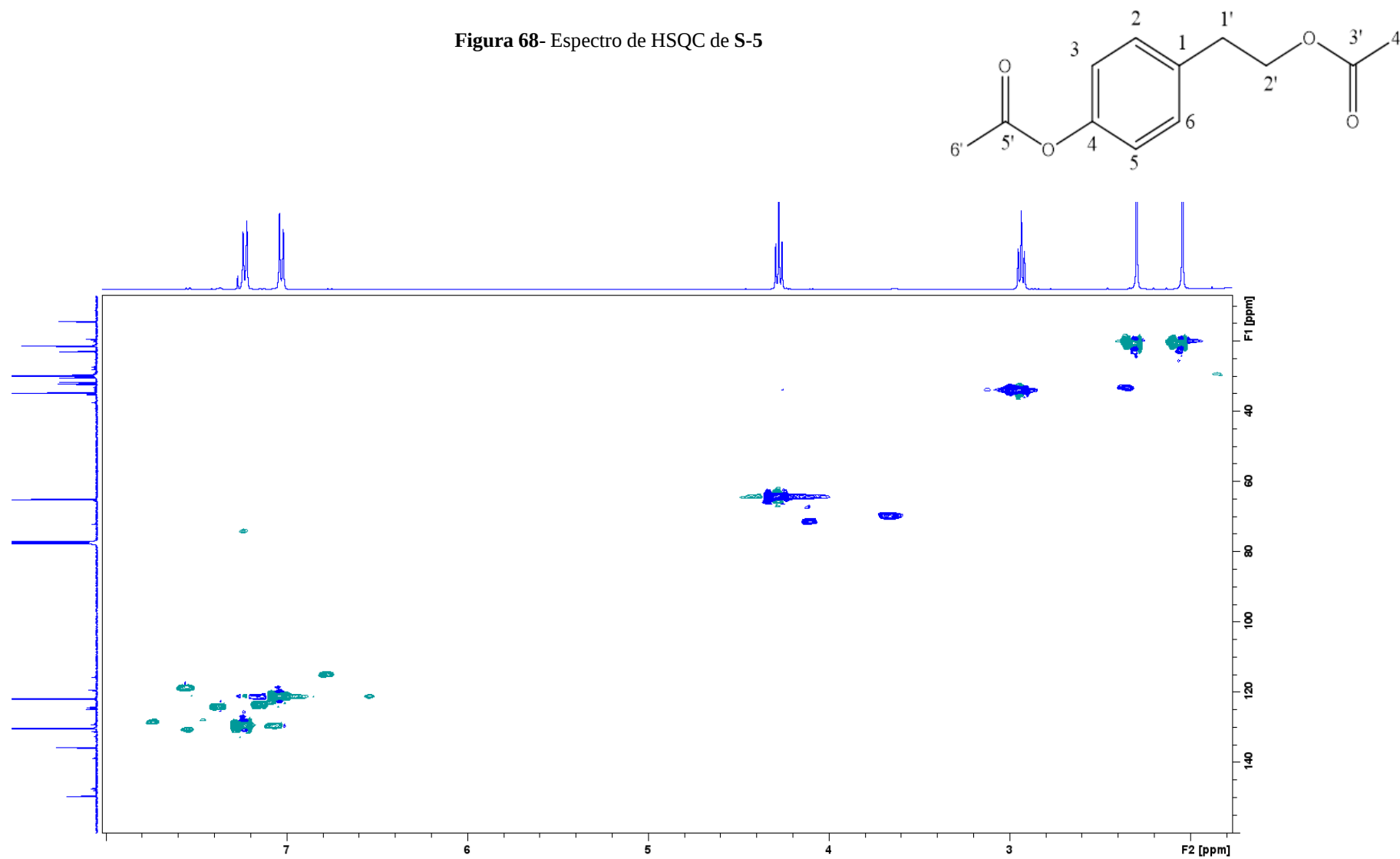
Figura 66- Espectro de RMN ^{13}C de S-5 (CDCl_3 , 100 MHz)



Fonte: Autora (2023)

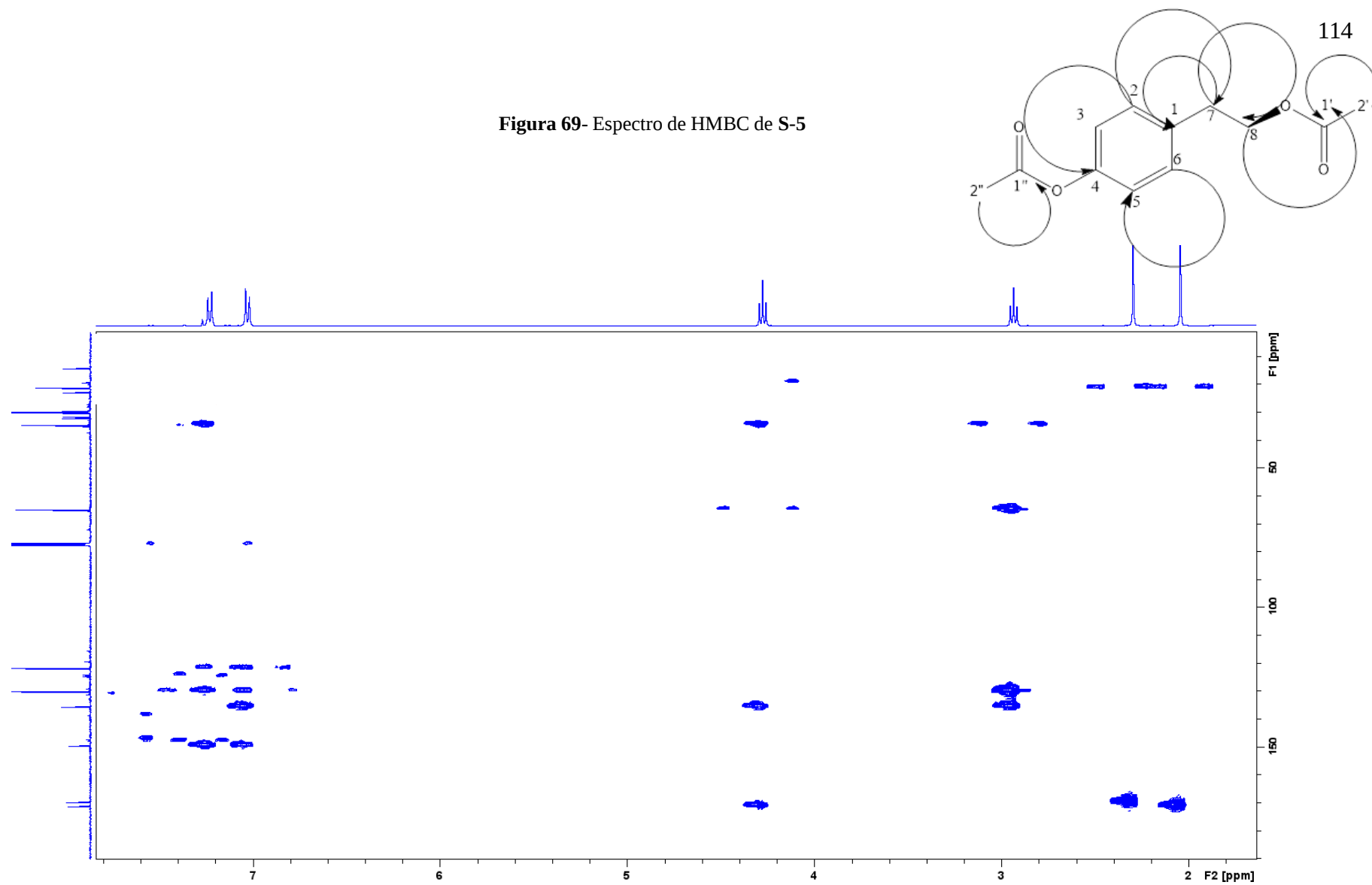
Figura 67- Espectro de COSY de S-5

Fonte: Autora (2023)

Figura 68- Espectro de HSQC de S-5

Fonte: Autora (2023)

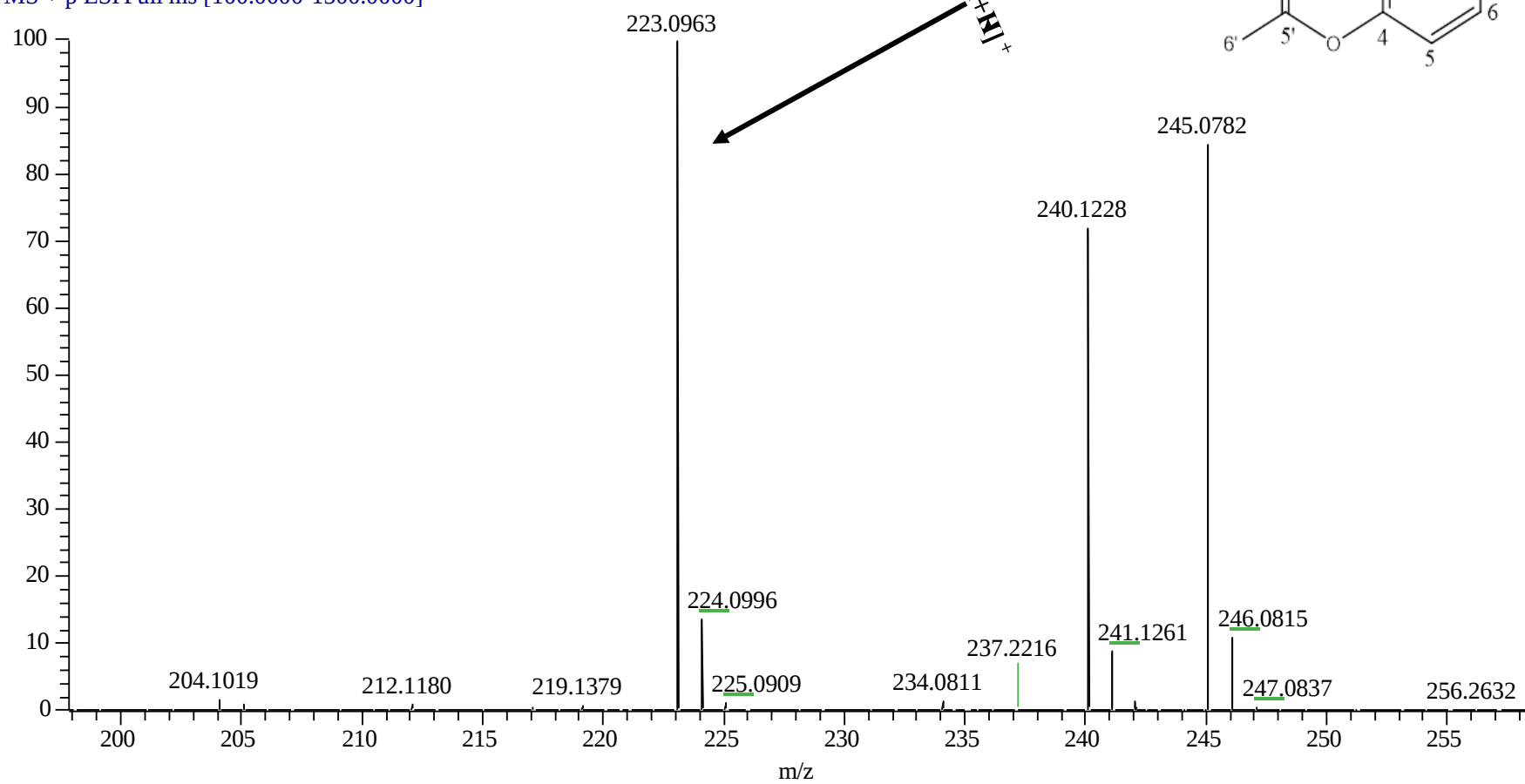
Figura 69- Espectro de HMBC de S-5



Fonte: Autora (2023)

Figura 70- Espectro de massas ESI (+) de S-5

LABQ21 #28-58 RT: 0.09-0.15 AV: 5 NL: 9.54E8 T:
FTMS + p ESI Full ms [100.0000-1500.0000]



Fonte: Autora (2023)

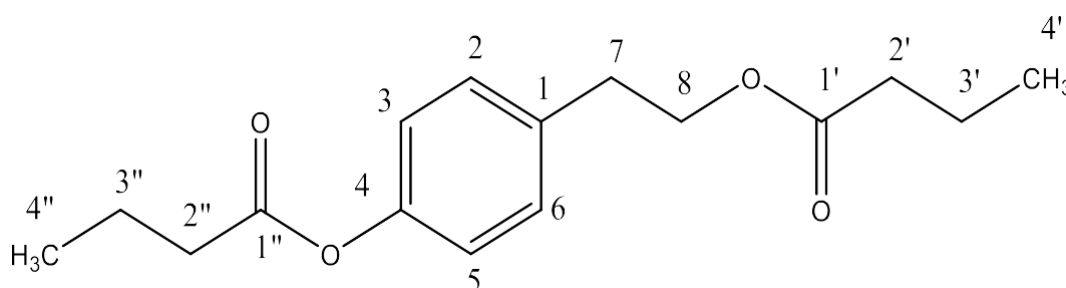
5.2.6 Substância S-6: 4-(2-(butiriloxi)etil) fenilbutirato

A substância **S-6** (figura 71) foi obtida por meio da reação de butanoilação de **S-1**. Ela se apresentou como um sólido oleoso de cor amarela. Ao comparar os espectros de RMN ^1H da substância **S-1** com espectro de RMN ^1H do produto da reação (figura 74, p. 120) observa-se o surgimento de dois sinais referentes a hidrogênios de metila com deslocamento químico em δ_{H} 1,05 (3H, *t*, 7,41 Hz; H-4'') e em δ_{H} 0,93 (3H, *t*, 7,41 Hz; H-4'), além de quatro sinais de hidrogênios metilênicos em δ_{H} 1,78 (2H, *m*, 7,40 Hz; H-3''), δ_{H} 2,53 (2H, *t*, 7,38 Hz; H-2''), δ_{H} 1,63 (2H, *m*, H-3') e em δ_{H} 2,27 (2H, *t*, 7,42 Hz; H-2').

Ao analisar os espectros de RMN de ^1H (figura 75-76, p. 121-122) da substância **S-6** observa-se sinais semelhantes aos da substância **S-1**. Por exemplo, os sinais dos hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,22 (2H, *d*, 8,44 Hz; H-2 e H-6) e em δ_{H} 7,01 (2H, *d*, 8,48 Hz; H-3 e H-5). Além disso, destacam-se o sinal do hidrogênio metilênico em δ_{H} 2,93 (2H, *t*, 6,98 Hz; H-7) e o sinal do hidrogênio oximetilênico em δ_{H} 4,28 (2H, *t*, 7,03 Hz; H-8).

A fórmula molecular da substância **S-6** foi determinada como $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$ por meio da análise dos dados de RMN, assim como pelo espectro de massas ESI (+), o qual exibiu um pico com m/z 279.1592 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (figura 81, p. 127), indicando uma massa de 278.1592 Da para a substância **S-6**.

Figura 71- Estrutura de S-6



Fonte: Autora (2023)

No espectro de RMN ^{13}C de **S-6** (figura 77, p. 123) observa-se oito sinais de carbono a mais em comparação **S-1**, sugerindo o aparecimento de duas cadeias laterais. Foram identificados os seguintes sinais: um sinal de carbono sp^3 em δ_{C} 13,77, atribuído aos carbonos C-1' e C-1'', bem como quatro sinais de carbono metilênicos em δ_{C} 36,3 (C-2'), δ_{C} 36,4 (C-2''), δ_{C} 18,5 (C-3') e δ_{C} 18,6 (C-3''). Além disso, foram observados dois sinais típicos de carbonos de carbonila em δ_{C} 172,3 (C-1'') e em δ_{C} 173,7 (C-1').

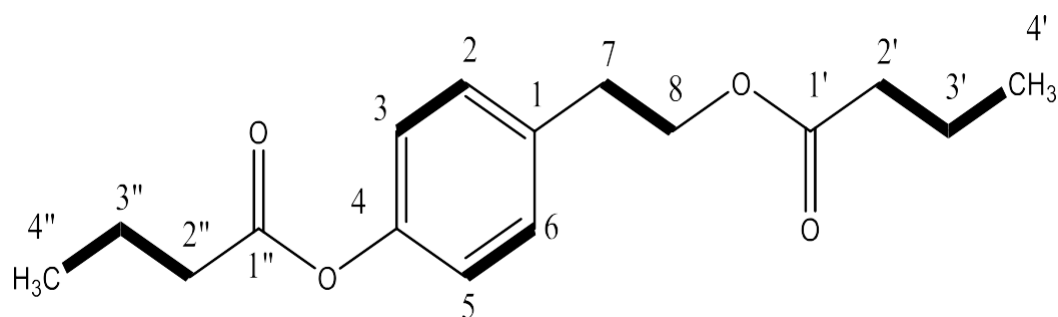
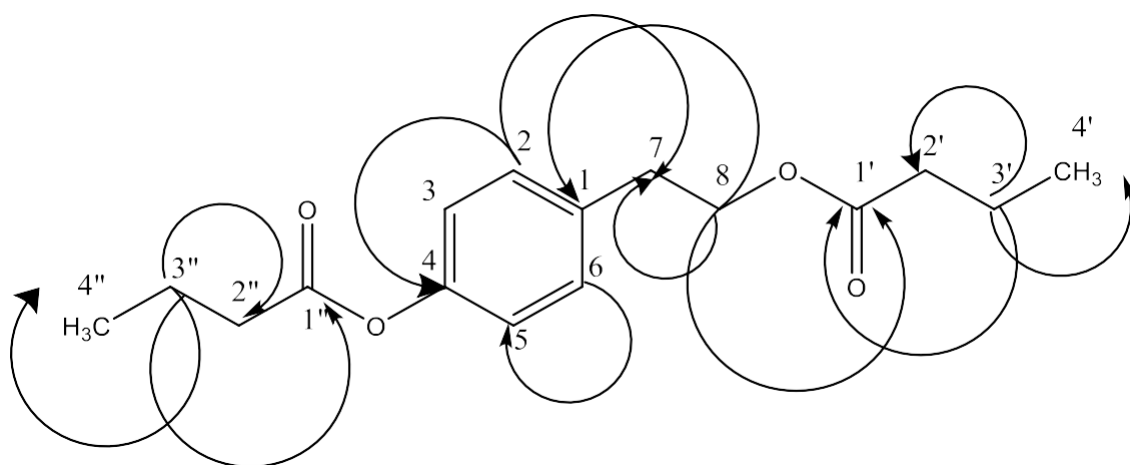
A partir da análise do espectro COSY (figura 78, p. 124) verificou-se as correlações

entre os sinais de hidrogênio em δ_H 1,78 (H-3'') com os sinais em δ_H 1,05 (H-4'') e em δ_H 2,53 (H-2''); entre δ_H 1,63 (H-3') com os sinais em δ_H 0,93 (H-4') e em δ_H 2,27 (H-2'). Também foram observadas as correlações entre δ_H 4,28 (H-7) e δ_H 2,93 (H-8), assim como entre os sinais em δ_H 7,22 (H-2 e H-6) e δ_H 7,01 (H-3 e H-5).

A partir da análise espectrométrica de HSQC (figura 79, p. 125) evidenciou-se as correlações dos sinais de hidrogênios em δ_H 1,05 (H-4'') e 0,93 (H-4') com o sinal de carbono em δ_C 13,8 (C-4' e C-4''), sinal com deslocamento químico em δ_H 1,78 (H-3'') com o sinal de carbono em δ_C 18,6 (C-3''), sinal com deslocamento químico em δ_H 1,63 (H-3') com o sinal de carbono em δ_C 18,5 (C-3'), sinal com deslocamento químico em δ_H 2,53 (H-2'') com o sinal de carbono em δ_C 36,4 (C-2'') e sinal de hidrogênio em δ_H 2,27 (H-2') com o sinal em δ_C 36,3 (C-2'). Também foram confirmadas as correlações previamente observadas em **S-1**, como as correlações entre os sinais em δ_H 4,28 (H-8) com o sinal em δ_C 64,7 (C-8), sinal de hidrogênio em δ_H 2,93 (H-7) com o sinal em δ_C 34,7 (C-7) e a correlação dos sinais dos hidrogênios do anel aromático em δ_H 7,22 (H-2 e H-6) com o sinal em δ_C 129,9 (C-2 e C-6) e em δ_H 7,01 (H-3 e H-5) com o sinal em δ_C 121,7 (C-3 e C-5).

O espectro de HMBC (figura 80, p. 126) apresenta a correlação entre o sinal do hidrogênio em δ_H 1,78 (H-3'') com os sinais de carbono em δ_C 172,3 (C-1''), δ_C 36,4 (C-2'') e δ_C 13,7 (C-4' e C-4''). Além disso observou-se a correlação do sinal de hidrogênio em δ_H 1,63 (H-3') com os sinais de carbono em δ_C 173,7 (C-1'), δ_C 36,3 (C-2') e δ_C 13,7 (C-4'). Também são observadas as correlações já identificadas em **S-1**, como a correlação entre δ_H 4,28 (H-7) com os sinais de carbono em δ_C 34,67 (C-7), δ_C 135,51 (C-1) e δ_C 173,75 (C-1'), bem como a correlação entre δ_H 7,22 (H-2 e H-6) com os sinais de carbono em δ_C 34,7 (C-7), δ_C 121,7 (C-3 e C-5) e δ_C 149,53 (C-4).

A seguir, apresentam-se as representações de todas as correlações de COSY (figura 72, p. 118) e HMBC (figura 73, p. 118), além da tabela 12 (p. 119) que compara os dados de RMN 1H e RMN ^{13}C da substância **S-1** com o produto da butanoilação. Através da análise de RMN de 1H , ^{13}C , HSQC, COSY e HMBC, foi possível propor a estrutura de **S-6**. Após comparar os dados de RMN 1H e ^{13}C com a literatura disponível, não foi encontrado nenhum relato, portanto, o composto é inédito.

Figura 72- Principais correlações de COSY de S-6**Figura 73-** Principais correlações de HMBC

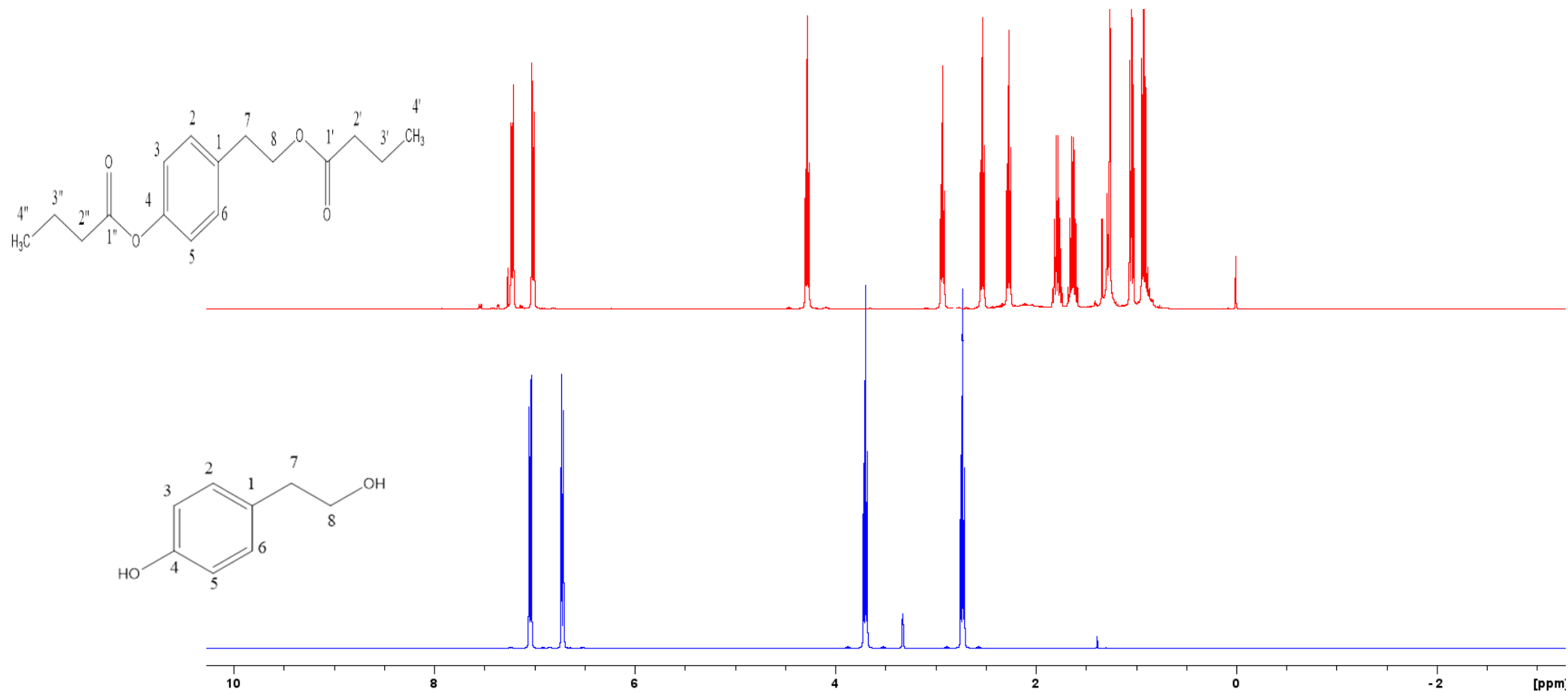
Fonte: Autora (2023)

Tabela 12- Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C (400 MHz e 100 MHz, CDCl_3) de **S-1** com **S-6**.

	S-1	S-6	S-1	S-6
	<i>H</i> (δ , mult., <i>J</i> em Hz)	<i>H</i> (δ , mult., <i>J</i> em Hz)	C	C
1	-	-	129,6	135,5
2	7,04 (<i>d</i> , 8,4)	7,22 (<i>d</i> , 8,44)	129,5	129,9
3	6,78 (<i>d</i> , 8,4)	7,01 (<i>d</i> , 8,48)	114,7	121,7
4	-	-	155,3	149,5
5	6,78 (<i>d</i> , 8,4)	7,01 (<i>d</i> , 8,48)	114,7	121,7
6	7,04 (<i>d</i> , 8,4)	7,22 (<i>d</i> , 8,44)	129,5	129,9
7	2,80 (<i>t</i> , 7,2)	2,93 (<i>t</i> , 6,98)	37,9	34,7
8	3,83 (<i>t</i> , 7,2)	4,28 (<i>t</i> , 7,03)	63,2	64,7
1'	-	-	-	173,7
2'	-	2,27 (<i>t</i> , 7,42)	-	36,3
3'	-	1,63 (<i>m</i> , 7,42)	-	18,5
4'	-	0,93 (<i>t</i> , 7,41)	-	13,8
1''	-	-	-	172,3
2''	-	2,53 (<i>t</i> , 7,38)	-	36,4
3''	-	1,78 (<i>m</i> , 7,40)	-	18,6
4''	-	1,05 (<i>t</i> , 7,41)	-	13,8

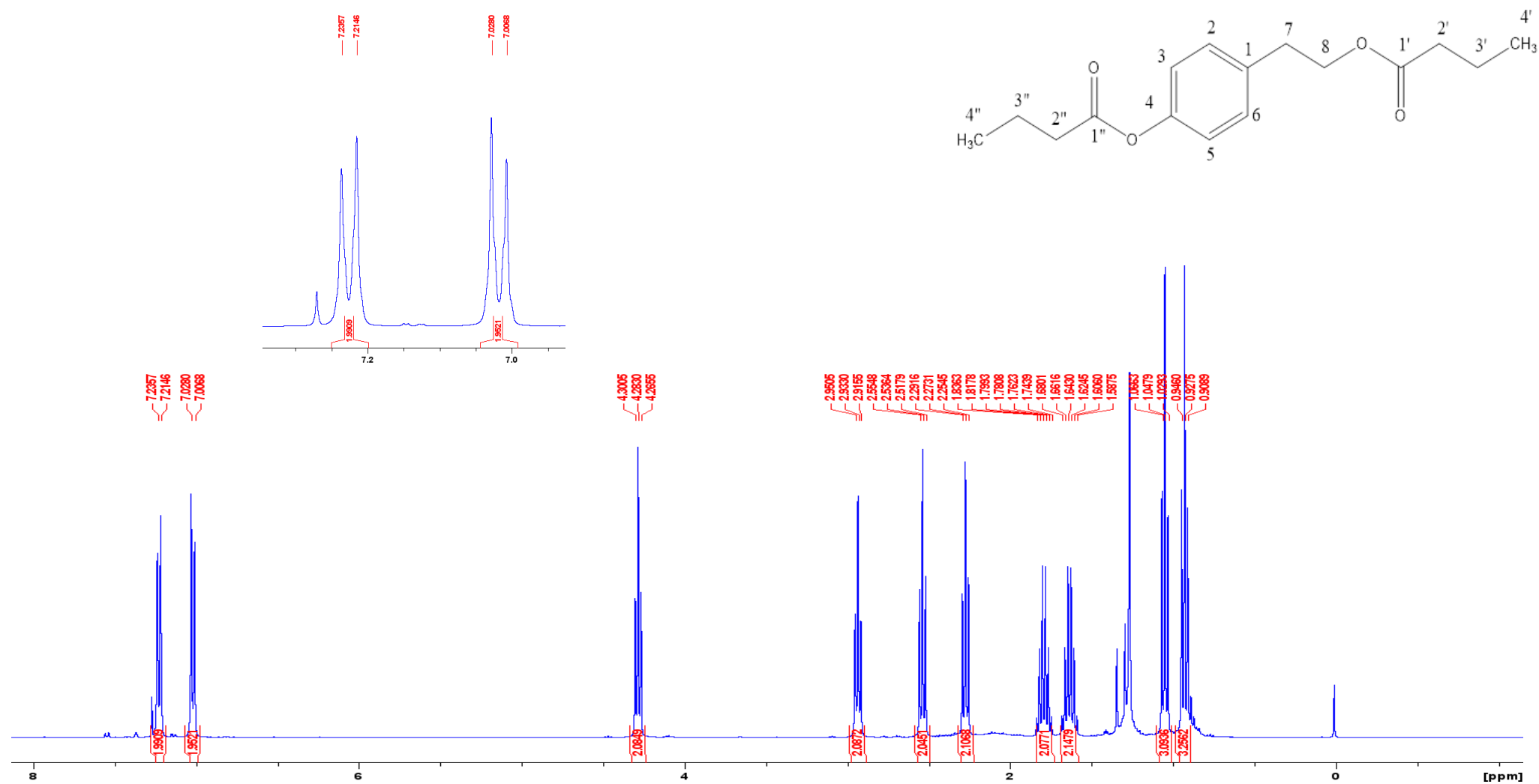
Fonte: Autora (2023)

Figura 74- Comparação dos espectros de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **S-1** e **S-6**.



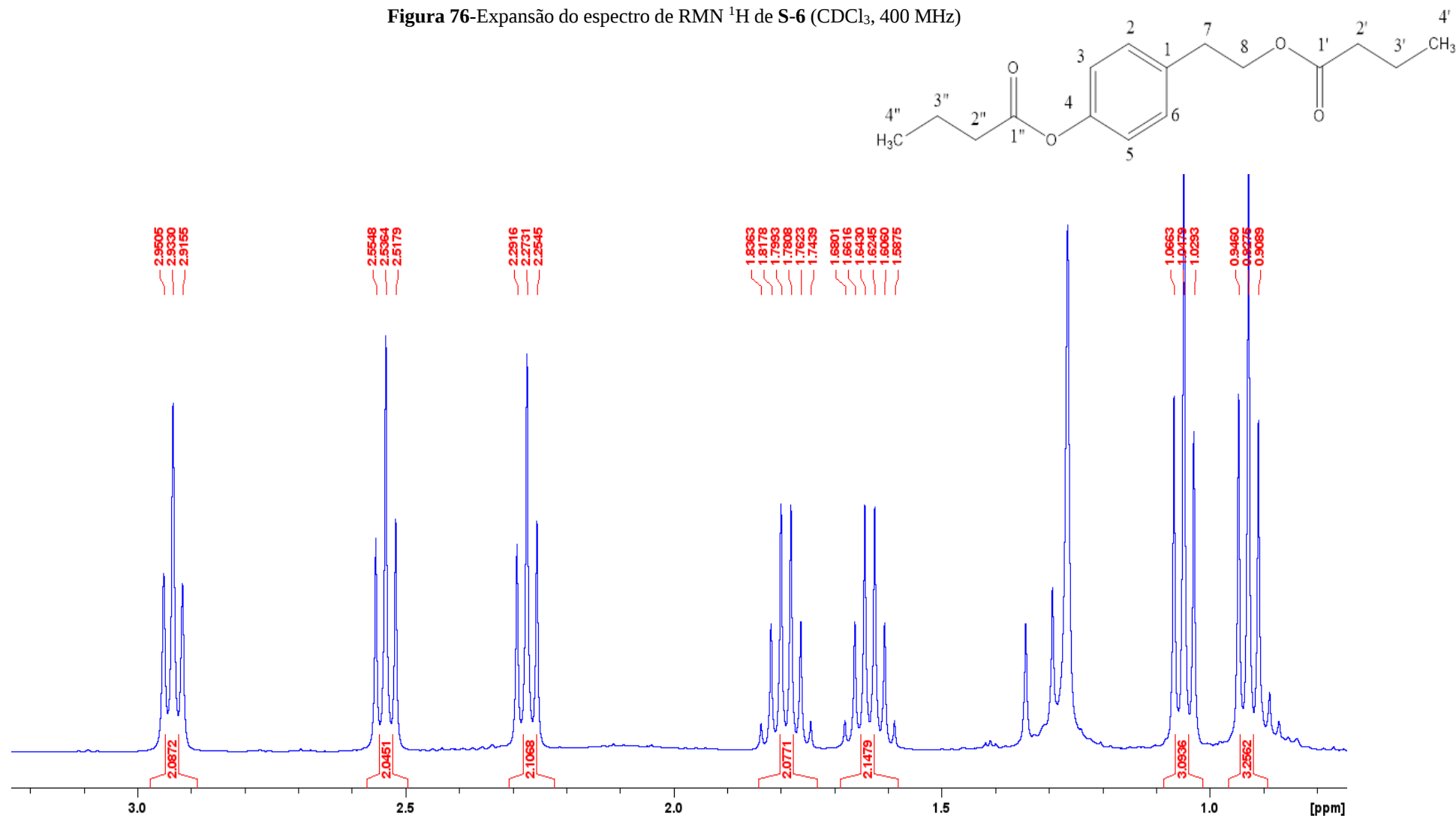
Fonte: Autora (2023)

Figura 75- Espectro de RMN ^1H de S-6 (CDCl_3 , 400 MHz)



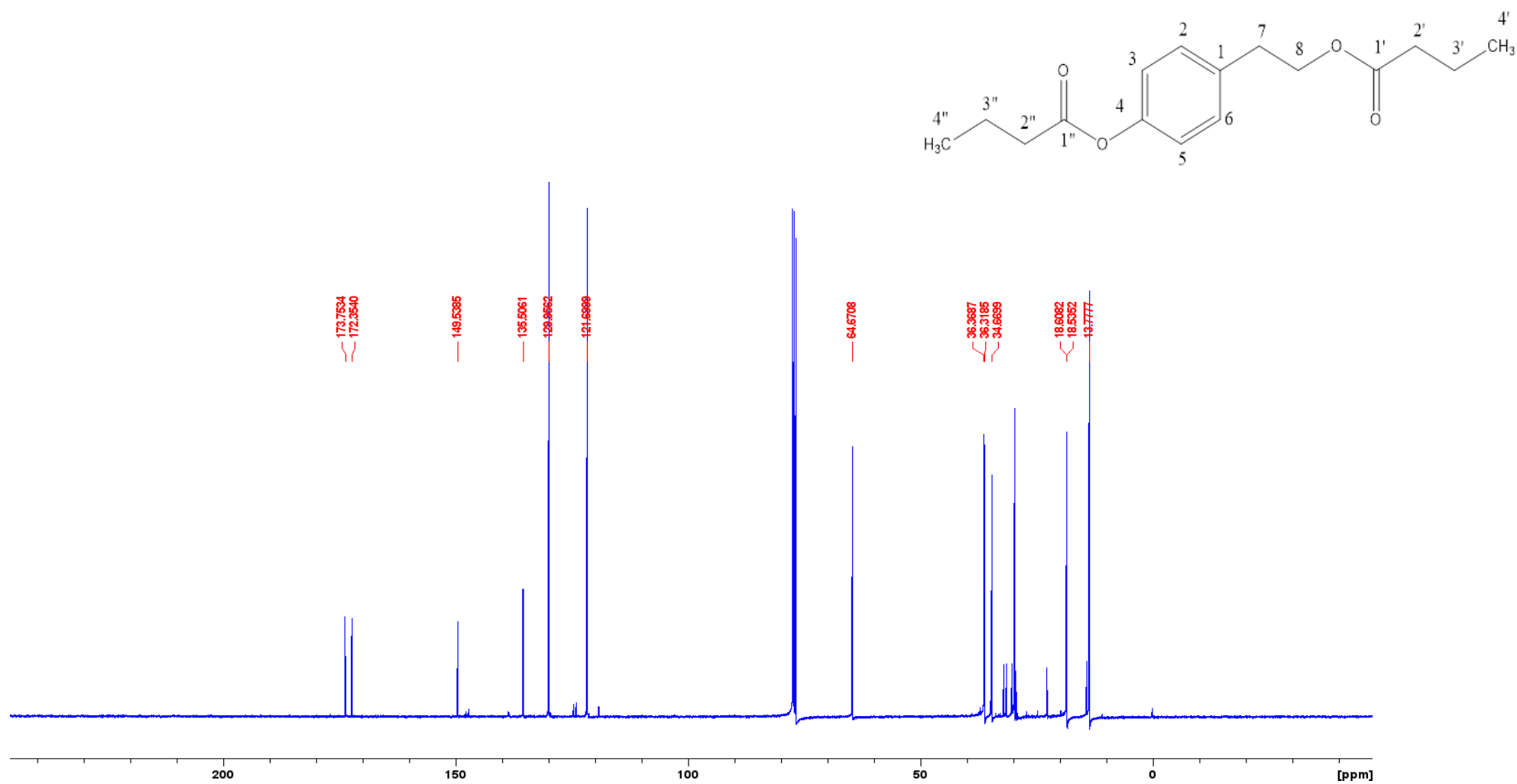
Fonte: Autora (2023)

Figura 76-Expansão do espectro de RMN ^1H de **S-6** (CDCl_3 , 400 MHz)

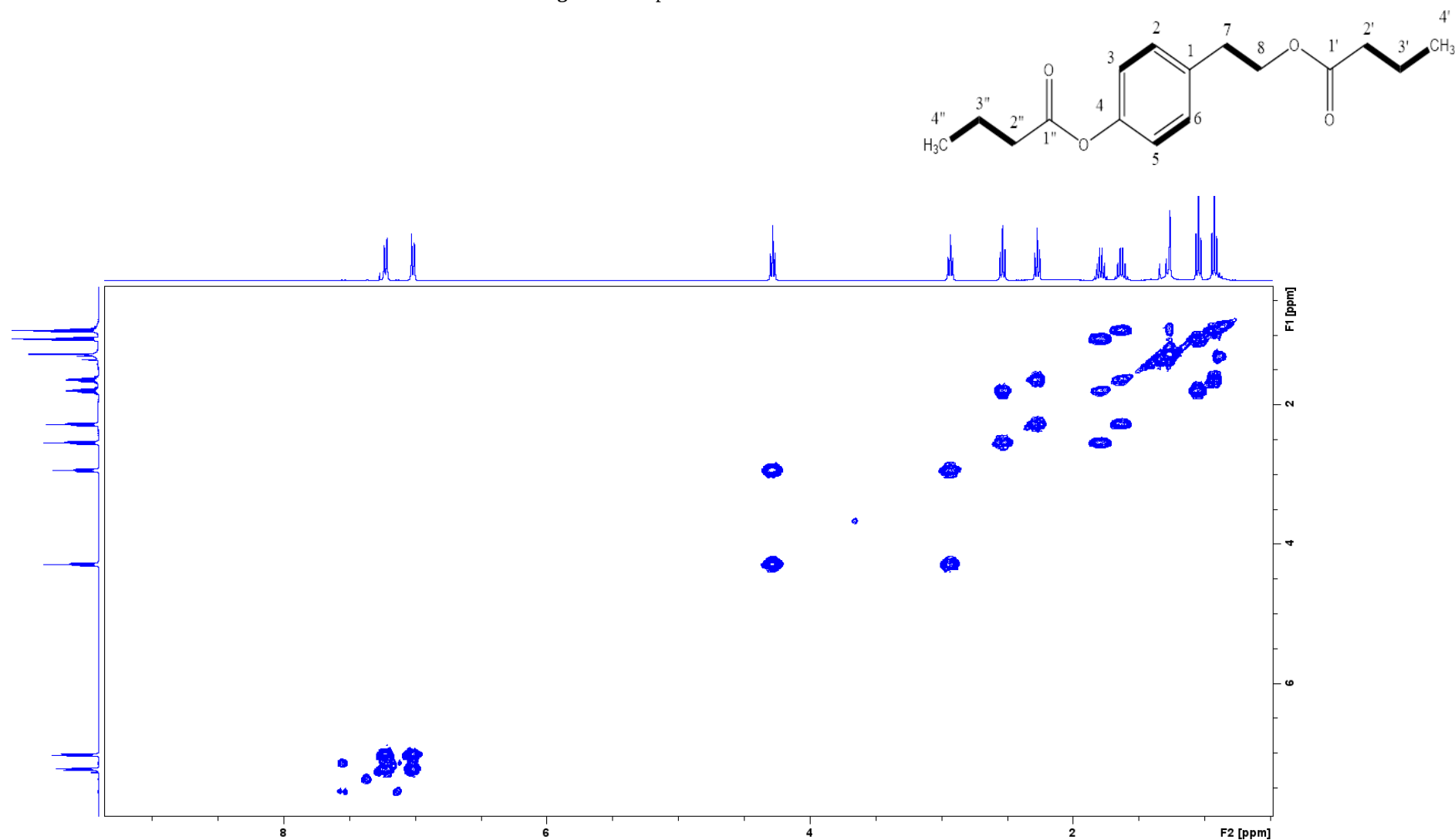


Fonte: Autora (2023)

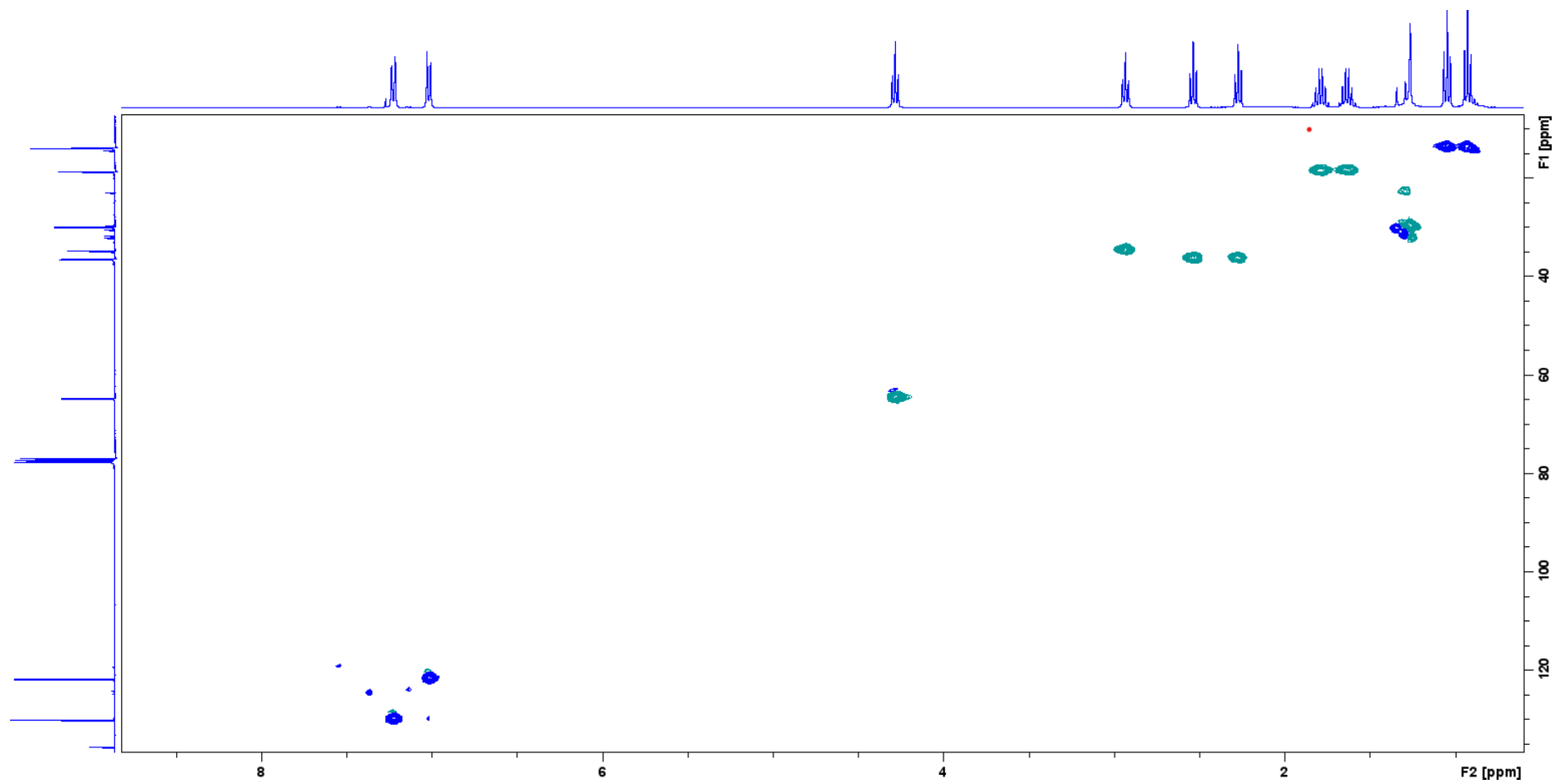
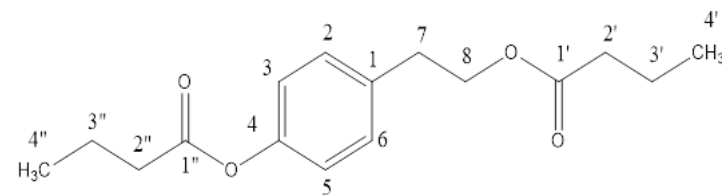
Figura 77- Espectro de RMN ^{13}C de **S-6** (CDCl_3 , 100 MHz)



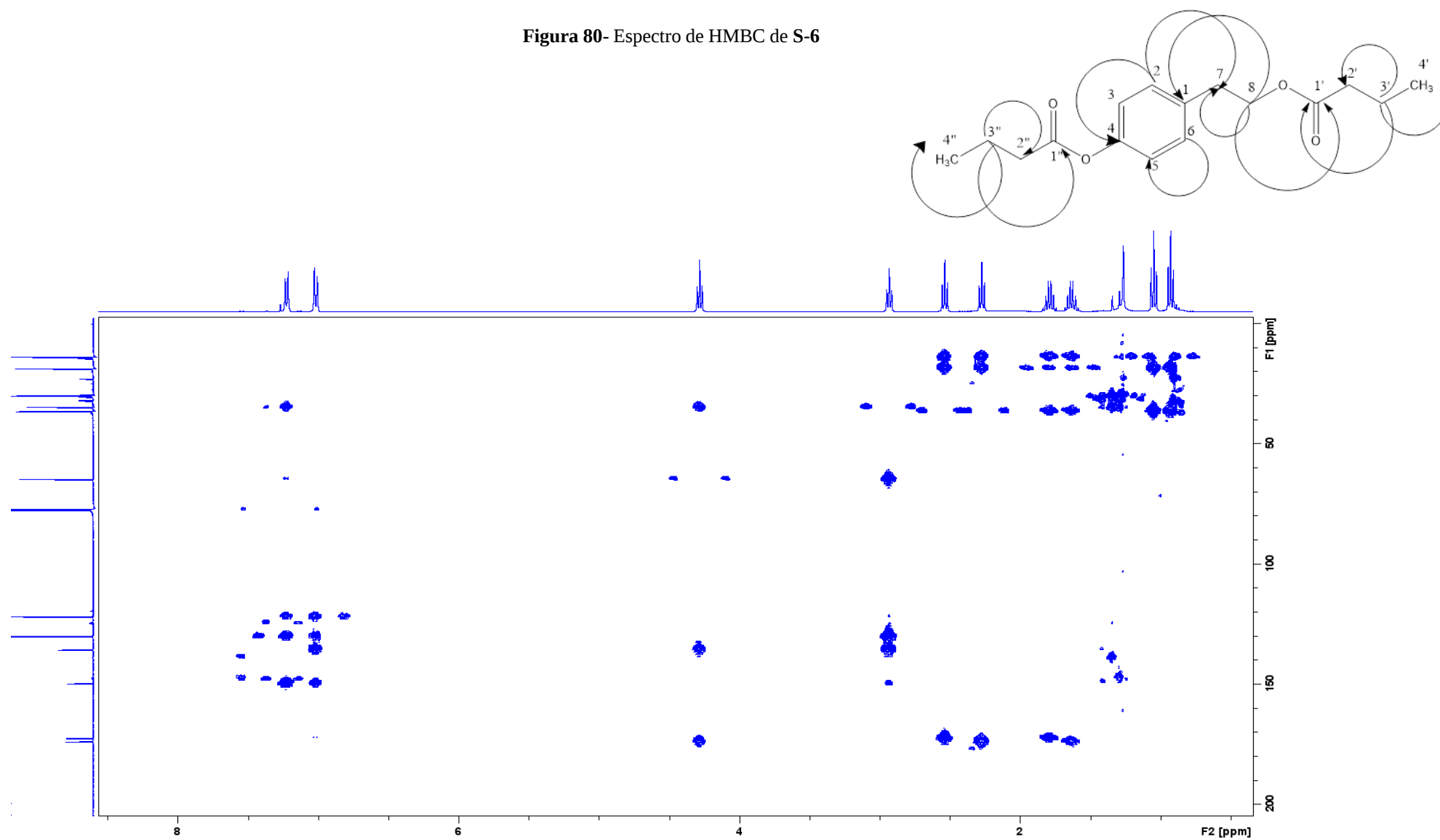
Fonte: Autora (2023)

Figura 78- Espectro de COSY de S-6

Fonte: Autora (2023)

Figura 79- Espectro de HSQC de **S-6**.

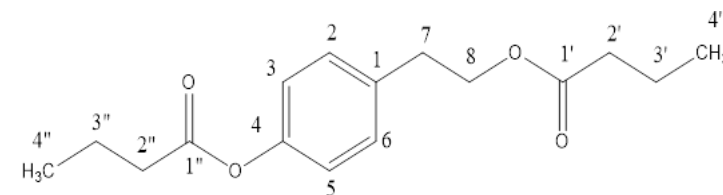
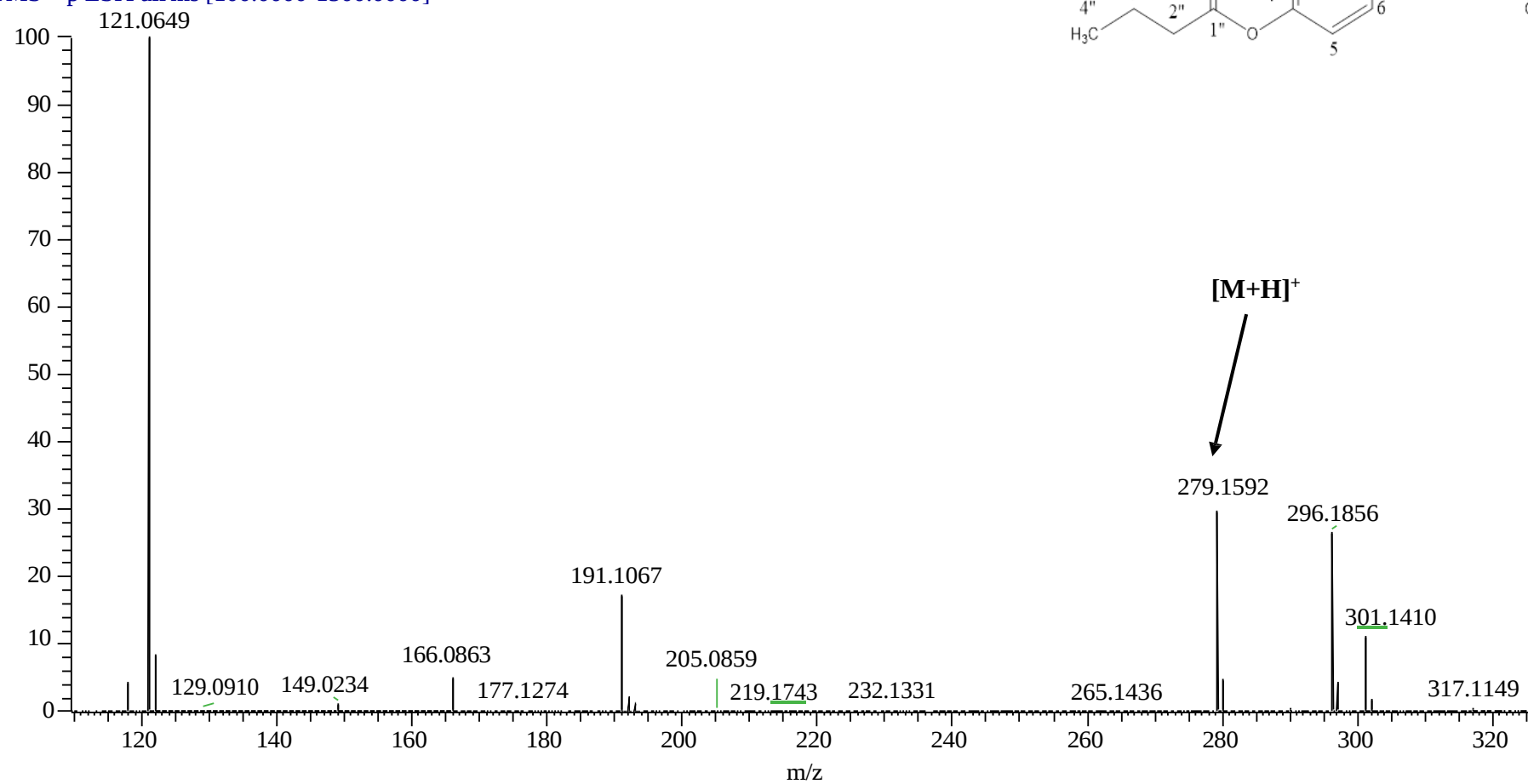
Fonte: Autora (2023)

Figura 80- Espectro de HMBC de S-6

Fonte: Autora (2023)

Figura 81- Espectro de massas ESI (+) de **S-6**

LABQ22 #25-73 RT: 0.07-0.20 AV: 9 NL: 3.51E9 T:
FTMS + p ESIFull ms [100.0000-1500.0000]



Fonte: Autora (2023)

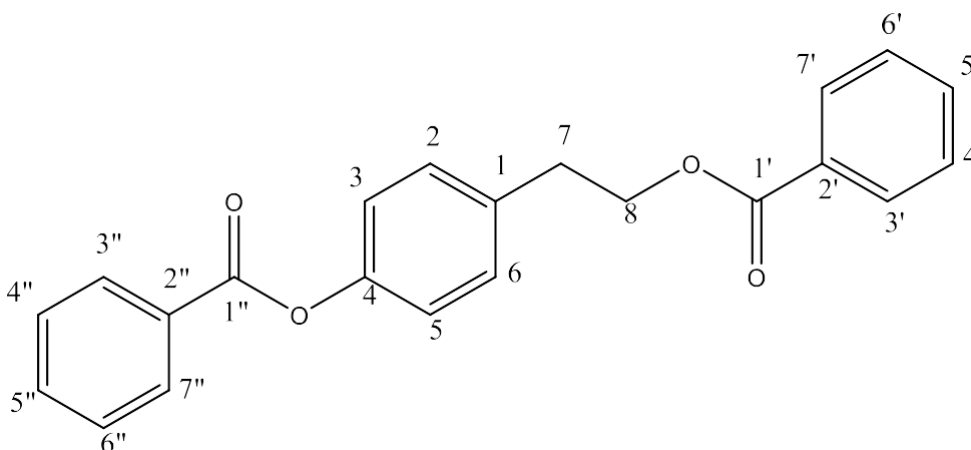
5.2.7 Substância S-7: 4-(2-(benzoyloxy)etil) fenilbenzoato

A substância S-7 (figura 82) foi obtida como produto da reação de benzoilação a partir da substância S-1 e apresentou-se como sólido branco. Ao comparar os espectros de RMN ^1H da substância S-7 com a S-1 (figura 85, p. 132), observa-se o surgimento de seis sinais comumente atribuídos aos hidrogênios na região do anel aromático dissustituído, sendo quatro sinais característicos de tripletos em δ_{H} 7,64 (1H, *t*, H-5''), δ_{H} 7,57 (1H, *t*, H-5'), δ_{H} 7,52 (2H, *t*, H-4'' e H-6'') e em δ_{H} 7,45 (2H, *t*, 7,64 Hz; H-4' e H-6'). Também observou-se dois sinais característicos dupletos em δ_{H} 8,03 (2H, *d*, 7,16 Hz; H-7' e H-3) e em δ_{H} 8,21 (2H, *d*, 7,16 Hz; H-7'' e H-3'').

A partir do espectro de RMN de ^1H (figura 86-87, p. 133-134) da substância S-7 observa-se que os sinais são semelhantes aos da substância S-1 como, por exemplo, os sinais dos hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,36 (2H, *d*, 8,44 Hz; H-2 e H-6) e em δ_{H} 7,18 (2H, *d*, 8,48 Hz; H-3 e H-5). Além disso, destacam-se o sinal do hidrogênio metilênico em δ_{H} 3,12 (2H, *t*, 6,92 Hz; H-7) e o sinal do hidrogênio oximetilênico em δ_{H} 4,55 (2H, *t*, 6,92 Hz; H-8).

A fórmula molecular da substância S-7 foi determinada como $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_4$ por meio da análise dos dados de RMN, assim como pelo espectro de massas ESI (+), o qual exibiu um pico com m/z 347.1277 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (figura 92, p. 139), indicando uma massa de 346.1277 Da para a substância S-7.

Figura 82- Estrutura de S-7



Fonte: Autora (2023)

No espectro de RMN ^{13}C de **S-7** (figura 88, p. 135), foram observados nove sinais de carbono adicionais em comparação com **S-1**, sugerindo a presença de dois anéis aromáticos. Esses sinais apresentaram deslocamentos químicos em δ_{C} 130,3 (C-3'' e C-7''), δ_{C} 128,7 (C-4'' e C-6''), δ_{C} 133,7 (C-5''), δ_{C} 130,4 (C-2'' e C-2'), δ_{C} 128,5 (C-4' e C-6'), δ_{C} 133,1 (C-5'), e δ_{C} 129,7 (C-3' e C-7'). Além disso, foram observados dois sinais típicos de carbonos de carbonila em δ_{C} 165,4 (C-1'') e em δ_{C} 166,7 (C-1').

A partir das análises do espectro de COSY (figura 89, p. 136) observou-se as correlações entre o sinal em δ_{H} 4,55 (H-8) com δ_{H} 3,12 (H-7). Correlações dos sinais de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,18 (H-3 e H-5) com δ_{H} 7,36 (H-2 e H-6), em δ_{H} 8,03 (H-3' e H-7') com δ_{H} 7,45 (H-4' e H-6'), em δ_{H} 7,57 (H-5') com 7,45 (H-4' e H-6'), em δ_{H} 8,21 (H-3'' e H-7'') com δ_{H} 7,52 (H-4'' e H-6'') e em δ_{H} 7,64 (H-5'') com δ_{H} 7,52 (H-4'' e H-6'').

Analizando o espectro de HSQC (figura 90, p. 137), foi possível destacar as correlações dos sinais de hidrogênios aromáticos característicos de duplo duplete em δ_{H} 8,21 (H-3'' e H-7'') e δ_{H} 8,03 (H-3' e H-7') com os sinais de carbono em δ_{C} 130,3 (C-3'' e C-7'') e δ_{C} 129,7 (C-3' e C-7'), respectivamente. Também foi possível determinar as correlações dos hidrogênios aromáticos característicos de tripleto com seus respectivos carbonos, onde observou-se os sinais com deslocamento químicos dos hidrogênios em δ_{H} 7,64 (H-5''), δ_{H} 7,57 (H-5'), δ_{H} 7,52 (H-4'' e H-6'') e δ_{H} 7,45 (H-4' e H-6') com os sinais em δ_{C} 133,7 (C-5''), δ_{C} 133,1 (C-5'), δ_{C} 128,7 (C-4'' e C-6'') e δ_{C} 128,5 (C-4' e C-6'), respectivamente. Além disso foram confirmadas as correlações previamente observadas em **S-1**, como as correlações entre os sinais em δ_{H} 4,56 (H-8) com o sinal em δ_{C} 65,47 (C-8), em δ_{H} 3,12 (H-7) com o sinal em δ_{C} 34,82 (C-7) e a correlação dos sinais dos hidrogênios do anel aromático em δ_{H} 7,36 (H-2 e H-6) com o sinal em δ_{C} 130,1 (C-2 e C-6) e em δ_{H} 7,18 (H-3 - H-5) com o sinal em δ_{C} 121,9 (C-3 e C-5).

O espectro de HMBC (figura 91, p. 138) apresenta a correlação entre o sinal do hidrogênio em δ_{H} 8,21 (H-3'' e H-7'') com os sinais carbonos em δ_{C} 165,4 (C-1''), δ_{C} 133,7 (C-5'') e em δ_{C} 130,4 (C-2''); em δ_{H} 8,03 (H-7' e H-3) com os sinais carbonos em δ_{C} 133,10 (C-15') e δ_{C} 166,7 (C-1'); em δ_{H} 7,45 (H-4' e H-6') com 130,4 (C-2'); em δ_{H} 7,52 (H-4'' e H-6'') com o sinal em δ_{C} 130,4 (C-2''); em δ_{H} 7,57 (H-10) com os sinais carbonos em δ_{C} 129,7 (C-3' e C-7''); e em δ_{H} 7,64 (H-5'') com o sinal em δ_{C} 130,3 (C-3'' e C-7''). Além disso, foram confirmadas as correlações previamente observadas em **S-1**, como a correlação entre δ_{H} 4,56 (H-7) com os sinais de carbono em δ_{C} 34,82 (C-7), δ_{C} 135,7 (C-1) e δ_{C} 166,7 (C-1''), bem como a correlação entre δ_{H} 7,36 (H-2 e H-6) com os sinais de carbono em δ_{C} 34,8 (C-7), δ_{C} 121,9 (C-3 e C-5) e δ_{C} 149,81 (C-4).

A seguir, apresentam-se as representações de todas as correlações de COSY (figura 83) e HMBC (figura 84), além da tabela 13 (p. 131), que compara os dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C da substância **S-1** com o produto da benzoilação. Através da análise de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, COSY e HMBC, foi possível propor a estrutura de **S-7**. Após comparar os dados de RMN ^1H e ^{13}C com a literatura disponível, não foi encontrado nenhum relato referente à identificação por ressonância magnética.

Figura 83- Principais correlações de COSY de **S-7**

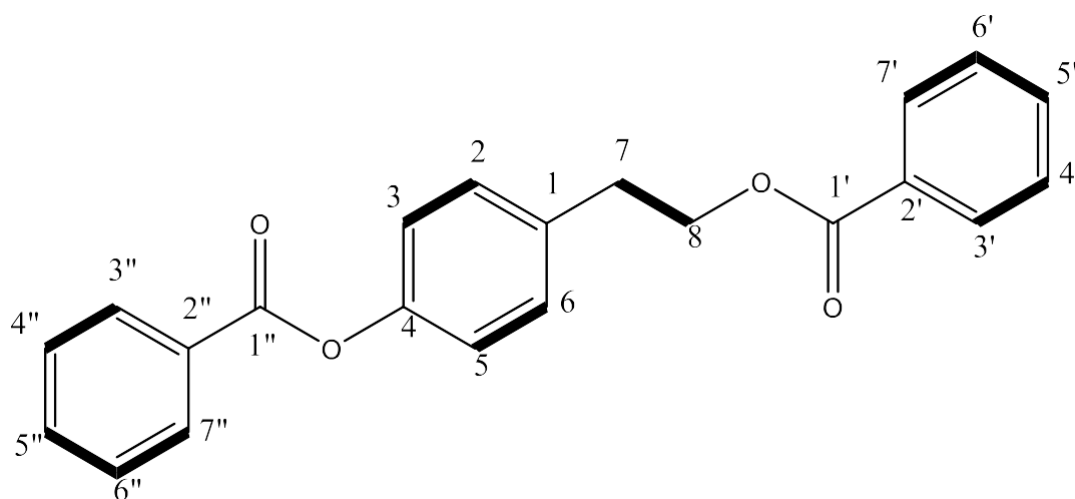
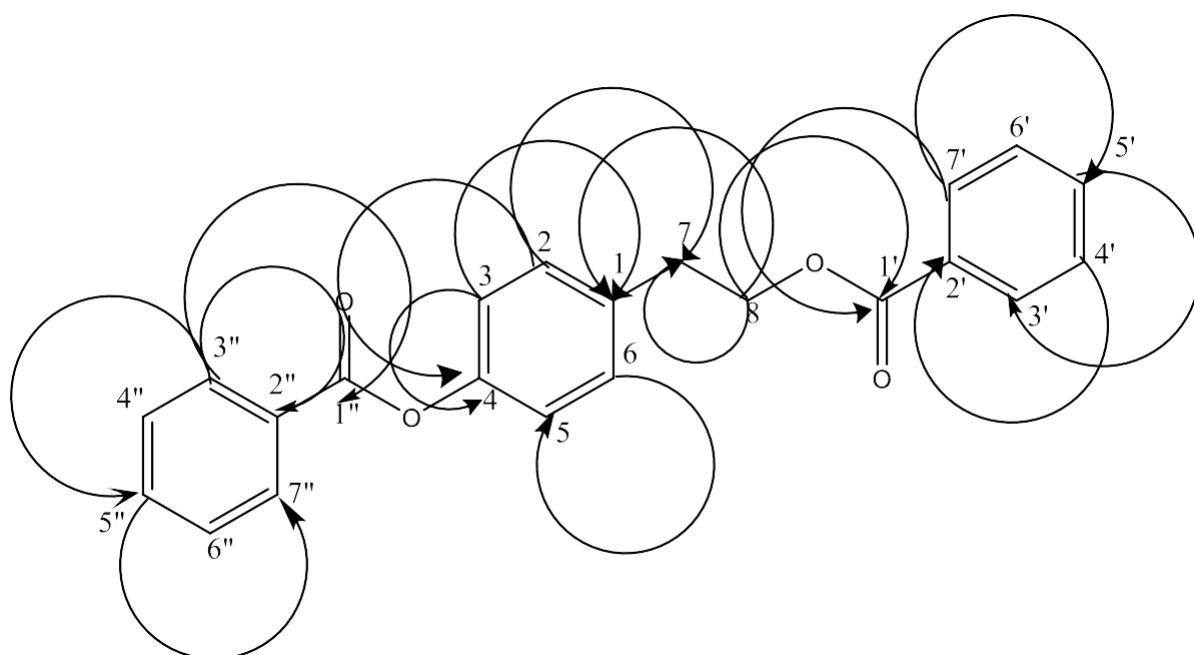


Figura 84- Principais correlações de HMBC de **S-7**



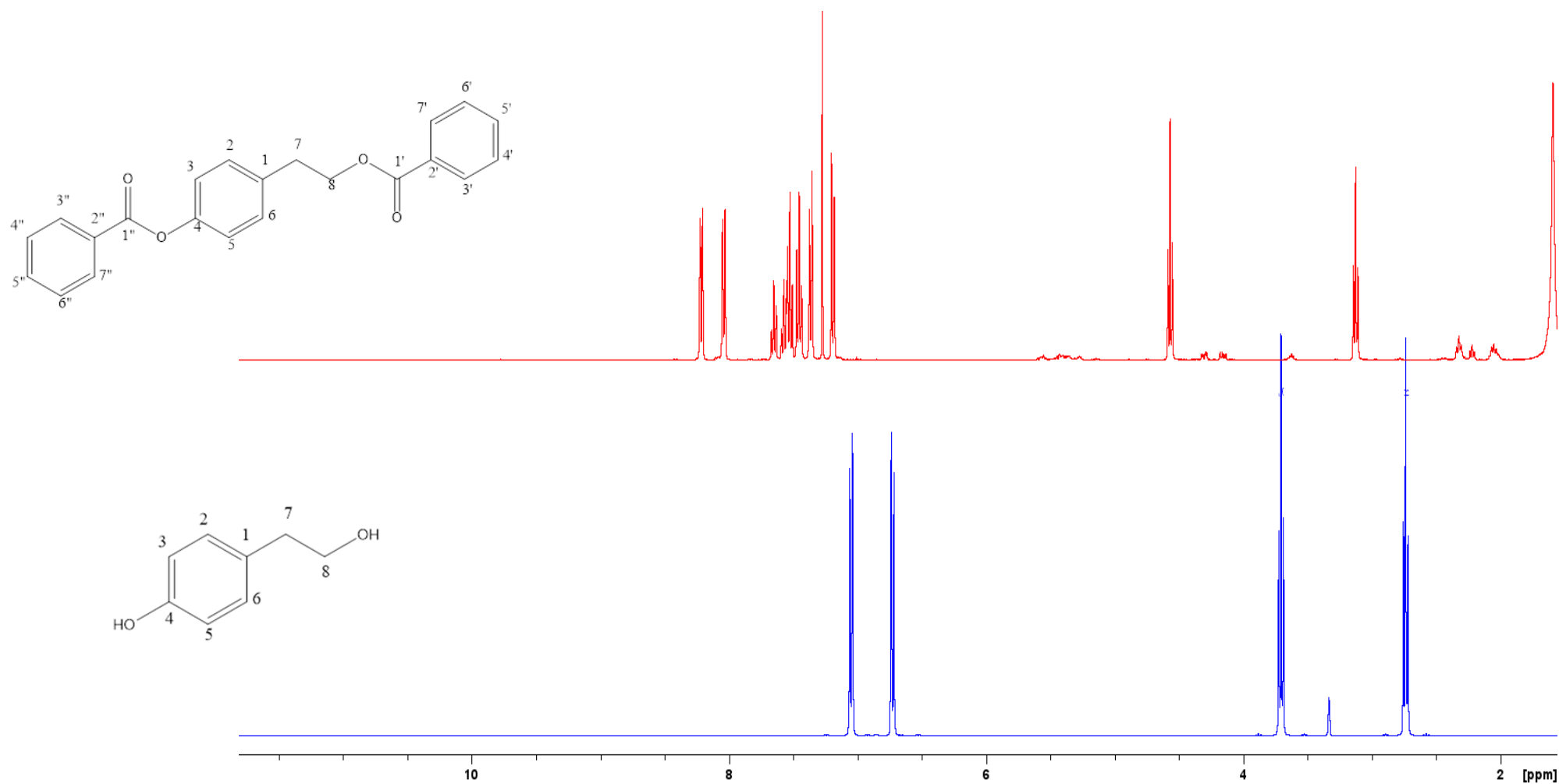
Fonte: Autora (2023)

Tabela 13- Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C (400 MHz e 100 MHz, CDCl_3) de **S-1** com **S-7**

	S-1	S-7	S-1	S-7
	<i>H</i> (δ , mult., <i>J</i> em Hz)	<i>H</i> (δ , mult., <i>J</i> em Hz)	C	C
1	-	-	129,6	135,6
2 e 6	7,04 (<i>d</i> , 8,4)	7,36 (<i>d</i> , 8,44)	129,5	130,1
3 e 5	6,73 (<i>d</i> , 8,4)	7,18 (<i>d</i> , 8,48)	114,7	121,9
4	-	-	155,3	149,8
7	2,73 (<i>t</i> , 7,2)	3,12 (<i>t</i> , 6,92)	37,9	34,8
8	3,71 (<i>t</i> , 7,2)	4,56 (<i>t</i> , 6,92)	63,2	65,4
1'	-	-	-	166,6
2'	-	-	-	130,3
3' e 7'	-	8,03 (<i>d</i> , 7,16)	-	129,7
4' e 6'	-	7,45 (<i>t</i> , 7,64)	-	128,5
5'	-	7,57 (<i>t</i> , 7,42)	-	133,1
1''	-	-	-	165,3
2''	-	-	-	130,3
3'' e 7''	-	8,21 (<i>d</i> , 7,16)	-	130,3
4'' e 6''	-	7,52 (<i>t</i> , 7,68)	-	128,7
5''	-	7,64 (<i>t</i> , 7,43)	-	133,73

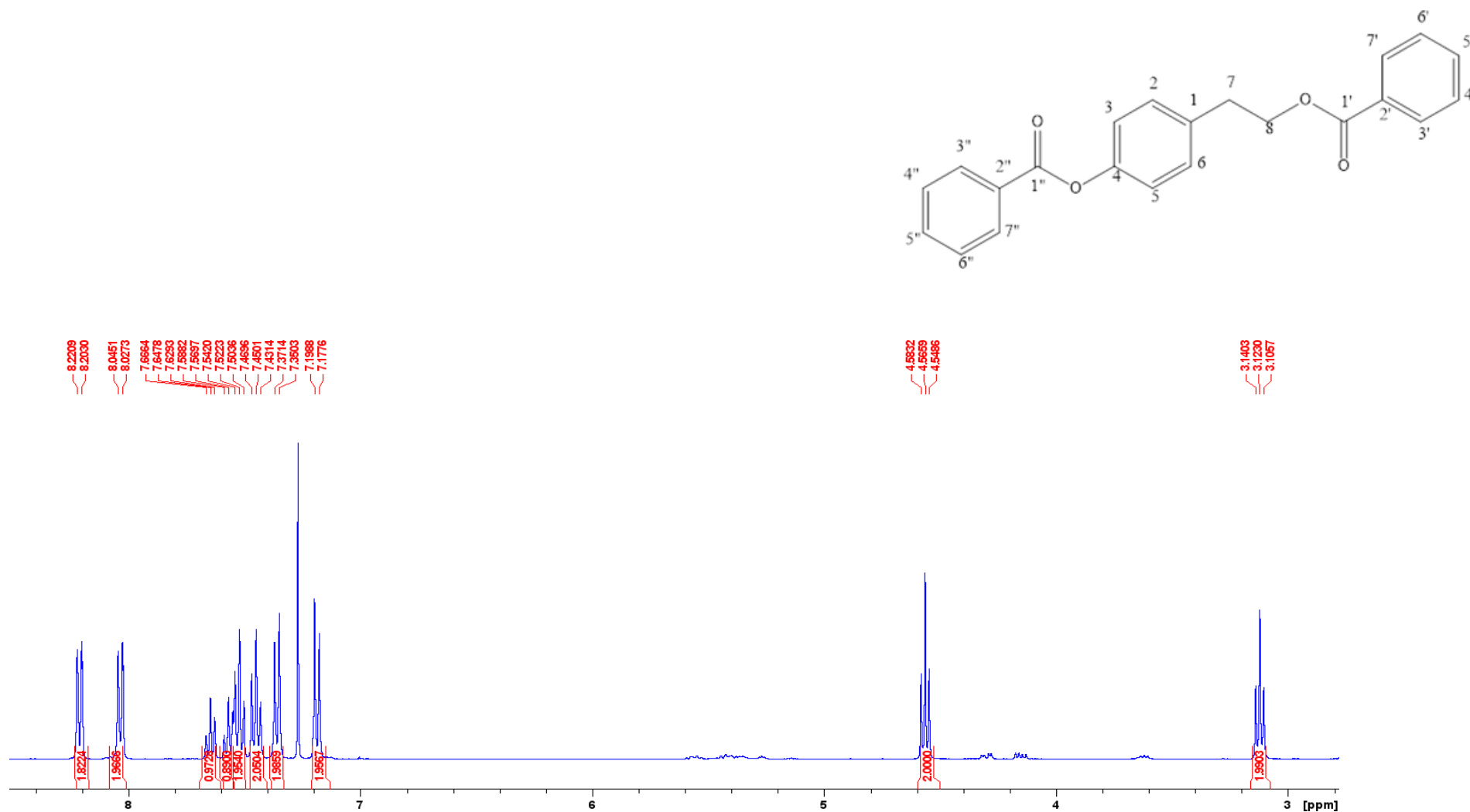
Fonte: Autora (2023)

Figura 85- Comparação dos espectros de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **S-1** e **S-7**



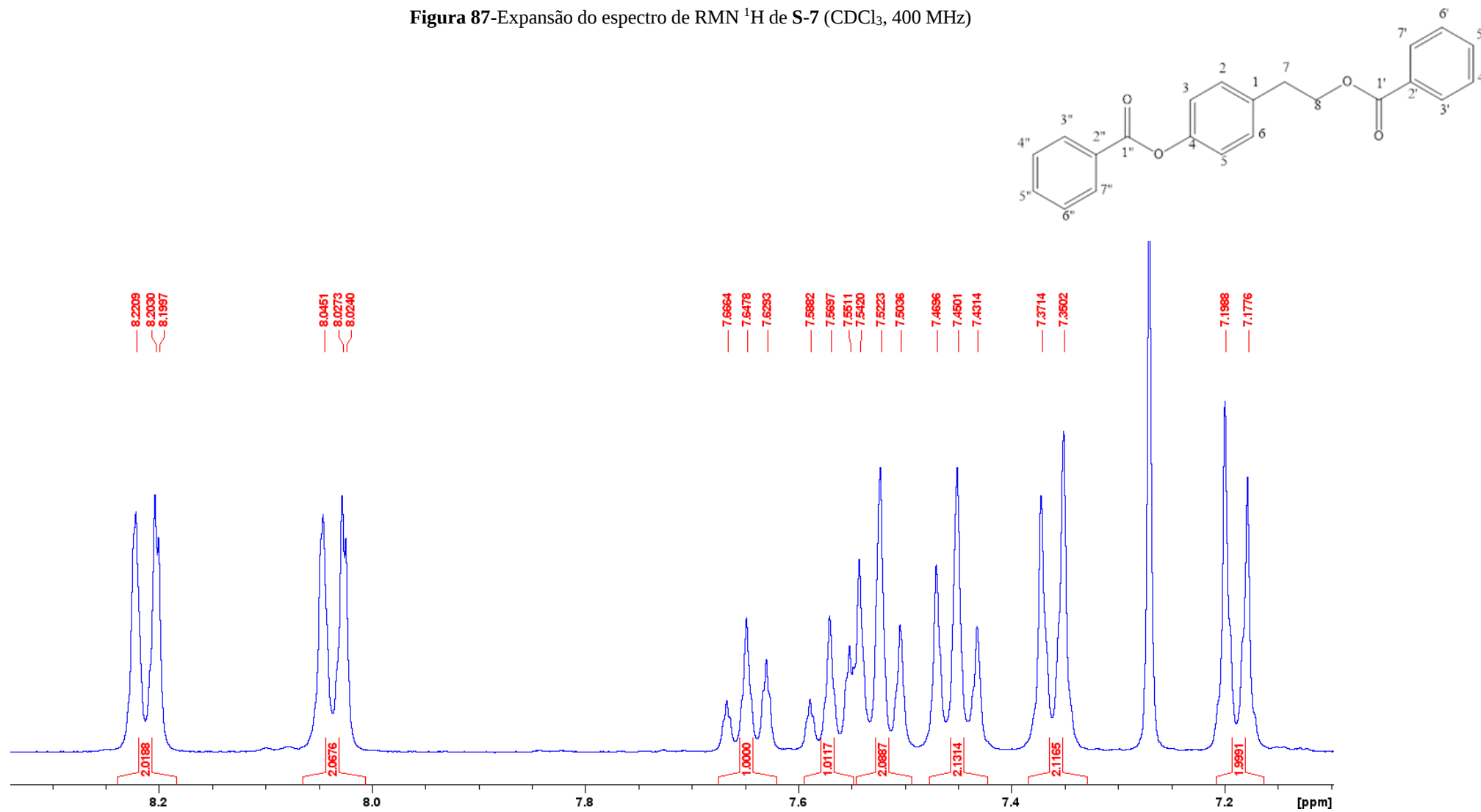
Fonte: Autora (2023)

Figura 86- Espectro de RMN ^1H de S-7 (CDCl_3 , 400 MHz)



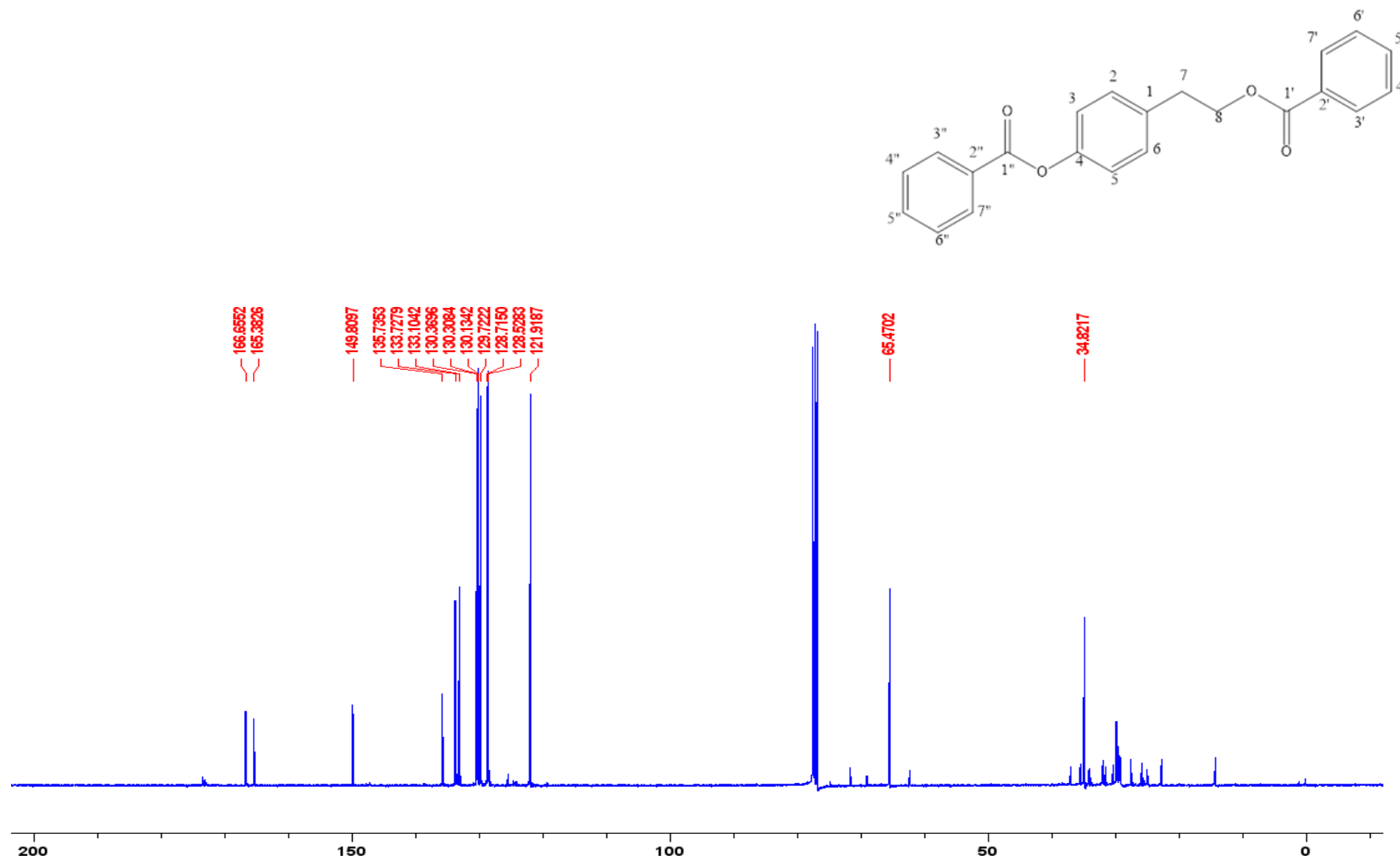
Fonte: Autora (2023)

Figura 87-Expansão do espectro de RMN ^1H de S-7 (CDCl_3 , 400 MHz)

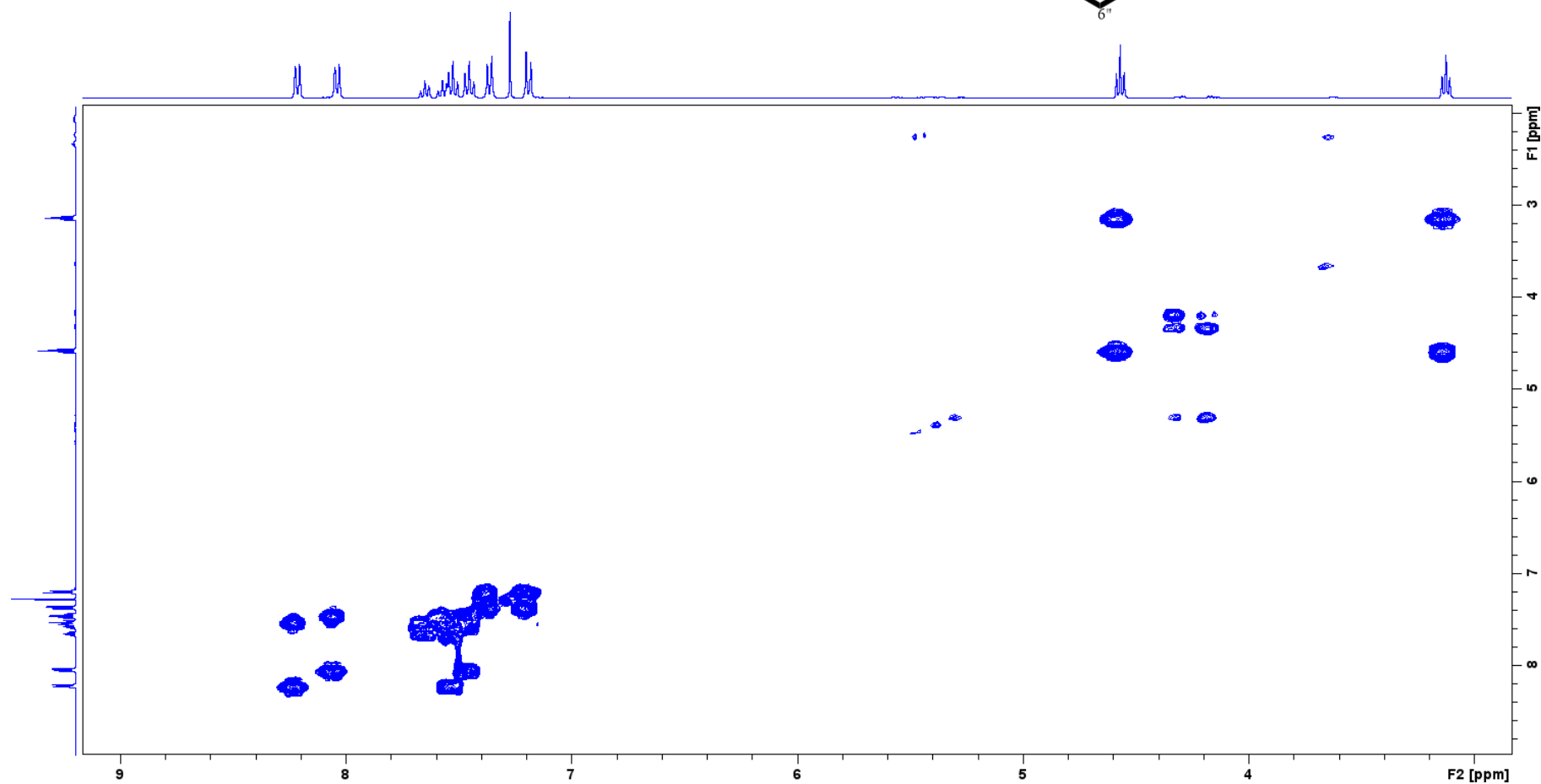
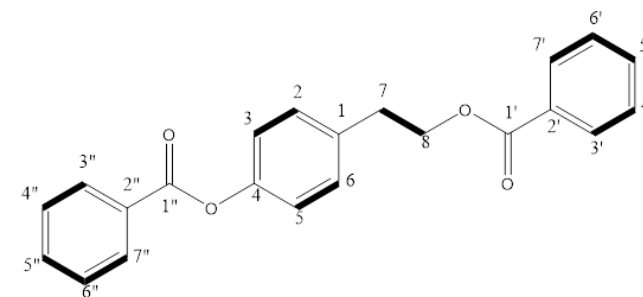


Fonte: Autora (2023)

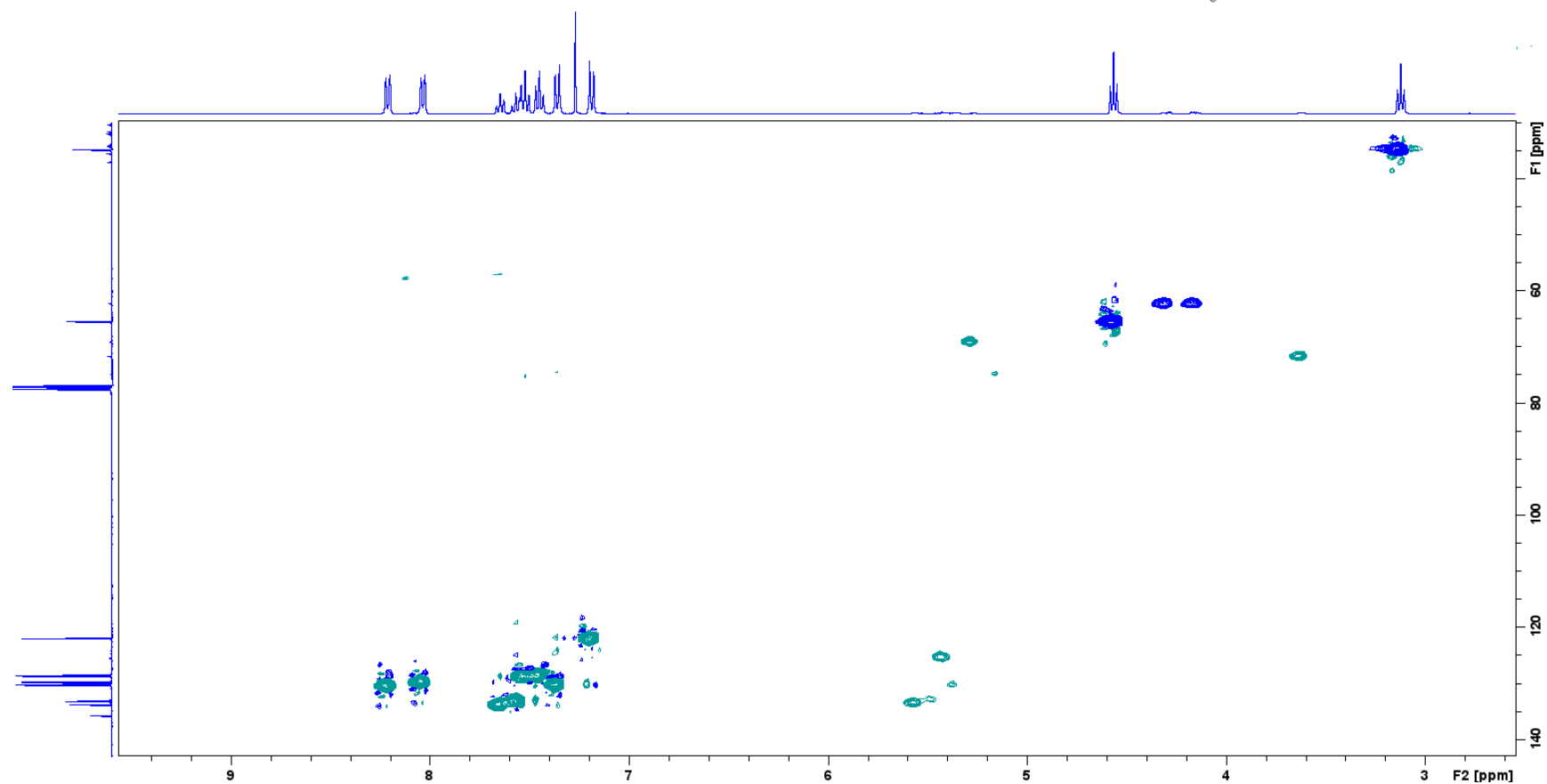
Figura 88- Espectro de RMN ^{13}C de S-7 (CDCl_3 , 100 MHz)



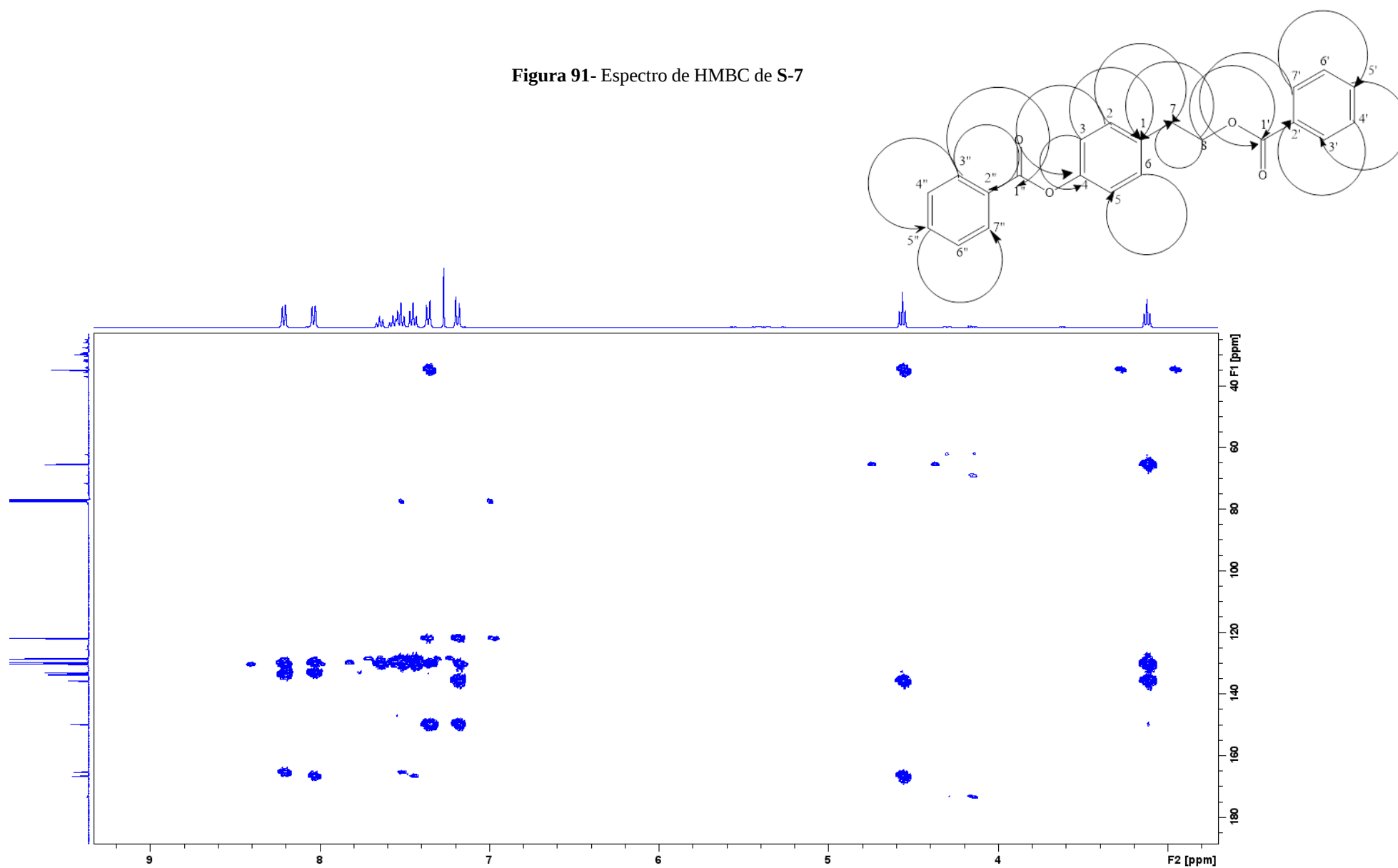
Fonte: Autora (2023)

Figura 89- Espectro de COSY de S-7

Fonte: Autora (2023)

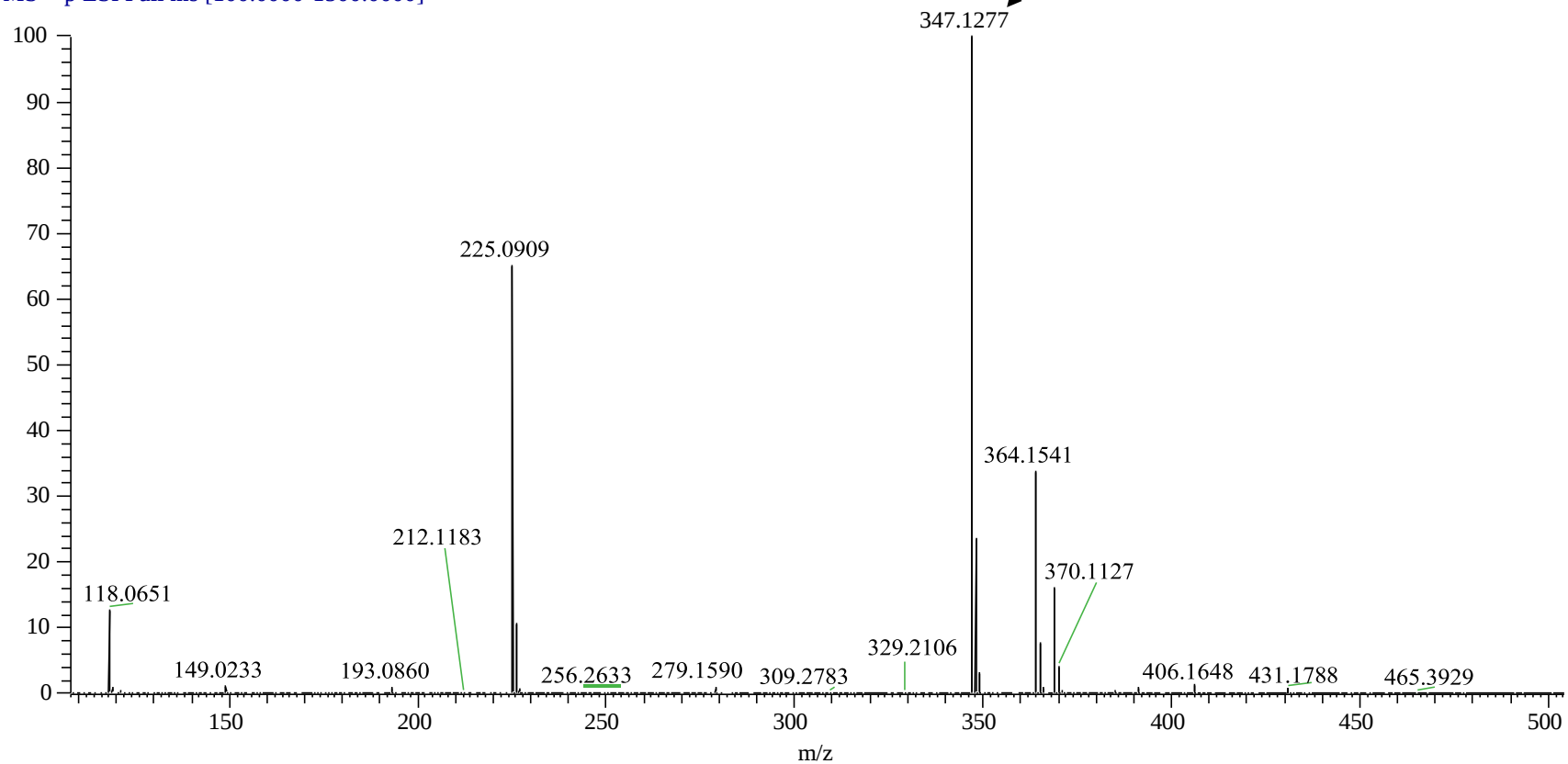
Figura 90- Espectro de HSQC de S-7

Fonte: Autora (2023)

Figura 91- Espectro de HMBC de S-7

Fonte: Autora (2023)

[M+H]⁺



Fonte: Autora (2023)

5.3 Ensaios Biológicos

5.3.1 Ensaios antimicrobianos

A Tabela 14 (p. 144) apresenta os resultados dos ensaios antimicrobianos. Foi testado o extrato ETOH, bem como as quatro substâncias isoladas: tirosol (**S-1**), ácido 4-hidroxifenilacético (**S-2**), 4-formilfenil 2 fenilacetato (**S-3**) e 4 ácido fenilacético (**S-4**). Além disso, foram avaliadas três substâncias resultantes da derivação estrutural de **S-1**: 4-(2-acetoxietil) fenilacetato (**S-5**), 4-(2-(butiriloxy)etil) fenilbutirato (**S-6**) e 4-(2-(benzoiloxy)etil) fenilbenzoato (**S-7**). Esses compostos foram testados em relação a diferentes bactérias, incluindo *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e quatro cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (PA1, PA5.2, PA18 e PA20).

O extrato EtOH não demonstrou atividade contra as bactérias nas concentrações testadas, conforme indicado na tabela 14. No entanto, é importante ressaltar que este extrato foi submetido a uma partição líquido-líquido com acetato de etila, resultando na obtenção da fase AcOEt, da qual as substâncias orgânicas foram separadas. Essa observação sugere uma possível explicação para os resultados superiores das substâncias em comparação com o extrato de EtOH. Além disso, a quantidade de cada molécula presente nos extratos também pode influenciar nessa diferença de atividade, assim como suas interações intermoleculares, que podem não favorecer a atividade antimicrobiana.

No caso da *E. coli*, tanto as substâncias quanto os extratos não demonstraram atividade biológica nas concentrações testadas. Isso pode sugerir que as substâncias não possuem atividade contra esse tipo de bactéria Gram-negativa, ou possivelmente seja necessário utilizar concentrações mais elevadas para que possam exercer seu efeito antimicrobiano.

As substâncias **S-2** e **S-4** demonstraram atividade bactericida na concentração de 250 µg/mL contra a bactéria *S. typhimurium*. No entanto, para as demais substâncias, não foi observada atividade biológica nas concentrações testadas em relação a esta bactéria específica.

Em relação à bactéria *B. subtilis*, a substância **S-2** apresentou atividade bactericida até a concentração de 31,25 µg/mL e atividade bacteriostática até a concentração 15,625 µg/mL. Por outro lado, a substância **S-5** exibiu atividade bactericida até a concentração 31,25 µg/mL e atividade bacteriostática até 3,90 µg/mL. Tanto **S-3** quanto **S-4** demonstraram atividade bactericida na concentração de 250 µg/mL, enquanto as demais substâncias não apresentaram atividade biológica nas concentrações testadas.

Frente a *S. aureus*, as substâncias **S-2** e **S-5** demonstraram atividade bactericida na concentração de 250 µg/mL. Por outro lado, as substâncias **S-4**, **S-6** e **S-7** exibiram atividade

bacteriostática na concentração de 250 µg/mL. As outras substâncias carecem de atividade biológica nas concentrações testadas.

A substância **S-6** não apresentou atividade frente às cepas das bactérias *X. axonopodis* pv. *passiflorae* nas concentrações testadas. Por outro lado, a substância **S-7** apresentou atividade bacteriostática na concentração de 250 µg/mL frente às cepas PA1 e PA5.2.

A substância **S-1** mostrou atividade bacteriostática somente frente à cepa PA5.2 até a concentração de 31,25 µg/mL, não apresentando atividade em relação às outras cepas de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*..

A substância **S-2** apresenta atividade bactericida na concentração de 250 µg/mL e atividade bacteriostática até 125 µg/mL em relação às cepas PA1, PA18 e PA20. Em relação à cepa PA5.2, a substância **S-2** apresenta atividade bactericida na concentração de 250 µg/mL e atividade bacteriostática até a concentração de 62,5 µg/mL, conforme a tabela 9 (p. 113). Segundo Liu et al. (2021), o ácido 4-hidroxifenilacético foi identificado com diversas atividades biológicas, incluindo propriedades antioxidantes, ação antimicrobiana e capacidade de induzir enzimas. Com base nessas informações, compreende-se a sua relevância para a saúde.

A substância **S-3** demonstrou atividade bacteriostática até a concentração de 125 µg/mL em relação à bactéria PA5.2. Em relação à cepa PA18, a substância **S-3** exibiu atividade bacteriostática na concentração de 250 µg/mL. No entanto, em relação às cepas PA1 e PA20, a substância **S-3** não apresentou atividade.

Por outro lado, a substância **S-4** demonstrou atividade bactericida na concentração de 250 µg/mL em relação às cepas PA1 e PA18. Em relação à cepa PA5.2, a substância **S-4** apresentou atividade bactericida na concentração de 250 µg/mL e atividade bacteriostática até a concentração de 15,625 µg/mL. Em relação à cepa PA20, exibiu atividade bactericida na concentração de 250 µg/mL e atividade bacteriostática até a concentração de 125 µg/mL.

A substância **S-5** apresenta atividade bactericida na concentração de 250 µg/mL e atividade bacteriostática até 125 µg/mL em relação à cepa PA18. No entanto, em relação às cepas PA1, PA5.2 e PA20, a substância **S-5** não apresentou atividade.

Quando se comparam os resultados das atividades antimicrobianas do tirosol **S-1** com seus produtos de derivação, pode-se verificar que houve um aumento da atividade destes produtos sobre algumas cepas bacterianas testadas, tendo em vista que a substância **S-1** apresentou efeito antibacteriano somente sobre a cepa PA5.2 de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, em que demonstrou atividade bacteriostática até a concentração de 31,25. Já a substância **S-5** apresentou atividade bactericida até 31,2 µg/mL e bacteriostática até 3,9 µg/mL sobre *B. subtilis*, bactericida na concentração de 250 µg/mL sobre *S. aureus*, bactericida na concentração

de 250 µg/mL e bacteriostática até a concentração de 125 µg/mL sobre *X. axonopodis* pv. *passiflorae* PA18. Enquanto que a substância **S-6** apresentou atividade bacteriostática na concentração de 250 µg/mL sobre *S. aureus*, e a substância **S-7** também apresentou atividade bacteriostática na concentração de 250 µg/mL sobre *S. aureus* e sobre as cepas PA1 e PA5.2 de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Vale ressaltar que, de acordo com a literatura, a capacidade antimicrobiana do tirosol tem sido amplamente documentada, bem como seus efeitos benéficos na saúde humana (Servili *et al.*, 2014; Rodríguez-Morató *et al.*, 2015). Essas diferenças apresentadas no estudo podem ser devidas à metodologia utilizada, bem como às concentrações e tipos de bactérias utilizados neste estudo.

No estudo de Tafesh e colaboradores (2011), a metodologia é baseada na determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC), empregando concentrações dos compostos de até 1000 µg/mL. As cepas testadas foram as Gram-positivas *Streptococcus pyogenes* (nº ATCC 19675) e *Staphylococcus aureus* (nº ATCC 25923), e as Gram-negativas *Escherichia coli* (nº ATCC 25922) e *Klebsiella pneumoniae* (nº ATCC 700603), onde cada poço continha aproximadamente 10⁵ unidades formadoras de colônias (UFC). O tirosol apresentou atividade antimicrobiana em uma concentração de 600 µg/mL contra as bactérias *E. coli* e *S. pyogenes*, com exceção de *S. aureus*, onde não demonstrou atividade portanto, as condições e as bactérias utilizadas neste estudo variaram consideravelmente, indicando que, para o tirosol apresentar atividade antimicrobiana, são necessárias concentrações superiores às utilizadas no estudo. Isso sugere que o tirosol apresenta um potencial antimicrobiano não tão pronunciado quanto outras substâncias. As substâncias **S-5** e **S-7**, derivadas do tirosol, apresentaram resultados melhores do que o próprio tirosol. Cabe destacar que, além do efeito antimicrobiano, o tirosol possui um reconhecido efeito anticancerígeno, já amplamente discutido na literatura (Mohamed *et al.*, 2020).

No estudo de Cueva e colaboradores (2004), observou-se que posição das substituições no anel de benzeno e o comprimento da cadeia lateral saturada dos ácidos fenólicos influenciaram significativamente seu potencial antimicrobiano, sendo as bactérias Gram-positivas geralmente mais suscetíveis do que as Gram-negativas.

Os ácidos fenólicos **S-2** e **S-4**, isolados neste trabalho, demonstraram um potente efeito antibacteriano sobre as bactérias utilizadas no estudo, corroborando com a evidência científica que destaca o poder antimicrobiano desses ácidos em comparação com outros compostos fenólicos. Uma hipótese para essa clara diferença pode ser atribuída aos seus grupos carboxílicos e à modificação do pH nas membranas bacterianas, assim como outros fatores estruturais mencionados anteriormente (Cueva *et al.*, 2004).

Estudos indicam que ácidos orgânicos não dissociados podem atravessar membranas celulares, reduzindo o pH intracelular e levando à cessação do crescimento ou inativação bacteriana. Em resumo, o grupo carboxila e o pH ácido desses compostos contribuem para sua eficácia antibacteriana (Kovanda *et al.*, 2019; Chai *et al.*, 2016).

Tabela 14- Resultados antimicrobianos do extrato e substâncias obtidas no trabalho

Bactérias (CIM em µg/mL)								
	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurum</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Xanthomonas</i>			
					PA1	PA5.2	PA18	PA20
AcCC18.1A	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Ex. ETOH								
S-1	>250	>250	>250	>250	>250	31,25 (-)	>250	>250
S-2	>250	250 (=)	31,2 (=); 15,6(-)	250 (=)	250 (=); 125 (-)	62,5 (=); 7,8 (-)	250 (=); 125 (-)	250 (=); 125 (-)
S-3	>250	>250	250 (=)	>250	>250	125 (-)	250 (-)	>250
S-4	>250	250 (=)	250 (=)	250 (-)	250 (=)	250 (=); 15,6 (-)	250 (=)	250 (=); 125 (-)
S-5	>250	>250	31,2 (=); 3,9 (-)	250 (=)	>250	>250	250 (=); 125 (-)	>250
S-6	>250	>250	>250	250 (-)	>250	>250	>250	>250
S-7	>250	>250	>250	250 (-)	250 (-)	250 (-)	>250	>250
Amoxicilina	125(=); 3,9 (-)	3,90 (-)	3,90 (=)	62,5 (=); 3,9 (-)	31,2 (=); 3,9 (-)	3,90 (=)	250 (=); 3,9 (-)	250 (=); 3,9(-)
Tetraciclina	125(=); 3,9 (-)	3,90 (-)	3,90 (=)	15,6 (=); 3,9 (-)	62,5 (=); 3,9 (-)	7,8 (=); 3,9 (-)	250 (=); 3,9 (-)	250 (=); 3,9 (-)

(-) bacteriostático; (=) bactericida; (>) atividade em uma concentração maior que

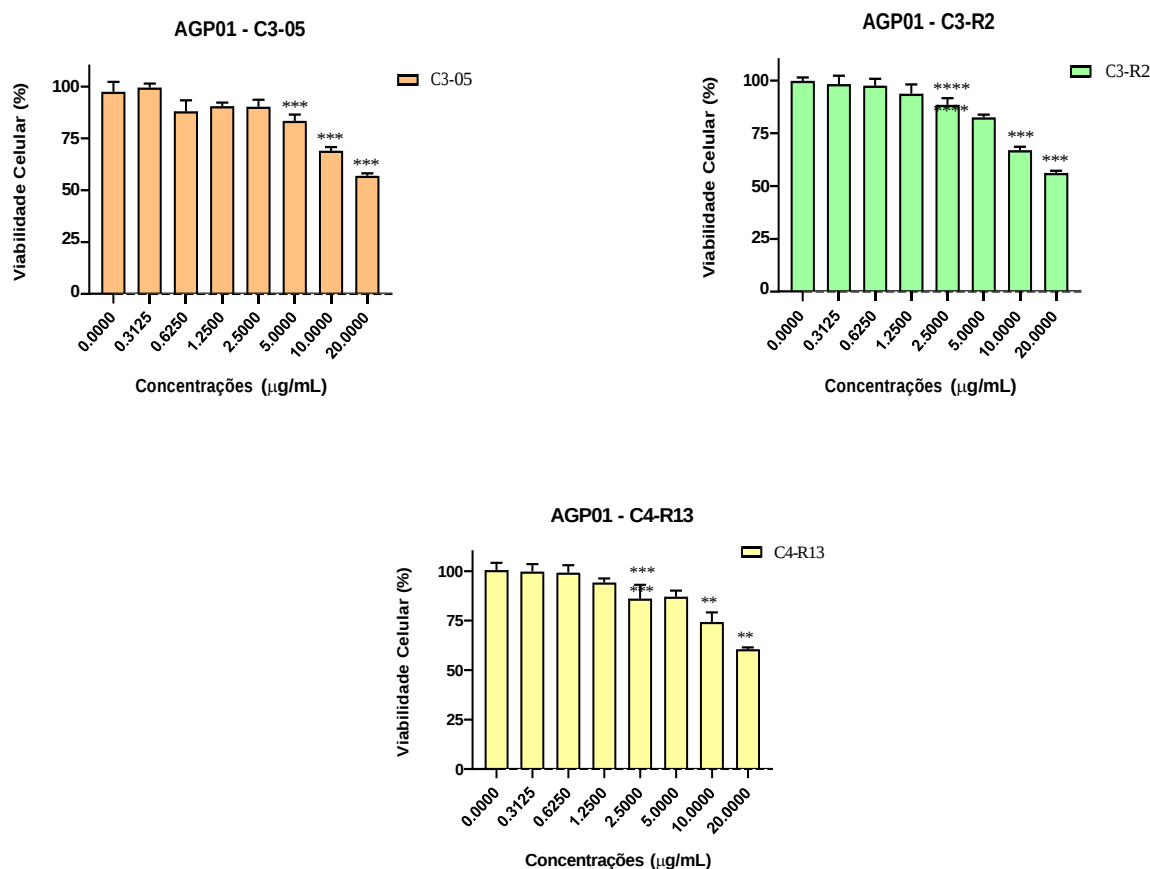
Fonte: Autora (2023)

5.3.2 Atividade citotóxica

Os compostos fenólicos tirosol (**S-1**), ácido 4-hidroxifenilacético (**S-2**) e 4-formilfenil-2-fenilacetato (**S-3**) isolados a partir do fungo *Actinomucor elegans* AcCC18.1A foram testadas a fim de avaliar a atividade citotóxica sobre células tumorais. As três substâncias apresentaram diminuição da viabilidade conforme o aumento da concentração, mostrando uma relação de concentração -dependência em todas as linhagens testadas.

As três substâncias testadas, **S-1**, **S-2** e **S-3**, mostram uma melhor atividade sobre a linhagem de câncer gástrico metastático AGP01, com diminuição da viabilidade de forma significativa a partir da concentração de 5 µg/mL para **S-1** e 2,5 µg/mL para as substâncias **S-2** e **S-3**, como é apresentado na figura 96.

Figura 93-Gráfico de viabilidade celular de das substâncias isoladas do fungo *Actinomucor elegans* AcCC18.1A, **S-1** (C3-05), **S-2** (C3-R2) e **S-3** (C4-R13), após 72 horas de tratamento em linhagem de câncer gástrico metastático AGP01. Cada ponto equivale à média de três replicatas

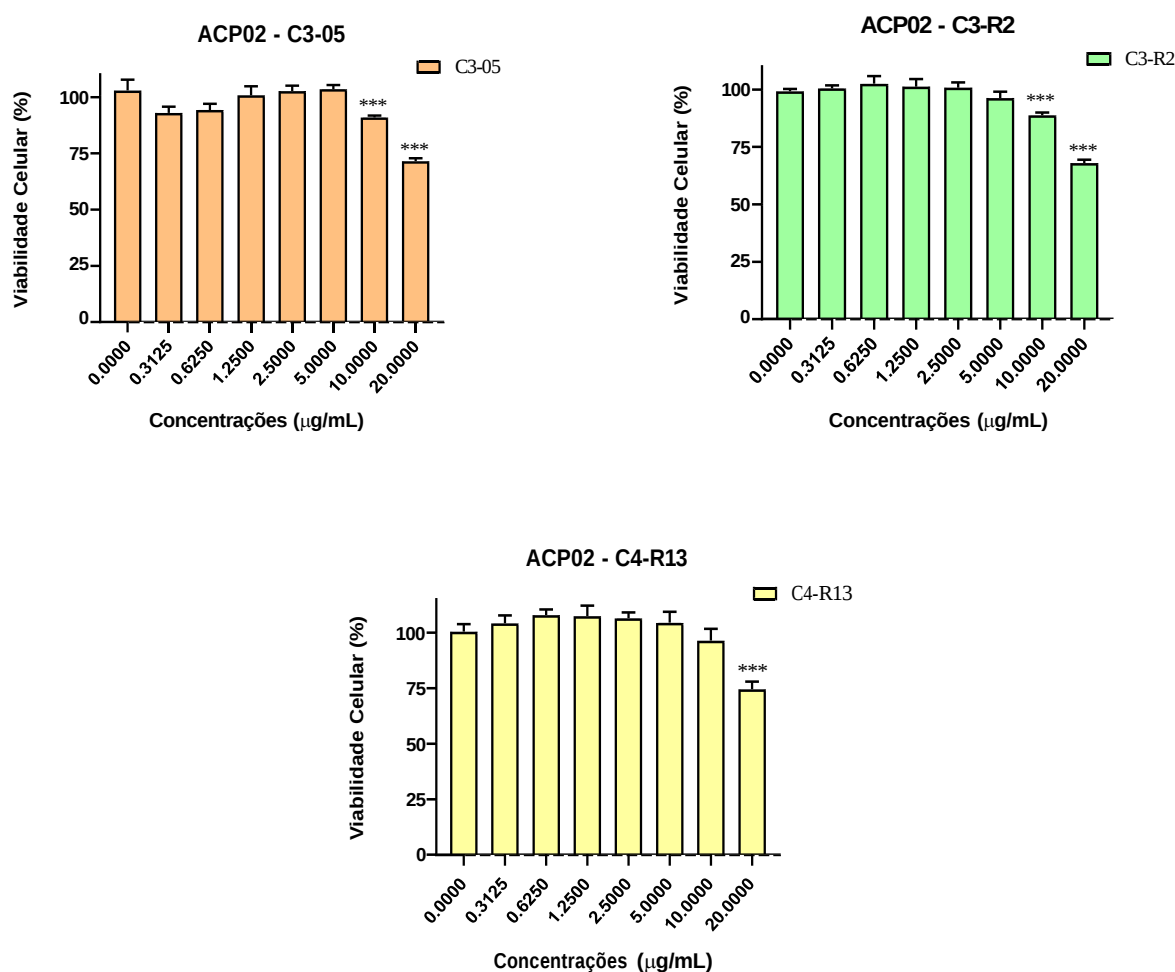


Legenda: AGP01 (adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal)

Fonte: Autora 2023

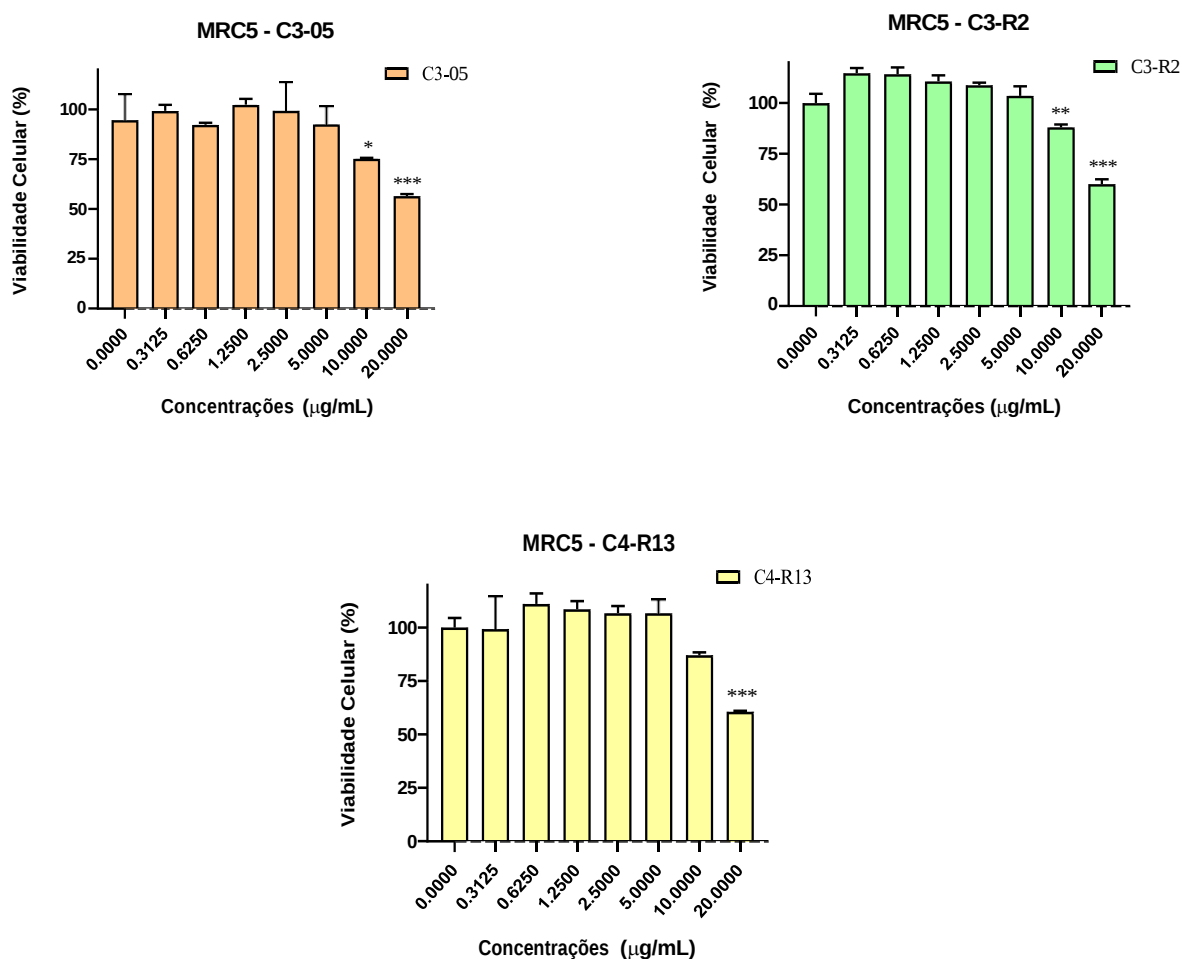
Na linhagem de câncer gástrico primário ACP02, observou-se uma significativa redução na viabilidade celular a partir da concentração de 10 µg/mL para as substâncias S-1, S-2 e S-3, conforme ilustrado na figura 97. Por outro lado, para a linhagem não tumoral MRC5 (figura 98, p.148), as substâncias só apresentaram um efeito de inibição significativo a partir da maior concentração testada neste estudo, ou seja, 20 µg/mL. Esse resultado sugere uma maior toxicidade para as células tumorais, indicando uma possível seletividade das substâncias em relação às células tumorais. No entanto, é crucial realizar estudos mais aprofundados para compreender o mecanismo de ação geral dessas substâncias e validar sua atividade citotóxica potencial sobre as linhagens de câncer gástrico.

Figura 94–Gráfico de viabilidade celular de das substâncias isoladas do fungo *Actinomucor elegans* AcCC18.1A, S-1 (C3-05), S-2 (C3-R2) e S-3 (C4-R13), após 72 horas de tratamento em linhagem de câncer gástrico primário ACP02. Cada ponto equivale à média de três replicatas



Legenda: ACP02 (Adenocarcinoma gástrico do tipo difuso)
Fonte: Autora 2023

Figura 95-Gráfico de viabilidade celular de das substâncias isoladas do fungo *Actinomucor elegans* AcCC18.1A, S-1 (C3-05), S-2 (C3-R2) e S-3 (C4-R13), após 72 horas de tratamento em linhagem não tumoral MRC5. Cada ponto equivale à média de três replicatas



Legenda: MRC5 (fibroblasto pulmonar humano)

Fonte: Autora 2023

Estudos indicam que a atividade citotóxica atribuída aos compostos fenólicos está associada a múltiplas vias, incluindo a redução do crescimento e viabilidade celular, inibição da proliferação, migração e invasão celular, modulação em fases do ciclo celular e indução de apoptose em diferentes modelos tumorais. No geral, diversos estudos concluíram que o efeito anticâncer dos compostos fenólicos é dependente da dose. Vale ressaltar que a maioria dos estudos sobre compostos fenólicos, realizados para avaliar sua citotoxicidade, foi conduzida in vitro (Ferreira *et al.*, 2021; Ramos *et al.*, 2020).

Segundo Lee e colaboradores (2016), o tirosol apresenta inibição do crescimento celular de forma dependente da concentração e do tempo em células de carcinoma epidermoide. Além disso, observou-se que o tirosol pode suprimir a mitose de células tumorais e, em doses mais altas, atuar como um agente apoptótico em células de carcinoma epidermoide. De acordo com Hashim e colaboradores (2008), o tirosol apresentou atividade citotóxica em células de carcinoma de cólon humano HT115, sugerindo uma possível ação relacionada à invasão celular do câncer e que esse efeito pode ser mediado pela prevenção da ligação de células tumorais à matriz extracelular.

O ácido 4-hidroxifenilacético e o 4-formilfenil-2-fenilacetato não têm atividades citotóxicas conhecidas. Enquanto o primeiro é reconhecido por sua ação antibacteriana, o segundo carece de estudos sobre suas atividades biológicas. Como compostos fenólicos, é possível que compartilhem mecanismos de ação citotóxica semelhantes a outros compostos do mesmo grupo. No entanto, são necessários mais estudos para confirmar essa hipótese e entender melhor seu potencial em células cancerígenas.

5.3.3 Atividade alelopática do extrato do fungo *Actinomucor elegans* AcCC18.1A

O extrato não influenciou no crescimento de *Lactuca sativa* (alface), nas concentrações de 125, 250, 500 e 1.000 µg/mL, apresentando valores de taxas de germinação estatisticamente iguais ao controle. Entretanto, concentrações mais elevadas, a partir de 2.000 µg/mL, resultaram em uma redução significativa na taxa de germinação (tabela 15, p. 150), indicando um efeito alelopático do extrato.

Na germinação da alface houve diferença significativa entre o tratamento com o extrato nas concentrações de 125, 250, 500 e 1000 µg/mL em relação ao controle, quando observado o Índice de Velocidade de Germinação (IVG). Entretanto, observou-se que nas sementes submetidas às concentrações de 2.000 e 3.000 µg/mL, houve redução do IVG em relação ao controle, bem como o atraso no processo germinativo. Condizente com a pesquisa de Souza e colaboradores (2017), que em ensaios de germinação com sementes de alface e tomate, frente ao extrato da planta *Croton* L. (Euphorbiaceae), nas concentrações mais altas (50% e 100%), também se observou a diminuição do IVG com o aumento da concentração do extrato.

As substâncias produzidas pelo extrato do fungo *Actinomucor elegans* AcCC18.1A pertencem à classe dos compostos fenólicos. De acordo com Li e colaboradores (2010), compostos fenólicos são a classe mais comum de compostos alopáticos, os quais reduzem a germinação ao inibir as atividades das peroxidases que participam da neutralização de espécies

reativas de oxigênio e na oxidação de outros fenólicos, processos essenciais para a quebra da casca dura da semente e facilitação da emergência da plântula. No estudo realizado por Inácio e colaboradores (2013), observou-se que os extratos das sementes de *P. rígida*, os quais contêm uma quantidade considerável de compostos fenólicos de acordo com seu estudo químico, reduziram significativamente a germinação das sementes de *L. sativa* quando aplicados em concentrações de 5%, 10% e 15%, sendo que nesta última concentração ocorreu uma inibição completa. Dessa forma, é possível inferir que os compostos fenólicos podem contribuir para o efeito alelopático inibitório apresentado pelo extrato em concentrações de 2.000 e 3.000 µg/mL. A intensidade dos efeitos inibitórios induzidos pelo extrato esteve positivamente associada à concentração. No entanto, é essencial conduzir estudos mais detalhados para entender melhor a atividade alelopática, explorando diferentes concentrações do extrato e avaliando seu impacto em diversas espécies de plantas. Isso possibilitará uma compreensão mais ampla dos mecanismos subjacentes ao efeito alelopático e sua possível relevância em contextos agrícolas, como na criação de biopesticidas. Esses produtos têm ganhado destaque devido à capacidade de oferecer soluções mais práticas e sustentáveis para o controle de plantas daninhas na agricultura.

A figura 96 (p. 151) apresenta o índice de velocidade de germinação (nº de sementes germinadas/dia) e a figura 97 (p. 151) apresenta as sementes germinadas durante o experimento

Tabela 15- Influência do extrato na promoção do crescimento vegetal das sementes de alface

Concentração¹	G (%)²	IVG³
125	98,7 a ⁴	12,94 a
250	97,3 a	12,16 a
500	96,0 a	12,16 a
1000	100,0 a	12,61 a
2000	80,0 b	7,43 b
3000	62,7 c	6,76 b
Controle	97,3 a	12,27 a
CV⁵ (%)	4,83	10,39

¹Concentração: µg/mL; ²G: Taxa de germinação; ³IVG: Índice de velocidade de germinação (nº de sementes germinadas/dia); ⁴Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ⁵CV: Coeficiente de variação

Fonte: Autora (2023)

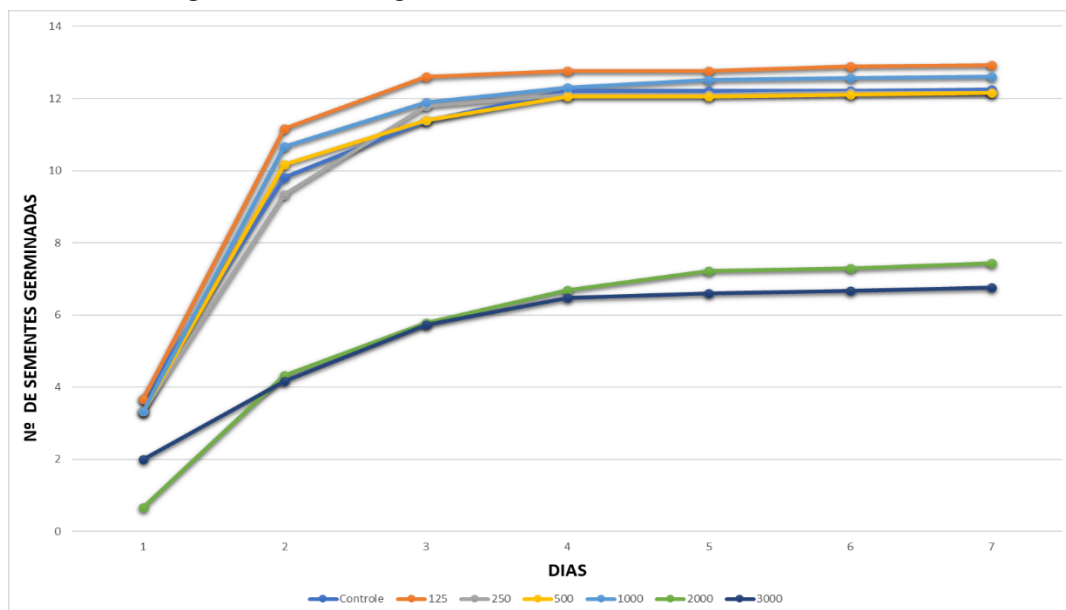
Na análise de variância, o coeficiente de variação (CV) é uma medida de dispersão usada para avaliar a precisão dos experimentos, expressando o desvio-padrão como uma porcentagem da média. Segundo Gomes (1990), em experimentos de campo com culturas agrícolas, os coeficientes de variação são considerados baixos quando inferiores a 10%, médios entre 10 e 20%, altos entre 20 e 30%, e muito altos se superiores a 30% (tabela 16). Neste trabalho, os experimentos se enquadram na categoria de alta precisão no caso da taxa da germinação (G%) (Gomes, 1990).

Tabela 16- Classificação dos experimentos quanto aos coeficientes de variação

Classes de CV	Limites do CV (%)	Precisão
Baixas	≤ 10	Alta
Médios	10-20	Média
Altos	20-30	Baixa
Altos	≥ 30	Muito baixa

Fonte: Gomes F.P. (1990)

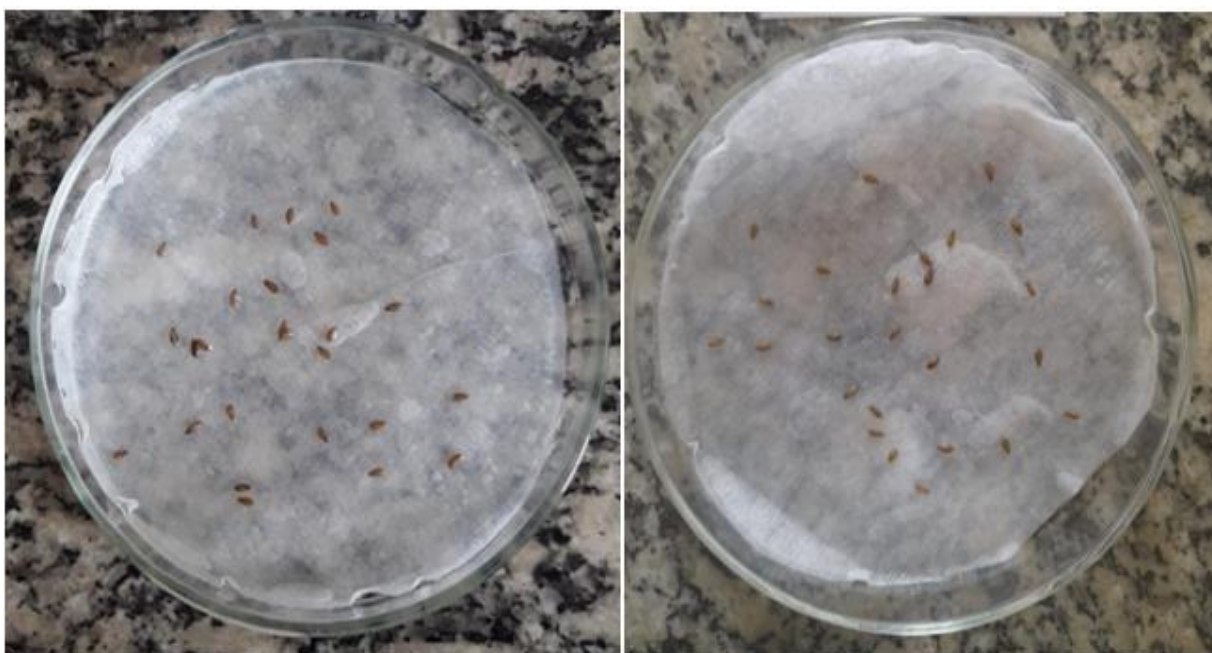
Figura 96- Índice de velocidade de germinação de sementes de *Lactuca sativa*, em concentrações diferentes, do extrato do fungo *Actinomucor elegans* AcCC18.1A.



Legenda: Concentração em µg/mL

Fonte: Autora (2023)

Figura 97- Germinação de sementes de alface pelo extrato etanólico na concentração de 2.000 e 3.000 µg/mL no primeiro dia de contagem



Fonte: Autora (2023)

6 CONCLUSÕES

Nesta pesquisa, investigou-se o papel crucial dos fungos endofíticos, destacando sua habilidade em produzir diversos compostos bioativos, especialmente os compostos fenólicos. O fungo *Actinomucor elegans* AcCC18.1A, isolado de *Rhizophora mangle*, produziu quatro substâncias da classe dos compostos fenólicos (tirosol, ácido 4-hidroxifenilacético, 4-formilfenil 2 fenilacetato e ácido fenilacético). Nos ensaios antimicrobianos, tanto as substâncias isoladas quanto as substâncias modificadas apresentaram resultados positivos frente às bactérias *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. typhimurium*, *E. coli* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, demonstrando eficácia nos testes antimicrobianos.

Embora todas as substâncias isoladas tenham atividade antimicrobiana, os ácidos 4-hidroxifenilacético (**S-2**) e fenilacético (**S-4**) se destacaram, demonstrando atividade bactericida contra *S. typhimurium* e *S. aureus*. Quanto aos ensaios de inibição do crescimento vegetal, o extrato afetou a germinação de *Lactuca sativa* nas concentrações de 2.000 e 3.000 µg/mL, resultando em uma redução significativa na taxa de germinação. Isso indica um efeito alelopático do extrato, sugerindo sua possível relevância em contextos agrícolas, como na criação de biopesticidas,

Dentre todas as substâncias relatadas neste trabalho, destacam-se o 4-(2-(butiriloxi) etil) fenilbutirato (**S-6**) e 4-formilfenil 2 fenilacetato (**S-3**), sendo **S-6** uma estrutura química inédita na literatura. Enquanto isso, **S-3** está sendo relatada pela primeira vez como um produto natural. É relevante ressaltar que esta é a primeira vez que **S-6**, **S-3** e **S-7** são submetidos a ensaios antimicrobianos.

É importante destacar que este é o primeiro relato de ensaios antimicrobianos frente as bactérias *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* com as substâncias isoladas neste trabalho.

Após a realização dos testes iniciais de citotoxicidade e viabilidade celular, observou-se que as substâncias **S-1**, **S-2** e **S-3** exibiram atividade em todas as linhagens de células neoplásicas testadas. Além disso, o estudo das substâncias também demonstrou que elas diminuem a viabilidade celular das linhagens neoplásicas, com melhor ação em AGP01, modelo metastático. Isso destaca a relevância de estudar substâncias naturais para compreender seu potencial na farmacologia do câncer.

Finalmente, torna-se necessário promover mais estudos sobre a química dos fungos endofíticos, os quais representam uma alternativa sustentável para a obtenção de novas substâncias bioativas. Além disso, busca-se identificar derivados mais promissores no combate de doenças, contribuindo para um melhor entendimento das interações entre fungos e plantas.

REFERENCIAS

- ABDALA, G. ; SARAIVA, N. ; WESLEY, F. **Plano de Manejo da Reserva Extrativista. Caeté-Taperaçu - VOLUME I - Diagnóstico da Unidade de Conservação Diagnóstico da Unidade de Conservação**. Brasília: ICMBio, 2012.
- ABDEL-WAHAB, M.A.. Diversity of marine fungi from Egyptian Red Sea mangroves. **Botanica Marina, Berlin**, v. 48, p. 348-355, 2005.
- ABRANTES, J. A.; NOGUEIRA, J.M. D. R.. Resistência bacteriana aos antimicrobianos: uma revisão das principais espécies envolvidas em processos infecciosos. **Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca**, v. 53, p. 219-223, 2021.
- ALMEIDA, L. *et al.* Bioatividade de óleos essenciais na germinação e no vigor em sementes de tomate. **Revista Biotemas**, v. 32 n. 2, 2019.
- ALTMANN, K.-H.; GERTSCH, J. Anticancer drugs from nature—natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents. **Nat. Prod. Rep.**, v. 24, n. 2, p. 327–357, 2007.
- ALVES, K. C.S. *et al.* Bacillus subtilis: uma versátil ferramenta biotecnológica. **Scientia Amazonia**, v. 7, n.2, p. 16-21, 2018.
- AMNA, T. *et al.* Bioreactor studies on the endophytic fungus *Entrophospora infrequens* for the production of an anticancer alkaloid camptothecin. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 189-196, 2006.
- ANSEL, H. C.; Popovich N. G.; Allen, L. V. JR. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. porto alegre: **Artmed**, v. 45, 2007.
- ARAUJO, M. Bacillus subtilis, 2010. Disponível em: <https://www.infoescola.com/reino-monera/bacillus-subtilis/>. Acesso em: 25 out. 2023.
- ARIVUDAINAMBI, U. E. *et al.* A. Novel bioactive metabolites producing endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunol. **Med. Microbiol**, v. 61, p. 340-345, 2011.
- ARRUDA, G. L. *et al.* Aromatic compounds from the endophytic fungus *Asordaria conoidea* and their allelochemical property using OSMAC strategy. **Natural Product Research**, v. 36, n. 15, p. 3999–4002, 2021.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos Endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA**, p. 488, 1998.
- BARDOSA, I. C. C. *et al.* Composição Química de Sedimento de Manguezal do Estuário Bragantino (PA) –Brasil. **Revista Virtual Química** v. 7, n. 4, p. 1087-1101, 2015.
- BERENGER, B. *et al.* Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID-induced gastric ulcers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 194–200, 2006.

BORGES, S. V. *et al.* Bioprospecção de fungos endofíticos com ação antimicrobiana frente a *Pseudomonas aeruginosa*. **Peer Review**, v.5, n.25, p.135-145, 2023.

BRASIL. **Decreto de 20 de maio de 2005**. Dispõe sobre a criação da Reserva Extrativista Marinha de Arai-Peroba, no Município de Augusto Corrêa, no Estado do Pará, e dá outras providências. Brasília, DF, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes.. **Secretaria de Defesa Agropecuária**, Brasília: MAPA/ACS, p. 399, 2009.

BRASIL. Atlas dos Manguezais do Brasil. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Brasília. 2018.

CADAMURO, R. D. *et al.* Bioactive Compounds from Mangrove Endophytic Fungus and Their Uses for Microorganism Control. **Journal of fungi**, v. 7, p. 2-19, 2021.

CAMARA, B. Imagens incríveis feitas com microscopia eletrônica de varredura disponível em: <https://www.biomedicinapadiao.com.br/2013/08/imagens-incriveis-feitas-com.html>, 2013.

CAMARA, M. C. C. *et al.* Transgênicos: avaliação da possível (in)segurança alimentar através da produção científica História, Ciências, Saúde. **Manguinhos, fundação oswaldo Cruz Rio de Janeiro ,Brasil**, v.16, p. 669-681, 2009.

CASADEVALL, A. Antibody-based therapies for emerging infectious diseases. **Emerg Infect Dis**, v. 2 n. 3, 1996.

CAVALCANTE, A. *et al.* A ecobiologia do caranguejo-uçá (*ucides cordatus*) do manguezal da península de ajuruteua, bragança – PA. **IV Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental Salvador/BA – 25 a 28/11/2013**.

CAVALCANTE, R. M. *et al.* The impact of urbanization on tropical mangroves (Fortaleza, Brazil): Evidence from PAH distribution in sediments. **Journal of Environmental Management**, p. New York, v. 91, p. 328- 335, 2009.

CHAI, C. *et al.* synergistic antimicrobial effects of organic acids in combination with carvacrol against *Shigella sonnei*. **Journal of Food Safety** , p. 360–366, 2016.

CHAPLA, V.; BIASETTO, R C.; ARAUJO, A.R. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Revista Virtual de Química**, p. v.5 p. 421-437, 2013.

CHEN, G., Y. *et al.* The metabolites of a mangrove endophytic fungus, *Penicillium thomii*. **J. Asian Nat. Prod. Res.**, p. v. 9, n. 2, p. 159-164, 2007.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. 8.ed. Wayne, PA, USA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2017.

- COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v.126, p.159-175, 2009.
- CORREA, L. C. *et al.* mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão, p. 2-9, 2017.
- COSTA, L. D. F. *et al.* Antimicrobial resistance of enterococci isolated from food in South Brazil: Comparing pre- and post-RDC 20/2011. **An Acad Bras Cienc**, v.94, p.1-14, 2022.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, J. D. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. **Pure Appl. Chem [CrossRef]**, p. 77, 2005.
- CRAPEZ, M.A.C.. Bactérias marinhas.IN: PEREIRA & SOARES-GOMES. **Biologia Marinha**, ed.1, p.83-101, 2002.
- CREUS, E. G. Compuestos fenólico un análisis de sus beneficios para la salud. **ámbito farmacéutico**, v.23 n 6, 2004.
- CRIBB, A.B. ; CRIBB, J.W.. Marine fungi from queensland. In: CRIBB, A.B.; CRIBB, J.W. **Marine fungi from Queensland I. Queensland: University Queensland**, p.77-81, 1955.
- CUEVA, C. *et al.* Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. **current microbiology** , v. 48 , 2004.
- DE-FARIA, F.M. *et al.* Mechanisms of action underlying the gastric antiulcer activity of the *Rhizophora mangle* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.139, p. 234-243, 2012.
- DEMAIN. A.L. Prescription for an ailing pharmaceutical industry. **nature biotechnology**, v.20, p. 231-235, 2002.
- DESHMUKH, S. K.; PRAKASH, V.; RANJAN, N. Recent advances in the discovery of bioactive metabolites from *Pestalotiopsis*. **Phytochem.Rev**, v. 16, p. 883–920., 2017.
- ELKHATEEB, Waill A.; EL-GHWAS, Dina E.; DABA, Ghoson M. Endophyte Fungi from Agarwood and Mangrove and Their Applications. **Journal of Pharmaceutics and Pharmacology Research**, v. 6 n 3, 2022.
- EQUAL, H. P. *et al.* The antibacterial mechanism of phenylacetic acid isolated from *Bacillus megaterium* L2 against *Agrobacterium tumefaciens*. **PeerJ reviewing**, 2022.
- FEITOSA, A. de O *et al.* Lethality of cytochalasin B and other compounds isolated from fungus *Aspergillus* sp. (Trichocomaceae) endophyte of *Bauhinia guianensis* (Fabaceae). **Rev. Argent. Microbiol**, v. 48 n.3, p. 259-263, 2016.
- FERNÁNDEZ, A. P. *et al.* Evolution of Hydroxytyrosol, Hydroxytyrosol 4-β-D-Glucoside, 3,4-Dihydroxyphenylglycol and Tyrosol in Olive Oil Solid Waste or “Alperujo”. **Molecules**, 2022.
- FERREIRA, C. M. *et al.* Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive

compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 59, p. 36-44, 2015.

FERREIRA, W. A. *et al.* Potencial antitumoral dos compostos fenólicos de produtos da oliveira (*Olea europaea* L.): uma revisão integrativa da literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n.13, 2021.

FISCHER, I. H.; BERTANI, R. M. D. A.; SILVA, S. P. Doenças do maracujá – Controle da bacteriose é urgente, 15 maio 2017. Disponível em: <https://revistacampoenegocios.com.br/doencas-do-maracuja-controle-da-bacteriose-e-urgente/>. Acesso em: 25 out. 2023.

FRAGOPOULOU, E. *et al.* Biological Activity of Acetylated Phenolic Compounds. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 80–89, 2007.

GALLO, M. B. C. *et al.* Endophytic fungi found in association with *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) as resourceful producers of cytotoxic bioactive natural. **Journal of Basic Microbiology**, 2008.

GIBBS, A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 63, p. 9-16, 1997

GILBERT, G. S. GOROSPE, J.; RYVARDEN, L. Host and habitat preferences of polypore fungi in Micronesian tropical flooded forests. **Mycological Research Cambridge**, v. 112, p. 674-680, 2008.

GOMES, F. P. Curso de estatística experimental, São Paulo: Nobel, n. 15.ed, p. 467-2000, 1990.

GOMES, T. A.T. *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2016.

GONÇALVES, Y. B.; ROSATO, E. R. Caracterização genotípica de cepas de *xanthomonad* isoladas de plantas de maracujá (*Passiflora* spp.) e sua relação com diferentes espécies de *Xanthomonas*. **Jornal Internacional de Microbiologia Sistemática e Evolutiva**, v. 50 p.811-821, 2000.

GONZÁLEZ-OCAMPO, H. A. *et al.* Comparison of Phenolic and Flavonoid Content and Antioxidant and Chelating Activities of *Rhizophora mangle* in Different Anthropogenically-Polluted Coastal Lagoons. **Frontiers in Marine Science**, v. 9 p.2-6, 2022.

GOUVEIAA, D. N. *et al.* Natural products as a perspective for cancer pain management: a systematic. **phytoedicine**, 2018.

GREVE, H. *et al.* Fungal metabolites: structural diversity as incentive for anticancer drug development. **Phytochem. Rev. [CrossRef]**, p. p. 9-537, 2010.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. D.L. Ocorrência da mancha bacteriana do maracujazeiro em Roraima. *Fitopatologia brasileira*, v.31, n.2, p. 214–214, 2006

HARVEY, J.B.J.; GOFF, L. J. Genetic covariation of the marine fungal symbiont *Haloguignardia irritans* (Ascomycota, Pezizomycotina) with its algal hosts *Cystoseira* and *Halidrys* (Phaeophyceae, Fucales) along the west coast of North America. **Fungal Biology**, v.114, p. 82-95, 2010

HALIDRYS (Phaeophyceae, Fucales) along the west coast of North America. **Fungal Biology, Amsterdam**, v. 114, p. 82-95, 2010.

HASHIM, Y. Z. H-Y. *et al.* Inhibitory effects of olive oil phenolics on invasion in human colona denocarcinoma cell sin vitro. **Int. J. Cancer**, v. 122, p. 495–500, 2008.

HELMS, M. *et al.* International Salmonella Typhimurium DT104 Infections, 1992–2001. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 859-866, 2005.

HOENSCH, H. P.; OERTEL, R. The value of flavonoids for the human nutrition: Short review and perspectives. **Clinical Nutrition Experimental**, v. 3, p. 8-14, 2015.

HUSSAIN, M. Iftikhar *et al.* Unraveling Sorghum Allelopathy in Agriculture: Concepts and Implications.. **Plants (Basel)**, v. 28, n.10, 2021.

IBGE, - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção de Maracujá, 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/maracuja/br>. Acesso em: 25 out. 2023.

INÁCIO, M. C. *et al.* Phenolic Compounds Influence Seed Dormancy of *Palicourea rigida* H.B.K. (Rubiaceae), a Medicinal Plant of the Brazilian Savannah. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, p. 129-133, 2013.

INCA. Estatísticas de câncer | INCA - Instituto Nacional de Câncer., 23 nov. 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/introducao>.

JOHNSTON, G. A. R. Flavonoid nutraceuticals and ionotropic receptors for the inhibitory neurotransmitter GABA. **Clinical Nutrition Experimental**, v. 89, p.8-14, 2015.

KASHYAP, Bishwapran ; PHUKAN, Prodeep. A new ferrocene-based bulky pyridine as an efficient reusable homogeneous catalyst. **The Royal Society of Chemistry**, v. 3, p. 15327–15336, 2013.

KHARWAR, R. N., Mlshra, A. *et al.* Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Natural Products Reports**, p. v. 28, p. 1208- 1228, 2011.

KHAWAR, R. N. *et al.* Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance ad future challenges. **Natural Products Reports**, v. 28, p.1208-1228, 2011.

KIM, Y. *et al.* Identification and Antimicrobial Activity of Phenylacetic Acid Produced by *Bacillus licheniformis* Isolated from Fermented Soybean, Chungkook-Jang. **Current Microbiology**, v. 48, p. 312–317, 2004.

KING, R. Coloração de Gram (*Escherichia coli*). **Manual MSD Versão para profissionais da saúde**, 2022. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/multimedia/image/colora%C3%A7%C3%A3o-de-gram-escherichia-coli->. Acesso em: 25 out. 2023.

KNOX, S. S. From “omics” to complex disease: A systems biology approach to gene-environment interactions in cancer. **Cancer Cell International**, v. 10, 2010.

KODUMURI, S. *et al.* Metal-Free, Catalytic Regioselective Oxidative Conversion of Vinylarenes: A Mild Approach to Phenylacetic Acid Derivatives. **The Royal Society of Chemistry**, 2016.

KOVANDA, Lauren *et al.* In Vitro Antimicrobial Activities of Organic Acids and Their Derivatives on Several Species of Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. **Molecules**, v. 24, p. 2-14, 2019.

KUMAR, A. *et al.* Isolation, purification and characterization of vinblastine and vincristine from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Catharanthus roseus*. **Plos One**, p. v. 8, 2013.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. **Cold Spring Harb. Protoc**, v. 6, p. 469-471, 2018.

KUMARESAN, V.; SURYANARAYANAN, T. S. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. **Mycological Research, Cambridge**, v.105, p. 1388-1391, 2001.

LABOURIAU, L.G. ; VALADARES, M.B. On the germination of seeds of *Calotropis procera*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 48, p. 174-186, 1976.

LEVERSTEIN-VAN, H. M., *et.al.* 2011. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin Microbiol Infect* v.17 p.873-880.

LEE, Hyunjung *et al.* Tyrosol, an olive oil polyphenol, inhibits ER stress-induced apoptosis in pancreatic b-cell through JNK signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 469, p. 748-752, 2016.

LI, Y. C.; TAO, W.Y. Paclitaxel-producing fungal endophyte stimulates the accumulation of taxoids in suspension cultures of *Taxus cuspidate*. **Scientia Horticulturae**, v. 121, n.1, p. 97-102, 2009.

LI, Zhao-Hui *et al.* Phenolics and Plant Allelopathy. **Molecules**, v. 15, p. 8933-8952, 2010.

LIBERATO, J. R. Controle das doenças causadas por fungos, bactérias e nematoides no maracujazeiro. In: **Zambolim L, Vale FXR, Monteiro AJA & Costa H (Eds.) Controle de doenças de plantas fruteiras. Viço-sa, Suprema**, p. 699-825, 2002.

LIN, Z. *et al.* Polyketides from *Penicillium* sp. JP-1, an endophytic fungus associated with the mangrove plant *Aegiceras corniculatum*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 5, p. 1273-1278, 2008.

LIU, Y. *et al.* Antimicrobial mechanism of 4-hydroxyphenylacetic acid on *Listeria monocytogenes* membrane and virulence. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 572, p. 145–150, 2021.

MAGUIRE, J. D. Speed germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and 102 vigor. **Crop Sci., Madison** v. 2, p. 176-177, 1962.

MALINI, M. *et al.* Determination of the antimutagenicity of an aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), using in vivo and in vitro test systems. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, p.1-6, 2010.

MARINHO, A. M. R. **Metabolismo secundário de fungos endofíticos do gênero *Penicilium* associados às plantas *Melia azedarach* (Meliaceae) e *Murraya paniculata* (Rutaceae)**. 2005. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP.

MATNI, A. S.; MENEZES, M. P. M.; MEHLIG, U. Estrutura dos bosques de mangue da península de Bragança, Pará, Brasil. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, Ciências Naturais, Belem**, v. 1, n. 3, p. 43-52, 2006.

MCGARVEY, P. B. *et al.* Systems Integration of Biodefense Omics Data for Analysis of Pathogen-Host Interactions and Identification of Potential Targets. **Pathogen-Host Omics Data**, v. 4 n.9, 2009.

MELCHOR, M. A.; O. F.; LINARES, E.; FRAGAS, I. Antibacterial activity of *Rhizophora mangle* bark. **Fitoterapia**, p. 689-691., 2001.

MOHAMED, T. A. *et al.* Cytotoxic and chemotaxonomic study of isolated metabolites from *Centaurea aegyptiaca*. **Journal of the chinese chemical society**, p. 1-10, 2020.

MOUTINHO, S.. Ação Implacável. **Ciência Hoje**, 2017. setembro 2015. Disponível em: http://www.cienciahoje.org.br/noticia/v/ler/id/2182/n/acao_implacavel.

OLIVEIRA, A.; SOUZA, R. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, p. 189-197, 2008.

OLIVEIRA, I. N. Detecção de pigmentos e metabólitos secundários bioativos de extratos de fungos endofíticos associados à *manilkara salzmännii* planta da restinga de Salvador, BA. **Dissertação de Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia**, 2018.

OLIVEIRA, K. M. de *et al.* Isolamento e atividade antibacteriana de fungos endofíticos de *Piper glabratum* Kunth. **Arq. Cienc. Saúde UNIPAR, Umuarama**, v. 19, n. 1, p. 3-9, 2015.

OLIVEIRA, L. C. de *et al.* Characterization and variability of strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* from the state of Pará, Brazil. **Rev. Ceres, Viçosa**, v. 70, n.1, p. 124-132, 2023.

OUEDRAOGO, M. *et al.* From the vasodilator and hypotensive of an extract fraction from *Agelanthus dodoneifolius* (DC) Danser (Loranthaceae) to the active compound dodoneine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.133 p. 345–352, 2011.

PANG, K. L.; MITCHELL, J. I. Molecular approaches for assessing fungal diversity in marine substrata. **Botanica Marina**, Berlin, v. 48, p. 332-337, 2005.

PARK, C. H. *et al.* Phenolic constituents of *Acorus gramineus*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 8, p.1289–1296, 2011.

PARK, Cheol Hyeong *et al.* Phenolic Constituents of *Acorus gramineus*. **Archives of Pharmacal Research** , v. 34, n. 8, p. 1289-1296, 2011.

PARRENT, J.L. ; GARBELOTTO, M. ; GILBERT, G.S.. Population genetic structure of the polypore *Datronia caperata* in fragmented mangrove forests. **Mycological Research Cambridge**, v. 108, p. 403-410, 2004.

PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry**. 4th ed, cap.10 e cap.16, 2009.

PEREIRA, J. C. *et al.* Potencial alelopático e identificação dos metabólitos secundários em extratos de *Canavalia ensiformis* L. **Rev. Ceres, Viçosa**, v. 65, n.3, p. 243-252,2018.

PERERA, L.M.S. *et al.* Further Pharmacological Evidence Supporting the Development of an Antiulcerogenic Drug Based on *Rhizophora mangle* L. Aqueous Extract. HPLC Method Proposed for Determinating a Chemical Marker. **Open Access Library Journal**, v. 3, 2016.

PRETSCH, A. *et al.* Antimicrobial and anti-inflammatory activities of endophytic fungi *Talaromyces wortmannii* extracts against acne-inducing bacteria. **Plos one**, v.9, n.6, p. 1-11, 2014.

PETRINI, O. Fungal endophyte of three leaves. **Microbial Ecology of Leaves. New York. Springer Verlag**, p. 179-197, 1991.

PINHEIRO, E. A. A. **Perfil cromatográfico e potencial químico e biológico de fungos de solo e fungos endofíticos isolados de fungos de solo e fungos endofíticos isolados de bauhinia guianensis e mimosa acutistipula var. ferrea**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade federal do Pará.

PINHEIRO, E. A. A. *et al.* Anularinas I e J: Novos Metabólitos Isolados de Fungo Endofítico. **J. Braz. Química**, v. 27 n. 8, p. 1432-1436, 2016.

PROJAN, S. J.; SHLAES, D. M. Clin. Microbiol. Infec., p. 10-18, 2004.

PURI, S. C. *et al.* An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. **Journal of Natural Products**, v. 12, p. 1717-1719, 2005.

RAMOS, A. C. *et al.* A aplicabilidade terapêutica do tirosol e hidroxitirosol para a Odontologia. **Research, Society and Development**, v. 9 n. 8, p. 2-16, 2020.

RAMOS, G. D. C. **Fungos endofíticos associados à planta de manguezal (rhizophora mangle l.) da resex marinha de caeté-taperaçu: estudo químico e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica.** 2021. Tese de doutorado Universidade Federal do Pará, Belém-PA.

REGALADO, Ada I.; SÁNCHEZ, Luz M.; MANCEBO, Betty. Rhizophora mangle L. (mangle rojo): Una especie con potencialidades de uso terapéutico. **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, v. 4 n.1, p. 1-17, 2016.

RODRIGUEZ, R. M. **Estudo da Emissão de Íons Estáveis e Metaestáveis Estudo da emissão de íons estáveis e metaestáveis (lif)nli+ induzida por fragmentos de fissão do 252cf.** 2003. Dissertação de mestrado da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

RODRÍGUEZ, J. M. *et al.* Potential Role of Olive Oil Phenolic Compounds in the Prevention of Neurodegenerative Diseases. **Molecules**, v. 20 , p. 4655-4680, 2015.

ROSALES, J. D. T. Extracción de metabolitos secundarios y el estudio de su actividad biológica. **Tese de doutorado da universidade autonoma de puebla**, p. 4-5, 2019.

RUKACHAISIRIKUL, V. *et al.* a-Pyrone and seiricuprolide derivatives from the mangrove-derived fungi Pestalotiopsis spp. PSU-MA92 and PSU-MA119. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 1, p. 13-17, 2012.

SAJID, I.; SHAABAN, K. A.; HASNAIN, S. Identification, isolation and optimization of antifungal metabolites from the streptomyces malachitofuscus ctf9. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 592-604, 2011.

SALLES, J.M.C. Antimicrobianos (Antibacterianos, Antifúngicos, Antivirais, Antiparasitários)- Quando indicar, Como usar. **Editora Universitária da Universidade Federal do Pará, Belém-PA**, 2000.

SÁNCHEZ, J. *et al.* Antioxidant activity of Rhizophora mangle bark. **Fitoterapia**, p. 77, 141–143, 2006.

SANTANA, E. S. *et al.*, Association of Rhizophora mangle and ascorbic acid in hydrogels: Evaluation of cytotoxic and immunomodulatory effects. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.59 p.1- 14, 2023.

SANTOS, A. L. D. *et al.* Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43 n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto Contexto Enferm**, Florianópolis, v. 13, p. 64-70, 2004.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. Review The endophytic continuum. **Mycol. Res**, v. 109 n. 6 , p. 661–686, 2005.

SERVILI, M. *et al.* Biological Activities of Phenolic Compounds of Extra Virgin.

Antioxidants, v. 3, p. 1-23, 2014.

SHAH, Suraj Kumar *et al.* Fungal Endophytes: A Storehouse of Bioactive Compounds. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 23, n 9, p. 978-991, 2023.

SHAMS, K. A. *et al.* Isolation and characterization of antineoplastic alkaloids from *Catharanthus Roseus* L. Don. cultivated in Egypt. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 6, p. 118-122, 2009.

SILVA, J. J. X. **Creme de Rhizophora mangle na cicatrização de segunda intenção de feridas cutâneas em pálpebra superior: ensaio clínico randomizado**. 2019. Dissertação de mestrado Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE.

SILVA, M. A. B.; BERNINI, E.; CARMO, T. M. S. Características estruturais de bosques de mangue do estuário do rio São Mateus, ES, Brasil. **Acta bot. Bras**, v.19, n.3, p. 465-471, 2005.

SILVERSTEIN, R. M *et al.* Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 8 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2019.

SINGH, S *et al.* Synergistic biodegradation of pentachlorophenol by *Bacillus cereus* (DQ002384), *serratia marcescens* (AY927692) and *serratia marcescens* (DQ02385). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p.1821-1828, 2009.

SOARES, Sergio Eduardo. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15 n. 1, p. 71-81, 2002.

SOUZA FILHO, A. P. S.; DUARTE, M. L. R. Atividade alelopática do filtrado de cultura produzido por *Fusarium solani*. **Planta Daninha, Viçosa-MG**, v. 25, n. 1, p. 227-230, 2007.

SOUZA, B. D. S. *et al.* Fungos endofíticos associados à planta medicinal corama (*kalanchoe pinnata*). **Desafios**, p. 2-5, 2018.

SOUZA, C. D. O. *et al.* *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreioigênica versátil. **Rev Pan-Amaz Saude, Ananindeua**, v. 7, n. 2, p. 79-91, 2016.

SOUZA, G. S. *et al.* Potencial alelopático de seis espécies do gênero *Croton* L. na germinação de alface e tomate. **Iheringia, Serie Botanica**, v. 72 n.2, p. 155–160, 2017.

SOUZA-FILHO, P.W.M.; PARADELLA, W.R. Use of RADARSAT-1 Fine and Landsat-5 TM selective principal component analysis for geomorphological mapping in a macrotidal mangrove coast, Amazon Region. **Canadian Journal of Remote Sensing**, v. 31, n. 3, p. 214-224, 2005.

SPECIAN, V *et al.* Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos Secondary Metabolites Produced by Endophytic Fungi of Pharmaceutical Interest. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 16 n. 4, p. 345-51, 2014.

SRINIVAS, T. L. *et al.* Medicinal Plants as Anti-Ulcer Agents. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, n. 4, p. 91-97, 2013.

- STIERLE, A. A.; STIERLE, D. B.; BUGNI, T.. Sequoiatones A-D: novel antitumor metabolites isolated from a redwood endophyte. **Journal Organic Chemistry**, v. 64, p. 5479-5484, 1999.
- STROBEL, G. *et al.* Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67 , p. 257-268, 2004.
- STROHL, W. A.; ROUSE, H.; FISHER, B. D.; FISHER, B. D. Microbiologia ilustrada. Artmed. **Artmed: Porto Alegre**, 2004.
- SUN, H. *et al.* The Epidemiology of Monophasic Salmonella Typhimurium. **Foodborne pathogens and disease**, 2019.
- TAFESH, A. *et al.* Synergistic Antibacterial Effects of Polyphenolic Compounds. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-9, 2011.
- TORTORA, G. J; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 331-332, 2012.
- TULP, M. ; BOHLIN, L.. Unconventional natural sources for future drug discovery. **[CrossRef] [PubMed]Drug Discov. Today**, p. 9, 450, 2004.
- TURBYVILLE, T. J. *et al.* Search for Hsp90 inhibitors with potential anticancer activity: isolation and SAR studies of radicicol and monocillin I from two plant-associated fungi of the sonoran Desert. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 178-184, 2006.
- VENUGOPALAN, A.; SRIVASTAVA, S. Endophytes as in vitro production platforms of high value plant. **Biotechnology Advances**, v. 33 n.6 , p. 873–887, 2015.
- VERRAES C. *et al.* 2013. Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *Int J Environ Res Public Health* v.10 p. 2643-2669.
- WADE, L. Química orgánica. 7 ed. ed. México v.13, p. 561-609, 2012.
- WALL, M. E. *et al.* Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. **Journal of the American Chemical Society August** , 1966.
- WANG, S ; XU, F ; ZHAN, J. Introdução de pigmentos naturais de microrganismos. **In: Singh OV (Ed.) Biopigmentação e implementações biotecnológicas**, Nova Jersey, Wiley Blackwell., p. 1-16, 2017.
- WEN, J. *et al.* Endophytic Fungi: An Effective Alternative Source of Plant-Derived Bioactive Compounds for Pharmacological Studies. **Journal of fungi**, 2022.
- WENDEL, G. H., Teves *et al.* Evaluation of the Antidiarrheal Activity of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 32, p.128-131, 2013.
- WHO. Cancer, 22 nov. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact->

sheets/detail/cancer.

XU, J. *et al.* Chromones from the Endophytic Fungus *Pestalotiopsis* sp. Isolated from the Chinese Mangrove Plant *Rhizophora mucronata*. **J. Nat. Prod**, v. 72, n. 4, p. 662-665, 2009.

XU, J. ; EBADA, S.S. ; PROKSCH, P.. *Pestalotiopsis* a highly creative genus: Chemistry and bioactivity of secondary metabolites. **Fungal Divers**, v. 44, p. 15–31, 2010.

ZHANG, X. *et al.* Phylogenetic Diversity, Antimicrobial and Antioxidant Potential and Identification of Bioactive Compounds from Culturable Endophytic Fungi Associated with Mangrove *Bruguiera sexangula* (Lour) Poir. **Curr. Microbiol**, v.78, p.479–489, 2021.

ZHANG, Ya-Kun *et al.* CHEMICAL CONSTITUENTS OF *Clerodendrum japonicum*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 59, n.4, 2023.

ZHOU, J. *et al.* Cytotoxic constituents from the mangrove endophytic *Pestalotiopsis* sp. induce G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in human cancer cells. **Natural Product Research**, 2017.