

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LUCAS SILVA TIRONI

ESTUDO QUÍMICO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE
Lasiodiplodia sp.

ALFENAS/MG

2023

LUCAS SILVA TIRONI

ESTUDO QUÍMICO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE
Lasiodiplodia sp.

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

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

ALFENAS/MG

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Tironi, Lucas Silva.

Estudo químico e potencial antioxidante de extratos de *Lasiodiplodia* sp.
/ Lucas Silva Tironi. - Alfenas, MG, 2023.

94 f. : il. -

Orientador(a): Jaine Honorata Hortolan Luiz.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas,
Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. *Lasiodiplodia* sp.. 2. Metabólitos secundários bioativos. 3. Atividade
antioxidante. 4. PCA. 5. Similaridade e diferencial de RMN. I. Luiz, Jaine
Honorata Hortolan, orient. II. Título.

LUCAS SILVA TIRONI

ESTUDO QUÍMICO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE *Lasiodiplodia* sp.

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovado em: 10 de novembro de 2023.

Profa. Dra. Jaine Honorata Hortolan Luiz
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

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

Profa. Dra. Cecilia Veronica Nunez
Instituição: Universidade do Estado do Amazonas



Documento assinado eletronicamente por **Jaine Honorata Hortolan Luiz, Professor do Magistério Superior**, em 10/11/2023, às 12:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1118404** e o código CRC **1689A8C2**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus pela força e pela coragem de não desistir nunca dos meus objetivos, de sempre estar comigo, ouvindo minhas orações, me amparando e possibilitando minhas conquistas. Sem Ele eu nada seria.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Jaine, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa, pela confiança em meu trabalho, competência, profissionalismo, amizade, compartilhando todos seus conhecimentos, contribuindo para o meu crescimento profissional. Minha sincera admiração e gratidão.

Um agradecimento mais que especial a minha família, pois com toda a certeza, os maiores ensinamentos que tenho na vida foram vocês que me proporcionaram. Amo vocês eternamente.

Aos meus amigos Guilherme, Amanda, Paula e Júlia que tornaram essa trajetória mais divertida, me proporcionando momentos de lazer e distração. E aos amigos de outras caminhadas, que mesmo de longe sempre se fizeram presentes, tornando meus dias mais felizes. Em especial, a Cristiane e Rafaela, por todos os ensinamentos compartilhado durante o mestrado.

Quero agradecer ao laboratório de pesquisa de Bioprocessos, em particular ao Omar pela amizade e à Dajara pelo fornecimento dos extratos estudado. Às instituições e profissionais que fizeram possível a obtenção dos resultados da pesquisa: o Prof. Dr. Jan do LCQUI/CCT/UENF pelo apoio e pelos grandes ensinamentos, o Professor Giba do Departamento de Química da UFSCar pela aquisição dos espectros de RMN e a Professora Mariane Gonçalves Santos pela assessoria durante o trabalho com LC/MS no LATF /FCF/UNIFAL.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) Financiamento 01.

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e a da Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da UNIFAL-MG.

Gostaria de expressar minha gratidão à CAPES e à FAPEMIG pelas bolsas que me foram concedidas ao longo do meu período de dedicação ao mestrado.

RESUMO

Os fungos endofíticos são organismos que produzem uma ampla variedade de metabólitos com estruturas complexas e diversificadas. Esses metabólitos podem exibir atividade antioxidante, o que os torna uma fonte promissora de produtos naturais contra o estresse oxidativo. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante e identificar compostos majoritários presentes em extratos orgânicos acetato de etila oriundos do processo de otimização do meio de cultivo realizado em modo estático em diferentes tempos do fungo *Lasiodiplodia* sp., isolado do ipê *Handroanthus impetiginosus*. O conteúdo de flavonoides e fenólicos e a capacidade antioxidante foram avaliados utilizando as seguintes metodologias: cloreto de alumínio, Folin-Ciocalteu, DPPH, FRAP e ABTS+●. Os extratos cultivados entre o sexto (POLd-6) e o décimo primeiro (POLd-11) dia apresentaram os melhores resultados quanto às atividades antioxidantes determinadas. De acordo com os ensaios de DPPH, FRAP e ABTS+● foi possível classificar e agrupar os extratos por meio da PCA (*Principal Component Analysis*). Os resultados indicaram a existência de dois grupos distintos entre os extratos, que foram correspondentes à fase inicial e ao final do crescimento fúngico. Os 14 extratos fúngicos foram submetidos à análise de RMN-¹H e foram tratados quanto a suas similaridades entre os espectros individuais, permitindo a comparação do perfil químico. Essa abordagem revelou tanto as similaridades quanto as diferenças entre os metabólitos biossintetizados durante o período de cultivo do fungo. Através da análise por RMN-1D e 2D do extrato POLd-14, foram identificados dois compostos conhecidos: 3-carboxi-2-metileno-4-heptanolida e o ácido decumbico. Além disso, o uso da plataforma GNPS permitiu a atribuição de classes dos compostos presentes nos extratos, incluindo ácidos carboxílicos e derivados, alcaloides, benzeno e derivados substituídos, além de flavonoides. Foi avaliada a atividade tóxica de um dos extratos POLd-11 por meio da taxa de sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella*. Após um período de 72 horas de tratamento com concentrações variando de 12,5 a 200 µg.mL⁻¹, todas as larvas testadas permaneceram vivas, resultando em uma taxa de sobrevivência de 100%. Conclui-se que, nas condições do estudo, o endófito *Lasiodiplodia* sp. foi capaz de sintetizar substâncias com atividade antioxidante promissoras.

Palavras-chave: fungos endofíticos; *Lasiodiplodia* sp.; metabólitos secundários bioativos; atividade antioxidante; PCA; similaridade e diferencial de RMN.

ABSTRACT

Endophytic fungi are organisms that produce a wide variety of metabolites with complex and diverse structures. These metabolites may exhibit antioxidant activity, making them a promising source of natural products against oxidative stress. The objective of this study was to evaluate the antioxidant potential and identify major compounds present in ethyl acetate extracts obtained from the optimization process of static culture at different times of *Lasiodiplodia* sp. fungus, isolated from the *Handroanthus impetiginosus* tree. Flavonoids and phenols content and antioxidant capacity were evaluated using the following methodologies: aluminum chloride, Folin-Ciocalteu, DPPH, FRAP, and ABTS+●, respectively. The extracts obtained from the sixth (POLd-6) and the eleventh (POLd-11) day of cultivation showed the best antioxidant activities as determined by the assays. According to the DPPH, FRAP, and ABTS+● tests, it was possible to classify and group the extracts using Principal Component Analysis (PCA). The results indicated the existence of two distinct groups among the extracts, corresponding to the early and late stages of fungal growth. The 14 fungal extracts were subjected to ¹H-NMR analysis and treated for similarities between individual spectra, allowing the comparison of chemical profile. This approach revealed both similarities and differences among the metabolites biosynthesized during the fungal cultivation period. Through 1D and 2D NMR analysis of POLd-14 extract, two known compounds were identified: 3-carboxy-2-methylene-4-heptanolide and decumbic acid. Furthermore, the use of the GNPS platform allowed for the assignment of chemical classes of the compounds in the extracts, including carboxylic acids and derivatives, alkaloids, substituted benzenes and flavonoids. The toxicity of POLd-11 was evaluated through the survival rate of *Galleria mellonella* larvae. After a 72-hour treatment period with concentrations ranging from 12.5 to 200 µg.mL⁻¹, all tested larvae remained alive, resulting in a survival rate of 100%. It is concluded that, under the conditions of this study, the endophyte *Lasiodiplodia* sp. was capable of synthesizing substances with promising antioxidant activity.

Keywords: endophytic fungi; *Lasiodiplodia* sp.; bioactive secondary metabolites; antioxidant activity; PCA; NMR similarity and differential.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Etapas envolvidas no estudo de metabólitos secundários sintetizados por fungos endofíticos.....	22
Figura 2 –	Estrutura química dos metabólitos secundários com ação no sistema enzimático antioxidante e atividade antioxidante isolados do gênero <i>Lasiodiplodia</i>	24
Figura 3 –	Esquema ilustrado da complexação do flavonoide quercetina com cloreto de alumínio (AlCl ₃) o qual forma o complexo estável flavonoide-Al ³⁺	28
Figura 4 –	Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.....	29
Figura 5 –	Estrutura química do radical DPPH e reação com um antioxidante.....	31
Figura 6 –	Redução do Fe(III) a Fe(II) pela adição de um antioxidante.....	32
Figura 7 –	Redução do ABTS+● por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.....	32
Figura 8 –	Resumo da estatística multivariada e seleção dos métodos aplicados na pesquisa.....	34
Figura 9 –	Esquema metodológico para obtenção da rede molecular seguido de desreplicação, obtenção de novos compostos e biomoléculas.....	38
Figura 10 –	Sinais identificados no espectro de ¹ H do extrato POLd-14 em CDCl ₃ – 400 MHz, 9,4 T a 25 °C.....	93
Figura 11 –	Correlações observadas no espectro de COSY do extrato POLd-14 em CDCl ₃ – 400 MHz, 9,4 T a 25 °C.....	93
Figura 12 –	Correlações observadas no espectro de no espectro de HSQC do extrato POLd-14 em CDCl ₃ – 400 MHz, 9,4 T a 25 °C.....	94
Figura 13 –	Correlações observadas no espectro de no espectro de no espectro de HMBC do extrato POLd-14 em CDCl ₃ – 400 MHz, 9,4 T a 25 °C.....	94
Figura 14 –	Estrutura da 3-carboxi-2-metileno-4-heptanolida: Estrutura química (a); Correlações observadas nos espectros de COSY (b) e HMBC (c).....	62
Figura 15 –	Estrutura do ácido decumbico: Estrutura química (a); Correlações observadas nos espectros de COSY (b) e HMBC (c).....	64
Figura 16 –	Diferencial de RMN- ¹ H dos extratos POLd-14 e 15.....	66
Figura 17 –	Expansão da região entre 3,5 – 6,7 ppm.....	67

Figura 18 – Diferencial de RMN- ¹ H dos extratos POLd-7 e 14.....	68
Figura 19 – Expansão da região entre 6,0 - 10,1 ppm.....	68
Figura 20 – Comparação entre os espectros de RMN- ¹ H dos extratos POLd-11 (azul), 12 (vermelho), 13 (verde), 14 (roxo) e 15 (amarelo) (CDCl ₃ – 400 MHz).....	69
Figura 21 – Região expandida entre 4,6 e 6,6 ppm para comparação entre os espectros de RMN- ¹ H dos extratos POLd-12 (azul), 13 (vermelho), 14 (verde) e 15 (roxo) (CDCl ₃ – 400 MHz).....	70
Figura 22 – Comparação entre os espectros de RMN- ¹ H dos extratos POLd-4 (azul), 5 (vermelho), 6 (verde), 7 (roxo) (CDCl ₃ – 400 MHz).....	71
Figura 23 – Expansão da região entre 6,7 - 10,1 ppm.....	71
Figura 24 – Comparação entre os espectros de RMN- ¹ H dos extratos POLd-8 (azul), 9 (vermelho), 10 (verde), 11 (roxo) (CDCl ₃ – 400 MHz).....	72
Figura 25 – Expansão da região entre 7,2 - 10,1 ppm.....	72
Figura 26 – Comparação entre os espectros de RMN- ¹ H dos extratos POLd-12 (azul), VAL-4.1 (vermelho) e 12.1 (verde) (CDCl ₃ – 400 MHz).....	73
Figura 27 – Região expandida entre 3 - 9 ppm.....	73
Figura 28 – Rede molecular.....	75
Figura 29 – Toxicidade <i>in vivo</i> do extrato POLd-11 em larvas de <i>G. mellonella</i> após 72 horas de inoculação.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Metabólitos secundários com atuação no sistema enzimático antioxidante e com atividade antioxidante isolados do endófito <i>Lasiodiplodia</i>	23
Tabela 2 –	Massas dos extratos acetato de etila obtidas no processo fermentativo do fungo <i>Lasiodiplodia</i> sp.....	90
Tabela 3 –	Conteúdo de flavonoides totais dos extratos.....	45
Tabela 4 –	Resultados de teor de compostos fenólicos totais dos extratos.....	46
Tabela 5 –	Resultados de eliminação do radical DPPH dos extratos.....	47
Tabela 6 –	IC ₅₀ da neutralização do radical DPPH.....	48
Tabela 7 –	Resultados de redução de íons Fe ³⁺ dos extratos.....	50
Tabela 8 –	Resultados de eliminação do radical ABTS+● dos extratos.....	51
Tabela 9 –	IC ₅₀ da neutralização do radical ABTS+●.....	52
Tabela 10 –	Matriz utilizada no processamento estatístico de PCA levando em consideração os resultados dos ensaios antioxidantes.....	91
Tabela 11 –	Matriz autoescalada utilizada na análise de componentes principais.....	91
Tabela 12 –	Valores de <i>Loadings</i> na componente principal 1.....	58
Tabela 13 –	Matriz utilizada na análise de correlação de Pearson – Flavonoides.....	92
Tabela 14 –	Matriz utilizada na análise de correlação de Pearson – Fenóis.....	92
Tabela 15 –	Coefficiente de correlação de Pearson – Flavonoides e atividades antioxidantes.....	59
Tabela 16 –	Coefficiente de correlação de Pearson – Fenóis e atividades antioxidantes.....	59
Tabela 17 –	Deslocamentos químicos δ (ppm) e constantes de acoplamento J (Hz) para a substância 3-carboxi-2-metileno-4-heptanolida, em CDCl ₃ ; 9,4 T a 25 °C.....	61
Tabela 18 –	Deslocamentos químicos δ (ppm) e constantes de acoplamento J (Hz) para a substância ácido decumbico, em CDCl ₃ ; 9,4 T a 25 °C.....	62
Tabela 19 –	Similaridade de RMN dos extratos em estudo.....	65

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – IC ₅₀ DPPH.....	49
Gráfico 2 – IC ₅₀ ABTS+●.....	53
Gráfico 3 – Comparação das atividades antioxidante dos extratos.....	54
Gráfico 4 – Porcentagem da variância explicada de acordo com cada componente principal.....	55
Gráfico 5 – <i>Scores</i> PC1 versus PC2 – Considerando PC1 com 78,34% de variância explicada.....	57
Gráfico 6 – <i>Loadings</i> PC1 versus PC2– Considerando PC1 com 78,34% de variância explicada.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABTS	2,2'-Azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ABTS+●	Radical 2,2'-Azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
Al ³⁺	Íon alimínio
AlCl ₃	Cloreto de alumínio
aprox.	Aproximadamente
ATP	Adenosina trifosfato
BHA	2,3-terc-butil-4-hidroxianisol
BHT	2,6-diterc-butil- <i>p</i> -creso
BuOH	Butanol
¹³ C	Espectro de RMN de carbono
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CFT	Compostos fenólicos totais
COSY	¹ H- ¹ H – Espectroscopia de Correlação Homonuclear
Cu ²⁺	Íons cuprosos
1D	Uma dimensão
2D	Duas dimensões
<i>d</i>	Dupleto
Da	Dalton
DPPH	2,2-Difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazin-1-il
DPPH●	Radical 2,2-Difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazin-1-il
<i>dq</i>	Duplo quarteto
<i>dt</i>	Duplo tripleto
δ	Deslocamento químico
EAG	Equivalente ácido gálico
EC ₅₀	Concentração que induz metade do efeito máximo
EGCG	Epigallocatequina-galato
EM/EM	Espectro de massas/fragmentação
EQ	Equivalente quercetina

ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ESF	Equivalente sulfato ferroso
ET	Equivalente trolox
EtOH	Etanol
eV	Elétron-volt
F-C	Folin-Ciocalteu
Fe ²⁺ /Fe(II)	Íons ferrosos
Fe ³⁺ /Fe(III)	Íons férricos
FeSO ₄ ·7H ₂ O/FeSO ₄	Sulfato ferroso heptahidratado
FRAP	Potencial antioxidante redutora férrica
°C	Graus Celsius
G	Grama
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
¹ H	Espectro de RMN de hidrogênio
H ⁺	Íons hidrogênio
HCA	Análise hierárquica de cluster
Hidrogel-Las	Hidrogel contendo (1→6)-β-D-glucano - lasiodiplodan
HMBC	¹ H- ¹³ C – Correlação de Múltiplas Ligações Heteronucleares
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
HPLC/RMN	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à ressonância magnética nuclear
HSQC	¹ H- ¹³ C – Espectroscopia de Coerência Quântica Simples Heteronuclear
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentração inibitória média
J	Constante de acoplamento
K ⁺	Íons potássio
K ₂ HPO ₄	Fosfato dipotássico
K ₂ S ₂ O ₈	Persulfato de potássio
KCl	Cloreto de potássio

KNN	<i>k-Nearest Neighbors</i> (k-vizinhos mais próximos)
L	Litro
LB	Fator de alargamento lorentziano
LC/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LDA	Análise Discriminante Linear
LMA-número	Número de identificação do fungo na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria
µg	Micrograma
µM	Micromolar
µm	Micrometro
µmol	Micromol
µL	Microlitro
M	Multiplicidade
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Razão massa-carga
mg	Miligrama
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de magnésio heptahidratado
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmol	Milimol
Mo	Molibdênio
Mo ⁵⁺ /Mo ⁶⁺	Íons molibdênio
MS/MS	Espectrometria de massa em tandem
Na ⁺	Íons sódio
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaNO ₃	Nitrato de sódio
nm	Nanômetro
O-H	Ligação oxigênio-hidrogênio na hidroxila
OH•	Radical hidroxila
ORAC	Capacidade de absorção de radicais de oxigênio
%	Porcentagem

p. ex.	Por exemplo
PA	Para análise
PC	Componentes principais
PCA	Análise de componentes principais
pH	Potencial hidrogeniônico
PLS	Análise de Componentes Principais por Mínimos Quadrados Parciais
POLd-número	Extrato bruto do ponto ótimo - número = dias de fermentação do fungo <i>Lasiodiplodia</i> sp.
ppm	Partes por milhão
QS	<i>Quorum sensing</i>
r	Coefficiente de correlação de Pearson
RMN	Ressonância magnética nuclear
-SH	Grupos sulfidrila
SIMCA	Modelagem Independente Suave de Analogia de Classe
T	Tesla
TMS	Tetrametilsilano
TPTZ	2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos – São Paulo
UHPLC	Cromatógrafo Líquido de Ultra Alta Eficiência
V	Volts
VAL-número	Extrato bruto utilizado na validação do método de otimização do meio de cultivo do fungo <i>Lasiodiplodia</i> sp. - número = identificação do ensaio no planejamento fatorial completo 2 ³
W	Tungstênio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1	ESTRESSE OXIDATIVO.....	19
3.2	FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	20
3.3	SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES PRODUZIDAS PELO GÊNERO <i>Lasiodiplodia</i>	22
3.4	FLAVONOIDES, TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ENSAIOS ANTIOXIDANTES.....	26
3.5	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS.....	33
3.6	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE MISTURAS, SIMILARIDADE E DIFERENCIAL POR RMN.....	35
3.7	CRIAÇÃO DE REDES MOLECULARES UTILIZANDO A PLATAFORMA GNPS.....	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1	MATERIAL.....	39
4.2	MÉTODOS.....	39
4.2.1	Flavonoides, teor de compostos fenólicos totais e determinação das atividades antioxidantes.....	39
4.2.1.1	Flavonoides totais.....	39
4.2.1.2	Teor de compostos fenólicos totais.....	40
4.2.1.3	Neutralização do radical livre DPPH.....	40
4.2.1.4	Redução do ferro (FRAP).....	41
4.2.1.5	Método do ABTS+●.....	41
4.2.2	Análise de componentes principais e coeficiente de correlação de Pearson.....	42
4.2.3	Toxicidade <i>in vivo</i> em larvas de <i>Galleria mellonella</i> do extrato POLd- 11.....	42
4.2.4	Elucidação estrutural, similaridade e diferencial por ressonância magnética	

	nuclear.....	42
4.2.5	Análise dos extratos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS).....	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1	FLAVONOIDES, TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ENSAIOS ANTIOXIDANTES.....	45
5.1.1	Conteúdo de flavonoides.....	45
5.1.2	Teor de compostos fenólicos totais - Folin-Ciocalteu.....	46
5.1.3	DPPH.....	47
5.1.4	FRAP.....	50
5.1.5	ABTS+•.....	51
5.2	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	55
5.3	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL, SIMILARIDADE E DIFERENCIAL POR RMN.....	60
5.3.1	Elucidação estrutural de compostos presentes no extrato POLd-14.....	60
5.3.2	Similaridade e diferencial por RMN.....	64
5.3.3	Comparação entre espectros de RMN- ¹ H dos extratos estudados.....	69
5.4	REDE MOLECULAR.....	75
5.5	TOXICIDADE.....	76
6	CONCLUSÃO.....	79
	REFERÊNCIAS.....	81
	APÊNDICES.....	90

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos endofíticos são geralmente fungos e bactérias que vivem sistematicamente no interior das plantas, sem causar aparentemente danos aos seus hospedeiros (HARDOIM *et al.*, 2015; STIERLE; STIERLE, 2015). Eles surgem como uma possibilidade de substituição da utilização das plantas para obtenção de substâncias com atividades biológicas, uma vez que eles desenvolveram a capacidade de sintetizar compostos bioativos para as mais diversas aplicações e que são, muitas vezes, semelhantes ou idênticos aos de suas plantas hospedeiras ou mesmo completamente diferentes (UZMA *et al.*, 2018).

Dentre os microrganismos associados às plantas medicinais, os fungos vêm despertando admirável interesse pois apresentam grande potencial na produção de substâncias novas e bioativas e na descoberta de agentes (KHARWAR *et al.*, 2011; UMEOKOLI *et al.*, 2018) com propriedades úteis para uso agrícola, farmacêutico, medicinal e industrial (DE MEDEIROS *et al.*, 2018; DESHMUKH *et al.*, 2018). Destacando-se neste cenário o fungo endofítico do gênero *Lasiodiplodia* é capaz de produzir uma vasta gama de compostos orgânicos como, por exemplo, meleínas, depsídonas, jasmonatos, derivados fenólicos, indólicos e lactonas, entre outros, que apresentam importantes atividades biológicas, tais como: atividade antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória, entre outras (SALVATORE; ALVES; ANDOLFI, 2020).

Existe uma tendência ao isolamento e uso de fungos endofíticos de plantas medicinais para obtenção de compostos bioativos de importância terapêutica, considerando que cerca de 80% dos medicamentos naturais disponíveis no mercado são derivados diretamente ou inspirados em produtos de plantas medicinais e de endófitos (MAITRA *et al.*, 2022; SINGH; DUBEY, 2015).

Há um interesse crescente na triagem e quantificação de antioxidantes de amostras biológicas na busca por compostos naturais e eficazes no combate aos radicais livres e complicações patológicas (KOTHA *et al.*, 2022).

De acordo com estas evidências científicas, o trabalho de mestrado objetivou o estudo químico dos constituintes e avaliação da capacidade antioxidante dos extratos obtidos a partir do cultivo em condições otimizadas do fungo endofítico *Lasiodiplodia* sp., isolado da planta medicinal *Handroanthus impetiginosus* (ipê roxo) (MARIANO *et al.*, 2022).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação do potencial antioxidante e realização do estudo químico dos extratos acetato de etila (AcOEt) secos, provenientes do cultivo otimizado em modo estático em diferentes dias de crescimento do fungo endofítico *Lasiodiplodia* sp. isolado do ipê *Handroanthus impetiginosus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar o potencial antioxidante dos extratos brutos AcOEt;
- b) Realizar processamento dos resultados obtidos utilizando análises estatísticas de PCA e coeficiente de correlação de Pearson;
- c) Obter dados por similaridade e diferencial de RMN no sentido de correlacionar a composição química dos extratos brutos AcOEt nos diferentes períodos do cultivo do fungo;
- d) Identificar metabólitos secundários presentes nos extratos com atividade antioxidante, através da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear;
- e) Analisar os perfis químicos dos extratos brutos AcOEt por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas empregando a rede molecular da plataforma GNPS;
- f) Determinar a toxicidade *in vivo* do extrato POLd-11.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ESTRESSE OXIDATIVO

A produção de radicais livres é um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Sua presença, em proporções adequadas, possibilita a geração de energia (ATP), a fertilização de óvulos, a ativação de genes e a participação em mecanismos de defesa durante um processo de infecção. Porém, a produção excessiva desses radicais livres pode conduzir a danos oxidativos (BARBOSA *et al.*, 2010; POWERS *et al.*, 2020; VELLOSA *et al.*, 2021).

A geração contínua de radicais livres durante os processos metabólicos resultou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante, que tem como objetivo limitar os níveis de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de diferentes tipos de danos (BARBOSA *et al.*, 2010; POWERS *et al.*, 2020).

A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou diminuição da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas, cuja manifestação é o dano oxidativo contra células e tecidos (MAITRA *et al.*, 2022). O sincronismo da operação em questão tem importantes implicações sobre o processo de numerosas doenças crônicas não transmissíveis, entre elas o diabetes, a obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer (EBERT *et al.*, 2022). Lv *et al.*, (2021) em artigo de revisão, descreveram que a geração de radicais livres desencadeia eventos patológicos que, por sua vez, estão envolvidos em problemas cardiovasculares, carcinogênicos e neurodegenerativos.

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicaais. Tais ações podem ser alcançadas por meio de diferentes mecanismos de ação: impedindo a formação dos radicais livres ou espécies não-radicaais (sistemas de prevenção), impedindo a ação desses (sistemas varredores) ou, ainda, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo) (BARBOSA *et al.*, 2010; GULCIN, 2020).

Uma substância antioxidante, por definição, é uma substância capaz de impedir a oxidação, mesmo que em baixa concentração comparada ao substrato oxidável, minimizando ou inibindo a oxidação deste substrato. Do ponto de vista biológico, define-se antioxidante

como aqueles compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos negativos dos processos ou reações que levam à oxidação de moléculas ou estruturas celulares. Existem duas categorias que são classificadas como sistema de defesa antioxidante: enzimático e não-enzimático (GULCIN, 2020).

O sistema não-enzimático é constituído de várias substâncias biologicamente ativas contidas nos alimentos, como nos grãos, frutas e legumes. Dentre os antioxidantes presentes nos alimentos pode-se citar o ácido ascórbico (vitamina C), os tocoferóis (p. ex. vitamina E), polifenóis e terpenoides. Acredita-se que através de uma dieta rica nesses alimentos, que possuem funções antioxidantes, pode-se minimizar os danos da oxidação e assim a geração excessiva de radicais livres que acabam contribuindo para o aparecimento de diversas enfermidades (GULCIN, 2020; PREVEDELLO; COMACHIO, 2021).

O sistema de defesa enzimático engloba enzimas tais como superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase, dentre outras. As enzimas citadas, atuam por meio de métodos de prevenção, impedindo e controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicaais, produzidos na iniciação das reações em cadeia que resultam na amplificação e propagação do processo e assim na decorrência de danos oxidativos. Esses inibidores preventivos podem conduzir à decomposição de hidroperóxido para produtos inativados e os maiores exemplos desses inibidores são os tióis, sulfetos, catalases, peroxidases, glutathione peroxidase e transferase (CHIRINOS *et al.*, 2022; PREVEDELLO; COMACHIO, 2021).

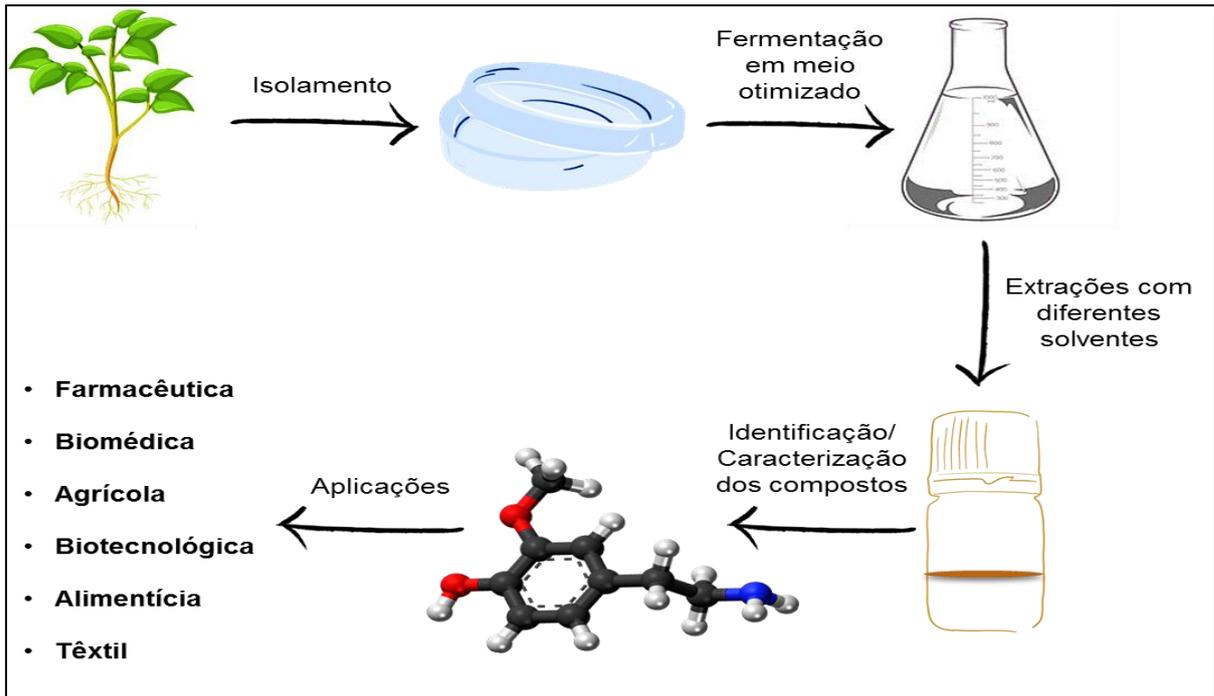
3.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Os microrganismos endofíticos são fungos e bactérias que colonizam e habitam o interior das plantas sem causar-lhes danos durante toda ou parte de sua vida, sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais como folhas, caules e ramos (TUFAIL *et al.*, 2022). Os endófitos exibem uma associação simbiótica com os tecidos da maioria das plantas, mas, em algum momento, do ciclo de vida da planta podem se tornar patogênicos (FADIJI; BABALOLA, 2020). Nas interações simbióticas, os microrganismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários, que podem conferir diversas vantagens à planta, como o aumento da tolerância a estresses abióticos, diminuição do ataque de herbívoros e insetos e controle de outros microrganismos (KOGEL; FRANKEN; HÜCKELHOVEN, 2006) em contrapartida, a planta garante ao endófito os nutrientes necessários à sua sobrevivência, abrigo e manutenção de novas gerações (ZHANG *et al.*, 2021).

Fungos endofíticos são grandes produtores de metabólitos secundários ativos e são ou podem ser influenciados por condições ambientais, tempo, temperatura, pH e nutrientes disponíveis. Esses metabólitos podem apresentar atividades antioxidantes, antibióticas, antitumorais, antifúngicas, citotóxicas, antivirais, antiparasitárias, entre outras. Os produtos naturais obtidos de endófitos incluem principalmente alcaloides, esteroides, terpenoides, isocumarinas, quinonas, fenilpropanoides, ligninas, fenóis e ácidos fenólicos, metabólitos alifáticos, lactonas, citocatalasinas, flavonoides, peptídeos e xantonas. Os endófitos surgem como fonte de novos produtos naturais para o desenvolvimento de novos medicamentos com maior eficácia e como forma de preservação de todos os tipos de plantas, incluindo as medicinais. Várias técnicas têm sido utilizadas para aprimorar a utilização de microrganismos para a produção de novos princípios ativos, reunindo o conhecimento em química, bioquímica, microbiologia, biologia molecular, biotecnologia e estatística (AMIRZAKARIYA; SHAKERI, 2022; DESHMUKH *et al.*, 2018; LACERDA; POLONIO; GOLIAS, 2022).

Pesquisas científicas estão sendo realizadas e utilizadas para o rastreamento de substâncias bioativas a partir de fungos endofíticos por ensaios biológicos, levando ao fracionamento, isolamento, purificação, identificação e caracterização desses compostos, podendo surgir a partir deste estudo um possível candidato a fármaco, enzimas de alto valor agregado e/ou substâncias químicas com propriedades relevantes. Desta forma, os metabólitos secundários produzidos por endófitos vêm despertando interesse, devido às suas aplicações em diversas áreas industriais incluindo a farmacêutica, biomédica, agrícola, biotecnológica, alimentícia, têxtil, entre outras (YAN *et al.*, 2018). Na **Figura 1** é possível observar as etapas envolvidas no estudo de metabólitos isolados a partir de microrganismos. Ao serem isolados, os fungos podem ser cultivados em meios de cultura sob agitação ou de forma estática. Além disso, estes meios podem ser otimizados para melhorar o rendimento de metabólitos alvo, produzidos pelo endófito ou para ativar novas vias metabólicas para produção de novas substâncias. Após a etapa de cultivo, o caldo poderá ser submetido às extrações com solventes orgânicos de diferentes polaridades, para separação ou enriquecimento dos compostos que foram produzidos. Técnicas analíticas podem ajudar na purificação e identificação desses compostos e na elucidação de novas estruturas químicas. Dentre elas, podem-se citar a ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas, cromatografia, infravermelho ou mesmo comparar com dados disponíveis na literatura (VASUNDHARA; KUMAR; REDDY, 2016).

Figura 1 – Etapas envolvidas no estudo de metabólitos secundários sintetizados por fungos endofíticos



Fonte: Do autor (2022).

3.3 SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES PRODUZIDAS PELO GÊNERO *Lasiodiplodia*

Lasiodiplodia é um gênero de fungos pertencentes a família Botryosphaeriaceae e compreende 31 espécies (DISSANAYAKE *et al.*, 2016). É característico das regiões tropicais e subtropicais e é capaz de colonizar, isoladamente ou em associação com outros fungos, ampla gama de hospedeiros, tais como cajueiro, mangueira, coqueiro, cupuaçuzeiro, aceroleira, maracujazeiro, dentre outros. Eles apresentam variadas formas de vida. Como endófitos habitam diferentes tecidos vegetais de forma assintomática; como patógenos, causam doenças em seus hospedeiros vegetais (DE SILVA *et al.*, 2019; NUR-SHAKIRAH *et al.*, 2022). Também, já foi descrito como um patógeno oportunista em humanos, causando infecções com diferentes níveis de gravidade (KANAUJIA *et al.*, 2022).

Vários estudos já demonstraram que o endófito *Lasiodiplodia* é capaz de sintetizar um número significativo de metabólitos secundários com atividades biológicas (SALVATORE; ALVES; ANDOLFI, 2020). Nesse contexto, a triagem de compostos com atividade antioxidante sintetizado pelo fungo *Lasiodiplodia* tornou-se um ponto de pesquisa imprescindível para descoberta e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos farmacológicos e não farmacológicos (SINGH; DUBEY, 2015). Na **Tabela 1** são descritas algumas substâncias isoladas do fungo do gênero *Lasiodiplodia* e suas atividades antioxidante

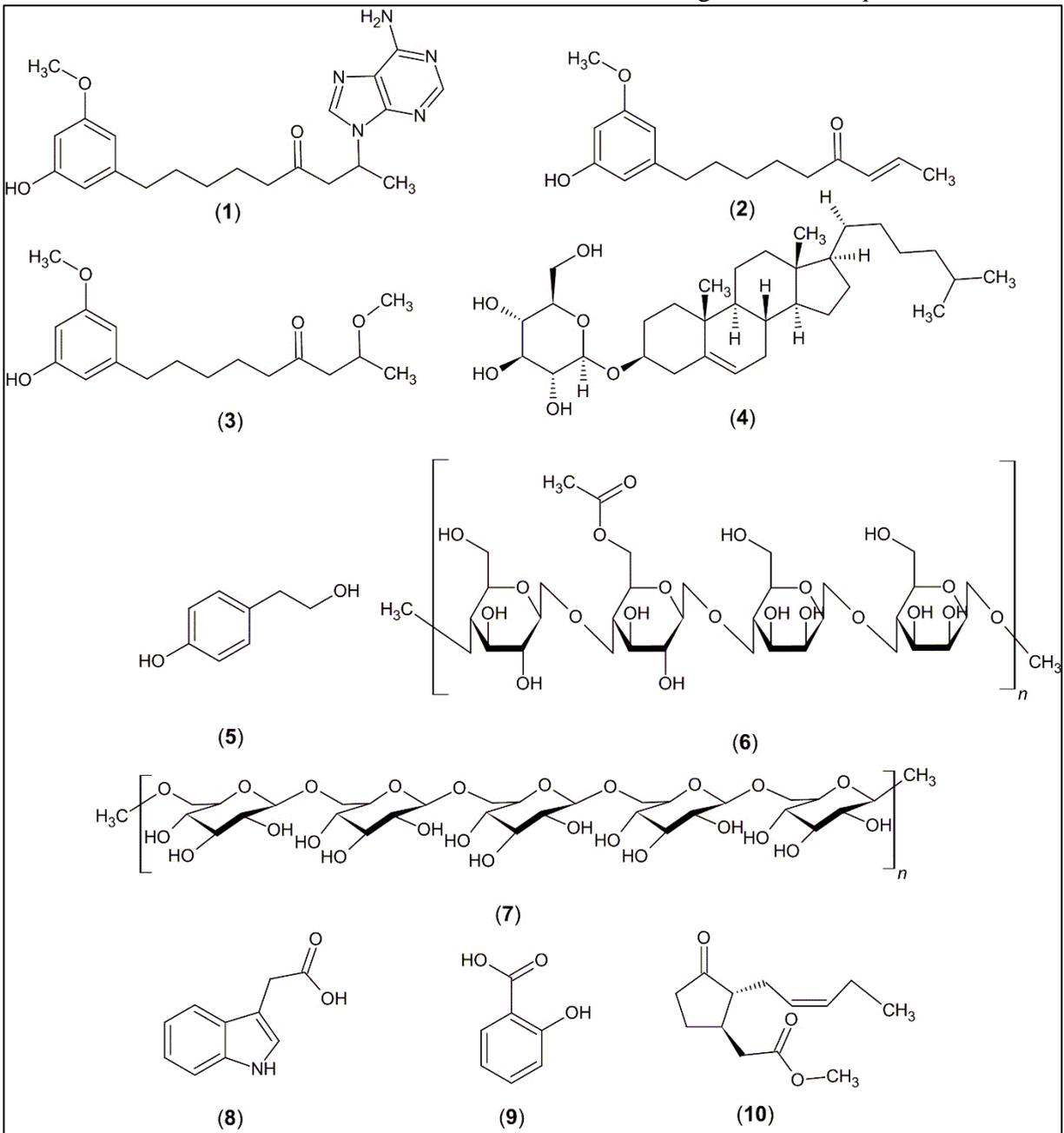
ou atuação no sistema enzimático antioxidante. Em seguida, na **Figura 2**, são apresentadas as estruturas químicas desses compostos.

Tabela 1 – Metabólitos secundários com atuação no sistema enzimático antioxidante e com atividade antioxidante isolados do endófito *Lasiodiplodia*

Espécie	Composto	Atividade	Referência
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Alquil resorcinol	Antioxidante	(GAO <i>et al.</i> , 2016)
<i>L. theobromae</i>	Colestanol glicosídeo	Antioxidante	(JINU; GINI; JAYABASKARAN, 2015)
<i>L. theobromae</i>	Tirosol	Antioxidante	(SALVATORE; ALVES; ANDOLFI, 2020)
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Lasiosan - Exopolissacarídeo – Glucomanano	Antioxidante	(KUMAR; MONGOLLA; POMBALA, 2018)
<i>L. theobromae</i>	(1→6)-β-D-glucano – Lasiodiplodan	Antioxidante	(NISSOLA <i>et al.</i> , 2021)
<i>L. theobromae</i>	Ácido indol-3-acético	Sistema enzimático antioxidante	(ESAN <i>et al.</i> , 2017)
<i>L. theobromae</i>	Ácido salicílico	Sistema enzimático antioxidante	(ESAN <i>et al.</i> , 2017)
<i>L. theobromae</i>	Metiljasmonato	Sistema enzimático antioxidante	(GAO <i>et al.</i> , 2021)

Fonte: Do autor (2022).

Figura 2 – Estrutura química dos metabólitos secundários com ação no sistema enzimático antioxidante e atividade antioxidante isolados do gênero *Lasiodiplodia*



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: (1) Adenina alquil resorcinol

(2 e 3) Alquil resorcinol

(4) Colestanol glicosídeo

(5) Tirosol

(6) Lasiosan - Exopolissacarídeo – Glucomanano

(7) (1→6)-β-D-glucano – Lasiodiplodan

(8) Ácido indol-3-acético

(9) Ácido salicílico

(10) Metiljasmonato

De acordo com a **Tabela 1**, os compostos bioativos antioxidantes e com ação no sistema enzimático antioxidante, isolados de espécies de *Lasiodiplodia* pertencem a diferentes classes químicas, como: fenóis, jasmonatos, alcaloide indólico, glicosídeos e polissacarídeos.

Segundo o trabalho de Gao e colaboradores (2016) os resorcinóis (**1**, **2** e **3**) foram avaliados e mostraram potente atividade antioxidante e maior capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC), apresentando 4,31; 2,95 e 4,25 μmol de equivalente Trolox/ μmol de amostra, respectivamente, comparado ao padrão epigallocatequina-galato (EGCG) 2,36 μmol de equivalente Trolox/ μmol de padrão (GAO *et al.*, 2016). A atividade antioxidante de (**4**) foi testada usando diferentes metodologias, este composto foi capaz de eliminar eficientemente o peróxido de hidrogênio, apresentando valor de $\text{IC}_{50} = 7,20 \mu\text{M}$ e radicais hidroxila com $\text{IC}_{50} = 3,60 \mu\text{M}$ (JINU; GINI; JAYABASKARAN, 2015). O tirosol (**5**), juntamente com o hidroxitirosol, são os compostos fenólicos mais presentes no azeite de oliva e são responsáveis pelas suas propriedades antioxidantes (SALVATORE; ALVES; ANDOLFI, 2020).

A atividade antioxidante *in vitro* de lasiosan (**6**) foi determinada com base na eliminação de radicais livres DPPH, ânions superóxido e radicais peroxil lipídicos. A inibição de radicais livres DPPH foi de $31,80 \pm 0,20\%$; $51,10 \pm 0,10\%$ e $64,60 \pm 0,26\%$ utilizando-se concentrações do composto igual a 20, 40 e 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. O EC_{50} para a atividade de eliminação de DPPH foi de $39,13 \pm 0,30 \mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto EC_{50} de ácido ascórbico foi de $40,28 \pm 0,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A atividade de eliminação do ânion superóxido foi de $64,45 \pm 0,07\%$ e $78,68 \pm 0,07\%$ nas concentrações de 40 e 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. O EC_{50} para lasiosan e ácido ascórbico foi de $31,01 \pm 0,06$ e $21,10 \pm 0,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A atividade inibitória do peróxido lipídico de lasiosan foi de $20,54 \pm 0,06\%$ e $43,65 \pm 0,08\%$ aos 40 e 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, e os respectivos valores de EC_{50} registrados para lasiosan e ácido ascórbico foram $97,37 \pm 0,50$ e $130,97 \pm 0,54 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (KUMAR; MONGOLLA; POMBALA, 2018).

Em estudos sobre a cicatrização de feridas foi possível observar que a cicatrização pode ser acelerada através do uso de antioxidantes. A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) causam um desequilíbrio entre os oxidantes e antioxidantes, resultando em lenta regeneração e cicatrização dos tecidos. Biomateriais para a produção de curativos com propriedades antioxidantes são úteis para reduzir os danos causados por espécies químicas reativas (LIANG *et al.*, 2022). Os β -glucanos têm despertado muito interesse no setor da indústria cosmética devido à suas propriedades bioativas e funcionais e na promoção da saúde da pele (MURPHY *et al.*, 2021). Um hidrogel contendo (1 \rightarrow 6)- β -D-glucano - lasiodiplodan (**7**) sintetizado por *L. theobromae* foi desenvolvido (hidrogel-Las) e seu

potencial de cicatrização de feridas foi avaliado. Técnicas de análises físico-químicas, microbiológicas, parâmetros de qualidade, potencial antioxidante e estabilidade da formulação foram empregadas na caracterização do hidrogel. O potencial antioxidante dos hidrogéis foi avaliado pelos seguintes testes: atividade de captura do radical DPPH, eliminação do radical hidroxila (OH•) e poder antioxidante redutor férrico (FRAP). A adição de lasiodiplodan no hidrogel promoveu a potencialização de sua atividade antioxidante, pois houve um aumento de 40,20% para 60,70% na capacidade de eliminar o radical OH• comparando o hidrogel-controle com o hidrogel-Las. De forma similar, lasiodiplodan contribuiu para aumentar a capacidade de eliminação de DPPH de 8,30% para 12,90% e aumentou o potencial redutor do íon férrico de 0,70 para 1,44 mmol.L⁻¹ equivalente de sulfato ferroso. Os autores do trabalho concluíram que a presença de antioxidantes em hidrogéis é uma vantagem na cicatrização de feridas, uma vez que substâncias antioxidantes auxiliam no controle do estresse oxidativo no local da ferida crônica, acelerando assim o processo de cicatrização (NISSOLA *et al.*, 2021).

Esan e colaboradores (2017) em estudo comparativo entre o ácido indol-3-acético (**8**) e ácido salicílico (**9**) utilizados no pré-tratamento de sementes de quiabo sob estresse salino, concluíram que com ácido indol-3-acético ou ácido salicílico, individualmente ou em combinação com NaCl, houve um estímulo à tolerância ao sal em relação ao quiabo e um aumento da capacidade de sequestro de radicais DPPH, através de um aumento na atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, que atenuaram os efeitos negativos das espécies reativas de oxigênio na planta (ESAN *et al.*, 2017). Já o metiljasmonato (**10**) exógeno melhorou a resposta de defesa e aliviou o dano do estresse salino aumentando a atividade da enzima antioxidase e o conteúdo antioxidante, bem como atuando no ajuste e reprogramação da distribuição de Na⁺ e K⁺ da planta *Nitraria tangutorum* (GAO *et al.*, 2021).

3.4 FLAVONOIDES, TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ENSAIOS ANTIOXIDANTES

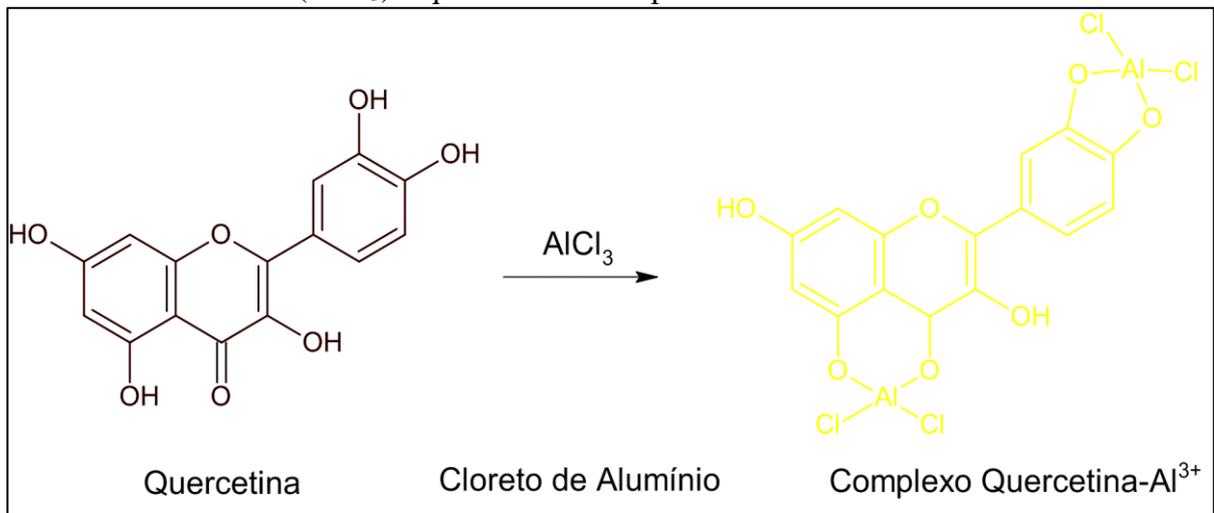
Os flavonoides são um grupo de compostos polifenólicos produzidos pelas plantas como metabólitos secundários. Os flavonoides são abundantes em frutas, vegetais e outras culturas alimentares, apresentando efeitos benéficos em várias doenças, bem como bioatividades anti-inflamatórias e antienvhecimento. A principal atividade biológica dos flavonoides que tem sido amplamente estudada é a sua atividade antioxidante. A atividade antioxidante dos flavonoides pode prevenir os danos causados pelos radicais livres, eliminando espécies reativas

de oxigênio, ativando enzimas antioxidantes, inibindo oxidases (por exemplo, xantina oxidase, ciclooxigenase, lipoxigenase e fosfoinositídeo 3-quinase) e reduzindo os radicais α -tocoferol. A atividade antioxidante dos flavonoides pode aumentar os níveis de ácido úrico, a atividade quelante de metais e aliviar o estresse oxidativo (SHEN *et al.*, 2022).

Diversas técnicas podem ser utilizadas para detecção e determinação de flavonoides em amostras, como cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, cromatografia em camada delgada, entre outras. No entanto, o método de quantificação de flavonoides por espectrofotometria é mais acessível, prático e de menor custo comparado a outros métodos, e devido às insaturações presentes nos anéis aromáticos, os flavonoides podem ser analisados na região do ultravioleta ou do visível (PEIXOTO *et al.*, 2012). Durante a reação (**Figura 3**), o íon alumínio (Al^{3+}) se complexa com as moléculas de flavonoides da amostra e forma um complexo flavonoide- Al^{3+} estável de coloração amarela, cuja intensidade é proporcional à concentração do flavonoide presente na amostra. Essa complexação promove um desvio para o vermelho e aumento da absorção em espectroscopia e pode ser quantificada sem ser afetada por outros compostos fenólicos presentes na amostra (HARESMITA; PRADANI, 2022).

A análise de flavonoides utilizando cloreto de alumínio apresenta algumas desvantagens significativas devido às simplificações e suposições inerentes ao método. Uma das principais limitações está relacionada à presunção de que todos os complexos formados durante o ensaio têm o mesmo comprimento de onda máximo e o mesmo coeficiente de extinção molar que o padrão utilizado. No entanto, na prática, essas características podem variar consideravelmente entre diferentes classes de flavonoides. Além disso, alguns flavonoides podem não formar complexos estáveis com o íon Al^{3+} . Isso significa que a metodologia pode não ser sensível o suficiente para detectar certas classes de flavonoides, resultando em uma subestimação da concentração total de flavonoides na amostra (SHRAIM *et al.*, 2021).

Figura 3 – Esquema ilustrado da complexação do flavonoide quercetina com cloreto de alumínio (AlCl_3) o qual forma o complexo estável flavonoide- Al^{3+}

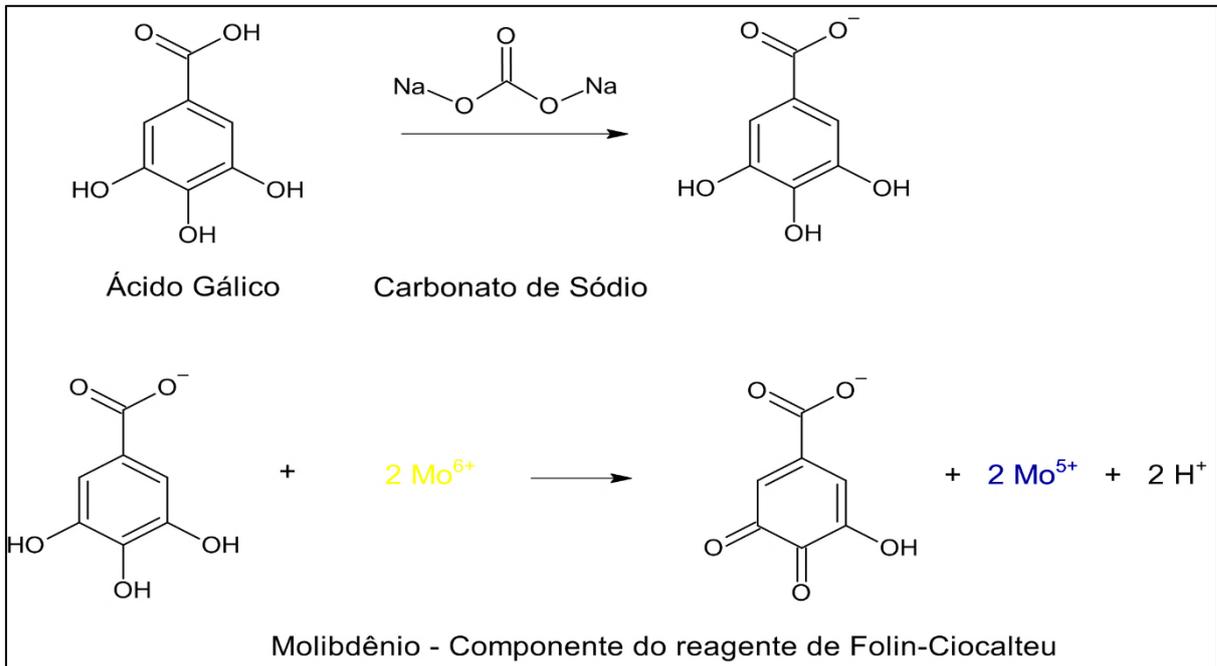


Fonte: Do autor (2023).

O ensaio de Folin-Ciocalteu (F-C) é usado para determinar o teor de compostos fenólicos totais (FT). Compostos fenólicos de valor quimiopreventivo e terapêutico são de interesse científico no tratamento de inúmeras doenças crônicas desde 1990 (BIBI SADEER *et al.*, 2020). Os principais contribuintes da capacidade antioxidante de amostras de frutas, vegetais, grãos ou plantas são os compostos fenólicos. O ensaio de Folin-Ciocalteu é um método colorimétrico baseado em reações de transferência de um único elétron entre o reagente F-C e compostos fenólicos (SÁNCHEZ-RANGEL *et al.*, 2013). Os compostos fenólicos são bons sequestradores de radicais de oxigênio, uma vez que o potencial de redução de elétrons de radical fenólico é menor do que os radicais de oxigênio e também, os radicais fenoxil são menos reativos quando comparados aos radicais de oxigênio. Assim, a eliminação de radicais reativos de oxigênio por compostos fenólicos cessa ainda mais reações oxidativas (AINSWORTH; GILLESPIE, 2007). No entanto, o ensaio F-C é inespecífico, uma vez que outras substâncias como açúcares redutores e ácido ascórbico, que são abundantes em extratos de alimentos vegetais, podem reduzir o reagente F-C, levando a resultados de teor de compostos fenólicos totais tendenciosos (AINSWORTH; GILLESPIE, 2007).

O reagente Folin-Ciocalteu é uma solução complexa de íons formados a partir de ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico, que são reduzidos a partir dos extratos com propriedades antioxidantes. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo-os a um complexo azul composto por Mo-W, juntamente com a adição de carbonato de sódio (**Figura 4**), podendo ser medido por espectrofotometria no comprimento de onda de 740 nm (GEORGE *et al.*, 2022).

Figura 4 – Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu



Fonte: Do autor (2022).

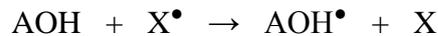
A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e sua estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (FLIEGER *et al.*, 2021; SOUSA *et al.*, 2007; STOIA; OANCEA, 2022).

Ensaio antioxidantes desempenham um papel importante em estudos de produtos naturais. No entanto, vários pesquisadores expressam preocupação sobre a confiabilidade dos ensaios *in vitro* existentes. Tais preocupações surgem principalmente da fraca correlação entre os resultados *in vitro* e *in vivo*. Além disso, ensaios *in vitro* têm o problema de reprodutibilidade e ainda não há uma padronização para expressão dos resultados. Até o momento, as capacidades antioxidantes são medidas usando um painel de ensaios em que cada ensaio tem suas próprias vantagens, limitações e mecanismo químico das reações (BIBI SADEER *et al.*, 2020).

Os ensaios de antioxidantes podem ser categorizados segundo suas vias mecanísticas (BIBI SADEER *et al.*, 2020; KOTHA *et al.*, 2022):

- a) Transferência de elétron - Os ensaios baseados em transferência de elétron envolvem uma reação redox (redução-oxidação) onde ocorre uma única transferência de elétron

entre o antioxidante e o substrato. Pertence a essa via de mecanismo os ensaios FRAP, ABTS+●, entre outros.



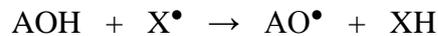
Onde: AOH – Antioxidante;

X[•] – Substrato;

AOH[•] – Radical inerte (estabilizado, não tem a capacidade de iniciar ou propagar processos oxidativos);

X – Espécie inativa.

- b) Transferência de átomo de hidrogênio - Nestes ensaios, um átomo de hidrogênio é transferido do antioxidante para o substrato. Ensaios como ORAC e DPPH encontram-se nesta categoria.



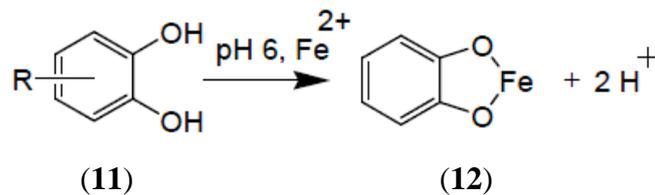
Onde: AOH – Antioxidante;

X[•] – Substrato;

AO[•] – Radical inerte;

XH – Espécie inativa.

- c) Ensaios baseados em reação ou quelação de metais de transição - Os antioxidantes (11) se ligam a metais de transição como Fe²⁺ (12) e Cu²⁺. A atividade quelante de íons ferrosos e íons cuprosos são exemplos desta categoria.

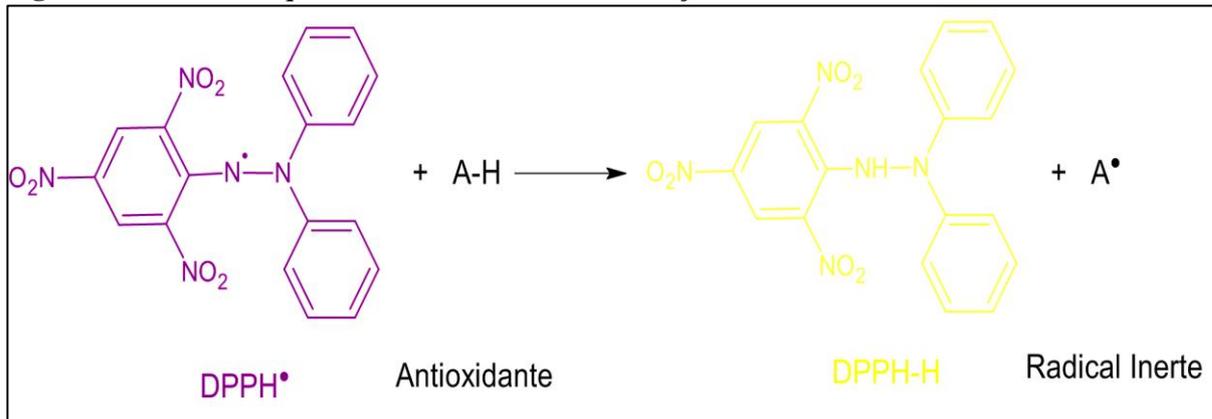


Os antioxidantes podem trazer benefícios para a melhoria da qualidade de vida, já que eles têm a capacidade de proteger um organismo dos danos causados pelos radicais livres, prevenindo ou adiando o início de várias doenças, como cardiovasculares, crônicas (câncer, artrite reumática, hipertrofia muscular) e neurodegenerativas (Mal de Alzheimer) (EBERT *et al.*, 2022; LV *et al.*, 2021). Uma das técnicas utilizada para detectar a presença de compostos antioxidantes, é um método baseado na eliminação ou neutralização do radical livre estável DPPH[•]. Este método é considerado fácil, preciso, rápido, simples e econômico, sendo adequado para a determinação da capacidade antioxidante de substâncias puras, misturas ou matrizes complexas.

O DPPH é um radical de nitrogênio orgânico, estável, de cor violeta e possui absorção máxima na faixa de comprimento de onda entre 515 – 520 nm. A redução do radical DPPH

ocorre na presença de um doador de hidrogênio ou elétron. Quando o radical DPPH recebe um átomo de hidrogênio proveniente de compostos antioxidantes, ocorre mudança de cor de roxo para amarelo. A intensidade de absorção, portanto, diminui, pois, a solução com o radical perde cor, de acordo com o número de elétrons capturados (IONITA, 2021). A equação que representa a captura do radical DPPH encontra-se na **Figura 5**.

Figura 5 – Estrutura química do radical DPPH e reação com um antioxidante

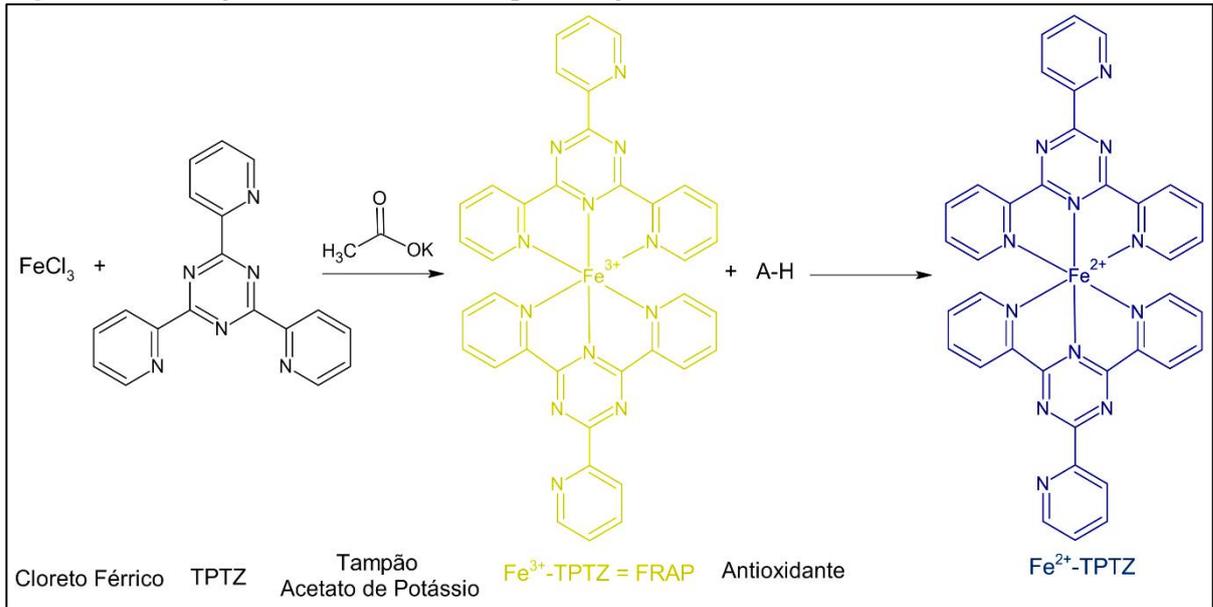


Fonte: Do autor (2022).

O método DPPH é bastante utilizado para avaliação da capacidade antioxidante, mas essa avaliação antioxidante não deve se basear apenas em uma única metodologia, sendo necessários outros métodos para caracterizar completamente um composto como antioxidante, como o método FRAP e ABTS+• (OLIVEIRA, 2015).

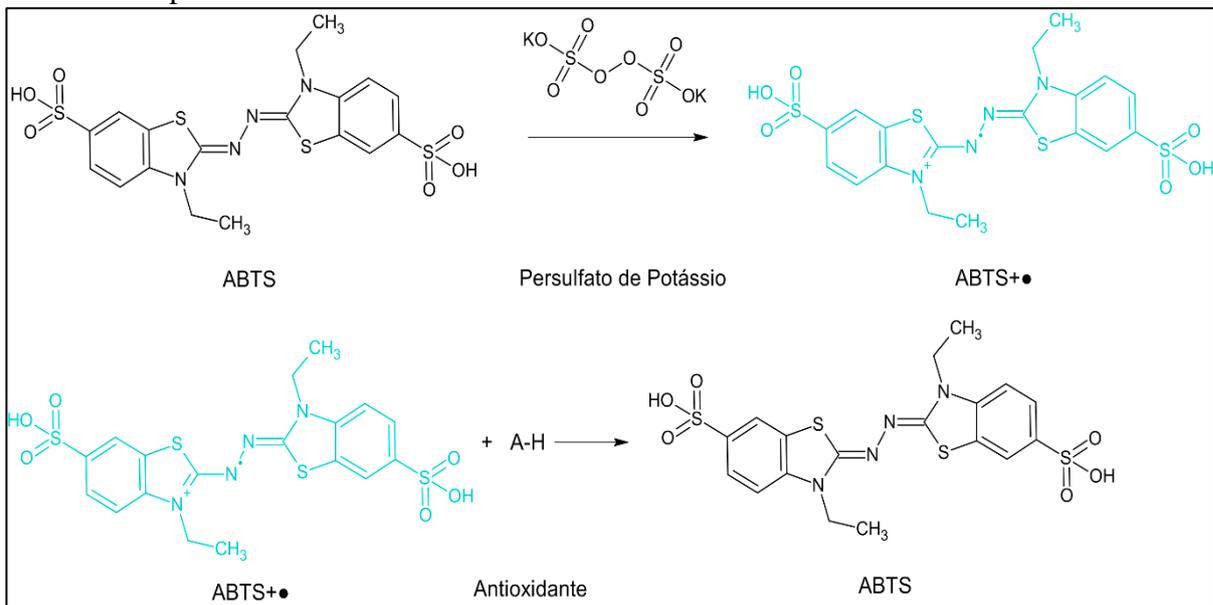
Um antioxidante que pode efetivamente reduzir os pró-oxidantes, pode não ser capaz de reduzir eficientemente o Fe³⁺. Um antioxidante é um redutor, mas um redutor não é necessariamente um antioxidante. Como relatado em muitos estudos, as atividades antioxidantes naturais estão intimamente relacionadas à prevenção de diversas enfermidades, devido sua capacidade de reduzir danos ao DNA, mutagênese, carcinogênese e inibição do crescimento de bactérias patogênicas (AKBARI *et al.*, 2022; GULCIN, 2020).

O potencial antioxidante segundo o método do FRAP se baseia em reações de transferência de elétrons. O complexo formado da solução de TPTZ com o Fe(III) cuja cor é amarelo ferrugem, na presença de um antioxidante, tem a capacidade de reduzir o ferro III a ferro II, dando origem ao [Fe(II)(TPTZ)₂]³⁺, de colocação azul escura, como indica a **Figura 6**, a leitura de absorbância deve ser realizada em 595 nm (RAMIREZ-GARCIA *et al.*, 2022).

Figura 6 – Redução do Fe(III) a Fe(II) pela adição de um antioxidante

Fonte: Do autor (2022).

O método ABTS baseia-se na geração do radical ABTS, de cor azul esverdeado após reação com o persulfato de potássio. A adição de um antioxidante, faz com que ocorra redução do $\text{ABTS}^{+\bullet}$ a ABTS, ocasionando perda de coloração do meio reacional, a qual passa de azul esverdeado para incolor, ocorrendo diminuição da absorbância. A leitura de absorbância deve ser realizada em 730 nm (WOŁOSIAK, R. *et al.*, 2022). A **Figura 7** apresenta a equação que representa um antioxidante reagindo com $\text{ABTS}^{+\bullet}$.

Figura 7 – Redução do $\text{ABTS}^{+\bullet}$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio

Fonte: Do autor (2022).

3.5 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

Quimiometria é uma área do conhecimento interfacial que extrai informações úteis de grandes conjuntos de dados químicos e bioquímicos usando diferentes métodos matemáticos e estatísticos (BROWN, 2017). Na química aplicada, o uso da quimiometria passou a ser difundido e reconhecido a partir de 1960 (BRERETON, 2014), não havendo dúvidas de que as ferramentas quimiométricas são de fundamental importância para resolver problemas da vida real (GRANATO *et al.*, 2018).

De acordo com Brereton (2015), os usuários de quimiometria tendem a “seguir a multidão” e usar indiscriminadamente os *softwares* disponíveis sem conhecer os princípios e fundamentos de cada método aplicado na sua análise de dados de pesquisa. Em estudos de química, a análise de componentes principais (PCA) e a análise hierárquica de clusters (HCA) são amplamente aplicadas como classificação não supervisionada, ou seja, de métodos para avaliar a associação entre compostos bioativos e propriedades funcionais *in vitro*, como por exemplo, antioxidante e inibição de enzimas (GRANATO *et al.*, 2018).

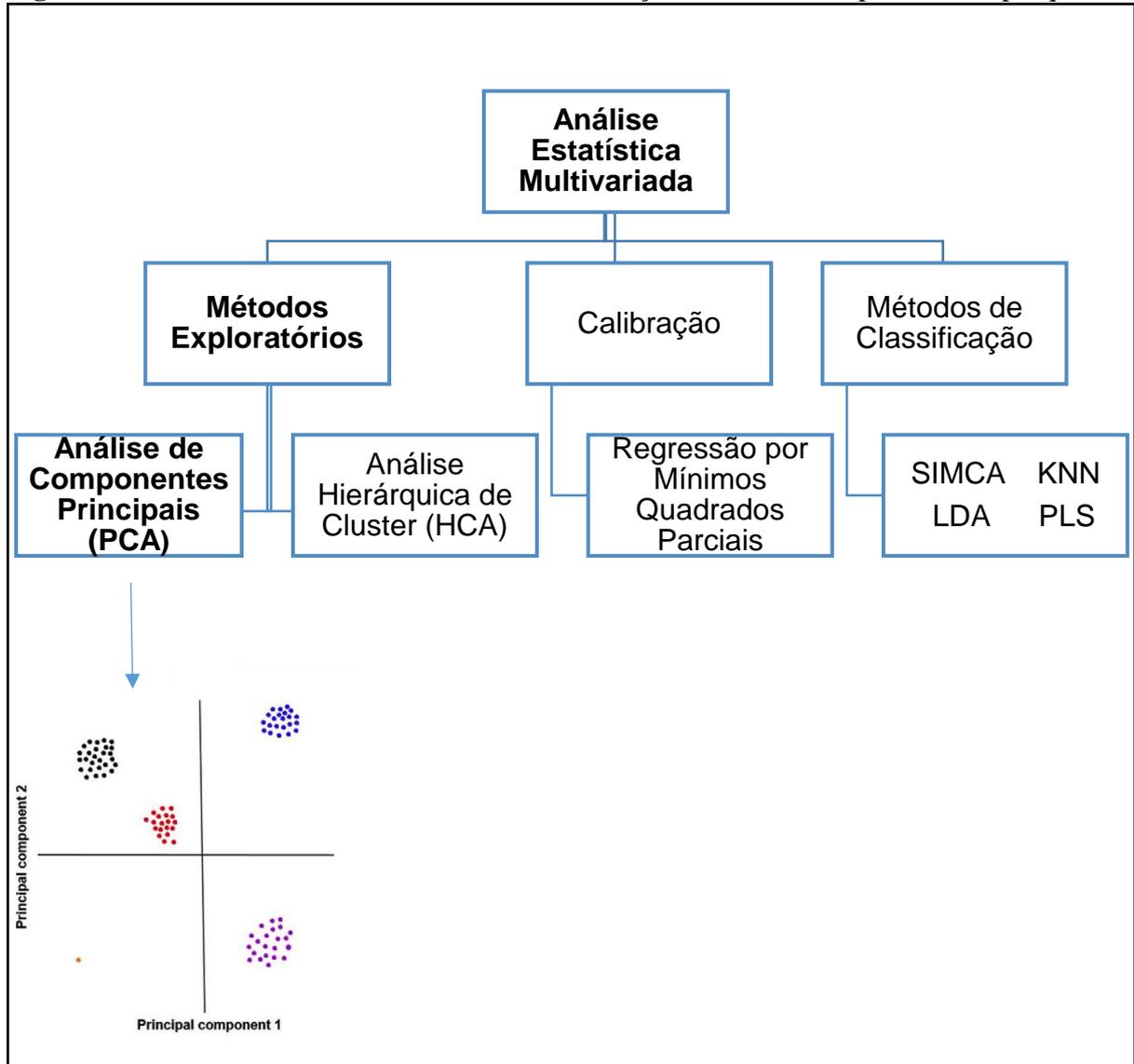
A análise multivariada de uma forma bem geral refere-se aos métodos estatísticos que analisam simultaneamente múltiplas medidas em cada indivíduo ou objeto sob investigação (GRANATO *et al.*, 2018). Nesse contexto, entre as técnicas multivariadas, a análise de componentes principais (**Figura 8**) é uma das técnicas estatísticas mais utilizadas na análise de dados em diversas áreas do conhecimento, como química, agronomia, zootecnia, ecologia, florestal, medicina, etc (BARRA *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2020; SAUZIER; VAN BRONSWIJK; LEWIS, 2021; TAHIR *et al.*, 2022).

A PCA transforma linearmente um conjunto original de variáveis, inicialmente correlacionadas entre si, num conjunto substancialmente menor de variáveis não correlacionadas que contém a maior parte da informação do conjunto original, isto é, consiste em transformar um conjunto de variáveis originais em outro conjunto de variáveis de mesma dimensão denominadas de componentes principais. Os componentes principais apresentam propriedades importantes: cada componente principal é uma combinação linear de todas as variáveis originais, são independentes entre si e estimados com o propósito de reter o máximo de informação, em termos da variação total contida nos dados (ANOWAR; SADAQUI; SELIM, 2021).

A técnica PCA pode ser utilizada para geração de índices e agrupamento de indivíduos. A análise agrupa os indivíduos de acordo com sua variação, isto é, os indivíduos são agrupados segundo suas variâncias, ou seja, segundo seu comportamento dentro da população,

representado pela variação do conjunto de características que define o indivíduo, ou seja, a técnica agrupa os indivíduos de uma população segundo a variação de suas características (ANOWAR; SADAoui; SELIM, 2021).

Figura 8 – Resumo da estatística multivariada e seleção dos métodos aplicados na pesquisa



Fonte: Adaptado de Granato *et al.*, 2018.

Legenda: SIMCA: Modelagem Independente Suave de Analogia de Classe

LDA: Análise Discriminante Linear

KNN: *k-Nearest Neighbors* (k-vizinhos mais próximos)

PLS: Análise de Componentes Principais por Mínimos Quadrados Parciais

3.6 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE MISTURAS, SIMILARIDADE E DIFERENCIAL POR RMN

A ressonância magnética nuclear (RMN) é a técnica mais amplamente utilizada pelos químicos para a determinação estrutural de compostos. É uma ferramenta versátil e sensível, mas tem um grande inconveniente: a análise de compostos em misturas complexas representa um desafio significativo devido à possibilidade de sobreposição de sinais, o que pode dificultar a interpretação dos espectros de RMN e, conseqüentemente, impedir a conclusão efetiva da elucidação estrutural. Porém, como muitos dos estudos propostos na área de produtos naturais e pela indústria são apresentados como misturas complexas, de difícil e demorada separação, um grande esforço por parte dos pesquisadores na área de RMN se dedica a elucidação estrutural de componentes individuais em misturas, para que assim estes possam ser identificados sem prévia purificação (YUAN *et al.*, 2021).

Os espectros de RMN costumavam ser usados principalmente como uma ferramenta para identificar compostos de amostras puras e não eram comumente aceitos como um meio adequado de identificar definitivamente constituintes em misturas. Na última década, os métodos espectroscópicos de RMN começaram a desempenhar um papel importante na identificação de compostos previamente desconhecidos em misturas complexas (EGAN *et al.*, 2021).

A identificação de compostos em misturas por RMN representa um diferencial importante neste trabalho, pois nem sempre é possível alcançar a purificação de substâncias devido ao acesso à tecnologia necessária ou à falta de uma quantidade mínima de amostra para isolar os compostos, além de ser um processo caro. Usar RMN para identificar compostos já conhecidos sem precisar isolá-los otimiza o tempo de purificação que é usado apenas quando necessário ou quando se trabalha com substâncias inéditas (WIST, 2017).

A similaridade é importante e amplamente utilizada na classificação em várias áreas, desde a taxonomia até a quimioinformática (MIRANDA-QUINTANA *et al.*, 2021). Apesar de seu uso generalizado em cromatografia e espectrometria de massa, suas utilizações em RMN são muito pouco exploradas (SCHRIPISEMA, 2019). Além disso, muitos métodos e cálculos têm sido usados para determinar a similaridade entre amostras, como proposto em trabalhos de Todeschini *et al.*, (2012) e Floris *et al.*, (2014). Uma maneira direta e clara de cálculo utilizado para semelhança, corresponde ao que duas séries de dados ou espectros têm em comum, sendo necessário que cada série some exatamente igual a 1 para se conseguir uma boa comparação. A

similaridade espectral pode ser usada para verificar a qualidade dos dados e auxiliar na interpretação dos resultados (SCHRIPSEMA, 2019).

Para os cálculos de similaridade e subsequente diferencial é importante que todos os espectros de RMN sejam processados da melhor forma possível, evitando variações no faseamento e na correção da linha de base (SCHRIPSEMA *et al.*, 2022). Para o alinhamento do espectro muito cuidado deve ser tomado porque um desvio no deslocamento químico indica alguma diferença na amostra, e essa diferença pode ser importante. Qualquer melhoria no alinhamento será refletida em melhor similaridade (SCHRIPSEMA, 2019). Deve-se lembrar que a similaridade calculada reflete qualquer diferença no conjunto de dados completo, portanto o cálculo da similaridade é extremamente útil para avaliação dos dados e pode ser utilizado em diferentes etapas como: a) verificação do alinhamento dos espectros, b) se há problemas com correção de fase ou linha de base, c) reprodutibilidade do experimento, d) se qualquer procedimento tenha sido realizado para melhorar os espectros na fase de pré-processamento, e) classificação das amostras (SCHRIPSEMA, 2019).

Estudos recentes mostraram que cálculos de similaridade entre espectros e espectroscopia diferencial de RMN facilitam a detecção de amostras suspeitas, com a possibilidade direta de identificar e quantificar impurezas ou componentes não declarados e os autores esperam que as técnicas possam ser eficazes no combate à falsificação e/ou adulteração de óleos vegetais, de medicamentos, de alimentos e de óleos essenciais (AUGUSTYN; VILJOEN; SCHRIPSEMA, 2021; DOS SANTOS RIBEIRO; DAGNINO; SCHRIPSEMA, 2021; SCHRIPSEMA *et al.*, 2022; SCHRIPSEMA, 2019; SCHRIPSEMA; DA SILVA; DAGNINO, 2022).

3.7 CRIAÇÃO DE REDES MOLECULARES UTILIZANDO A PLATAFORMA GNPS

A complexidade de certas amostras, como extratos de produtos naturais, torna o isolamento e a identificação de compostos uma tarefa desafiadora. A desreplicação é uma técnica rápida para identificar e comparar moléculas conhecidas ou novas sem a necessidade de seu isolamento e é uma alternativa eficiente para a análise de metabólitos secundários em matrizes complexas (CALDAS; ZIED; SARTORELLI, 2022).

Com o avanço da tecnologia, diferentes técnicas foram adotadas para a desreplicação. Dentre elas, destacam-se técnicas combinatórias como a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC/MS) e a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à ressonância magnética nuclear (HPLC/RMN). Associadas a essas tecnologias, as

plataformas de processamento de dados online têm servido como ferramentas importantes na desrepliação. A *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) é uma plataforma on-line de livre acesso baseada em dados de espectrometria de massas para identificação de compostos e redes moleculares. Os dados de entrada são analisados na plataforma e espectros de massas semelhantes são vinculados para formar uma rede molecular. Além disso, há também uma biblioteca virtual para identificação de moléculas com base em sua semelhança espectral com bancos de dados (PILON *et al.*, 2021).

A plataforma GNPS organiza os espectros adquiridos e os classifica com base na similaridade que é calculada usando uma medida de cosseno modificada. Para cada espectro é atribuído um vetor espectral e dado dois vetores espectrais podem-se calcular o vetor entre eles e este fornece o cosseno de similaridade entre os espectros. O valor de cosseno varia entre 0 e 1, sendo mais próximo de 1 indicando maior similaridade e mais próximo de 0 indicando maior diferença espectral (ARON *et al.*, 2020).

Além do valor de cosseno, os espectros do banco de dados também são classificados de acordo com a qualidade dos dados e a confiabilidade dessas anotações. Existem três categorizações dos dados: ouro, prata e bronze, sendo que ouro indica espectros de estruturas sintetizadas, com caracterização estrutural completa por RMN e outros métodos padrão, garantindo alta confiabilidade. Prata engloba dados de estruturas isoladas ou anotadas em extratos brutos obtidos a partir de publicações científicas. Enquanto a categoria bronze inclui espectros com caracterização incompleta ou não referendados por uma publicação científica. Níveis de ouro e prata só podem ser atribuídos por membros autorizados e treinados pela equipe responsável pela plataforma, enquanto classificações bronze também podem ser promovidas ao passar por uma análise e preencherem os requisitos necessários (PILON *et al.*, 2021).

Do ponto de vista de aplicação, a rede molecular representa um mapa químico onde substâncias que possuem espectros de EM/EM semelhantes estão agrupados em *clusters*. Além disso, é possível enriquecer com anotações de dados espectrais de padrões internos, *in silico* e bibliotecas, dados de atividade biológica, entre outros, para assim ajudar na visualização da composição química de compostos conhecidos e evidenciar os desconhecidos, podendo assim, guiar para o isolamento de novas substâncias ou substâncias com potencial biológico (**Figura 9**) (ARON *et al.*, 2020; KANG *et al.*, 2019; RAMOS *et al.*, 2019).

Em trabalho, Pellissier *et al.*, (2021) utilizaram a plataforma GNPS para compreender a especificidade e modulação da atividade no que diz respeito às estruturas presentes nos extratos de *Lasiodiplodia venezuelensis* na fração acetato de etila e na fração aquosa. Os compostos **13**, **14** e **15** foram localizados e identificados na rede molecular em um aglomerado

contendo derivados de pirano e piranona. Os autores concluíram que as moléculas ativas de baixo peso molecular **14** e **15**, são capazes de atuar em múltiplos alvos em sistemas QS (*quorum sensing*) de *Pseudomonas aeruginosa*, um patógeno de grande importância devido à sua multirresistência a uma ampla gama de antibióticos, uma vez que, essas duas pequenas moléculas representam um interessante farmacóforo inicial para o desenvolvimento de modelos de medicamentos mais eficazes contra *P. aeruginosa* (PELLISSIER *et al.*, 2021).

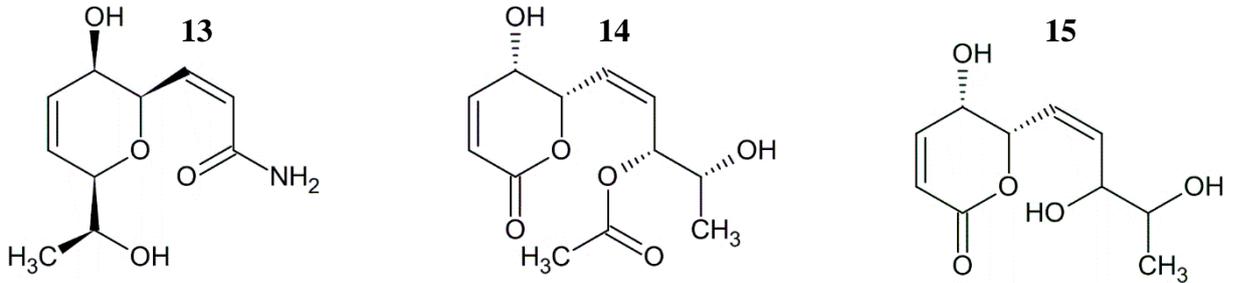
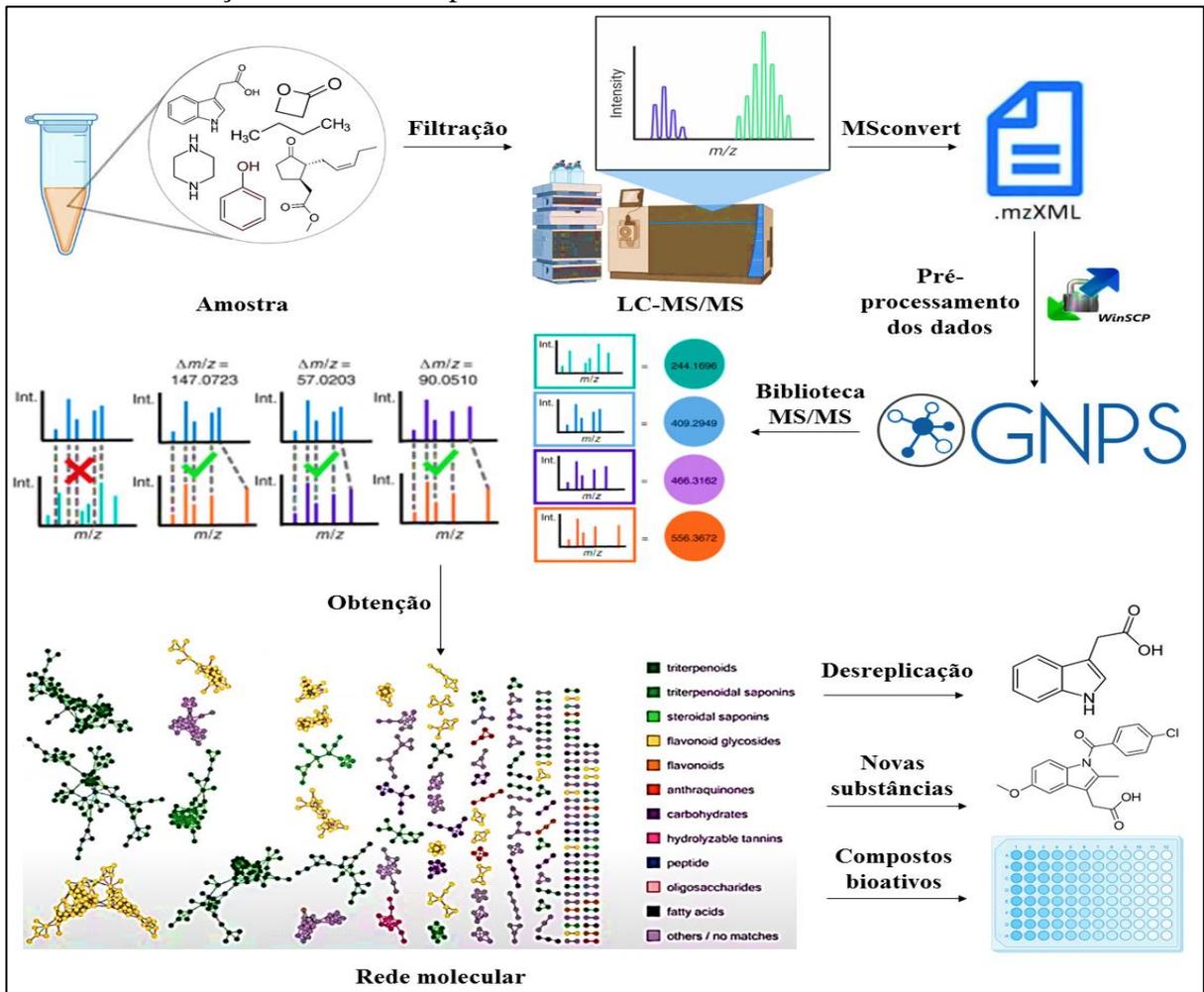


Figura 9 – Esquema metodológico para obtenção da rede molecular seguido de desreplicação, obtenção de novos compostos e biomoléculas



Fonte: Do autor (2023).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Foram utilizados 14 extratos, obtidos a partir de extrações com acetato de etila, após o cultivo em modo estático do fungo *Lasiodiplodia* sp., sendo 12 extratos (POLd) cultivados em meio Czapek otimizado em diferentes dias de crescimento do fungo, alcançado através de um planejamento fatorial completo 2^3 , incluindo 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios. As variáveis independentes foram a concentração da fonte de carbono - sacarose e glicose e a concentração da fonte de nitrogênio - NaNO_3 . Sendo utilizados na validação do método de otimização os extratos (VAL) dos ensaios 4 e 12 (MOREIRA *et al.*, 2022). Os extratos foram obtidos anteriormente pela discente de mestrado do curso de Biotecnologia Dajara Moana Barbosa Moreira (APÊNDICE A).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Flavonoides, teor de compostos fenólicos totais e determinação das atividades antioxidantes

O conteúdo de flavonoides e fenóis totais foi quantificado empregando-se os métodos espectrofotométricos de cloreto de alumínio e Folin-Ciocalteu, respectivamente, e a avaliação da atividade antioxidante foi realizada através dos métodos: DPPH e ABTS+• (efeito neutralizante de radicais livres) e FRAP (capacidade de redução de íons Fe^{3+}). Os extratos AcOEt utilizados nestes experimentos foram preparados nas concentrações de 0,25 – 5,00 mg.mL^{-1} , como solvente foi utilizado etanol PA. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro com leitora de microplacas Biochrom® modelo Asys UVM 340.

4.2.1.1 Flavonoides totais

O conteúdo de flavonoides foi determinado de acordo com o método colorimétrico apresentado por Meda *et al.*, (2005). As amostras foram diluídas na proporção de 1 mg.mL^{-1} (POLd-4, 7 e 8) e os demais extratos 5 mg.mL^{-1} em etanol. Um volume de 100 μL de amostras ou padrões de quercetina e 100 μL de uma solução 2% (p/v) de AlCl_3 em metanol foram adicionados a uma microplaca de 96 poços. A composição foi deixada em repouso por 10

minutos, em seguida a absorvância foi lida no comprimento de onda de 415 nm. O branco foi obtido usando 100 μL de etanol juntamente com 100 μL de AlCl_3 em 2% em metanol. Para determinar o teor de flavonoides, foi utilizada uma curva padrão de quercetina em concentrações entre 3,00 – 25,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em etanol. Os resultados obtidos foram expressos em microgramas de equivalente de quercetina por mg de extrato.

4.2.1.2 Teor de compostos fenólicos totais (CFT)

O teor de compostos fenólicos totais presentes nos extratos foi determinado a partir da metodologia descrita por Halagarda e colaboradores (2020), utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. Para a realização do experimento foi utilizada uma placa de 96 poços. Em cada micropoço da placa foram adicionados 20 μL dos extratos derivados do cultivo do fungo com concentrações de 0,50 mg.mL^{-1} , padrões de ácido gálico (20 – 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), branco (água) ou controle (etanol) mais reagente Folin-Ciocalteu 10% (100 μL) e solução de carbonato de sódio à 7,50% (75 μL), que foram homogeneizados e deixados em repouso ao abrigo da luz durante 40 minutos, com posterior leitura no comprimento de onda de 740 nm. Os dados obtidos foram utilizados para estimar as concentrações de CFT, a partir da curva de calibração com os padrões de ácido gálico, sendo os resultados expressos em microgramas de equivalência de ácido gálico por mg de amostra.

4.2.1.3 Neutralização do radical livre DPPH

Para análise de eliminação de radicais DPPH foi utilizada a metodologia descrita por Becker *et al.* (2019). Foram pipetados e inseridos em cada poço de uma placa de 96 poços, 66 μL dos extratos preparados nas concentrações de cerca de 0,50 mg.mL^{-1} e 134 μL de DPPH 150 μM . Para o controle foi necessário pipetar 66 μL de etanol ao invés do extrato. O branco foi preparado com etanol (200 μL). Os reagentes foram homogeneizados e mantidos em contato por 45 minutos ao abrigo da luz. A microplaca foi inserida no leitor em 517 nm. A atividade antioxidante foi expressa em equivalentes ao Trolox por grama de extrato ($\mu\text{molET/g}$ de extrato), através da equação da reta obtida da curva de calibração. A curva foi construída plotando-se a concentração de Trolox (20 – 100 μM) no eixo x e a absorvância no eixo y.

A concentração efetiva dos extratos necessária para inibição do radical DPPH em 50% (IC_{50}) foi obtida por análise de regressão não linear logarítmica através da plotagem da curva dose-resposta entre % de neutralização do DPPH e concentrações dos extratos 0,25; 0,50; 1,00;

3,00 e 5,00 mg.mL⁻¹. A atividade antioxidante, em %, foi calculada utilizando-se a equação abaixo (Equação 1):

Equação 1:

$$AA(\%) = \left(1 - \frac{Aa}{Ac}\right) * 100$$

Onde: AA(%): Atividade Antioxidante em %

Aa: Absorbância da amostra

Ac: Absorbância do controle

4.2.1.4 Redução do ferro (FRAP)

Em cada poço da microplaca foi adicionado 20 µL dos extratos (aprox. 0,50 mg.mL⁻¹), padrões de sulfato ferroso (100 – 700 µM) ou de água para o branco, mais 30 µL água destilada e 200 µL do reagente FRAP, preparado no momento da análise. Após incubação à 37 °C, durante 8 minutos, a microplaca de 96 poços foi inserida no equipamento e realizada a leitura no comprimento de onda de 595 nm, segundo a metodologia descrita por Sethi *et al.* (2020). A atividade antioxidante foi determinada em equivalentes ao sulfato ferroso, por meio da equação da reta obtida da curva de calibração, sendo os valores expressos em micromol de equivalência de FeSO₄ por grama de extrato fúngico.

4.2.1.5 Método do ABTS+●

A determinação da capacidade antioxidante pelo método ABTS+● foi realizada segundo metodologia descrita por Becker *et al.* (2019). Em cada poço da microplaca adicionou-se: 20 µL dos extratos com concentrações próximas a 0,50 mg.mL⁻¹, padrões de Trolox entre 12,50 e 200 µM ou etanol para controle; 220 µL de solução do radical ABTS ajustada com absorbância de 0,70 ± 0,02. Os brancos eram constituídos apenas por 240 µL de tampão fosfato (curva de calibração) e etanol (amostras). A placa com os meios reacionais foi mantida por 6 minutos ao abrigo da luz e realizada a leitura no equipamento em comprimento de onda de 730 nm. A atividade antioxidante foi expressa em µmolET/grama de extrato, através da equação da reta obtida da curva de calibração.

A concentração efetiva dos extratos necessária para inibição do radical ABTS+● em 50% (IC₅₀) foi obtida por análise de regressão não linear logarítmica através da plotagem da curva dose-resposta entre % de neutralização do ABTS+● e concentrações dos extratos 0,25;

0,50; 1,00; 3,00 e 5,00 mg.mL⁻¹. A atividade antioxidante, em porcentagem, foi calculada utilizando-se a Equação 1.

4.2.2 Análise de componentes principais e coeficiente de correlação de Pearson

A análise de componentes principais foi realizada utilizando-se como matriz os resultados das atividades antioxidantes (DPPH, FRAP e ABTS+●) e as rotinas *help data_pre* para autoescalamiento dos dados (média = 0, desvio padrão e variância = 1) e *help pca_dis* para análise estatística, operando no programa Octave (GUI) 6.1.

O teste escolhido para medir a relação estatística entre as variáveis, conteúdo de flavonoides, teor de compostos fenólicos totais e atividades antioxidantes foi o coeficiente de correlação linear de Pearson, os resultados obtidos foram organizados em planilhas no *software* Excel 2013 e sobre estes foi aplicada a fórmula para obtenção da correlação.

4.2.3 Toxicidade *in vivo* em larvas de *Galleria mellonella* do extrato POLd-11

Para o estudo de toxicidade *in vivo* foi utilizado o protocolo de Scorzoni *et al.* (2013) com modificações, para avaliar a toxicidade do extrato POLd-11 em larvas de *G. mellonella*. Foram usadas 10 larvas para cada concentração testada do extrato (12,50; 25; 50; 100 e 200 µg.mL⁻¹) e para os controles água destilada estéril e solvente (etanol 50%), as larvas selecionadas pesavam entre 0,2000 e 0,3000 g e foram alocadas em placas de Petri, as que apresentavam alterações de cor, como manchas escuras ou com melanização aparente, foram descartadas. 10 µL das soluções do extrato POLd-11 e controles foram aplicados na última pró-pata direita das larvas usando uma seringa Hamilton de 1 mL. Após a inoculação, as larvas foram incubadas a 37 °C no escuro. A morte larval foi monitorada por 24, 48 e 72 horas pela inspeção visual da cor (marrom - marrom escuro) e ausência de movimento ao toque.

4.2.4 Elucidação estrutural, similaridade e diferencial por ressonância magnética nuclear

No Departamento de Química da UFSCar foram obtidos os espectros (para quatorze extratos) de RMN- ¹H e os espectros bidimensionais (para o extrato POLd-14) COSY (¹H-¹H – Espectroscopia de Correlação Homonuclear), HMBC (¹H-¹³C – Correlação de Múltiplas Ligações Heteronucleares) e HSQC (¹H-¹³C – Espectroscopia de Coerência Quântica Simples Heteronuclear); registrados no equipamento operando com 9,4 T, marca Bruker, modelo

AVANCE III, equipado com uma sonda criogênica de 5 mm e mantida a temperatura de 25 °C em todo o experimento, usando o TMS como padrão interno e CDCl_3 como solvente deuterado.

Os espectros de RMN 1D e 2D do extrato POLd-14 foram processados no programa TopSpin 4.1.4, com a finalidade de se identificar substâncias presentes no extrato.

Para a análise de similaridade/diferença, o processamento de todos os espectros de RMN- ^1H adquiridos, foi usado o programa SpinWorks 4. Durante a análise dos espectros a função de LB (fator de alargamento lorentziano) foi trabalhada em 0,3 Hz para melhorar a resolução, foi realizado o ajuste das fases até obtenção de picos simétricos e uma boa linha de base contínua. Além disso, calibrou-se os espectros para o TMS em 0 ppm e foi executada a correção da linha de base utilizando o método dos mínimos quadrados, por fim, os espectros foram salvos como arquivos XY, os mesmos foram alinhados e para calcular a similaridade foi selecionado o intervalo de deslocamento químico de -0,5 a 12,0 ppm, operando o programa PowerShell com rotinas já estabelecidas, transferindo os resultados obtidos para planilhas do Excel, onde pode-se obter também os espectros de RMN diferencial dos extratos.

4.2.5 Análise dos extratos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS)

Para análise de LC/MS os extratos e padrões (ácido gálico - fenol, quercetina – flavonoide e cumarina – lactona) foram preparados na concentração de 1 mg.mL^{-1} utilizando como solvente o metanol. Vale ressaltar que todos os solventes utilizados neste experimento eram grau HPLC.

Os analitos extraídos foram determinados utilizando um sistema de cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC) modelo LC/MS 8030 equipado com um analisador de massas triplo-quadrupolo Shimadzu. O sistema era formado por 2 bombas LC-20AD um auto injetor SIL-20 AHT e uma coluna C18 Waters Spherisorb ($3 \mu\text{m}$) de 4,6 mm por 150 mm. O *software* para a aquisição e tratamento dos dados foi o LabSolution. Para a separação, o método gradiente foi utilizado, tendo como fase móvel acetonitrila (ACN) com 1,0% ácido fórmico e água Milli-Q com 1,0% ácido fórmico, num fluxo total de $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$. Primeiramente de 0,01 a 10,00 min manteve-se a proporção ACN em 20% e de água acidificada em 80% constante, em seguida, aumentou-se para 40% em 10 min, posteriormente, aumentou-se para 60% de ACN em 20 min, mantendo-se essa concentração constante por mais 10 min, e em seguida aumentou-se para 100% ACN em 30 min, mantendo essa concentração constante por 10 min. Por último retornou-se à condição inicial com 20% de ACN e 80% de água acidificada, mantendo

constante por 15 min. O tempo de corrida total foi de cerca de 55 – 60 min. Foram injetados 1,0 μL de cada extrato e a temperatura da coluna foi mantida em 40 °C.

Primeiramente foi realizado um *full scan* no modo positivo e no modo negativo de todos os extratos, sendo monitorados compostos com m/z entre 100 e 1200 Da, com o intuito de selecionar os íons precursores de cada composto, e em seguida, fragmentá-los. Para seleção dos íons precursores, foi utilizado como critério picos que apresentassem boa resolução.

Após a seleção dos íons precursores, as amostras foram novamente injetadas, no modo Product Ion Scan com o intuito de obter a fragmentação (MS/MS) de cada íon precursor selecionado, utilizando como energia de ionização 30 eV. Em seguida, os dados obtidos foram analisados na plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS), que possibilitou a criação de redes moleculares, que são capazes de agrupar espectros baseados em suas similaridades espectrais, facilitando a análise dos dados e a identificação das possíveis classes dos compostos pertencentes aos extratos (PILON *et al.*, 2021). Primeiramente os dados foram convertidos para o formato mzXML utilizando o *software* MSConvert e em seguida, os arquivos foram submetidos ao fluxo de trabalho do GNPS utilizando o *software* WinSCP.

As redes moleculares foram criadas utilizando os parâmetros gerais a seguir: os dados foram filtrados removendo todos os íons fragmento MS/MS dentro de +/- 17 Da do precursor m/z . Os espectros de MS/MS foram filtrados por janela, escolhendo apenas os 6 principais íons de fragmento na janela de +/- 50 Da em todo o espectro. A tolerância da massa do íon precursor foi ajustada para 2,0 Da e uma tolerância do íon fragmento MS/MS de 0,50 Da. Uma rede foi então criada onde as bordas foram filtradas para ter uma pontuação de cosseno acima de 0,70 e mais de 6 picos correspondentes. Além disso, as arestas entre dois nós foram mantidas na rede se e somente se cada um dos nós aparecesse nos respectivos 10 principais nós mais semelhantes. Finalmente, o tamanho máximo de uma família molecular foi fixado em 100, e as arestas de menor pontuação foram removidas das famílias moleculares até que o tamanho da família molecular estivesse abaixo desse limiar. Os espectros na rede foram então pesquisados nas bibliotecas espectrais do GNPS. Os espectros da biblioteca foram filtrados da mesma maneira que os dados de entrada. Todas as correspondências mantidas entre espectros de rede e espectros de biblioteca deveriam ter uma pontuação acima de 0,70 e pelo menos 6 picos correspondentes (WANG *et al.*, 2016). Após a sua criação, elas foram importadas para o *software* Cytoscape 3.10.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 FLAVONOIDES, TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ENSAIOS ANTIOXIDANTES

Neste trabalho, os extratos obtidos a partir do cultivo do fungo *Lasiodiplodia* sp. foram avaliados em relação ao conteúdo de flavonoides, teor de compostos fenólicos totais - Folin-Ciocalteu e à atividade antioxidante pelos métodos: DPPH, FRAP e ABTS+●.

5.1.1 Conteúdo de flavonoides

Os teores de flavonoides totais obtidos são mostrados na **Tabela 3**. Os maiores conteúdos de flavonoides totais foram de 6,57; 5,11 e 4,70 µg equivalente quercetina por mg de extrato para as amostras POLd-4, POLd-7 e POLd-8, respectivamente. Segundo Trantas e colaboradores (2015), dentre os polifenóis, os flavonoides, em particular possuem estruturas ideais para o sequestro de radicais livres e, por isso, são considerados antioxidantes efetivos.

Tabela 3 – Conteúdo de flavonoides totais dos extratos

Extratos	Teor de Flavonoides no micropoço expressa em equivalente Quercetina (µg.mL ⁻¹)	Teor de Flavonoides da amostra expressa em equivalente Quercetina (µg/mg de extrato)
POLd-4	6,57	6,57
POLd-5	11,84	2,37
POLd-6	19,13	3,83
POLd-7	5,11	5,11
POLd-8	4,70	4,70
POLd-9	17,53	3,51
POLd-10	15,09	3,02
POLd-11	21,55	4,31
POLd-12	15,95	3,19
POLd-13	20,14	4,03
POLd-14	11,71	2,34
POLd-15	15,19	3,04
VAL-4.1	10,50	2,10
VAL-12.1	11,97	2,39

Fonte: Do autor (2023).

Todos os extratos avaliados apresentaram baixos teores de flavonoides quando comparado ao estudo de Praptiwi e colaboradores (2020), sugerindo que o potencial

antioxidante pode não estar relacionado a essas substâncias ou que estas não sejam as únicas responsáveis por esta atividade. Para, então, verificar se o teor de flavonoides possuía ou não correlação com a atividade antioxidante foi realizado o teste de Pearson.

5.1.2 Teor de compostos fenólicos totais - Folin-Ciocalteu

Os resultados obtidos da quantificação dos compostos fenólicos totais dos extratos utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu estão descritos na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Resultados de teor de compostos fenólicos totais (CFT) dos extratos

Extratos	Teor de CFT no micropoço expressa em equivalente Ácido Gálico ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Teor de CFT da amostra expressa em equivalente Ácido Gálico ($\mu\text{g/mg de extrato}$)
POLd-4	65,18	127,81
POLd-5	89,91	166,50
POLd-6	71,97	143,94
POLd-7	83,36	173,67
POLd-8	73,18	146,36
POLd-9	72,00	138,46
POLd-10	72,73	139,86
POLd-11	58,91	103,35
POLd-12	41,18	72,25
POLd-13	42,82	83,96
POLd-14	48,73	87,01
POLd-15	47,45	89,54
VAL-4.1	37,00	74,00
VAL-12.1	34,33	68,67

Fonte: Do autor (2023).

Nota-se que, de acordo com os resultados expressos na **Tabela 4**, os extratos POLd-5, POLd-7 e POLd-8 apresentaram maiores teores de compostos fenólicos totais, com valores de 166,50; 173,67 e 146,36 $\mu\text{g EAG/mg}$ de extrato, respectivamente. Da Silva e colaboradores (2020) ao estudarem a atividade antioxidante de extratos acetato de etila de fungos endofíticos isolados da *Passiflora incarnata* detectaram teores de CFT entre $103,62 \pm 0,32$ e $208,43 \pm 0,88$ $\mu\text{g EAG/mg}$ extrato, os autores concluíram que os resultados sugeriam que os extratos acetato de etila (AcOEt) eram ricos em compostos fenólicos. Os autores Sakhri e colaboradores (2019) verificaram que o extrato AcOEt obtido do fungo *Aspergillus creber* apresentava um alto teor de compostos fenólicos $85,76 \pm 0,96$ $\mu\text{g EAG/mg}$ extrato e que os resultados alcançados na pesquisa revelaram que *A. creber* foi capaz de produzir um extrato com alto teor de fenóis em

relação a outros fungos filamentosos encontrados na literatura. Além disso, Hassane *et al.* (2022) e Prima *et al.* (2022) também relataram, em seus estudos com fungos endofíticos, que os extratos AcOEt apresentavam elevados índices de compostos fenólicos, sendo, portanto, fontes promissoras no estudo de antioxidantes.

5.1.3 DPPH

A **Tabela 5** apresenta os resultados adquiridos no ensaio de eliminação do radical DPPH das amostras de extratos do fungo endofítico *Lasiodiplodia* sp. Os resultados são expressos como um equivalente de uma referência padrão (Trolox, ácido gálico, ácido ascórbico, BHA, BHT), IC₅₀ ou porcentagem (BIBI SADEER *et al.*, 2020), onde uma maior porcentagem de eliminação corresponde a uma maior atividade antioxidante do extrato testado (CAICEDO *et al.*, 2019).

Tabela 5 – Resultados de eliminação do radical DPPH dos extratos

Extratos	[Antioxidante] no micropoço expressa em equivalente Trolox (µM)	[Antioxidante] da amostra expressa em equivalente Trolox (µmol/g de extrato)
POLd-4	40,42	79,26
POLd-5	47,98	88,86
POLd-6	52,70	105,40
POLd-7	52,54	109,45
POLd-8	49,69	99,38
POLd-9	41,28	79,38
POLd-10	46,76	89,93
POLd-11	55,67	97,66
POLd-12	38,72	67,92
POLd-13	46,52	91,22
POLd-14	35,54	63,47
POLd-15	42,62	80,41
VAL-4.1	24,81	49,63
VAL-12.1	37,74	75,48

Fonte: Do autor (2023).

Foi possível observar que as maiores concentrações de antioxidantes responsáveis pela eliminação de radicais DPPH foram obtidas para os extratos POLd-6, POLd-7 e POLd-8, com valores de 105,40; 109,45 e 99,38 µmol ET/g de extrato, respectivamente.

O valor IC₅₀ DPPH (**Tabela 6**) representa a concentração da amostra necessária para eliminar 50% dos radicais livres DPPH. É uma medida do potencial antioxidante da amostra.

Um valor de IC₅₀ mais baixo indica uma atividade antioxidante mais forte, pois significa que uma concentração menor da amostra é necessária para eliminar metade dos radicais DPPH (MARTINEZ-MORALES *et al.*, 2020).

É importante ressaltar que os valores de IC₅₀ são específicos do sistema que está sendo estudado e podem variar dependendo de fatores como o solvente usado, as condições experimentais e a amostra específica que está sendo testada (MARTINEZ-MORALES *et al.*, 2020).

Tabela 6 – IC₅₀ da neutralização do radical DPPH

Amostras	0,25	0,50	1,00	3,00	5,00	IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)
	(mg.mL ⁻¹)					
% de Neutralização do DPPH						
VAL-4.1	26,57	29,37	41,68	56,44	75,95	1,45
VAL-12.1	25,56	28,65	34,41	56,73	76,17	1,60
POLd-4	19,51	23,95	31,39	58,39	67,31	2,03
POLd-5	16,56	24,55	38,66	62,63	68,90	1,72
POLd-6	21,74	30,60	36,93	70,84	75,09	1,32
POLd-7	27,72	31,01	33,41	64,52	71,98	1,48
POLd-8	19,77	27,80	30,81	58,92	68,80	1,91
POLd-9	10,90	28,89	40,27	65,45	72,64	1,54
POLd-10	27,07	35,47	42,19	73,72	82,15	1,02
POLd-11	23,25	30,53	38,59	75,16	79,99	1,16
POLd-12	14,11	22,75	36,86	50,61	63,68	2,44
POLd-13	16,41	24,33	33,19	65,59	77,54	1,55
POLd-14	14,54	26,06	35,04	56,55	64,06	2,16
POLd-15	19,73	27,65	40,53	65,08	71,03	1,51
BHT	41,77	51,03	81,01	96,99	99,00	0,35

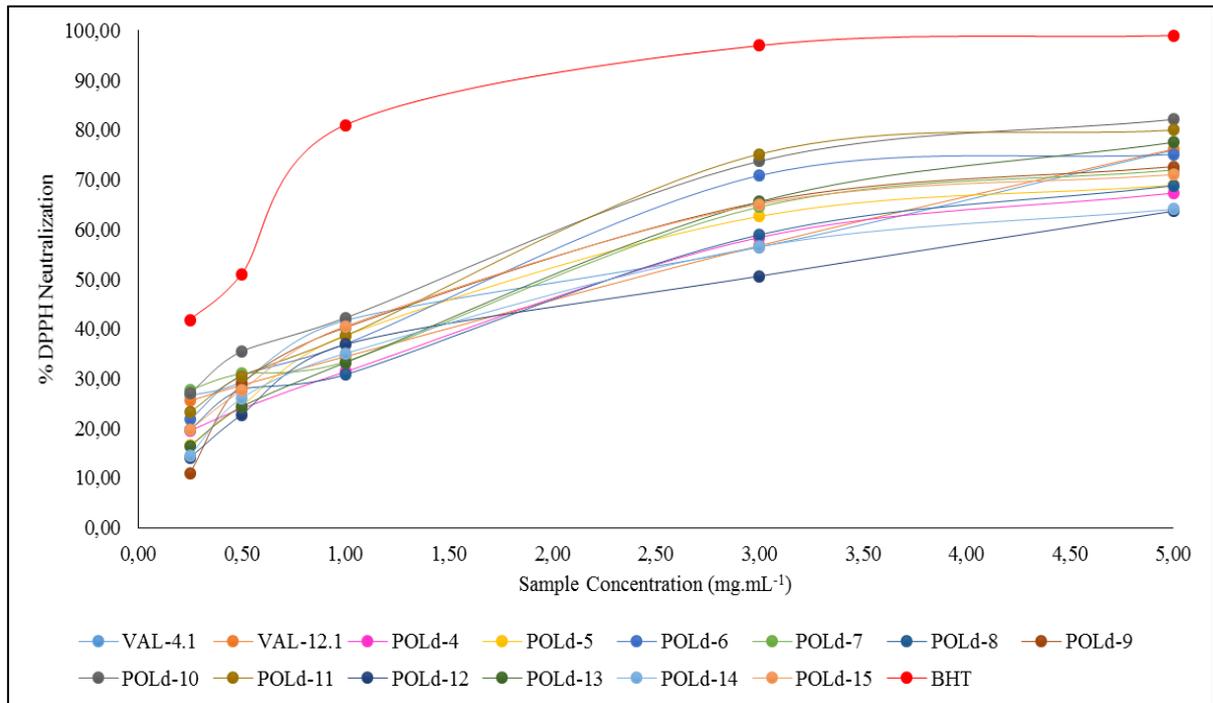
Fonte: Do autor (2023).

O estudo realizado por Prommaban e colaboradores (2022) analisou os extratos aquosos de frutificação e micélio de dois fungos, *Cordyceps militaris* e *Isaria tenuipes*, em termos de sua atividade antioxidante IC₅₀ DPPH para cada um dos extratos. Para o *C. militaris*, o extrato aquoso de frutificação apresentou um IC₅₀ DPPH de $1,20 \pm 0,18$ mg.mL⁻¹, enquanto o extrato aquoso de micélio teve um IC₅₀ DPPH de $1,64 \pm 0,35$ mg.mL⁻¹. Já para o fungo *I. tenuipes*, o extrato aquoso de frutificação mostrou um valor de IC₅₀ DPPH de $0,05 \pm 0,02$ mg.mL⁻¹, e o extrato aquoso de micélio apresentou um valor significativamente maior, com IC₅₀ DPPH de $5,18 \pm 1,05$ mg.mL⁻¹. Com base nesses resultados, os autores do estudo sugeriram que os extratos desses fungos possuem propriedades antioxidantes potentes. Eles também propuseram

que esses extratos poderiam ser utilizados futuramente na produção de produtos farmacêuticos, cosmecêuticos e nutracêuticos (PROMMABAN *et al.*, 2022).

Abaixo, encontra-se o **Gráfico 1** que representa os valores de IC₅₀ para DPPH referente aos 14 extratos AcOEt analisados neste trabalho e para o padrão BHT.

Gráfico 1 – IC₅₀ DPPH



Fonte: Do autor (2023).

Os resultados de IC₅₀ para eliminação do radical DPPH para os extratos brutos AcOEt do fungo *Lasiodiplodia* sp. não ficaram próximos à porcentagem do padrão de referência antioxidante BHT, utilizado no estudo (**Gráfico 1**). Mas é possível observar que o BHT em concentração de 1,00 mg.mL⁻¹ neutraliza o radical DPPH em cerca de 81% enquanto os extratos POLd 6, 10 e 11 atingem uma porcentagem de inibição entre 70 – 75% em concentrações de 3,00 mg.mL⁻¹. Na concentração máxima dos extratos e padrão avaliados 5,00 mg.mL⁻¹, enquanto o padrão BHT eliminou 99% dos radicais DPPH, todos os extratos avaliados apresentaram tal atividade entre 60 – 82%. Este comportamento pode ser atribuído aos diferentes compostos presentes em cada um dos extratos. Ao que tudo indica, podem haver limites entre as misturas dos compostos para se obter um efeito sinérgico, isto é, dependendo dos compostos presentes nos extratos, pode ocorrer um sinergismo entre as moléculas proporcionando um aumento da atividade avaliada, porém, podem ocorrer atuações

antagônicas, onde uma molécula pode anular o efeito de outra acarretando diminuição da atividade avaliada (DA SILVA *et al.*, 2020).

5.1.4 FRAP

O poder antioxidante redutor do íon férrico (FRAP) dos extratos em estudo estão descritos na **Tabela 7**.

Tabela 7 – Resultados de redução de íons Fe^{3+} dos extratos

Extratos	[Antioxidante] no micropoço expressa em equivalente Sulfato Ferroso (μM)	[Antioxidante] da amostra expressa em equivalente Sulfato Ferroso ($\mu mol/g$ de extrato)
POLd-4	188,67	369,93
POLd-5	188,25	348,61
POLd-6	208,67	417,33
POLd-7	222,83	464,24
POLd-8	206,58	413,17
POLd-9	205,33	394,87
POLd-10	344,08	661,70
POLd-11	227,00	398,25
POLd-12	132,42	232,31
POLd-13	184,92	362,58
POLd-14	214,08	382,29
POLd-15	172,00	324,53
VAL-4.1	125,33	250,67
VAL-12.1	149,92	299,83

Fonte: Do autor (2023).

Como mostrado na **Tabela 7**, com concentrações de aproximadamente $0,50 \text{ mg.mL}^{-1}$ os extratos POLd-6, POLd-7 e POLd-10 apresentaram propriedades antioxidantes mais fortes, com valores de 417,33; 464,24 e 661,70 μmol de equivalente de sulfato ferroso/g de extrato, respectivamente. Em estudo recente, Budiarso e colaboradores (2021) submeteram frações metanólicas de *Xylocarpus moluccensis* ao ensaio FRAP, obtendo resultados entre $309,80 \pm 0,06$ - $667,80 \pm 0,0525$ μmol ESF/g da fração e para o controle antioxidante ácido ascórbico $340,48 \pm 0,02$ μmol ESF/g. Baseado nos resultados os autores concluíram que o maior teor de antioxidante total na fração significa que mais compostos podem reduzir Fe^{3+} para Fe^{2+} e compostos que reduzem Fe^{3+} é um composto antioxidante. Desta forma, ao se comparar os resultados obtidos pelos autores e os resultados apresentados neste trabalho sugere-se que o fungo *Lasiodiplodia* é capaz de produzir substâncias capazes de reduzir o íon Fe^{3+} , e que estes

compostos estão presentes, principalmente, nos extratos obtidos nos cultivos entre os dias 6 e 11.

5.1.5 ABTS+●

Na **Tabela 8** estão apresentados os resultados referentes ao teste ABTS+● com os extratos orgânicos em estudo, os melhores resultados adquiridos 176,50; 130,88 e 254,81 μmol ET/g de extrato foram para os extratos POLd-7, POLd-9 e POLd-10, respectivamente.

Tabela 8 – Resultados de eliminação do radical ABTS+● dos extratos

Extratos	[Antioxidante] no micropoço expressa em equivalente Trolox (μM)	[Antioxidante] da amostra expressa em equivalente Trolox ($\mu\text{mol/g}$ de extrato)
POLd-4	47,78	93,68
POLd-5	60,09	111,28
POLd-6	63,61	127,22
POLd-7	84,72	176,50
POLd-8	63,06	126,11
POLd-9	68,06	130,88
POLd-10	132,50	254,81
POLd-11	51,39	90,16
POLd-12	35,83	62,87
POLd-13	63,33	124,18
POLd-14	72,22	128,97
POLd-15	55,46	104,65
VAL-4.1	33,33	66,67
VAL-12.1	47,50	95,00

Fonte: Do autor (2023).

Para determinar o valor IC_{50} ABTS+●, uma série de diluições das amostras foram preparadas, e cada diluição foi misturada com uma concentração fixa de radicais ABTS+●. A absorbância da solução ABTS+● é então medida espectrofotometricamente antes e depois da adição das amostras (DONG *et al.*, 2015). A concentração na qual a amostra reduz a absorbância em 50% é considerada o valor de IC_{50} como demonstrado na **Tabela 9**.

Tabela 9 – IC₅₀ da neutralização do radical ABTS+●

Amostras	0,25	0,50	1,00	3,00	5,00	IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)
	(mg.mL ⁻¹)					
% de Neutralização do ABTS+●						
VAL-4.1	42,69	54,22	56,62	63,38	77,38	0,46
VAL-12.1	38,30	47,62	61,73	84,12	89,14	0,51
POLd-4	36,90	41,41	52,91	61,82	70,72	0,89
POLd-5	27,15	39,77	52,56	69,51	80,92	0,90
POLd-6	22,91	38,99	56,11	76,17	87,06	0,84
POLd-7	28,88	33,72	58,70	79,97	84,38	0,80
POLd-8	39,85	53,46	73,08	91,23	93,23	0,38
POLd-9	45,31	51,69	53,77	78,85	94,51	0,45
POLd-10	39,34	44,44	61,56	72,11	93,63	0,56
POLd-11	37,98	52,48	57,18	94,47	98,13	0,48
POLd-12	33,93	39,29	44,30	57,74	74,49	1,14
POLd-13	36,25	49,32	53,88	65,58	82,27	0,66
POLd-14	41,69	44,77	57,13	72,77	84,62	0,56
POLd-15	31,30	46,60	56,71	71,41	77,64	0,72

Fonte: Do autor (2023).

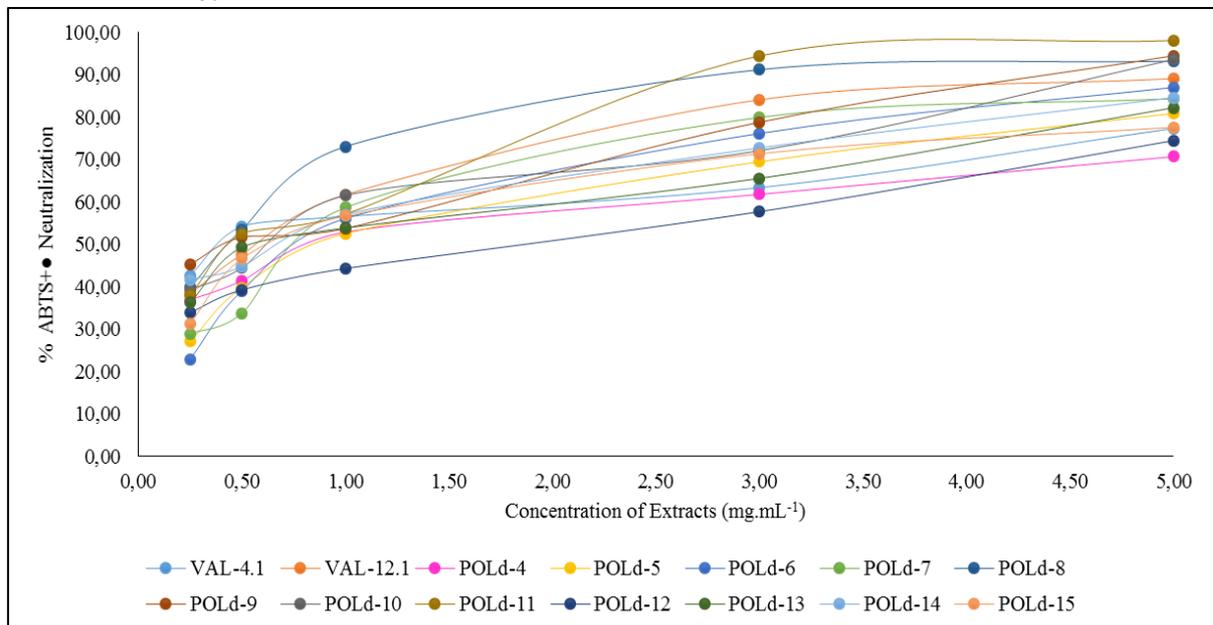
No estudo conduzido por Dutta *et al.* em 2023, foi realizado o teste de IC₅₀ ABTS+● em extratos metanólicos de dois fungos produtores de pigmentos: *Talaromyces atroroseus* e *Penicillium choerospondiatis*. Os resultados obtidos foram de $42,793 \pm 5,000$ mg.mL⁻¹ para *T. atroroseus* e $27,033 \pm 2,574$ mg.mL⁻¹ para *P. choerospondiatis*. Com base nesses resultados, os pesquisadores concluíram que os fungos são uma fonte essencial de novas moléculas para o desenvolvimento de corantes, produtos farmacêuticos, enzimas e agroquímicos. Além disso, ambos os fungos demonstraram boas atividades antioxidantes, indicando que os extratos metanólicos dessas espécies podem ter propriedades benéficas para a proteção contra o estresse oxidativo (DUTTA *et al.*, 2023).

No estudo conduzido por Prommaban *et al.* em 2022, foram analisados os extratos aquosos de frutificação e micélios do fungo *Isaria tenuipes* em relação à sua atividade antioxidante, utilizando o método de IC₅₀ ABTS+●. Os resultados obtidos mostraram que o extrato de frutificação apresentou um valor de IC₅₀ ABTS+● de $0,22 \pm 0,02$ mg.mL⁻¹, enquanto o extrato de micélio apresentou um valor de $1,05 \pm 0,05$ mg.mL⁻¹. De acordo com estes resultados, os autores do estudo sugeriram que os extratos do fungo *I. tenuipes* possuem propriedades antioxidantes fortes (PROMMABAN *et al.*, 2022).

No experimento realizado neste trabalho, os antioxidantes de referência BHT, vitamina C, trolox e ácido gálico demonstraram uma notável capacidade antioxidante, apresentando 100% de neutralização do radical ABTS+● em todas as concentrações testadas, variando de

0,25 a 5,00 mg.mL⁻¹. Devido à eficácia desses antioxidantes, não foi possível determinar seus respectivos valores de IC₅₀ ABTS+●. Os resultados (**Gráfico 2**) estão de acordo com outros estudos que relataram o potencial de fungos de diferentes fontes, para a produção de substâncias antioxidantes e que a diferença entre as capacidades antioxidantes de extratos e de referências (padrões) podem ser explicadas pela pureza da mesma. Como o extrato é uma mistura complexa de substâncias, algumas delas podem ter a capacidade de neutralizar ou inibir o efeito de outras substâncias que poderiam apresentar atividade biológica (SAKHRI *et al.*, 2019), enquanto a referência utilizada está em sua forma pura.

Gráfico 2 – IC₅₀ ABTS+●



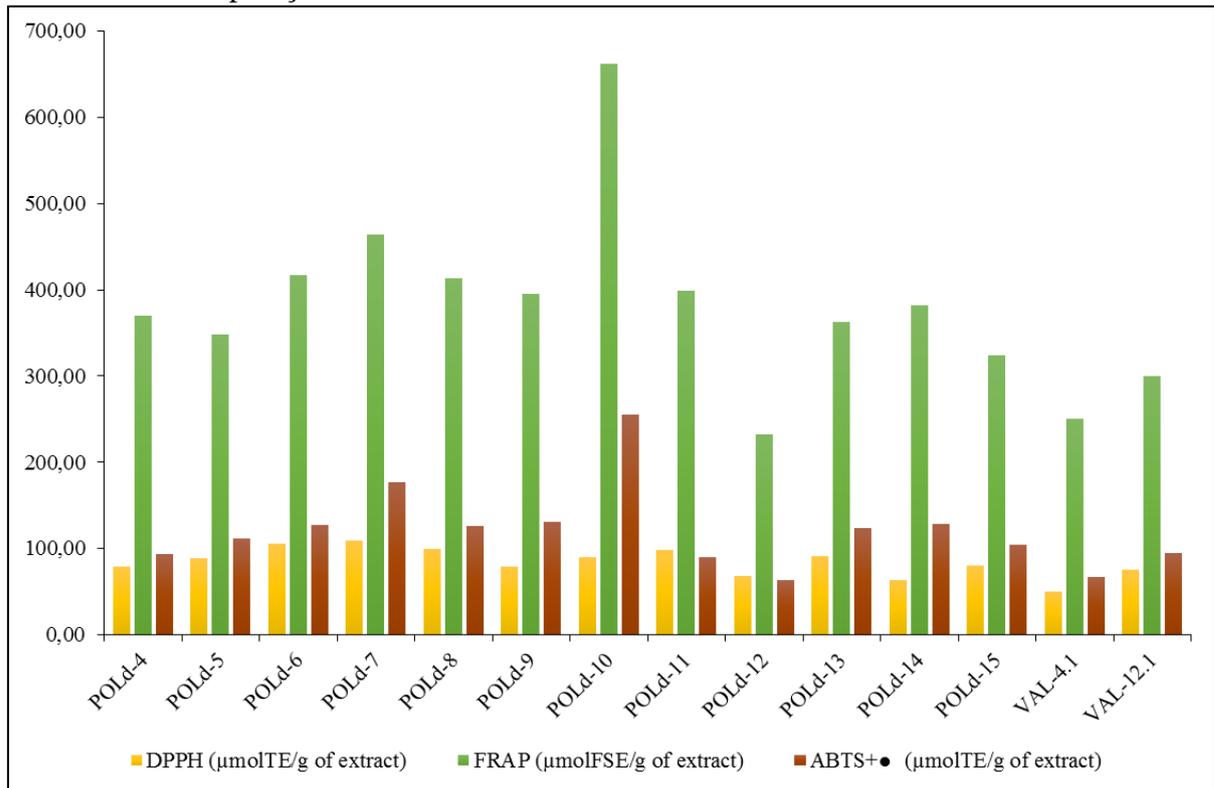
Fonte: Do autor (2023).

Em alguns trabalhos de pesquisa (LEE *et al.*, 2018; MIHAILOVIĆ *et al.*, 2018) é possível encontrar resultados nos quais o IC₅₀ do ensaio ABTS é menor que o IC₅₀ do ensaio DPPH. Isso pode ocorrer devido aos diferentes mecanismos de ação dos antioxidantes em relação aos diferentes radicais livres (ABTS+● e DPPH). Enquanto o ensaio DPPH mede a capacidade do antioxidante em neutralizar o radical DPPH, que é uma molécula mais estável, o ensaio ABTS mede a atividade antioxidante contra o radical ABTS+●, que é uma espécie radicalar com maior reatividade. Portanto, os antioxidantes podem apresentar eficácia diferente na neutralização desses radicais, resultando em valores de IC₅₀ distintos (BIBI SADEER *et al.*, 2020; KOTHA *et al.*, 2022).

Ao analisar os resultados adquiridos na quantificação das atividades antioxidantes, verificou-se um potencial promissor em relação as propriedades antioxidantes nos quatorze

extratos, principalmente, entre o sexto (POLd-6) e o décimo primeiro (POLd-11) dia de cultivo do microrganismo, como pode ser observado no **Gráfico 3**. Os extratos estudados foram comparados de acordo com cada metodologia utilizada para a determinação da atividade antioxidante.

Gráfico 3 – Comparação das atividades antioxidante dos extratos



Fonte: Do autor (2023).

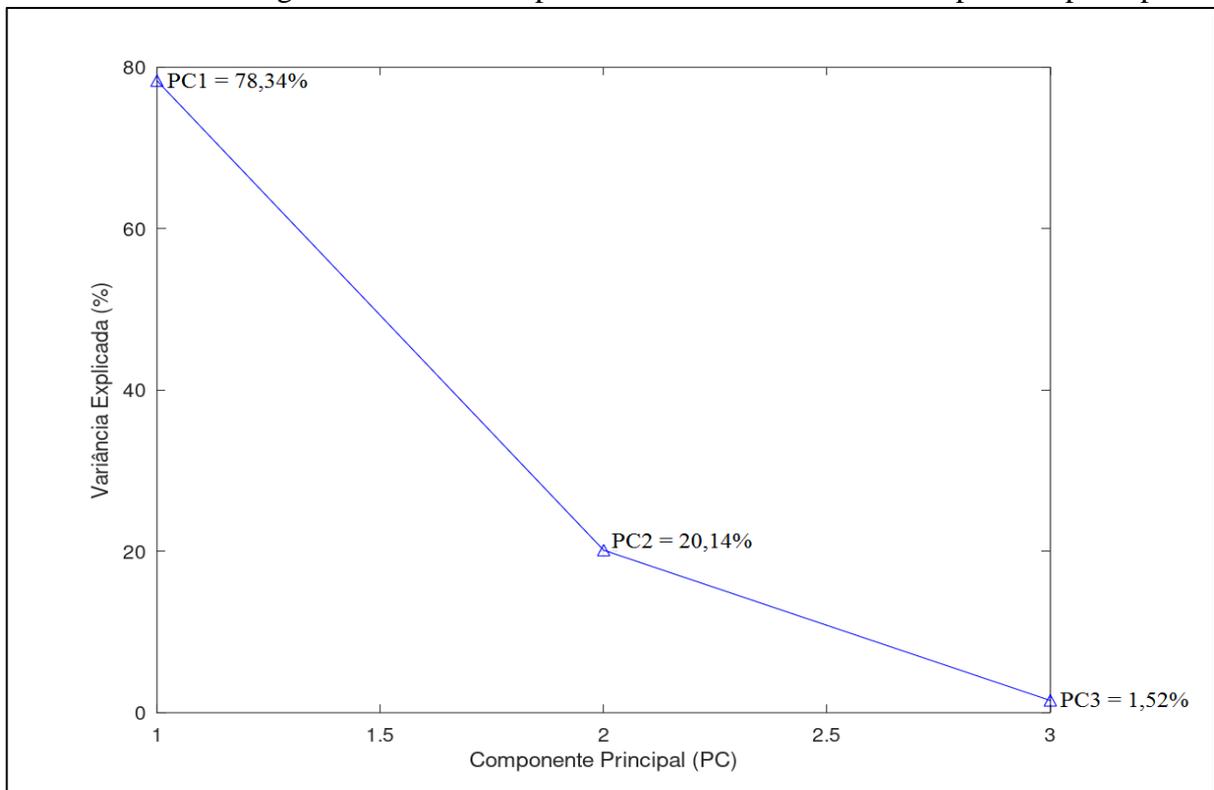
A comunidade científica está sempre em busca por novas tecnologias, soluções, aplicações, metodologias e produtos, com a finalidade de se obter melhores resultados que apresentem maior confiabilidade. Nesse sentido, ainda é necessário se desenvolver um protocolo universal e otimizado para a determinação das capacidades antioxidantes de amostras. Não há um ensaio padrão capaz de fornecer uma imagem global da capacidade antioxidante que apresenta uma dada amostra, portanto, uma combinação de alguns ensaios (mínimo três) devem ser realizados para se contemplar uma avaliação mais fidedigna sobre sua capacidade antioxidante (BIBI SADEER *et al.*, 2020).

5.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para investigar a relação dos extratos orgânicos fúngicos, foi realizada a análise de componentes principais e o agrupamento dos mesmos, com base nos resultados dos ensaios antioxidantes DPPH, FRAP e ABTS+● expressos em equivalentes do padrão antioxidante utilizado (**APÊNDICE B**).

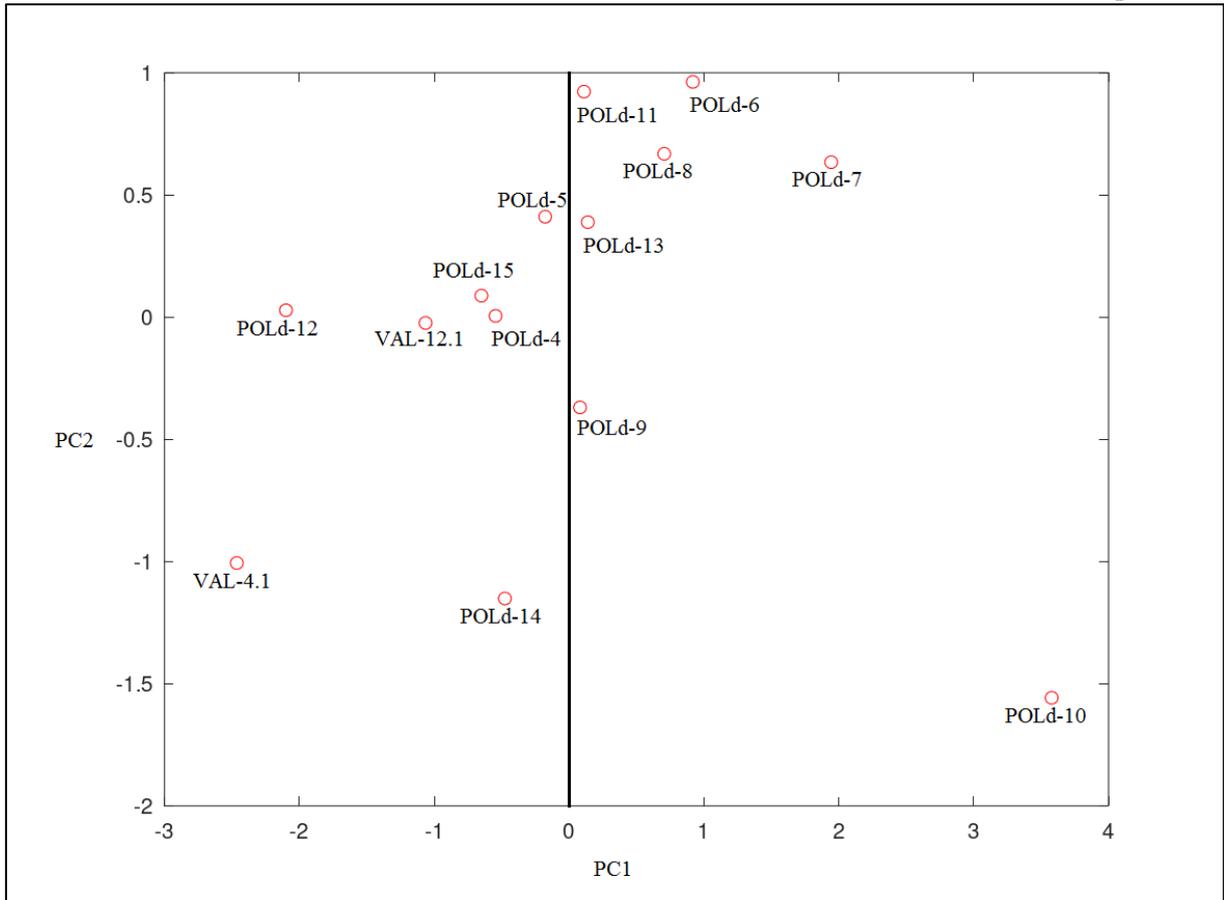
O gráfico de variância explicada (**Gráfico 4**) exhibe as porcentagens entre as componentes principais (PC): PC1 = 78,34%, PC2 = 20,14% e PC3 = 1,52%. Inicialmente, deve-se procurar no gráfico uma queda acentuada na porcentagem de variação explicada e ignorar os componentes principais que explicam relativamente pouca variação (HONGYU *et al.*, 2016). Baseado nestes dados e informações levou-se em consideração a PC1 que representa a maior porcentagem da variância explicada, com a capacidade de explicar a maior variabilidade nos dados originais. Portanto, a primeira componente principal resume efetivamente a variância amostral total e pode ser utilizada para o estudo do conjunto de dados (HONGYU *et al.*, 2016).

Gráfico 4 – Porcentagem da variância explicada de acordo com cada componente principal



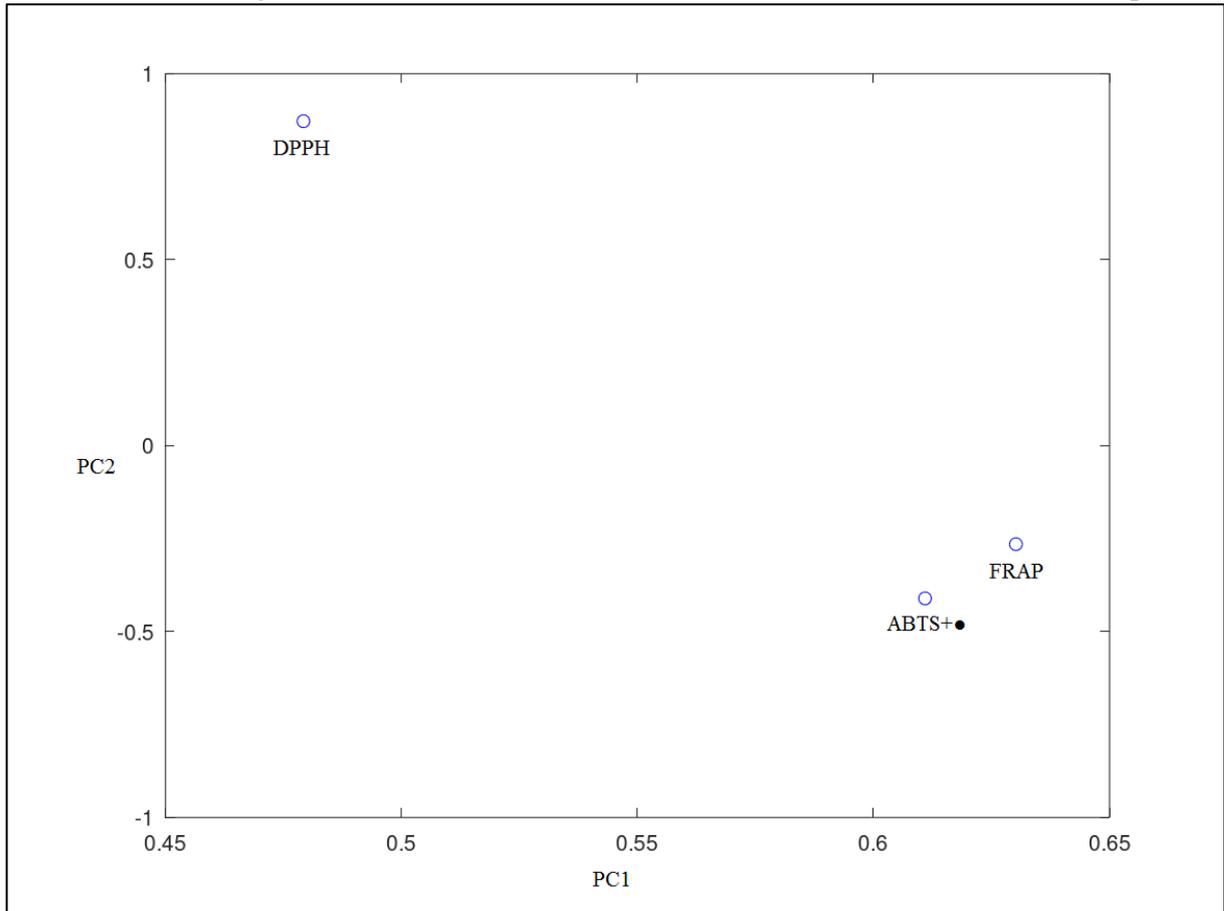
Fonte: Do autor (2022).

Gráficos de dispersão são usados para exibir a relação entre dois componentes. Com a interpretação do gráfico de *Scores* PC1 x PC2 (**Gráfico 5**), considerando os valores apresentados pela PC1, os 14 extratos foram divididos em dois grupos principais, correspondendo aos diferentes tempos do processo fermentativo do qual são gerados compostos majoritários e minoritários distintos, devido a disponibilidade de nutrientes (TRESEDER *et al.*, 2021). **Grupo 1** – valores negativos na PC1: **VAL-4.1**(-2,46), **VAL-12.1**(-1,06), **POLd-4**(-0,55), **POLd-5**(-0,18), **POLd-12**(-2,10), **POLd-14**(-0,48), **POLd-15**(-0,65). **Grupo 2** – valores positivos na PC1: **POLd-6**(0,92), **POLd-7**(1,94), **POLd-8**(0,71), **POLd-9**(0,08), **POLd-10**(3,58), **POLd-11**(0,11) e **POLd-13**(0,14). Em trabalho realizado em nosso laboratório por Moreira *et al.* (2022) foi construída a curva de crescimento para o fungo *Lasiodiplodia* sp., o qual gerou os extratos estudados neste trabalho. De acordo com os autores, os extratos POLd-5 até POLd-11 (crescimento fúngico entre os dias 5 – 11), representaram o período no qual o fungo se encontrava em sua fase estacionária de crescimento, sendo estes extratos os mais promissores quanto a atividade antimicrobiana avaliada, o que é coerente, pois, estudos demonstram que os metabólitos secundários são produzidos quando o fungo finaliza ou diminui seu crescimento, isto é, na fase estacionária. A partir do 12º dia há uma diminuição em sua curva de crescimento, o que pode representar o consumo de alguns metabólitos pelo microrganismo por falta de nutrientes, indicando uma possível diminuição na atividade biológica apresentada pelos extratos, o que pode ser observada no agrupamento gerado pela PCA.

Gráfico 5 – Scores PC1 versus PC2 – Considerando PC1 com 78,34% de variância explicada

Fonte: Do autor (2022).

Ao analisar o gráfico de *Loadings* PC1 x PC2 (**Gráfico 6**), considerando os resultados apresentados pela PC1, todas as variáveis: DPPH, FRAP e ABTS+● apresentam valores positivos na PC1, se relacionando de formas diretamente proporcionais. Além disso, grandes cargas (positivas ou negativas) indicam que uma variável tem um forte efeito naquele componente principal (WANG; YAN; JIANG, 2015). No presente estudo o ensaio antioxidante FRAP apresenta maior influência sobre a componente principal 1, como demonstrado na **Tabela 12**.

Gráfico 6 – *Loadings* PC1 versus PC2 – Considerando PC1 com 78,34% de variância explicada

Fonte: Do autor (2022).

Tabela 12 – Valores de *Loadings* na componente principal 1

Variáveis	PC1
DPPH	0,48
FRAP	0,63
ABTS+•	0,61

Fonte: Do autor (2023).

De acordo com tabela acima, verificou-se que os ensaios antioxidantes FRAP e ABTS+• apresentaram valores de *Loadings* bem próximos de 0,63 e 0,61; respectivamente. Tal resultado pode ser atribuído pelo fato do potencial redox do Fe(III) ser aproximadamente 0,70 V, que é comparável ao potencial redox do ABTS+• 0,68 V e curiosamente, existe uma linha tênue entre os métodos ABTS+• e FRAP, exceto que o ensaio ABTS+• é conduzido em pH neutro, enquanto o FRAP é realizado sob condições de pH ácido (BIBI SADEER *et al.*, 2020). Além disso as metodologias ABTS+• e FRAP apresentam o mesmo mecanismo químico antioxidante, transferência de um único elétron (BIBI SADEER *et al.*, 2020; KOTHA *et al.*, 2022).

A correlação de Pearson (r) foi realizada para determinar as relações entre flavonoides, teor de compostos fenólicos totais e os ensaios antioxidantes (APÊNDICE C). Segundo Figueiredo Filho e colaborador (2009) a correlação de Pearson mensura a direção e o grau de relação linear entre duas variáveis quantitativas, com r variando de -1 a 1. Sendo: $r = 0,00$ até $0,39$ (fraco); $r = 0,40$ até $0,69$ (moderado) e $r = 0,70$ até $1,00$ (forte). Nesse sentido, quanto mais perto de $1,00$ (independente do sinal) maior é o grau de dependência estatística linear entre as variáveis e quanto mais próximo de zero, menor é a força dessa relação.

Os resultados das correlações de Pearson entre conteúdo de flavonoides, teor de compostos fenólicos totais e os ensaios antioxidantes DPPH, FRAP e ABTS+● são mostrados nas Tabelas 15 e 16.

Tabela 15 – Coeficiente de correlação de Pearson – Flavonoides e atividades antioxidantes

	Flavonoides	DPPH	FRAP	ABTS+●
Flavonoides	1,00			
DPPH	0,53	1,00		
FRAP	0,24	0,57	1,00	
ABTS+●	0,07	0,47	0,95	1,00

Fonte: Do autor (2023).

Tabela 16 – Coeficiente de correlação de Pearson – Fenóis e atividades antioxidantes

	Teor de Compostos Fenólicos Totais	DPPH	FRAP	ABTS+●
Teor de Compostos Fenólicos Totais	1,00			
DPPH	0,70	1,00		
FRAP	0,60	0,57	1,00	
ABTS+●	0,55	0,47	0,95	1,00

Fonte: Do autor (2023).

Com base nas Tabelas 15 e 16, é possível observar que os teores totais de flavonoides e fenóis estão positivamente correlacionados (proporcionalmente) com todos os testes antioxidantes utilizados neste estudo (DPPH, FRAP e ABTS+●). Além disso, apresentaram correlação moderada e forte com o método DPPH com $r = 0,53$ e $0,70$; respectivamente. Esses valores indicam uma associação significativa entre os níveis de flavonoides e fenóis e a atividade antioxidante DPPH, sugerindo que esses compostos podem desempenhar um papel importante na capacidade de neutralização/sequestro de radicais livres. Quimicamente, esses compostos possuem a habilidade em liberar homoliticamente o hidrogênio da ligação O-H e

formar radicais estáveis por efeito de ressonância ou por efeito de hiperconjugação, potencializando o efeito antioxidante (DE CARVALHO *et al.*, 2020).

5.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL, SIMILARIDADE E DIFERENCIAL POR RMN

Através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear, foi possível realizar a análise de similaridade e diferencial entre os espectros obtidos, além de permitir a elucidação estrutural de moléculas.

5.3.1 Elucidação estrutural de compostos presentes no extrato POLd-14

Foram adquiridos os espectros 1D e 2D do extrato POLd-14 (**APÊNDICE D**), com a finalidade de se identificar substâncias presentes neste extrato. Os sinais de hidrogênios observados na região de 6,0 – 6,5 ppm foram escolhidos, por se destacarem em relação aos demais sinais.

Por se tratar de uma mistura, a elucidação estrutural torna-se mais difícil, pois, alguns sinais de hidrogênios e/ou carbonos, no espectro, podem não ser observados devido à sobreposição de sinais de outros compostos, bem como, as integrais podem não ser confiáveis e as multiplicidades dos sinais muitas vezes não são observadas de maneira adequada, o que dificulta a identificação de compostos em misturas.

Neste extrato foi possível identificar duas substâncias conhecidas e anteriormente isoladas da espécie *Lasiodiplodia*, cujos sinais de RMN 1D e 2D estão descritos nas **Tabelas 17 e 18**, e foram comparados com a literatura (HE; MATSUURA; YOSHIHARA, 2004). As diferenças observadas nos deslocamentos químicos podem estar relacionadas ao solvente deuterado utilizado para aquisição dos espectros. Os autores utilizaram metanol deuterado, enquanto neste trabalho foi utilizado clorofórmio deuterado.

Nas **Tabelas 17 e 18** encontram-se os deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos observados para 3-carboxi-2-metileno-4-heptanolida e para o ácido decumbico, respectivamente, bem como suas correlações ^1H - ^{13}C a longa distância (HMBC) e ^1H - ^1H (COSY).

Tabela 17 – Deslocamentos químicos δ (ppm) e constantes de acoplamento J (Hz) para a substância 3-carboxi-2-metileno-4-heptanolida, em CDCl_3 ; 9,4 T a 25 °C

Posição	^1H (H; m; J)	^1H (CD_3OD) *	^{13}C (HSQC)	^{13}C (CD_3OD) *	HMBC	COSY
1	-	-	167,6	168,5	-	-
2	-	-	132,2	132,8	-	-
3	3,64 (1H; dt; 2,8)	3,56	48,8	50,0	78,1; 36,5; 173,0; 132,2	1,48; 4,84; 6,04; 6,47
4	4,84 (1H; dt; 5,68)	4,76	78,1	79,1	48,8; 173,0; 36,5; 17,7; 167,6	1,72; 3,64
5	1,72 (m)	1,69	36,5	38,2	48,8; 78,1; 17,7; 13,5	4,84
6	1,48 (m)	1,43	17,7	18,6	13,5; 48,8	0,99; 3,64
7	0,99 (m)	0,91	13,5	14,1	17,7; 36,5	1,48
8, 8'	6,47 (1H; d; 2,8); 6,04 (1H; d; 2,8)	6,40 5,96	125,3	126,4	48,8; 167,6; 132,2; 173,0	3,64
9	-	-	173,0	174,7	-	-

Fonte: Do autor (2023).

Legenda: *m*: multiplicidade
m: multipletto*dt*: duplo tripleto
d: dupletto

*: (HE; MATSUURA; YOSHIHARA, 2004)

Para uma das moléculas (**Tabela 17**) foi possível observar sinais de hidrogênios em 6,46 e 6,04 ppm na forma de dois dubletos com $J = 2,8$ Hz, dois duplos tripletos em 4,84 e 3,64 ppm, todos integrando para 1H, foi possível observar correlações ^1H - ^1H (COSY) entre o hidrogênio δ 3,64 e um hidrogênio em δ 1,48 e este com um hidrogênio em δ 0,99, bem como, o hidrogênio em δ 4,84 apresentou correlação com o hidrogênio em δ 1,72. Com a análise simultânea dos espectros HMBC e HSQC foi possível observar a presença de nove carbonos, dentre eles: duas carbonilas, com δ 173,0 e δ 167,6, um carbono quaternário sp^2 em δ 132,2, um carbono sp^2 em δ 125,3 com 2 H ligados a esse carbono, dois carbonos sp^3 funcionalizados em δ 78,1 e δ 48,8 e três carbonos sp^3 característicos de cadeia alquila em δ 36,5, 17,7 e 13,5, este último característico de grupo metila. O espectro HMBC indicou correlações ^1H - ^{13}C a longa distância entre o H 3 e os carbonos C 4, 5, 9 e 2; o H 4 e os carbonos 5, 6, 9, 3 e 1; os dois H 8,8' e os carbonos C 2, 1, 3, 9, todas estas correlações indicam a união de um anel de 5 membros (lactona) com uma carbonila de ácido carboxílico e com uma cadeia alquila ligada ao anel pelo carbono C 4. A partir destas análises e com base na literatura foi possível sugerir que se tratava da substância 3-carboxi-2-metileno-4-heptanolida (**Figura 14**). Os dados indicados na tabela são

para a (3*S*,4*R*)-3-carboxi-2-metileno-4-heptanolida (HE; MATSUURA; YOSHIHARA, 2004). Algumas correlações observadas podem ser visualizadas na **Figura 14**. De acordo com os autores (HE; MATSUURA; YOSHIHARA, 2004), os dois hidrogênios metínicos presentes no anel se encontram em posição *trans*, pois, foram comparados com as estruturas: ácido protolicherínico, ácido nefrosterínico, metilenolactosina, entre outras, que apresentam a mesma configuração, desta forma é possível sugerir que a substância presente no extrato POLd-14 também seja o mesmo isômero, devido às semelhanças nos deslocamentos químicos tanto dos hidrogênios como dos carbonos que constituem a molécula (**Tabela 18**).

Figura 14 – Estrutura da 3-carboxi-2-metileno-4-heptanolida: Estrutura química (a); Correlações observadas nos espectros de COSY (b) e HMBC (c)

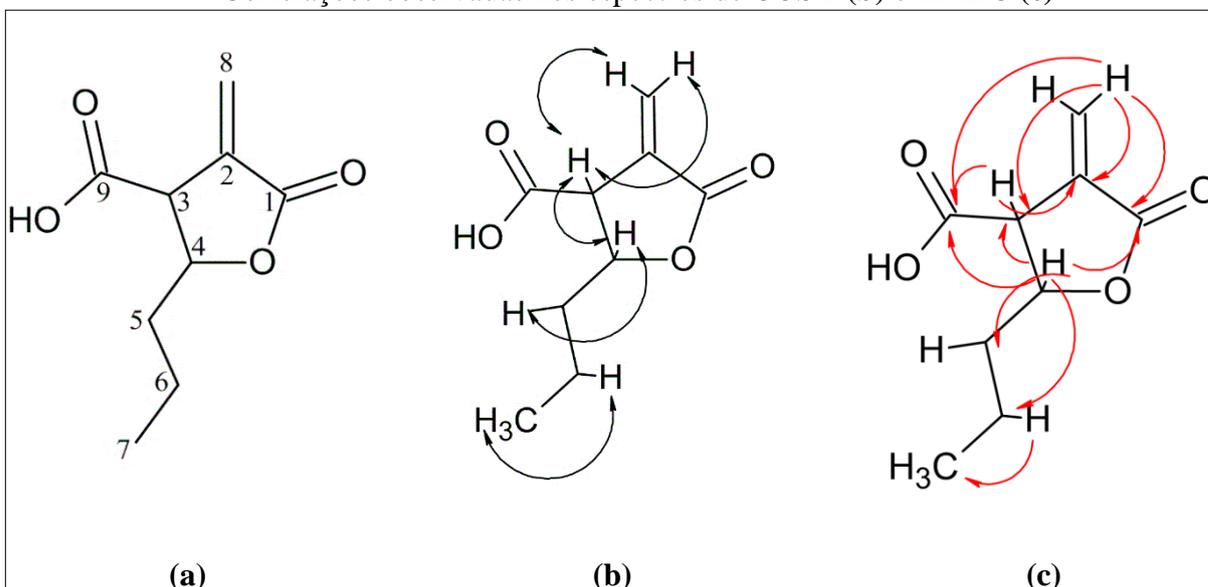


Tabela 18 – Deslocamentos químicos δ (ppm) e constantes de acoplamento J (Hz) para a substância ácido decumbico, em CDCl_3 ; 9,4 T a 25 °C

Posição	(Conclusão)					
	^1H (H; <i>m</i> ; J)	^1H (CDCl_3)*	^{13}C (HSQC)	^{13}C (CDCl_3)*	HMBC	COSY
8	2,22 (3H; <i>d</i> ; 2,21)	2,22	10,7	11,1	138,8; 146,8; 165,8; 172,2	5,12
9	-	-	165,8	166,1	-	-

Fonte: Do autor (2023).

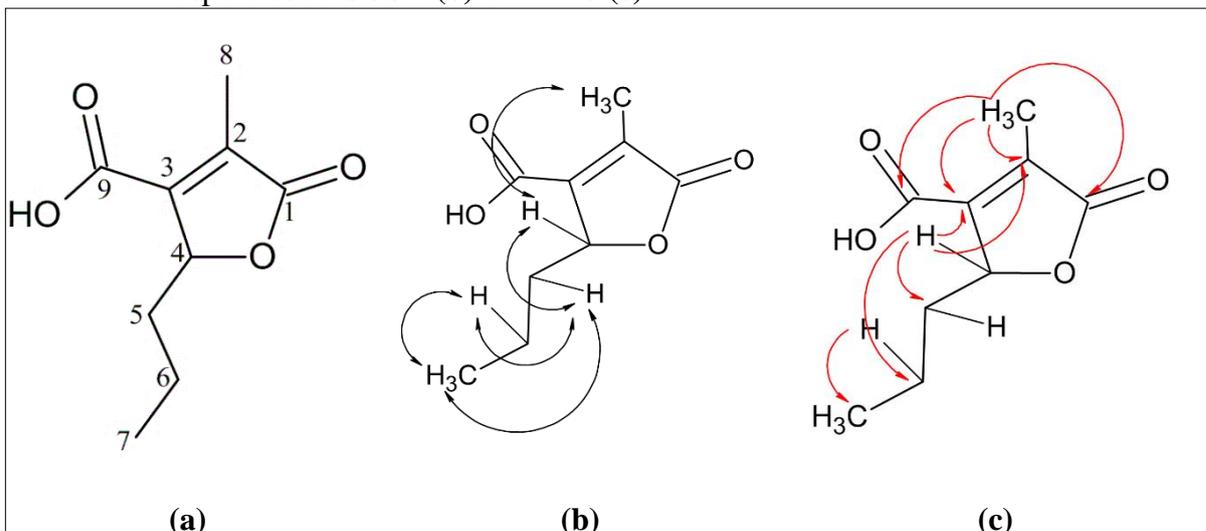
Legenda: *m*: multiplicidade
dq: duplo quarteto

m: multiplete
d: duplete

*: (HE; MATSUURA; YOSHIHARA, 2004)

A outra molécula identificada (**Tabela 18**) apresentou um H em δ 5,12 parecendo ser um duplo quarteto com um dos valores de $J= 2,21$ Hz, integrando para 1 H, além de sinais de hidrogênios em δ 1,59 e 2,12 ligados ao carbono C 5; δ 1,48 e 0,94 referentes a cadeia alquila, sendo o último característico de grupo metila. Foi observada também uma metila cujos hidrogênios apresentaram δ 2,22 e carbono C 8 em δ 10,7. Foram observados nove carbonos, dentre eles: duas carbonilas em δ 165,8 e 172,2; dois carbonos quaternários do tipo sp^2 em δ 138,8 e 146,8; um carbono funcionalizado, próximo a oxigênio em δ 81,0; três carbonos de cadeia alquila em δ 34,3, 17,7 e 13,4, além de uma metila em 10,7 ppm. Foram observadas correlações importantes nos espectros de COSY e HMBC que indicaram as conexões entre o anel lactona com a cadeia alquila e com o grupamento ácido carboxílico, da mesma forma como descrito anteriormente, cujas correlações podem ser observadas tanto na **Tabela 18**, como na **Figura 15**, sugerindo estar presente no mesmo extrato o ácido decumbico, um isômero de 3-carboxi-2-metileno-4-heptanolida.

Figura 15 – Estrutura do ácido decumbico: Estrutura química (a); Correlações observadas nos espectros de COSY (b) e HMBC (c)



Fonte: Do autor (2023).

He e colaboradores (2004) descreveram que foram realizados experimentos com estas duas moléculas, sendo que a principal diferença estrutural se encontra na posição da olefina como exocíclica para a substância 3-carboxi-2-metileno-4-heptanolida e endocíclica para o ácido decumbico, os autores concluíram que a posição da dupla ligação exocíclica é fundamental para induzir efeito tóxico em frutas. Além disso, os autores relataram que as α -metileno- γ -butirolactonas apresentam, em alguns casos, atividades antibacteriana, antifúngica e antitumoral, podendo atuar como agentes reguladores de crescimento. Os autores afirmaram que duplas ligações olefínicas são centros ativos de antibióticos da classe α -exometilenolactonas, as quais reagem com os grupos sulfidríla (-SH) de proteínas receptoras (HE; MATSUURA; YOSHIHARA, 2004). Não foram encontradas referências sobre o potencial antioxidante destas moléculas.

Foram obtidos espectros 1D e 2D de RMN do extrato POLd-6 na tentativa de se identificar as estruturas aromáticas presentes no mesmo. Verificou-se que na região entre 7,3 e 10,1 ppm havia uma mistura complexa de compostos, sendo inviável realizar a elucidação estrutural dos mesmos na mistura. Estes extratos serão purificados em trabalhos futuros.

5.3.2 Similaridade e diferencial por RMN

A similaridade de RMN avalia a proximidade entre dois espectros de RMN e é útil para identificar padrões de ressonância semelhantes ou compostos com estruturas químicas parecidas (SCHRIPEMA, 2019). A **Tabela 19** mostra os resultados dos cálculos de

semelhança dos 14 espectros de RMN-¹H obtidos, a similaridade entre os extratos variou de 0,584 a 0,941 com média de 0,768; indicando efetivamente pequenas mudanças químicas na composição dos extratos durante os dias de cultivo do fungo *Lasiodiplodia* sp. em meio otimizado.

Tabela 19 – Similaridade de RMN dos extratos em estudo

	VAL-4.1	VAL-12.1	POLd-4	POLd-5	POLd-6	POLd-7	POLd-8	POLd-9	POLd-10	POLd-11	POLd-12	POLd-13	POLd-14	POLd-15
VAL-4.1	1,000	0,818	0,665	0,685	0,754	0,601	0,720	0,791	0,781	0,788	0,865	0,821	0,883	0,830
VAL-12.1	0,818	1,000	0,671	0,704	0,791	0,612	0,746	0,837	0,842	0,842	0,750	0,785	0,778	0,755
POLd-4	0,665	0,671	1,000	0,869	0,739	0,692	0,718	0,675	0,664	0,665	0,628	0,615	0,641	0,612
POLd-5	0,685	0,704	0,869	1,000	0,797	0,727	0,770	0,713	0,711	0,709	0,651	0,653	0,657	0,643
POLd-6	0,754	0,791	0,739	0,797	1,000	0,685	0,848	0,825	0,837	0,851	0,718	0,744	0,720	0,721
POLd-7	0,601	0,612	0,692	0,727	0,685	1,000	0,723	0,667	0,664	0,663	0,605	0,611	0,584	0,606
POLd-8	0,720	0,746	0,718	0,770	0,848	0,723	1,000	0,816	0,813	0,820	0,704	0,729	0,688	0,712
POLd-9	0,791	0,837	0,675	0,713	0,825	0,667	0,816	1,000	0,910	0,888	0,766	0,821	0,744	0,785
POLd-10	0,781	0,842	0,664	0,711	0,837	0,664	0,813	0,910	1,000	0,941	0,771	0,843	0,735	0,788
POLd-11	0,788	0,842	0,665	0,709	0,851	0,663	0,820	0,888	0,941	1,000	0,779	0,844	0,747	0,792
POLd-12	0,865	0,750	0,628	0,651	0,718	0,605	0,704	0,766	0,771	0,779	1,000	0,830	0,892	0,853
POLd-13	0,821	0,785	0,615	0,653	0,744	0,611	0,729	0,821	0,843	0,844	0,830	1,000	0,800	0,847
POLd-14	0,883	0,778	0,641	0,657	0,720	0,584	0,688	0,744	0,735	0,747	0,892	0,800	1,000	0,865
POLd-15	0,830	0,755	0,612	0,643	0,721	0,606	0,712	0,785	0,788	0,792	0,853	0,847	0,865	1,000

Fonte: Do autor (2023).

Legenda: 0,500 0,600 0,700 0,800 0,900 1,000

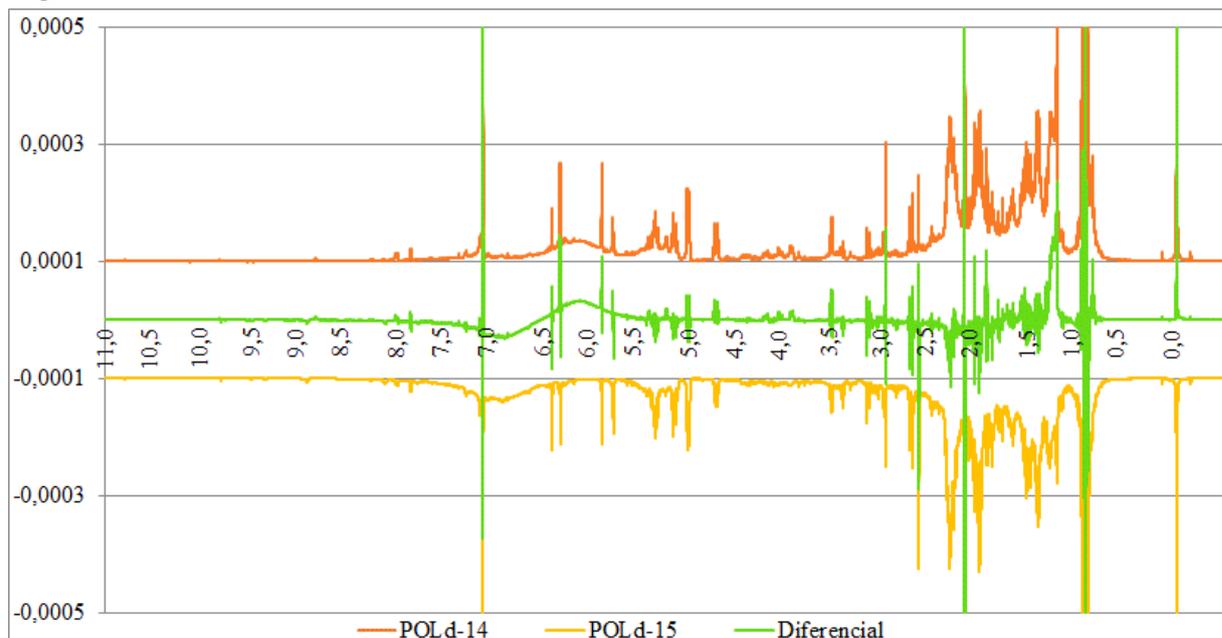
Ao aplicar a PCA aos resultados das atividades antioxidantes, é possível identificar grupos de extratos que apresentam perfis químicos semelhantes, revelando similaridades e diferenças durante os dias consecutivos de cultivo do fungo. Inicialmente há disponibilidade de nutrientes, o microrganismo encontra-se em fase de crescimento. A análise dos extratos AcOEt inicia-se a partir do quarto dia, pois antes disso, o microrganismo está com seu metabolismo primário ativado. Com o passar dos dias o microrganismo se desenvolve, consumindo os nutrientes, e à medida que cessam esses nutrientes ou mesmo antes de seu término, inicia-se a produção de metabólitos secundários, devido ao estresse do microrganismo, na tentativa de manter sua sobrevivência, podendo ocorrer entre os dias de cultivo algumas semelhanças/diferenças entre os perfis químicos de cada extrato ao longo do cultivo (HAMILL *et al.*, 2020; YIN *et al.*, 2009; YIN; SUN, 2011).

Ao calcular a similaridade entre os espectros de RMN-¹H, foi possível comparar a composição química dos extratos de *Lasiodiplodia* sp. nos diferentes dias do cultivo, identificando quais são os perfis de RMN-¹H mais semelhantes, indicando similaridade estrutural, potencialmente relacionada aos metabólitos específicos produzidos pelo fungo em determinada etapa de sua curva de crescimento (HAMILL *et al.*, 2020; YIN *et al.*, 2009; YIN; SUN, 2011).

Embora a PCA e a similaridade de RMN apresentem conceitos distintos, ambas são ferramentas valiosas na análise e interpretação dos resultados obtidos. Tanto no PCA quanto na análise de similaridade, é possível observar padrões consistentes nos agrupamentos e nos valores de similaridade mais altos (acima de 0,80) ao longo do processo de cultivo do *Lasiodiplodia* sp. As combinações destas ferramentas fornecem uma visão abrangente do cultivo do *Lasiodiplodia* sp., revelando padrões consistentes e fornecendo informações valiosas sobre as mudanças metabólicas e influenciáveis que ocorrem ao longo do processo.

A técnica de diferencial de RMN fornece informações detalhadas sobre os constituintes de várias amostras analisadas, podendo ser bastante útil quando estas amostras apresentam alta similaridade, sendo difícil observar as diferenças entre elas. Para que seja possível diferenciá-las, através da visualização de alguns sinais que se encontram pequenos, por pertencerem a compostos minoritários (importante nos estudos de produtos naturais) ou por se encontrarem sobrepostos a outros sinais, a espectroscopia de RMN diferencial surge como uma ferramenta para auxiliar na descoberta destes compostos (DOS SANTOS RIBEIRO; DAGNINO; SCHRIPEMA, 2021). Para exemplificar a utilidade da técnica foi realizada uma comparação entre os espectros dos extratos POLd-14 e POLd-15 (**Figuras 16 e 17**) que apresentam uma similaridade espectral de 0,865 e entre os espectros dos extratos POLd-14 e POLd-7 cuja similaridade espectral foi de 0,584 (**Figura 18 e 19**).

Figura 16 – RMN-¹H diferencial dos extratos POLd-14 e 15

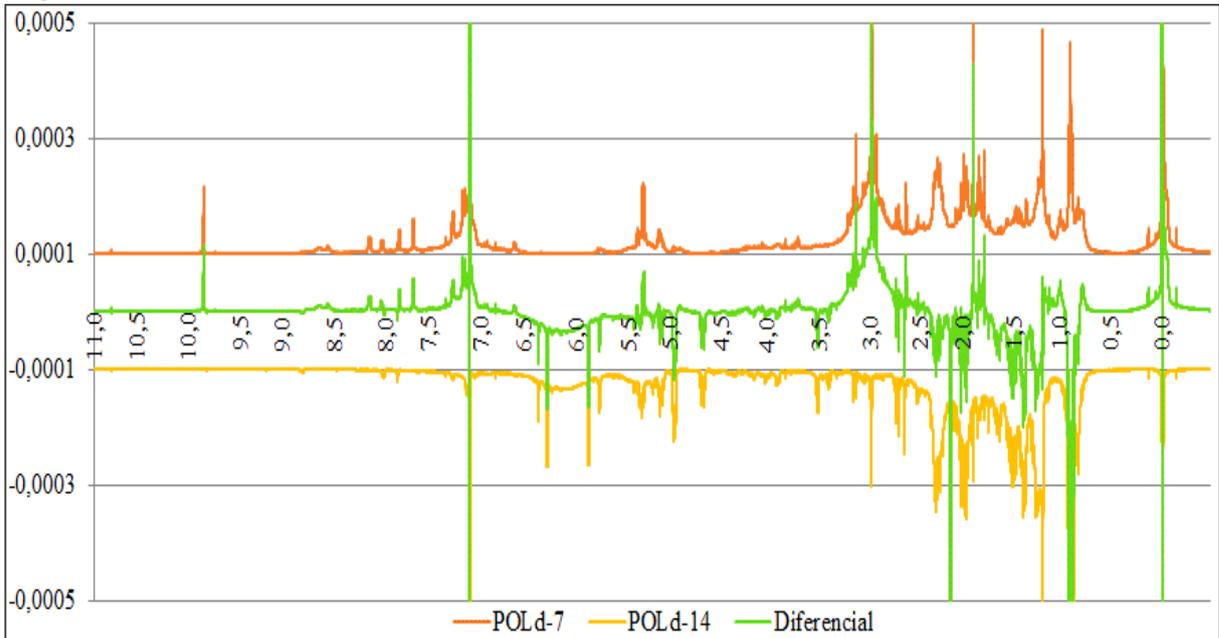


Fonte: Do autor (2023).

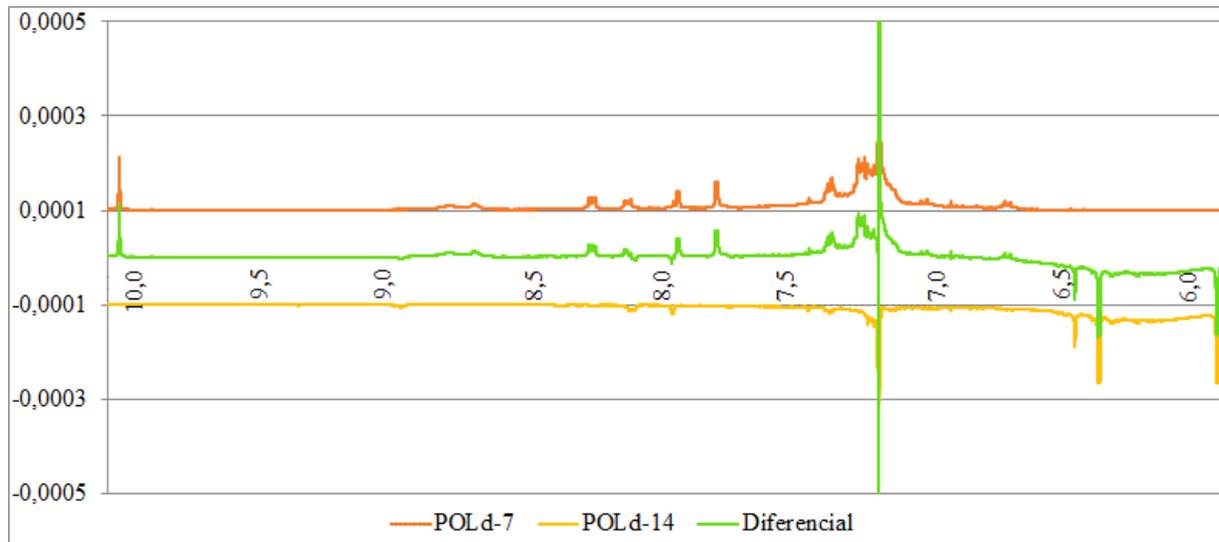
Figura 17 – Expansão da região entre 3,5 – 6,7 ppm

Fonte: Do autor (2023).

Ao se comparar a região onde se encontram os sinais de RMN-¹H das substâncias identificadas neste trabalho (ácido decumbico e 3-carboxi-2-metileno-4-heptanolida) é possível observar que os dois compostos se encontram em ambos extratos (alguns dos sinais de hidrogênios: próximos de 5,12 ppm e também 6,43, 6,02, 4,85, 3,64 ppm, respectivamente), porém, ao se observar a região entre 3,97 e 4,30 ppm, é possível observar sinais de hidrogênios de compostos minoritários que estão presentes no extrato POLd-14, mas que não são tão visíveis no POLd-15, o que fica bem nítido no espectro diferencial (em verde) (**Figura 17**). O mesmo raciocínio pode ser feito analisando todas as regiões do espectro, o que pode auxiliar na elucidação estrutural tanto das substâncias majoritárias como minoritárias. O espectro de RMN diferencial pode sugerir se o grupo de sinais observados pertencem a uma mesma molécula, uma vez que estarão de um mesmo lado no espectro diferencial (parte positiva ou negativa).

Figura 18 – RMN-¹H diferencial dos extratos POLd-7 e 14

Fonte: Do autor (2023).

Figura 19 – Expansão da região entre 6,0 – 10,1 ppm

Fonte: Do autor (2023).

Ao se comparar os espectros de RMN-¹H dos extratos POLd-14 e POLd-7, que se apresentam com baixa similaridade, é possível notar que os sinais de hidrogênios descritos acima para as duas substâncias identificadas no extrato POLd-14 não estão presentes no extrato POLd-7 (região entre 6,43 – 3,64 ppm). No espectro de RMN-¹H diferencial todos estes sinais (em verde) estão voltados para baixo (eixo negativo), onde foi plotado o espectro do extrato POLd-14.

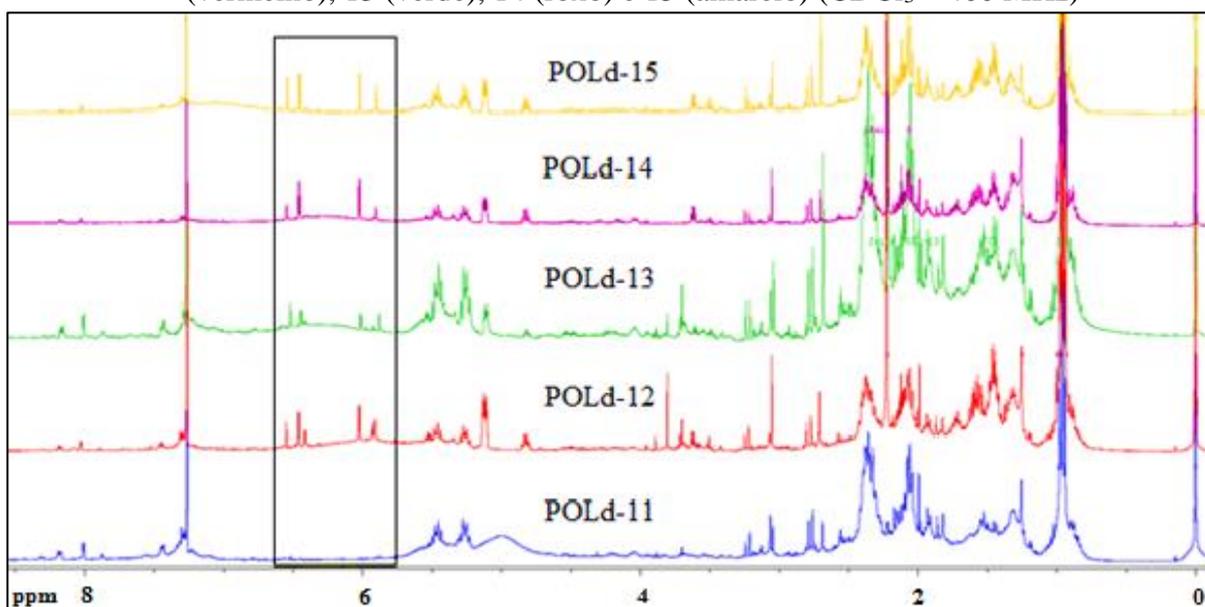
Por outro lado, uma região bastante importante no estudo de produtos naturais, como a região entre 7,32 – 10,1 ppm (região de sinais de hidrogênios característicos de sistemas insaturados conjugados e hidrogênio ligado a grupos funcionais como a carbonila) estão mais evidentes no extrato POLd-7. Os extratos obtidos no início da fermentação do fungo até o 11º dia, apresentam estes sinais, indicando uma diferenciação entre os compostos produzidos pelo fungo *Lasiodiplodia* sp. até o 11º dia e os compostos presentes nos extratos partir do 11º dia. Análises mais detalhadas dos espectros diferenciais de RMN-¹H estão sendo realizadas com a finalidade de se tentar identificar compostos minoritários, presentes nos extratos.

5.3.3 Comparação entre espectros de RMN-¹H dos extratos estudados

Inicialmente, foram adquiridos os espectros de RMN-¹H de todos os extratos estudados neste trabalho para que fosse possível compará-los. De acordo com os estudos de PCA para atividade antioxidante e também por similaridade de espectros foi possível agrupar os seguintes extratos destacados nas figuras abaixo (**Figuras 20 e 21**).

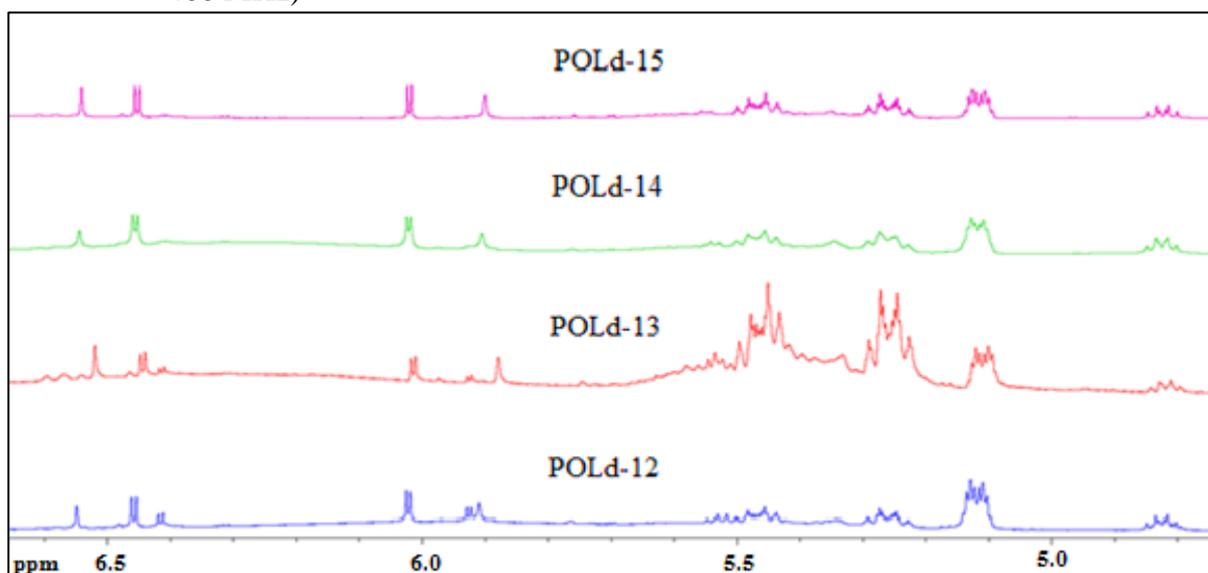
Na **Figura 20** foram comparados os extratos POLd-11-15, onde notam-se semelhanças entre alguns sinais de RMN-¹H desde o extrato POLd-12 até POLd-15. O extrato POLd-11 foi colocado apenas para comparação. Já a **Figura 21** apresenta uma expansão da região entre 4,6 e 6,6 ppm dos extratos POLd-12-15.

Figura 20 – Comparação entre os espectros de RMN-¹H dos extratos POLd-11 (azul), 12 (vermelho), 13 (verde), 14 (roxo) e 15 (amarelo) (CDCl₃ – 400 MHz)



Fonte: Do autor (2023).

Figura 21 – Região expandida entre 4,6 e 6,6 ppm para comparação entre os espectros de RMN-¹H dos extratos POLd-12 (azul), 13 (vermelho), 14 (verde) e 15 (roxo) (CDCl₃ – 400 MHz)



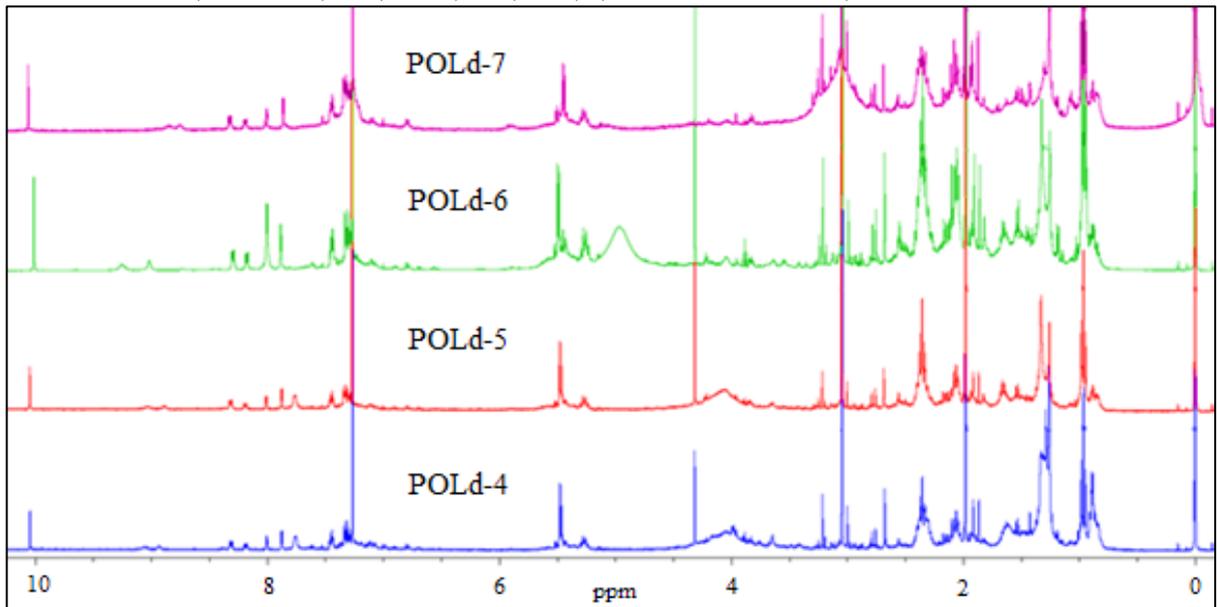
Fonte: Do autor (2023).

É possível observar através das **Figuras 20 e 21**, um aglomerado de sinais de hidrogênios na região entre 0,5 e 2,5 ppm característicos de hidrogênios sp^3 de grupos metila e metileno, em todos os espectros. Na região entre 2,5 – 4,5 ppm podem ser encontrados hidrogênios funcionalizados com heteroátomos ou próximos de carbonos com insaturações, que também são observados em todos os espectros, porém, com sinais distintos entre os mesmos. Na região entre 5,0 até 7,0 ppm os sinais são bastante semelhantes, exceto para o espectro do extrato POLd-11, região característica de hidrogênios ligados a carbonos sp^2 ou em anéis próximos a heteroátomos. Também é possível observar sinais entre 7,3 – 8,5 ppm característicos de hidrogênios sp^2 pertencentes a sistemas onde há ressonância, estes sinais são menos intensos nos extratos POLd-14 e 15.

Os sinais de hidrogênios observados entre 6,0 e 6,5 ppm foram selecionados para serem melhor estudados a partir dos espectros bidimensionais. Para tanto, foi selecionado o extrato POLd-14 para identificação da substância com os sinais mais pronunciados nesta região quando comparados com outros sinais de hidrogênios pertencentes a outra substância no mesmo extrato/espectro.

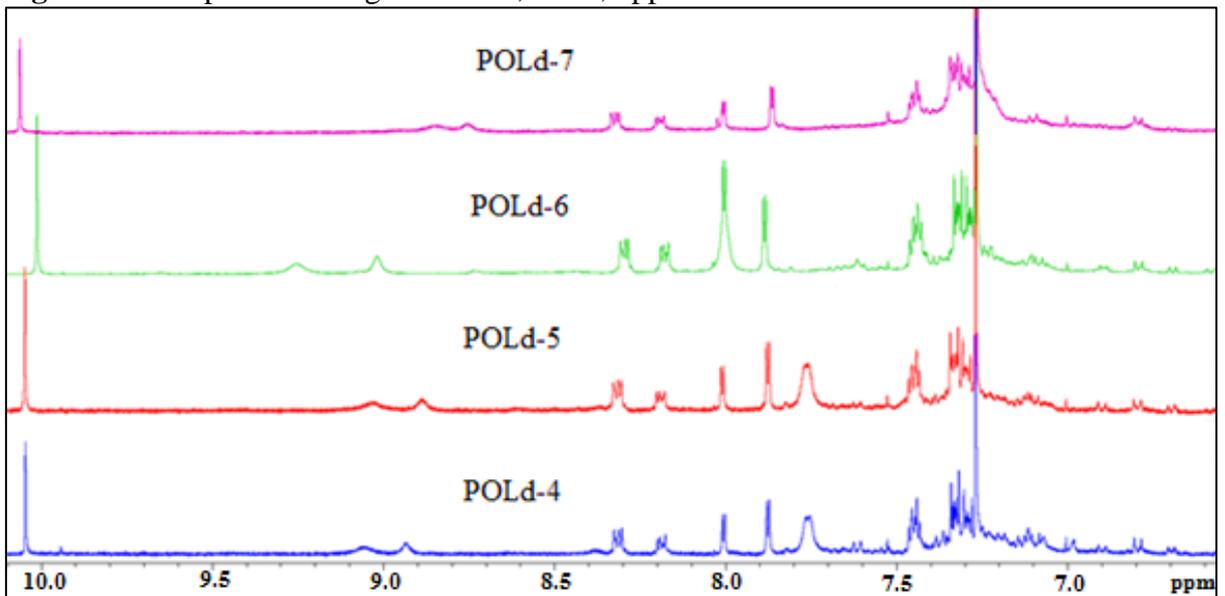
Também é possível se notar semelhanças entre os espectros dos extratos POLd-4-11, como pode ser observado nas **Figuras 22, 23, 24 e 25**.

Figura 22 – Comparação entre os espectros de RMN-¹H dos extratos POLd-4 (azul), 5 (vermelho), 6 (verde), 7 (roxo) (CDCl₃ – 400 MHz)



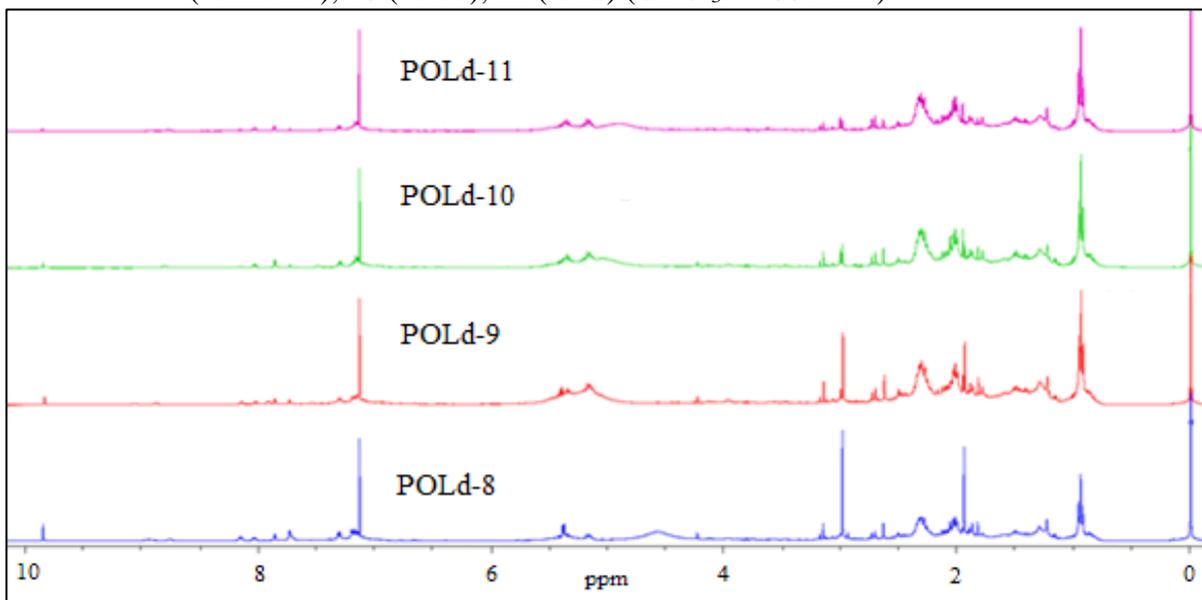
Fonte: Do autor (2023).

Figura 23 – Expansão da região entre 6,7 - 10,1 ppm



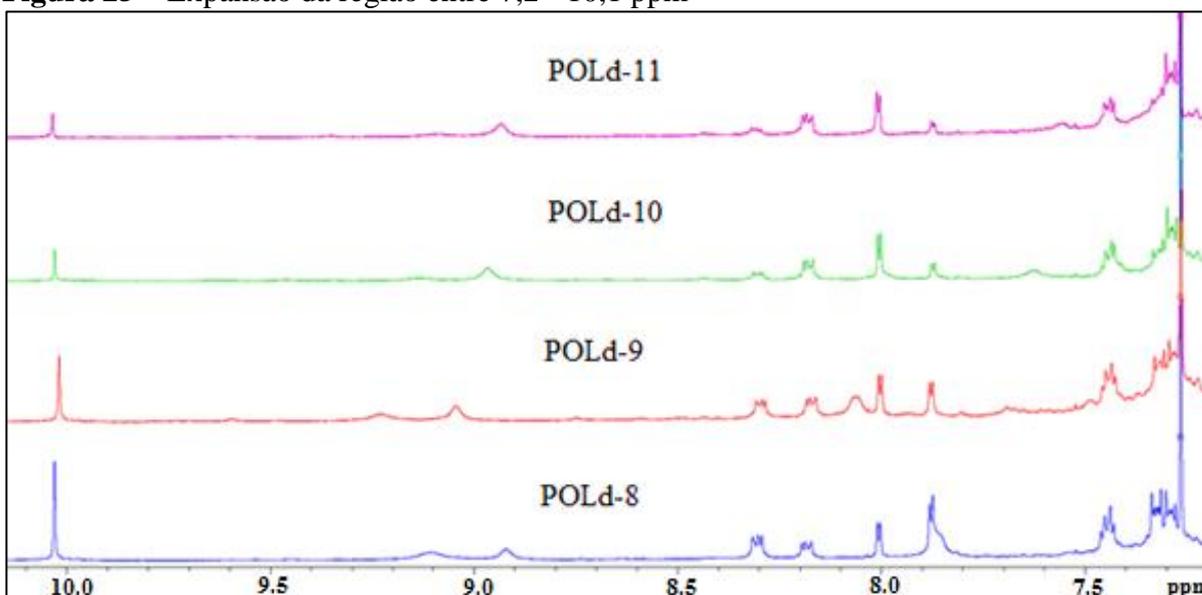
Fonte: Do autor (2023).

Figura 24 – Comparação entre os espectros de RMN-¹H dos extratos POLd-8 (azul), 9 (vermelho), 10 (verde), 11 (roxo) (CDCl₃ – 400 MHz)



Fonte: Do autor (2023).

Figura 25 – Expansão da região entre 7,2 - 10,1 ppm

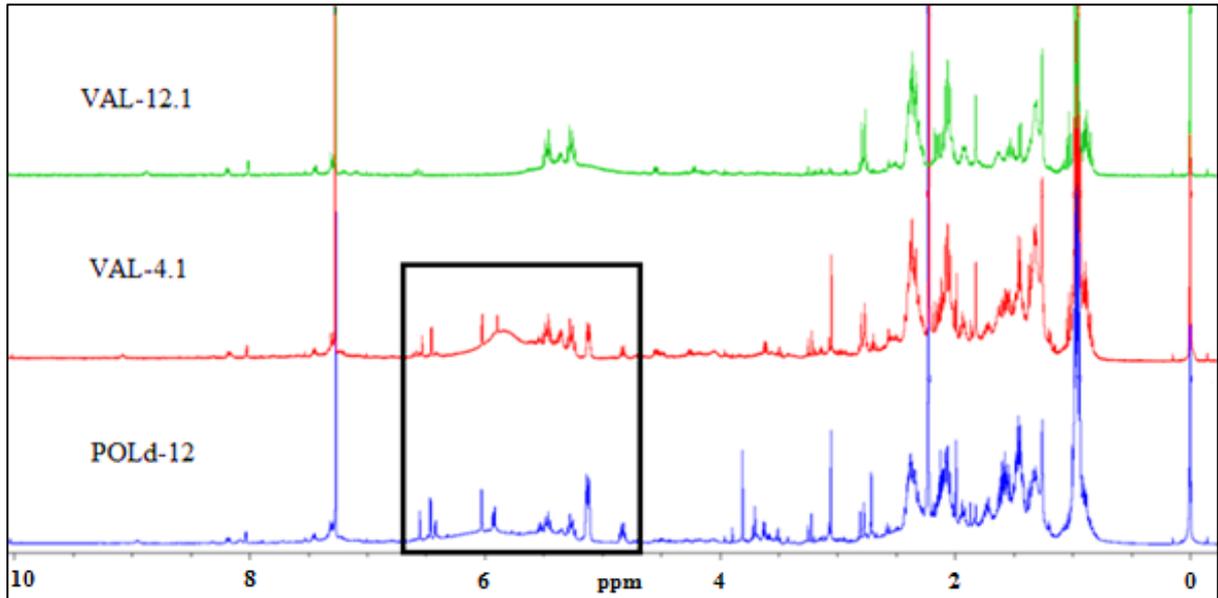


Fonte: Do autor (2023).

A partir da análise dos espectros presentes nas **Figuras 22, 23, 24 e 25**, que foram obtidos de extratos no início do cultivo do fungo *Lasiodiplodia* sp., notam-se sinais de hidrogênios, além de alguns citados anteriormente, que se destacam na região entre 7,3 e 10,1 ppm, que são característicos de hidrogênios pertencentes a sistemas aromáticos. Nestes extratos os sinais entre 6,0 – 6,5 ppm não foram observados.

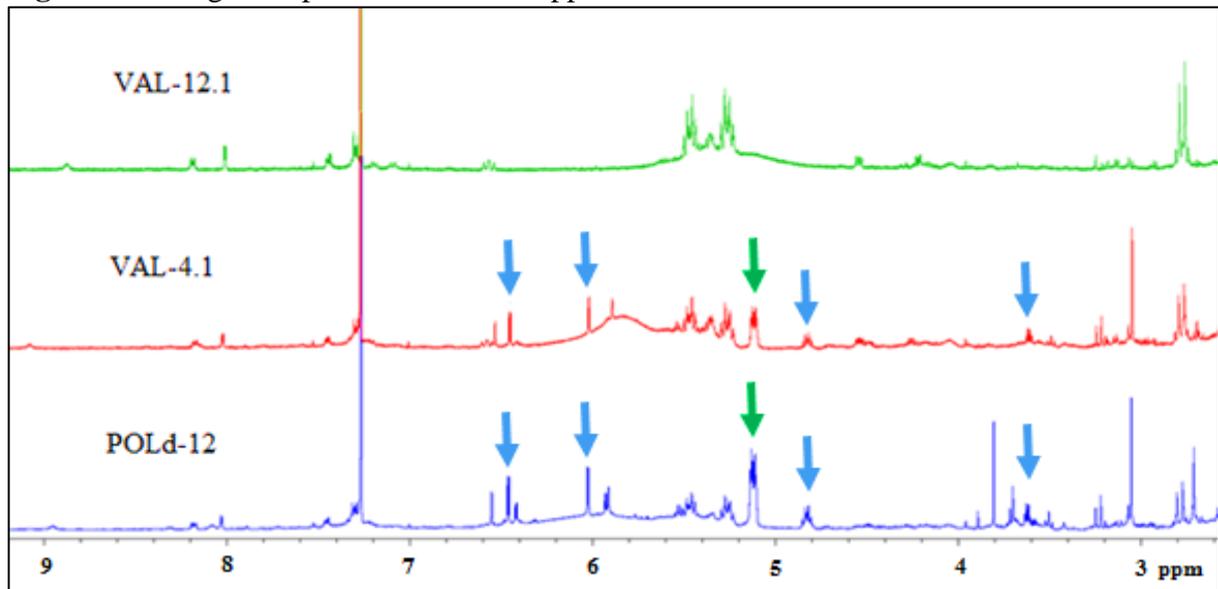
Nas **Figuras 26 e 27**, foram comparados os espectros de RMN-¹H dos extratos VAL-4.1, 12.1 e POLd-12, nos quais foram observadas algumas diferenças nos sinais. O extrato POLd-12 foi incluído para fins de comparação, uma vez que todos esses extratos foram fermentados pelo mesmo período de 12 dias.

Figura 26 – Comparação entre os espectros de RMN-¹H dos extratos POLd-12 (azul), VAL-4.1 (vermelho) e 12.1 (verde) (CDCl₃ – 400 MHz)



Fonte: Do autor (2023).

Figura 27 – Região expandida entre 3 - 9 ppm



Fonte: Do autor (2023).

Legenda: ↓: Sinais do composto 3-carboxi-2-metileno-4-heptanolida



↓: Sinais do composto ácido decumbico



Os extratos VAL-4.1 e VAL-12.1 foram cultivados empregando-se quantidades diferentes de fontes de carbono e de nitrogênio para o cultivo do endófito *Lasiodiplodia* sp. (VAL-4.1: glicose = 24 g/L, sacarose = 24 g/L e NaNO₃ = 0,85 g/L; VAL-12.1: glicose = 15 g/L, sacarose = 30 g/L e NaNO₃ = 1,65 g/L) estas quantidades de nutrientes foram estabelecidas para o planejamento experimental realizado em trabalho anterior, enquanto, para o ponto ótimo (PO) após o planejamento experimental, onde se conseguiu melhores massas de extratos as fontes de carbono e de nitrogênio foram estabelecidas como sendo POLd: glicose = 15 g/L, sacarose = 24 g/L e NaNO₃ = 0,85 g/L (**APÊNDICE A**). Para que fosse possível comparar os espectros, foi escolhido o espectro do ponto ótimo obtido após 12 dias de cultivo, como os obtidos para os extratos VAL-4.1 e 12.1 (12 dias de cultivo). Ao se comparar os espectros VAL-4.1 e VAL-12.1 ambos apresentam uma similaridade de 0,818, enquanto VAL-4.1 com POLd-12 e POLd-14 a similaridade apresenta-se um pouco maior 0,865 e 0,883, respectivamente. Essa similaridade indica que existem semelhanças entre a maior parte dos picos presentes nos espectros, que por sua vez, indicam semelhanças entre as moléculas presentes nos extratos. Quando se compara sinais da região onde se encontram alguns dos hidrogênios das substâncias identificadas neste trabalho (ácido decumbico e 3-carboxi-2-metileno-4-heptanolida), é possível observar que enquanto o extrato VAL-4.1 apresenta os sinais característicos dos compostos identificados no extrato POLd-14 e também no extrato POLd-12 (similaridade calculada 0,883 e 0,865, respectivamente), estes mesmos sinais na região ente 5,12-6,46 ppm não estão presentes no extrato VAL-12.1, o que pode indicar que durante o cultivo de 12 dias do fungo *Lasiodiplodia* sp., utilizando-se quantidades superiores de sacarose e de fonte de nitrogênio NaNO₃ (extrato VAL-12.1) pode ter havido algum bloqueio no metabolismo das substâncias identificadas neste trabalho, pelo excesso das fontes de carbono e nitrogênio. É possível observar que tanto para obtenção do extrato VAL-4.1 como para o extrato POLd-12 as quantidades de sacarose e de NaNO₃ foram idênticas. É importante ressaltar que os metabolitos produzidos em meios de fermentação distintos podem variar devido ao estresse causado tanto pela falta como pelo excesso de nutrientes durante o processo fermentativo (ABDELRAZEK *et al.*, 2020; GU *et al.*, 2021; WANG; NYSETVOLD; ZHOU, 2021).

Também é importante destacar que os compostos identificados neste estudo não estão presentes em estudos prévios realizados em nosso grupo de pesquisa, com o cultivo do *Lasiodiplodia* sp. (GÓMEZ, 2022). Essa diferença pode ser atribuída à utilização de diferentes quantidades/fontes de carbono e nitrogênio, bem como, pelo número de dias de cultivo do fungo endofítico *Lasiodiplodia* sp. Essas diferenças entre os resultados obtidos revela a importância de se controlar as variáveis relacionadas ao cultivo de fungos para que estes consigam ativar as

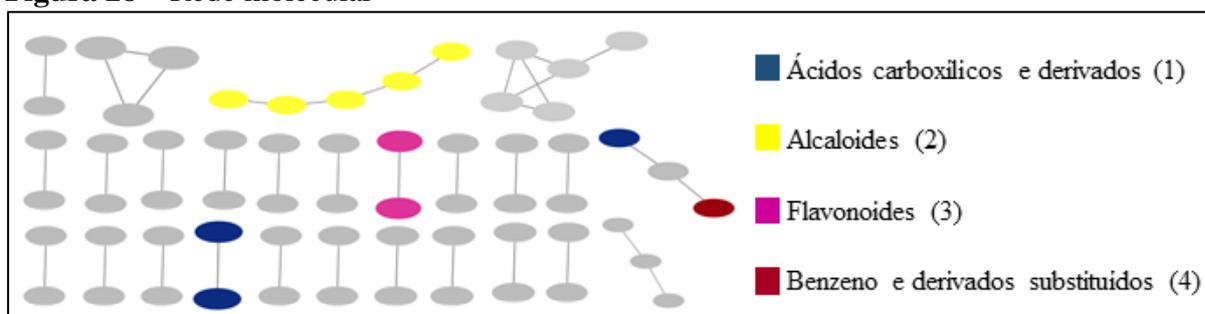
rotas biossintéticas desejadas com finalidade de se direcionar a produção de determinadas substâncias de interesse biotecnológico e industrial.

5.4 REDE MOLECULAR

A plataforma online GNPS é uma ferramenta gratuita que se concentra no armazenamento, análise e divulgação de espectros de massas e fragmentações MS/MS. Além disso, ela oferece recursos para o compartilhamento comunitário de espectros brutos, agrupamento e criação de redes moleculares (PILON *et al.*, 2021). Considerando o potencial dessa plataforma, foram utilizados os dados de MS/MS dos extratos POLd-4, 7, 8, 9, 11 e 14, retirando os demais extratos que não apresentavam anotação de compostos. Esses dados foram submetidos à análise no GNPS, visando identificar as classes dos constituintes químicos presentes nos extratos. Para esse propósito, foram geradas redes moleculares com base nas informações mencionadas anteriormente. No total, foram criadas vinte e seis redes moleculares, e foram anotadas quatro classes de compostos.

As redes moleculares são compostas por nós (*nodes*) conectados por arestas (*edges*), resultando na formação de grupos (*clusters*) compostos por metabólitos análogos que apresentam perfis de fragmentação semelhantes (PILON *et al.*, 2021). Os *nodes* foram organizados com base nos íons precursores analisados nos extratos. As *edges* foram organizadas com base no valor do cosseno, variando de 0,70 a 1, onde o valor 1 indica espectros idênticos. Os *clusters* foram formados e organizados em diferentes cores para representar as classes de compostos identificados no GNPS (CALDAS; ZIED; SARTORELLI, 2022). Na **Figura 28** abaixo, é apresentada as redes moleculares resultante desse processo.

Figura 28 – Rede molecular



Fonte: Do autor (2023).

No *cluster* 1, foram identificados os íons precursores $m/z = 133$ e 255 , com valor de cosseno de 0,89, evidenciando uma fragmentação característica da classe de ácidos carboxílicos e seus derivados. Na rede molecular, também foram identificados os íons precursores $m/z = 233$, 253 , 281 e 587 , os quais foram reconhecidos como metabólitos pertencentes à classe dos alcaloides (*cluster* 2). Além disso, os íons precursores $m/z = 281$ e 587 exibiram um valor de cosseno de 0,87. O *cluster* 3 é constituído pelos íons precursores $m/z = 255$ e 281 , com cosseno de 0,72, anotados como metabólitos pertencentes à classe dos flavonoides. Vale destacar que essa classe é comumente encontrada em extratos do caldo de fermentação de fungos endofíticos (PRAPTIWI; FATHONI; ILYAS, 2020). Por fim, o *cluster* 4 é composto pelos íons precursores $m/z = 165$, 255 e 253 . O íon $m/z = 165$ foi identificado como pertencente à classe de ácidos carboxílicos e seus derivados, enquanto o íon $m/z = 253$ foi associado à classe de benzeno e seus derivados substituídos. Por sua vez, o íon precursor $m/z = 255$ apresentou cossenos de 0,74 e 0,72 com os íons $m/z = 165$ e 253 , respectivamente.

Através da plataforma GNPS, foi viável analisar as diferentes classes de compostos presentes nos extratos, que incluem ácidos carboxílicos e seus derivados, alcaloides, benzeno e derivados substituídos, além dos flavonoides. Esses resultados estão em concordância com as informações documentadas na literatura (PELLISSIER *et al.*, 2021; SALVATORE; ALVES; ANDOLFI, 2020) e também com os dados obtidos neste estudo, reforçando e corroborando com os resultados obtidos.

5.5 TOXICIDADE

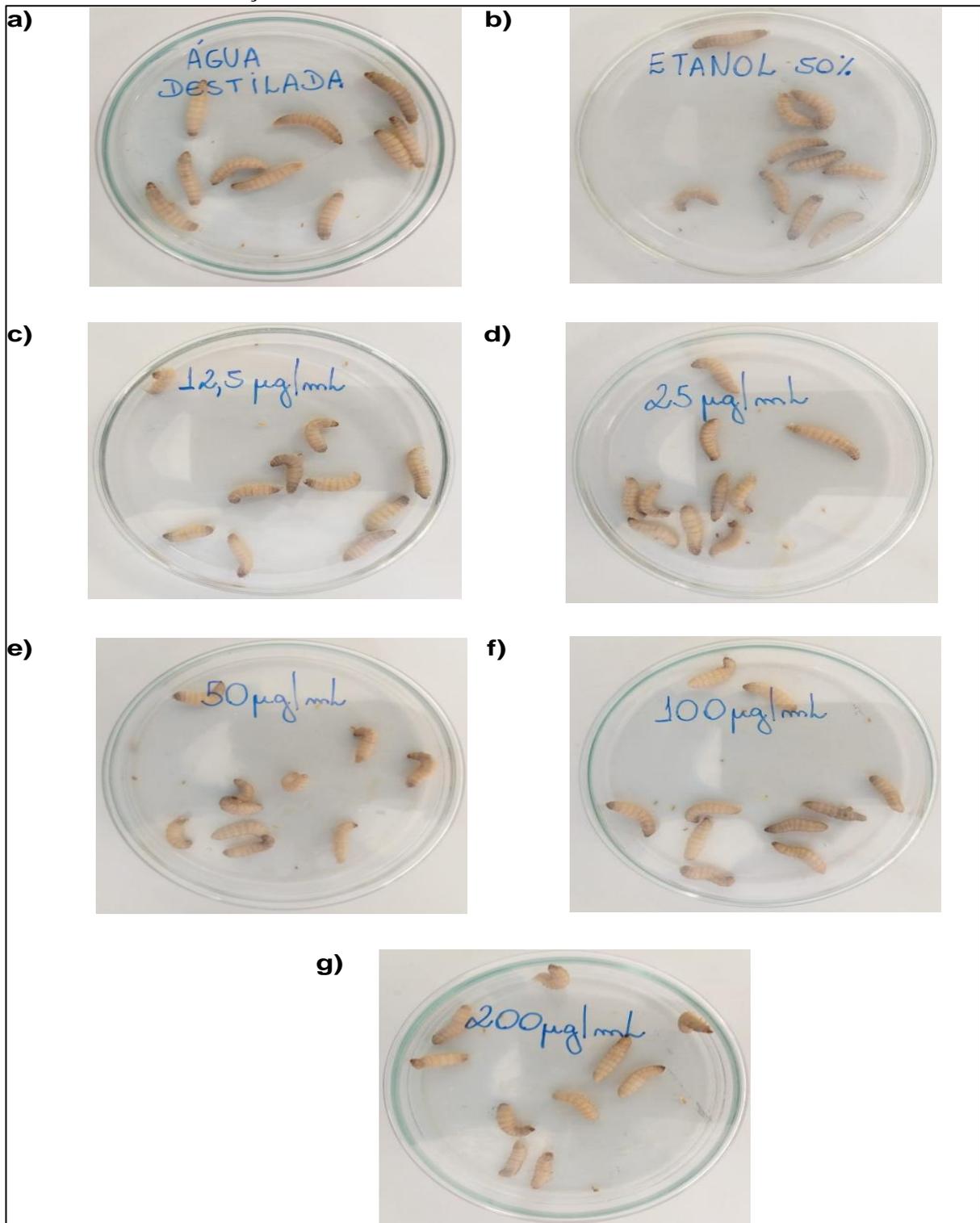
Para estudar diversas doenças, bem como o potencial *in vivo* de novos candidatos a fármacos, é essencial desenvolver modelos usando animais confiáveis que mimetizem as manifestações clínicas em humanos. Modelos de mamíferos são populares e muitas vezes insubstituíveis devido à sua fisiologia semelhante à dos humanos. No entanto, o alto custo e questões éticas complicam seu uso, especialmente quando se trata de ambientes de grande escala. Modelos de invertebrados oferecem uma possibilidade real como modelos de triagem *in vivo* em estágio inicial, em uma tentativa de diminuir o número de candidatos para posterior avaliação em modelos de mamíferos (WOJDA *et al.*, 2020). Invertebrados são excluídos do Animals Act 1986 (HOLLANDS, 1986); portanto, as restrições éticas são relativamente limitadas. Embora os insetos não tenham um sistema imunológico adaptativo, eles têm um sistema imunológico inato semelhante ao dos mamíferos (ANDREA; KROGFELT; JENSSEN, 2019).

Entre os modelos de toxicidade *in vivo*, a larva da mariposa *G. mellonella* oferece várias vantagens atraentes, incluindo a capacidade de incubar a 37 °C, ciclo de desenvolvimento e vida útil curta, facilidade de reprodução, descendência numerosa e tamanho conveniente para manuseio. A popularidade do uso de invertebrados em ensaios de toxicidade *in vivo* aumentou notavelmente na última década, com uma infinidade de estudos fornecendo evidências de que a *G. mellonella* é um modelo confiável e eficiente para testar a patogenicidade de bactérias, fungos e vírus, bem como testar a eficácia e toxicidade de compostos (ANDREA; KROGFELT; JENSSEN, 2019; WOJDA *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2018).

Neste estudo, a toxicidade *in vivo* foi avaliada através da quantidade de larvas de *G. mellonella* vivas através da inspeção visual da cor e ausência de movimento ao toque, após a inoculação com diferentes concentrações do extrato POLd-11, o extrato foi escolhido levando em considerações a quantidade disponível e também baseado nos resultados promissores das atividades antimicrobianas realizadas anteriormente (MOREIRA *et al.*, 2022). Verificou-se após 24, 48 e 72 horas de exposição ao extrato que a taxa de sobrevivência das larvas foi de 100% em todas as concentrações testadas 12,50; 25; 50; 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e controles água destilada estéril e solvente etanol 50% (**Figura 29**), indicando que não houve efeito tóxico dos componentes do extrato neste ensaio, pois as larvas não apresentaram alterações de cor, como manchas escuras ou melanização aparente.

As qualificações para se obter um potencial candidato a novo fármaco ou substância química com significativas propriedades ativas dependem de certos fatores como eficácia, segurança, interações e baixa toxicidade (PAVELIĆ *et al.*, 2020). O resultado obtido nesta pesquisa demonstrou que o extrato POLd-11 é seguro nas concentrações testadas em relação à toxicidade *in vivo* em *G. mellonella*, sugerindo possíveis aplicações terapêuticas.

Figura 29 – Toxicidade *in vivo* do extrato POLd-11 em larvas de *G. mellonella* após 72 horas de inoculação



Fonte: Do autor (2023).

Legenda: **a)** Controle: Água Destilada Estéril

b) Controle: Solvente Etanol 50%

c) Solução de 12,50 µg.mL⁻¹

d) Solução de 25 µg.mL⁻¹

e) Solução de 50 µg.mL⁻¹

f) Solução de 100 µg.mL⁻¹

g) Solução de 200 µg.mL⁻¹

6 CONCLUSÃO

O processo fermentativo realizado pelo fungo endofítico *Lasiodiplodia* sp., isolado do ipê roxo (*Handroanthus impetiginosus*), resultou na obtenção de quatorze extratos orgânicos acetato de etila com comprovada capacidade antioxidante, conforme demonstrado pelas metodologias DPPH, FRAP e ABTS+●. Esses resultados sugerem que o endófito *Lasiodiplodia* sp. possui um potencial promissor na produção de compostos com atividades antioxidantes. Vale ressaltar que os melhores resultados foram observados nos extratos cultivados por um período de seis (POLd-6) a onze (POLd-11) dias. Nos espectros de RMN-¹H dos extratos POLd-4 a 7, observa-se a presença de sinais de compostos aromáticos e a ausência das lactonas identificadas. Nos extratos POLd-8 a 11, a concentração dos compostos aromáticos diminui gradativamente. A partir do extrato POLd-12, os hidrogênios olefínicos começam a surgir, ao passo que os compostos aromáticos se tornam minoritários.

Através da análise de componentes principais, foi possível identificar a relação entre os 14 extratos estudados. O modelo obtido revelou-se eficaz na interpretação do comportamento desses extratos, levando em consideração os resultados dos testes antioxidantes realizados. Ao analisar os gráficos de *Scores* e *Loadings* na PC1, que explicou 78,34% da variância total, observou-se uma clara separação dos 14 extratos em dois grupos distintos, correspondentes aos diferentes períodos de fermentação. Além disso, todas as variáveis analisadas (DPPH, FRAP e ABTS+●) mostraram-se diretamente proporcionais, demonstrando uma forte e moderada correlação entre os teores de compostos fenólicos totais, flavonoides e DPPH, com coeficientes de correlação de Pearson de 0,70 e 0,53, respectivamente.

A técnica de RMN tem ganhado cada vez mais reconhecimento como uma poderosa ferramenta na identificação de metabólitos secundários em misturas complexas, permitindo a elucidação estrutural de compostos presentes no extrato POLd-14. Neste estudo, a RMN foi utilizada com sucesso para identificar e caracterizar dois compostos conhecidos, a 3-carboxi-2-metileno-4-heptanolida e o ácido decumbico. Não há relatos na literatura sobre esses compostos apresentando atividade antioxidante, o que estimula a realização de estudos adicionais para aprofundar o conhecimento sobre esses compostos.

Através do cálculo da similaridade entre os espectros de RMN-¹H, foi viável realizar a comparação da composição química dos extratos de *Lasiodiplodia* sp. em diferentes estágios do cultivo. Essa análise permitiu identificar os perfis de RMN-¹H com maior similaridade, indicando uma possível similaridade estrutural associada aos metabólitos específicos produzidos pelo fungo em uma determinada fase de seu ciclo de crescimento.

Por meio da plataforma GNPS, foi possível sugerir as classes dos compostos presentes nos extratos, incluindo ácidos carboxílicos e derivados, alcaloides, benzeno e derivados substituídos, bem como flavonoides. Esses resultados corroboram com as informações descritas na literatura e com os dados obtidos nesta pesquisa, fornecendo uma confirmação dos resultados.

Além disso, os resultados desta pesquisa demonstraram que o extrato POLd-11 é seguro nas concentrações testadas, em relação à toxicidade *in vivo* em larvas de *G. mellonella*.

REFERÊNCIAS

- ABDELRAZEK, M. M. *et al.* Effect of Changing Culture Media on Metabolites of Endophytic Fungi from *Halocnemum strobilaceum*. **Archives of Pharmaceutical Sciences Ain Shams University**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 135-144, 2020.
- AINSWORTH, E. A.; GILLESPIE, K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 875–877, 2007.
- AKBARI, B. *et al.* The role of plant-derived natural antioxidants in reduction of oxidative stress. **BioFactors**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 611–633, 2022.
- AMIRZAKARIYA, B. Z.; SHAKERI, A. Bioactive terpenoids derived from plant endophytic fungi: An updated review (2011–2020). **Phytochemistry**, [s. l.], v. 197, p. 113130, 2022.
- ANDREA, A.; KROGFELT, K. A.; JENSSEN, H. Methods and challenges of using the greater wax moth (*Galleria mellonella*) as a model organism in antimicrobial compound discovery. **Microorganisms**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 85, 2019.
- ANOWAR, F.; SADAOU, S.; SELIM, B. Conceptual and empirical comparison of dimensionality reduction algorithms (pca, kpca, lda, mds, svd, lle, isomap, le, ica, t-sne). **Computer Science Review**, [s. l.], v. 40, p. 100378, 2021.
- ARON, A. T. *et al.* Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 1954-1991, 2020.
- AUGUSTYN, W.; VILJOEN, A.; SCHRIPSEMA, J. Metabolomics of baobab oil—Analysis and authentication of cyclopropenoid fatty acids using similarity and differential NMR spectroscopy. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s. l.], v. 102, p. 104000, 2021.
- BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, [s. l.], v. 23, p. 629–643, 2010.
- BARRA, I. *et al.* Soil spectroscopy with the use of chemometrics, machine learning and pre-processing techniques in soil diagnosis: Recent advances—A review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 135, p. 116166, 2021.
- BECKER, M. M. *et al.* Determination of the antioxidant capacity of red fruits by miniaturized spectrophotometry assays. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 30, p. 1108–1114, 2019.
- BIBI SADEER, N. *et al.* The versatility of antioxidant assays in food science and safety—Chemistry, applications, strengths, and limitations. **Antioxidants**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 709, 2020.
- BRERETON, R. G. A short history of chemometrics: a personal view. **Journal of Chemometrics**, [s. l.], v. 28, n. 10, p. 749-760, 2014.
- BRERETON, R. G. Pattern recognition in chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, [s. l.], v. 149, p. 90–96, 2015.

- BROWN, S. D. The chemometrics revolution re-examined. **Journal of Chemometrics**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. e2856, 2017.
- BUDIARSO, F. S. *et al.* Antioxidant Activity of Methanol Fractions Stem Bark of Kayu Sarampa (*Xylocarpus moluccensis* (Lam.) M. Roen). **Pharmacognosy Journal**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 1694–1701, 2021.
- CAICEDO, N. H. *et al.* Antioxidant activity of exo-metabolites produced by *Fusarium oxysporum*: An endophytic fungus isolated from leaves of *Otoba gracilipes*. **MicrobiologyOpen**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. e903, 2019.
- CALDAS, L. A.; ZIED, D. C.; SARTORELLI, P. Dereplication of extracts from nutraceutical mushrooms *Pleurotus* using molecular networking approach. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 370, p.131019, 2022.
- CHIRINOS, R. *et al.* Effect of Prolonged Cold Storage on the Dynamics of the Enzymatic and Non-Enzymatic Antioxidant System in the Mesocarp of Avocado (*Persea americana*) cv. Hass: Relationship with Oxidative Processes. **Horticulturae**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 880, 2022.
- DA SILVA, M. H. R. *et al.* Endophytic fungi from *Passiflora incarnata*: an antioxidant compound source. **Archives of Microbiology**, [s. l.], v. 202, n. 10, p. 2779–2789, 2020.
- DE CARVALHO, N. K. G. *et al.* Perfil Químico e Análise Antioxidante *in vitro* do extrato e fração de *Auxemma glazioviana* Taub. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. e9699109387-e9699109387, 2020.
- DE MEDEIROS, A. G. *et al.* Bioprospecting of *Diaporthe terebinthifolii* LGMF907 for antimicrobial compounds. **Folia Microbiologica**, [s. l.], v. 63, n. 4, p. 499-505, 2018.
- DE SILVA, N. I. *et al.* Phylogeny and morphology of *Lasiodiplodia* species associated with *Magnolia forest* plants. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.
- DESHMUKH, S. *et al.* Endophytic fungi: A source of potential antifungal compounds. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 77, 2018.
- DISSANAYAKE, A. J. *et al.* Botryosphaeriaceae: Current status of genera and species. **Mycosphere**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 1001–1073, 2016.
- DONG, J-W. *et al.* Re-evaluation of ABTS•+ assay for total antioxidant capacity of natural products. **Natural Product Communications**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 1934578X1501001239, 2015.
- DOS SANTOS RIBEIRO, H. S.; DAGNINO, D.; SCHRIPSEMA, J. Rapid and accurate verification of drug identity, purity and quality by 1H-NMR using similarity calculations and differential NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 199, p. 114040, 2021.
- DUTTA, M. *et al.* Characterization and metabolomic profiling of two pigment producing fungi from infected fruits of Indian Gooseberry. **Archives of Microbiology**, [s. l.], v. 205, n. 4, p. 141, 2023.
- EBERT, T. *et al.* Ageing – Oxidative Stress, PTMs and Disease. **Molecular Aspects of Medicine**, [s. l.], v. 86, p. 101099, 2022.

- EGAN, J. M. *et al.* Development of an NMR-based platform for the direct structural annotation of complex natural products mixtures. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 84, n. 4, p. 1044-1055, 2021.
- ESAN, A. M. *et al.* Comparative effects of indole acetic acid and salicylic acid on oxidative stress marker and antioxidant potential of okra (*Abelmoschus esculentus*) fruit under salinity stress. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 216, p. 278–283, 2017.
- FADIJI, A. E.; BABALOLA, O. O. Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 8, p. 467, 2020.
- FIGUEIREDO FILHO, D. B.; SILVA JÚNIOR, J. A. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 115–146, 2009.
- FLIEGER, J. *et al.* Antioxidants: Classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles. **Materials**, [s. l.], v. 14, n. 15, p. 4135, 2021.
- FLORIS, M. *et al.* A generalizable definition of chemical similarity for read-across. **Journal of Cheminformatics**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1-7, 2014.
- GAO, Y-M. *et al.* Adeninealkylresorcinol, the first alkylresorcinol tethered with nucleobase from *Lasiodiplodia* sp. **Fitoterapia**, [s. l.], v. 112, p. 254–259, 2016.
- GAO, Z. *et al.* Exogenous methyl jasmonate promotes salt stress-induced growth inhibition and prioritizes defense response of *Nitraria tangutorum* Bobr. **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v. 172, n. 1, p. 162–175, 2021.
- GEORGE, J. *et al.* Evaluation of Antioxidant Capacity (ABTS and CUPRAC) and Total Phenolic Content (Folin-Ciocalteu) Assays of Selected Fruit, Vegetables, and Spices. **International Journal of Food Science**, [s. l.], v. 2022, 2022.
- GÓMEZ, Omar Cabezas. Identificação de metabólitos secundários com potencial antimicrobiano produzidos pelo fungo endofítico *Lasiodiplodia* sp. isolado do Ipê rosa (*Handroanthus impetiginosus*). 2022. 170 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.
- GRANATO, D. *et al.* Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 72, p. 83–90, 2018.
- GU, S. *et al.* Characterization and inhibition of four fungi producing citrinin in various culture media. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 43, p. 701-710, 2021.
- GULCIN, İ. Antioxidants and Antioxidant Methods: an Updated Overview. **Archives of Toxicology**, [s. l.], v. 94, n. 3, p. 651–715, 2020.
- HALAGARDA, M. *et al.* Antioxidant activity and phenolic profile of selected organic and conventional honeys from Poland. **Antioxidants**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 44, 2020.

- HAMILL, P. G. *et al.* Microbial lag phase can be indicative of, or independent from, cellular stress. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 5948, 2020.
- HARDOIM, P. R. *et al.* The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.
- HARESMITA, P. P.; PRADANI, M. P. K. Determination Of Total Flavonoid In Jamu “X” With Uv-Visible Spectrophotometric Methods. **Jurnal Farmasi Sains Dan Praktis**, p. 155-161, 2022.
- HASSANE, A. M. A. *et al.* Radical scavenging potency, HPLC profiling and phylogenetic analysis of endophytic fungi isolated from selected medicinal plants of Saudi Arabia. **Electronic Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 58, p. 37–45, 2022.
- HE, G.; MATSUURA, H.; YOSHIHARA, T. Isolation of an α -methylene- γ -butyrolactone derivative, a toxin from the plant pathogen *Lasiodiplodia theobromae*. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 65, n. 20, p. 2803-2807, 2004.
- HOLLANDS, C. The animals (scientific procedures) act 1986. **Lancet (London, England)**, [s. l.], v. 2, n. 8497, p. 32–33, 1986.
- HONGYU, K. *et al.* Análise de componentes principais: resumo teórico, aplicação e interpretação. **E&S Engineering and Science**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 83–90, 2016.
- IONITA, P. The chemistry of DPPH· free radical and congeners. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 1545, 2021.
- JINU, M. V.; GINI, C. K.; JAYABASKARAN, C. *In vitro* antioxidant activity of cholestanol glucoside from an endophytic fungus *Lasiodiplodia theobromae* isolated from *Saraca asoca*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 952–962, 2015.
- KANAUIA, R. *et al.* P213 *Lasiodiplodia theobromae*: an emerging human pathogen. **Medical Mycology**, [s. l.], v. 60, n. Supplement_1, p. myac072P213, 2022.
- KANG, K. B. *et al.* Comprehensive mass spectrometry-guided phenotyping of plant specialized metabolites reveals metabolic diversity in the cosmopolitan plant family *Rhamnaceae*. **The Plant Journal**, [s. l.], v. 98, n. 6, p. 1134-1144, 2019.
- KHARWAR, R. N. *et al.* Anticancer compounds derived from fungal endophytes: Their importance and future challenges. **Natural Product Reports**, [s. l.], v. 28, n. 7, p. 1208-1228, 2011.
- KOGEL, K. H.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite—what decides?. **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 358–363, 2006.
- KOTHA, R. R. *et al.* Oxidative Stress and Antioxidants—A Critical Review on *In vitro* Antioxidant Assays. **Antioxidants**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 2388, 2022.
- KUMAR, C. G.; MONGOLLA, P.; POMBALA, S. Lasiosan, a new exopolysaccharide from *Lasiodiplodia* sp. strain B2 (MTCC 6000): structural characterization and biological evaluation. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 72, p. 162–169, 2018.

- LACERDA, Í. C. dos S.; POLONIO, J. C.; GOLIAS, H. C. Endophytic Fungi as a Source of Antiviral Compounds – A Review. **Chemistry & Biodiversity**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. e202100971–n/a, 2022.
- LEE, A. L. *et al.* Effect of germination on composition profiling and antioxidant activity of the polysaccharide-protein conjugate in black soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 113, p. 601-606, 2018.
- LI, Y. *et al.* Quality assessment of herbal medicines based on chemical fingerprints combined with chemometrics approach: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 185, p. 113215, 2020.
- LIANG, R. *et al.* PLA-lignin nanofibers as antioxidant biomaterials for cartilage regeneration and osteoarthritis treatment. **Journal of Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. NA, 2022.
- LV, S. *et al.* Relationship between Apelin/APJ Signaling, Oxidative Stress, and Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2021, p. 1–7, 2021.
- MAITRA, U. *et al.* Drug Discovery from Natural Products – Old Problems and Novel Solutions for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 210, p. 114553, 2022.
- MARIANO, R. L. *et al.* Antileishmanial Activity and Chemical Composition of Hydroalcoholic Extracts from Different Parts of *Handroanthus impetiginosus* (Ipê-Roxo). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 32, p. 851–857, 2022.
- MARTINEZ-MORALES, F. *et al.* Use of standardized units for a correct interpretation of IC₅₀ values obtained from the inhibition of the DPPH radical by natural antioxidants. **Chemical Papers**, [s. l.], v. 74, p. 3325-3334, 2020.
- MEDA, A. *et al.* Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 91, n. 3, p. 571-577, 2005.
- MIHAILOVIĆ, N. R. *et al.* Analysis of phenolics in the peel and pulp of wild apples (*Malus sylvestris* (L.) Mill.). **Journal of Food Composition and Analysis**, [s. l.], v. 67, p. 1-9, 2018.
- MIRANDA-QUINTANA, R. A. *et al.* Differential consistency analysis: which similarity measures can be applied in drug discovery?. **Molecular Informatics**, [s. l.], v. 40, n. 7, p. 2060017, 2021.
- MOREIRA, D. M. B. *et al.* Optimizing the Culture Medium of *Lasiodiplodia* sp. to Improve the Yield of Ethyl Acetate Extract as an Antimicrobial Source. **Current Microbiology**, [s. l.], v. 79, n. 8 p. 222, 2022.
- MURPHY, E. J. *et al.* β-glucanos. **Enciclopédia**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 831–847, 2021.
- NISSOLA, C. *et al.* Hydrogel containing (1→6)-β-D-glucan (lasiodiplodan) effectively promotes dermal wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 183, p. 316–330, 2021.

- NUR-SHAKIRAH, A. O. *et al.* Characterization of *Lasiodiplodia* Species Causing Leaf Blight, Stem Rot and Fruit Rot of Fig (*Ficus carica*) in Malaysia. **Plant Pathology**, [s. l.], v. 71, n. 7, p. 1594–1605, 2022.
- OLIVEIRA, G. L. da S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s. l.], v. 17, p. 36–44, 2015.
- PAVELIĆ, S. *et al.* Technological Advances in Preclinical Drug Evaluation: The Role of -Omics Methods. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 27, n. 8, p. 1337–1349, 2020.
- PEIXOTO, S. *et al.* Teor de flavonoides totais em produtos contendo pata-de-vaca (*Bauhinia* L.) comercializados em farmácias de Recife/PE. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s. l.], v. 14, p. 586-591, 2012.
- PELLISSIER, L. *et al.* Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Inhibitors from the Endophyte *Lasiodiplodia venezuelensis* and Evaluation of Their Antivirulence Effects by Metabolomics. **Microorganisms**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 1807, 2021.
- PELLISSIER, L. *et al.* Isolation and identification of isocoumarin derivatives with specific inhibitory activity against wnt pathway and metabolome characterization of *Lasiodiplodia venezuelensis*. **Frontiers in Chemistry**, [s. l.], v. 9, p. 664489, 2021.
- PILON, A. C. *et al.* Redes moleculares: Uma análise sobre anotações e descoberta de novos ativos. **Química Nova**, [s. l.], v. 44, p. 1168-1179, 2021.
- POWERS, S. K. *et al.* Exercise-Induced Oxidative Stress: Friend or Foe?. **Journal of Sport and Health Science**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 415–425, 2020.
- PRAPTIWI, P.; FATHONI, A.; ILYAS, M. Diversity of endophytic fungi from *Vernonia amygdalina*, their phenolic and flavonoid contents and bioactivities. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, [s. l.], v. 21, n. 2, 2020.
- PREVEDELLO, M. T.; COMACHIO, G. Antioxidantes e sua relação com os radicais livres, e Doenças Crônicas Não Transmissíveis: uma revisão de literatura Antioxidants and their relationship with free radicals, and Chronic Non communicable Diseases: a literature review. **Brazilian Journal of Development**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 55244–55285, 2021.
- PRIMA, S. R. *et al.* Evaluation of Antibacterial and Antioxidant Activity of Endophytic Fungi Isolated from *Capsicum annuum* L. and *Allium cepa* L. **Pharmacognosy Journal**, [s. l.], v. 14, n. 2, 2022.
- PROMMABAN, A. *et al.* Comparison of chemical profiles, antioxidation, inhibition of skin extracellular matrix degradation, and anti-tyrosinase activity between mycelium and fruiting body of *Cordyceps militaris* and *Isaria tenuipes*. **Pharmaceutical Biology**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 225-234, 2022.
- RAMIREZ-GARCIA, O. *et al.* Screening antioxidant capacity of Mexican maize (*Zea mays* L.) landraces with colored grain using ABTS, DPPH and FRAP methods. **Cereal Research Communications**, [s. l.], v. 50, n. 4, p. 1075-1083, 2022.
- RAMOS, A. E. F. *et al.* Natural products targeting strategies involving molecular networking: Different manners, one goal. **Natural Product Reports**, [s. l.], v. 36, n. 7, p. 960-980, 2019.

SAKHRI, A. *et al.* Chemical Composition of *Aspergillus creber* Extract and Evaluation of its Antimicrobial and Antioxidant Activities. **Polish Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 68, n. 3, p. 309–316, 2019.

SALVATORE, M. M.; ALVES, A.; ANDOLFI, A. Secondary Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*: Distribution, Chemical Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. **Toxins**, [s. l.], v. 12, n.7, p. 457, 2020.

SÁNCHEZ-RANGEL, J. C. *et al.* The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. **Analytical Methods**, [s. l.], v. 5, n. 21, p. 5990–5999, 2013.

SAUZIER, G.; VAN BRONSWIJK, W.; LEWIS, S. W. Chemometrics in forensic science: approaches and applications. **Analyst**, [s. l.], v. 146, n. 8, p. 2415–2448, 2021.

SCHRIPSEMA, J. *et al.* Towards a holistic view of tablet quality, an extensive study on paracetamol tablets with nuclear magnetic resonance using similarity calculations, differential NMR and hierarchical cluster analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 215, p. 114773, 2022.

SCHRIPSEMA, J. Similarity and differential NMR spectroscopy in metabolomics: application to the analysis of vegetable oils with 1 H and 13 C NMR. **Metabolomics**, [s. l.], v. 15, p. 1-12, 2019.

SCHRIPSEMA, J.; DA SILVA, S. M.; DAGNINO, D. Differential NMR and chromatography for the detection and analysis of adulteration of vetiver essential oils. **Talanta**, [s. l.], v. 237, p. 122928, 2022.

SCORZONI, L. *et al.* Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast *in vitro* susceptibility profile. **Plos One**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. e60047, 2013.

SETHI, S. *et al.* Significance of FRAP, DPPH, and CUPRAC assays for antioxidant activity determination in apple fruit extracts. **European Food Research and Technology**, [s. l.], v. 246, n. 3, p. 591–598, 2020.

SHEN, N. *et al.* Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. **Food Chemistry**, p. 132531, 2022.

SHRAIM, A. M. *et al.* Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: a critical evaluation. **Lwt**, [s. l.], v. 150, p. 111932, 2021.

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

SOUSA, C. M. de M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, [s. l.], v. 30, p. 351–355, 2007.

STIERLE, A. A.; STIERLE, D. B. Bioactive secondary metabolites produced by the fungal endophytes of conifers. **Natural Product Communications**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 1671–1682, 2015.

- STOIA, M.; OANCEA, S. Low-Molecular-Weight Synthetic Antioxidants: Classification, Pharmacological Profile, Effectiveness and Trends. **Antioxidants**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 638, 2022.
- TAHIR, H. E. *et al.* The use of analytical techniques coupled with chemometrics for tracing the geographical origin of oils: A systematic review (2013–2020). **Food Chemistry**, [s. l.], v. 366, p. 130633, 2022.
- TODESCHINI, R. *et al.* Similarity coefficients for binary chemoinformatics data: overview and extended comparison using simulated and real data sets. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], v. 52, n. 11, p. 2884-2901, 2012.
- TRANTAS, E. A. *et al.* When plants produce not enough or at all: metabolic engineering of flavonoids in microbial hosts. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 6, p. 7, 2015.
- TRESEDER, K. K. *et al.* Nutrient and stress tolerance traits linked to fungal responses to global change: Four case studies. **Elementa: Science of the Anthropocene**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 00144, 2021.
- TUFAIL, M. A. *et al.* Endophytic bacteria perform better than endophytic fungi in improving plant growth under drought stress: A meta-comparison spanning 12 years (2010–2021). **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v. 174, n. 6, p. e13806, 2022.
- UMEOKOLI, B. O. *et al.* A new depsidone derivative from mangrove sediment derived fungus *Lasiodiplotia theobromae*. **Natural Product Research**, p. 2215-2222, 2018.
- UZMA, F. *et al.* Endophytic fungi-alternative sources of cytotoxic compounds: A review. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 9, p. 1-37, 2018.
- VASUNDHARA, M.; KUMAR, A.; REDDY, M. S. Molecular approaches to screen bioactive compounds from endophytic fungi. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 7, p. 1774, 2016.
- VELLOSA, J. C. R. *et al.* Estresse oxidativo: uma introdução ao estado da arte. **Brazilian Journal of Development**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 10152–10168, 2021.
- WANG, B.; YAN, X.; JIANG, Q. Loading-based principal component selection for PCA integrated with support vector data description. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, [s. l.], v. 54, n. 5, p. 1615–1627, 2015.
- WANG, L.; NYSETVOLD, E.; ZHOU, X. G. Culture media promoting sporulation of rice kernel smut fungus *Tilletia barclayana*. **European Journal of Plant Pathology**, [s. l.], v. 161, n. 3, p. 629-635, 2021.
- WANG, M. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016.
- WIST, J. Complex mixtures by NMR and complex NMR for mixtures: experimental and publication challenges. **Magnetic Resonance in Chemistry**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 22-28, 2017.
- WOJDA, I. *et al.* The greater wax moth *Galleria mellonella*: biology and use in immune studies. **Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 78, n. 9, p. ftaa057, 2020.

WOŁOSIAK, R. *et al.* Verification of the conditions for determination of antioxidant activity by ABTS and DPPH assays—A practical approach. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 50, 2022.

YAN, L. *et al.* Production of Bioproducts by Endophytic Fungi: Chemical Ecology, Biotechnological Applications, Bottlenecks, and Solutions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 102, n. 15, p. 6279–6298, 2018.

YIN, H. *et al.* Gentiopicroin-producing endophytic fungus isolated from *Gentiana macrophylla*. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 793-797, 2009.

YIN, H.; SUN, Y-H. Vincamine-producing endophytic fungus isolated from *Vinca minor*. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 18, n. 8-9, p. 802-805, 2011.

YUAN, B. *et al.* NMR for mixture analysis: Concentration-ordered spectroscopy. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 93, n. 28, p. 9697-9703, 2021.

ZHANG, Q. *et al.* Bridging the data gap from in vitro toxicity testing to chemical safety assessment through computational modeling. **Frontiers in Public Health**, [s. l.], v. 6, p. 261, 2018.

ZHANG, X. Y. *et al.* Bioactive Metabolites from the Desert Plant-Associated Endophytic Fungus *Chaetomium globosum* (Chaetomiaceae). **Phytochemistry**, [s. l.], v. 185, p. 112701, 2021.

APÊNDICE A – Massas dos extratos acetato de etila obtidos e meios de cultivos utilizados

Tabela 2 – Massas dos extratos acetato de etila obtidas no processo fermentativo do fungo *Lasiodiplodia* sp.

Identificação dos Extratos	Dias de Fermentação	Massa obtida de extrato bruto AcOEt (mg)
POLd-1	1	7
POLd-2	2	13
POLd-3	3	17
POLd-4	4	52
POLd-5	5	62
POLd-6	6	76
POLd-7	7	71
POLd-8	8	84
POLd-9	9	144
POLd-10	10	173
POLd-11	11	180
POLd-12	12	284
POLd-13	13	275
POLd-14	14	261
POLd-15	15	274
VAL-4.1	12	190±19
VAL-12.1	12	206±50

Fonte: Do autor (2023).

Meio Czapek otimizado (POLd) - Glicose: 15,00 g; Sacarose: 24,00 g; NaNO₃: 0,85 g; K₂HPO₄: 1,00 g; MgSO₄·7H₂O: 0,50 g; KCl: 0,50 g; FeSO₄·7H₂O: 0,01 g; Extrato de Levedura: 1,00 g e Água destilada: 1000 mL.

Meio do extrato VAL-4.1 - Glicose: 24,00 g; Sacarose: 24,00 g; NaNO₃: 0,85 g; K₂HPO₄: 1,00 g; MgSO₄·7H₂O: 0,50 g; KCl: 0,50 g; FeSO₄·7H₂O: 0,01 g; Extrato de Levedura: 1,00 g e Água destilada: 1000 mL.

Meio do extrato VAL-12.1 - Glicose: 15,00 g; Sacarose: 30,00 g; NaNO₃: 1,65 g; K₂HPO₄: 1,00 g; MgSO₄·7H₂O: 0,50 g; KCl: 0,50 g; FeSO₄·7H₂O: 0,01 g; Extrato de Levedura: 1,00 g e Água destilada: 1000 mL.

APÊNDICE B – Matriz utilizada na análise estatística de PCA

Tabela 10 – Matriz utilizada no processamento estatístico de PCA levando em consideração os resultados dos ensaios antioxidantes

Amostras Extratos AcOEt	DPPH ($\mu\text{molET/g}$ de extrato)	FRAP ($\mu\text{molESF/g}$ de extrato)	ABTS+● ($\mu\text{molET/g}$ de extrato)
VAL-4.1	49,63	250,67	66,67
VAL-12.1	75,48	299,83	95,00
POLd-4	79,26	369,93	93,68
POLd-5	88,86	348,61	111,28
POLd-6	105,40	417,33	127,22
POLd-7	109,45	464,24	176,50
POLd-8	99,38	413,17	126,11
POLd-9	79,38	394,87	130,88
POLd-10	89,93	661,70	254,81
POLd-11	97,66	398,25	90,16
POLd-12	67,92	232,31	62,87
POLd-13	91,22	362,58	124,18
POLd-14	63,47	382,29	128,97
POLd-15	80,41	324,53	104,65

Fonte: Do autor (2023).

Tabela 11 – Matriz autoescalada utilizada na análise de componentes principais

Amostras Extratos AcOEt Pontos	DPPH ($\mu\text{molET/g}$ de extrato)	FRAP ($\mu\text{molESF/g}$ de extrato)	ABTS+● ($\mu\text{molET/g}$ de extrato)
VAL-4.1	-2,06	-1,25	-1,12
VAL-12.1	-0,52	-0,78	-0,54
POLd-4	-0,29	-0,10	-0,56
POLd-5	0,28	-0,30	-0,20
POLd-6	1,27	0,36	0,13
POLd-7	1,52	0,81	1,15
POLd-8	0,91	0,32	0,11
POLd-9	-0,28	0,14	0,21
POLd-10	0,35	2,72	2,77
POLd-11	0,81	0,18	-0,64
POLd-12	-0,97	-1,43	-1,20
POLd-13	0,43	-0,17	0,07
POLd-14	-1,23	0,02	0,17
POLd-15	-0,22	-0,54	-0,34
Média	0,00	0,00	0,00
Desvio Padrão	1,00	1,00	1,00
Variância	1,00	1,00	1,00

Fonte: Do autor (2023).

APÊNDICE C – Matrizes utilizadas na análise estatística de Pearson

Tabela 13 – Matriz utilizada na análise de correlação de Pearson - Flavonoides

Amostras Extratos AcOEt	Teor de Flavonoides (µgEQ/mg de extrato)	DPPH (µmolET/g de extrato)	FRAP (µmolESF/g de extrato)	ABTS+● (µmolET/g de extrato)
VAL-4.1	2,10	49,63	250,67	66,67
VAL-12.1	2,39	75,48	299,83	95,00
POLd-4	6,57	79,26	369,93	93,68
POLd-5	2,37	88,86	348,61	111,28
POLd-6	3,83	105,40	417,33	127,22
POLd-7	5,11	109,45	464,24	176,50
POLd-8	4,70	99,38	413,17	126,11
POLd-9	3,51	79,38	394,87	130,88
POLd-10	3,02	89,93	661,70	254,81
POLd-11	4,31	97,66	398,25	90,16
POLd-12	3,19	67,92	232,31	62,87
POLd-13	4,03	91,22	362,58	124,18
POLd-14	2,34	63,47	382,29	128,97
POLd-15	3,04	80,41	324,53	104,65

Fonte: Do autor (2023).

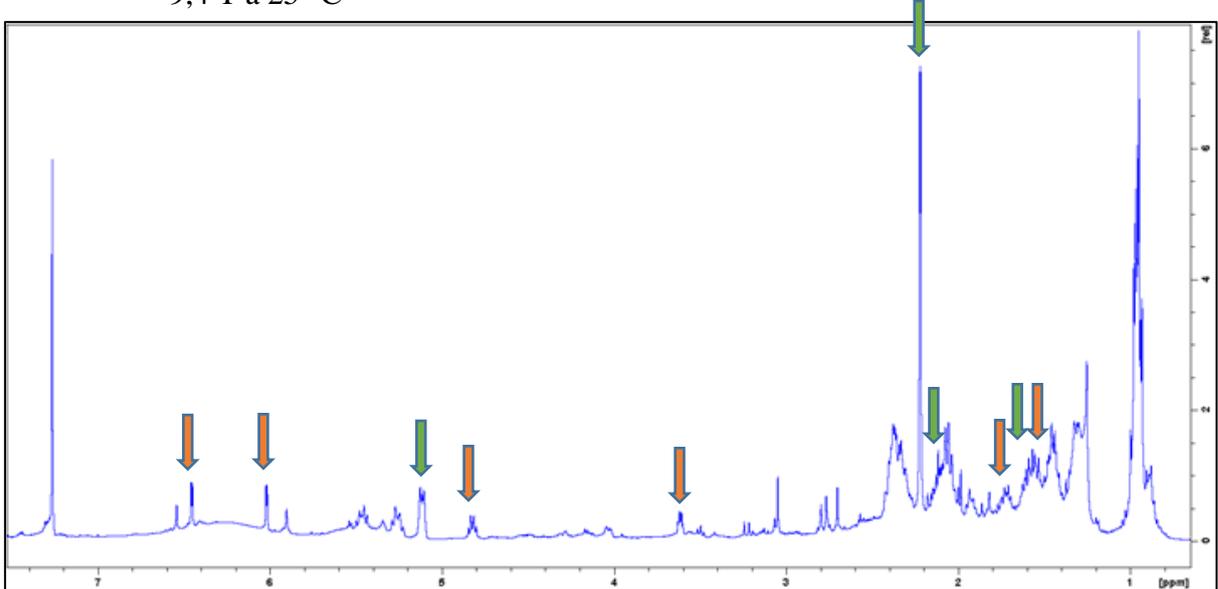
Tabela 14 – Matriz utilizada na análise de correlação de Pearson – Fenólicos Totais

Amostras Extratos AcOEt	Teor de Compostos Fenólicos Totais (µgEAG/mg de extrato)	DPPH (µmolET/g de extrato)	FRAP (µmolESF/g de extrato)	ABTS+● (µmolET/g de extrato)
VAL-4.1	74,00	49,63	250,67	66,67
VAL-12.1	68,67	75,48	299,83	95,00
POLd-4	127,81	79,26	369,93	93,68
POLd-5	166,50	88,86	348,61	111,28
POLd-6	143,94	105,40	417,33	127,22
POLd-7	173,67	109,45	464,24	176,50
POLd-8	146,36	99,38	413,17	126,11
POLd-9	138,46	79,38	394,87	130,88
POLd-10	139,86	89,93	661,70	254,81
POLd-11	103,35	97,66	398,25	90,16
POLd-12	72,25	67,92	232,31	62,87
POLd-13	83,96	91,22	362,58	124,18
POLd-14	87,01	63,47	382,29	128,97
POLd-15	89,54	80,41	324,53	104,65

Fonte: Do autor (2023).

APÊNDICE D – Espectros de RMN do extrato POLd-14

Figura 10 – Sinais identificados no espectro de ^1H do extrato POLd-14 em CDCl_3 – 400 MHz, 9,4 T a 25 °C



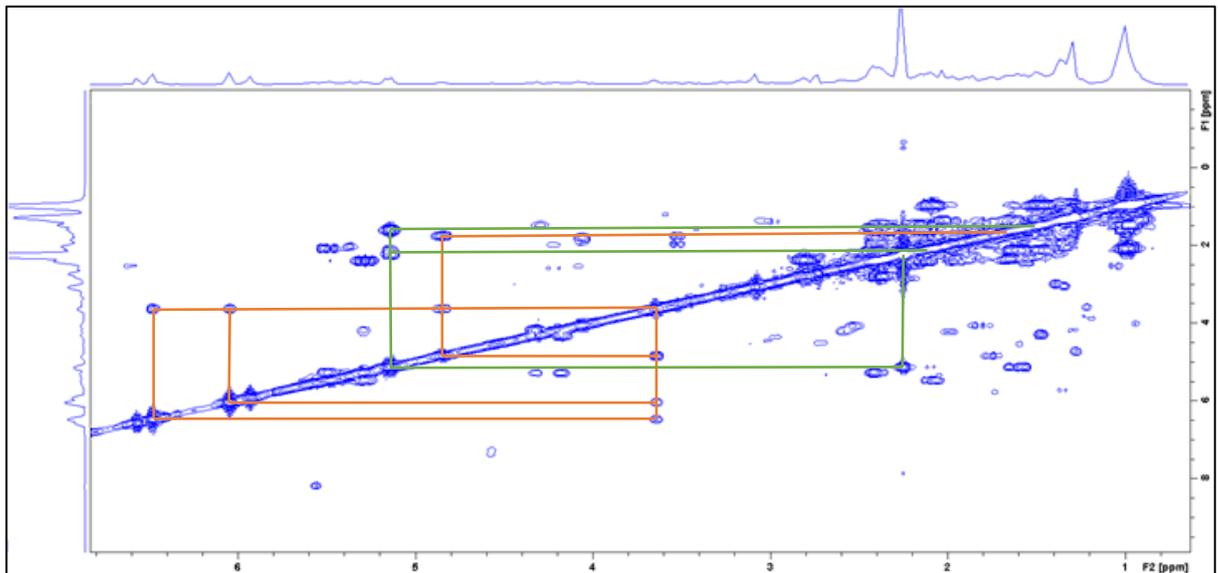
Fonte: Do autor (2023).

Legenda:  : Sinais do composto 3-carboxi-2-metileno-4-heptanolida



: Sinais do composto ácido decumbico

Figura 11 – Correlações observadas no espectro de COSY do extrato POLd-14 em CDCl_3 – 400 MHz, 9,4 T a 25 °C



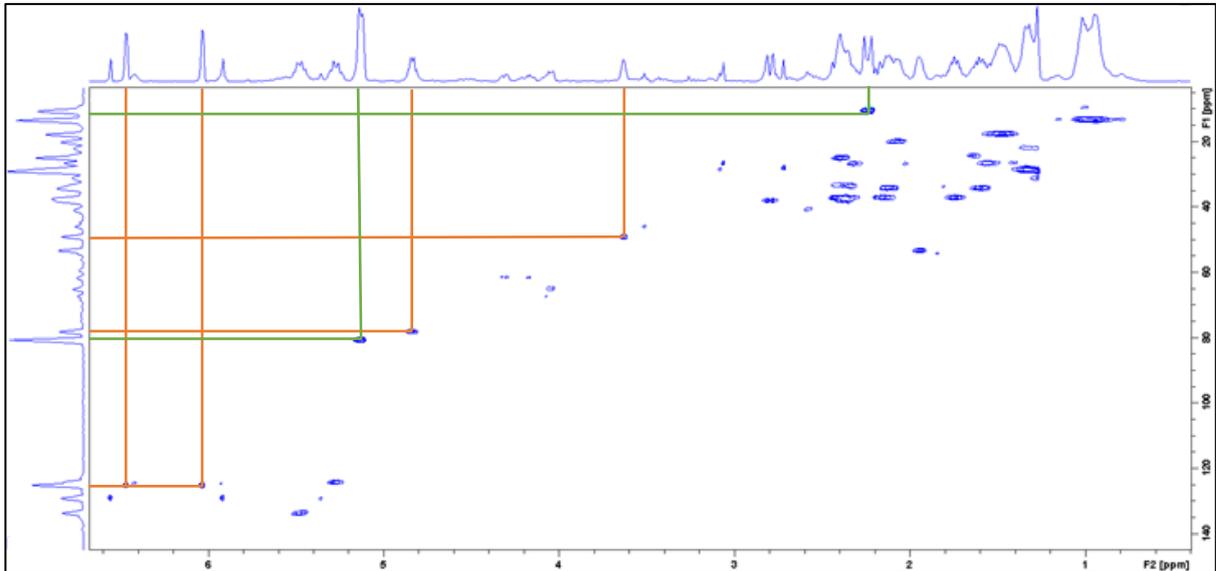
Fonte: Do autor (2023).

Legenda:  : Correlações do composto 3-carboxi-2-metileno-4-heptanolida



: Correlações do composto ácido decumbico

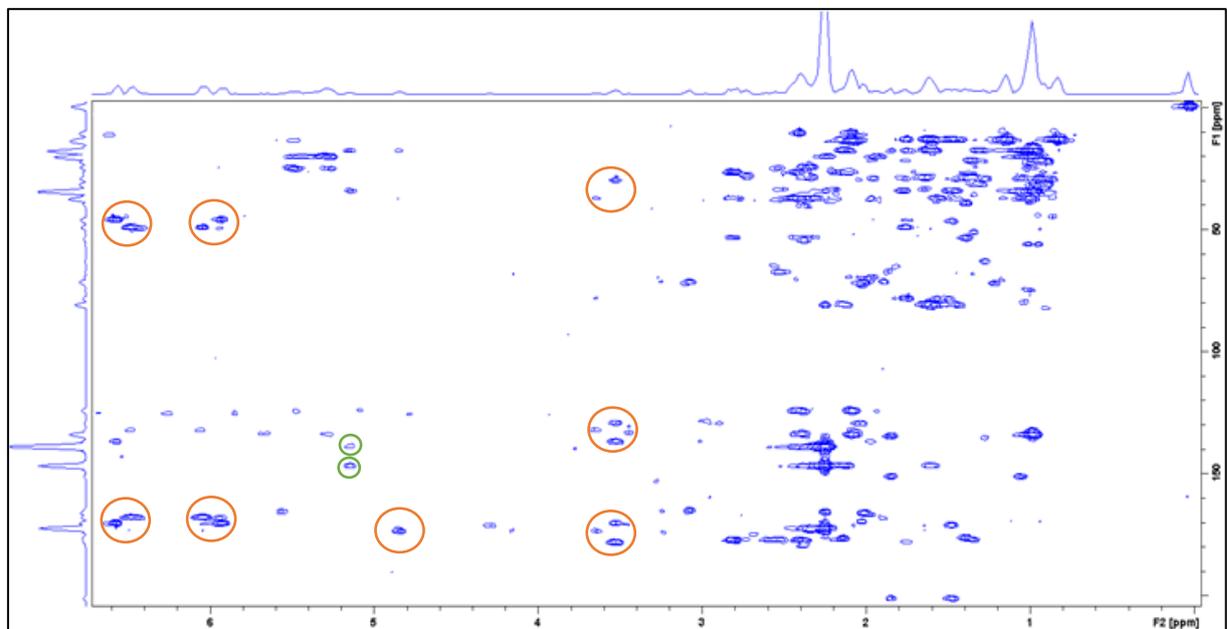
Figura 12 – Correlações observadas no espectro de no espectro de HSQC do extrato POLd-14 em CDCl_3 – 400 MHz, 9,4 T a 25 °C



Fonte: Do autor (2023).

Legenda: — : Sinais do composto 3-carboxi-2-metileno-4-heptanolida
— : Sinais do composto ácido decumbico

Figura 13 – Correlações observadas no espectro de no espectro de no espectro de HMBC do extrato POLd-14 em CDCl_3 – 400 MHz, 9,4 T a 25 °C



Fonte: Do autor (2023).

Legenda: ○ : Correlações do composto 3-carboxi-2-metileno-4-heptanolida
○ : Correlações do composto ácido decumbico