



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Amanda Ellen de Athayde

**PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Porophyllum
ruderale* (ASTERACEAE) E DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS**

Florianópolis

2023

Amanda Ellen de Athayde

**PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Porophyllum*
runderale (ASTERACEAE) E DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como etapa para obtenção do título de doutora em Farmácia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maique Weber Biavatti

Co-orientador: Prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Athayde, Amanda Ellen de
PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Porophyllum*
runderale (ASTERACEAE) E DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS /
Amanda Ellen de Athayde ; orientadora, Maique Weber
Biavatti, coorientador, Louis Pergaud Sandjo, 2023.
167 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. *Porophyllum runderale*. 3. Fungos
endofíticos. 4. CLUE-ESI-QToF-EM. I. Biavatti, Maique
Weber. II. Sandjo, Louis Pergaud. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Farmácia. IV. Título.

Amanda Ellen de Athayde

**“PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Porophyllum ruderale*
(ASTERACEAE) E DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS”**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado, em 13/04/2023 pelos seguintes membros:

Profa. Izabella Thaís da Silva, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Prof. Claudio Roberto Fonseca Sousa Soares, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Prof. Geison Modesti Costa, Dr.

Pontificia Universidad Javeriana - Colômbia

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Farmácia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Prof.(a) Maique Weber Biavatti

Dr.(a) Orientador(a)

Florianópolis, 2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que mesmo diante de todas as barreiras incluindo a desinformação e o desrespeito com a pesquisa no Brasil, nos dá forças para continuar.

A Universidade Federal de Santa Catarina por toda estrutura e a CAPES pelo apoio financeiro.

Aos meus orientadores, Prof^ª Maique W. Biavattie e Prof. Louis P. Sandjo, por sempre estarem presentes e por todo ensinamento, suporte e amizade.

Ao professor Prof. Dr. Cláudio Roberto Fonseca Sousa Soares, Dr^ª. Anabel Gonzalez Hernandez e Dr^ª Emanuela Pillepor todo auxílio, paciência e por ceder a estrutura do laboratório de microbiologia de solo da UFSC. Meus agradecimentos aos colegas do laboratório de microbiologia de solo pela recepção e auxílio, em especial a Luísa, Isabella Maria, André, Edenilson e Joana.

Aos meus queridos amigos, em especial Luiz, Gui, Larissa G, Larissa F, Layzon, Ingrid, Ana e Erlon. Obrigada pela amizade, pelas risadas, pelos ensinamentos e por serem os melhores companheiros de laboratório que eu poderia desejar.

Obrigada a Vivian Dalla Colleta por todas as conversas e ajuda nesta reta final.

A minha família, sem eles nada seria possível. Obrigada por nunca deixarem de acreditar e me incentivar a seguir meus sonhos. Ao Carlos, por todo amor, compreensão e parceria.

Obrigada!

RESUMO

Porophyllum ruderale Jacq. Cass (Asteraceae) é uma planta alimentícia não convencional conhecida no Sul do Brasil como “couve-cravinho”, “arnica-paulista”, “picão-branco”, entre outros nomes. O interesse por essa planta foi motivado por dados da literatura que apresentaram derivados do tiofeno como biomarcadores dessa espécie. No entanto, um trabalho controverso defende que esses metabólitos secundários sejam provenientes dos endófitos presentes na planta. Assim, o presente trabalho explora fitoquimicamente *P. ruderale* e compara os perfis químicos dos indivíduos coletados em diferentes localidades. O trabalho focará também na busca dos derivados tiofênicos. A técnica CLUE-ESI-QToF-EM permitiu a detecção de 36 substâncias, incluindo ácidos fenólicos, derivados de diterpenos aminoglicosídeos (descritos pela primeira vez para esta espécie), ácidos graxos e derivados de clorofila. Durante nosso estudo, nenhum derivado de tiofeno foi identificado. Somado a isto, análises de agrupamento e de principais componentes (PCA) foram realizadas em parceria para distinguir diferentes metabólitos entre amostras de *P. ruderale* em grupos bem definidos. Recentes publicações descrevem a notável simbiose entre plantas medicinais e seus fungos endofíticos sendo estas possíveis fontes de metabólitos secundários. Neste cenário, foi realizada a análise do microbioma (pela empresa GoGenetic) das folhas de *P. ruderale* coletadas próximo à praia. Os resultados demonstraram predomínio dos filos Ascomycota (85,95%) e Basidiomycota (7,76%) e os gêneros mais abundantes foram *Fusarium* (representando 9,3 % das sequências lidas), *Alternaria* (6,7 %), *Cladosporium* (6,5%), *Saccharomyces* (4,1 %), *Mortierella* (3,6 %) e *Pestalotiopsis* (1,9 %). Por fim, a extração dos fungos endófitos das folhas de *P. ruderale* proporcionaram 25 isolados fúngicos da planta coletada em campo, duas espécies foram identificadas como *Diaporthe paranensis* e *Penicillium* sp. A avaliação do perfil químico do extrato bruto de acetato de etila de *D. paranensis* permitiu a identificação de quatro novos peptídeos utilizando CL-EMⁿ. Até o presente momento, o conhecimento do perfil metabólico de *P. ruderale* bem como de seus fungos endofíticos forneceram novas informações para esta espécie vegetal, utilizada na medicina popular e também como planta alimentícia não convencional.

Palavras-chave: *Porophyllum ruderale*, CLUE-ESI-QToF-EM, diterpeno aminoglicosídeo, PCA, análise de grupos, fungos endofíticos, *Diaporthe paranensis*, peptídeos.

ABSTRACT

Porophyllum ruderale Jacq. Cass (Asteraceae) is a non-convention edible plant widespread in the south of Brazil where it is known as “couve-cravinho”, and “arnica-paulista”, “picão-branco”, among other names. Interest in this plant was motivated by data from the literature that present thiophene derivatives as biomarkers of this species. However, a controversial work argues that these secondary metabolites come from the endophytes present in the plant. Thus, the present research phytochemically explores *P. ruderale* and compares wild and cultivated individuals of this plant species collected from different localities. UPLC-ESI-QToF-MS technique led to the identification of 36 substances including mainly phenolic acids, diterpene aminoglycoside derivatives (described for the first time to this species), fatty acids and chlorophyll derivatives. During our investigation, no thiophene derivatives were identified. PCA and cluster analysis results were used to distinguish different metabolites among *P. ruderale* samples into well-defined groups. Recent reports described the symbiosis between medicinal plants and their endophytic fungi, with this later as a great source of bioactive metabolites. In this scenario, we analyzed the microbiome of leaves of *P. ruderale* (by the company GoGenetic). The results showed a predominance of phyla Ascomycota (85%) and Basidiomycota (7.76%) and the most abundant genera were *Fusarium* (representing 9,3 % of the sequences read), *Alternaria* (6,7 %), *Cladosporium* (6,5%), *Saccharomyces* (4,1 %), *Mortierella* (3,6 %) and *Pestalotiopsis* (1,9 %). Finally, the extraction of endophytic fungi from the leaves of *P. ruderale* wild species provided 25 fungi among them two were identified as *Diaporthe paranensis* and *Penicillium* sp. The investigation of the chemical profile (LC-MSⁿ) of *D. paranensis* allowed the identification of four new peptides. Up to now, data on the metabolites profile of *P. ruderale* as well as its endophytic fungi have provided new information for this medicinal species and non-conventional edible plant.

Keywords: *Porophyllum ruderale*, UPLC-ESI-QToF-MS, diterpene aminoglycoside, PCA, and cluster analysis, endophytic fungi, *Diaporthe paranensis*, peptides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química de metabólitos de fungos endofíticos também produzidos por suas plantas hospedeiras. Sendo A) taxol, B) podofilotoxina, C) azadiractina, D) hiperincia e E) emodina.	18
Figura 2. Novas drogas (fármacos), aprovadas de 01 de janeiro de 1981 até 30 de setembro de 2019, com um número amostral de 188. Fonte: Adaptado de Newman e Cragg (2020).	20
Figura 3. Tiofenos isolado de <i>Porophyllum obscurum</i> , segundo Postigo e colaboradores (2017).	23
Figura 4. Tiofenos isolados de <i>Porophyllum ruderale</i> , segundo Takahashi e colaboradores (2011).	24
Figura 5. <i>Porophyllum ruderale</i> cultivado em casa de vegetação. Fonte: A autora	25
Figura 6. Metabólitos isolados de fungos endofíticos e de suas plantas hospedeiras.	32
Figura 7. Curva de crescimento ou fases do crescimento fúngico.	36
Figura 8. Vias metabólicas centrais dos fungos. Fonte: Zhang (2013).	38
Figura 9. Exemplificação de método de obtenção de fungos endofíticos. Adaptado de Felix, 2019.	39
Figura 10. Sementes de <i>P. ruderale</i> em placa de Petri utilizadas para germinação. Fonte: A autora.	43
Figura 11. Microcultivo e lâminas para observação do material fúngico em microscópio....	51
Figura 12. Cromatograma do Controle de Qualidade (QC) dos extratos obtidos de <i>P. ruderale</i> , no modo positivo de análise (ESI +).	56
Figura 13. Estrutura química da maltose.	57
Figura 14. Estrutura química do ácido cafeoilquínico.	58
Figura 15. Estrutura química das substâncias ácido 1,4-dicafeoilquínico, ácido 1,5-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico.	58
Figura 16. estrutura química do galoil-dicafeoil-glicose (isômero).	59
Figura 17. Estrutura química da quercetina.	59
Figura 18. Estrutura química da isoquercetina.	60
Figura 19. Estrutura química da galoilquercitrina.	61
Figura 20. Estrutura química das substâncias luteolina e canferol.	61
Figura 21. Estrutura química do diterpeno aminoglicosídeo derivado de caureno, Bifloratoxina.	62

Figura 22. Perfil de fragmentação para o íon precursor com m/z 946 (pico 22), identificado como bifloratoxina (isômero), no modo positivo de ionização (ESI+).	63
Figura 23. Propostas de estruturas para os derivados de diterpenos aminoglicosídeos wedelosídeos encontrados em amostras de <i>P. ruderale</i> .	65
Figura 24. Estrutura química de linolenoil glicerol.	66
Figura 25. Estruturas químicas dos derivados hidroximetil-feoforbide e metil-feoforbide.	67
Figura 26. Estrutura química do atractilosídeo (ATR).	68
Figura 27. Gráfico dendograma das diferentes amostras de <i>P. ruderale</i> avaliadas.	74
Figura 28. Valores da silhueta mediana de todas as injeções para um determinado número de grupos (3-12 grupos).	76
Figura 29. Valores de silhueta K-medias para solução de oito grupos para as amostras de <i>P. ruderale</i> .	77
Figura 30. Gráfico de Principais Componentes (PCA) indicando a dispersão de injeções de <i>P. ruderale</i> para 8 grupos.	78
Figura 31. Composição taxonômica (filo) das amostras de folhas de <i>P. ruderale</i> .	88
Figura 32. Gráfico em barras evidenciando por cores a abundância média (n=4) de famílias de fungos detectados (%) entre os filos.	91
Figura 33. Metabólitos secundários de <i>Orobanch</i> sp possivelmente influenciados pela inoculação do fungo <i>Fusarium</i> , segundo Shalapy e Kang (2022).	94
Figura 34. Estruturas químicas de toxinas específicas do hospedeiro produzidas por espécies do gênero <i>Alternaria</i> (adaptado de Meena e Samal, 2019).	96
Figura 35. Estruturas das substâncias alternetanoxinas A (A) e B (B) e altenueno (C).	97
Figura 36. Metabólito produzido por espécies de <i>Cladosporium</i> , giberelinas.	98
Figura 37. Metabólitos identificados em <i>Cladosporium velox</i> e sua planta hospedeira <i>Tinospora cordifolia</i> , conforme Singh e colaboradores (2016).	99
Figura 38. Avaliação dos processos de desinfecção da superfície foliar e avaliação dos meios de cultura: ISP-2, BDA, TSA, Oatmeal agar e Sabouraud; ao fim dos 28 dias de incubação em estufa.	101
Figura 39. Avaliação dos processos de desinfecção 04 e 05, utilizando os meios de cultura BDA e Sabouraud, com duplicata de cultivo.	103
Figura 40. Métodos de plaqueamento das amostras (em duplicata). Utilizando fragmentos e solução salina.	104

Figura 41. Fungos endofíticos isolados das folhas de <i>P. ruderales</i> coletadas no município de Florianópolis – SC.....	107
Figura 42. Aspectos macroscópicos e microscópicos dos fungos isolados das folhas de <i>P. ruderales</i> , cultivados em placas de Petri contendo ágar batata dextrose por 7 e 14 dias. Aumento de 40x no microscópio ótico.....	108
Figura 43. Imagens obtidas por Goulart (2005) e Amirmijani <i>et al.</i> (2014) apresentando os conídios referentes ao gênero <i>Cladosporium</i>	111
Figura 44. Imagens obtidas por Goulart (2005) e Barreto <i>et al.</i> (2011) apresentando os conídios referentes a espécies do gênero <i>Alternaria</i>	112
Figura 45. Imagens obtidas por Goulart (2005) apresentando os conídios do fungo <i>Penicillium</i>	112
Figura 46. Perfil químico do fungo <i>Penicillium</i> sp. no modo positivo de análise (ESI+) em 14 dias de cultivo em meio de cultura BDA.....	114
Figura 47. Perfil químico do fungo <i>D. paranensis</i> no modo positivo de análise (ESI+) em 14 dias de cultivo em meio de cultura BDA.....	114
Figura 48. Laudo de Identificação molecular de <i>Diaporthe paranensis</i> pela empresa GoGenetic.....	116
Figura 49. Laudo de Identificação molecular de <i>Penicillium</i> sp. pela empresa GoGenetic..	117
Figura 50. Perfil químico do fungo <i>D. paranensis</i> , ESI+. Sendo A) 7 dias de cultivo e B) 14 dias de cultivo em meio de cultura BDA.....	118
Figura 51. Perfil químico do fungo <i>D. paranensis</i> , ESI-. Sendo A) 7 dias de cultivo e B) 14 dias de cultivo em meio de cultura BDA.....	119
Figura 52. Cromatograma obtido a partir de extrato do meio de cultura preparado nas mesmas condições das amostras do extrato fúngico. ESI+.	120
Figura 53. Propostas de estruturas para as substâncias m/z 910 e 909.....	121
Figura 54. Propostas de estruturas para as substâncias m/z 895 e 896.....	122
Figura 55. Proposta de fragmentação para os íons m/z 909 e 910, no modo de ionização positivo.	123
Figura 56. Proposta de fragmentação para os íons m/z 895 e 896, no modo de ionização positivo.	124
Figura 57. EM ² das substâncias m/z 909 (A), 910 (B), 896 (C) e 895 (D).....	125
Figura 58. Primeira extração utilizando acetato de etila. ESI+.	127
Figura 59. Segunda extração utilizando acetato de etila ESI +.	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Injeções (a-c) de cada amostra dos extratos de <i>P. ruderale</i> realizadas no CL-EM, totalizando 16 amostras e 61 injeções, em modo positivo de análise.....	45
Tabela 2. Compostos caracterizados em amostras de <i>P. ruderale</i> por CLUE-ESI-QToF-EM ⁿ , no modo positivo de análise (ESI+)	69
Tabela 3. Cargas percentuais cumulativas das variáveis selecionadas em relação aos 3 primeiros componentes principais (PCs) para o modo positivo de análise (ESI +).....	80
Tabela 4. Microbioma das folhas de <i>P. ruderale</i> , descrito para Filo, Família e Gênero (número de sequencias lidas e %).	83
Tabela 5. Composição microbiana das folhas de <i>P. ruderale</i> (Família) e abundância relativa ao total de sequencias lidas, calculada.	90
Tabela 6. Composição microbiana das folhas de <i>P. ruderale</i> (gênero) e abundância relativa ao total de sequencias lidas.	92
Tabela 7. Fragmentos obtidos por analise de EM/EM por UPLC-ESI-QToF.	120
Tabela 8. Rendimentos obtidos dos extratos do fungo <i>D. paranensis</i>	126
Tabela 9. Valores de área e KD obtidos para o sistema ARIZONA N para o modo Ascendente	128
Tabela 10. Valores de área e KD obtidos para o sistema ARIZONA N para o modo Descendente	128

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt: Acetato de etila

CCD: Cromatografia em camada delgada

CLUE: Cromatografia líquida de ultra eficiência

CL-EM: Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

EM: Espectrometria de massas

ESI-Q-TOF: Ionização por eletronebulização com analisadores do tipo quadrupolo acoplado a tempo de voo (do inglês, Electrospray ionization-quadrupole-time of flight)

FE: Fase estacionária

FM: Fase móvel

T_R: Tempo de retenção (do inglês, Retention time)

RMN: Ressonância magnética nuclear RMN

K_D: Constante de partição

UV: Ultravioleta

m/z: Relação massa carga

FEF: Fungos endofíticos foliares

BDA: Batata dextrose ágar

SAB: Sabouraud

TSA: Agar triptona de soja

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

OTU – Do ingles “operational taxonomic units”

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS	19
2.2	PLANTAS MEDICINAIS	21
2.2.1	Gênero <i>Porophyllum</i>	22
2.3	BIOPROSPECÇÃO DE METABOLITOS DE FUNGOS	28
2.3.1	Relação mutualística entre microrganismos e espécies vegetais	30
2.4	FUNGOS ENDOFÍTICOS	32
2.4.1	Crescimento microbiano e metabolismo fúngico	35
3	OBJETIVOS	41
3.1	OBJETIVO GERAL	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1	MATERIAL VEGETAL	42
4.1.1	Germinação e cultivo das sementes de <i>P. ruderale</i>	42
4.2	ANÁLISE DOS PERFIS QUÍMICOS DAS PARTES AÉREAS DE <i>Porophyllum ruderale</i> Jacq. Cass (ASTERACEAE) UTILIZANDO A TÉCNICA DE CLUE-ESI-QTOF. 43	
4.2.1	Preparo das amostras	43
4.2.2	Condições analíticas	43
4.2.3	Desreplicação dos extratos analisados	44
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA	44
4.3.1	Método de pré-processamento	44
4.3.2	Método de processamento estatístico	45
4.4	MICROBIOMA FÚNGICO ASSOCIADO AS FOLHAS DE <i>Porophyllum ruderale</i> (Jacq) Cass.	46

4.5	INVESTIGAÇÃO DE FUNGOS ENDOFITICOS DE OCORRENCIA NATURAL EM <i>Porophyllum ruderale</i> (Jacq) Cass.	47
4.5.1	Seleção do material vegetal	48
4.5.2	Desinfecção das folhas de <i>P. ruderale</i>	48
4.5.3	Seleção dos meios de cultura e método de plaqueamento	49
4.5.4	Isolamento das colônias	49
4.5.5	Criopreservação dos fungos isolados	50
4.5.6	Microcultivo de fungos endofíticos isolados	50
4.6	TRIAGEM DE METABOLITOS DE FUNGOS ENDOFITICOS ISOLADOS DE <i>Porophyllum ruderale</i> (Jacq) Cass, POR CLUE-ESI-qTOF.....	51
4.6.1	Processo extrativo para triagem de metabólitos fúngicos por CLUE-EM	51
4.6.2	Identificação dos fungos selecionados	52
4.6.3	Obtenção dos extratos de <i>Diaporthe paranensis</i>	52
4.7	PORPOSTA DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA DE PARTIÇÃO CENTRIFUGA (CPC) PARA ISOLAMENTO DE PEPTÍDEOS DETECTADOS NO EXTRATO DO FUNGO ENDOFITICO <i>Diaporthe paranensis</i>	53
4.7.1	Eleição do sistema cromatográfico pelo método de “Shake flasck”	53
4.7.2	Condições de análise por CPC	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1	AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA DE EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DE DIFERENTES COLETAS DE <i>Porophyllum ruderale</i> (Jacq) Cass. POR CLUE-ESI-qTOF.	56
5.2	ANALISE ESTATISTICA MULTIVARIADA DE DIFERENTES COLETAS DE <i>Porophyllum ruderale</i> (Jacq) Cass.	73
5.2.1	Agrupamento hierárquico	74
5.2.2	Análise de grupos por K-medias	75
5.2.3	Análise de contribuição de compostos (<i>m/z</i>)	79
5.3	MICROBIOMA FÚNGICO ASSOCIADO AS FOLHAS DE <i>Porophyllum ruderale</i> (Jacq) Cass.....	81

5.4	INVESTIGAÇÃO DE FUNGOS ENDOFITICOS DE OCORRENCIA NATURAL EM <i>Porophyllumruderale</i> (Jacq) Cass.	99
5.4.1	Isolamento de fungos endofíticos foliares associados a espécie vegetal <i>Porophyllumruderale</i> (Jacq) Cass.	100
5.6	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA DE PARTIÇÃO CENTRIFUGA (CPC) PARA PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS OBTIDOS DE <i>D. paraenses</i>	126
5.6.2	Purificação de metabólitos fúngicos utilizando Cromatografia de Partição Centrifuga (CPC).....	127
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	130
7	CONCLUSÕES	130

1 INTRODUÇÃO

Porophyllum ruderale (Jacq.) Cass. (Asteraceae) é uma planta espontânea utilizada na medicina popular na América Central e do Sul (ARIAS-RICO *et al.*, 2020). No sul do Brasil essa espécie é conhecida como “arnica-couve-cravinho”, “arnica-paulista”, “picão-branco” entre outros nomes, sendo utilizada como anti-inflamatório tópico (ARIAS-RICO *et al.*, 2020; RAGGI *et al.*, 2015). Na culinária é utilizada como uma planta alimentícia não convencional (PANC) na forma de tempero ou em preparos crus e cozidos devido ao seu aroma característico, marcado pela composição do seu óleo volátil (FONSECA *et al.*, 2007).

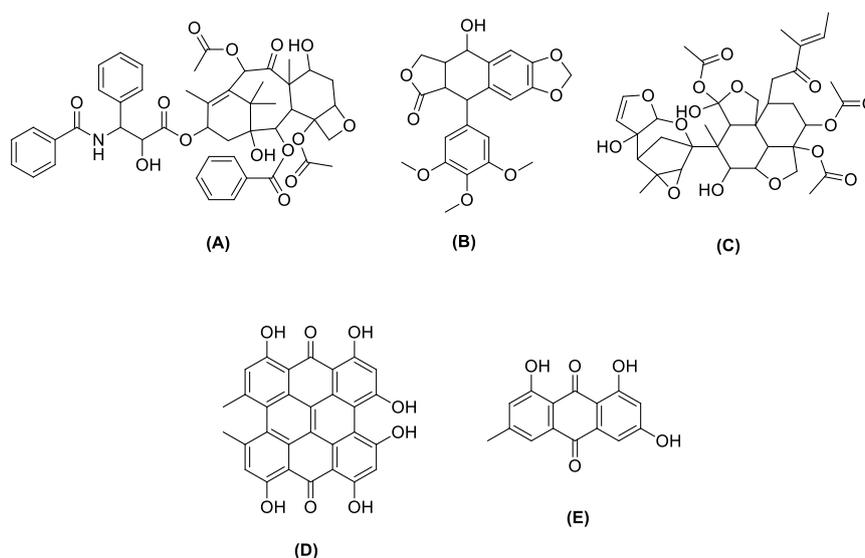
Considerando os dados históricos e a biodiversidade do Brasil como patrimônio histórico, diferentes vertentes de pesquisas buscam produtos que agreguem valores econômicos a produtos naturais sem prejudicar o ambiente (SANTOS *et al.*, 2013). No entanto existe a escassez de informações a respeito da utilização e da segurança no uso de plantas e de informações sobre os microrganismos que nelas habitam (microbioma) (GUPTA *et al.*, 2019). Essa falta de informações gera impacto tanto nas aplicações farmacológicas e terapêuticas quanto na segurança alimentar (BORTOLOTO *et al.*, 2015).

Estima-se que das 300 mil espécies de plantas que existem em nosso planeta, cada uma abriga no interior de seus tecidos pelo menos um ou mais fungos endofíticos. Entende-se como endofíticos, aqueles microrganismos que habitam dentro de diferentes tecidos da planta hospedeira, vivendo uma relação harmônica, ou seja, mutualística com seu hospedeiro (GUPTA *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2013).

Os fungos endofíticos apresentam importante interação com o hospedeiro, podendo produzir diversas substâncias a serem exploradas biologicamente, incluindo substâncias semelhantes as produzidas pela planta hospedeira. Como exemplo clássico, cita-se o taxol que foi extraído da planta *Taxus brevifolia* e isolado em 1993 do fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, desta planta (LEDWITCH *et al.*, 2013; STIERLE *et al.*, 1993). O mesmo ocorreu com as substâncias: podofilotoxina (anticancerígena), encontrada em espécies vegetais do gênero *Podophyllum* e também proveniente dos endófitos *Trametes hirsuta* e *Phialocephala fortinii*; azadiractina (inseticida) descrita para a espécie vegetal *Azadirachta indica* e para o endofítico *Eupenicillium parvum*; hipericina e emodina (antidepressivos) isoladas de *Hypericum perforatum* e pela primeira vez do fungo

INFU/Hp/KF/34B (GUIMARÃES, 2009). As substâncias citadas são apresentadas na Figura 1.

Figura 1. Estrutura química de metabólitos de fungos endofíticos também produzidos por suas plantas hospedeiras. Sendo A) taxol, B) podofilotoxina, C) azadiractina, D) hipericina e E) emodina.



Neste contexto, vários compostos bioativos obtidos a partir das partes aéreas de *Porophyllum ruderale* são relatados na literatura, incluindo importantes classes de metabólitos secundários, como terpenóides (DUARTE *et al.*, 2007), flavonoides e suas formas glicosídicas (ATHAYDE *et al.*, 2021; POSTIGO *et al.*, 2017), além de tiofenos (TAKAHASHI *et al.*, 2011). De acordo com Takahashi *et al.* (2011) e Postigo *et al.* (2017), duas espécies do gênero *Porophyllum* (*Porophyllum obscurum* e *Porophyllum ruderale*) apresentaram a presença de derivados naturais de tiofeno com expressiva atividade antimicrobiana e leishmanicida, respectivamente. Entretanto, são poucas informações consistentes a respeito do perfil químico do gênero botânico *Porophyllum*.

De tal modo, o presente estudo traz como objetivo a investigação química de *P. ruderale* em diferentes locais de coleta e explora pela primeira vez a comunidade de fungos endofíticos foliares (FEF) e do microbioma total das folhas desta espécie. Para a caracterização do perfil químico da planta e de seus fungos endofíticos a utilização da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução torna-se indispensável.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS

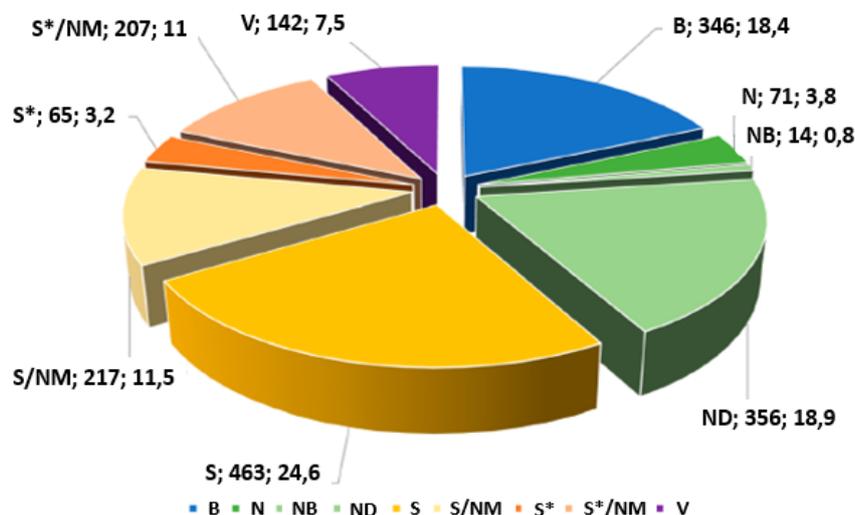
A busca por produtos naturais sempre foi importante para o desenvolvimento de novos fármacos, especialmente derivados das plantas medicinais. De tal modo o uso de plantas medicinais influenciou nos cuidados primários de saúde gerando grandes contribuições para o reestabelecimento da saúde humana (WHO, 2011). Esse conhecimento popular foi então compartilhado por diferentes culturas ao longo dos anos e atualmente é estudado e difundido através da etnofarmacologia (FUNK, 2009).

Em revisão realizada por Newman e Cragg (2020), os autores descrevem que a utilização de produtos naturais e/ou variações sintéticas destes devem ser ampliadas significativamente nos próximos anos, incluindo pesquisas nessas áreas. Como exemplo, os autores citam que na área de câncer, no período de 1946 a 1980, das 75 moléculas utilizadas, cerca de 53,3% são produtos naturais (N) ou derivados de produto natural (ND). De 1981 até o momento, os números equivalentes para os produtos naturais inalterados chegam a 33,5% das pequenas moléculas bioativas (n= 185), se considerar os produtos naturais miméticos (NMs) e os sintéticos com farmacóforo de produtos naturais (S*) eleva-se o número para 64,9%.

Noutras áreas o cenário é bastante semelhante. Embora as técnicas de química combinatória tenham tido sucesso pra otimização de compostos biologicamente ativos, os autores relatam que apenas dois compostos combinatórios foram aprovados como novos fármacos nos últimos 39 anos. Também adicionam uma discussão sobre fontes de novos antibióticos de origem natural, devido à necessidade crescente de novos agentes para combater genes de resistência. Reconhece-se de que um número significativo de medicamentos obtidos de produtos naturais é produzido por microrganismos (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Ainda, os autores consideram que a área de pesquisa de produtos naturais deve ser expandida significativamente. Abaixo apresenta-se o gráfico em pizza (Figura 2) extraído da publicação de Newman e Cragg (2020), representando um panorama geral dos fármacos aprovadas de 01 de janeiro de 1981 até 30 de setembro de 2019 (n=1881).

Figura 2. Novas drogas (fármacos), aprovadas de 01 de janeiro de 1981 até 30 de setembro de 2019, com um número amostral de 188. Fonte: Adaptado de Newman e Cragg (2020).



Legenda: B (macromolécula biológica), N (produto natural inalterado), NB (droga botânica, mistura definida), ND (derivado de produto natural), S (droga sintética), S* (droga sintética com farmacóforo de produto natural), V (vacina), NM (mimético a produto natural).

O Brasil tem uma contribuição significativa no estudo de produtos naturais graças a sua extensa biodiversidade vegetal responsável pela biossíntese de numerosas substâncias químicas com potencial farmacológico (RODRÍGUEZ-CHÁVEZ *et al.*, 2017; SEMIR *et al.*, 2012). Diante disto, diversos estudos químicos e farmacológicos têm sido realizados com espécies da flora do Brasil, incluindo pesquisas com espécies vegetais da família Asteraceae (CARVALHO, 2016, Da SILVA *et al.*, 2019; FAQUETI, 2020, ATHAYDE *et al.*, 2021).

Segundo Hogan e colaboradores (2016) nas últimas décadas percebeu-se a necessidade de equacionar a disponibilidade de recursos naturais e seu uso pela população. Gupta e colaboradores (2019) acrescentam que neste âmbito com a progressão da população mundial em grande escala é importante procurar diferentes fontes e habitats para descobrir novas fontes de substâncias bioativas de origem natural.

Prontamente, a relação inspiradora e mutualística entre plantas e microrganismos tende a ser uma nova alternativa para suprir esta demanda de novos agentes terapêuticos, seja

na forma de substâncias isoladas ou misturas complexas (GUPTA *et al.*, 2019). Devido a estreita relação com as espécies vegetais, os microrganismos fornecem um expressivo número de metabólitos bioativos (RAJAMANIKYAM *et al.*, 2017).

2.2 PLANTAS MEDICINAIS

Diante do contexto de novas fontes de substâncias bioativas destacam-se espécies vegetais da família Asteraceae. Em sua maioria apresentam importância direta para uso humano, sendo que espécies pertencentes a esta família são utilizadas pelo seu potencial nutricional, tecnológico, ornamental, farmacêutico, industrial ou ecológico (fornecimento de néctar e pólen), além de forragem para a produção pecuária (SILVA; ANDRADE, 2013).

Como exemplodo potencial alimentício da família Asteraceae cita-se espécies como, alface (*Lactuca sativa* L.), chicória (*Cichorium endívia* L.) e girassol (*Helianthus annuus* L.). Para fins farmacológicos, a utilização de camomila (*Matricaria recutita* L.), carqueja (*Baccharis trimera* Less.) e arnica (*Arnica montana* L.) (SILVA; ANDRADE, 2013)

Devido as proporções da família Asteraceae, esta é considerada uma das maiores e mais importantes famílias de plantas floríferas dentro das angiospermas eudicotiledôneas. Representando aproximadamente 10% da flora mundial, Asteraceae conta com aproximadamente 2000 gêneros e 30.000 espécies (FUNK *et al.*, 2009). Sua distribuição é considerada cosmopolita, abrangendo praticamente todos os continentes, com predomínio nas regiões temperadas e semi-áridas dos trópicos e subtropicos (MELO; PEREIRA, 2016).

Estudos de caracterização química de Asteraceae confirmaram a tese de pesquisadores como Cronquist (1988) e Bohlmann (1980), que atribuíram o sucesso evolutivo da família ao desenvolvimento de um sistema químico de defesa que inclui a produção combinada de compostos secundários, como poliacetilenos e lactonas sesquiterpênicas. Na sequência, inúmeros estudos demonstraram a riqueza e variedade de metabólitos encontrados nas diferentes espécies que contemplam a família Asteraceae, tais como poliacetilenos (POLLO *et al.*, 2013), terpenóides (DA SILVA, 2015), cumarinas (FAQUETI *et al.*, 2020), benzofuranos (ROMANO *et al.*, 2008), alcaloides (FAQUETI *et al.*, 2020), flavonoides (CARVALHO, 2016; FAQUETI *et al.*, 2020) e lactonas sesquiterpênicas (DA SILVA, 2019; LUSA *et al.*, 2016; SEMIR *et al.*, 2012). Sendo,

estas duas últimas classes reportadas como importantes marcadores quimiotaxonômicos da família Asteraceae (BOHLMANN *et al.*, 1980; CARVALHO, 2016; DA SILVA, 2015; Da SILVA, 2019; LUSA *et al.*, 2016).

2.2.1 Gênero *Porophyllum*

Pertencente a grande família Asteraceae, encontra-se o gênero *Porophyllum* (Asteraceae) que compreende cerca de 28 espécies, distribuídas desde o sudoeste dos Estados Unidos, México, América Central e América do Sul. Sendo descritos o maior número de publicações sobre este gênero no Brasil e Argentina (POSTIGO *et al.*, 2017). O gênero encontra-se incluído na tribo Heleniae (BREMER, 1994).

De forma geral, espécies do gênero *Porophyllum* são plantas anuais ou perenes com cavidades secretoras acentuadas (ATHAYDE *et al.*, 2019). Suas folhas e brácteas emitem um forte e desagradável odor. Estudos também demonstram uma rica composição de monoterpenos no óleo volátil extraído das folhas da espécie (POSTIGO *et al.*, 2017).

Dados etnofarmacológicos demonstram a utilização de espécies do gênero como, cicatrizante, anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, calmante, contra hipertensão arterial, leishmanicida, tratamento de picada de cobra, doenças reumáticas e dores em geral. No entanto poucas espécies têm sua composição química definida (FONSECA *et al.*, 2006; PAWŁOWSKA *et al.*, 2022).

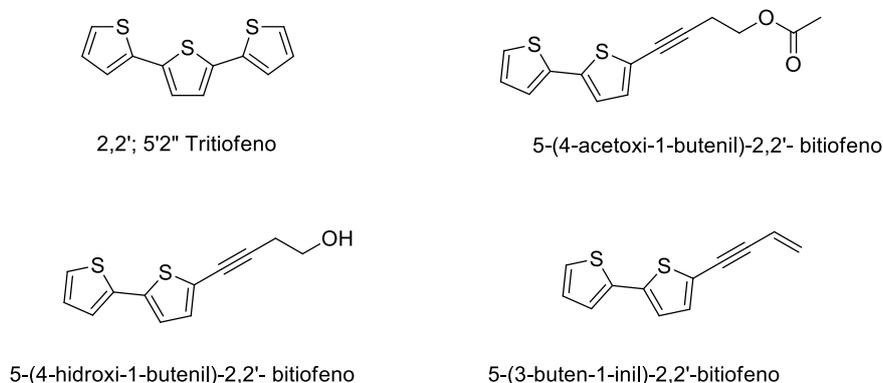
Quimicamente, diversos autores reportam a presença de terpenóides (monoterpenos e sesquiterpenos) e derivados de tiofenos (mono, di e tri-tiofenos) (TAKAHASHI *et al.*, 2011; POSTIGO *et al.*, 2017). A atividade antimicrobiana do gênero é amplamente difundida. Downum *et al.* (1989) descreveram sobre a atividade antifúngica mediada por luz UV-A para *Porophyllum* spp. (*P. gracile* Benth., *P. ruderale* (Jacq.) Cass. Var., *P. macrocephalum* (DC.) Cronq. e *P. scoparium* A. Gray) de regiões áridas e semi-áridas dos Estados Unidos e México. Meckes-Lozoya e Gaspar (1993) demonstraram a atividade antifúngica de *P. macrocephalum* contra *C. albicans*, após irradiação a 350 nm.

Outro fator marcante, é a presença de substâncias que contenham moléculas de enxofre em sua composição elementar, descrita para alguns gêneros botânicos da família Asteraceae, incluindo o gênero *Porophyllum* (BOHLMANN; ZDERO, 1985). Do presente gênero botânico, duas espécies ganham destaque pela presença de análogos

naturais de tiofenos, *P. obscurum* e *P. ruderale* e estes com satisfatória ação antimicrobiana e antiparasitária, respectivamente, descritas a seguir.

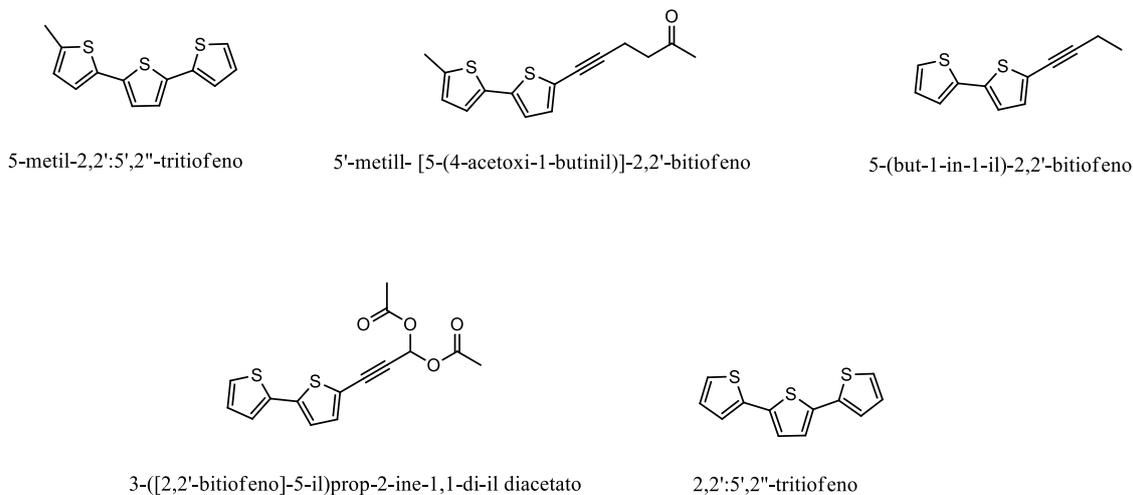
Em um estudo recente, Postigo e colaboradores (2017), avaliaram a atividade antifúngica de diferentes extratos de *P. obscurum*, coletados na Argentina, contra 25 estirpes clínicas de *Candida spp.* Os autores obtiveram resultados satisfatórios, destacando a atividade antifúngica dos tiofenos isolados do extrato hexânico da espécie (Figura 3).

Figura 3. Tiofenos isolado de *Porophyllum obscurum*, segundo Postigo e colaboradores (2017).



Takahashi e colaboradores (2011) isolaram das partes aéreas de *P. ruderale*, coletadas no Brasil, cinco novos derivados de tiofenos (Figura 4), e estes análogos de ocorrência natural apresentaram acentuada ação frente as formas promastigota e amastigota de *Leishmania amazonensis*.

Figura 4. Tiofenos isolados de *Porophyllum ruderale*, segundo Takahashi e colaboradores (2011).



2.2.1.1 *Porophyllum ruderale* Jacq. Cass

No Brasil, a espécie *Porophyllum ruderale* (Figura 5) ganha destaque, pela sua utilização popular como “arnica”, ou seja, utilizada como substituto da espécie europeia *Arnica montana*, como anti-inflamatório tópico (ATHAYDE *et al.*, 2019; FONSECA, 2007). Outra evidência para a espécie é sua utilização na alimentação, como uma Planta Alimentícia Não Convencional (PANC). Sendo conhecida popularmente como: “arnica-paulista”, “couve-cravinho”, “erva-fresca”, “erva-de-veado”, “arruda-de-galinha”, “cravo-de-urubu” e “picão-branco” (LIMA-NETO *et al.*, 1996; FONSECA, 2007). Segundo Semir e colaboradores (2011) muitas espécies no Brasil são popularmente conhecidas como “arnica” em analogia com a tradicional espécie europeia *Arnica montana* L. (Asteraceae) por apresentarem caracteres morfológicos, sensoriais e farmacológicos semelhantes a verdadeira arnica. Na Figura 5 é apresentada a imagem da espécie vegetal *P. ruderale*, cultivada em casa de vegetação.

Figura 5. *Porophyllum ruderale* cultivado em casa de vegetação. Fonte: A autora



De acordo com Arias-Rico e colaboradores (2020), as hortaliças de consumo popular podem apresentar um teor apreciável de fibra alimentar, cinzas, compostos fenólicos e capacidade antioxidante. Publicações anteriores relataram que preparos com *P. ruderale* (resultados expressos em gramas de cada composto por 100 g de base seca, g/100 g db) apresentaram alto teor de carboidratos ($47,4 \pm 0,3$), menor teor de lipídios ($5,0 \pm 0,3$), proteínas ($26,9 \pm 0,0$) e teores totais fibras alimentares ($19,7 \pm 0,6$), fibra solúvel ($4,9 \pm 0,6$) e fibra insolúvel ($14,9 \pm 0,6$) (ARIAS-RICO *et al.*, 2020).

Compostos antioxidantes estão naturalmente presentes em frutas e verduras, sendo que algumas apresentam altas concentrações. Como exemplo, a acerola apresenta grandes concentrações de ácido ascórbico enquanto que no morango predominam flavonoides como antocianinas. A importância dos antioxidantes ocorre pela presença de radicais de oxigênio (radicais hidroxila e peroxila) e do ânion superóxido que em condições de homeostase apresentam papel importante nas reações bioquímicas do corpo humano, porem quando ocorre uma produção excessiva de radicais de oxigênio (patologias ou fatores ambientais) provoca um desequilíbrio que pode ocasionar danos profundos em tecidos (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes, na prevenção de doenças crônico-degenerativas. Um dos métodos mais utilizados é o método para determinar a capacidade antioxidante de um composto em sequestrar radicais livres, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). Resumidamente, o DPPH é um radical de nitrogênio orgânico de cor violeta que possui absorção em

espectrofotômetro na faixa de 515-520 nm. Na presença de um doador de hidrogênio ou elétron a intensidade de absorção diminui e a solução com o radical perde cor, tornando-se amarela, ou seja, quando o elétron desemparelhado do átomo de nitrogênio no DPPH recebe um átomo de hidrogênio proveniente de compostos antioxidantes, ocorre a mudança de cor (SUCUPIRA et al., 2012). Nesse contexto, Arias-Rico e colaboradores(2020) determinaram para o extrato bruto de *P. ruderale* apresentou uma boa quantidade de ácido ascórbico (952,2 mg/100 g db ou 140 mg/100 g db) como *Brassica oleracea* (brócolis) e relataram uma capacidade antioxidante satisfatória de 6355 μ mol TE/100 g db (μ mol de Trolox equivalentes por 100 g de base seca) para DPPH(ARIAS-RICO et al., 2020).

Além da composição nutricional descrita por Arias-Rico et al. (2020), a composição química dos metabolitos secundários de *P. ruderale* é pouco estabelecida, dispondo de dados qualitativos e poucas substâncias isoladas (FONSECA, 2006, PAWŁOWSKA et al., 2022). Através de testes qualitativos são descritas para a espécie as classes de metabólitos, flavonoides, cumarinas, polissacarídeos, saponinas e óleo volátil rico em terpenóides (ATHAYDE, 2019; FONSECA, 2006; LIMA-NETO, 1996). No trabalho realizado por Guillet e colaboradores (1998), foi avaliada a composição do óleo volátil das folhas de *P. ruderale*, sendo 91,8% deste constituído pelos monoterpênos: sabineno, mirceno e limoneno.

Estudos com o extrato da planta referem sua utilização como possível analgésico e antiespasmódico. Em estudo realizado por Lima-Neto (1996) foram avaliados os efeitos farmacológicos (analgésico e antiespasmódico.) do extrato de *P. ruderale* (folhas e capítulos florais, extraídos com etanol 70° GL) em camundongos. O extrato foi administrado na forma intraperitoneal nas doses de 20, 40, 60, 80, 100 mg/kg. Utilizando a mesma via de administração, também foram avaliadas as doses de 130, 260, 400 e 550 mg/kg, sobre o número de contorções induzidas por agentes irritantes como a prostaciclina sintética e o ácido acético sobre a inibição da sensibilidade térmica em testes de analgesia central e placa-quente. Como resultados, os autores relatam que os animais apresentaram apatia, hipotonia, sedação e perda parcial do reflexo, sugerindo uma ação desta planta a nível do sistema nervoso central. Desta forma, o estudo *in vivo* concluiu que o extrato de *P. ruderale* apresenta potencial farmacológico inibindo as contorções abdominais induzidas pela prostaciclina e pelo ácido acético em camundongos, também foi observado aumento do tempo de latência nos testes de analgesia central e placa-

quente. Assim, os autores destacam a utilização da referida planta na medicina popular e na fitoterapia como analgésico e antiespasmódico.

Além da atribuição das classes químicas propostas por Lima-Neto (1966) e Fonseca (2007), outros trabalhos realizados por Bohlmann *et al.* (1980) e Takahashi *et al.* (2011) descreveram o isolamento de tiofenos das partes aéreas de *P. ruderale*. Takahashi *et al.* (2011), descrevem a notória ação leishmanicida das substâncias isoladas de *P. ruderale*, 5-metil-2,2':5',2"-tertiofeno e 5'-metil- [5-(4-acetoxi-1-butinil)]-2,2'-bitiofeno (Figura 4). Segundo os autores, as atividades leishmanicida e citotóxica do extrato bruto das partes aéreas de *P. ruderale* foram avaliados contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*.

Ressalta-se que a leishmaniose é uma doença endêmica em 76 países, incluindo o continente americano. Os casos no Brasil correspondem a 90% dos ocorridos na América Latina. Desde 2006 a secretaria de vigilância em saúde do Brasil-Ministério da Saúde, propõe atender às necessidades do serviço na implementação das ações de vigilância e controle da leishmaniose visceral no país. Ainda, segundo dados do Ministério da Saúde, são registrados em média 3.500 casos anuais com o coeficiente de incidência de 2,0 casos/100.000 habitantes (Brasil, 2006).

De forma resumida, a *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório de células do sistema fagocitário mononuclear, o que permite a disseminação e multiplicação incontrolada do parasito. A transmissão ocorre quando as fêmeas do mosquito palha (*Lutzomyia longipalpis*), ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*. Os parasitos do gênero *Leishmania* em seu ciclo apresentam duas formas evolutivas, forma promastigota (flagelada e extracelular) e a forma amastigota (intracelular e sem movimentos) (Brasil, 2006).

Retomando, Takahashi *et al.* (2011) descrevem que o extrato bruto das partes aéreas de *P. ruderale* apresentou os valores de concentração inibitória (IC₅₀) de 60,3 e 77,7 µg/mL, respectivamente frente as formas promastigota e amastigota do parasito *L. amazonensis*. Os valores de IC₅₀ descritos para os tiofenos isolados foram: 5-metil-2,2':5',2"-tertiofeno (7,7 e 19,0 µg/mL) e 5'-metil- [5-(4-acetoxi-1-butinil)]-2,2'-bitiofeno (21,3 e 28,7 µg/mL) respectivamente para as formas promastigotas e amastigotas. Os resultados demonstraram que o extrato de diclorometano, bem como os

derivados de tiofeno isolados de *P. ruderales* exibiram forte atividade contra formas amastigotas, promastigotas e axênicas de *L. amazonensis* (TAKAHASHI *et al.*, 2011).

Todavia, publicações demonstram derivados de tiofenos como sendo obtidos a partir do metabolismo de fungos endofíticos (DENG *et al.*, 2013; RODRIGUEZ; GIULIETTI, 1995). Complementar a esta informação, Carvalho *et al.* (2016 b) e Gupta *et al.* (2019) descrevem que devido a relação tênue entre as plantas e os microrganismos que habitam nos tecidos vegetais (endofíticos), pode haver confusões entre produtos do metabolismo fúngico e do metabolismo vegetal.

Neste contexto, a relação entre microrganismos e espécies vegetais merece destaque para fomentar o conhecimento de substâncias bioativas de origem natural, além de serem promissoras fontes de novas moléculas com potencial terapêutico. Somado a isto, pesquisas de bioprospecção de novas moléculas bioativas apontam que 51% de compostos isolados de fungos apresentam potenciais aplicações farmacológicas, sendo estas relacionadas a sua planta hospedeira (SANTOS *et al.*, 2013). Neste âmbito, estudos de bioprospecção de metabólitos fúngicos tem sido alvo de estudos visando micro e macromoléculas (GUPTA *et al.*, 2020).

2.3 BIOPROSPECÇÃO DE METABOLITOS DE FUNGOS

Segundo Santos e colaboradores (2020), o conceito de bioprospecção, pode ser definido como “ extrair produtos da biodiversidade e aplicar no sistema humano”. Adicionalmente, Saccaro Júnior (2011) conceitua a bioprospecção como “... a busca por organismos e partes provenientes de seres vivos em geral que possam ter um potencial econômico e eventualmente levar ao desenvolvimento de um produto”. Somado a isto, autores destacam que para que esta busca por novas moléculas ocorra de uma maneira equilibrada é de extrema importância entender que existe uma relação entre espécies e também destas com seu habitat. Portanto a preservação das espécies e ecossistemas se faz essencial (SANTOS *et al.*, 2020, IBRAHIM *et al.*, 2016).

Considerando os dados históricos e a biodiversidade como patrimônio histórico e genético, diferentes vertentes de pesquisas buscam produtos que agreguem valores econômicos sem prejudicar o ambiente (SANTOS *et al.*, 2020). Wink (2007) cita o projeto Genoma Humano, onde diversos genes (proteínas) foram identificados e correlacionados com doenças, possibilitando utilizar determinadas proteínas como alvos

para o desenvolvimento de novos fármacos. Outros pesquisadores ressaltam a necessidade de aumentar o número de sequenciamentos de diferentes organismos (tanto eucariotos como procariotos) visando a identificação taxonômica para catalogar ao máximo a biodiversidade, servindo de ferramenta para conhecimento, bioprospecção e preservação da biosfera (SANTOS *et al.*, 2020).

Em sua maioria, as diversas técnicas de bioprospecção são empregadas no estudo de metabólitos secundários. Estes são compostos orgânicos produzidos principalmente por plantas, fungos e bactérias relacionados a processos de adaptação e defesa dos organismos (IBRAHIM *et al.*, 2016, SANTOS, 2020).

Como marco na observação e aplicação de microrganismos ou produtos destes (como seus metabólitos) para benefício da sociedade, destaca-se o médico e bacteriologista escocês, Alexander Fleming. Fleming observou que uma determinada contaminação por fungos (*Penicillium*) inibiu e/ou reduziu o crescimento bacteriano de suas culturas de bactérias. Este achado revolucionou a produção dos antibióticos e atualmente os antimicrobianos são sintetizados e ou baseados nestes compostos de origem natural (SANTOS, 2020).

Embora um grande progresso tenha sido feito em bioprospecção de fungos, esta área de pesquisa ainda está em expansão (GUPTA *et al.*, 2020; IBRAHIM *et al.*, 2016; SANTOS, 2020). Como exemplo, cita-se a produção de ácidos carboxílicos oriundos de metabolismo fúngico, como os ácidos cítrico, glucônico, itacônico e lático que são atualmente fabricados por meio de bioprocessos em larga escala. Os ácidos tri e di carboxílicos são ácidos orgânicos que apresentam propriedades que variam significativamente com sua estrutura molecular, cadeia de carbono e presença de outros grupos funcionais. Devido a sua variedade, esses ácidos têm amplas aplicações como matérias-primas para produtos em várias indústrias, incluindo os setores de alimentos, rações, agricultura, polímeros e medicamentos (ZHANG *et al.*, 2013).

Muitos ácidos dicarboxílicos, incluindo ácido fumárico, ácido málico, ácido succínico, ácido glucárico, e ácido itacônico foram citados como principais produtos químicos que podem ser produzidos a partir de abundante biomassa renovável. Os autores reforçam que os produtos de origem fúngica produzidos por meio de bioprocessos podem ser ambientalmente benéficos e podem criar novas oportunidades com novos mercados para a indústria química e farmacêutica (FORTKAMP, 2018; SANTOS *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2013).

Os autores Gupta *et al.* (2019) e Ibrahim *et al.* (2016) abordam que, no âmbito farmacêutico, a utilização de produtos de origem fúngica para reduzir o extrativismo de plantas e dessa forma garantindo sua preservação e mantendo a produção de metabolitos ou produtos derivados de plantas (GUPTA *et al.*, 2019; IBRAHIM *et al.* 2016). Neste sentido, observando a variedade química proveniente do metabolismo fúngico e vegetal, sabe-se que os metabólitos secundários destes podem ser produzidos por algumas vias biossintéticas comuns, com a participação de genes específicos que codificam a produção de substâncias específicas para ambos organismos vivos (fungos e plantas). Acrescenta-se que parte desta variedade química pode ser atribuída a disponibilidade de precursores e reações biossintéticas das plantas hospedeiras (GUPTA *et al.*, 2019).

Do mesmo modo, a diversidade de microrganismos tende a variar de acordo com o hospedeiro, distribuição geográfica, idade da planta, condições ecológicas e sazonais, incluindo altitude e precipitação (SANTOS *et al.*, 2013; GUPTA *et al.*, 2019). A influência mútua entre microrganismos e plantas ainda não são muito bem estabelecidas, pois dependem de diversos fatores incluindo a particularidade de cada organismo vivo. De forma geral, a relação simbiótica entre dois organismos é descrita para praticamente todos os seres vivos conhecidos. O termo simbiose pode ter sua definição como uma interação entre indivíduos de diferentes espécies a longo prazo, sendo esta relação evolutivamente benéfica para ambos os indivíduos, neutra ou benéfica apenas para uma das partes (GUPTA *et al.*, 2019, SANTOS *et al.*, 2013).

2.3.1 Relação mutualística entre microrganismos e espécies vegetais

A relação entre microrganismos e plantas pode ter um ou vários papéis funcionais que dependem de ciclos de vida do microrganismo, da resposta a estímulos ambientais e de características da planta hospedeira (idade, habitat, entre outros). Assim, a relação entre eles pode ser parasítica (relação onde o indivíduo se beneficia do seu hospedeiro, causando-lhe danos de maior ou menor importância), comensalística (relação benéfica para um dos indivíduos, mas sem prejuízo para o outro) ou mutualística (relação harmônica, onde ambos os indivíduos se beneficiam) (SANTOS *et al.*, 2013; RAJAMANIKYAM *et al.*, 2017).

Segundo Alam e colaboradores (2021), quando diferentes microrganismos ocupam o mesmo habitat, há uma competição por recursos para nutrição, reprodução e outras

necessidades ao longo de sua vida. Em comparação com microrganismos que têm baixa adaptabilidade, microrganismos adaptáveis são mais propensos a obter recursos e aumentar sua abundância quando os recursos são insuficientes para atender às necessidades da comunidade. Para sobreviver, os organismos desenvolveram duas estratégias, uma delas é produzir substâncias químicas que inibem o crescimento de seus concorrentes ou eliminam substâncias tóxicas produzidas por eles e a outra é produzir substâncias químicas que auxiliem seus produtores. Na segunda estratégia os microrganismos formam alianças através de relações simbióticas com seus hospedeiros. Essas relações simbióticas permitem que ambas as partes sobrevivam e se reproduzam com segurança, mesmo em condições extremas.

De acordo com a hipótese de co-evolução de longo prazo dentro das comunidades, a orientação mútua de fungos e seus hospedeiros leva cada comunidade a selecionar uma gama específica de espécies hospedeiras, permitindo que se acumulem em um eucariótico específico. A maioria dessas substâncias químicas produzidas são metabólitos secundários, abrangendo uma variedade de produtos químicos de baixo peso molecular, diversos e com efeito funcional direto sobre o crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos que os produzem. Como exemplo, os compostos orgânicos voláteis são um grande grupo de metabólitos que permitem que seus produtores (incluindo plantas e microorganismos) se defendam contra ataques de patógenos, ou para transmitir sinalizações intra ou interespecíficas durante tais ataques (ALAM *et al.*, 2021).

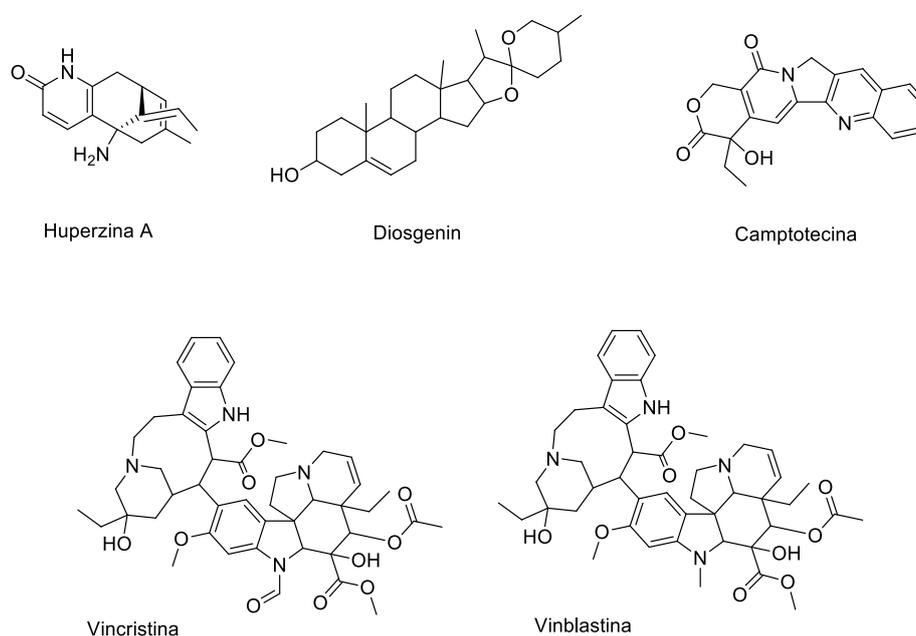
Portanto, entende-se que existe um equilíbrio na relação fungo-planta que varia do mutualismo ao antagonismo, havendo sempre um grau de infecção por parte do fungo e, ao mesmo tempo, defesa por parte da planta. Entre os fungos que apresentam uma relação próxima e geralmente mutualística com sua planta hospedeira se destacam os fungos endofíticos (SILVA *et al.*, 2014).

Entende-se como endofíticos, aqueles microrganismos (fungos ou bactérias) que habitam dentro de diferentes tecidos da planta hospedeira, geralmente não patogênicos (GUPTA *et al.*, 2019). Os fungos endofíticos fornecem um expressivo número de produtos naturais bioativos e a relação entre endofítico e planta hospedeira pode conferir vantagem para o fungo, como o fornecimento de nutrientes e substâncias necessárias para completar seu ciclo de vida. Da mesma forma para a planta hospedeira, os compostos produzidos por endofíticos podem auxiliar as plantas com resistência a nematoides,

insetos e animais, assim como melhorar seu crescimento pela produção de fitormônios (GUPTA *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014,).

Segundo Keller *et al.* (2005), grande parte da química de produtos naturais aborda um grupo de compostos conhecidos como metabólitos secundários, abrangendo grupos de substâncias químicas de baixo peso molecular que costumam ter atividades fisiológicas expressivas. Como exemplos de metabólitos cita-se: huperizina A isolada da espécie vegetal *Huperzia serrata* e posteriormente isoladas de seu fungo endofítico *Acremonium* sp., diosgenin isolada de *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* e posteriormente do endofítico *Cephalosporium* sp., camptotecina isolada de *Nothapodytes nimmoniana* e posteriormente do fungo *Botryosphaeria parva*. Por fim os alcaloides da vinca, vincristina e vinblastina que são metabólitos encontrados na planta *Catharanthus roseus* e isoladas respectivamente dos fungos *Fusarium oxysporum* e *Alternaria* sp. (SILVA, 2014, ZHAO *et al.*, 2011). As estruturas das substâncias citadas encontram-se na Figura 6.

Figura 6. Metabólitos isolados de fungos endofíticos e de suas plantas hospedeiras.



2.4 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Como introduzido no tópico anterior, os fungos endofíticos têm uma interação próxima com o hospedeiro. Estes microrganismos podem colonizar todos os tecidos vegetais presentes em folhas, raízes, flores, caules, entre outros, sem causar prejuízo ao seu hospedeiro. Habitam geralmente o apoplasto, vasos condutores e em alguns casos o interior da célula (MUSSI-DIAS *et al.*, 2012).

Devido a sua forma de colonização, os endofíticos dispõem de menor competição por espaço e nutrientes, além de proteção contra condições ambientais desfavoráveis como radiação ultravioleta, temperaturas extremas e déficits de recursos hídricos (GUPTA *et al.*, 2019). Em troca, os endofitos podem desempenhar funções relevantes para a planta hospedeira como: ação contra microrganismos patogênicos, promoção do crescimento vegetal incluindo o enraizamento e na quelatação de metais. Além de produzir compostos químicos como enzimas fito-hormônios e metabólitos bioativos na defesa do vegetal (RODRIGUEZ *et al.*, 2009).

Kusari e colaboradores (2011) sugerem que os fungos endofíticos resistem à toxicidade conferida pela planta hospedeira por alterações específicas de resíduos de aminoácidos ou que biodegradem compostos tóxicos com a ajuda de enzimas específicas (KUSARI *et al.* 2011). Gupta *et al.* (2019) e Ibrahim *et al.* (2016) reforçam que são necessárias abordagens multidisciplinares para entender tais interações complexas.

Fan e colaboradores (2022) investigaram a relação entre compostos contendo enxofre e fungos endofíticos. Nesta pesquisa os autores fizeram uma revisão dos 143 novos compostos contendo enxofre que foram relatados de 1985 a março de 2022. Segundo os autores, entre as atividades biológicas relatadas, 42% dos compostos avaliados pelos autores apresentaram atividade antimicrobiana, enquanto 37% eram citotóxicos. Os autores afirmam que esse fato não é surpreendente pois a maioria dos medicamentos antimicrobianos e anticancerígenos aprovados pela FDA são produtos naturais ou derivados de produtos naturais. A maioria dos compostos contendo enxofre (92) eram peptídeos, seguidos por policetídeos (38), híbridos (6), terpenóides (5) e outros (2). Todos esses 92 peptídeos eram dicetopiperazinas, e os átomos de enxofre nessas moléculas derivados principalmente da L -cisteína.

De forma adicional, o enxofre dispõe de cinco estados de oxidação diferentes, e moléculas contendo enxofre frequentemente participam de reações redox biológicas e processos de transferência de elétrons. Notavelmente, dois aminoácidos essenciais, L-metionina e L-cisteína, contêm um átomo de enxofre, destacando ainda mais a

importância e a indispensabilidade do enxofre na biologia (FAN *et al.*, 2022). Além de ser um componente estrutural das pontes dissulfeto de proteínas, o enxofre está presente em vitaminas (biotina e tiamina), cofatores (S-adenosil-metionina) e nos grupos Fe-S das cadeias transportadoras *de* elétrons. Para o metabolismo vegetal o enxofre é um macronutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Em solos com baixa disponibilidade de enxofre, uma associação simbiótica entre plantas e fungos auxilia na aquisição de enxofre do solo: as plantas obtêm nutrientes de seu parceiro fúngico, que em troca recebe açúcares da planta. Nessas associações, os transportadores de membrana de fungos e plantas participam da transferência de nutrientes para a planta hospedeira (NARAYAN *et al.*, 2021).

De fato, um quinto (20%) dos medicamentos aprovados pela FDA contém pelo menos um átomo de enxofre. Essas drogas contendo enxofre têm esqueletos estruturais diferentes, como sulfonamidas, β -lactâmicos, tioéteres, tiazóis, tiofenos, fenotiazinas, sulfóxidos, tionucleotídeos, sulfonas, sulfatos e dissulfetos macrocíclicos. Além disso, é importante observar que muitos medicamentos contendo enxofre são produtos naturais ou seus derivados (FAN *et al.*, 2022).

Segundo Rodriguez e colaboradores (2009), os fungos endofíticos podem ser subdivididos em quatro classes (Classe 1 até Classe 4) que variam de acordo com: hospedeiro colonizado, colonização, tipo de transmissão e função ecológica. A classe 1 engloba fungos endofíticos *Clavicipitaceous*, que são específicos de gramíneas e conduzem a sua transmissão de forma vertical e horizontal. A classe 2 engloba predominantemente o filo Ascomycota e alguns Basidiomycota, realizam transmissão vertical e horizontal por meio de sementes e rizomas podendo colonizar diferentes tecidos da sua planta hospedeira. A classe 3 apresenta transmissão de forma horizontal, ocorrendo predominantemente nos tecidos acima do solo. A classe 4 apresenta transmissão horizontal e são caracterizados pela coloração escura, associados a raízes de plantas e podem possuir especificidade de hospedeiro (FELIX, 2019).

Gonçalves (2013) menciona a hipótese de relação entre os fungos endofíticos com seu hospedeiro de antagonismo equilibrado. Nesta relação proposta, o endofítico consegue crescer dentro da planta, evitando a ativação do mecanismo de defesa do hospedeiro, sem causar nenhuma doença, e essa associação permanece assintomática. Outros autores complementam e ressaltam que esta associação entre os fungos endofíticos e seu hospedeiro é extremamente complexa e ocorre de forma mutualística. No entanto, essa

interação pode se tornar patogênica quando se encontra em um estado de desequilíbrio, ou até mesmo tornar-se de ocorrência saprófita quando a planta atinge a velhice (KELLER *et al.*, 2005). De forma geral, defende-se que a relação dos endófitos com as plantas é muito mais complexa do que apenas um equilíbrio sugerido pela hipótese do antagonismo equilibrado (GUPTA *et al.*, 2019).

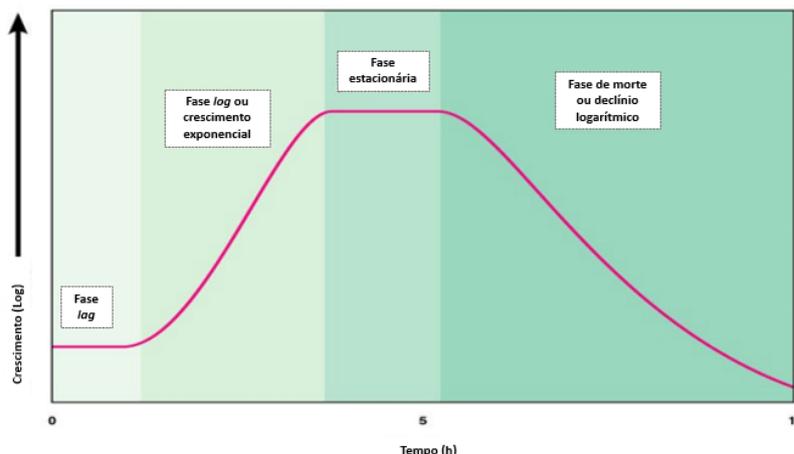
2.4.1 Crescimento microbiano e metabolismo fúngico

No contexto de produção de metabolitos ao longo do desenvolvimento dos fungos, sabe-se que os metabólitos primários são compostos essenciais para que ocorra o crescimento microbiano e desenvolvimento de hifas (quando aplicável), regulação de metabolismo e metabolismo energético, além de atuar como fonte intermediária na biossíntese de metabolitos secundários. Esses produtos primários normalmente são associados com a fase inicial de crescimento do organismo e a produção máxima ocorre ao final desta fase. Exemplos de metabólitos primários produzidos em abundância: enzimas, gorduras, ácidos orgânicos, bem como, substâncias de baixo peso molecular que incluem carboidratos, ácidos nucleicos e lipídios (HAMILL *et al.*, 2020).

Segundo Hamill e colaboradores (2020), para uma avaliação completa do crescimento de fungos devem ser levados em conta os processos de crescimento referentes a extensão do micélio, aumento na massa de células individuais, acúmulo de solutos compatíveis ou outras reservas endógenas, crescimento celular, esporulação, germinação, desenvolvimento de biofilme, outras formas de diferenciação (como exemplo, corpos de frutificação).

Nesta perspectiva, considerando uma população de microrganismos introduzida em um meio rico em nutrientes, estes apresentam quatro principais fases de crescimento: (1) fase *lag*, (2) fase *log* (logarítmica), (3) fase estacionária e (4) fase de declínio ou morte. Essas fases compõem a curva de crescimento microbiano. Na figura 7 apresenta-se um esquema das principais fases de crescimento fúngico, adaptado de Zhang (2013).

Figura 7. Curva de crescimento ou fases do crescimento fúngico.



As reações bioquímicas, fisiológicas e a cinética de crescimento microbiano geralmente passam por um período de latência antes de atingir sua taxa máxima. No contexto da cinética de crescimento microbiano, o período conhecido como 'latência', foi estudado desde o século XIX, sendo aplicado a processos biológicos desde a década de 1680 (HAMILL *et al.*, 2020).

Na fase *lag*, as células microbianas não aumentam significativamente em número, mas são metabolicamente ativas durante toda ou na maior parte desta. Neste período, são descritas a ativação de vias de sinalização e alterações transcricionais que levam à regulação positiva da montagem de proteínas, metabolismo de nucleotídeos, biossíntese de lipopolissacarídeos, respiração e outros processos necessários para a diferenciação e multiplicação. Estas atividades levam à divisão celular, podem facilitar o crescimento exponencial e incorporam diversas moléculas provenientes do meio. Ainda, durante essa fase, os organismos individuais aumentam de tamanho e produzem grandes quantidades de energia na forma de ATP. Até agora, há uma escassez de informações sobre se a fase *lag* é significativa como um indicador de estresse para diferentes tipos de fenótipo de crescimento (por exemplo, crescimento de colônias filamentosas) e para diferentes táxons filogenéticos (HAMILL *et al.*, 2020; ZHANG, 2013).

Uma vez que os microrganismos tenham se adaptado ao meio, o crescimento ocorrerá em velocidade exponencial ou logarítmica (fase *log*). Durante a fase *log*, os organismos se dividem na sua velocidade mais rápida, sendo geneticamente determinado. Alguns organismos demoram mais do que outros para irem da fase *lag* para a fase *log*, e nem todos se dividem precisamente juntos. À medida que o número de organismos cresce, os nutrientes são consumidos, os resíduos metabólicos são acumulados, o espaço pode se

tornar limitado e os organismos sofrerem por falta de oxigênio. Um fator importante é que, à medida que a disponibilidade de nutrientes diminui as células se tornam menos capazes de gerar ATP e sua taxa de crescimento se reduz, sendo este o fator limite para o crescimento logarítmico (HAMILL *et al.*, 2020; ZHANG, 2013).

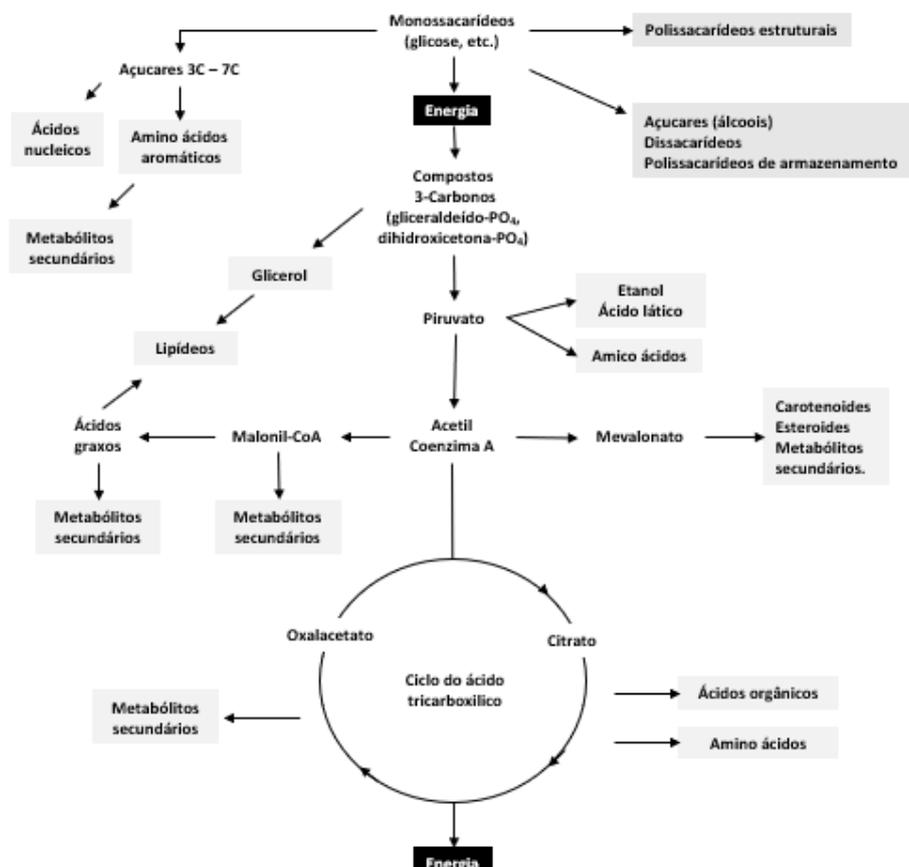
Quando divisão celular decresce à medida que novas células são produzidas com a mesma velocidade com que as células antigas morrem, o número de células vivas permanece constante, representado pela fase estacionária. À medida que as condições do meio vão se tornando cada vez menos favoráveis para divisão celular, muitas células perdem a capacidade de se dividir e morrem caracterizando a fase de declínio ou fase de morte. Durante a fase de declínio, muitas células sofrem involução, ou seja, assumem uma variedade de formas incomuns o que as torna difíceis de serem identificadas. Em culturas de organismos formadores de esporos, sobrevivem mais esporos do que células vegetativas (metabolicamente ativas). A duração dessa fase é variável (HAMILL *et al.*, 2020; ZHANG, 2013).

Uma vez que os fungos entram na fase estacionária de crescimento, os metabólitos primários podem ser novamente biotransformados em decorrência de estresses exercidos geralmente pela redução ou falta de nutrientes ou oxigênio. Contudo, metabólitos secundários são derivados de algumas vias biossintéticas comuns que se ramificam das vias metabólicas primárias e são muitas vezes produzidos como famílias de compostos relacionados, sendo específicos para grupos de organismos (HAMILL *et al.*, 2020).

Outra abordagem descrita por Fortkamp (2018) afirma que semelhanças de metabólitos provenientes do metabolismo fúngico e vegetal pode ser decorrente de vias biossintéticas comuns, geralmente em conjunto com o desenvolvimento morfológico. Assim, os avanços recentes em biologia molecular, genômica e bioinformática revelaram a participação de genes específicos que codificam a produção destas substâncias específica para ambos organismos vivos, fungos e plantas (GUPTA *et al.*, 2019).

Na Figura 8 é apresentado uma visão geral das vias metabólicas centrais dos fungos, ilustrando o ciclo do ácido tricarboxílico, que fornece os precursores para biossíntese de vários produtos metabólicos (caixas sombreadas). Segundo Zhang (2013) os metabólitos secundários (incluindo penicilinas e micotoxinas) são produzidos a partir de vários precursores, mas principalmente da acetil coenzima A.

Figura 8. Vias metabólicas centrais dos fungos. Fonte: Zhang (2013).

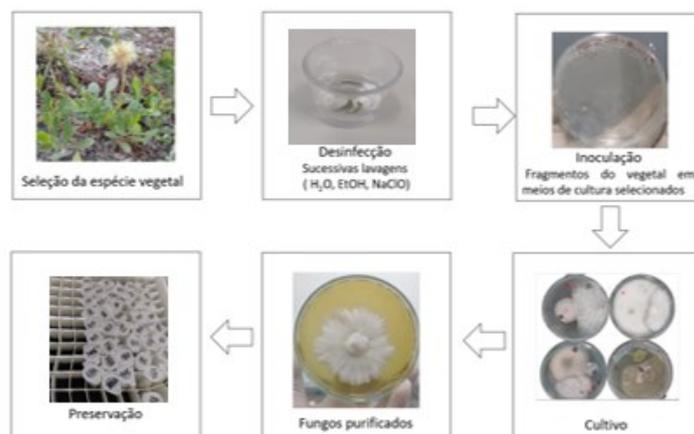


Para finalizar o tópico, visando a bioprospecção de metabólitos secundários de fungos endofíticos, Gupta e colaboradores (2019) descrevem alguns aspectos cruciais na busca por fungos endofíticos com potencial biológico. Os autores sugerem a busca por estes microrganismos em plantas com biologia incomum (ou seja, em altitudes muito altas, desertos, pântanos e pântanos, habitats salinos, florestas tropicais), plantas hospedeiras com propriedades medicinais e considerações etnobotânicas. Ainda, os habitats não explorados podem conter novos fungos endofíticos de interesse farmacêutico. Um bom estado físico de um local de amostragem sem sinal da doença da planta é recomendado para selecionar as plantas.

Felix (2019) reporta outros habitats que influenciam na maior variedade de fungos endofíticos como, as florestas tropicais, regiões de clima tropical quando comparados com a produção obtida em regiões de clima temperado. Além do habitat da planta hospedeira, para investigação da diversidade de endófitos encontrados em uma mesma espécie vegetal é de extrema importância estudar os métodos de isolamento destes microrganismos utilizados durante as pesquisas.

A soma de novos métodos utilizados para o isolamento fúngico, bem como a utilização de técnicas moleculares, permitiram estudos mais elaborados e um maior conhecimento desses micro-organismos nos mais distintos ambientes. Para isto, primeiramente são utilizadas técnicas de esterilização superficial do tecido vegetal para eliminação de microrganismos. Na sequência, os tecidos internos são fragmentados e distribuídos em placas de Petri e incubados. Após o crescimento, as colônias são isoladas para possibilitar a preservação e a identificação (microcultivo e/ou análise genômica) (STROBEL; DAISY, 2003; FELIX *et al.*, 2019). A Figura 9 exemplifica o método de obtenção de fungos endofíticos.

Figura 9. Exemplificação de método de obtenção de fungos endofíticos. Adaptado de Felix, 2019.



Desta forma, após o isolamento a identificação macro e microscópica destes microrganismos associada ao aprimoramento das tecnologias de sequenciamento de DNA viabilizam a identificação de novas espécies de fungos endofíticos. Sendo ainda associados as mais variadas espécies de plantas em diferentes habitats e regiões da flora brasileira e mundial (Felix, 2019).

Por fim, motivada pela carência de dados confiáveis de composição química disponíveis em literatura para *P. ruderale*, bem como pela utilização desta planta medicinal no município de Florianópolis (SC) constando na lista de plantas medicinais do horto didático de plantas medicinais da Universidade Federal de Santa Catarina, o presente estudo propõe uma avaliação química mais detalhada sobre esta planta, comparando diferentes indivíduos e locais de coleta. Somado a isto, a crescente busca por biomoléculas de fontes microbianas fomenta a investigação dos microrganismos desta

espécie vegetal, principalmente seus fungos endofíticos foliares. Ressalta-se ainda a descrita presença de derivados de tiofenos com expressiva atividade biológica que podem estar associados ao metabolismo fúngico. Não foi encontrada nenhuma publicação sobre a investigação de fungos endofíticos para o gênero *Porophyllum* (no período de 1980 até janeiro de 2023, utilizando as bases de dados Reaxys, Scifinder, Scopus, Pubmed, Scidirect e Google acadêmico).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a composição química de *Porophyllum ruderale* (Asteraceae) e explorar a comunidade de fungos endofíticos foliares presentes, em busca de metabólitos com potencial atividade biológica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os constituintes químicos de diferentes populações de *P. ruderale* coletadas em diferentes localidades (estado de Santa Catarina, Paraná e sementes cultivadas em casa de vegetação), utilizando a técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a espectrometria de massa (CLUE-ESI-qTOF).
- Realizar estudo estatístico para comparar o perfil químico das diferentes coletas e observar a contribuição dos metabólitos secundários para classificação dos grupos (clusters);
- Realizar estudo do microbioma das folhas de *P. ruderale* e quando possível correlacionar ao perfil químico obtido do extrato bruto das folhas da planta hospedeira.
- Isolar os fungos endofíticos foliares em *P. ruderale* e avaliar o perfil químico destes por CLUE-ESI-qTOF;
- Purificar por Cromatografia de Partição Centrifuga (CPC) os extratos de fungo para obtenção de metabólitos de interesse.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

Para o presente estudo, foram coletados indivíduos de *Porophyllum ruderale* em três diferentes localidades do Sul do Brasil. Duas amostras foram coletadas no estado de Santa e depositadas no herbário Flor da Universidade federal de Santa Catarina (UFSC), com número de exsicata FLOR0063639 referente as amostras coletadas próximas a praia (dunas) e FLOR0063635 referentes as amostras coletadas no mangue. Da mesma forma, a terceira coletada foi realizada no estado do Paraná, sob número de deposito FLOR0069610.

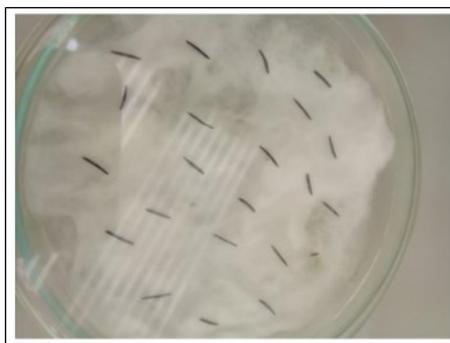
Após a coleta, foram separadas sementes de cada planta coletada (n=40) nas três diferentes localidades. As sementes foram submetidas ao processo de desinfecção descrito no item (4.1.1) e posteriormente cultivadas em casa de vegetação na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Para este estudo, foram cultivadas plantas independentes por 12, 6 e 3 meses após a germinação das sementes.

Para avaliação do microbioma foliar e isolamento de fungos endofíticos foram utilizados indivíduos da coleta com o número de exsicata FLOR0063639, descrito acima.

4.1.1 Germinação e cultivo das sementes de *P. ruderale*

O cultivo das sementes foi realizado segundo a metodologia descrita por Yamashita *et al.* (2008) com modificação. No primeiro momento, as sementes foram lavadas em água corrente e secas em temperatura ambiente (25°C). Em seguida, foi realizada a desinfecção da superfície das sementes (n=40) com etanol 70% (2 min.), hipoclorito de sódio 2,5% (3 min), etanol 70% (1 min.) e lavadas com água esterilizada (5-6 lavagens). Para o plantio das sementes germinadas foi utilizada uma mistura (1:1) de solo coletado no local e terra adubada não autoclavada. As sementes de *P. ruderale* utilizadas para germinação são demonstradas na Figura 10.

Figura 10. Sementes de *P. ruderale* em placa de Petri utilizadas para germinação. Fonte: A autora.



4.2 ANÁLISE DOS PERFIS QUÍMICOS DAS PARTES AÉREAS DE *Porophyllum ruderale* Jacq. Cass (ASTERACEAE) UTILIZANDO A TÉCNICA DE CLUE-ESI-QTOF

4.2.1 Preparo das amostras

Amostras de indivíduos de *Porophyllum ruderale* coletados em campo (Santa Catarina e Paraná) e cultivadas (Casa de vegetação) foram secas por 48h em estufa de circulação de ar a $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para a preparação do extrato (1:10 m/v), foram adicionados 50 mL da mistura de metanol e diclorometano (1:1 v/v) sob 5 g das partes aéreas secas. Esta mistura foi submetida à banho de ultrassom (Ultrasonic Clean 1650 A, Maxi Clean, Indaiatuba, Brasil) por duas horas. Para a análise por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (CL-EM) o solvente foi removido usando rotaevaporador a $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, os extratos brutos secos foram reconstituídos com mistura (1:1 v/v) de metanol e acetonitrila (grau HPLC) a $800\mu\text{g/mL}$. Como controle de qualidade (CQ) foi preparado um pool contendo todos os extratos obtidos e chegando à concentração final de $600\mu\text{g/mL}$, utilizando partes iguais de acetonitrila e metanol, ambos de grau HPLC.

4.2.2 Condições analíticas

As análises CLUE-ESI-QToF-EM foram realizadas em um sistema Acquity CLUE H-Class (Waters, Manchester, Reino Unido) equipado com bomba quaternária, amostrador automático e forno de coluna acoplado a um espectrômetro de massa Waters Xevo®G2-

S QToF (Waters®Co., Manchester, Reino Unido) equipado com ionização por eletrospray e analisadores quadro polo e tempo de voo quadrupolo (QToF). Coluna analítica CLUE ACQUITY UPC2 BEH 50 mm 2,1 mm 1,7 μm 130 Å.

A fase móvel consistiu de um sistema gradiente contendo 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B) e fluxo constante de 0,3 mL.min⁻¹: 0–4 min, 90% (A); 4–6,5 min, 70%(A); 6,5-10 min, 65% (A); 10–12 min, 10% (A), com limpeza e equilíbrio da coluna por 5min. O volume de injeção foi de 3 μL .

Os espectros de massa foram adquiridos no modo de ionização positivo (ESI+), com faixa de massa entre 100-1200 Da. O formato dos dados foi adquirido no modo Centroide e os parâmetros ESI+ foram: voltagem capilar 3 kV, voltagem do cone de amostragem 40V, temperatura de dessolvatação 400°C, temperatura da fonte 80°C, gás de dessolvatação/L 800°C.

4.2.3 Desrepliação dos extratos analisados

A desrepliação das amostras de *P. ruderule* foi realizada utilizando os dados de massas de alta resolução, os dados obtidos foram processados e comparados com os relatados na literatura e padrões analíticos (quercetina, ácido cumárico, ácido caféico, cafeato de etila, luteolina, canferol e rutina) disponíveis nos laboratórios disponíveis nos laboratórios Central Analítica e Farmacognosia da UFSC. A busca por substâncias nas bases de dados Reaxys® e Scifinder® foi realizada utilizando a fórmula molecular obtida no software MassLynx® (erro <5 ppm) e a identificação suportada pela consideração quimiotaxonômica e perfil de fragmentação (EM/EM e MS^c).

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA

As análises estatísticas, bem como a interpretação dos dados obtidos neste tópico foi realizado em parceria com o Dr. Carlos Eduardo Salles de Araújo, pesquisador na Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Epagri, Florianópolis, SC, Brasil.

4.3.1 Método de pré-processamento

O método de pré-processamento foi realizado usando a ferramenta MarkerLynx® presente no software MassLynx®. Foram realizadas três injeções no CL-EM de cada amostra de *P. ruderale* (n=3), totalizando 16 amostras e 61 injeções (incluindo 13 amostras de controle de qualidade, QC) indicadas na Tabela 1. Para o método de pré-processamento foram definidos os seguintes parâmetros: faixa de massa entre 50 Da e 1200 Da, tolerância de 0,05 dos valores de massa expressos em Da, limiar de 50.000 em relação à intensidade do sinal cromatográfico, erro de massa de 0,5 Da e erro de tempo de retenção de 0,3 min. O tempo de retenção foi corrigido pelo marcador ácido clorogênico (substância presente no perfil químico de todas as amostras avaliadas, m/z 355,0951 a 1,25min.). Os espectros de EM foram considerados apenas no modo positivo, representando todos os picos detectados. No modo negativo, não foram observados muitos íons, sendo que o modo positivo de análise contemplou todas as substâncias detectadas.

Tabela 1. Injeções (a-c) de cada amostra dos extratos de *P. ruderale* realizadas no CL-EM, totalizando 16 amostras e 61 injeções, em modo positivo de análise.

Grupo	Amostra	Replicata 1	Replicata 2	Total
Controle de qualidade	CQ	-	-	13
<i>P. ruderale</i> <i>Cultivado</i>	SC 12 meses	1a-1c	2a-2c	6
	SC 6 meses	1a-1c	2a-2c	6
	SC 3 meses	1a-1c	-	3
	PR 12 meses	1a-1c	2a-2c	6
	PR 6 meses	1a-1c	2a-2c	6
	PR 3 meses	1a-1c	-	3
<i>P. ruderale</i> <i>Coletado</i>	Estado de Santa Catarina *	1a-1c	2a-2c	3
	Estado de Santa Catarina **	1a-1c	2a-2c	3
	Estado do Paraná	1a-1c	2a-2c	3

* Mangue, **praia; SC (Santa Catarina), PR (Paraná).

4.3.2 Método de processamento estatístico

Os componentes principais (PCs) de todos os íons detectados no modo positivo (n=3846) foram computados para reduzir a dimensionalidade e eliminar redundância. Os

dados foram centralizados e utilizada a decomposição de valor singular (SVD) para calcular os PCs. Desta forma optou-se por trabalhar com os primeiros 23 PCs que explicaram mais de 99% da variância do conjunto de dados. Na sequência foi construída uma árvore hierárquica (dendograma), usando a distância euclidiana ao quadrado (método de Ward). Além disso, um algoritmo de agrupamento k-medias também foi usado para verificar a coerência do particionamento do agrupamento. O número ótimo de grupos para o método k-medias foi determinado executando testes de três a doze grupos. Os valores médios de silhueta foram utilizados como critério de decisão, indicando uma medida do quão semelhante uma amostra é do seu próprio grupo em comparação com outros grupos.

4.4 MICROBIOMA FÚNGICO ASSOCIADO AS FOLHAS DE *Porophyllum ruderale* (Jacq) Cass.

A análise do microbioma das folhas de *P. ruderale* foi realizada pela empresa GoGenetic, denominada de Microbioma All in (fungos). Conforme dados informados pela empresa, para análise de microbioma foi empregado o kit comercial Loccus DNA em extrator Extracta 32, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. A qualidade e quantificação foram avaliadas por espectrofotometria em Nanodrop (Thermo). Foi amplificado um segmento de aproximadamente 350 bases da região ITS2 utilizando-se os primers ITS3F/ITS4R, e as seguintes condições de PCR: 95°C por 3 min; 25 ciclos de 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 30 seg, seguido de etapa à 72°C por 5 min. Os amplicons foram ligados a barcodes dual index Nextera da Illumina®, nas seguintes condições: 95°C por 3 min; 08 ciclos de 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 30 seg, seguido de etapa à 72°C por 5 min. Os produtos foram então purificados, reunidos em pools e posteriormente sequenciados no sequenciador “MiSeq” da Illumina, em pairend de 250bases. As leituras ou “reads” obtidos no sequenciador foram analisadas na plataforma QIIME2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Caporaso et al., 2011, 2010), seguindo-se um fluxo de trabalho desde a remoção de sequências de baixa qualidade, filtração, remoção de quimeras e classificação taxonômica. As sequências foram classificadas em gêneros de fungos através do reconhecimento de Variantes de Sequências de Amplicons (ASVs), com banco UNITE.

Essa análise investiga a região do Espaço Interno Transcrito (ITS) do rDNA dos fungos, amplificadas por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase, que consiste na amplificação de uma região específica de DNA). A região ITS está localizada entre os genes 18SrDNA e 28SrDNA e pode ser amplificada por iniciadores específicos. Utiliza-se a região ITS por ser uma região que evolui mais rapidamente, podendo variar intraespecificamente na sequência de bases e no comprimento. Por esse motivo esta técnica é amplamente utilizada para determinar a taxonomia de espécies e gêneros fúngicos (MENEZES *et al.*, 2010).

Como amostras para análise do microbioma foram selecionadas folhas de *P. ruderale* coletadas nas proximidades da praia da Joaquina no município de Florianópolis – SC. Para isto, foram realizadas coletas de folhas de indivíduos saudáveis (n>5) da espécie e posteriormente as amostras foram separadas em grupos, contendo cerca de 2 g de folhas para cada. Destes grupos, quatro amostras foram encaminhadas para a empresa de biotecnologia GoGenetic e uma para avaliação de fungos endofíticos (Item 4.5), as demais amostras foram armazenadas em freezer -80 como estoque.

A Análise pela empresa GoGenetic incluiu a extração de DNA do material enviado (n=4), amplificação da região ITS de fungos, sequenciamento em Illumina MiSeq (PE 250b, ~30 mil reads). Foram geradas mais de 100 mil sequências por amostra. Contudo, a maioria delas foi referente à planta. Foram utilizadas apenas as sequências classificadas como fungos. Os resultados incluíram os arquivos de sequências representativos, lista de fungos em percentual e em números absolutos de sequências.

4.5 INVESTIGAÇÃO DE FUNGOS ENDOFITICOS DE OCORRENCIA NATURAL EM *Porophyllum ruderale* (Jacq) Cass.

Para esta etapa do trabalho, foi utilizado o espaço físico e materiais do Laboratório de Microrganismos e Processos Biotecnológicos, pertencente ao Centro de Ciências Biológicas (CCB-MIP) da UFSC com auxílio do Prof. Dr. Cláudio Roberto Fonseca Sousa Soares, Dr^a. Anabel Gonzalez Hernandez e Dr^a Emanuela Pille.

Ressalta-se que os experimentos incluindo procedimentos asséptico e o trabalho com os fungos foram realizados em fluxo laminar vertical e horizontal (dependendo do

material a ser manipulado). Os meios de cultura os demais materiais foram autoclavados durante 20 min a 120° C, conforme procedimento padronizado pelo laboratório.

4.5.1 Seleção do material vegetal

Para esta etapa do estudo, optou-se por utilizar como material vegetal as folhas integras e saudáveis de *P. ruderale*. Foram selecionadas as amostras da coleta realizada nas proximidades da praia da Joaquina, Florianópolis (SC campo), analisada previamente na avaliação fitoquímica. A escolha desta amostra foi devido ao habitat hostil em que a planta se encontra, com exposição direta à luz solar, pouco recurso hídrico e solo arenoso (GUPTA *et al.*, 2019), estas recomendações serão discutidas no Item 5 Resultados. Adicionalmente, pela facilidade de coleta, semelhança na composição química entre as amostras e pela facilidade de acesso para futuras coletas optou-se também por avaliar os fungos endofíticos de ocorrência natural presentes nas amostras coletadas na casa de vegetação, cultivadas por 12 meses (SC 12 meses)

4.5.2 Desinfecção das folhas de *P. ruderale*

O processo de desinfecção das folhas de *P. ruderale* (SC campo e SC 12 meses) foi definido através da avaliação dos parâmetros: tempo e ciclos de contato das folhas com etanol 70%, hipoclorito de sódio 2,5% e lavagens com água destilada autoclavada. Inicialmente foram selecionados três protocolos (Protocolo 1 - 3) de desinfecção através de revisão da literatura. Os protocolos foram selecionados levando em consideração: protocolos de desinfecção previamente desenvolvidos para espécies vegetais da família Asteraceae e partes da planta (folhas). Posteriormente estes protocolos foram adaptados, obtendo-se os Protocolos 4 e 5. Sendo eles:

- Protocolo 01: etanol 70% (1min.), hipoclorito de sódio 2,5% (4 min.), etanol 70% (30 seg.) e água destilada autoclavada (três lavagens rápidas) (CHAGAS *et al.*, 2018).
- Protocolo 02: etanol 70% (1min.), hipoclorito de sódio 2,5% (5 min.), água destilada autoclavada (três lavagens de 1 min.) (RIBEIRO *et al.*, 2014).
- Protocolo 03: etanol 99% P.A (1min.), hipoclorito de sódio 2,5% (6 min), etanol 99% P.A (30 seg.) e água destilada autoclavada (três lavagens de 1 min.) (WARDECKI *et al.*, 2015).

- Protocolo 04: etanol 70% P.A (1min.), hipoclorito de sódio 2,5% (4min), etanol 70% P.A (1 min.) e água destilada autoclavada (três lavagens de 1 min.). Adaptado de Chagas *et al.* (2018).
- Protocolo 05: etanol 70% P.A (1min.), hipoclorito de sódio 2,5% (2 min), etanol 70% P.A (30 seg.) e água destilada autoclavada (três lavagens de 1 min.). Adaptado de Chagas *et al.* (2018).

A água da última lavagem de cada um dos protocolos foi plaqueada (em duplicata) e utilizada como controle para avaliar se o processo de desinfecção foi suficiente para retirar os microrganismos epifíticos (que habitam a parte externa da folha), estas placas foram armazenadas por 21 dias a fim de monitorar se houve ou não crescimento de microrganismos.

4.5.3 Seleção dos meios de cultura e método de plaqueamento

Foram avaliados 5 meios de cultura para proporcionar maior recuperação de fungos endofíticos. Para isso avaliou-se o crescimento dos fungos nos meios de cultura: Agar triptona de soja (TSA), Agar batata dextrose (BDA), Ágar Sabouraud (SAB), ISP-2 malte e meio de aveia (Oat meal) em duas repetições de cada. Também foram avaliados os parâmetros: tempo de incubação (14 e 28 dias) e aplicação das amostras na placa (folhas maceradas com salina e folhas cortadas em pequenos fragmentos) incubados em estufa a temperatura ambiente.

Foram avaliadas duas formas de plaqueamento. Em um primeiro momento trabalhou-se com o plaqueamento do material vegetal utilizando 3 fragmentos das folhas, cortados com o auxílio de uma tesoura (autoclavada) em pequenos quadrados de aproximadamente 1x1 cm. A segunda forma de plaqueamento foi utilizando solução salina a 8,5 g/L, para este foi utilizando a proporção de 1:3 g/L de proporção entre folhas e solução salina. 100 µL desse macerado foi aplicado sobre a placa de Petri e espalhado utilizando alça de Drigalski.

4.5.4 Isolamento das colônias

Os materiais fungicos foram purificados e isolados por amostragens sucessivas (mínimo de dois repiques), conforme procedimento padronizado pelo laboratório (MAITAN, 1998).

4.5.5 Criopreservação dos fungos isolados

Os fungos endofíticos isolados foram preservados utilizando mistura de glicerol (20%) e peptona (80%). Para cada fungo isolado, foi adicionado um fragmento da sua colônia a 1 mL da respectiva solução em ependorfs (n=3) e posteriormente armazenada em freezer -80. Os fungos isolados também foram armazenados em 1 mL de óleo mineral autoclavado, utilizando microtubos(n=3) e armazenados em freezer -80.

4.5.6 Microcultivo de fungos endofíticos isolados

Os fungos isolados obtidos foram agrupados de acordo com as similaridades e aspectos da colônia. Por obter uma recuperação maior de fungos extraídos das folhas de *P. ruderalis* coletadas no campo (SC campo) e estes em sua grande maioria apresentavam colônias muito semelhantes as obtidas da coleta na casa de vegetação (SC 12 meses) optou-se por realizar o microcultivo utilizando as colônias obtidas da coleta do campo (25 fungos isolados).

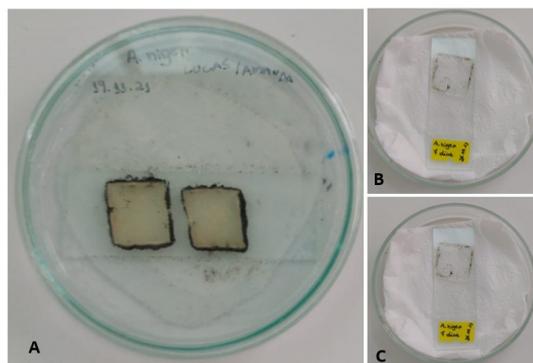
Para a identificação preliminar do fungo foi utilizada a técnica de Riddell (1950) adaptada. Assim, para a obtenção das estruturas microscópicas foi realizado o microcultivo em meio batata dextrose ágar (BDA), utilizando material estéril (autoclavados): placa de Petri de vidro (câmara), lâmina, lamínula, papel filtro hidrófilo e água purificada autoclavada.

Em fluxo vertical, foi transferido para cada lâmina um cubo de ágar BDA (2 x 2 cm) no qual fragmentos das colônias do fungo foram semeadas nos quatro cantos do cubo de ágar e na sequencia cobertos com lamínula. Por fim o papel filtro foi umedecido com água estéril e a câmara foi fechada e incubada a temperatura ambiente por 7 e 14 dias.

Após o período predeterminado de crescimento do fungo, cada lamínula foi retirada com auxílio de pinça e depositada sobre uma lâmina limpa contendo uma gota de lactofenol. Esperou-se a secagem das lâminas em temperatura ambiente e na sequencia as bordas das lamínulas foram vedadas com esmalte incolor e observadas ao microscópio

(aumento de 20 e 40x). Desta forma, pode-se observar na Figura 11 a representação do microcultivo, bem como a confecção das lâminas para observação do material fúngico em microscópio ótico. O crescimento fúngico em 7 e 14 dias foi observado e comparado com literatura (CBS 2011).

Figura 11. Microcultivo e lâminas para observação do material fúngico em microscópio



Legenda: (A) microcultivo, (B) lâmina em 7 dias, (C) lâmina em 14 dias.

4.6 TRIAGEM DE METABOLITOS DE FUNGOS ENDOFITICOS ISOLADOS DE *Porophyllum ruderale* (Jacq) Cass, POR CLUE-ESI-qTOF.

4.6.1 Processo extrativo para triagem de metabólitos fúngicos por CLUE-EM

Todos os fungos que foram submetidos ao microcultivo tiveram seu perfil químico analisado por LC-MS nos períodos de 7, 14 e 21 dias. A extração foi realizada utilizando o meio de cultura com o fungo acrescido de acetato de etila como líquido extrator. Na sequência, esse material foi macerado por 2h em banho de ultrassom. As culturas foram filtradas utilizando gaze e o filtrado foi concentrado e seco. Em seguida, os extratos foram solubilizados em acetonitrila grau HPLC até concentração de 600 µg/mL, filtrados em membrana PTFE hidrofóbica (0,22 µm) e avaliados através de CLUE-ESI-qTOF conforme descrito no Item 4.2.2 (Condições analíticas).

Todos os cromatogramas foram avaliados quanto a complexidade química das amostras e também a possibilidade de novas substâncias. De tal modo foram selecionados dois fungos endofíticos, e estes foram encaminhados para análise molecular pra identificação das espécies (descritas abaixo, no Item 4.6.2). A seleção destes fungos ocorreu pela identificação de substâncias que apresentaram potenciais atividades

farmacológicas descritas em literaturas (pesquisas realizadas nas bases de dados Pubmed, Scifinder e Scopus). Para o fungo identificado como *Diaporthe paranensis* foram identificados peptídeos com sequencias de aminoácidos nunca descritas para a espécie, por meio do perfil de fragmentação EM/EM dos íons correspondentes. Diante da complexidade da elucidação estrutural dos peptídeos, optou-se para dar seguimento aos estudos da presente tese com esta espécie.

O segundo fungo, identificado como *Penicillium* sp. também apresentou promissores metabolitos secundários e foi direcionado para trabalhos de iniciação científica, já iniciados em nosso grupo de pesquisa (mais detalhes serão apresentados no Item 5, Resultados).

4.6.2 Identificação dos fungos selecionados

Para identificação molecular das colônias isoladas, cada um dos fungos foi cultivado em meio BDA em placa de Petri. As amostras foram entregues em mãos para a empresa GoGenetic em Curitiba – PR. Segundo informações fornecidas pela empresa, a identificação dos microrganismos foi realizada por sequenciamento de DNA (ITS) com confiança de identidade de 99% para o isolado “*Penicillium* sp.” (514/515 bases) e 99% (524/528bases) para o isolado “*Diaporthe paranensis*”.

4.6.3 Obtenção dos extratos de *Diaporthe paranensis*

Inicialmente foram preparados aproximadamente 2,5 L de meio de cultura BDA e distribuídos em 90 placas de Petri. Na sequência, foram transferidos pequenos fragmentos do fungo isolado para cada placa e cultivados a temperatura ambiente por 14 dias. Ao total obteve-se uma massa de 871g de fungo + meio de cultura. Essa massa foi transferida para um frasco com capacidade de 5L e macerada com 1,3 L de acetato de etila por 7 dias. Após, o material foi filtrado e o solvente foi recuperado. O solvente recuperado foi utilizado para macerar novamente o mesmo material, por mais 7 dias. O extrato foi seco sob pressão reduzida e armazenado em geladeira até sua utilização. Esse processo de obtenção e preparo dos meios de cultura, transferências dos fungos e extração foi repetido duas vezes.

4.7 PROPOSTA DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA DE PARTIÇÃO CENTRIFUGA (CPC) PARA ISOLAMENTO DE PEPTÍDEOS DETECTADOS NO EXTRATO DO FUNGO ENDOFÍTICO *Diaporthe paranensis*.

Visando o desenvolvimento de método de isolamento por CPC para isolamento e/ou obtenção de fração enriquecida com peptídeos de interesse, o extrato bruto obtido a partir de colônias isoladas de *Diaporthe paranensis* foi submetido ao fracionamento por cromatografia de partição centrífuga (CPC). Para isto foi utilizado um Cromatógrafo de Partição Centrífuga (CPC), instrumento Armen® modelo SCPC-250- L equipado com rotor de 250 mL de capacidade acoplado a um sistema Spot Prep II (equipado com uma bomba quaternária, detector de arranjo de diodos e um coletor automático). Os dados foram processados em software Armen Glider CPC v.5.0 (Armen®). Disponível na Central Cromatográfica, vinculada ao Laboratório de Farmacognosia da Universidade Federal de Santa Catarina.

4.7.1 Eleição do sistema cromatográfico pelo método de “Shake flask”

Para determinação do coeficiente de partição (K_D) das substâncias de interesse, foi realizado o teste de “Shake flask”. Para isto foram selecionadas diferentes combinações de fases do sistema ARIZONA (Apendice 1). O sistema ARIZONA (ou sua variante HEMWat) propõe modelos bifásicos (de A até Z) de eluentes utilizando: heptano (ou n-hexano), acetato de etila, metanol e água (BOJCZUK; ŻYŻELEWICZ; HODUREK, 2017, DA SILVA, 2019), sendo o sistema mais usado em CPC.

Para definir qual o melhor sistema de eluentes para obtenção dos peptídeos, foi realizado o teste “Shake flask” que consistiu em adicionar pequena quantidade de amostra em um tubo de ensaio contendo as combinações de fases propostas no Sistema ARIZONA. Na sequência o tubo foi vedado e agitado vigorosamente, observou-se a separação das fases superior (*upper*, *U*) e inferior (*lower*, *L*). Com auxílio de uma micro pipeta, cerca de 1mL de cada fase foi transferida para novo tubo e secada a vácuo utilizando speedvac (SPD1010 e SPD2010 Integrated SpeedVac Systems, Thermo Scientific®), retomadas em 1 mL de acetonitrila grau HPLC, filtradas (tamanho de poro de 0,22 μm) para vials e analisadas por CLUE-EM (Item 4.2.2, condições analíticas).

Para cálculo do K_D (coeficiente de partição), foi utilizada a razão entre a área de pico do composto de interesse no cromatograma da fase estacionária (FE) e a área do mesmo na fase móvel (FM) (BERTHOD, 2017), sendo que para o modo de eluição ascendente a fase inferior corresponde à FE enquanto que a fase superior representa a FM. Para o modo descendente, essa determinação foi inversa. Com auxílio do Software MassLynx®, foi extraída a área do pico correspondente aos peptídeos de interesse, o K_D foi calculado segundo a fórmula:

$$K_D = \frac{A_{FE}}{A_{FM}}$$

Onde,

A_{FE} = área da substância de interesse na fase estacionária do sistema para CPC.

A_{FM} = área da substância de interesse na fase móvel do sistema para CPC.

Para o presente estudo, o Sistema N do modelo ARIZONA se mostrou o mais adequado, obtendo-se valores de K_D entre 1 e 2. Para este sistema foi utilizado a mistura dos solventes: hexano: acetato de etila: metanol e água purificada nas proporções de 1:1:1:1, ou seja, em partes iguais.

4.7.2 Condições de análise por CPC

As condições de análise foram: “**Fase de preenchimento**” do rotor durou 10 min, com fluxo de 30mL/min, 500 RPM com 100% de fase estacionária. “**Fase de equilíbrio**” durou 10 min, com fluxo de 8 mL/min, 2000 RPM com 100% de fase móvel, nesta fase observou-se que a porcentagem de perda da fase estacionária foi de 80%. “**Fase de análise**” durou 90 min. com fluxo de 8 mL/min, 2000 RPM com 100% de fase móvel. “**Fase de extrusão**” durou 30 min com fluxo de 15 mL/min, 2000 RPM com 100% de fase estacionária. Ao total foram obtidas 92 frações.

O preparo da amostra foi realizado utilizando 500 mg do extrato bruto solubilizado em 10 mL de mistura de fase inferior e fase superior (1:1), filtrados em filtro PTFE de 22 μ m. O monitoramento das frações foi realizado utilizando CCD e CLUE-EM.

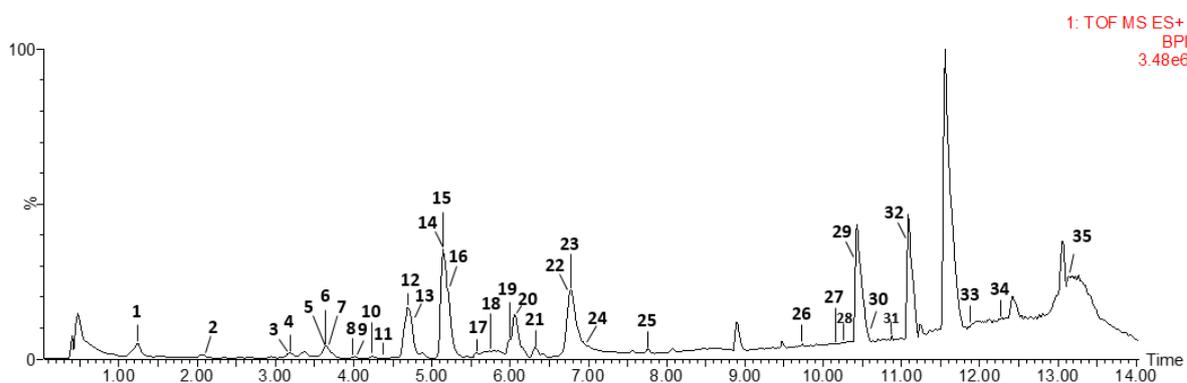
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA DE EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DE DIFERENTES COLETAS DE *Porophyllum ruderale* (Jacq) Cass. POR CLUE-ESI-qTOF.

Análises por CLUE-ESI-QToF EM foram realizadas para comparar e caracterizar os principais metabólitos secundários presentes em indivíduos de *P. ruderale* obtidos por cultivo em casa de vegetação por 12, 6 e 3 meses e por coleta em campo nos estados do Paraná (PR) e Santa Catarina (SC). Essa comparação foi feita pela primeira vez na literatura.

Para controle interno foi preparado um pool de amostras, contendo uma alíquota de cada uma das preparações de *P. ruderale*. Este controle foi denominado controle de qualidade (CQ), sendo representativo para todas as amostras e monitorado entre as análises cromatográficas. O cromatograma obtido (EM) do CQ é apresentado na Figura 12, com os picos identificados por ordem de eluição. Os metabólitos secundários foram caracterizados quanto ao tempo de retenção (T_R), perfil de fragmentação (EM/EM e EM^E) e comparação com padrão analítico ou com bases de dados (Scifinder, Reaxys e Chemnet database). Na sequência, as substâncias identificadas foram sumarizadas na Tabela 2. Os espectros de massas e os cromatogramas de cada extração encontram-se em Apêndices.

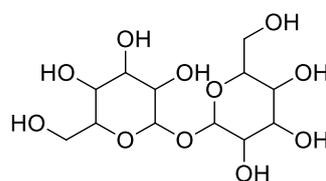
Figura 12. Cromatograma do Controle de Qualidade (QC) dos extratos obtidos de *P. ruderale*, no modo positivo de análise (ESI+).



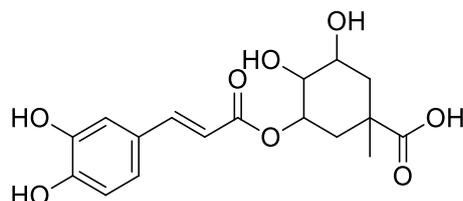
Observação. Todos os picos não anotados são impurezas observadas no branco. Considera-se “branco” o solvente utilizado para as análises de CLUE-EMⁿ, sendo analisado nas mesmas condições das amostras.

Pico 1 com T_R 0,47 min e m/z 381,0797), foi identificado como maltose [2 Hex + K]⁺. Foi observado que o íon precursor apresentou perda de 162 Da, correspondendo a uma hexose e produzindo o íon fragmento m/z 219,0697. Polissacarídeos e dissacarídeos são um dos principais componentes da dieta humana (LOVEGROVE *et al.*, 2017). Estas substâncias podem ser encontradas no metabolismo de plantas, animais e microrganismos, sendo conhecidas por seu alto valor nutritivo para a saúde humana. Alguns polissacarídeos importantes, como mucilagem e gomas, têm aplicações nas áreas médica, cosmética, farmacêutica, nutracêutica e alimentícia (VAN DAM *et al.*, 2017). Na Figura 13 é apresentada a estrutura química da maltose.

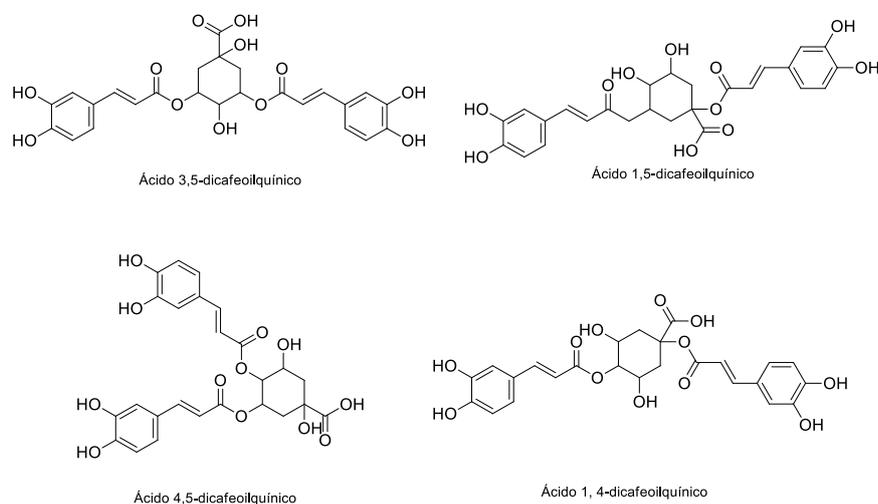
Figura 13. Estrutura química da maltose.



Pico 2 com T_R 1,25 min e m/z 355,1027 [$C_{16}H_{19}O_9 + H$]⁺, foi identificado como isômero do ácido cafeoilquínico. Este íon precursor produziu fragmentos diagnósticos com m/z 135,0447 (perda da porção cafeoil mais uma molécula de CO), m/z 163,0397 (ácido cumárico) e m/z 181,0500 (perda da porção correspondente ao ácido quínico). O padrão de fragmentação sugerido corrobora com a descrição de Carvalho (2016) e Nascimento *et al.* (2020). Esta classe de substâncias foi previamente identificada na família Asteraceae (ATHAYDE *et al.*, 2021; NASCIMENTO *et al.*, 2020). Na Figura 14 é apresentada a estrutura química do ácido cafeoilquínico.

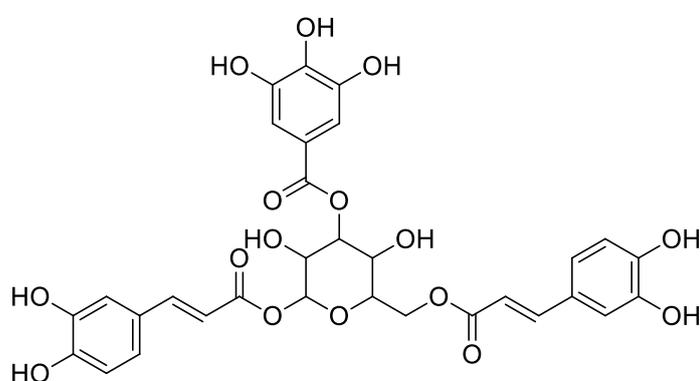
Figura 14. Estrutura química do ácido cafeoilquínico

Os **picos 3, 6, 7 e 10** foram observados em T_R : 2,172 min, 3,657 min, 3,657 min e 4,012, respectivamente com o mesmo valor de massa m/z 517,1341 $[C_{25}H_{25}O_{12} + H]^+$. Esses metabólitos foram identificados respectivamente como ácido 1,4-dicafeoilquínico, ácido 1,5-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico. Estes íons produziram os seguintes fragmentos diagnósticos de EM/EM: m/z 337,0923 produzidos após uma perda de ácido cafêico, m/z 181,0500 correspondente ao íon ácido cafêico (perda de ácido quínico) e m/z 163,0396 correspondente ao cátion relacionado ao ácido cafêico com perda de uma molécula de água. Os padrões de fragmentação são consistentes com os previamente relatados por Nascimento et al. (2020) e Athayde et al. (2021). Além disso, a ordem dos tempos de retenção desses íons precursores correspondeu aos relatados por Pawłowska e colaboradores (2022). Na Figura 15 são representados os ácidos 1,4-dicafeoilquínico, 1,5-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico.

Figura 15. Estrutura química das substancias ácido 1,4-dicafeoilquínico, ácido 1,5-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico.

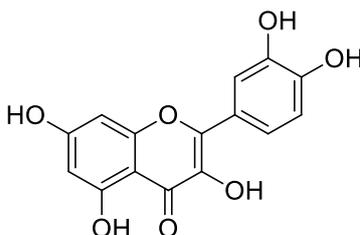
O pico 11 observado em T_R 4,249 min com m/z 657,1445 [$C_{31}H_{28}O_{16} + H$]⁺ foi identificado como galoil-dicafeoil-glicose(isômero). O fragmento diagnóstico de MS/MS correspondeu a perda de ácido cafêico em m/z 337,0923, e do fragmento de íon ácido cafêico desidratado em m/z 163,0396. Esses fragmentos foram produzidos a partir da fragmentação do esqueleto de dicafeoil (NASCIMENTO *et al.*, 2020). Na Figura 16 é representada a estrutura química do galoil-dicafeoil-glicose (isômero).

Figura 16. estrutura química do galoil-dicafeoil-glicose (isômero).



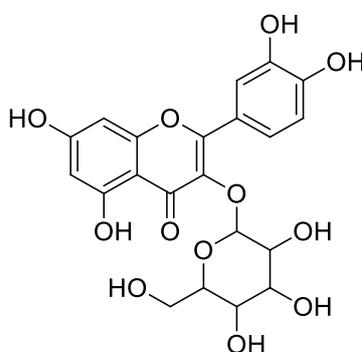
O pico 4 em T_R : 3,213 min apresentou o íon precursor m/z 303,0503 [$C_{15}H_{11}O_7 + H$]⁺. A estrutura da quercetina foi atribuída a esse metabólito com base nos fragmentos MS^e observados em m/z 285,0397 e m/z 257,0448, correspondendo à perda de H₂O (-18 Da) e CO (-28 Da), respectivamente. Além disso, Pawłowska *et al.* (2022) descrevem a detecção e isolamento de derivados de quercetina de *P. ruderale*. Na Figura 17 é apresentada a estrutura química da quercetina.

Figura 17. Estrutura química da quercetina.



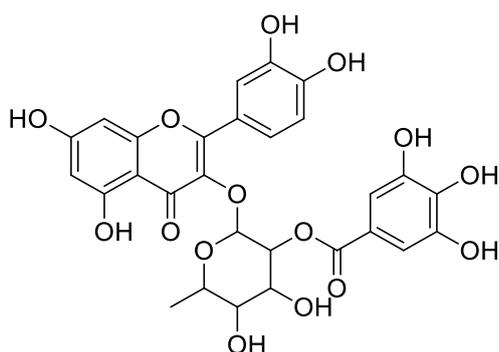
Pico 5 em T_R : 3,214 min com m/z 465,1027 [$C_{21}H_{21}O_{12} + H$]⁺ forneceu um fragmento de íon com m/z 303,0506, correspondente ao valor de massa do pico 4. A diferença entre este fragmento e o íon precursor é 162 Da sendo consistente com a perda de uma hexose. A aglicona foi identificada como quercetina com base nos valores de massa m/z 285,0397 (perda de H_2O , -18 Da) e m/z 257,0448 (perda de CO , -28 Da) e considerações quimiotaxonômicas (PAWŁOWSKA *et al.*, 2022). Esse composto foi identificado como quercetina glicopiranosídeo (isoquercitrina) (Figura 18) e seu padrão de fragmentação corrobora com os relatados por Perlatti *et al.* (2016), principalmente à fragmentação devido à perda de porções glicosídicas de flavonoides glicosilados.

Figura 18. Estrutura química da isoquercetina.



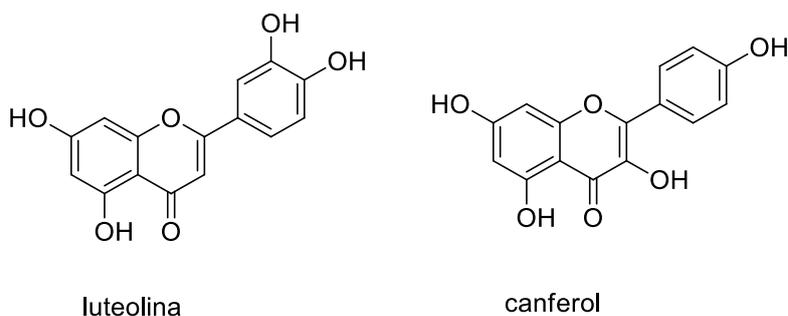
Da mesma forma, o **Pico 12** foi identificado como galoilquercitrina (T_R : 4,249 min, m/z 601,1186 [$C_{28}H_{25}O_{15} + H$]⁺). Foi observado no espectro de MS^e o íon fragmento com m/z 299,0774, correspondendo a perda de massa do flavonoide (quercetina), e o fragmento íon m/z 281,0672 sugeria uma perda de água (-18 Da) a partir de m/z 299.0774. A presença foi fragmento de massa correspondente à aglicona (quercetina) em m/z 303,0500 já foi previamente descrita na literatura (FRAIGE *et al.*, 2017). Na Figura 19 é apresentada a estrutura química da galoilquercitrina.

Figura 19. Estrutura química da galoilquercitrina.



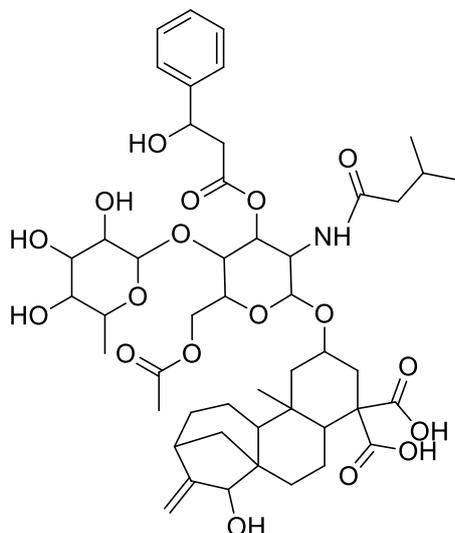
Na sequência, os **picos 8 e 9** foram identificados como dois flavonoides isoméricos de posição, nomeadamente luteolina e canferol, respectivamente (T_R : 3,692 min e 3,941 min; m/z 287,0554 [$C_{15}H_{11}O_6 + H$] $^+$). O padrão de fragmentação de ambas as substâncias revelou em ESI (+), o íon base em m/z 259,0455 formado pela perda de CO (28 Da). Essas substâncias foram identificadas por meio de padrões injetados nas mesmas condições das amostras. O tempo de retenção forneceu informações de que a luteolina apresentou menor tempo de retenção do que o canferol, nas condições analíticas propostas (fase móvel e tipo de coluna, C18). Este achado está de acordo com o trabalho relatado por Pawłowska et al. (2022) e Nascimento et al. (2020). Na Figura 20 são apresentadas as estruturas químicas das substâncias propostas, luteolina e canferol.

Figura 20. Estrutura química das substâncias luteolina e canferol.



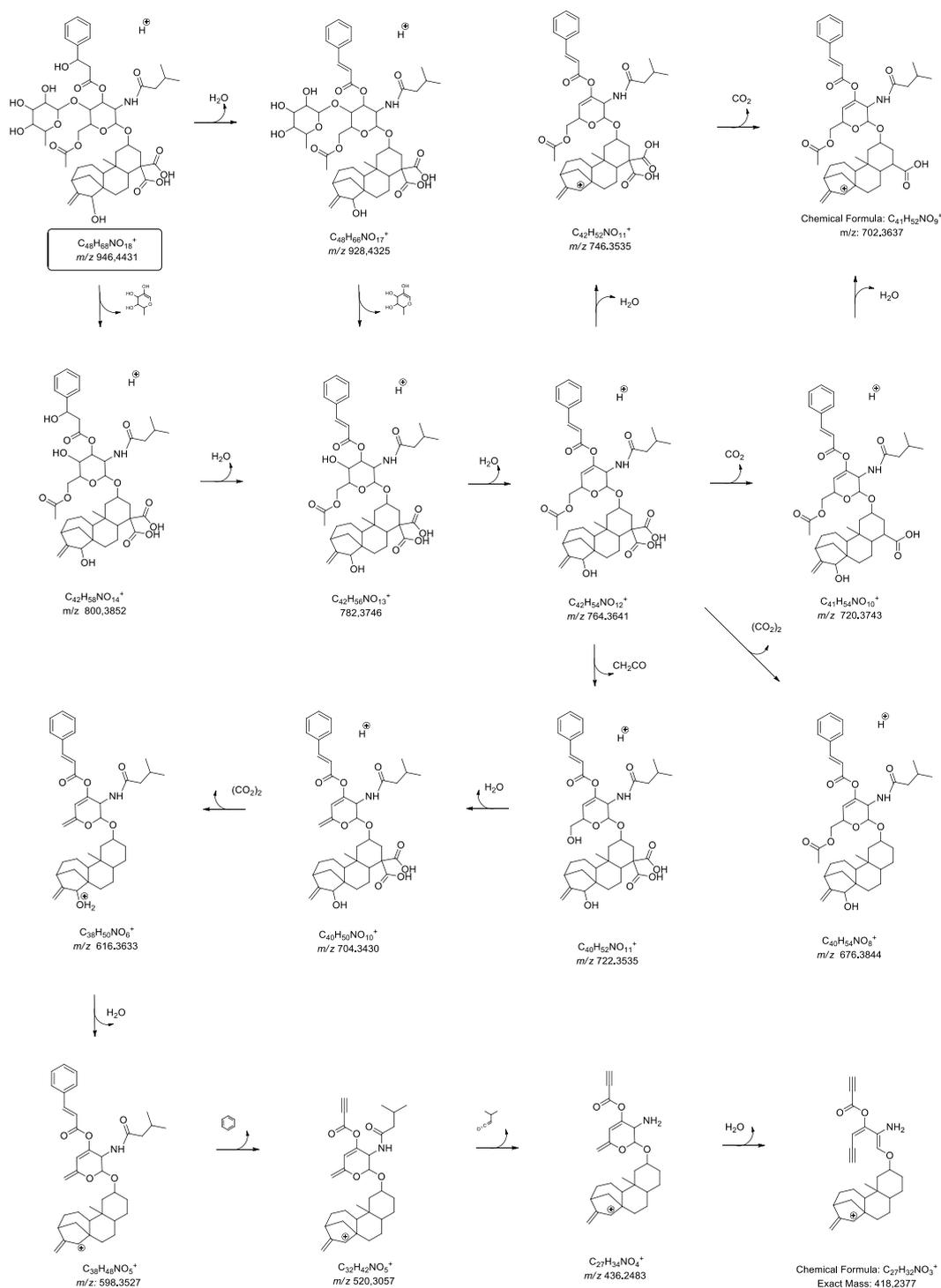
A estrutura atribuída aos **picos 13 a 29** foi sugerida como sendo derivados de wedelosídeos (diterpeno aminoglicosídeo derivado de caurano, Figura 21) ou um composto relacionado, relatado pela primeira vez em *P. ruderale*. A estrutura proposta para os **picos 22 e 23** são sugestivos de isômeros da bifloratoxina, uma substância tóxica e potencialmente antitumoral (EICHHOLZER *et al.*, 1981 e MACLEOD *et al.*, 1990).

Figura 21. Estrutura química do diterpeno aminoglicosídeo derivado de caureno, Bifloratoxina.



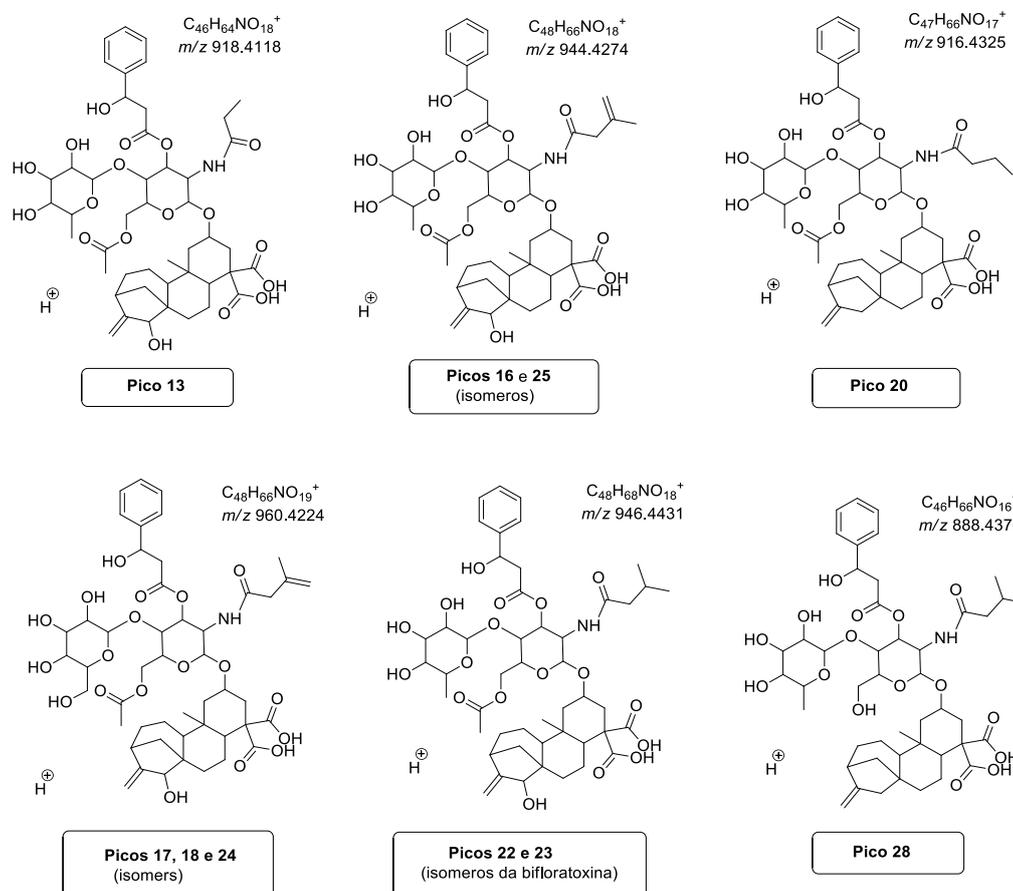
Os **picos 22 e 23** apresentaram o mesmo valor de massa com diferentes tempos de retenção (T_R : 6,330/6,896 min, m/z 946,4407 $[C_{48}H_{68}NO_{18} + H]^+$). Ambos os isômeros mostraram características de fragmentação semelhantes fornecendo os íons fragmentos de m/z 928,4325 da perda de H_2O (-18 Da) e m/z 800,3859 da perda de uma deoxi-hexose (-146 Da). Um fragmento com m/z 782,3748 também foi observado na sequência, possivelmente devido à perda de uma molécula de água do fragmento m/z 800,3859 e/ou perda da porção hexose (162 Da) do fragmento m/z 928,4325. O íon m/z 782,3748 apresentou valores de massa menores, como m/z 764,3641 após a perda de uma molécula de água e o fragmento com m/z 720,3743 após eliminação de CO_2 e H_2O (62 Da). Já o íon fragmento m/z 800,3859 produziu os seguintes fragmentos: m/z 722,3535 [perda de CH_2CO], m/z 704,3637 [perda de H_2O], m/z 616,3633 [perda de $2(CO_2)$], m/z 598,3527 [perda de H_2O], m/z 520,3057 [perda de anel aromático], m/z 436,1975 [perda de porção isobutil] e m/z 418 [perda de H_2O]. A proposta de fragmentação para a biflorotoxina encontra-se na Figura 22.

Figura 22. Perfil de fragmentação para o íon precursor com m/z 946 (pico 22), identificado como bifloratoxina (isômero), no modo positivo de ionização (ESI+).



Além disso, **picos 13 a 21** (TR 4,686 min, m/z 918,4102 [C₄₆H₆₄NO₁₈ + H]⁺), (TR: 4,717 min, m/z 920,4256 [C₄₆H₆₆NO₁₈ + H]⁺), (TR: 5,164 min, m/z 962,4355 [C₄₈H₆₈NO₁₉ + H]⁺), TR: 5,166 min, m/z 944,4243 [C₄₈H₆₆NO₁₈ + H]⁺), (TR: 5,201 min, m/z 960,4208 [C₄₈H₆₆NO₁₉ + H]⁺), (TR: 5,514 min, m/z 960,4210 [C₄₈H₆₆NO₁₉ + H]⁺), (TR: 5,717 min, m/z 1002,4298 [C₅₀H₆₈NO₂₀ + H]⁺), (TR: 5,998 min, m/z 916,4307 [C₄₇H₆₆NO₁₇ + H]⁺), (TR: 6,156 min, m/z 1002,4301 [C₅₀H₆₈NO₂₀ + H]⁺) e picos 24 a 29 (TR: 6,972 min, m/z 860,4409 [n.d.]), (TR: 7,019 min, m/z 944,4246 [C₄₈H₆₆NO₁₈ + H]⁺), (TR: 7,686 min, m/z 902,4514 [n.d.]), (TR: 9,807 min, m/z 518,3238 [C₃₃H₄₄NO₄ + H]⁺), (TR: 10,348 min, m/z 888,5304 [C₄₆H₆₆NO₁₆ + H]⁺), (TR: 10,457 min, m/z 496,3399 [C₃₁H₄₆NO₄ + H]⁺). Os íons descritos acima apresentaram composição elementar e perfil de fragmentação semelhantes aos isômeros da bifloratoxina (**Pico 22 e Pico 23**). As estruturas propostas para alguns dos derivados de diterpenos aminoglicosídeos wedelosídeos encontrados em amostras de *P. ruderale* encontram-se na Figura 23.

Figura 23. Propostas de estruturas para os derivados de diterpenos aminoglicosídeos wedelosídeos encontrados em amostras de *P. ruderale*.



Utilizando a composição elementar calculada, comparamos a estrutura química do pico 22 ($C_{48}H_{68}NO_{18}$) com as estruturas dos picos 13-21 e 24-29. A partir dessa comparação, observou-se que o Pico 13 ($C_{46}H_{64}NO_{18}$) possui uma diferença de C_2H_4 (28 Da) em sua composição elementar quando comparado com o Pico 22. Além disso, a comparação deste com outros picos revelou as seguintes diferenças: pico 14 (C_2H_2), 15 (O), 16 (H_2), 17 (H_2O), 19 (C_2O_2), 20 (CH_2O), 21 (C_2O_2), 24 (não identificado), 25 (H_2), 26 (não identificado), 27 ($C_{15}H_{24}O_{14}$), 28 ($C_2H_2O_2$) e 29 ($C_{17}H_{22}O_{14}$).

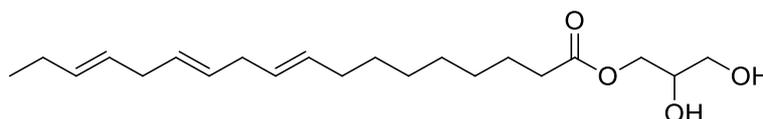
Possivelmente as diferenças entre os picos 13-21 e 24-29 incluíram principalmente variações no radical isobutil ($R-CH_2-(CH_3)_2$). Por exemplo, para o Pico 13 foi observada a presença do radical etil ($R-CH_2-CH_3$) em vez de isobutil. Para os picos 16 e 25 verificou-se a presença de isobutileno ($R-CH_2-CH-CH_3-CH_2$), enquanto para o pico 20 a presença

do radical propil. Os picos 17, 18 e 24 possivelmente apresentam diferença na porção do açúcar, sugerindo a presença de hexoses (162 Da) em vez de deoxihexose (146 Da). Além disso, para o pico 24 foi observado uma possível presença de isobutileno em vez de isobutil. As diferenças sugeridas na estrutura química observadas nos derivados diterpenos aminoglicosídeos wedelosídeos foram baseadas na fórmula molecular e no padrão de fragmentação de cada íon para análise de massa em sequência.

A estrutura proposta para os derivados de diterpenos aminoglicosídicos encontrados em amostras de *P. ruderale* foi desenhada a partir da composição elementar proposta pelo software MassLynx®, com erro inferior a 5ppm e fragmentos obtidos por EM/EM e EM^E. A proposta do esqueleto da bifloratoxim foi proposta em 1990 por Macleod & Oelrichs, sendo isolada das partes aéreas do gênero botânico *Wedelia* (atualmente *Sphagneticola*), pertencente à família Asteraceae.

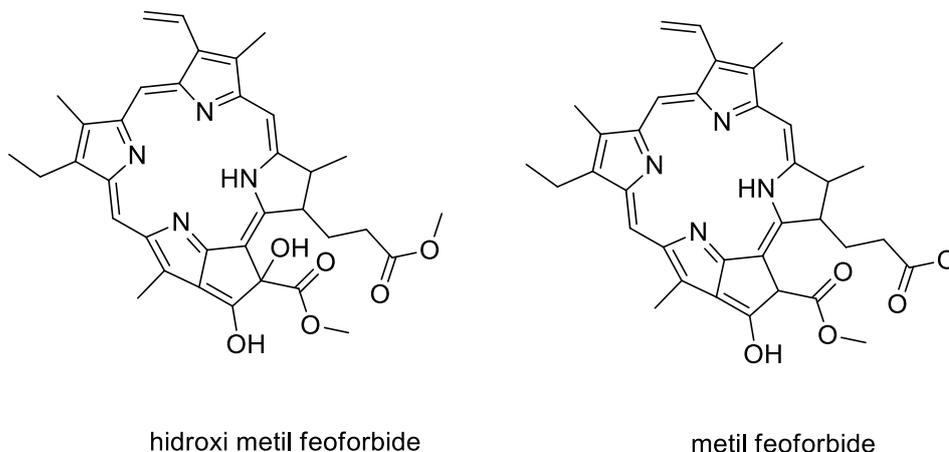
Os **picos 33 e 34**, (T_R : 11,006 min e 11,9079 min a m/z 352,2687 [$C_{21}H_{36}O_4 + H$]⁺) foram identificados como isômeros de linolenoilglicerol (Figura 24), usando íons de fragmento MS^e m/z 299,1279, m/z 317,3008 e m/z 335,2580 sugerindo perda de três moléculas de água (H_2O , -18 Da).

Figura 24. Estrutura química de linolenoil glicerol



O feoforbideo, um metabólito da clorofila derivado de plantas, foi atribuído como a estrutura proposta para os **picos 35 e 36** (T_R : 12,700 min a m/z 623,2864 [n.d.]), (T_R : 13,156 min a m/z 607,2914 [$C_{36}H_{38}N_4O_5 + H$]⁺). Essas substâncias foram previamente descritas por Kamarulzaman e colaboradores (2011) para a família Piperaceae. As estruturas químicas dos derivados hidroximetil-feoforbide e metil-feoforbide encontram-se na Figura 25.

Figura 25. Estruturas químicas dos derivados hidroxi-metil-feoforbide e metil-feoforbide.



As estruturas propostas para os derivados wedelosídeos diterpênicos aminoglicosídeos (esqueleto caurano) encontrados em amostras de *P. ruderale* foram estabelecidas por dados de espectrometria de massas de alta resolução usando o esqueleto de bifloratoxina (Macleod & Oelrichs, 1990).

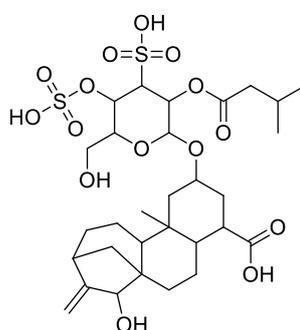
Os dados UPLC-ESI-QToF-MS/MS permitiram caracterizar 36 substâncias, incluindo ácidos fenólicos, derivados de diterpeno aminoglicosídeo, ácidos graxos e derivados de clorofila. Dessas, 21 substâncias supostamente identificadas como derivados diterpênicos aminoglicosídeos wedelosídeos, descritos pela primeira vez em *Porophyllum ruderale* Jacq. Cass (Asteraceae), uma planta comestível não convencional.

De forma a complementar informações sobre a toxicidade desta espécie vegetal, Vázquez-Atanacio e colaboradores (2021) compilaram dados sobre a toxicidade de *Porophyllum* (espécies do gênero). Segundo seu trabalho, os tiofenos isolados de *P. ruderale* apresentaram baixos níveis de toxicidade para células humanas (índice hemolítico < 10% a 500 µg/mL). O óleo volátil de *P. linaria* apresentou baixa toxicidade sobre macrófagos TPH-1 (LD50= 10,90 µg/mL) e *Artemia salina* (2301,07 µg/mL).

Segundo Klingenberg (2008), compostos como o wedelosídeo (derivado diterpeno aminoglicosídeo) apresentam potencial como inibidores de alta afinidade da troca ADP/ATP. Segundo o autor, o diterpeno glicosilado atractilosídeo (ATR) foi descrito como o princípio tóxico do cardo *Atractylis gummifera* (Asteraceae). O efeito inibitório do ATR no processo de fosforilação oxidativa foi previamente reportado, estando associado a presença de dois grupos sulfato e também do grupo carboxila presente na

estrutura do ATR. Contudo, a estrutura do wedelosídeo é semelhante a ATR (Figura 26), o que as difere é a ausência de grupos sulfato no wedelosídeo, mas em contrapartida apresenta cadeias laterais hidrofóbicas ligadas ao resíduo de glicose, os autores reportam que esta porção hidrofóbica do aminoglicosídeos diterpênicos pode estar associada com a sua toxicidade, sendo considerado uma toxina, devido a sua potencial ligação à proteína carreadora ADP/ATP mitocondrial (Eichholzer et al., 1981; MacLeod et al., 1990; Klingenberg, 2008).

Figura 26. Estrutura química do atractilosídeo (ATR).



Por outra via, segundo Vázquez-Atanacio et al. (2021), *Porophyllum* representa um dos gêneros de plantas pré-hispânicos mais utilizados na medicina popular neotropical. Além disso, existem poucos estudos sobre sua toxicidade, o que poderia indicar que as plantas desse gênero são bem toleradas para consumo humano.

Na sequência é apresentada a Tabela 2, que contempla as informações dos compostos caracterizados em amostras de *P. ruderale* por CLUE-ESI-QToF-EMⁿ, no modo positivo de análise (ESI+). São apresentados: número do pico observado no cromatograma do CQ (controle de qualidade), tempo de retenção (T_R) em minutos, *m/z*, composição elementar, erro (ppm), principais fragmentos (EM/EM e MS^e), proposta de substância e em qual amostras estas substâncias foram encontradas.

Tabela 2. Compostos caracterizados em amostras de *P. ruderale* por CLUE-ESI-QToF-EMⁿ, no modo positivo de análise (ESI+)

Pico n ^o	TR (min)	m/z [M+H] ⁺	Composição elementar	Erro (ppm)	MS/MS ou MS ^c fragmentação		Proposta de identificação	Amostra
1	0,47	381,0797	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	n.d	219,0697		maltose	SC-12mes, SC-6mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC-campo e PR-campo.
2	1,25	355,1027	C ₁₆ H ₁₉ O ₉	0,6	135,0447; 181,0500	163,0397;	ácido cafeoilquínico (isomero)	SC-12mes, SC-6mes, SC-3mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC-campo e PR-campo.
3	2,172	517,1338	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₂	0,2	163,0396; 181,0500	337,0923;	ácido 1,4 - di cafeoilquínico (isomero)	SC-12mes, SC-6mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC-campo e PR-campo.
4	3,2137	303,0503	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	0,3	257,0448; 285,0397		Quercetina	SC-12mes, SC-6mes, SC- 3mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC-campo e PR-campo.
5	3,2144	465,1027	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	0,0	257,0448; 303,0506	285,0397;	quercetina glicopiranosídeo	PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC-campo e PR-campo.
6	3,6572	517,1341	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₂	0,2	163,0396; 181,0500	337,0923;	ácido 1,5 - di cafeoilquínico (isomero)	SC-12mes, SC-6mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC-campo e PR-campo.
7	3,6572	517,1341	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₂	0,2	163,0396; 181,0500	337,0923;	ácido 3,5 - di cafeoilquínico (isomero)	SC-12mes, SC-6mes, SC-3mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes.
8	3,6924	287,0554	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	-1,0	269,1754		luteolina	SC-campo.
9	3,9418	287,0554	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	0,7	269,1754; 259,0807		canferol	SC-campo.
10	4,0123	517,1341	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₂	3,0	163,0396; 337,0923		ácido 4,5 - di cafeoilquínico (isomero)	PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC-campo e PR-campo.
11	4,2499	657,1445	C ₃₁ H ₂₈ O ₁₆	0,5	163,0396; 355,1029; 495,1137	337,0923;	dicafeoil-galoil-glicosídeo	SC-12mes, SC-6mes, SC- 3mes.
12	4,3889	601,1186	C ₂₈ H ₂₅ O ₁₅	1,3	303,0628; 449,1078		galoilquercitrin	SC-campo.

13	4,686	918,4102	$C_{46}H_{64}NO_{18}$	-0,5	418,2377; 436,2165; 492,2745; 539,2165; 568,3003; 570,3214; 586,3163; 595,1749; 630,3061; 674,3324; 692,3428; 700,2463; 754,4855; 772,3536; 884,406; 900,4005	diterpeno aminoglicosídico (isomero)	SC-12mes, SC-6mes, SC-3mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC- campo e PR-campo.
14	4,7176	920,4256	$C_{46}H_{66}NO_{18}$	-2,4	296,2704; 540,2445; 641,1506; 774,3690; 814,3632; 902,4154	diterpeno aminoglicosídico (isomero)	SC-12mes, SC-6mes, SC-3mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC- campo e PR-campo.
15	5,1649	962,4355	$C_{48}H_{68}NO_{19}$	0,0	436,1970; 580,2400; 648,3017; 780,3583; 798,3693; 814,3655; 926,4147; 942,4117	diterpeno aminoglicosídico (isomero)	SC-12mes, SC-6mes, SC-3mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC- campo e PR-campo.
16	5,1661	944,4243	$C_{48}H_{66}NO_{18}$	-1,6	418,2377; 500,2795; 578,3265; 580,2425; 596,3371; 614,3476 690,8505; 700,3480; 718,3555; 762,4351; 758,33,74; 780,3590; 798,4621; 860,4420; 926,5300	diterpeno aminoglicosídico (isomero)	SC-12mes, SC-6mes, SC-3mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC- campo e PR-campo.
17	5,2018	960,4208	$C_{48}H_{66}NO_{19}$	1,4	418,2378; 534,2326; 598,3527; 604,0011; 630,3740; 648,3743; 650,3864; 688,3848; 734,4452; 764,3641; 778,4471; 798,3695; 796,4600; 812,3701; 814,4728; 942,5383	diterpeno aminoglicosídico (isomero)	SC-12mes, SC-6mes, SC-3mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC- campo e PR-campo.
18	5,5142	960,4210	$C_{48}H_{66}NO_{19}$	3,2	418,2378; 534,2326; 598,3527; 604,0011; 630,3740; 648,3743; 650,3864; 688,3848; 734,4452; 764,3641; 778,4471; 798,3695; 796,4600; 812,3701; 814,4728; 942,5383	diterpeno aminoglicosídico (isomero)	SC-12mes, SC-6mes, SC-3mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC- campo e PR-campo.

19	5,7172	1002,4298	$C_{50}H_{68}NO_{20}$	1,5	434,1808; 718,8288; 814,3646; 984,4210	520,6924; 796,3494; 902,4163;	diterpeno aminoglicosídico (isomero)	SC-12mes, SC-6mes, SC-3mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC- campo e PR-campo.
20	5,9983	916,4307	$C_{47}H_{66}NO_{17}$	-1,4	492,2745; 584,3371; 674,3324; 692,3429; 770,3747; 754,3798; 898,4220	440,2795; 588,3684; 682,3222; 734,4295; 752,4412; 770,4578;	diterpeno aminoglicosídico (isomero)	SC-12mes, SC-6mes, SC-3mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC- campo e PR-campo.
21	6,1569	1002,4301	$C_{50}H_{68}NO_{20}$	2,8	434,1808; 718,8288; 814,3646; 984,4210	520,6924; 796,3494; 902,4163;	diterpeno aminoglicosídico (isomero)	SC-12mes, SC-6mes, SC-3mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC- campo e PR-campo.
22	6,3306	946,4407	$C_{48}H_{68}NO_{18}$	-1,5	418,1889; 492,6384; 582,2565; 616,3633; 681,8395; 720,3743; 746,3535; 782,3748; 800,3859; 928,4325	436,1975; 520,3057; 598,3527; 676,3844; 704,3637; 722,3535; 764,3641; 785,3964; 857,9014;	Bifloratoxina (diterpeno aminoglicosídico)	SC-12mes, SC-6mes, SC-3mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC- campo e PR-campo.
23	6,8968	946,4405	$C_{48}H_{68}NO_{18}$	-1,5	418,1889; 492,6384; 582,2565; 616,3633; 681,8395; 720,3743; 746,3535; 782,3748; 800,3859; 928,4325	436,1975; 520,3057; 598,3527; 676,3844; 704,3637; 722,3535; 764,3641; 785,3964; 857,9014;	Bifloratoxina (diterpeno aminoglicosídico)	SC-12mes, SC-6mes, SC-3mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC- campo e PR-campo.
24	6,9721	860,4407	$C_{48}H_{66}NO_{19}$	3,0	418,2378; 598,3527; 630,3740; 650,3864; 734,4452; 778,4471; 796,4600; 814,4728;	534,2326; 604,0011; 648,3743; 688,3848; 764,3641; 798,3695; 812,3701; 942,5383	diterpeno aminoglicosídico (isomer)	SC-12mes, SC-6mes, SC-3mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC- campo e PR-campo.

					418,2377; 500,2795; 578,3265; 580,2425; 596,3371; 614,3476 690,8505; 700,3480;							SC-12mes, SC-6mes, SC-3mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC- campo e PR-campo.
25	7,0192	944,4246	C ₄₈ H ₆₆ NO ₁₈	-1,6	718,3555; 762,4351; 758,33, 780,3590; 798,4621; 860,4420; 926,5300	diterpeno aminoglicosídico (isomer)						
26	7,6863	902,4514	n.d	n.d	n.d	diterpeno aminoglicosídico (isomer)						SC-12mes, SC-6mes, SC-3mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC- campo e PR-campo.
27	9,8071	518,3238	C ₃₃ H ₄₄ NO ₄	-4,6	518,3251	Diterpeno caurano (isômero)						SC-campo e PR-campo.
28	10,3488	888,5304	C ₄₆ H ₆₆ NO ₁₆	-1,2	378,2371; 474,0621; 524,3140; 618,3061; 664,2692; 706,3742; 724,3701; 742,4549	diterpeno aminoglicosídico (isomer)						SC-12mes, SC-6mes, SC-3mes, SC-campo e PR-campo.
29	10,457	496,3399	C ₃₁ H ₄₆ NO ₄	-3,6	496,3401	diterpeno aminoglicosídico (isomer)						SC-12mes, SC-6mes, SC-3mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC- campo e PR-campo.
30	10,4975	277,2166	n.d	n.d	n.d	ni						SC-12mes, SC-6mes, SC-3mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC- campo e PR-campo.
31	10,5029	295,2271	C ₁₉ H ₄₂ N	0,3	n.d	aminononodecano						SC-12mes, SC-6mes, SC-3mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC- campo e PR-campo.
32	10,8367	474,3787	n.d	n.d	n.d	n.i						SC-12mes, SC-6mes, SC-3mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC- campo e PR-campo.
33	11,0062	353,2687	C ₂₁ H ₃₇ O ₄	-0,4	299,1279; 317,3008; 335,2580; 353,2691	mono linoleoil glicerol (isômero)						SC-12mes, SC-6mes, SC-3mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC- campo e PR-campo.
34	11,9079	35,2675	C ₂₁ H ₃₇ O ₄	3,2	299,1279; 317,3008; 335,2580; 353,2691	mono linoleoil glicerol (isômero)						SC-12mes, SC-6mes, SC-3mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC- campo e PR-campo.
35	12,7007	623,2864	C ₃₆ H ₃₈ N ₄ O ₅	n.d.	n.d	feoforbideo (derivado de clorofila, isômero)						SC-12mes, SC-6mes, SC-3mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC- campo e PR-campo.

36	13,1568	607,2914	$C_{36}H_{38}N_4O_5$	-0,5	n.d	feoforbideo (derivado de clorofila, isômero)	SC-12mes, SC-6mes, SC-3mes, PR-12mes, PR-6mes, PR-3mes, SC- campo e PR-campo.
----	---------	----------	----------------------	------	-----	--	--

Foram observadas semelhanças quanto à produção de metabolitos secundários nas plantas cultivadas em casa de vegetação nos períodos de 12, 6 e 3 meses, bem como nos diferentes locais de coleta. Somado a isto, foi possível observar a presença dos flavonoides luteolina e canferolapenas nos cromatogramas correspondentes as plantas coletadas em campo no estado de Santa Catarina. Esse fato pode estar associado as condições de salinidade de solo e também a alta incidência de luz solar, visto que esta planta se encontra nas proximidades da praia.

Após uma avaliação criteriosa de cada extrato, não foi detectada a presença dos derivados de tiofenos propostos por Takahashi *et al.* (2011). Foi realizado contato com os autores do artigo, solicitando amostra dos compostos isolados, porém não obtivemos retorno. A pesquisa exaustiva pelos tiofenos nos faz concluir que não são substancias produzidas de forma regular por esta planta

Ressalta-se que o objetivo de isolamento de substâncias de interesse de *P. ruderale* não pode ser concluído, visto que as substancias representadas pelos picos 13 a 29 identificadas como derivados de wedelosídeo (um diterpeno aminoglicosídico derivado do esqueleto caurano) e relatadas pela primeira vez para *P. ruderale* não foram passíveis de isolamento em quantidades suficientes para prosseguir com os experimentos. Foram realizadas diversas tentativas de isolamento dos derivados aminoglicosídeos entretanto o rendimento em mistura destes isômeros e análogos foi inferior a 0,1% do extrato bruto disponível.

Assim, para obter uma avaliação mais criteriosa em termos de comparação entre as amostras avaliadas optou-se por realizar análise estatística multivariada. Esta análise foi realizada em parceria com o Dr. Carlos Eduardo Salles de Araújo, pesquisador na Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Epagri, Florianópolis, SC, Brasil. Descrita no tópico a seguir (Item 5.2).

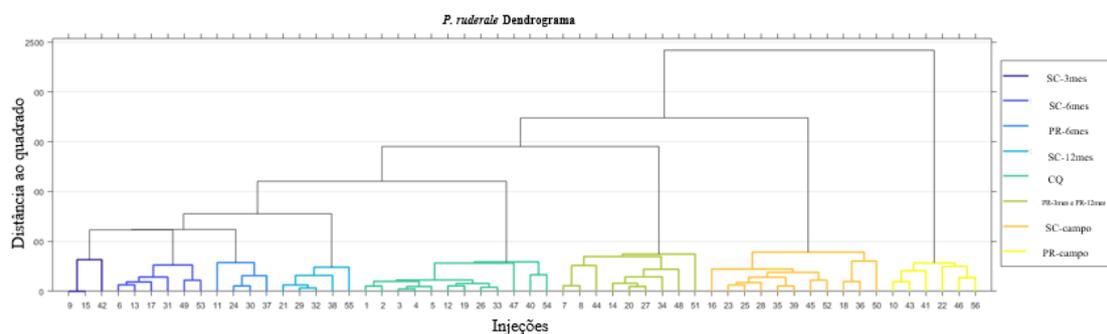
5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA DE DIFERENTES COLETAS DE *Porophyllum ruderale* (Jacq) Cass.

5.2.1 Agrupamento hierárquico

Na Figura 27 é apresentado o gráfico de dendrograma construído usando os primeiros 23 PCs que explicam mais de 99% da variância das amostras. Para reforçar a interpretação da Figura 27, foram identificados por cores os grupamentos formados com um limite de distância (variância) inferior a 500.

A análise pela árvore hierárquica demonstrou uma boa discretização para todas as amostras da Tabela 1, com exceção das amostras de *P. ruderale* cultivadas com 3 e 12 meses do estado do Paraná que formaram um único grupo (observadas na linha laranja horizontal superior, Figura 27). É possível observar também que as amostras de *P. ruderale* coletadas no estado de Santa Catarina apresentam a maior variância interna (intra) do grupo.

Figura 27. Gráfico dendrograma das diferentes amostras de *P. ruderale* avaliadas.



Legenda. Plantas coletadas em Santa Catarina e cultivadas por 3 meses (SC-3mes), 6 (SC-6mes), 12 meses (SC-12mes). Plantas coletadas no Paraná e cultivadas por 3 meses (PR-3mes), 6 (PR-6mes), 12 meses (PR-12mes). Plantas coletadas em campo em Santa Catarina (SC-campo). Plantas coletadas em campo no Paraná (PR-campo). Controle de Qualidade (CQ).

O inesperado agrupamento entre amostras de *P. ruderale* cultivadas por 3 a 12 meses do estado do Paraná pode estar relacionado com a variabilidade genética intrínseca nos indivíduos da mesma espécie. Mitchell (2017) e colaboradores estabeleceram alguns fatores para explicar as diferenças entre a germinação de sementes provenientes de uma mesma planta. Esta variável pode ser observada a partir de sementes cultivadas em condições ambientais constantes, porém fatores como a posição da semente na planta mãe e a disponibilidade de nutrientes podem influenciar no desenvolvimento da planta e também na produção de metabólitos secundários. Esses fenômenos foram descritos

anteriormente na variabilidade de sementes de gramíneas e são minimizados pelas práticas de produção dentro da indústria de sementes.

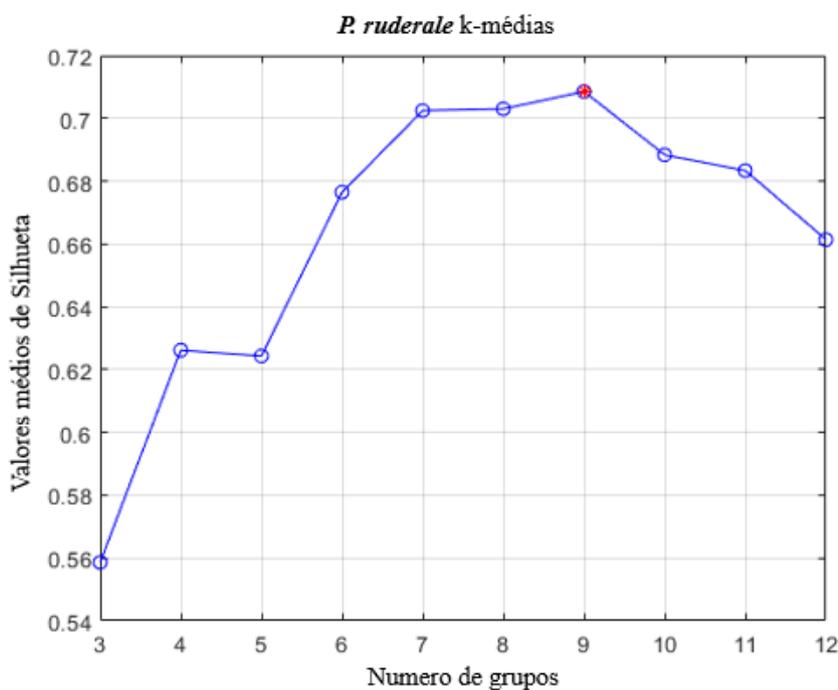
Além disso, no presente estudo, os grupos de plantas cultivadas apresentaram menor distância quando comparados com as respectivas plantas silvestres, independentemente do local de coleta (Paraná ou Santa Catarina). Também é possível observar que a variância intra grupo é maior para grupos de plantas coletadas no campo do que para grupos cultivados. A distância inter grupos parece ser maior entre as amostras coletadas em campo. Conforme observado pela avaliação preliminar do perfil químico por CL-EM, as plantas coletadas em campo no estado de Santa Catarina (mangue e praia) foram agrupadas em um único grupo devido a sua similaridade na composição química.

5.2.2 Análise de grupos por K-medias

Para obter uma melhor medida de similaridade entre amostras de *P. ruderales* foi realizada a análise pelo algoritmo de particionamento de K-medias, usando a métrica de distância euclidiana ao quadrado. Ainda, foram utilizados os grupos no espaço de 23 dimensões (primeiros 23 PCs).

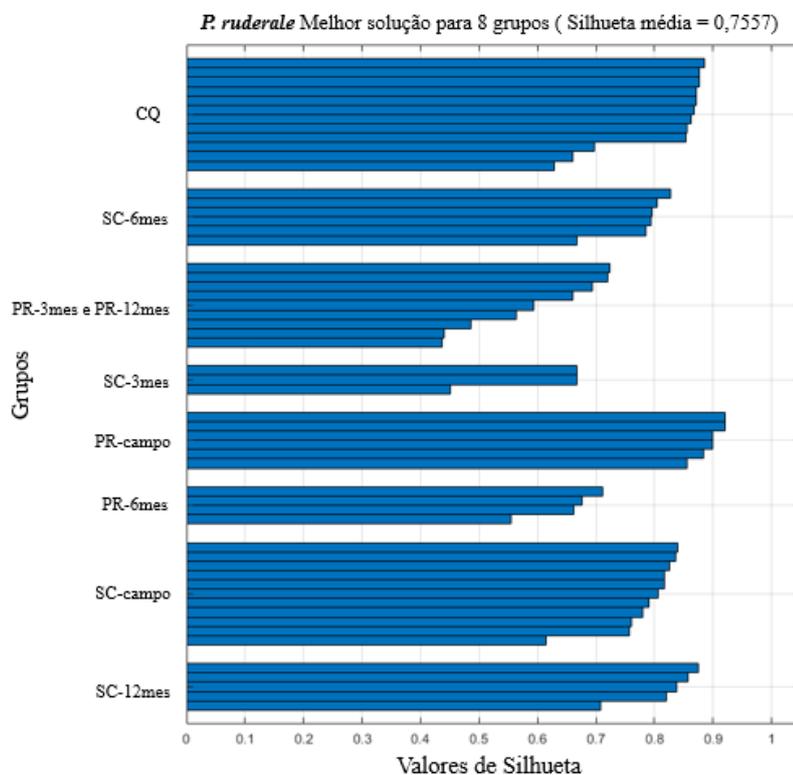
O número ótimo de grupos para o conjunto de dados das injeções foi determinado executando testes de três a doze soluções de agrupamentos. O valor mediano de silhueta calculado a partir de 200 repetições para cada solução foi usado como critério de decisão, pois silhueta é uma medida de o quão semelhante uma injeção é ao seu próprio grupo em comparação com outros grupos. A partir de sete grupos, o valor da silhueta mediana se estabiliza em um platô alto e em nove clusters a pontuação mais alta é alcançada. Além desse número, os valores de silhueta decaem à medida que mais grupos são adicionados. A Figura 28 representa os números ótimos de grupos.

Figura 28. Valores da silhueta mediana de todas as injeções para um determinado número de grupos (3-12 grupos).



A Figura 29 demonstra os valores de silhueta para a solução de oito grupos de *P. ruderale*. Ele mostra que oito grupos é coincidente com o dendograma da árvore binária de grupos (Figura 27). Esperava-se que a avaliação k-medias de nove grupos pudesse separar as amostras de *P. ruderale* cultivadas aos 3 e 12 meses oriundas do Estado do Paraná, mas isso não ocorreu. Em vez disso, o nono agrupamento foi formado pela divisão das injeções da amostra de *P. ruderale* cultivada por 3 meses no Estado de Santa Catarina. Considerando que este nono grupo possui apenas um elemento (injeção) e não representa uma partição natural do conjunto de dados, a solução de oito grupos foi escolhida como a melhor descrição do conjunto de dados de *P. ruderale*.

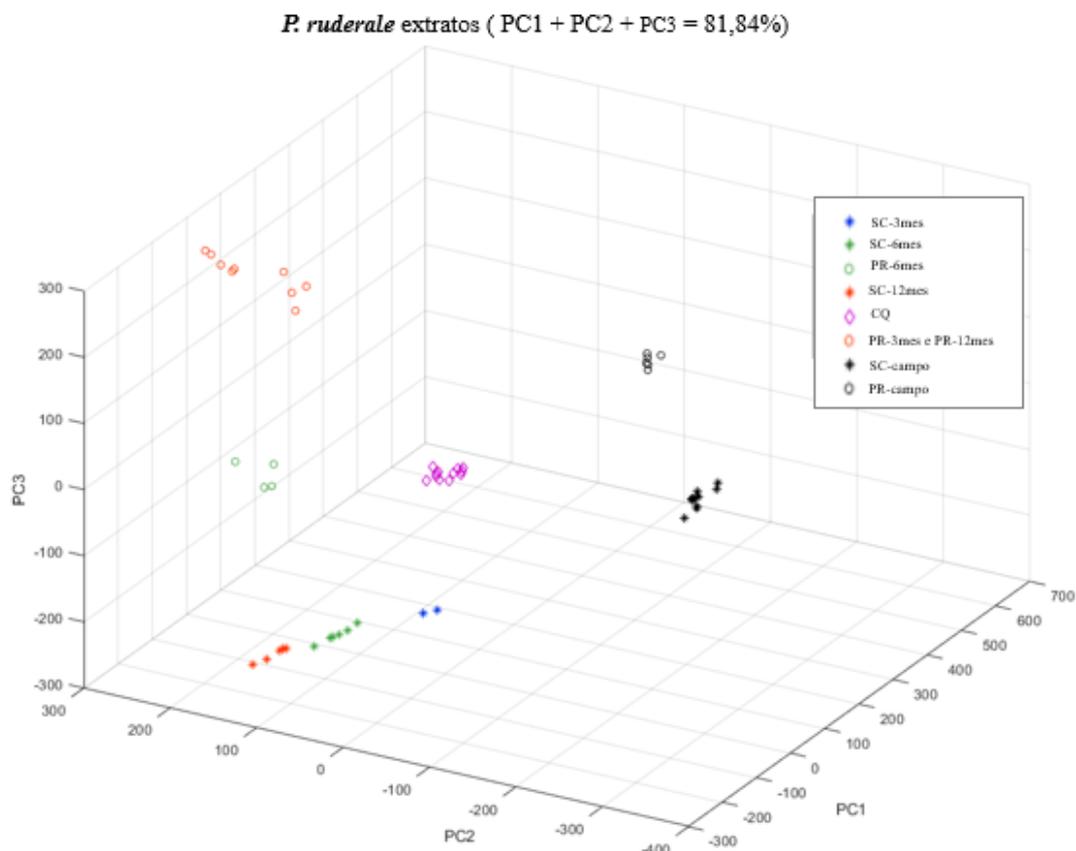
Figura 29. Valores de silhueta K-medias para solução de oito grupos para as amostras de *P. ruderale*.



Legenda. Plantas coletadas em Santa Catarina e cultivadas por 3 meses (SC-3mes), 6 (SC-6mes), 12 meses (SC-12mes). Plantas coletadas no Paraná e cultivadas por 3 meses (PR-3mes), 6 (PR-6mes), 12 meses (PR-12mes). Plantas coletadas em campo em Santa Catarina (SC-campo). Plantas coletadas em campo no Paraná (PR-campo). Controle de Qualidade (CQ).

Na Figura 30 apresenta-se o gráfico de dispersão de injeções de *P. ruderale* para 8 grupos. As três primeiras dimensões dos PCs (eixos no gráfico) representam 81,84% da variância total do conjunto de dados. Como esperado, todas as injeções de controle de qualidade foram agrupadas em um grupo no centro do gráfico, considerando que a amostra de controle de qualidade é um pool de todas as soluções extrativas e necessariamente encontram-se agrupadas no centro do gráfico.

Figura 30. Gráfico de Principais Componentes (PCA) indicando a dispersão de injeções de *P. ruderale* para 8 grupos.



Legenda. Plantas coletadas em Santa Catarina e cultivadas por 3 meses (SC-3mes), 6 (SC-6mes), 12 meses (SC-12mes). Plantas coletadas no Paraná e cultivadas por 3 meses (PR-3mes), 6 (PR-6mes), 12 meses (PR-12mes). Plantas coletadas em campo em Santa Catarina (SC-campo). Plantas coletadas em campo no Paraná (PR-campo). Controle de Qualidade (CQ).

A Figura 30 mostra que as amostras coletadas no campo no estado do Paraná apresentam grande variabilidade em relação ao restante do conjunto de dados. As amostras cultivadas em casa de vegetação apresentam menor variabilidade do que as coletadas no campo. A mesma conclusão pode ser tirada observando a altura das linhas horizontais pretas do dendograma na Figura 27.

Uma tendência linear entre as injeções das amostras cultivadas no estado de Santa Catarina (SC) pode ser observada na Figura 30 nos eixos PC2 x PC3. No eixo PC2, as injeções de amostra SC de 12 meses mostram os valores mais altos e as injeções de amostra SC de 3 meses os mais baixos. O comportamento oposto é observado no eixo

PC3. Também é interessante notar na Figura 30 que as injeções do grupo amostral Paraná de 3 meses está em uma posição diferente do resto das amostras cultivadas no Paraná.

5.2.3 Análise de contribuição de compostos (m/z)

Para identificar a contribuição dos diferentes íons (m/z) no modo positivo de análise (ESI +), foram plotadas na Tabela 3 as cargas percentuais cumulativas (cargas redimensionadas ao quadrado vezes 100) das variáveis selecionadas em relação aos 3 primeiros componentes principais para o modo positivo de análise (81,85% da variância cumulativa explicada). Os números abaixo dos índices PC no cabeçalho da tabela são a variação percentual explicada por cada PC (primeira linha) e a variação percentual acumulada explicada pela soma dos primeiros n ésimos componentes (segunda linha).

Nesse sentido, os números abaixo dos rótulos de PC no cabeçalho da Tabela 3 são as variações percentuais acumuladas de todos os conjuntos de dados explicados pela soma dos primeiros componentes. A coluna rotulada PC3 denota cargas percentuais cumulativas de PC1 + PC2 + PC3 e assim por diante.

A variância cumulativa de PC2 (65,37%, PC1+PC2) foi aumentada com a variância explicada por PC 3 (16,48%). Esse somatório totalizou a variância cumulativa de PC3 explicando 81,85% (PC1+PC2+PC3), da variância total dos dados. Além disso, os picos 13, 14, 15 e 16 do cromatograma são os principais íons que influenciam a porcentagem cumulativa de PC3 (em 99%, 99%, 97% e 97% respectivamente). Essas substâncias foram preliminarmente identificadas como novos esqueletos de diterpenos aminoglicosídeos, discutido anteriormente.

Tabela 3. Cargas percentuais cumulativas das variáveis selecionadas em relação aos 3 primeiros componentes principais (PCs) para o modo positivo de análise (ESI+).

		<i>Número de PCs</i>				
		C1	C2	PC3		
		% de variância explicada	43,22	22,15	16,48	
		% variância acumulada explicada	43,22	65,37	81,85	
Nº do pico no cromatograma	Compostos	Tempo de retenção (min.)	m/z	CARGA ACUMULATIVA PARA OS COMPOSTOS		
2	Isômero do ácido cafeoilquínico	1,246	355,1026	0,90	75,54	82,21
3	Ácido 1,4 - dicafeoilquínico	2,172	517,1338	1,03	74,41	81,07
4	Quercetina	3,214	303,0503	1,23	73,96	81,48
5	Quercetina glucopiranosídeo	3,214	465,1027	0,50	77,99	84,37
6/7	Isômero do ácido dicafeoilquínico	3,657	517,1341	0,01	70,06	79,08
8	Canferol	3,692	287,0554	1,60	79,57	87,17
9	Luteolina	3,942	287,0554	0,60	46,85	51,53
10	Ácido 4, 5 - dicafeoilquínico	4,012	517,1341	14,03	75,54	78,87
11	Isômero do dicafeoil-glucopiranosídeo	4,250	657,1445	1,18	74,24	79,36
12	Galoil-quercitrina	4,389	601,1186	1,38	74,62	81,83
13	Diterpeno aminoglicosídeo (wedelosídeo)	4,686	918,4102	2,20	50,04	99,27
14	Diterpeno aminoglicosídeo (wedelosídeo)	4,718	920,4256	0,45	52,05	99,84
15	Diterpeno aminoglicosídeo (wedelosídeo)	5,165	962,4355	1,10	56,81	97,21
16	Diterpeno aminoglicosídeo (wedelosídeo)	5,166	944,4243	0,26	55,37	97,10
17	Diterpeno aminoglicosídeo (wedelosídeo)	5,202	960,4208	17,73	50,74	91,28
18	Diterpeno aminoglicosídeo (wedelosídeo)	5,514	960,4200	1,58	71,75	78,43
19	Diterpeno aminoglicosídeo (wedelosídeo)	5,717	1002,4298	0,71	23,75	23,79
20	Diterpeno aminoglicosídeo (wedelosídeo)	5,998	916,4307	35,07	43,01	65,83
21	Diterpeno aminoglicosídeo (wedelosídeo)	6,157	1002,4301	1,05	55,09	55,30
22	Isômero da biflotoxina	6,331	946,4407	57,94	58,30	73,42
23	Isômero da biflotoxina	6,897	946,4405	0,56	68,49	71,05
25	Diterpeno aminoglicosídeo (wedelosídeo)	7,019	944,4246	18,60	39,31	49,11
27	Diterpeno caurano	9,807	518,3238	4,51	4,61	7,65
28	Diterpeno aminoglicosídeo (wedelosídeo)	10,349	888,5304	54,59	54,75	56,62
29	Diterpeno caurano	10,457	496,3399	20,95	63,19	72,80
33	Isômero do linolenil glicerol	11,006	353,2687	40,11	71,33	71,60
34	Isômero do linolenil glicerol	11,908	353,2675	0,15	0,45	3,25

Usando CLUE-ESI-QToF-EM, foi possível detectar 36 substâncias incluindo ácidos fenólicos, derivados de diterpeno aminoglicosídeos, ácidos graxos e derivados de clorofila. Desse total, 21 substâncias foram preliminarmente identificadas como derivados de diterpeno aminoglicosídeo e foram descritas pela primeira vez em *Porophyllum ruderale* Jacq. Cass (Asteraceae), uma planta comestível não convencional.

Além disso, para a eluição estrutural desta classe de substâncias é necessário o isolamento e caracterização por técnicas espectrométricas, incluindo a abordagem de RMN. PCA e a análise de agrupamento permitiram a comparação entre plantas coletadas no campo e cultivadas em grupos bem definidos. Assim, o conhecimento do perfil metabólico de *P. ruderale* cultivado em diferentes condições agrega novas informações para esta planta alimentícia não convencional (PANC), utilizadas tanto em produtos alimentícios quanto nas pesquisas fitoquímicas.

Avaliada a composição química das partes aéreas de *P. ruderale*, a próxima etapa do presente estudo foi investigar a comunidade de fungos que colonizam as folhas de *P. ruderale*. Assim, no item a seguir serão discutidos os resultados das análises do microbioma

5.3 MICROBIOMA FÚNGICO ASSOCIADO AS FOLHAS DE *Porophyllum ruderale* (Jacq) Cass.

Para avaliação dos microrganismos presentes em *P. ruderale* foi necessário escolher apenas uma das amostras, devido à complexidade de informações e disponibilidade de recursos financeiros para esta análise. Deste modo optou-se por investigar o microbioma das folhas de *P. ruderale* da coleta da praia. Ressalta-se que não foram observadas grandes diferenças entre o perfil químico das demais coletas, contudo observou-se a presença dos flavonoides luteolina e canferol apenas na coleta da praia. Ainda, segundo Gupta e colaboradores (2019), um habitat hostil (ou seja, em altitudes elevadas, desertos, habitats salinos, alta incidência de luz solar) pode ser positivo na busca por novos fungos de interesse farmacêutico devido ao estresse que o meio pode causar na planta hospedeira e assim sua associação com microrganismos pode ser interessante.

Nestas vias, quatro réplicas da coleta de *P. ruderale* próximas a praia (n=4) foram encaminhadas para a empresa de biologia molecular GoGenétic. Foram geradas mais de 100 mil sequências por amostra, contudo a maioria delas era referente à planta. Portanto, foram utilizadas apenas as sequências classificadas como fungos, respectivamente 314, 336, 707 e 530 sequencias para cada réplica da coleta (todas realizadas no mesmo dia). Destes, foram classificados 61 gêneros, 62 famílias e 7 filos.

Na tabela4 são apresentados os dados contendo o número de sequencias lidas das 4 amostras coletadas (Amostra 1, Amostra 2, Amostra 3 e Amostra 4), a média entre as amostras, desvio padrão (DP) e a porcentagem em relação ao total de sequencias lidas (utilizando a média).

Tabela 4. Microbioma das folhas de *P. ruderale*, descrito para Filo, Família e Gênero (número de sequencias lidas e %).

Filo	Família	Gênero	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostr a 4	media	DP	% em relação ao total de leituras (média)
Outros	Outros	Outros	0	0	0	4	1	2	0,2
Outros	Outros	Outros	6	7	7	3	6	2	1,2
Ascomycota	Outros	Outros	19	34	7	11	18	12	3,8
Ascomycota	Outros	Outros	14	4	246	85	87	112	18,5
Ascomycota	Aplosporellaceae	<i>Aplosporella</i>	0	1	0	0	0	1	0,1
Ascomycota	Botryosphaeriaceae	<i>Dothiorella</i>	0	3	1	1	1	1	0,3
Ascomycota	Outros	Outros	0	0	2	5	2	2	0,4
Ascomycota	Capnodiales	<i>Rachicladosporium</i>	0	0	1	0	0	1	0,1
Ascomycota	Capnodiales	<i>Toxicocladosporium</i>	0	0	2	0	1	1	0,1
Ascomycota	Davidiellaceae	<i>Cladosporium</i>	3	18	55	46	31	24	6,5
Ascomycota	Mycosphaerellaceae	<i>Cercospora</i>	2	0	0	0	1	1	0,1
Ascomycota	Teratosphaeriaceae	Outros	0	0	5	28	8	13	1,7
Ascomycota	Dothioraceae	<i>Aureobasidium</i>	0	0	1	2	1	1	0,2
Ascomycota	Eremomycetaceae	<i>Arthrographis</i>	0	3	0	0	1	2	0,2
Ascomycota	Hysteriaceae	<i>Gloniopsis</i>	0	0	0	2	1	1	0,1
Ascomycota	Elsinoaceae	Outros	0	0	1	12	3	6	0,7
Ascomycota	Myriangiaceae	Outros	0	0	1	0	0	1	0,1
Ascomycota	Outros	Outros	12	9	24	43	22	15	4,7
Ascomycota	Lentitheciaceae	indefinido	0	2	0	0	1	1	0,1
Ascomycota	Leptosphaeriaceae	<i>Coniothyrium</i>	0	0	1	20	5	10	1,1
Ascomycota	Lophiostomataceae	Outros	0	0	1	0	0	1	0,1
Ascomycota	Phaeosphaeriaceae	Outros	0	6	15	39	15	17	3,2

Ascomycota	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>	6	8	42	71	32	31	6,7
Ascomycota	Pleosporaceae	<i>Bipolaris</i>	0	0	1	0	0	1	0,1
Ascomycota	Pleosporales	Outros	1	0	1	0	1	1	0,1
Ascomycota	Pleosporales	<i>Didymella</i>	3	0	3	3	2	2	0,5
Ascomycota	Sporormiaceae	<i>Westerdykella</i>	3	2	0	0	1	2	0,3
Ascomycota	indefinido	indefinido	2	0	4	2	2	2	0,4
Ascomycota	Tubeufiaceae	<i>Helicoma</i>	5	13	1	1	5	6	1,1
Ascomycota	Venturiaceae	<i>Venturia</i>	0	3	1	0	1	1	0,2
Ascomycota	indefinido	indefinido	2	5	0	0	2	2	0,4
Ascomycota	Outros	Outros	0	3	2	0	1	2	0,3
Ascomycota	Herpotrichiellaceae	Outros	0	0	0	1	0	1	0,1
Ascomycota	Herpotrichiellaceae	<i>Exophiala</i>	1	0	0	0	0	1	0,1
Ascomycota	Trichocomaceae	Outros	2	1	1	1	1	1	0,3
Ascomycota	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>	1	3	3	4	3	1	0,6
Ascomycota	Trichocomaceae	<i>Byssochlamys</i>	1	0	0	0	0	1	0,1
Ascomycota	Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>	0	0	2	0	1	1	0,1
Ascomycota	Arthrodermataceae	<i>Ctenomyces</i>	0	0	1	0	0	1	0,1
Ascomycota	indefinido	indefinido	0	1	1	0	1	1	0,1
Ascomycota	Outros	Outros	1	1	0	0	1	1	0,1
Ascomycota	Outros	Outros	0	1	0	0	0	1	0,1
Ascomycota	Orbiliaceae	<i>Arthrobotrys</i>	0	1	0	0	0	1	0,1
Ascomycota	Pezizomycotina	Outros	1	0	0	0	0	1	0,1
Ascomycota	Pezizomycotina	<i>Ochroconis</i>	1	0	0	0	0	1	0,1
Ascomycota	Saccharomycetaceae	Outros	2	12	6	3	5	1,2	1,22
Ascomycota	Saccharomycetaceae	<i>Saccharomyces</i>	14	38	7	18	13	4,1	4,08
Ascomycota	Saccharomycetales	Outros	0	1	0	0	1	0,1	0,05

Ascomycota	Saccharomycetales	<i>Candida</i>	20	11	11	18	5	3,2	3,18
Ascomycota	Saccharomycodaceae	<i>Hanseniaspora</i>	1	0	0	2	1	0,2	0,16
Ascomycota	Outros	Outros	33	36	6	1	18	4,0	4,03
Ascomycota	Chaetosphaeriaceae	Outros	0	1	2	0	1	0,2	0,16
Ascomycota	Chaetosphaeriaceae	<i>Chloridium</i>	0	0	1	0	1	0,1	0,05
Ascomycota	Outros	Outros	4	1	0	0	2	0,3	0,26
Ascomycota	Diaporthaceae	Outros	0	0	6	0	3	0,3	0,32
Ascomycota	Outros	Outros	10	1	3	0	5	0,7	0,74
Ascomycota	Bionectriaceae	Outros	10	0	2	1	5	0,7	0,69
Ascomycota	Bionectriaceae	<i>Clonostachys</i>	1	0	0	0	1	0,1	0,05
Ascomycota	Hypocreaceae	Outros	1	0	0	1	1	0,1	0,11
Ascomycota	Hypocreaceae	<i>Trichoderma</i>	10	3	4	1	4	1,0	0,95
Ascomycota	Hypocreales	Outros	1	0	0	0	1	0,1	0,05
Ascomycota	Hypocreales	<i>Stachybotrys</i>	2	0	0	0	1	0,1	0,11
Ascomycota	Nectriaceae	Outros	2	7	3	0	3	0,6	0,64
Ascomycota	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	49	56	61	9	24	9,3	9,27
Ascomycota	Nectriaceae	<i>Volutella</i>	0	0	1	0	1	0,1	0,05
Ascomycota	Nectriaceae	indefinido	0	0	0	1	1	0,1	0,05
Ascomycota	Ophiocordycipitaceae	<i>Purpureocillium</i>	0	0	1	3	1	0,2	0,21
Ascomycota	indefinido	indefinido	3	0	6	2	3	0,6	0,58
Ascomycota	Plectosphaerellaceae	<i>Lectera</i>	0	0	1	0	1	0,1	0,05
Ascomycota	Microascaceae	indefinido	3	0	0	0	2	0,2	0,16
Ascomycota	Outros	Outros	1	13	2	2	6	1,0	0,95
Ascomycota	Chaetomiaceae	Outros	2	2	1	0	1	0,3	0,26
Ascomycota	Lasiosphaeriaceae	Outros	0	1	0	0	1	0,1	0,05
Ascomycota	Sordariaceae	Outros	0	0	0	1	1	0,1	0,05

Ascomycota	Sordariaceae	<i>Neurospora</i>	1	0	0	0	1	0,1	0,05
Ascomycota	indefinido	indefinido	0	3	0	0	2	0,2	0,16
Ascomycota	Annulatascaceae	<i>Conlarium</i>	2	0	0	0	1	0,1	0,11
Ascomycota	Glomerellaceae	<i>Colletotrichum</i>	0	0	1	0	1	0,1	0,05
Ascomycota	Trichosphaeriales	<i>Nigrospora</i>	1	1	0	0	1	0,1	0,11
Ascomycota	Outros	Outros	0	0	1	0	1	0,1	0,05
Ascomycota	Amphisphaeriaceae	Outros	0	0	5	3	2	0,4	0,42
Ascomycota	Amphisphaeriaceae	<i>Pestalotiopsis</i>	0	0	35	0	18	1,9	1,85
Ascomycota	Xylariales	<i>Microdochium</i>	2	4	0	0	2	0,3	0,32
Ascomycota	Xylariales	<i>Monographella</i>	3	0	1	0	1	0,2	0,21
Ascomycota	indefinido	indefinido	0	1	0	0	1	0,1	0,05
Ascomycota	indefinido	indefinido	0	2	1	0	1	0,2	0,16
Basidiomycota	Outros	Outros	0	0	0	5	3	0,3	0,26
Basidiomycota	Outros	Outros	1	0	0	0	1	0,1	0,05
Basidiomycota	Agaricaceae	<i>Lycoperdon</i>	0	0	1	0	1	0,1	0,05
Basidiomycota	Psathyrellaceae	Outros	0	0	2	0	1	0,1	0,11
Basidiomycota	Psathyrellaceae	<i>Coprinopsis</i>	0	0	0	1	1	0,1	0,05
Basidiomycota	Strophariaceae	<i>Agrocybe</i>	0	0	0	4	2	0,2	0,21
Basidiomycota	Ceratobasidiaceae	Outros	8	0	0	0	4	0,4	0,42
Basidiomycota	indefinido	indefinido	0	0	3	0	2	0,2	0,16
Basidiomycota	Hydnodontaceae	<i>Trechispora</i>	1	0	0	0	1	0,1	0,05
Basidiomycota	Agaricostilbaceae	<i>Sterigmatomyces</i>	0	0	2	0	1	0,1	0,11
Basidiomycota	Outros	Outros	0	0	0	3	2	0,2	0,16
Basidiomycota	Symmetrosporaceae	<i>Symmetrospora</i>	0	0	0	8	4	0,4	0,42
Basidiomycota	Outros	Outros	0	0	3	2	2	0,3	0,26
Basidiomycota	Outros	Outros	3	1	1	3	1	0,4	0,42

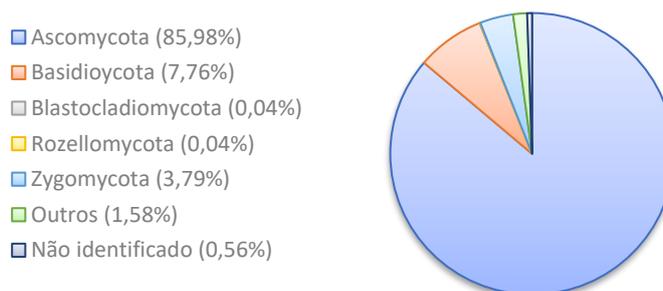
Basidiomycota	Filobasidiaceae	<i>Filobasidium</i>	0	0	3	9	4	0,6	0,64
Basidiomycota	Tremellales	Outros	2	0	15	2	7	1,0	1,01
Basidiomycota	Tremellales	<i>Cryptococcus</i>	0	0	5	0	3	0,3	0,26
Basidiomycota	Tremellales	<i>Dioszegia</i>	0	0	0	20	10	1,1	1,06
Basidiomycota	Tremellales	<i>Papiliotrema</i>	0	0	0	1	1	0,1	0,05
Basidiomycota	Tremellales	indefinido	0	0	5	0	3	0,3	0,26
Basidiomycota	Trichosporonaceae	<i>Apiotrichum</i>	8	1	3	6	3	1,0	0,95
Basidiomycota	Trichosporonaceae	<i>Cutaneotrichosporo</i>	2	0	0	2	1	0,2	0,21
Basidiomycota	Trichosporonaceae	<i>Trichosporon</i>	8	0	0	3	4	0,6	0,58
Basidiomycota	Outros	Outros	0	0	3	0	2	0,2	0,16
Basidiomycota	Ustilaginaceae	<i>Pseudozyma</i>	0	0	0	2	1	0,1	0,11
lastocladiomycot a	indefinido	indefinido	0	0	1	0	1	0,1	0,05
Chytridiomycota	Spizellomycetaceae	<i>Powellomyces</i>	0	1	0	0	1	0,1	0,05
Chytridiomycota	Spizellomycetaceae	<i>Spizellomyces</i>	0	3	0	0	2	0,2	0,16
Rozellomycota	indefinido	indefinido	0	0	1	0	1	0,1	0,05
Zygomycota	Mortierellaceae	<i>Mortierella</i>	10	4	54	0	25	3,6	3,60
Zygomycota	Cunninghamellaceae	<i>Absidia</i>	7	0	1	0	3	0,4	0,42
Zygomycota	Mucoraceae	<i>Mucor</i>	0	1	1	0	1	0,1	0,11
Zygomycota	Rhizopodaceae	<i>Rhizopus</i>	0	0	1	0	1	0,1	0,05
Zygomycota	Umbelopsidaceae	<i>Umbelopsis</i>	0	0	0	1	1	0,1	0,05
indefinido	indefinido	indefinido	0	2	1	8	4	0,6	0,58

Legenda: DP (desvio padrão), % média foi calculada com o somatório das médias de sequencias lidas (n=4).

A diversidade taxonômica fúngica presente e estabelecida entre as amostras avaliadas indicou que o filo mais encontrado foi Ascomycota, mostrando uma abundância relativa média (\pm desvio padrão, DP) de 85,98% ($\pm 1,02$). O segundo filo mais abundante foi Basidiomycota com 7,76% ($\pm 0,31$). Os demais filios compostos por Zygomycota (3,75% $\pm 0,48$) Blastocladiomycota (0,04% $\pm 0,04$), Rozellomycota (0,04% $\pm 0,15$), não classificados (0,56% $\pm 0,04$), outros (1,58% $\pm 0,76$) apresentaram menor abundancia.

Na figura abaixo (Figura 31) são apresentados na forma de gráfico pizza os dados referentes a composição taxonômica das amostras de folhas de *P. ruderale*, coletada em ambiente salino mostrando a abundância relativa média dos filios fúngicos (n=4).

Figura 31. Composição taxonômica (filio) das amostras de folhas de *P. ruderale*.



A predominância do filo Ascomycota em espécies da família botânica Asteraceae é descrita por Whitaker *et al.* (2020) e adicionalmente para as famílias Poaceae, Fabaceae, Malvaceae e Solanaceae (FUENTES *et al.*, 2020). Segundo Fuentes e colaboradores (2020) espécies dessas famílias se adaptam ao ambiente extremo através de mecanismos que contribuem para sua tolerância e desenvolvimento, principalmente decorrente de sua microbiota.

Um fato observado foi a variação da composição do microbioma entre as amostras (1-4), sendo que estas foram coletadas no mesmo momento, contudo foram coletadas de indivíduos diferentes pertencentes ao mesmo habitat e com aproximadamente 1m de distância entre cada indivíduo. Ressalta-se que foram coletadas apenas amostras em bom estado, com altura e desenvolvimento semelhantes.

Segundo Gupta e colaboradores (2019), a diversidade na comunidade microbiana vegetal depende não apenas das espécies hospedeiras e da pressão de seleção exercida pelo habitat, mas também do estágio de desenvolvimento e das condições ambientais. Os autores citam que pesquisadores, como Agler et al. (2016) observaram que a composição do microbioma e suas interações com outras comunidades microbianas dependem da constituição genética do hospedeiro, de fatores abióticos e da função de espécies ou famílias microbianas específicas. O microbioma vegetal também inclui uma variedade de conjuntos de dados biológicos, incluindo informações genéticas, transcrições, proteínas e metabólitos que representam as comunidades microbianas associadas ao hospedeiro.

Como as comunidades microbianas estão dispersas em todas as esferas (ar, água e solo) estas podem interagir facilmente com as plantas em diferentes compartimentos, e estas possuem suas próprias comunidades microbianas. A comunidade microbiana é altamente variável e depende totalmente da espécie vegetal, estágio de desenvolvimento e variação genética. As condições experimentadas pelas plantas hospedeiras em seu ciclo de vida também podem interferir na modulação da diversidade microbiana pela ativação do sistema imune inato do hospedeiro (GUPTA *et al.*, 2019). Além disso, a imunidade comprometida das plantas hospedeiras, estimulada por estresses bióticos e abióticos, pode afetar a diversidade de seu microbioma. Portanto é necessário ter informações detalhadas sobre as composições microbianas das plantas para desvendar o mecanismo subjacente da montagem do microbioma (GUPTA *et al.*, 2019).

Na sequência serão apresentados os dados referentes à composição das famílias (Figura 21) identificados na análise do microbioma das folhas de *P. ruderale*.

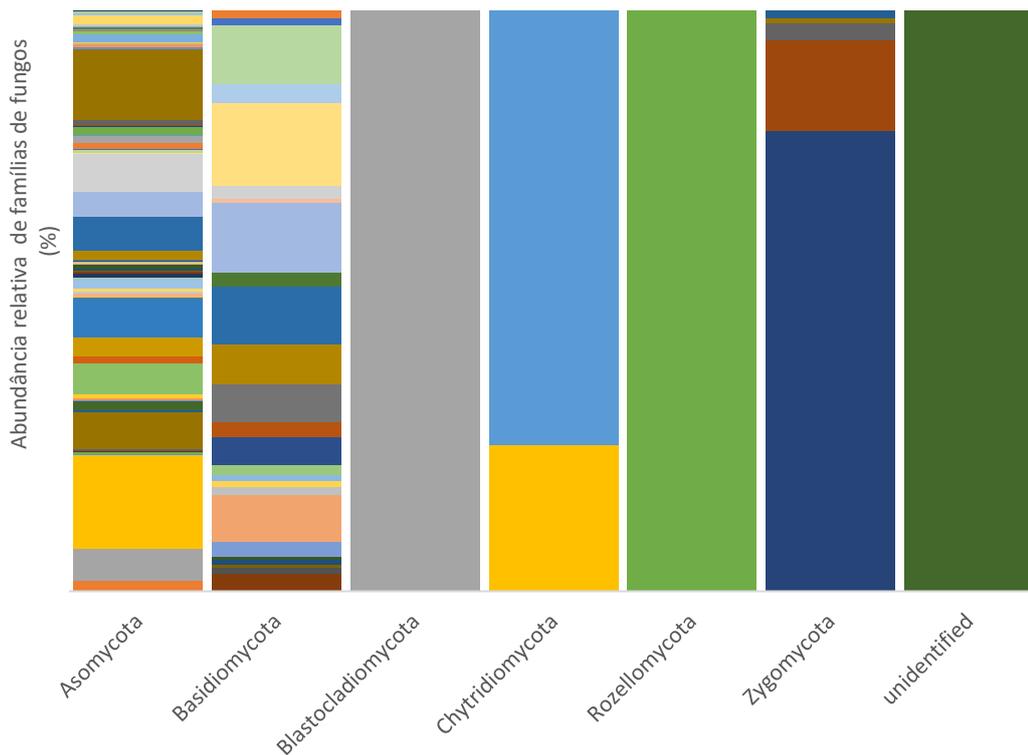
Em nível de família, observamos que as maiores porcentagens relativas foram para Davidiellaceae (5,70 %), Pleosporaceae (5,94 %), Saccharomycetaceae (5,04 %), Nectriaceae (10,65 %) e Mortierellaceae (3%). Infortunadamente, as sequências determinadas como “Outros” representaram 36,5%, ou seja, a maior porcentagem de leituras, porém as mesmas não foram identificadas. Os dados podem ser observados na tabela abaixo, Tabela 5.

Tabela 5. Composição microbiana das folhas de *P. ruderale* (Família) e abundância relativa ao total de sequências lidas, calculada.

Família	Abundância relativa (%)	Família	Abundância relativa (%)
Outros	36,5%	Nectriaceae	11,52%
Aplosporellaceae	0,08%	Ophiocordycipitaceae	0,18%
Botryosphaeriaceae	0,31%	unidentified	0,55%
Capnodiales	0,11%	Plectosphaerellaceae	0,04%
Davidiellaceae	5,70%	Microascaceae	0,24%
Mycosphaerellaceae	0,16%	Chaetomiaceae	0,35%
Teratosphaeriaceae	1,50%	Lasiosphaeriaceae	0,08%
Dothioraceae	0,13%	Sordariaceae	0,13%
Eremomycetaceae	0,22%	Annulatasceae	0,16%
Hysteriaceae	0,10%	Glomerellaceae	0,04%
Elsinoaceae	0,60%	Trichosphaeriales	0,16%
Myriangiaceae	0,04%	Amphisphaeriaceae	1,56%
Lentitheciaceae	0,15%	Xylariales	0,73%
Leptosphaeriaceae	0,98%	Agaricaceae	0,04%
Lophiostomataceae	0,04%	Psathyrellaceae	0,12%
Phaeosphaeriaceae	2,82%	Strophariaceae	0,19%
Pleosporaceae	5,94%	Ceratobasidiaceae	0,64%
Pleosporales	0,60%	Unidentified	0,11%
Sporormiaceae	0,39%	Hydnodontaceae	0,08%
Tubeufiaceae	1,45%	Agaricostilbaceae	0,07%
Venturiaceae	0,26%	Symmetrosporaceae	0,38%
Herpotrichiellaceae	0,13%	Filobasidiaceae	0,53%
Trichocomaceae	1,06%	Tremellales	2,13%
Arthrodermataceae	0,04%	Trichosporonaceae	2,14%
Orbiliaceae	0,08%	Ustilaginaceae	0,10%
Pezizomycotina	0,16%	Spizellomycetaceae	0,30%
Saccharomycetaceae	6,45%	Mortierellaceae	3,00%
Saccharomycetales	3,73%	Cunninghamellaceae	0,59%
Saccharomycodaceae	0,18%	Mucoraceae	0,11%
Chaetosphaeriaceae	0,18%	Rhizopodaceae	0,04%
Diaporthaceae*	0,21%	Umbelopsidaceae	0,05%
Bionectriaceae	0,99%	Hypocreales	0,24%
Hypocreaceae	1,34%		

Na Figura 32 observa-se uma representação gráfica da abundância média de família por filo. Sendo possível observar uma maior variedade e abundancia de fungos pertencentes ao filo Ascomycota.

Figura 32. Gráfico em barras evidenciando por cores a abundancia média (n=4) de famílias de fungos detectados (%) entre os filios.



Em nível de gênero (Tabela 6), observamos abundância dos gêneros: *Fusarium* (representando 9,3 % das sequencias lidas), *Cladosporium* (6,5%), *Alternaria* (6,7 %), *Saccharomyces* (4,1%), *Mortierella* (3,6%), *Pestalotiopsis* (1,9%) e *Candida* (3,2%). Os gêneros classificados como “Outros”, ou seja, não identificados correspondem a 48,3% das sequencias lidas.

Tabela 6. Composição microbiana das folhas de *P. ruderale* (gênero) e abundância relativa ao total de sequências lidas.

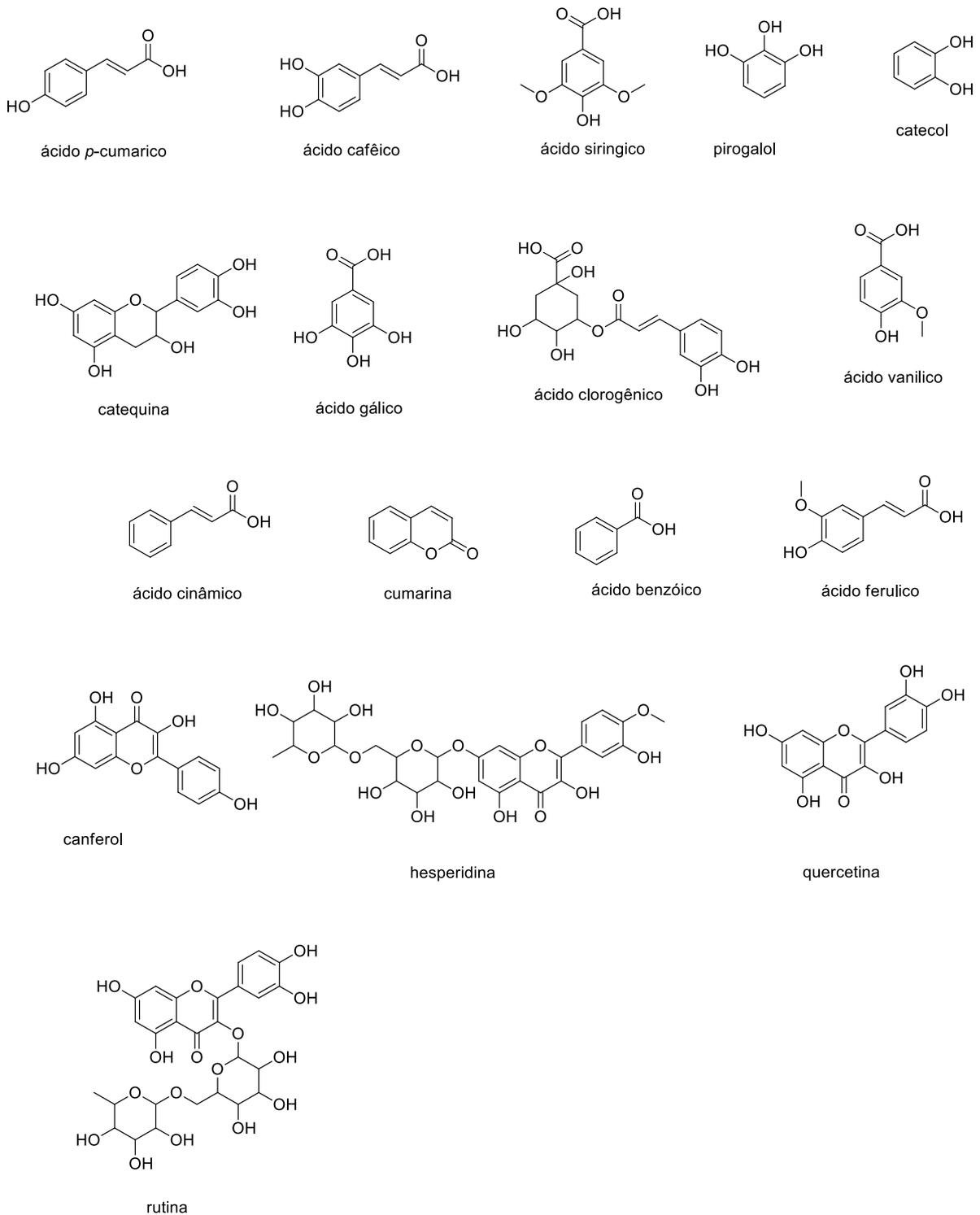
Gênero	Abundância relativa (%)	Gênero	Abundância relativa (%)
Outros	48,3	<i>Purpureocillium</i>	0,2
indefinidos	3	<i>Lectera</i>	0,1
<i>Aplosporella</i>	0,1	<i>Neurospora</i>	0,1
<i>Dothiorella</i>	0,3	indefinido	0,2
<i>Rachicladosporium</i>	0,1	<i>Conlarium</i>	0,1
<i>Toxicocladosporium</i>	0,1	<i>Colletotrichum</i>	0,1
<i>Cladosporium</i>	6,5	<i>Nigrospora</i>	0,1
<i>Cercospora</i>	0,1	<i>Pestalotiopsis</i>	1,9
<i>Aureobasidium</i>	0,2	<i>Microdochium</i>	0,3
<i>Arthrographis</i>	0,2	<i>Monographella</i>	0,2
<i>Glioniopsis</i>	0,1	<i>Lycoperdon</i>	0,1
<i>Coniothyrium</i>	1,1	<i>Coprinopsis</i>	0,1
<i>Alternaria</i>	6,7	<i>Agrocybe</i>	0,2
<i>Bipolaris</i>	0,1	<i>Trechispora</i>	0,1
<i>Didymella</i>	0,5	<i>Sterigmatomyces</i>	0,1
<i>Westerdykella</i>	0,3	<i>Symmetrospora</i>	0,4
<i>Helicoma</i>	1,1	<i>Filobasidium</i>	0,6
<i>Venturia</i>	0,2	<i>Cryptococcus</i>	0,3
<i>Exophiala</i>	0,1	<i>Dioszegia</i>	1,1
<i>Aspergillus</i>	0,6	<i>Papiliotrema</i>	0,1
<i>Byssochlamys</i>	0,1	<i>Apiotrichum</i>	1,0
<i>Penicillium</i>	0,1	<i>Cutaneotrichosporon</i>	0,2
<i>Ctenomyces</i>	0,1	<i>Trichosporon</i>	0,6
<i>Arthrobotrys</i>	0,1	<i>Pseudozyma</i>	0,1
<i>Ochroconis</i>	0,1	<i>Powellomyces</i>	0,1
<i>Saccharomyces</i>	4,1	<i>Spizellomyces</i>	0,2
<i>Candida</i>	3,2	<i>Mortierella</i>	3,6
<i>Hanseniaspora</i>	0,2	<i>Absidia</i>	0,4
<i>Chloridium</i>	0,1	<i>Mucor</i>	0,1
<i>Clonostachys</i>	0,1	<i>Rhizopus</i>	0,1
<i>Trichoderma</i>	1,0	<i>Umbelopsis</i>	0,1
<i>Stachybotrys</i>	0,1	<i>Volutella</i>	0,1
<i>Fusarium</i>	9,3		

Segundo Batistae colaboradores (2022), o gênero *Fusarium* inclui numerosas espécies de fungos endofíticos, sendo conhecido como uma fonte produtiva de metabólitos secundários. Através de estudos qualitativos para triagem de classes de metabólitos secundários de *Fusarium* sp. são descritos a presença de metabólitos como: fenóis, flavonoides, aminoácidos, carboidratos, saponinas e terpenos. Além disso, uma análise quantitativa descrita por Batistae colaboradores (2022) apresentou o teor de fenólicos totais do extrato metanólico de *Fusarium* sp. com valores de $4,46 \pm 0,15$ mg /g (determinados com curva de calibração utilizando quercetina).

O complexo de espécies pertencentes ao gênero *Fusarium* abrange uma variedade de cepas presentes nos solos, sendo que a maioria dessas linhagens tem capacidade de colonizar as raízes das plantas. Contudo, espécies de *Fusarium* também podem apresentar características comensais e saprófitos. Salvo exceções, cepas deste gênero podem ser benéficas para o hospedeiro e podem fornecer proteção contra patógenos além de conferirem ação de biocontrole (SHALAPY; KANG, 2022).

Em termos de influência no metabolismo vegetal Shalapy e Kang (2022) descrevem a influência da inoculação de *Fusarium oxysporum* nas raízes da espécie vegetal *Orobanch* sp. A avaliação foi feita por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas e permitiu observar uma elevação significativa nos metabólitos ácido *p*-cumárico, ácido cafêico, ácido siringico e catequina em raízes infectadas por *Fusarium oxysporum*. Entretanto foi descrita uma pequena diminuição no ácido gálico em comparação com dados de controle (*Orobanch* sp. saudáveis). Para plantas inoculadas com *Fusarium solani* os autores observaram elevação nas concentrações de ácido pirogalico, ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, catecol, ácido cafêico, ácido vanílico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, cumarina, ácido benzóico, bem como os favonóides canferol, hesperidina, rutina, quercetina, entre outros metabólitos (SHALAPY; KANG, 2022). As substâncias citadas encontram-se na figura abaixo, Figura 33.

Figura 33. Metabolitos secundários de *Orobanchae* sp possivelmente influenciados pela inoculação do fungo *Fusarium*, segundo Shalapy e Kang (2022).



Comparando as informações descritas acima por Shalapy e Kang (2022) com os dados de desreplicação obtidos para os extratos de indivíduos da espécie *Porophyllum ruderale* (discutida no Item 5.1) nota-se que as apenas nos cromatogramas dos indivíduos coletados na praia foi observada a presença dos flavonoides luteolina e canferol. Nas demais coletas não foi observada a presença destes flavonóides. Assim levanta-se uma hipótese de que a presença desta classe de fungos (*Fusarium*) pode estar influenciando na produção destes metabolitos identificados na espécie em estudo. Contudo como não foi realizada a avaliação do microbioma das demais coletas, não sendo possível afirmar essa hipótese. Mais estudos ainda são necessários.

Em termos de bioprospecção Shalapy e Kang (2022) e Batista (2022) sugerem que devido ao seu conteúdo abundante de fenóis, flavonoides e ácidos graxos o gênero *Fusarium* apresenta potencial aplicação farmacológica, incluindo suas descritas ações como: antioxidante, anti-inflamatório e antimicrobiana

O gênero *Alternaria* é amplamente distribuído na natureza, sendo pertencente ao filo Ascomycota. Espécies deste gênero apresentam-se na forma de saprófitas e endofíticas, contudo, em sua maioria são agentes de doenças vegetais (MEENAA; SAMAL, 2019). Os autores asseguram a existência de 300 espécies de *Alternaria* relatadas, incluindo *Alternaria alternata*, *A. arborescens*, *A. radicina*, *A. brassicola*, *A. brassicae* e *A. infectoria*. Complementar a isto, a espécie *A. alternata* é citada como a principal causa de doenças em várias plantas economicamente importantes, como tomate, pimenta, batata, frutas cítricas, maçã, etc.

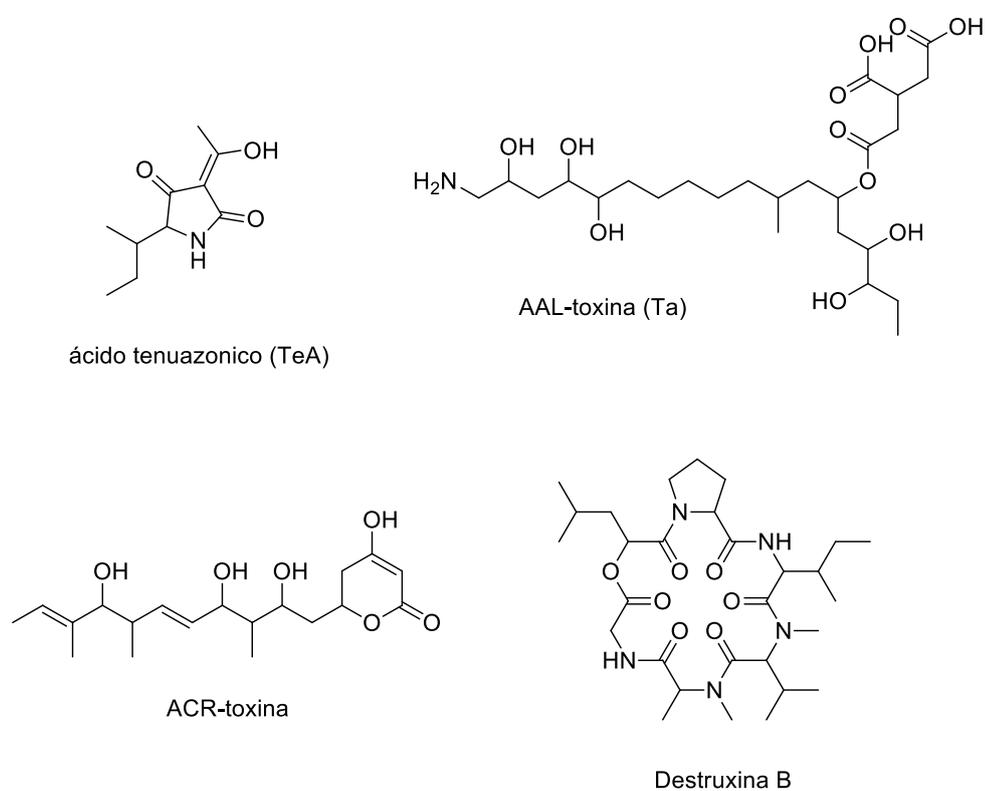
Entre os metabolitos secundários produzidos por espécies de *Alternaria* existe uma classe de toxinas que podem ser divididas em toxinas específicas (host-specific toxins, HSTs) e não específicas (non-host-specific toxins) para o hospedeiro. As toxinas específicas do hospedeiro (HSTs) induzem toxicidade e promovem doenças apenas na espécie hospedeira e apenas em genótipos desse hospedeiro que expressam um gene de suscetibilidade específico e muitas vezes dominante.

Existem muitas toxinas de *Alternaria* que foram descritas como possuindo atividade citotóxica, genotóxica, mutagênica, fetotóxica e/ou teratogênica. Em sistemas celulares microbianos e de mamíferos, essas toxinas causam efeitos mutagênicos e clastogênicos. Apesar do fato de que as toxinas de *Alternaria* podem se originar quase inteiramente em alimentos e

rações para animais, contudo elas têm o poder de exibir efeitos nocivos na saúde humana e animal. No momento, não há regulamentos internacionais e nem nacionais para determinar limites de toxinas. Alguns autores sugerem limitar o teor da toxina TeA (ácido tenuazonico) em 500 µg/kg em alimentos infantis à base de sorgo/painço (MEENA; SAMAL, 2019).

Na figura 34 são apresentadas quatro toxinas específicas do hospedeiro produzidas por espécies do gênero *Alternaria* (adaptado de Meena e Samal, 2019).

Figura 34. Estruturas químicas de toxinas específicas do hospedeiro produzidas por espécies do gênero *Alternaria* (adaptado de Meena e Samal, 2019).

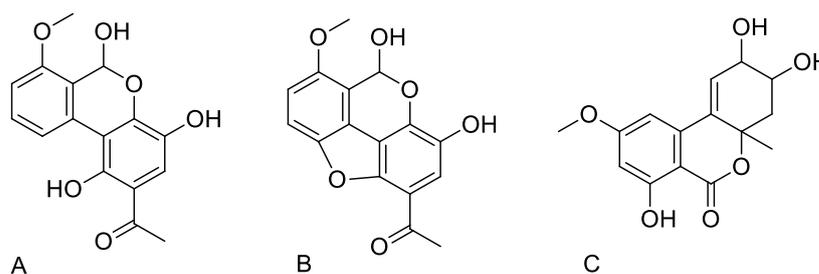


Outras pesquisas demonstram uma inibição de AChE (acetilcolinesterase) de 78% para o extrato bruto do fungo *Alternaria* sp, isolada da planta *Catharanthus roseus*. Os autores observaram que o extrato também inibiu a butirilcolinesterase em 73%. Nesta pesquisa, os autores identificaram que o altenueno expôs potencial inibidor da AChE, apresentando

potencial para maiores investigações para o tratamento de doenças neurodegenerativas (BHAGAT *et al.*, 2016).

Outro exemplo de isolado fúngico do gênero *Alternaria* com potenciais aplicações na indústria agroquímica e farmacêutica é a *Alternaria sonchi*, considerada um potencial agente para o biocontrole de *Sonchus arvensis* (popularmente conhecido como cardo perene). Os autores isolaram da cultura sólida do fungo duas substâncias identificadas como alternetanoxinas A e B, relatadas também em *A. sonchiantes*, os autores testaram as substâncias para atividades fitotóxicas, antimicrobianas, inseticidas, citotóxicas e de inibição de esterase com resultados satisfatórios (DALINOVA *et al.*, 2019). As estruturas das substâncias altenueno e alternetanoxinas A e B são apresentadas na figura 35.

Figura 35. Estruturas das substâncias alternetanoxinas A (A) e B (B) e altenueno (C)

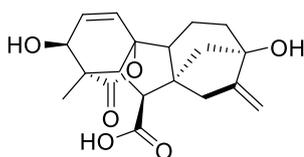


Não foram encontradas publicações que descrevam a relações entre este gênero de fungos e a produção de metabólitos secundários pelas plantas. Considerando que *P. ruderale* é uma planta alimentícia não convencional (PANC) e diante da presença de fungos do gênero *Alternária*, não foram detectadas as toxinas descritas em literatura nos extratos das plantas avaliadas por CL-EM (Item 5.1) na presente tese.

Segundo Raut *et al.*, (2021), espécies de *Cladosporium* em sua maioria são fungos endofíticos distribuídos mundialmente. São conhecidos por serem ativos na proteção de plantas contra diferentes estresses bióticos e abióticos. Com base na produção de metabólitos secundários benéficos, essas espécies podem auxiliar as plantas na adaptação de novos habitats e de manter a saúde e o desempenho do vegetal. Entre os metabólitos produzidos pelo fungo é descrita a presença de giberelinas (Figura 36), que são hormônios responsáveis por estimular o

crescimento das plantas, especialmente na germinação de sementes, alongamento do caule e expansão foliar (RAUT *et al.*, 2021).

Figura 36. Metabólito produzido por espécies de *Cladosporium*, giberelinas.

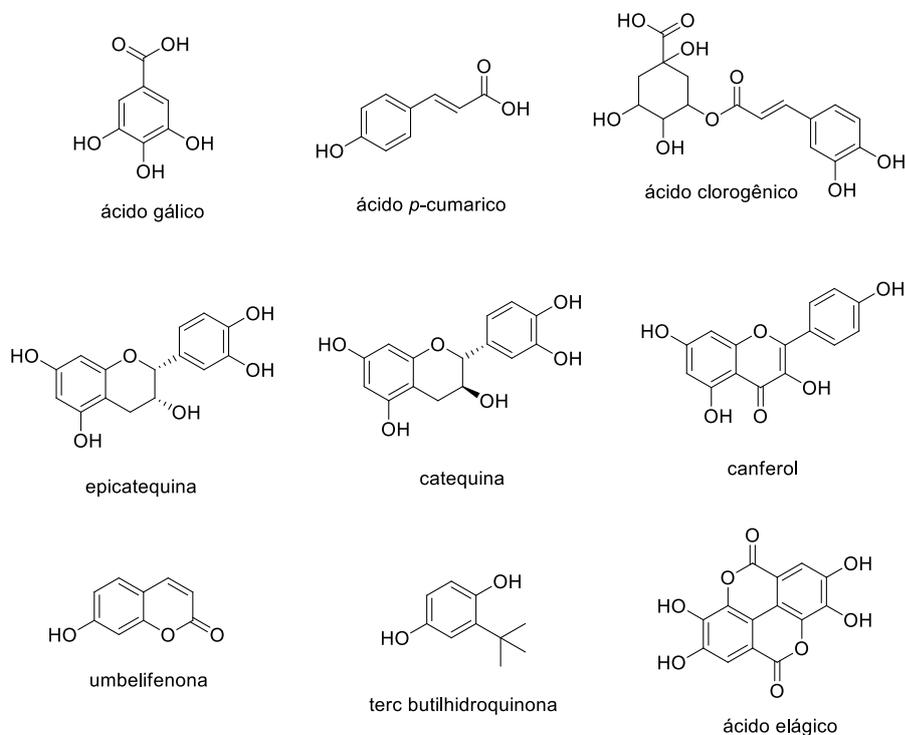


Giberelinas (GA₃)

Neste sentido, espécies de *Cladosporium* não causam danos as plantas e são de grande interesse para aplicações agroindustriais, devido à crescente demanda por melhor rendimento e qualidade de alimentos e culturas, biorremediação. Outras aplicações descritas são para indústria de detergentes, descoloração de corantes têxteis e na degradação de resíduos contendo queratina do ambiente natural (RAUT *et al.*, 2021).

Singh e colaboradores (2016) realizaram uma análise comparativa do perfil fenólico da planta *Tinospora cordifolia* e do endófito *Cladosporium velox*, isolado do caule desta mesma planta. A análise por CLUE revelou que o extrato preparado com acetato de etila do endofítico continha compostos fenólicos semelhantes aos do caule da planta hospedeira. A avaliação do perfil do extrato fúngico utilizando padrões injetados nas mesmas condições analíticas permitiu identificar os compostos: ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, epicatequina, ácido cafêico, umbeliferona, ácido cumárico, ácido elágico e terc-butilhidroquinona. Um fato interessante é que o perfil cromatográfico das folhas da planta, apresentado pelos autores, apresentou exclusivamente a presença de canferol, diferenciando-se dos demais. As estruturas químicas citadas encontram-se desenhadas abaixo, Figura 37.

Figura 37. Metabolitos identificados em *Cladosporium velox* e sua planta hospedeira *Tinospora cordifolia*, conforme Singh e colaboradores (2016)



De tal modo, nas últimas décadas a busca por microrganismos endofíticos abrem caminhos para explorar novas moléculas produzidas durante a interação planta-microrganismos para aplicações farmacêuticas e agrícolas (DALINOVA *et al.*, 2019).

Após a avaliação da composição química das partes aéreas de *P. ruderale* e a investigação da diversidade de fungos presentes nas folhas da espécie, o próximo objetivo do presente estudo foi investigar a presença de fungos endofíticos que colonizam as folhas de *P. ruderale*, isolando e identificando fungos endofíticos como potencial fonte de metabolitos secundários. No item a seguir serão descritos os resultados referentes avaliação dos microrganismos endofíticos isolados.

5.4 INVESTIGAÇÃO DE FUNGOS ENDOFITICOS DE OCORRENCIA NATURAL EM *Porophyllum ruderale* (Jacq) Cass.

Os fungos endofíticos foliares (FEF) são componentes importantes do microbioma da planta e surgiram recentemente como um modelo útil para avaliar interações microbianas com sua planta hospedeira. Segundo Felix (2019), os FEF se destacam pela facilidade de cultivo em condições de laboratório.

Diante do contexto, nessa seção será discutido o isolamento, identificação e bioprospecção de fungos endofíticos isolados das folhas de *P. ruderale*, com ênfase na seleção de metabolitos secundários com potencial aplicação farmacológica. Para este estudo optou-se por utilizar as folhas de *P. ruderale* coletadas nas proximidades da praia de Santa Catarina (SC campo), devido ao fácil acesso, quantidade de material vegetal disponível e condições ambientais (habitat hostil, salino). As amostras utilizadas neste estudo foram provenientes da mesma coleta realizada para análise do microbioma, descrita no tópico anterior. Em contrapartida, pela semelhança na composição química entre as amostras e pela facilidade de acesso para futuras coletas optou-se também por avaliar os fungos endofíticos de ocorrência natural presentes nas amostras coletadas na casa de vegetação, cultivadas por 12 meses (SC 12 meses).

5.4.1 Isolamento de fungos endofíticos foliares associados a espécie vegetal

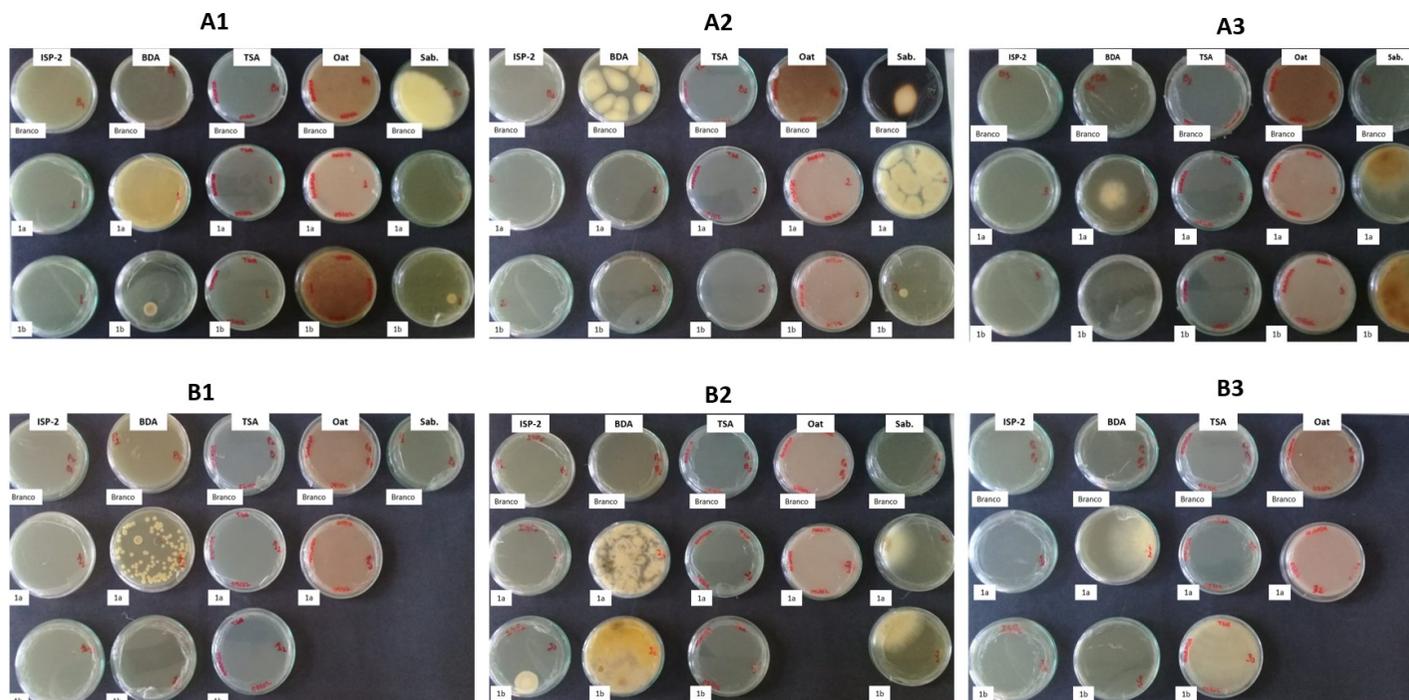
***Porophyllum ruderale* (Jacq) Cass.**

5.4.1.1 Avaliação das condições de obtenção de fungos endofíticos foliares de *P. ruderale*.

Para estabelecer o protocolo de desinfecção mais adequado para as folhas de *Porophyllum ruderale* (Jacq) Cass a fim de evitar a contaminação por microrganismos epifíticos foram selecionados inicialmente três processos de desinfecção (CHAGAS *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2014; WARDECKI *et al.*, 2015), posteriormente estes foram adaptados conforme a efetividade da desinfecção. Ao todo foram avaliados 5 protocolos de desinfecção da superfície foliar. Adicionalmente foram selecionados cinco diferentes meios de cultura disponíveis no laboratório de microbiologia de sola da UFSC (MIP-UFSC), sendo eles: BDA, Sabouraud, ISP-2 malte, TSA e meio de aveia.

Abaixo apresenta-se a Figura 38, referente aos três diferentes processos de desinfecção das folhas de *P. ruderale*, utilizando os cinco diferentes meios de cultura acompanhados por 28 dias.

Figura 38. Avaliação dos processos de desinfecção da superfície foliar e avaliação dos meios de cultura: ISP-2, BDA, TSA, Oatmeal agar e Sabouraud; ao fim dos 28 dias de incubação em estufa.

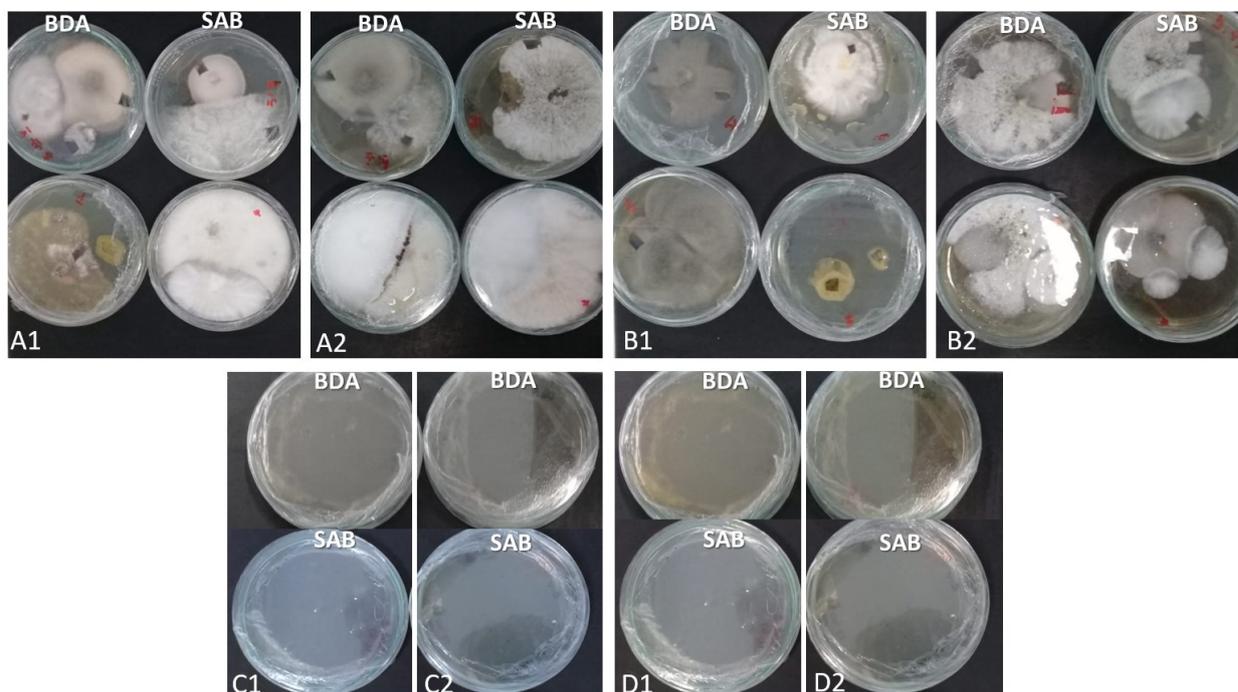


Legenda: (A) material vegetal obtido no campo, sendo (A1) processo de desinfecção 1, (A2) processo de desinfecção 02, (A3) processo de desinfecção 03. (B) material vegetal obtido na casa de vegetação, sendo (B1) processo de desinfecção 1, (B2) processo de desinfecção 02, (B3) processo de desinfecção 03. Utilizando os meios de cultura: ISP-2, BDA, TSA, aveia ágar e Sabouraud respectivamente, demonstrando o “branco” e duplicata de cultivo (1a-1b).

Após 28 dias concluiu-se que dos processos de desinfecção avaliados (protocolos descritos no Item 4.5.2) a desinfecção mais eficiente para a coleta do campo foi a 03, composta por: etanol 99% P.A (1min.), hipoclorito de sódio 2,5% (6 min), etanol 99% P.A (30 seg) e água destilada autoclavada (três lavagens de 1 min.) (WARDEKI *et al.*, 2015). Para a coleta da casa de vegetação todos foram eficientes pois não houve crescimento de microrganismos no plaqueamento da “amostra branco” (água da última lavagem do processo de desinfecção).

Contudo, notou-se um menor crescimento de colônias de fungos nos meios de cultura em A3 (coleta campo, processo de desinfecção 03), e B3 (coleta casa de vegetação, processo de desinfecção 03) e B1 (coleta casa de vegetação, processo de desinfecção 01). Ressalta-se que para o protocolo 1 foram utilizados: etanol 70% (1min.), hipoclorito de sódio 2,5% (4 min.), etanol 70% (30 seg) e água destilada autoclavada (três lavagens rápidas) (CHAGAS *et al.*, 2018). Possivelmente a redução do crescimento se deve ao tempo de exposição ao etanol e hipoclorito que podem ter penetrado o tecido vegetal e eliminado alguns fungos de interesse. Para uma melhor avaliação dos métodos de desinfecção, estes foram modificados e avaliados em duas novas condições (Figura 39), utilizando apenas os meios BDA e Sabouraud, por terem proporcionado maior crescimento de colônias. Sendo eles o Protocolo 4, composto por: etanol 70% P.A (1min.), hipoclorito de sódio 2,5% (4min), etanol 70% P.A (1 min.) e água destilada autoclavada (três lavagens de 1 min.), adaptado de Chagas *et al.* (2018) e o Protocolo 05: etanol 70% P.A (1min.), hipoclorito de sódio 2,5% (2 min), etanol 70% P.A (30 seg.) e água destilada autoclavada (três lavagens de 1 min.). Adaptado de Chagas *et al.* (2018).

Figura 39. Avaliação dos processos de desinfecção 04 e 05, utilizando os meios de cultura BDA e Sabouraud, com duplicata de cultivo.



Legenda: (A) material vegetal obtido no campo respectivamente para o meio BDA (esquerda) e Sabouraud (direita), sendo (A1) processo de desinfecção 04, (A2) processo de desinfecção 05, (B) material vegetal obtido na casa de vegetação, sendo (B1) processo de desinfecção 04, (B2) processo de desinfecção 05. Ainda em sequência observa-se o crescimento fúngico para os respectivos “brancos” dos meios de cultura BDA e SAB, sendo (C1) e (C2) respectivamente para os processos de desinfecção 04 e 05 das folhas coletadas no campo. (D1) e (D2) respectivamente para os processos de desinfecção 04 e 05 das folhas coletadas na casa de vegetação.

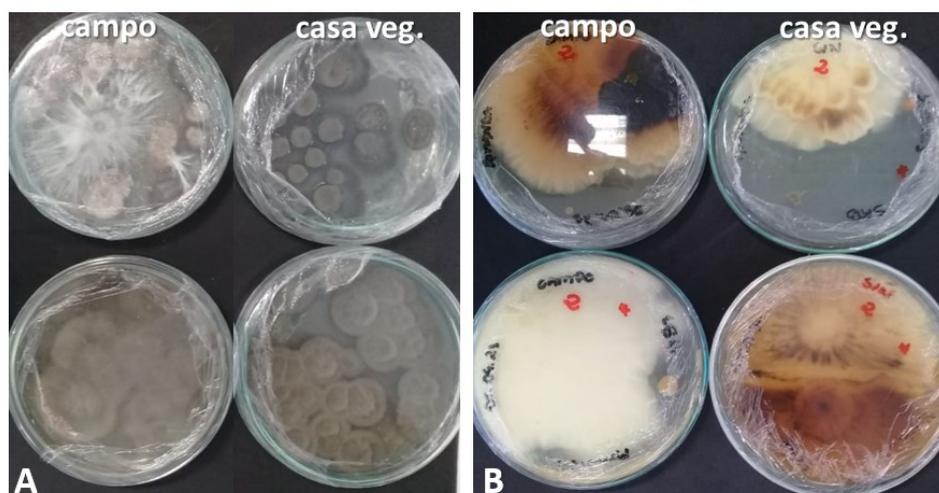
De acordo com o observado na Figura 39, ambos os métodos foram efetivo para a desinfecção da superfície das folhas, sem crescimento de microrganismos epifíticos nos “brancos”. Por este motivo foi escolhido o método de desinfecção 05 pra dar continuidade aos estudos, visto que ele é o mais brando (menor tempo de exposição ao hipoclorito).

Ainda na Figura 39 observa-se o crescimento dos endofíticos nos meios de cultura BDA e Sabouraud. Entre os meios de cultura, observou-se que os melhores meios para extração dos fungos endofíticos foram igualmente os meios BDA e Sabouraud devido à variedade de

colônias observadas. Contudo optou-se por seguir os experimentos utilizando o meio BDA pela disponibilidade e menor custo.

Na sequência foi avaliado o processo de plaqueamento utilizando a maceração das folhas com salina, conforme Figura 40.

Figura 40. Métodos de plaqueamento das amostras (em duplicata). Utilizando fragmentos e solução salina.



Legenda: (A) material vegetal plaqueado por maceração com salina e (B) material plaqueado através de fragmentos das folhas. Processo de desinfecção 05 e tempo de cultivo de 21 dias.

Avaliados os processos de desinfecção, os meios de cultura e o processo de plaqueamento que proporcionam maior recuperação de fungos endofíticos, concluiu-se que: os meios de cultura que proporcionaram maior recuperação de fungos endofíticos foram BDA e Sabouraud, ambos sem a adição de antimicrobianos. Optou-se por seguir os experimentos utilizando o meio BDA pela disponibilidade e baixo custo. O protocolo de desinfecção mais eficiente foi o protocolo 05, utilizando etanol 70% P.A (1min.), hipoclorito de sódio 2,5% (2 min), etanol 70% P.A (30 seg.) e água destilada autoclavada (três lavagens de 1 min.) Por fim, obteve-se uma maior variedade de colônias de fungos utilizando plaqueamento por fragmentos das folhas.

Acrescenta-se ainda que não foram observadas o crescimento de novas colônias e nem o crescimento das mesmas após 14 dias de cultivo.

5.4.1.2 Fungos endofíticos isolados das folhas de *Porophyllum ruderale* (Jacq) Cass.

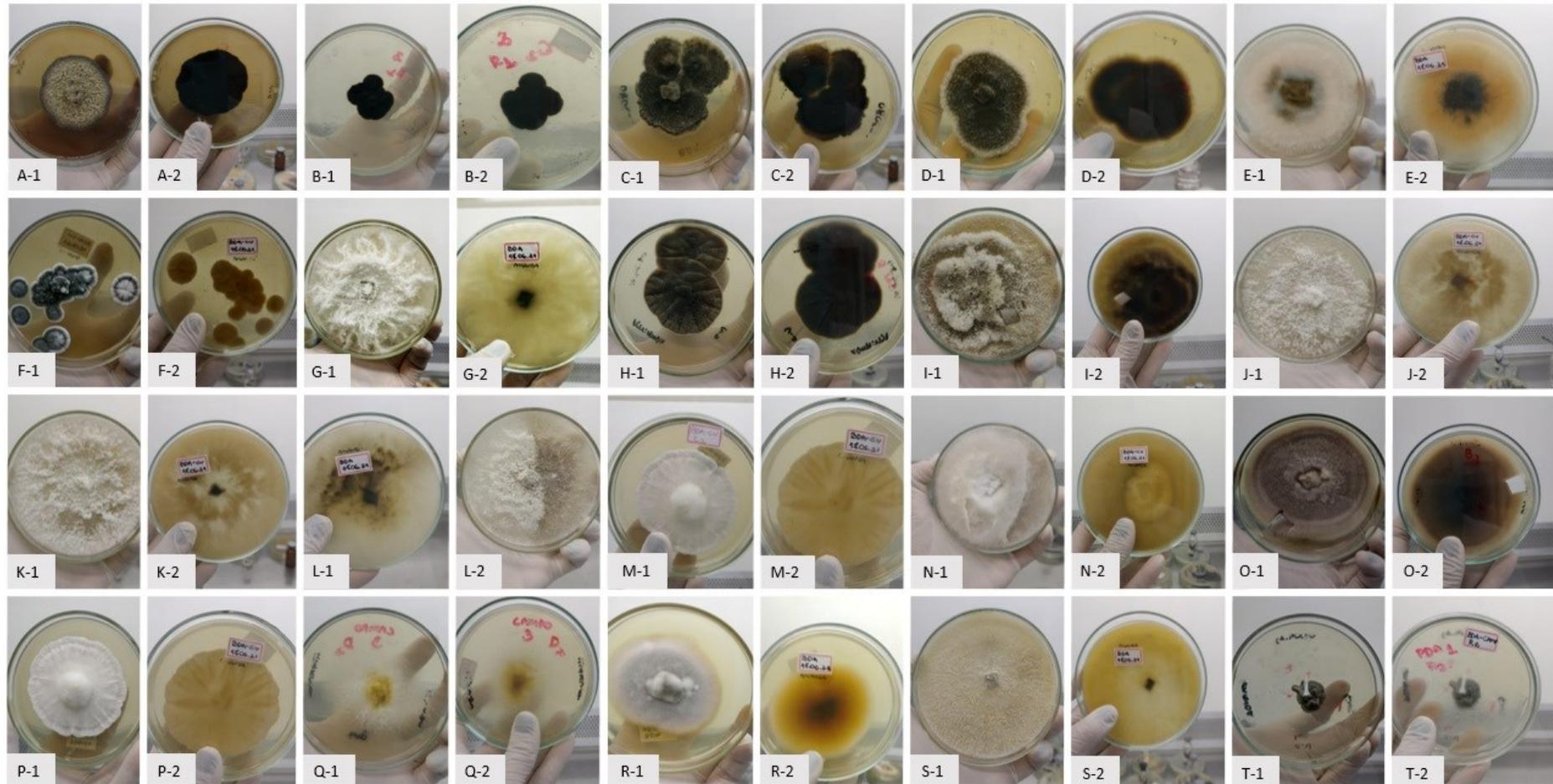
Foram isolados 25 fungos endofíticos (Figura 41) e destes 16 fungos foram selecionados para o microcultivo. As colônias foram agrupadas de acordo com suas características macroscópicas, com predomínio de colônias inicialmente brancas e algodonosas. De tal modo foram selecionados os fungos que apresentavam colônias distintas e um exemplar de colônias semelhantes. Com relação aos isolados da coleta do campo, estes apresentaram maior diversidade (25 isolados) enquanto que os fungos isolados da casa de vegetação apresentaram morfologias iguais aos isolados da coleta do campo e em menor quantidade (8 isolados). Por este motivo foram selecionados apenas os fungos provenientes da coleta do campo para realizar o microcultivo. Os 16 endofíticos selecionados foram submetidos ao microcultivo, no qual foram observadas as características microscópicas das colônias por período de 7 e 14 dias. A utilização da técnica objetivou a visualização de estruturas reprodutivas que pudessem sugerir possíveis gêneros para classificação dos endofíticos para auxiliar na triagem de metabólitos de interesse.

Para a identificação morfológica das colônias deparou-se com escassa disponibilidade de atlas para identificação de fungos de origem ambiental, a maior parte das publicações em periódicos e livros são para fungos de importância médica. Essas informações a respeito de falta de materiais para consultas também foram citadas por Pinto (2019) para bioprospecção de fungos endofíticos da planta *Dalbergia ecastaphyllum* L. Tau (Fabaceae).

Por meio do microcultivo foi possível observar que as poucas estruturas de esporulação visualizadas sugeriram endófitos pertencem aos gêneros: *Penicillium*, *Alternária* e *Cladosporium*. Para os demais fungos não foi possível obter dados suficientes para uma sugestão de gênero fúngico. Ressalta-se que esta etapa serviu como triagem para identificação de possível gêneros fúngicos para serem utilizados nas buscas de literatura (bases de dados) para correlacionar os íons encontrados nos cromatogramas de CL-EM para cada isolado fúngico, discutido no tópico seguinte. Como a identificação por microcultivo não era um objetivo principal, é possível realizar a identificação criteriosa de todos os isolados com o auxílio de especialistas em outros projetos de pesquisa. Sendo também necessário a identificação molecular de cada isolado, que por falta de recursos não pode ser realizada no

presente projeto. As imagens referentes aos fungos isolados encontram-se na figura abaixo, Figura 41.

Figura 41. Fungos endofíticos isolados das folhas de *P. ruderale* coletadas no município de Florianópolis – SC.



Legenda: Os isolados são representados pelas letras de A até P, sendo subdivididos em frente (1) e verso (2) da colônia na placa de Petri.

As imagens referentes ao microcultivo de cada isolado são apresentadas abaixo (Figura 42). Sendo:

Figura 42. Aspectos macroscópicos e microscópicos dos fungos isolados das folhas de *P. ruderales*, cultivados em placas de Petri contendo ágar batata dextrose por 7 e 14 dias. Aumento de 40x no microscópio ótico.

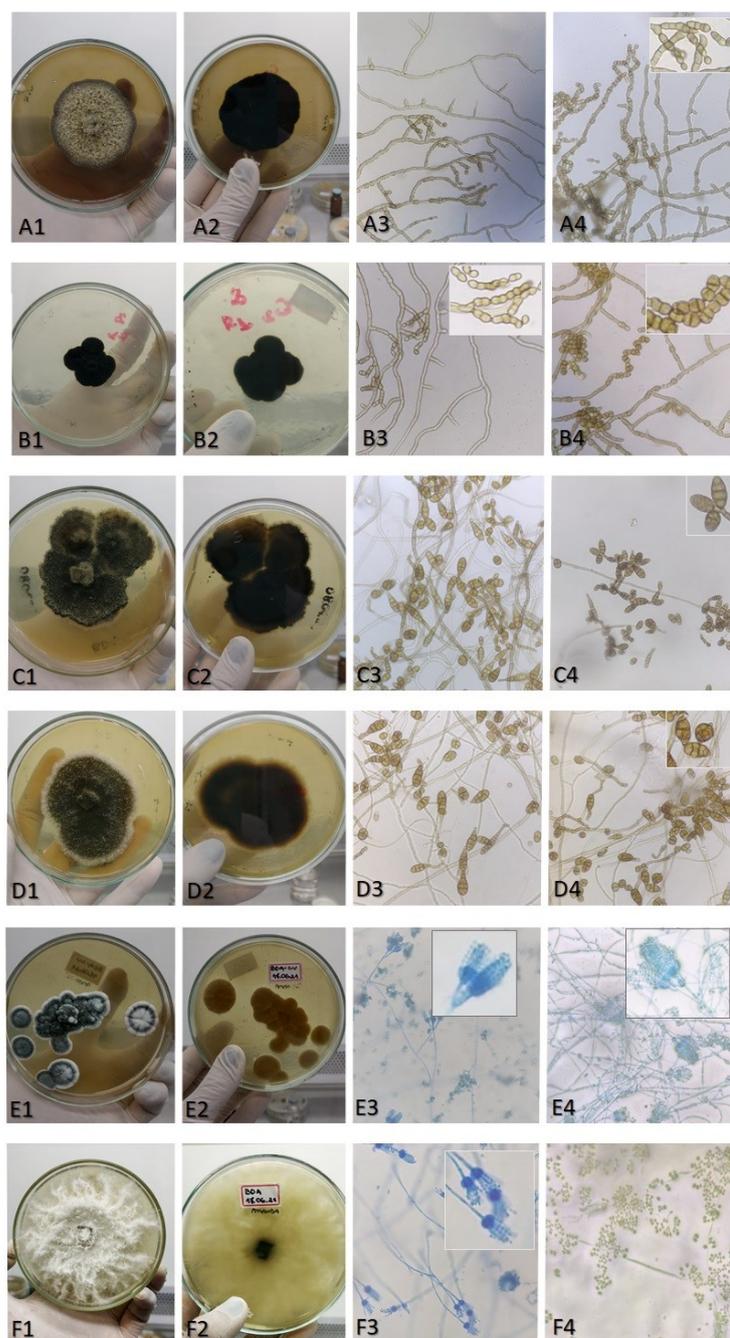


Figura 42. Aspectos macroscópicos e microscópicos dos fungos isolados das folhas de *P. ruderale*, cultivados em placas de Petri contendo ágar batata dextrose por 7 e 14 dias. Aumento de 40x no microscópio ótico (continuação)

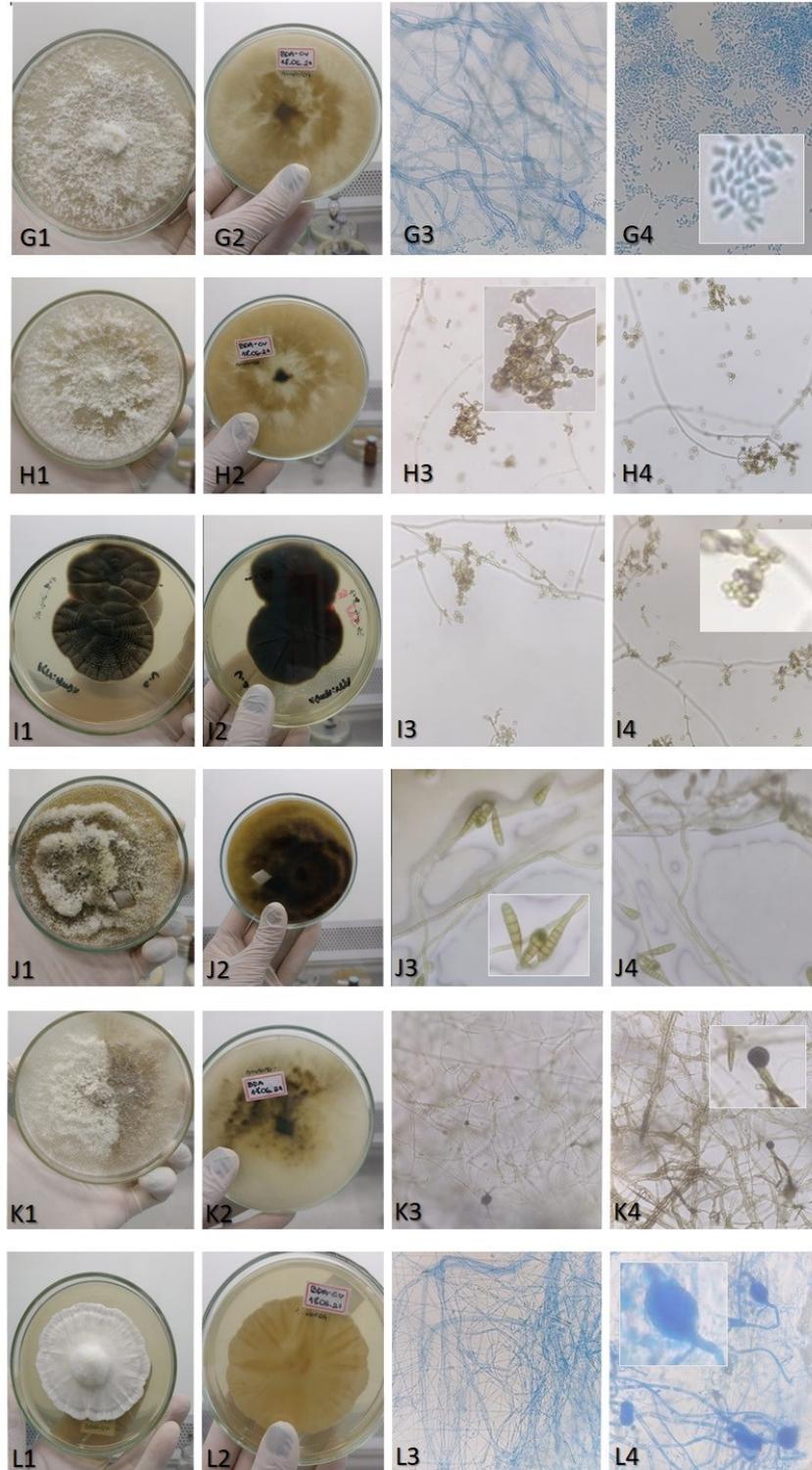
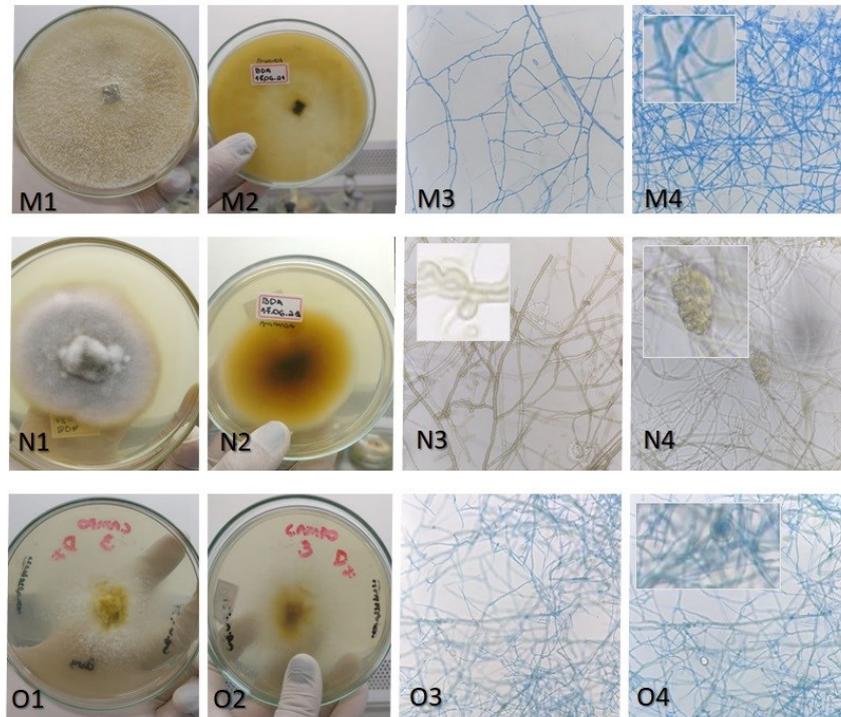


Figura 42. Aspectos macroscópicos e microscópicos dos fungos isolados das folhas de *P. ruderale*, cultivados em placas de Petri contendo ágar batata dextrose por 7 e 14 dias. Aumento de 40x no microscópio ótico (continuação).



Os fungos A e B (Figura 23) condizem com achados que indiquem sua identificação preliminar como *Cladosporium*. Achados da literatura revelam a presença deste fungo em inúmeras espécies vegetais, sendo citados como componente da microflora da semente (Goulart, 2005). Como características do gênero, destaca-se conídios escuros com até três septos, variáveis forma e tamanho, presença de cadeias ramificadas. Já os conidióforos são retos e ramificados, de coloração marrom, paredes espessas, regularmente septadas e geralmente ovoides (Goulart, 2005). Os achados são ilustrados por Segundo Goulart (2005) e Amirmijani *et al.* (2014) na Figura 43.

Figura 43. Imagens obtidas por Goulart (2005) e Amirmijani *et al.* (2014) apresentando os conídios referentes ao gênero *Cladosporium*.

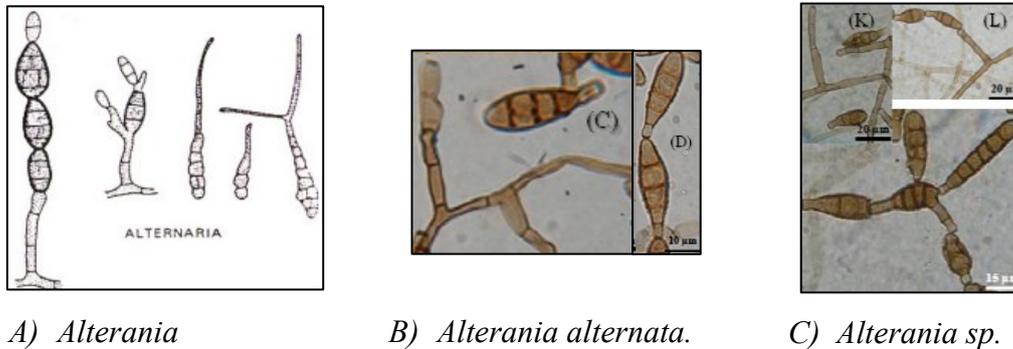


Fonte: Goulart (2005) e Amirmijani *et al.* (2014)

Através da técnica de microcultivo, as imagens observadas em C e D condizem com achados próximos ao gênero *Alternaria*. Segundo Goulart (2005) este gênero abrange parasitas fracos ou saprófitas, sendo a espécie mais encontrada a *A. alternata*. Esta caracteriza-se pela produção de conídios com formato de clava (ou pêra invertida), ovóide ou elipsoide. Podem formar cadeias com até 8 septos transversais. Barreto e colaboradores (2011) mencionam que estes achados também foram descritos para fungos isolados de sementes de *Dahlia pinnata* (Asteraceae), *Salvia farinácea* (Lamiaceae), *Salvia splendens* (Lamiaceae) e *Tagets patula* (Asteraceae) que causaram a morte das plantas.

Outra espécie comum ao gênero *Alternaria* é a *Alternaria* spp apresentando conidióforos lisos, septados, simples ou ramificados, retos ou flexuosos e marrom-claros. Conídios formados em cadeias, algumas vezes ramificadas, ovoides, marrom-claros a dourados, lisos, às vezes rugosos, com até 7 septos transversais e muitos septos longitudinais e oblíquos. Os achados descritos pelos autores foram realizados para os isolados de sementes de *Phlox drummondii* (Polimoneaceae) referindo como a causa da mancha foliar na espécie. Assim, Goulart (2005) descreve que espécies do gênero *Alternaria* são consideradas patógenos fraco por não causarem grandes danos às sementes de soja. Algumas imagens de *A. alternata* e *A. spp* são apresentadas a seguir (Figura 44).

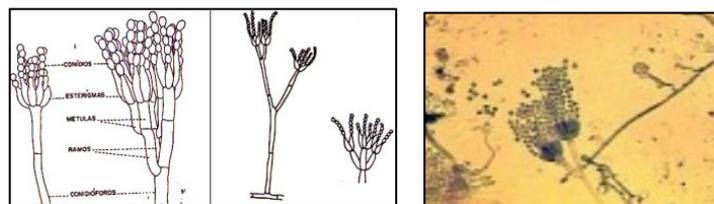
Figura 44. Imagens obtidas por Goulart (2005) e Barreto *et al.* (2011) apresentando os conídios referentes a espécies do gênero *Alternaria*.



Legenda: A) *Alternaria* spp.: conidióforos e conídios. B) *Alternaria alternata*, apresentando conidióforos cicatrizados e rugosidade do conídio. C) *Alternaria* sp., apresentando conídios em cadeia presos ao conidióforo e rugosidade dos conídios. Fonte: Goulart (2005) e Barreto *et al.* (2011).

Através da técnica de microcultivo, as imagens observadas em E e F condizem com achados próximos a *Penicillium*. Segundo Goulart (2005) os conidióforos são hialinos, geralmente eretos, terminando em fiálides que produzem conídios em cadeia, produzindo uma aparência de vassoura. Os conídios são unicelulares, esféricos, em geral com coloração verde ou azulada. O autor ainda relata que este gênero de fungo ocorre geralmente em semente de soja de baixa qualidade, sendo prejudicial em lotes de sementes armazenados com umidade elevada. As colônias desse fungo apresentam crescimento lento a moderado na superfície da semente, com extensa esporulação de coloração geralmente verde a azulada. Na figura a seguir (figura 45) são apresentadas as imagens de Goulart (2005) do fungo *Penicillium*.

Figura 45. Imagens obtidas por Goulart (2005) apresentando os conídios do fungo *Penicillium*.



Fonte: Goulart (2005)

Os demais fungos não foram identificados. Ressalta-se que as limitações deste estudo estão relacionadas ao número amostral, escassez de recursos financeiros para realizar a identificação molecular desses fungos e momento de pandemia.

5.4.1.3 Seleção dos fungos endofíticos isolados das folhas de *Porophyllum ruderale* (Jacq) Cass para avaliação do perfil químico

Avaliados cada um dos fungos pelo microcultivo, estes tiveram seu perfil químico analisado por CLUE-ESI-qTOF conforme descrito no Item 4.2.2 (Condições analíticas). A extração foi realizada utilizando o meio de cultura com o fungo e acrescentando acetato de etila como líquido extrator (macerado por 2h em banho de ultrassom). Após as análises, todos os cromatogramas foram avaliados quanto a complexidade química, potenciais substâncias de interesse e novas moléculas (utilizando as bases de dados Reaxys e Scifinder). Feita essa triagem inicial, foram escolhidos dois fungos endofíticos para dar continuidade ao presente trabalho. Estes foram então enviados para identificação molecular. Nas Figuras abaixo (46 e 47) encontram-se o perfil químico dos dois fungos de interesse. Posteriormente identificados como *Diaporthe paranensis* e *Penicillium* sp.

Figura 46. Perfil químico do fungo *Penicillium* sp. no modo positivo de análise (ESI+) em 14 dias de cultivo em meio de cultura BDA.

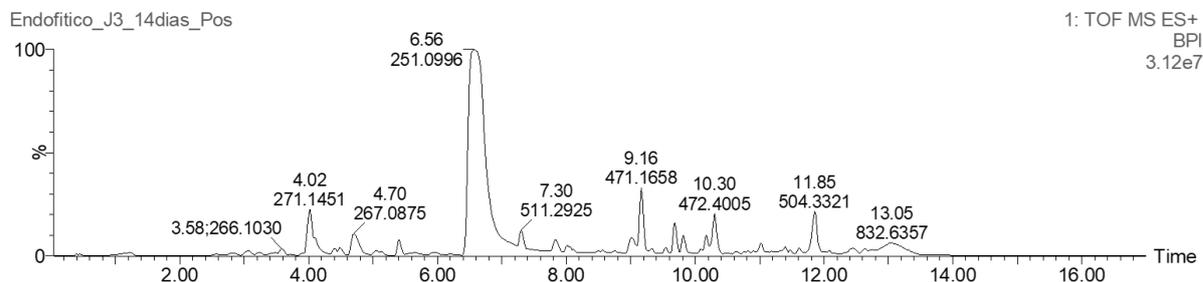
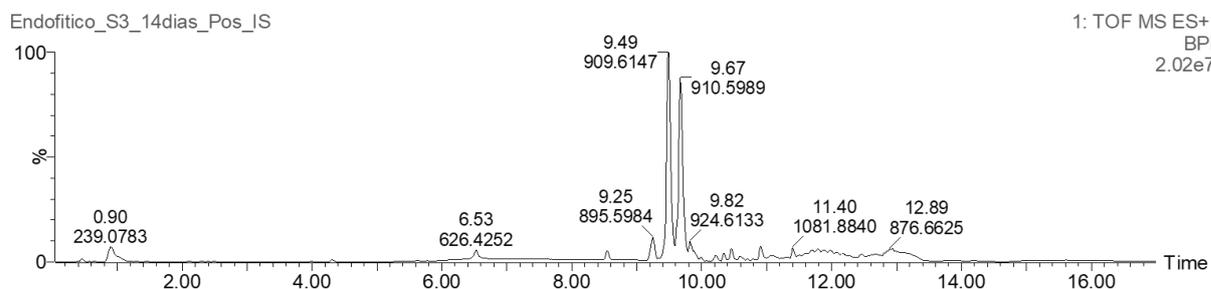


Figura 47. Perfil químico do fungo *D. paranensis* no modo positivo de análise (ESI+) em 14 dias de cultivo em meio de cultura BDA.



Após extensa revisão de literatura para *Penicillium* SP (Figura 46) sugere-se a presença da isocumarina diaportina ou a substância citrinina para *Penicillium* sp. com m/z 251 e tempo de retenção de 6,56 min. Segundo Cai e colaboradores (2018), a substância diaportina está associada a potenciais aplicações antimicrobianas contra *Mycobacterium tuberculosis*.

Para *D. paranensis* (Figura 47) sugere-se que as substâncias de maior intensidade no cromatograma referem-se a peptídeos com m/z 909, 910, 895, 896. Estas substâncias não foram encontradas em bases de dados, possivelmente sendo substâncias nunca descritas.

Devido à complexidade das estruturas dos peptídeos optou-se por trabalhar apenas com essas substâncias e assim o fungo *Penicillium* sp foi direcionado para trabalhos de iniciação científica já iniciados em nosso grupo de pesquisas, incluindo a identificação da substância utilizando espectrometria de massas (EM/EM) e futuro isolamento e avaliação por ressonância magnética nuclear (RMN).

Vale ressaltar que a família Diaporthaceae (representada no presente trabalho por 0,21 % das leituras realizadas ao total de fungos nas análises de microbioma, Ver Item 5.3), tem sido

investigada pela química de produtos naturais e demonstrou produzir uma variedade de metabólitos únicos de baixo peso molecular com diferentes atividades biológicas como: antibacteriano, anticancerígeno, antifúngico, antimalárico, antiviral, citotóxico e herbicida (GOMES *et al.* 2013). Segundo Chepkirui e Stadler (2017), *Diaporthe sp.* são conhecidos por causar doenças em uma ampla gama de plantas hospedeiras, alguns dos quais são economicamente importantes em todo o mundo, causando decomposição de raízes e frutos, morte, cancos e manchas nas folhas. Como exemplo, *D. ampelina* é uma das espécies patogênicas conhecida como mancha foliar levando a perdas de rendimento de uvas em regiões temperadas. *D. phaseolorum* e *D. longicolla* são patogênicos à soja. Algumas espécies deste gênero também foram relatadas como patógenos de humanos e outros mamíferos, porém esses casos são raros e muitas vezes devido a infecções oportunistas de pacientes gravemente imunocomprometidos, não há evidências de que *Diaporthe* e seu estágio assexuado estão entre os patógenos humanos graves (CHEPKIRUI; STADLER, 2017).

Ainda é válido citar a presença de peptídeos, que são uma classe de compostos de interesse nos últimos anos, devido às suas diversas aplicações nos setores agrícola e farmacêutico incluindo pesquisas para inibição de proteases do SARS-CoV-2 (PANT *et al.*, 2020). No trabalho realizado por Pant *et al.* (2020) os autores avaliaram mais de trezentas estruturas cristalinas por docking incluindo peptídeos e pequenas moléculas que atuassem na ligação com a principal protease do SARS-CoV-2, sendo um possível alvo para o desenvolvimento de medicamentos. Contudo não foram encontrados artigos mais recentes que reforçassem esta pesquisa (CHEPKIRUI; STADLER, 2017). Os autores sugerem a necessidade de mais investigações sobre indivíduos fúngicos pertencentes a esta família, sendo potenciais fontes de metabólitos secundários.

No tópico seguinte serão apresentados os dados referentes a proposta de sequências de aminoácidos para os peptídeos encontrados em *D. paranensis*, utilizando UPLC-ESI-qTOF. O laudo de identificação molecular dos fungos encontram-se abaixo, Figuras 48 e 49.

Figura 48. Laudo de Identificação molecular de *Diaporthe paranensis* pela empresa GoGenetic.

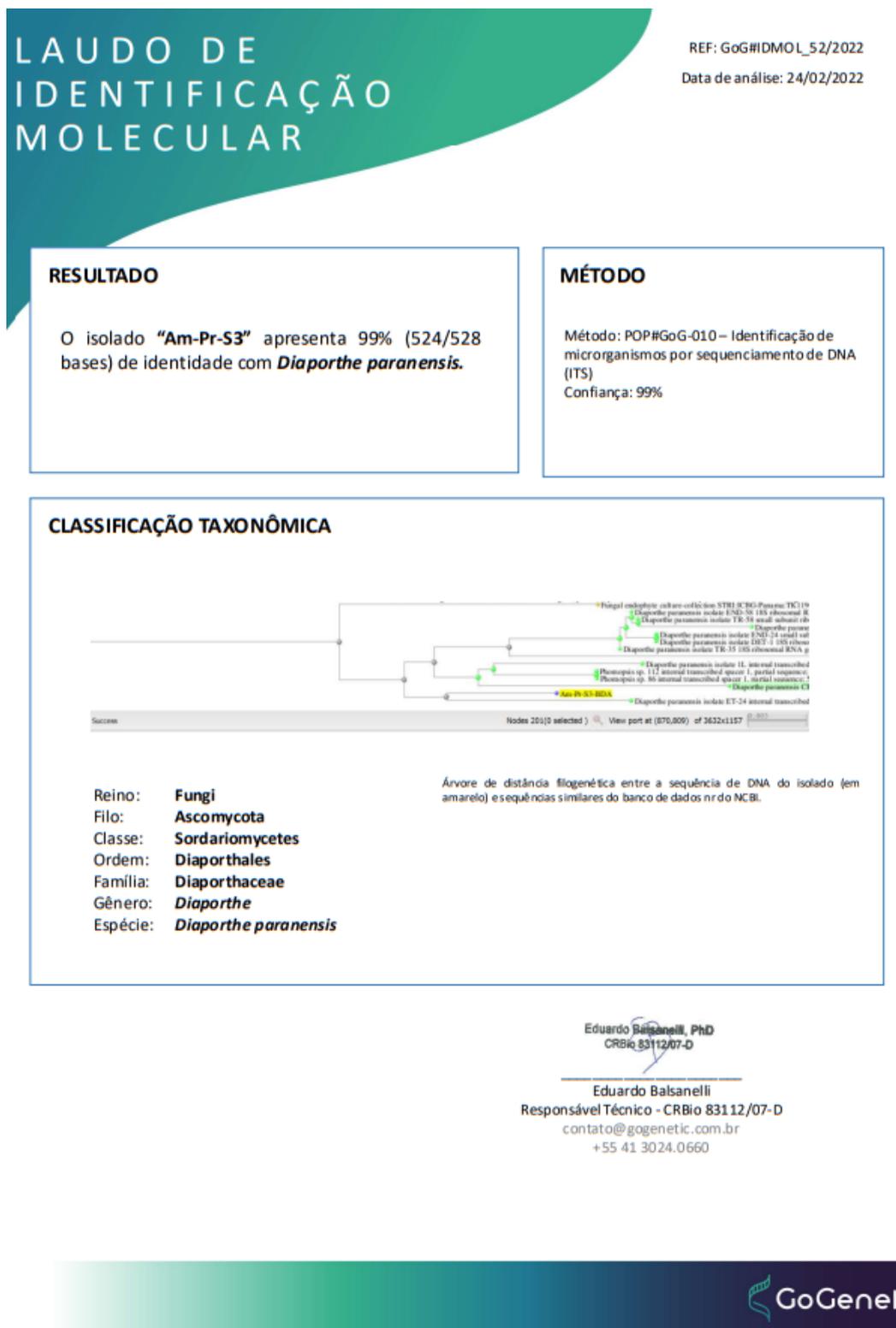


Figura 49. Laudo de Identificação molecular de *Penicillium sp.* pela empresaGoGenetic.

LAUDO DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

REF: GoG#IDMOL_51/2022
Data de análise: 24/02/2022

RESULTADO

O isolado "Am-Pr-J3" apresenta 99% (514/515 bases) de identidade com *Penicillium sp.*

MÉTODO

Método: POP#GoG-010 – Identificação de microrganismos por sequenciamento de DNA (ITS)
Confiança: 99%

CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA

Reino: Fungi
Filo: Ascomycota
Classe: Eurotiomycetes
Ordem: Eurotiales
Família: Aspergillaceae
Gênero: *Penicillium*
Espécie: *Penicillium sp*

Árvore de distância filogenética entre a sequência de DNA do isolado (em amarelo) e sequências similares do banco de dados nr do NCBI.

Eduardo Balsanelli, PhD
CRBio 83112/07-D

Eduardo Balsanelli
Responsável Técnico - CRBio 83112/07-D
contato@gogenetic.com.br
+55 41 3024.0660



5.5 INVESTIGAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DO FUNGO ENDOFITICO *Diaporthe paranensis*.

O isolado foi identificado pela empresa GoGenetic pela região ITS do DNS fúngico, apresentando 99% (524/528 bases) de identidade com *Diaporthe paranensis* (Figura 48). Para avaliação do perfil químico de *D. paranensis* por CL-EM, foram realizadas três extrações distintas nos tempos de 7, 14 e 21 dias a fim de avaliar em qual tempo de cultivo o fungo produziria maior quantidade de metabólitos de interesse (Figura 50 e 51).

Figura 50. Perfil químico do fungo *D. paranensis*, ESI+. Sendo A) 7 dias de cultivo e B) 14 dias de cultivo em meio de cultura BDA.

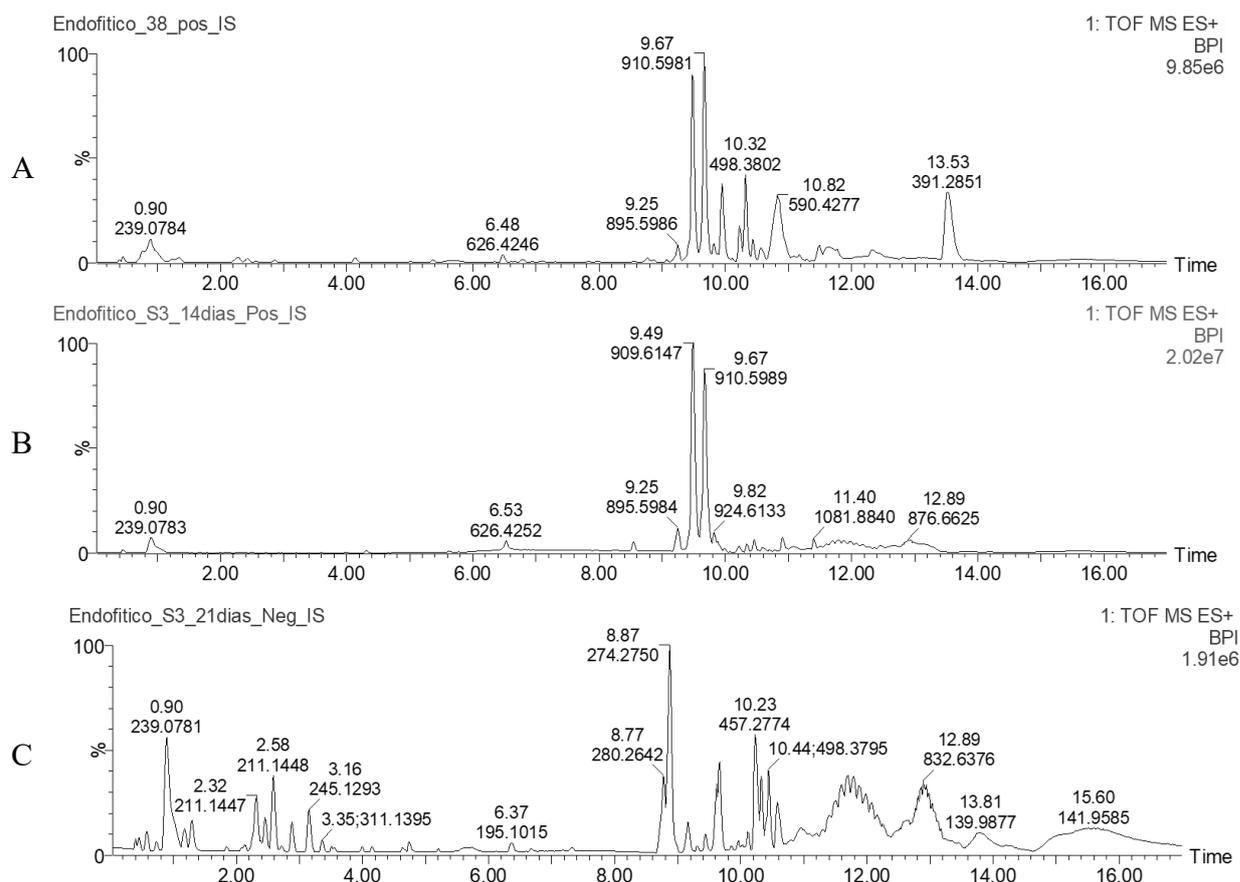
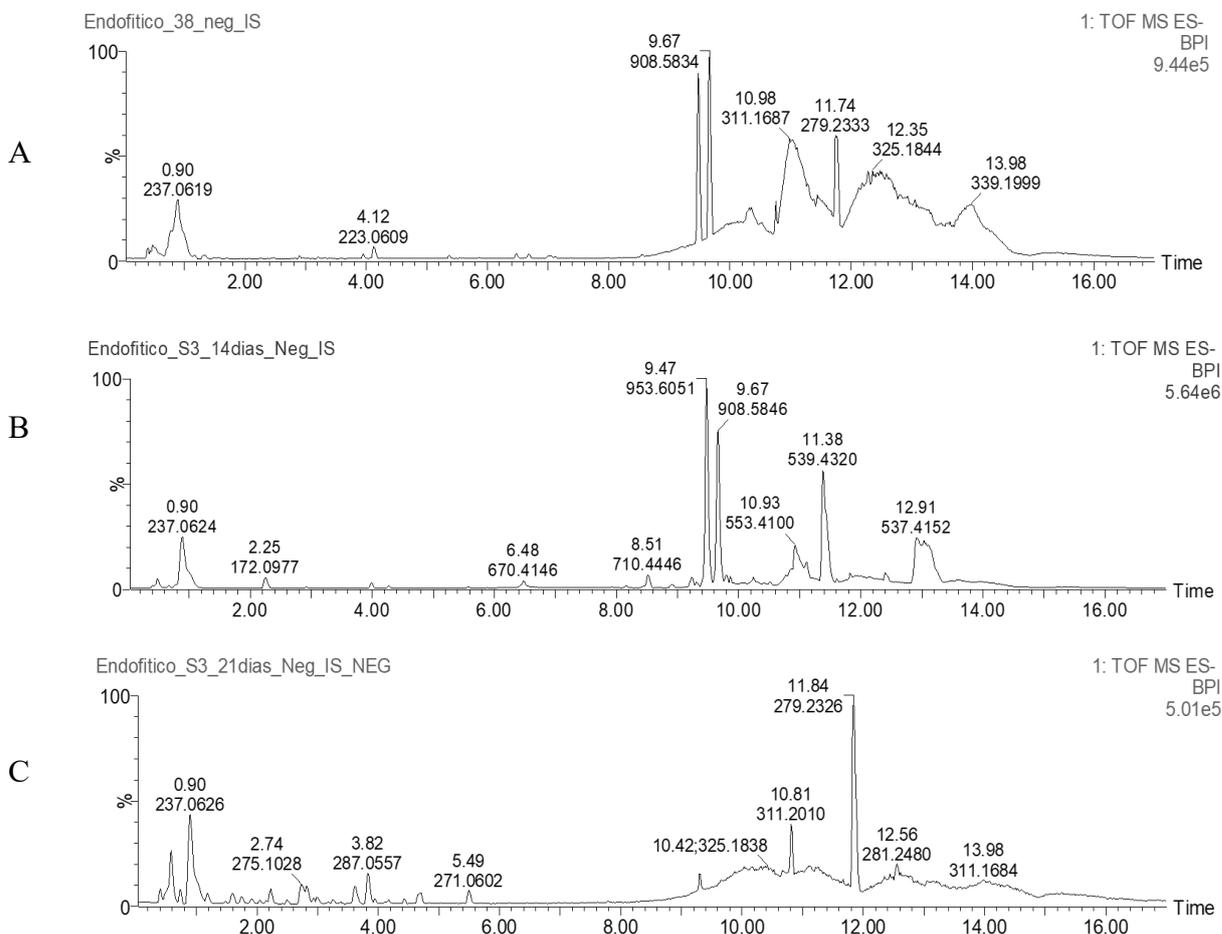


Figura 51. Perfil químico do fungo *D. paranensis*, ESI-. Sendo A) 7 dias de cultivo e B) 14 dias de cultivo em meio de cultura BDA.

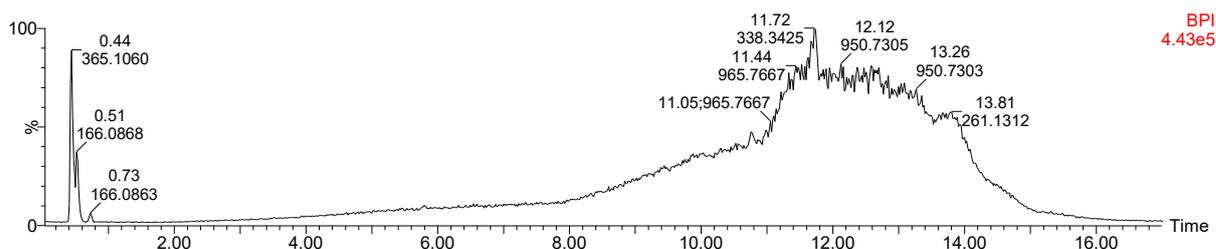


A partir dos cromatogramas observou-se predomínio dos picos com as massas m/z 895, 896, 909 e 910 nos tempos de 7 e 14 dias. A partir desta informação foram realizadas diversas buscas na literatura (utilizando as bases de dados Reaxys, Science Finder e Chemnetbase) para cada proposta de composição elementar fornecida pelo software MassLynx®, considerando o erro de massa calculada inferior a 5ppm.

Dando continuidade à investigação química do fungo optou-se por utilizar como tempo de crescimento fúngico ideal o tempo de 14 dias, visto que neste tempo foram detectados picos mais intensos referentes as substâncias de interesse. Para desconsiderar a possibilidade destas substâncias serem da composição do meio de cultura foi feito um extrato utilizando apenas o

meio de cultura nas mesmas condições dos extratos fúngicos. O cromatograma do meio de cultura encontra-se na Figura 52, abaixo.

Figura 52. Cromatograma obtido a partir de extrato do meio de cultura preparado nas mesmas condições das amostras do extrato fúngico. ESI+.



As massas de interesse foram selecionadas e fragmentadas por EM/EM para obtenção do perfil de fragmentação de cada substância. Na tabela abaixo (Tabela 4) são apresentados os valores de massa selecionados, tempo de retenção, composição elementar, erro e perfil de fragmentação.

Tabela 7. Fragmentos obtidos por análise de EM/EM por UPLC-ESI-QToF.

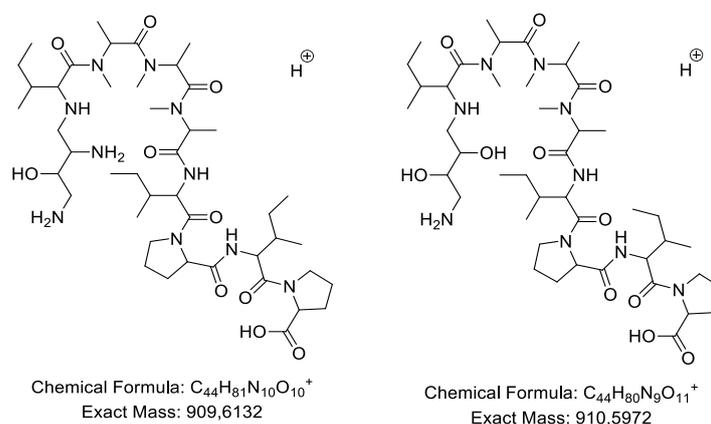
T_R (min)	m/z [M+H] ⁺	Fórmula molecular	Erro (ppm)	Fragmentos (EM/EM)
9,28	895,5977	C ₄₃ H ₇₈ N ₉ O ₁₁	-4,6	793,5182; 680,4340; 595,3814; 524,3444, 439,2924; 312,1918
9,46	896,5842	C ₄₃ H ₇₈ N ₁₀ O ₁₀	-2,0	793,5182; 680,4340; 595,3814; 524,3444, 439,2924; 312,1918
9,51	909,6194	C ₄₄ H ₈₀ N ₉ O ₁₁	-3,0	807,5342; 694,4504; 609,39; 524,3443; 439,2924; 326,2083
9,68	910,6055	C ₄₄ H ₈₁ N ₁₀ O ₁₀	-2,6	807,5342; 694,4504; 609,39; 524,3443; 439,2924; 326,2083

Através dos fragmentos obtidos por EM/EM utilizando a energia de fragmentação de 30eV, foram observados alguns padrões de fragmentação, com perdas sequenciais de aminoácidos. Através da junção dos fragmentos foi possível propor uma estrutura para as substâncias com m/z 909, 910, 895 e 896.

Para as estruturas m/z 910 e 909 observou-se o padrão de aminoácidos composto por prolina-isoleucina-prolina-isoleucina-N-metil-alanina-N-metil-alanina-N-metil-alanina-isoleucina com porção terminal referente a amino hidroxí putrescina para m/z 909 e amino dihidroxí putrescina para m/z 910. Assim os dois peptídeos apresentaram diferenças apenas na cadeia final.

Ressalta-se ainda que existem possíveis combinações entre os aminoácidos isoleucina (ISOL) e leucina (LEU) que apresentam a mesma massa e fórmula molecular, sendo necessário a utilização de outras técnicas (como a utilização de colunas quirais) para estabelecer qual seria o aminoácido na sequência do peptídeo. Segundo avaliações de probabilidade, existem mais de 26 posições em que poderiam constar os aminoácidos leucina e isoleucina nas presentes estruturas. As propostas de estruturas para as substâncias m/z 910 e 909 são apresentadas a seguir, Figura 53.

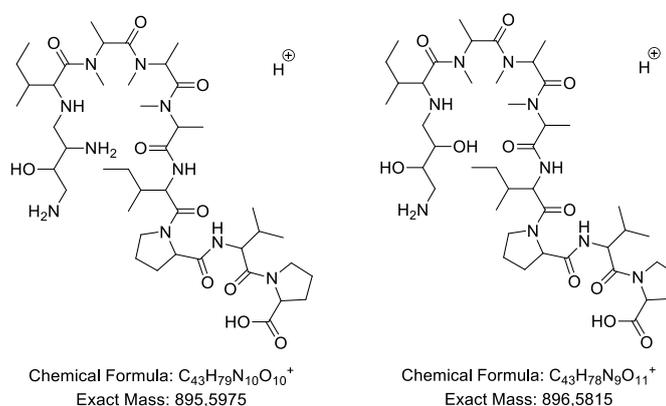
Figura 53. Propostas de estruturas para as substâncias m/z 910 e 909.



Para as substâncias com m/z 895 e 896 observou-se o padrão de aminoácidos composto por prolina-valina-prolina-isoleucina-N-metil-alanina-N-metil-alanina-N-metil-alanina-isoleucina com porção terminal referente a amino hidroxí putrescina para m/z 895 e amino dihidroxí putrescina para m/z 896. Seguindo o padrão de fragmentos das moléculas anteriores, as

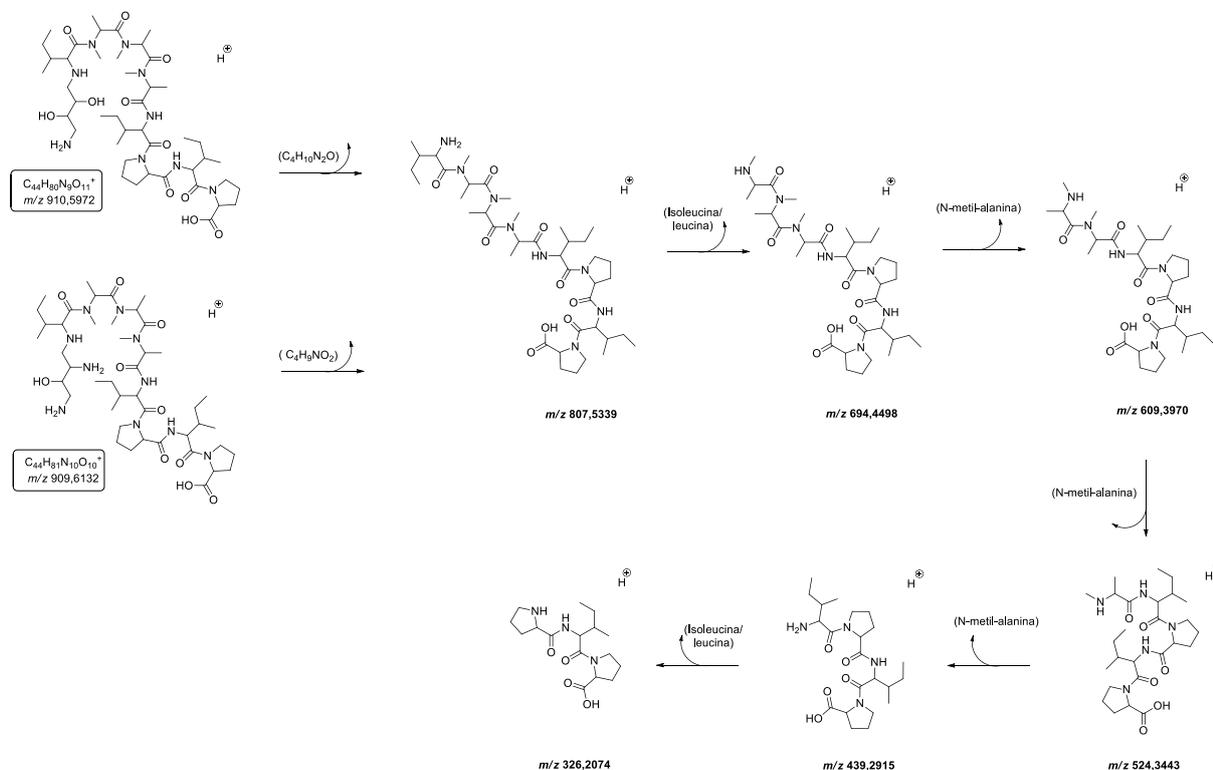
estruturas m/z 895 e 896. Ressalta-se também a possibilidade de possíveis combinações entre os aminoácidos isoleucina (ISOL) e leucina (LEU) que apresentam a mesma massa e fórmula molecular, sendo necessário a utilização de outras técnicas (como a utilização de colunas quirais) para estabelecer qual seria o aminoácido na sequência do peptídeo. As propostas de estruturas para as substâncias m/z 895 e 896 são apresentadas a seguir, Figura 54.

Figura 54. Propostas de estruturas para as substâncias m/z 895 e 896.



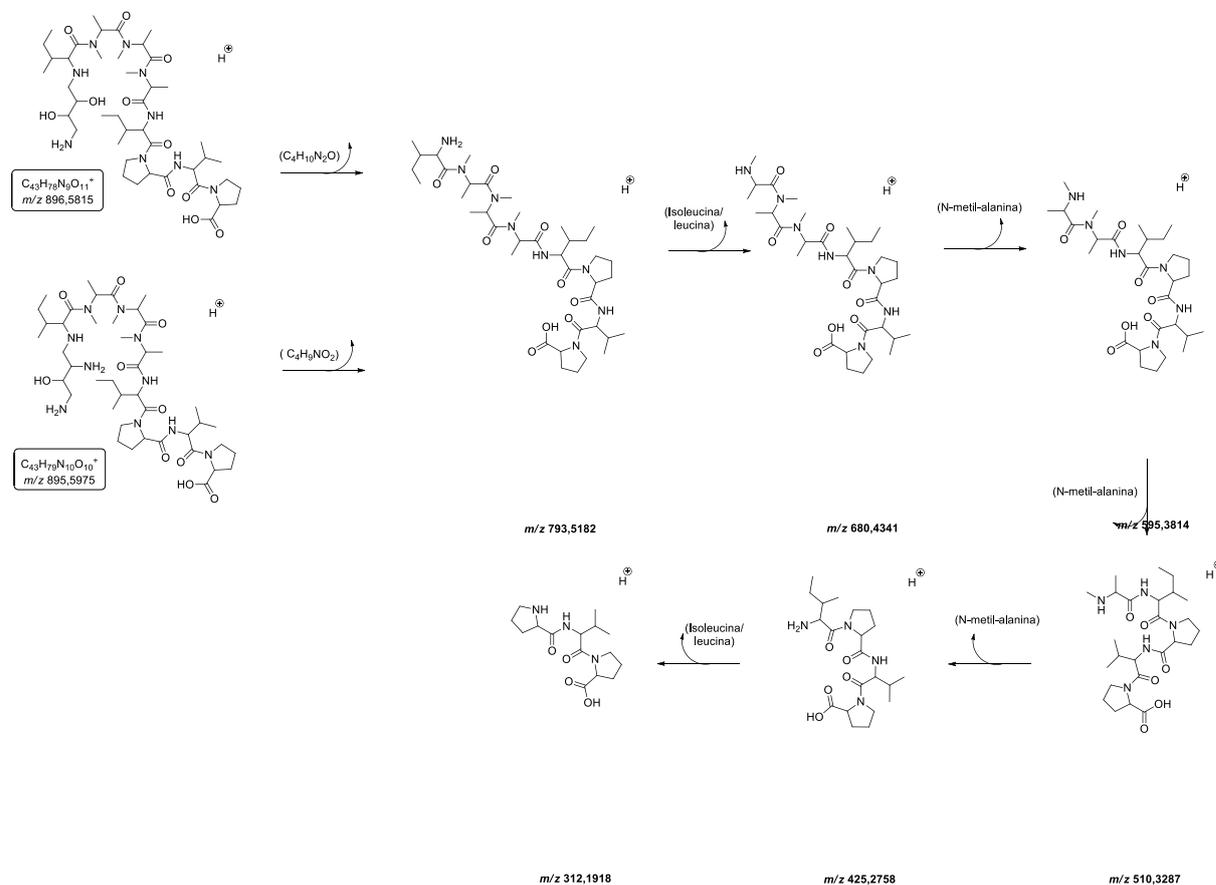
Como proposta de fragmentação dos peptídeos sugere-se que os íons com m/z 895,5977 (T_R : 9,28 min $[C_{43}H_{78}N_9O_{11}H]^+$), 896,5842 (T_R : 9,46 min, $[C_{43}H_{78}N_{10}O_{11}H]^+$), m/z 909,6194 (T_R : 9,51 min $[C_{44}H_{80}N_9O_{11}H]^+$) e 910,6055 (T_R : 9,68 min, $[C_{44}H_{81}N_{10}O_{10}H]^+$) apresentaram características de fragmentação semelhantes. Para os íons 909 e 910 os seguintes fragmentos foram observados: m/z 807,5342 referente a perda da hidroxí putrescina e dihidroxí putrescina, com as perdas de $C_4H_9NO_2$ e $C_4H_{10}N_2O$ respectivamente, o que justifica a diferença de 1 Da na massa molecular das substâncias. Na sequência, o fragmento m/z 694,4504 se justifica pela perda da leucina ou isoleucina. O fragmento m/z 609,3979 com perda do aminoácido N-metil alanina. Fragmento m/z 524,3443 formado pela perda de mais um aminoácido N-metil alanina. Fragmento m/z 439,2924 formado pela perda de N-metil alanina e por fim a perda de uma isoleucina ou leucina originando o fragmento m/z 326,2083. A proposta de fragmentação para as substâncias m/z 909 e 910 encontra-se a seguir na Figura 55.

Figura 55. Proposta de fragmentação para os íons m/z 909 e 910, no modo de ionização positivo.



Para os íons m/z 895 e 896 os seguintes fragmentos foram observados: m/z 793,5182 referente a perda da hidroximetil putrescina e dihidroximetil putrescina (perdas de $C_4H_9NO_2$ e $C_4H_{10}N_2O$) respectivamente, o que também justifica a diferença de 1 Da na massa molecular das substâncias. Na sequência, o fragmento m/z 680,4340 se justifica pela perda da leucina ou isoleucina. O fragmento m/z 595,3814 com perda do aminoácido *N*-metil alanina. O fragmento m/z 524,3444 com perda do aminoácido *N*-metil alanina. O fragmento m/z 439,2924 com perda do aminoácido *N*-metil alanina e na sequência a perda da isoleucina/isoleucina. Por fim o fragmento m/z 312,1918 originado pela perda de valina. A proposta de fragmentação para as substâncias m/z 895 e 896 encontra-se a seguir na Figura 56.

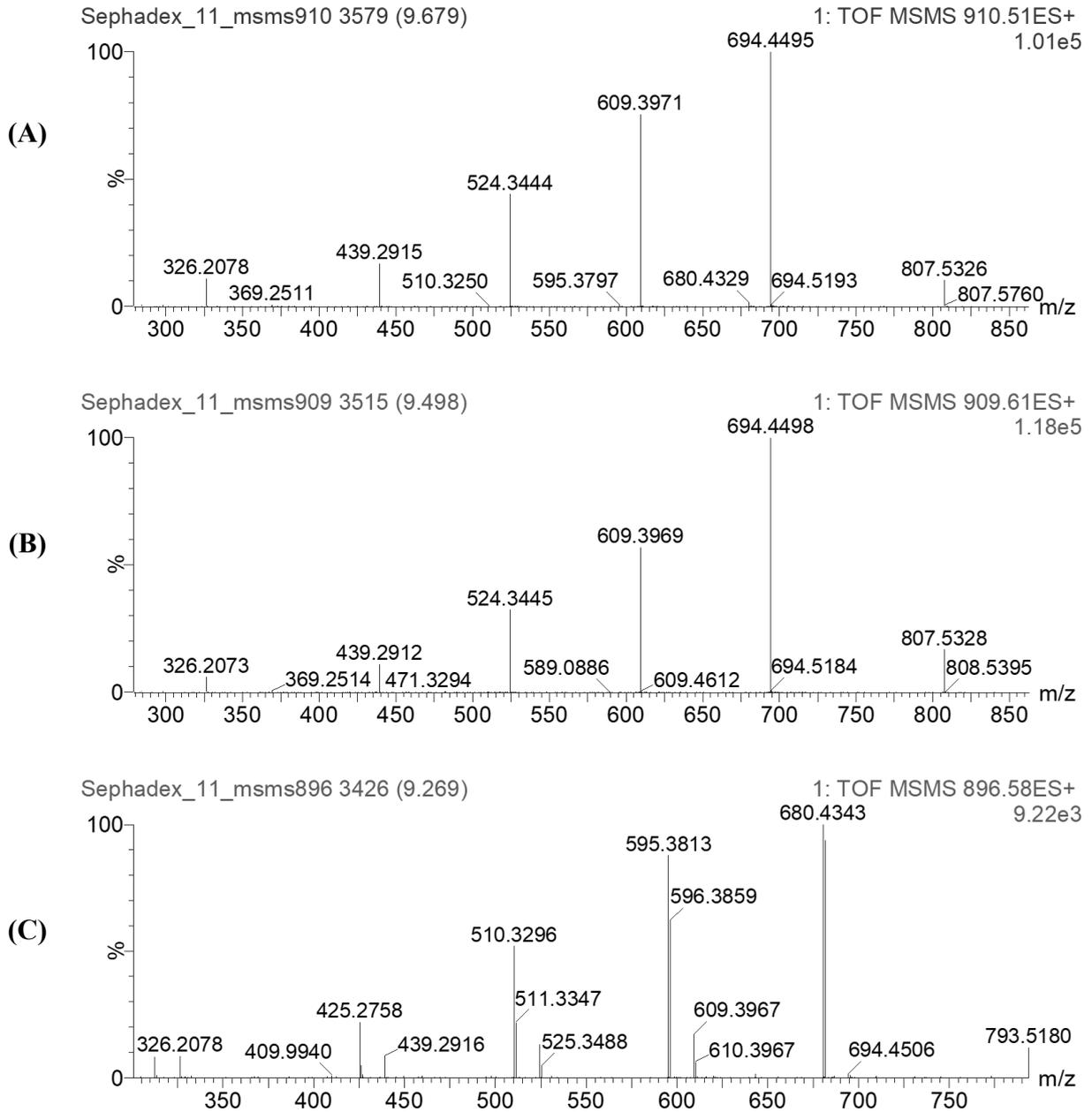
Figura 56. Proposta de fragmentação para os íons m/z 895 e 896, no modo de ionização positivo.

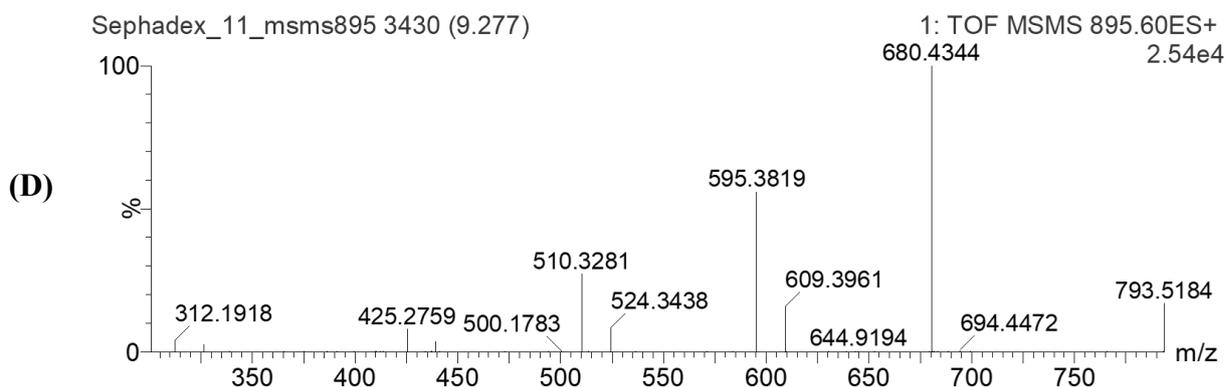


A putrescina é uma poliamina encontrada em praticamente todos os organismos, estando envolvida em um grande número de processos do desenvolvimento vegetal. As poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) podem ser encontradas livres ou conjugadas com ácidos fenólicos, compostos de baixo peso molecular ou macromoléculas (proteínas e ácidos nucleicos). Sua biossíntese compreende vias semelhantes em bactérias, animais e plantas sendo sintetizadas a partir dos aminoácidos arginina e ornitina. Posteriormente esses aminoácidos sofrem a ação das enzimas arginina descarboxilase e ornitina descarboxilase, respectivamente, gerando a putrescina (MC LEOD, 2017).

O espectro de massas (MS^2) obtido para cada uma das substâncias m/z 909, 910, 896 e 895 encontram-se a seguir na Figura 57.

Figura 57. EM² das substâncias *m/z* 909 (A), 910 (B), 896 (C) e 895 (D).





Por fim, no tópico a seguir será apresentada uma proposta pra purificação dos peptídeos utilizando a técnica de Cromatografia de Partição Centrifuga (CPC). E os rendimentos obtidos.

5.6 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA DE PARTIÇÃO CENTRIFUGA (CPC) PARA PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS OBTIDOS DE *D. paraenses*.

5.6.1 Rendimento dos extratos

A partir das informações obtidas foi realizada uma nova extração do fungo *D. paraenses* e desta vez em maior escala (871 g de meio sólido + fungo). Os rendimentos são descritos na Tabela 8.

Tabela 8. Rendimentos obtidos dos extratos do fungo *D. paranensis*.

Cultivo	Massa total de fungo + meio de cultura	Total de extrato bruto obtido	Rendimento (%)
Primeiro cultivo			
1ª extração	871	0,54mg	0,06%
2ª extração	871g	0,19mg	0,02%

Segundo cultivo

1ª extração	625g	0,42mg	0,07%
2ª extração	625g	0,07mg	0,01%

Os cromatogramas obtidos de cada extração encontram-se abaixo (Figuras 58 a 60). Observa-se que a extração do primeiro cultivo apresentou um perfil diferente de metabólitos extraídos.

Figura 58. Primeira extração utilizando acetato de etila. ESI+.

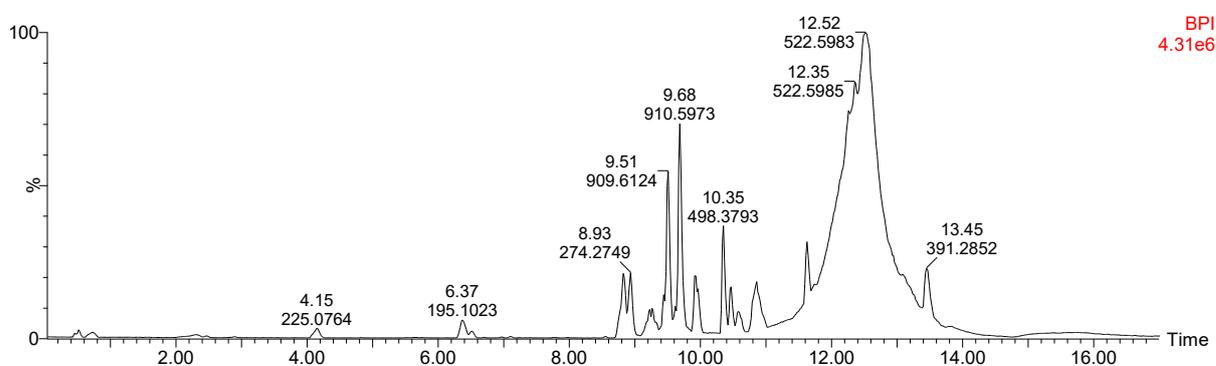
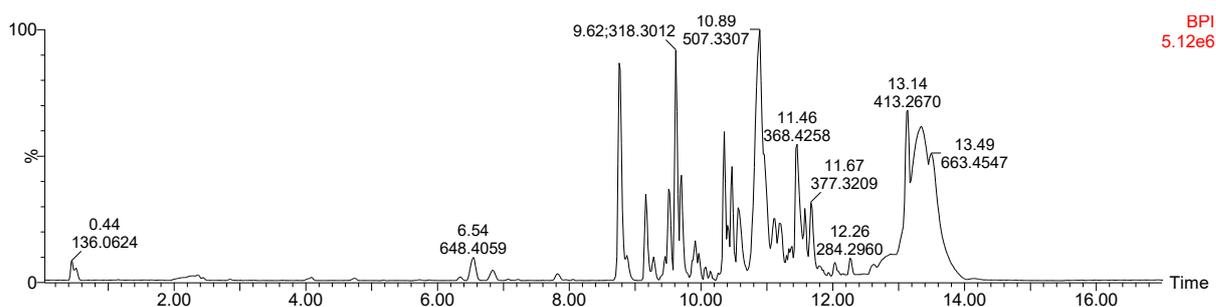


Figura 59. Segunda extração utilizando acetato de etila ESI +.



5.6.2 Purificação de metabólitos fúngicos utilizando Cromatografia de Partição Centrifuga (CPC)

Para purificação do extrato e tentativa de obter uma separação dos peptídeos, foi utilizada a CPC. Para esta técnica foi selecionado o sistema ARIZONA N, o qual mostrou uma distribuição equilibrada das substâncias de interesse entre as fases superior e inferior. Na tabela abaixo apresenta-se os resultados do teste do K_D para as substâncias com m/z 895, 896, 909 e 910 nos sistemas Ascendente e Descendente, respectivamente.

Tabela 9. Valores de área e K_D obtidos para o sistema ARIZONA N para o modo Ascendente

<i>m/z</i>	895,5977	896,5842	909,6194	910,6055
SUP	14769,9000	112135,1	147299,8	41074,7
INF	14969,8000	91975,7	94240,4	15211,1
K_D	1,0135343	0,820222	0,639786	0,370328

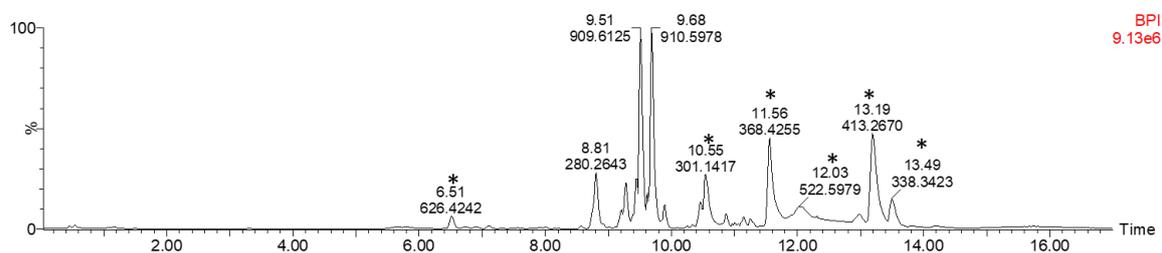
Tabela 10. Valores de área e K_D obtidos para o sistema ARIZONA N para o modo Descendente

<i>m/z</i>	895,5977	896,5842	909,6194	910,6055
SUP	14769,9000	112135,1	147299,8	41074,7
INF	14969,8000	91975,7	94240,4	15211,1
K_D	0,986646448	1,219182	1,563022	2,700311

Assim, foi escolhido o sistema Descendente (fase inferior é a fase móvel) para realizar a separação por CPC com as condições propostas no sistema N.

Avaliando o perfil químico das 92 frações obtidas por CPC, foi notado que na fração 8 (8mg) constavam os quatro peptídeos juntos, não havendo separação destes. Isto se justifica pela proximidade estrutural das substâncias que mesmo com diferentes K_D estas ainda apresentam um coeficiente de partição muito semelhante, sendo possível apenas obter (pela presente técnica) uma fração enriquecida com os peptídeos. Obteve-se o seguinte perfil cromatográfico para a fração 8, Figura 60.

Figura 60. Cromatograma obtido da fração 8 do sistema de CPC, ARIZONA N.



Legenda: Os picos assinalados com * são impurezas contidas no branco (impurezas do solvente utilizado nas análises).

O método proposto por CPC apresenta-se eficiente para obtenção de uma fração enriquecida de peptídeos, contudo estas substâncias encontram-se em pequenas quantidades no extrato. Em nosso trabalho infelizmente não foram observados sinais característicos de peptídeos no extrato bruto quando avaliados por RMN de 300 MHz para completa elucidação estrutural.

Por fim, ressalta-se que a técnica de CPC oferece numerosos benefícios para a purificação de misturas complexas em apenas uma etapa. Devido à não utilização de fases sólidas como as colunas tradicionais de sílica ou os cartuchos usados no HPLC preparativo (ou MPLC) ou outras técnicas cromatográficas. Para o CPC podem ser utilizados diversos solventes para criar o sistema de separação de acordo com o composto alvo ou nível de purificação desejada para obter frações enriquecidas ou altamente purificadas.

6 CONCLUSÕES

- Utilizando a técnica de CLUE-ESI-QToF-EMⁿ, foi possível caracterizar 36 substâncias incluindo ácidos fenólicos, derivados diterpeno aminoglicosídeos, ácidos graxos e derivados de clorofila. Desse total, 21 substâncias (diterpenos aminoglicosídeos) foram descritas pela primeira vez em *Porophyllum ruderale*. Contudo não foi possível obter quantidades suficientes dessas substâncias para elucidação estrutural completa por RMN.
- As análises de principais componentes e de agrupamento permitiram a comparação entre plantas coletadas no campo e cultivadas em 8 grupos bem definidos.
- A análise do microbioma das folhas de *P. ruderale* coletadas próximo à praia demonstrou que o filo dominante foi Ascomycota (85%), seguido de Basidiomycota (7%). Os gêneros mais abundantes foram *Fusarium* (representando 9,3 % das sequencias lidas), *Alternaria* (6,7 %), *Saccharomyces* (4,1 %), *Mortierella* (3%) e *Pestalotiopsis* (1,9%).
- A extração dos fungos endófitos das folhas de *P. ruderale* proporcionaram 25 isolados e destes foi selecionado o fungo *Diaporthe paranensis* para investigação de seu perfil químico (identificado por biologia molecular pela empresa GoGenetic).
- Utilizando a técnica de CPC (Sistema Arizona N) foi possível obter uma fração enriquecida dos peptídeos: prolina-isoleucina/leucina-prolina-isoleucina/isoleucina-N-metil-alanina-N-metil-alanina-N-metil-alanina-isoleucina/leucina-putrescina/dihidroxi-putrescina e prolina-valina-prolina-isoleucina/leucina-N-metil-alanina-N-metil-alanina-N-metil-alanina-isoleucina/isoleucina-putrescina/dihidroxi-putrescina descritos pela primeira vez para *D. paranensis*, porém apresentando baixo rendimento
- De forma geral, entre os diversos compostos que foram revisados no decorrer do presente estudo, não detectamos nenhuma substância que foi simultaneamente detectada nos endofíticos isolados e na respectiva planta hospedeira. Não foram detectados derivados de tiofenos, ao contrário do publicado anteriormente para esta espécie.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Em parceria com a universidade de Wake Forest, Scholl of medicine (Carolina do Norte - Estados Unidos) sob supervisão do Professor Dr. Allen Tsang, estão sendo realizados testes de atividade anticâncer para os extratos fúngicos obtidos no presente estudo. Segundo feedback do professor Allen, o extrato de acetato de etila de *Diaporthe brasiliensis* e *Penicillium* sp. apresentaram resultados promissores (dados não apresentados nesta tese).

Para melhor explorar do extrato obtido de *D. brasiliensis*, os resultados de atividade biológicas somados a proposta de isolamento dos peptídeos serão utilizados para submissão de futuros projetos pelo professor Louis P. Sandjo, responsável pelo Laboratório de química de produtos naturais (LQPN), do Programa de pós graduação em Química – UFSC e coorientador da presente tese. Ainda, novas publicações estão em vias de escrita.

Ressalta-se que já foram obtidas maiores quantidades de extratos brutos de *D. paranensis*, com sucessivas extrações utilizando acetato de etila e posterior extração com metanol e clorofórmio (1:1 v/v). Foram cultivadas 196 placas de fungos em meio sólido BDA e 2L em meio líquido (batata dextrose) para ser utilizados em futuras pesquisas. Cepas deste fungo encontram-se em estoque em freezer -80°C acondicionadas em soluções crioprotetoras.

Para os extratos de *Penicillium* sp., estes encontram-se em fase de isolamento dos constituintes majoritários utilizando HPLC preparativo em projeto de iniciação científica, possivelmente novas tentativas de isolamento utilizando CPC serão propostas.

Até o presente momento foram escritos dois manuscritos incluindo o *Porophyllum ruderalee* sua comparação e caracterização por CL-EM.

REFERÊNCIAS

- ALAM, B. L. *et al.* Endophytic Fungi: From Symbiosis to Secondary Metabolite Communications or Vice Versa. **Frontiers of Plant Science**, [S.L.], v. 12, p.791. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2021.791033>.
- AMIRMIJANI, A. *et al.* Contribution to the identification of Cladosporium species in the North of Iran. **Rostaniha**, [s. l], v. 15, n. 2, p. 133-145, 2014.
- ARIAS-RICO, J. *et al.* Study of Edible Plants: effects of boiling on nutritional, antioxidant, and physicochemical properties. **Foods**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 599, 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/foods9050599>.
- ATHAYDE, A. E. *et al.* “Arnicas” from Brazil: comparative analysis among ten species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 29, n. 4, p. 401-424, jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2019.02.006>.
- ATHAYDE, A. E. *et al.* Metabolomic analysis among ten traditional “Arnica” (Asteraceae) from Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 265, n. July 2020, p. 113149, 2021.
- BARRETO, S. S. *et al.* Fungos em sementes de plantas ornamentais. **Revista Brasileira de Sementes**, [S.L.], v. 33, n. 3, p. 561-573, 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-31222011000300019>.
- BERTHOD, A. *et al.* Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 383, n. 2, p. 327–340, 2005.
- BHAGAT, J. *et al.* Cholinesterase inhibitor (Altenuene) from an endophytic fungus *Alternaria alternata*: optimization, purification and characterization. **Journal of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 121, n. 4, p. 1015-1025, 1 ago. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.13192>.
- BOHLMANN, F. *et al.* **Distribution of acetylenes. I. Compositae**. Academic Press, London, p. 340, 1973.
- BOHLMANN, F. *et al.* Sesquiterpene and diterpene derivatives from *Solidago* species. **Phytochemistry**, v. 19, n. 12, p. 2655-2661, 1980.
- BOHMANN, F., ZDERO, C. Naturally occurring thiophenes, in Thiophenes and its derivatives. **Interscience publications**. New York, p. 262, 1985.
- BOJCZUK, M.; ŚYŃELEWICZ, D.; HODUREK, P. Centrifugal partition chromatography - A review of recent applications and some classic references. **Journal of Separation Science**, [S.L.], v. 40, n. 7, p. 1597-1609, 22 fev. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201601221>.

BORTOLOTTI, I. *et al.* Knowledge and use of wild edible plants in rural communities along Paraguay River, **Pantanal, Brazil**. *J Ethnobiology Ethnomedicine* 11, 46 (2015).
<https://doi.org/10.1186/s13002-015-0026-2>

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 120 p.: il. color – (Série A. Normas e Manuais Técnicos) ISBN 85-334-0742-4

BREMER, K. (1994) **Asteraceae: Cladistics and Classification**. Timber Press, Portland.
 CAI, R. *et al.* Penisocoumarins A–J: isocoumarins from *penicillium commune* qqf-3, an endophytic fungus of the mangrove plant *kandelia candel*. **Journal of Natural Products**, [S.L.], v. 81, n. 6, p. 1376-1383, 24 maio 2018. American Chemical Society (ACS).
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b01018>

CARVALHO, J. M. *et al.* Phytosterols isolated from endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* (Melanconiaceae). **Acta Amazonica**, [S.L.], v. 46, n. 1, p. 69-72, mar. 2016 b. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201500072>.

CARVALHO, T.C.L. **Estudo fitoquímico e de bioatividade de *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less. E *Calea uniflora* Less. (ASTERACEAE)**. 2016. 301 f. Tese (Doutorado) – Programa de pós graduação em Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

CBS Laboratory Manual Series **Food and Indoor Fungi**. By R. A. Samson, J. Houbraken, U. Thrane, J. C. Frisvad & B. Andersen, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre 2011, p. 390.

CHAGAS, F. O. *et al.* Chemical interaction of endophytic fungi and actinobacteria from *Lychnophora ericoides* in co-cultures. **Microbiological Research**, [S.L.], v. 212-213, p. 10-16, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.005>

CHEPKIRUI, C., STADLER, M. The genus *Diaporthe*: a rich source of diverse and bioactive metabolites. **Mycological Progress**, [S.L.], v. 16, n. 5, p. 477-494, 22 mar. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11557-017-1288-y>.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York, Columbia, University Press, v.1, p. 1261, 1988.

DA SILVA, L A.L. *et al.* Single-step isolation by centrifugal partition chromatography of the potential anti-inflammatory glaucolide B from *Lepidaploa chamissonis*. **Journal of chromatography A**, v. 1605, p. 460362, 2019.

Da SILVA, L.A.L. **Investigação fitoquímica da espécie *Vernonanthura tweedieana* (Baker) H. Rob.** 2016. 184 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós graduação em

Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

DALINOVA *et al.* Isolation and Bioactivity of Secondary Metabolites from Solid Culture of the Fungus *Alternaria sonchi*. **Biomolecules**, v. 10, p.81, 2019.

DENG, C. *et al.* Secondary Metabolites of a Mangrove Endophytic Fungus *Aspergillus terreus* (No. GX7-3B) from the South China Sea. **Marine Drugs**, n. 7, p.2616-2624, 2013.

DOWNUM, K.R. *et al.* Distribution of acetylenic thiophenes in the pectidinae. **Biochemical Systematics And Ecology**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 109-113, maio 1985. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0305-1978\(85\)90067-5](http://dx.doi.org/10.1016/0305-1978(85)90067-5).

DUARTE, M. *et al.* **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. ISSN 1808-4532, p. p.193-20, 2007.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH¹. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 2, n. 26, p. 446-452, 2006.

EICHHOLZER, J. V. *et al.* **The toxic extractives from wedelia asperrima** —I. *Tetrahedron*, v. 37, n. 10, p. 1881–1891, 1981.

FAQUETI, L.G. *et al.* Simple and fast UPLC-MS method for quantifying the anti-inflammatory candidate 5'-methoxynobletin in rat plasma: validation and application in a preliminary pharmacokinetic study. **Journal of chromatography B -analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 1158, p. 122387, 2020

FAN, Y. *et al.* Sulfur-Containing Compounds from Endophytic Fungi: sources, structures and bioactivities. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 8, n. 6, p. 628, 13 jun. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jof8060628>.

FELIX, T. **Fungos endofíticos em espécies agrícolas de importância econômica**. 2019. 54 f. (Especialista) - Curso de Pós Graduação em Microbiologia, Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2019.

FONSECA, M. *et al.* Influência da época e do horário de colheita nos teores de óleo essencial e de taninos em couve-cravinho (*Porophyllum ruderale*) (Jacq.) Cassini. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 2, p. 75–79, 2007.

FONSECA, M.C.M. *et al.* Anatomia dos órgãos vegetativos e histolocalização de compostos fenólicos e lipídicos em *Porophyllum ruderale* (Asteraceae). **Planta Daninha**, n. 24, p.707-713, 2006.

FORTKAMP, D. **Metabolitos secundários produzidos por fungos endofíticos isolados de *Anthurium alcatrazense* e *Begonia spp.*** 2018. 185 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências, Microbiologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura "Luiz Queiroz", São Paulo, 2018.

FRAIGE, K. *et al.* Dereplication by HPLC-DAD-ESI-MS/MS and Screening for Biological Activities of Byrsonima Species (Malpighiaceae). **Phytochemical Analysis**, [S.L.], v. 29, n. 2, p. 196-204, 9 out. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/pca.2734>.

FUENTES, A. *et al.* Fungal and Bacterial Microbiome Associated with the Rhizosphere of Native Plants from the Atacama Desert. **Microorganisms**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 209, 4 fev. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8020209>.

FUNK, V.A. *et al.* **Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae**. Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy (IAPT), p.171-189, 2009.

GOMES R. R. *et al.* Diaporthe: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia** 31:1–41, 2013.

GONÇALVES, I. C. O. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos associados a plantas medicinais do cerrado**. 2013. 55 f. Especialista em Microbiologia, Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

GONZÁLEZ, G. D. T. *et al.* Avanços Recentes Na Manipulação Genética de Organismos para a Produção de Peptídeos não Ribossomais. **Rev. Virtual Quim.**, S.L, v. 6, n. 8, p. 1-28, 2016

GOULART, A. C. P. Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle. **Embrapa Agropecuária Oeste**, 172 p. 2004.

GUILLET, G. *et al.* Volatile monoterpenes in *Porophyllum gracile* and *P. ruderale* (Asteraceae): Identification, localization and insecticidal synergism with α -terthienyl. **Phytochemistry**, v. 49, n. 2, p. 423–429, 1998.

GUPTA, S. *et al.* A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi. **Biotechnology Advances**, v. 39, p. 107462, 2020.

HAMILL, P.G. *et al.* Microbial lag phase can be indicative of, or independent from, cellular stress. **Sci Rep**. 10, 5948 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62552-4>

HOGAN, D. J. *et al.* Conflitos Entre Crescimento Populacional E Uso Dos Recursos Ambientais Em Bacias Hidrográficas Do Estado De São Paulo. **Encontro Nacional De Estudos Populacionais**, n. XI, p. 1539–1572, 1998.

IBRAHIM, S. R. M. *et al.* Naturally occurring thiophenes: isolation, purification, structural elucidation, and evaluation of bioactivities. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 2, p. 197–220, 2016.

KAMARULZAMAN, F. A. *et al.* Derivatives of pheophorbide-a and pheophorbide-b from photocytotoxic Piper penangense extract. **Chemistry and Biodiversity**, 8(3), 494–502, 2011. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201000341>

KELLER, N. P. *et al.* Fungal secondary metabolism - From biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 937–947, 2005.

KLINGENBERG, M. *et al.* The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Biomembranes**, [S.L.], v. 1778, n. 10, p. 1978-2021, out. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.04.011>.

KUSARI, S. *et al.* Survival-strategies of endophytic *Fusarium solani* against indigenous camptothecin biosynthesis. **Fungal Ecol**, v.4, p. 219–223, 2011.

LAMO, F. J. de; TAKKEN, F. L. W. Biocontrol by *Fusarium oxysporum* Using Endophyte-Mediated Resistance. **Frontiers In Plant Science**, [S.L.], v. 11, n. 0, p. 1-20, 6 fev. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2020.00037>.

LEDWITCH, K. *et al.* Taxol: Efficacy Against Oral Squamous Cell Carcinoma. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 13, n. 4, p. 509–521, 2013.

LIAO, H-L. **The Plant-Growth-Promoting Fungus, *Mortierella elongata*: its biology, ecological distribution, and growth-promoting activities.** **Edis**, [S.L.], v. 2021, n. 2, p. 1-10, 5 mar. 2021. University of Florida George A Smathers Libraries. <http://dx.doi.org/10.32473/edis-ss679-2021>.

LIMA NETO, D. A. de. **Estudo fitoquímico e efeitos analgésicos da *Porophyllum ruderale*.** 1996. 111 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências, Farmacologia., Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

LOVEGROVE, A. *et al.* Role of polysaccharides in food, digestion, and health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 2, p. 237–253, 2017.

LUSA, M.G. *et al.* Histolocalization of chemotaxonomic markers in Brazilian Vernonieae (Asteraceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, n. 182, p. 581-593, 2016.

MACLEOD, J. *et al.* Bifloratoxin, a Toxic Aminoglycoside of Carboxyatractyligenin, From *Melanthera biflora*. **Australian Journal of Chemistry**, 43(9), p. 15-33, 1990. <https://doi.org/10.1071/CH9901533>

MACLEOD, J. K. *et al.* Bifloratoxin, a Toxic Aminoglycoside of Carboxyatractyligenin, from *Melanthera biflora*. **Australian Journal of Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 1533–9, 1990.
MAITAN, V. R. **Isolamento e caracterização de actinomicetos endofíticos isolados de *Solanum lycocarpum* (lobeira).** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Goiás, 122p. 1998.

MC LEOD, L. **Efeito da aplicação de Putrescina sobre aspectos bioquímicos e acúmulo de poliaminas em calos de *Handroanthus impetiginosus*.** 2017. 47 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Tecnologias Ambientais, Universidade Federal de Alfena, Alfenas, 2017

MECKES-LOZOYA, M.; GASPAR, I. Phototoxic effect of *Porophyllum macrocephalum* and *Tagetes erecta*. **Fitoterapia**, v. 64 (1993) 35–41.

MEENA, Mukesh *et al.* Alternaria host-specific (HSTs) toxins: an overview of chemical characterization, target sites, regulation and their toxic effects. **Toxicology Reports**, [S.L.], v. 6, p. 745-758, 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.06.021>.

MELO, M. R. C. S.; PEREIRA, R. D. C. A. Revisão histórica da tribo Vernonieae Cass. (Família Asteraceae) para o Brasil. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 11, p.172-192, 2016.

MENEZES, J. P. *et al.* Variabilidade genética na região its do rDNA de isolados de *Trichoderma spp.* (biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. **Ciênc. Agrotec.**, Santa Maria, v. 1, n. 34, p. 132-139, 2010.

MITCHELL, J.; JOHNSTON, I. G.; BASSEL, G. W. Variability in seeds: Biological, ecological, and agricultural implications. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 4, p. 809–817, 2017.

MUSSI-DIAS, V. *et al.* Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [S.L.], v. 14, n. 2, p. 261-266, 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-05722012000200002>.

NARAYAN, O. P. *et al.* Sulfur transfer from the endophytic fungus *Serendipita indica* improves maize growth and requires the sulfate transporter SiSulT. **The Plant Cell**, [S.L.], v. 33, n. 4, p. 1268-1285, 21 jan. 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/plcell/koab006>.

NASCIMENTO, L. E. S. *et al.* Phytochemical profile of different anatomical parts of jambu (*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen): A comparison between hydroponic and conventional cultivation using PCA and cluster analysis. **Food Chemistry**, v. 332, n. May, 2020.

PANT, S. *et al.* Peptide-like and small-molecule inhibitors against Covid-19. **Journal Of Biomolecular Structure And Dynamics**, [S.L.], v. 39, n. 8, p. 2904-2913, 6 maio 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2020.1757510>.

PAWŁOWSKA, K. A. *et al.* The contribution of phenolics to the anti-inflammatory potential of the extract from Bolivian coriander (*Porophyllum ruderale* subsp. *runderale*). **Food Chemistry**, v. 371, 2022.

PERLATTI, B. *et al.* Application of a Quantitative HPLC-ESI-MS/MS Method for Flavonoids in Different Vegetables Matrices. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 475-483, 2016. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20150273>.

PINTO, R.A. F. O. **Bioprospecção e caracterização de fungos endofíticos produtores de compostos bioativos isolados de Dalbergia ecastaphyllum L. Taub.** 2019. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Interação Patógenohospedeiro, Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração, Alfenas, 2019.

POLLO, L.A.E. *et al.* Polyacetylenes from the leaves of *Vernonia scorpioides* (Asteraceae) and their antiproliferative and antiherpetic activities. **Phytochemistry**, v. 95, p. 375-383, 2013.

POSTIGO, A. *et al.* Antifungal photosensitive activity of *Porophyllum obscurum* (Spreng.) DC.: Correlation of the chemical composition of the hexane extract with the bioactivity.

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, v. 20, n. October, p. 263–272, 2017.

POSTIGO, M. *et al.* Bifloratoxin, a Toxic Aminoglycoside of Carboxyatractyligenin, From *Melanthera biflora*. **Australian Journal of Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 1533, 1990.

Raut, I. *et al.* Cladosporium sp. Isolate as Fungal Plant Growth Promoting Agent. **Agronomy** 2021, 11, 392. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020392>.

RAGGI, L. *et al.* Differentiation of two *Porophyllum ruderales* (Jacq.) Cass. subspecies by the essential oil composition. **Journal of Essential Oil Research**, v. 27:1, p. 30–33, 2015.

RAJAMANIKYAM, M. *et al.* Endophytic fungi as novel resources of natural therapeutics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, n. December, p. 1–26, 2017.

RIBEIRO, F. P. C. *et al.* Isolation and identification of endophytic fungi in the medicinal plant *Mikania laevigata* (Asteraceae). **Pharmacognosy Journal**, v. 6, n. 4, p. 10–15, 2014.

RODRIGUEZ, R. J. *et al.* Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, v.182, n. 2, p. 314- 330, 2009

RODRIGUEZ, T. J.; GIULIETTI, A. M. **In vitro thiophene production by transformed root cultures of Tag.** 1995.

RODRÍGUEZ-CHÁVEZ, J. L. *et al.* Mexican Arnica (*Heterotheca inuloides* Cass. Asteraceae: Astereae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 195, p.39-63, jan. 2017.

ROMANO, E. *et al.* Characterization and crystal structure of 2R-(-)-6 hydroxytremetone from *Xenophyllum poposum* (Phil.) V.A. **Natural Product Research**, v. 22, n. 2, p. 124-135, 2008.

SACCARO, J.R.; NILO, L. **Desafios da bioprospecção no Brasil. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada.** Brasília, jan. de 2011. Disponível em: <http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/1568/1/TD_1569.pdf>. Acesso em out de 2020.

Santos, L. A. *et al.* (2020). Bioprospection: a mini review as to the use and conservation of biodiversity as a bind between ecological systems and human systems. **Revista Fimca**, 7(2), 34-38. <https://doi.org/10.37157/fimca.v7i2.116>

SANTOS, L. S. *et al.* A interação harmônica entre fungos e plantas: aspectos da relação endófito/hospedeiro. **Revista Saúde e Biologia**, v. 8, n. 1, p. 92–101, 2013.

SEMIR, J. *et al.* **As arnicas endêmicas das serras do Brasil: Uma revisão sobre a biologia e a química das espécies de *Lychnophora* (Asteraceae).** Ouro Preto (MG): Ufop, 2011. 2012 p.

SHALAPY, N. M. *et al.* Fusarium oxysporum & Fusarium solani: identification, characterization, and differentiation the fungal phenolic profiles by hplc and the fungal lipid profiles by gc-ms. **Journal Of Food Quality**, [S.L.], v. 2022, p. 1-12, 16 dez. 2022. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2022/4141480>.

SILVA, A. A.; ANDRADE, L. D. H. C. Utilização de espécies de Asteraceae por comunidades rurais do nordeste do Brasil: relatos em Camocim de São Félix, Pernambuco. **Biotemas**, v. 26, n. 2, p. 93–104, 2013.

SILVA, D. P. *et al.* Fungos anemófilos isolados de bibliotecas de instituições de ensino da Região Nordeste do Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, [S.L.], v. 12, p. 1-10, jan. 2021. Instituto Evandro Chagas. <http://dx.doi.org/10.5123/s2176-6223202000769>.

SILVA, I. P. Fungos endofíticos: fonte alternativa a metabólitos secundários de plantas. **Enciclopédia Biosfera (Centro Científico Conhecer)**, [s. l], v. 10, n. 18, p. 388-8, 2014.

SILVA, M.P. *et al.* Estudo taxonômico e etnobotânico sobre a família Asteraceae (Dumortier) em uma comunidade rural no Nordeste do Brasil. **Gaia Scientia**, v. 8, n. 2, p. 110–123, 2014.

SINGH, Bahaderjeet *et al.* Antioxidant and in vivo genoprotective effects of phenolic compounds identified from an endophytic *Cladosporium velox* and their relationship with its host plant *Tinospora cordifolia*. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 194, p. 450-456, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.10.018>.

STIERLE, A. *et al.* Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreanae*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. **Science**, Washington, v. 260, n. 5105, p. 214–216, 1993.

STROBEL, G.A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes. Infect**, v.5, p. 535–544, 2003.

SUCUPIRA, N. R. *et al.* Methods for Measuring Antioxidant Activity of Fruits. **Unopar Cient Ciênc Biol Saúde**, Ceará, v. 4, n. 14, p. 263-269, 2012.

TAKAHASHI, H.T. *et al.* Thiophene derivatives with antileishmanial activity isolated from aerial parts of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. **Molecules**, n.16, p. 3469-3478, 2011.

VAN DAM, J. E.G. *et al.* Polysaccharides in Human Health Care. **Natural Product Communications**, S.L, v. 12, n. 6, p. 821-830, 2016.

VÁZQUEZ-ATANACIO, M. J. *et al.* Porophyllum Genus Compounds and Pharmacological Activities: a review. **Scientia Pharmaceutica**, [S.L.], v. 89, n. 1, p. 7, 18 jan. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/scipharm89010007>.

WARDECKI, T. *et al.* Endophytic Streptomyces in the traditional medicinal plant *Arnica montana* L.: secondary metabolites and biological activity. **Antonie van Leeuwenhoek**, [S.L.], v. 108, n. 2, p. 391-402, 4 jun. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-015-0492-5>

WHITAKER, B. K. *et al.* Foliar fungal endophyte community structure is independent of phylogenetic relatedness in an Asteraceae common garden. **Ecology And Evolution**, [S.L.], v. 10, n. 24, p. 13895-13912, 26 nov. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ece3.6983>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation: issues and challenges**. Geneva: WHO, 2011. 12p.

YAMASHITA, O. M. *et al.* Influência da temperatura e da luz na germinação de sementes de couve-cravinho (*Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass.): nota científica. **Revista Brasileira de Sementes**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 202-206, 2018.

ZHANG, K. Production of citric, itaconic, fumaric, and malic acids in filamentous fungal fermentations. **Bioprocessing Technologies In Biorefinery For Sustainable Production Of Fuels, Chemicals, And Polymers**, v. 1, p. 375-397, 2013.

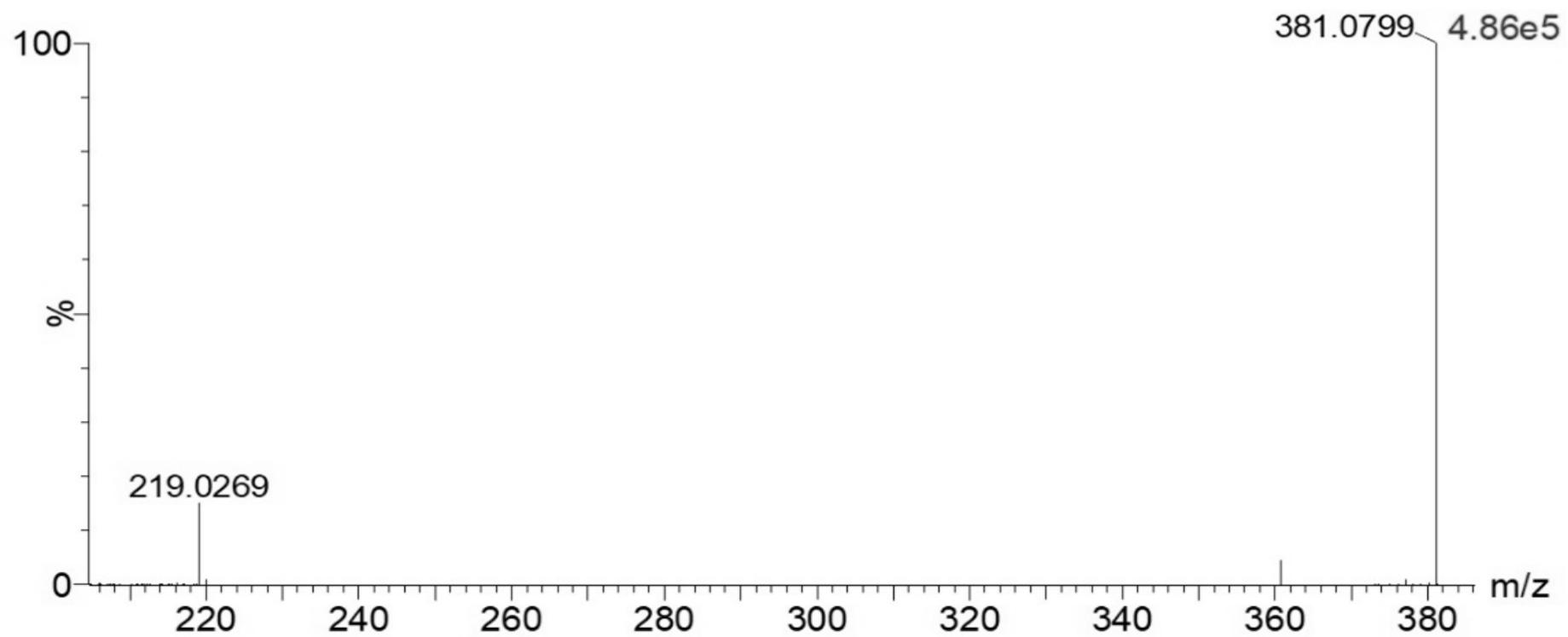
GUIMARÃES, D. O. **Produtos naturais de fungos endofíticos associados a espécies de Asteraceae e ensaio antibiótico no modelo de infecção em *Caenorhabditis elegans***. 2009. 50 f. Monografia (Especialização) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal Of Natural Products**, [S.L.], v. 83, n. 3, p. 770-803, 12 mar. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>

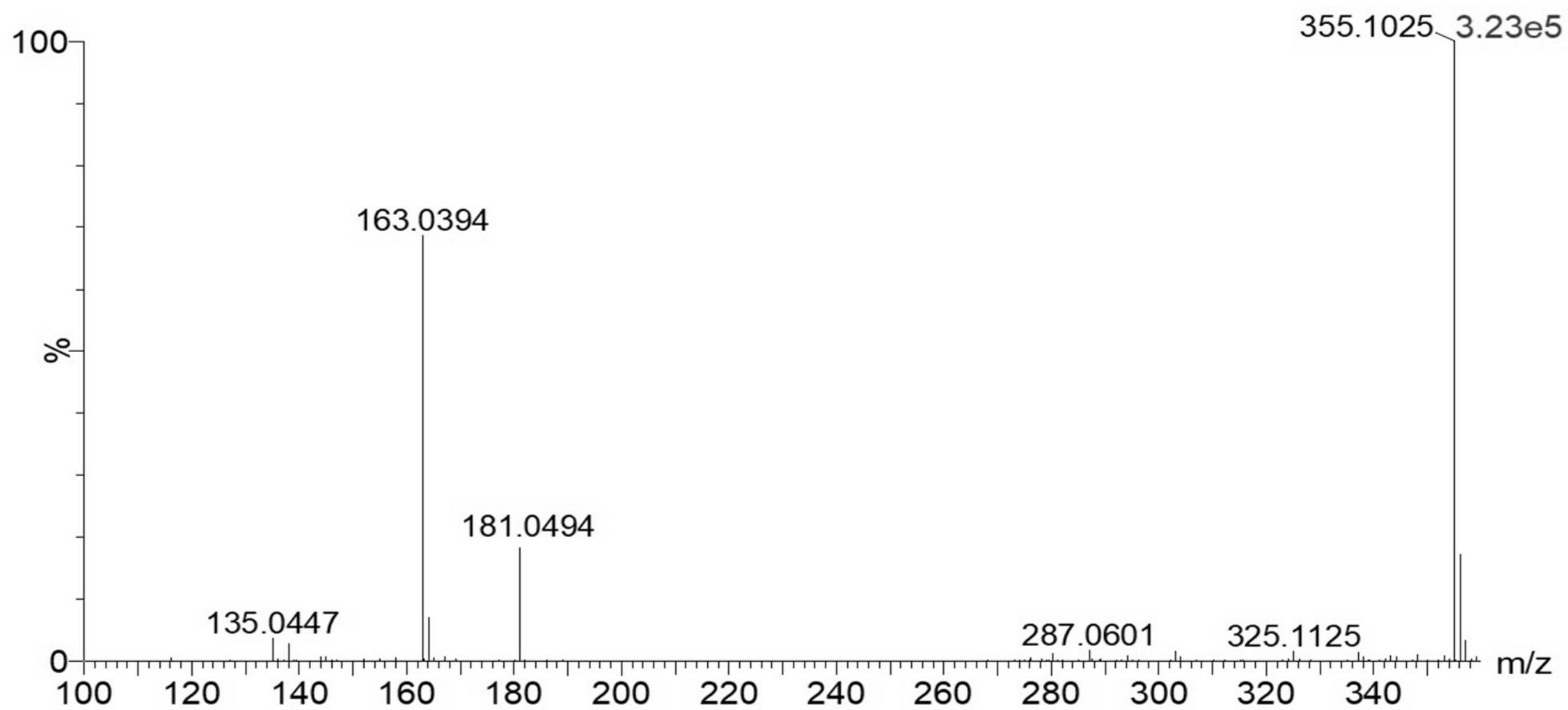
WINK, M. Bioprospecting: the search for bioactive lead structures from nature. **Medicinal Plant Biotechnology: From Basic Research to Industrial Applications**, p. 97-116, 2006.

APENDICE

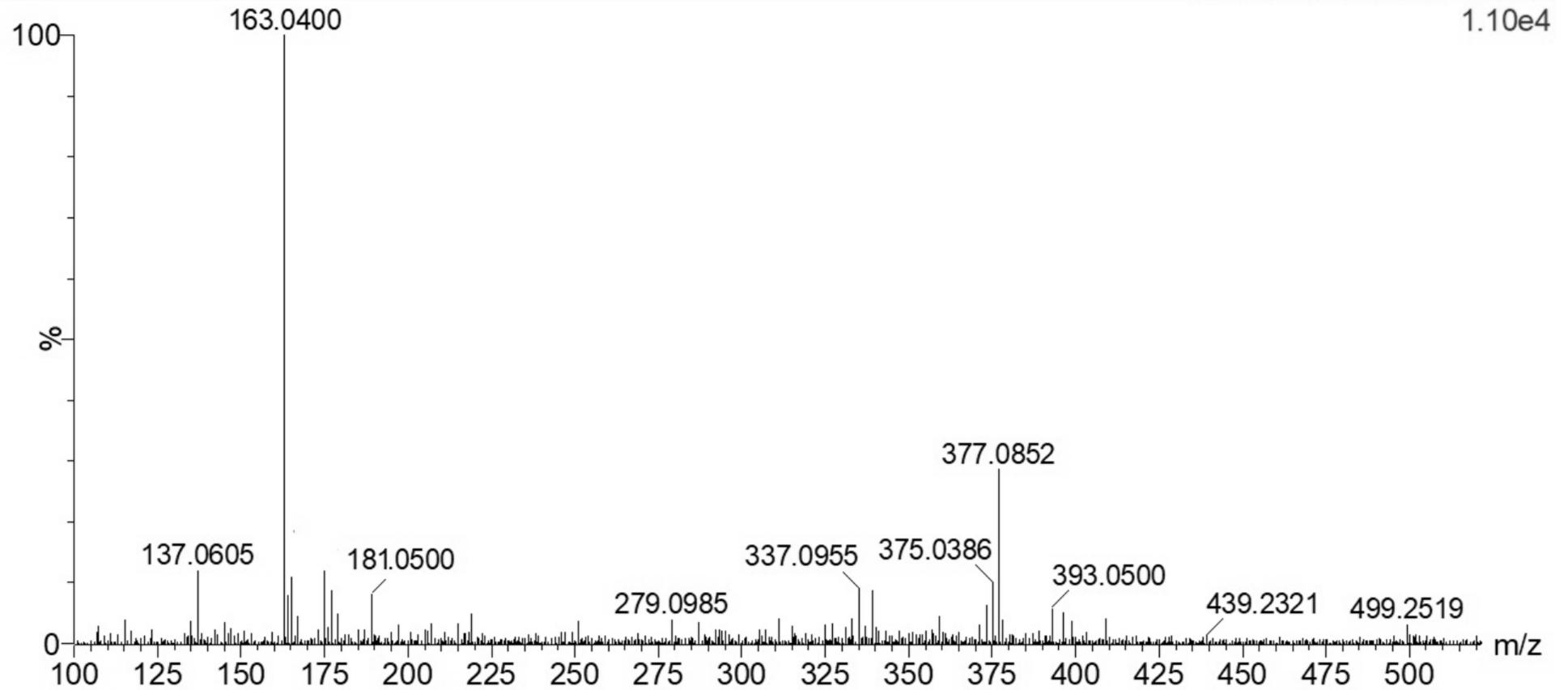
1. Espectro de massas da substância maltose (ESI+).



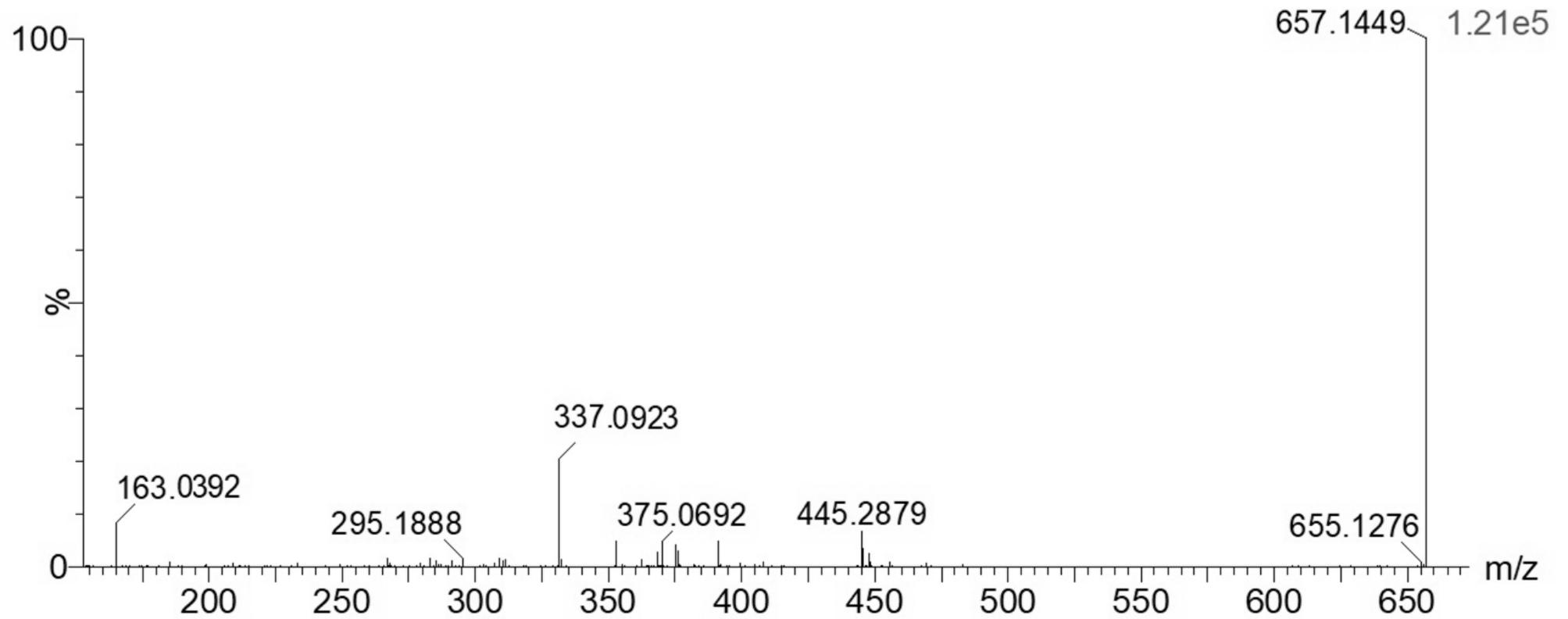
2. Espectro de massas da substância ácido cafeoilquínico (ESI +).



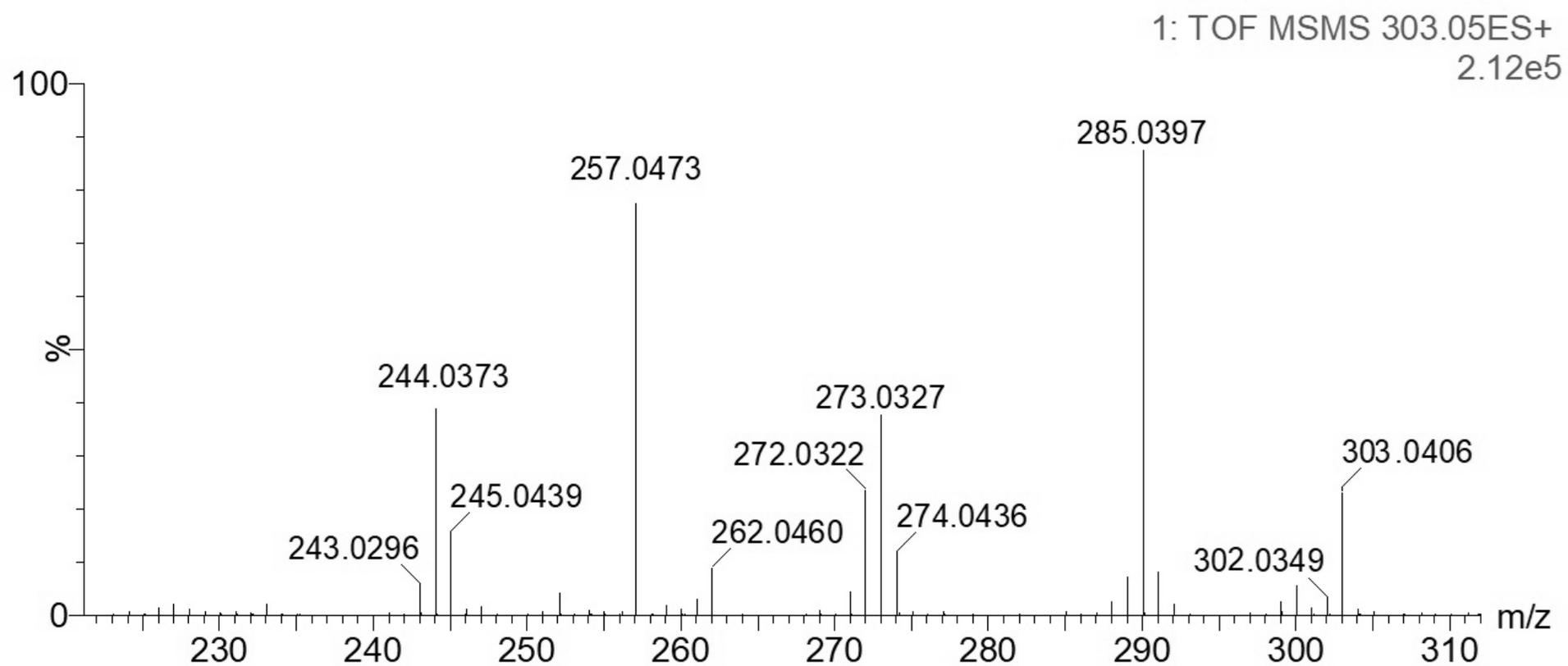
3. Espectro da substancia ácido dicafeoilquínico (1,5-dicafeoilquínico) (ESI +).



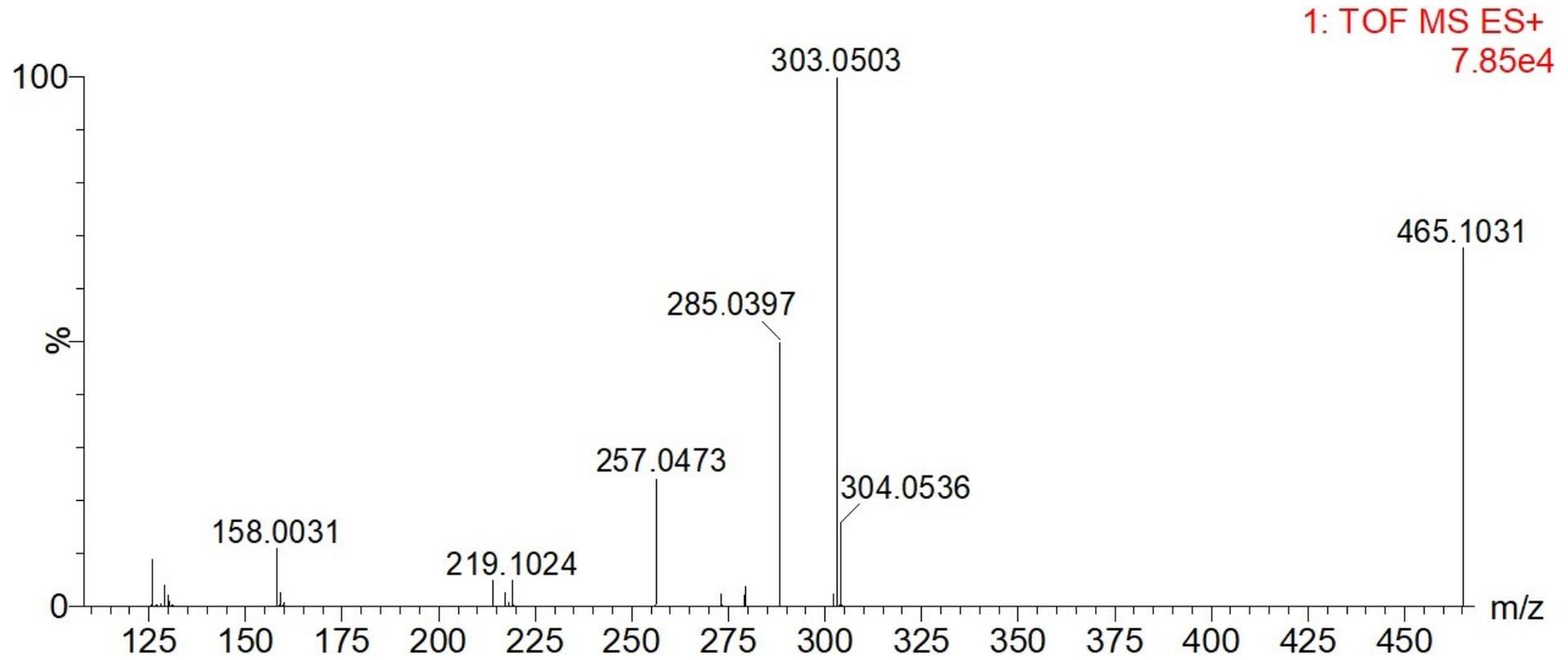
4. Espectro da substancia galoil-dicafeoil-glicose (isômero) (ESI +).



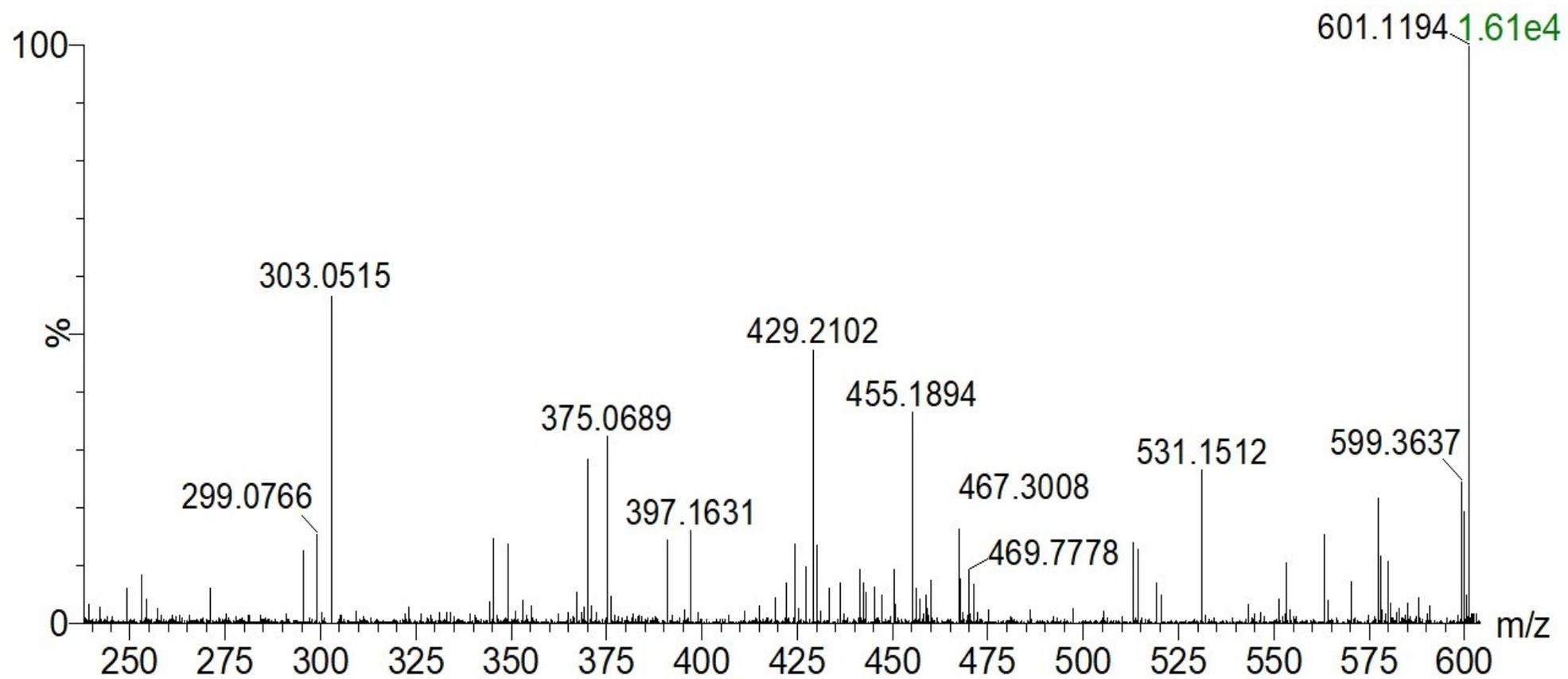
5. Espectro da substancia quercetina (ESI+).



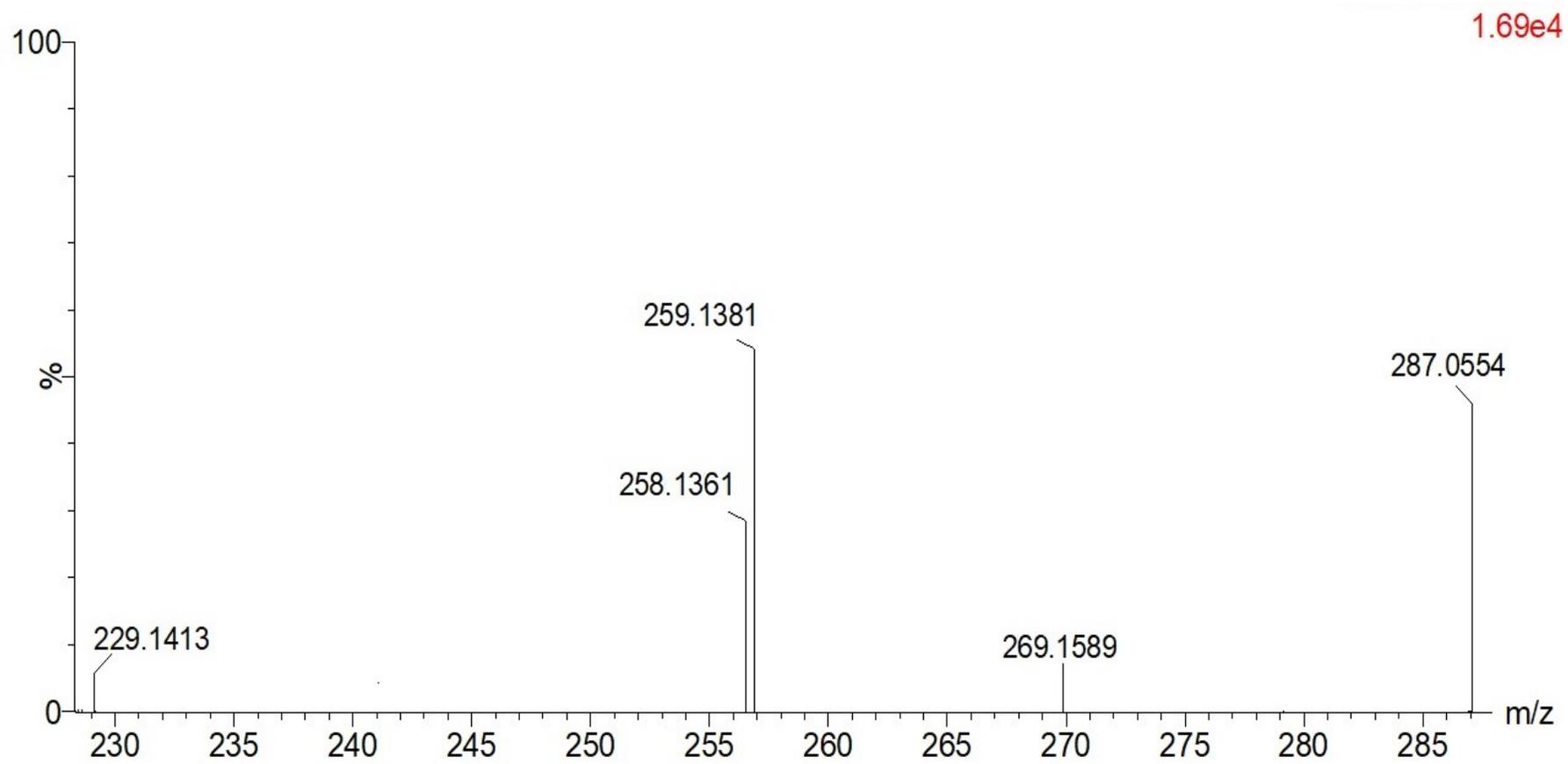
6. Espectro da substancia quercetina glicopiranosidio (isoquercitrina) (ESI +).



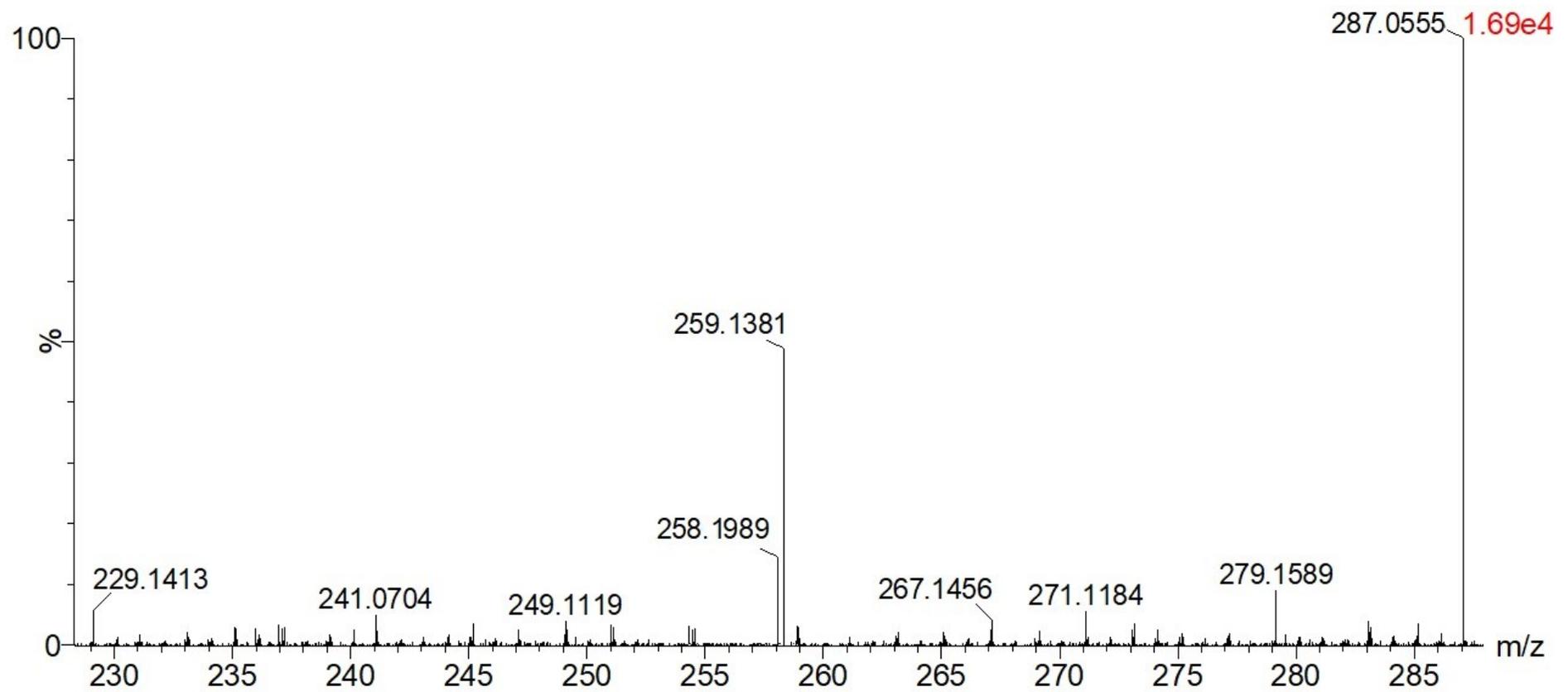
7. Espectro da substancia galoilquercitrina (ESI +).



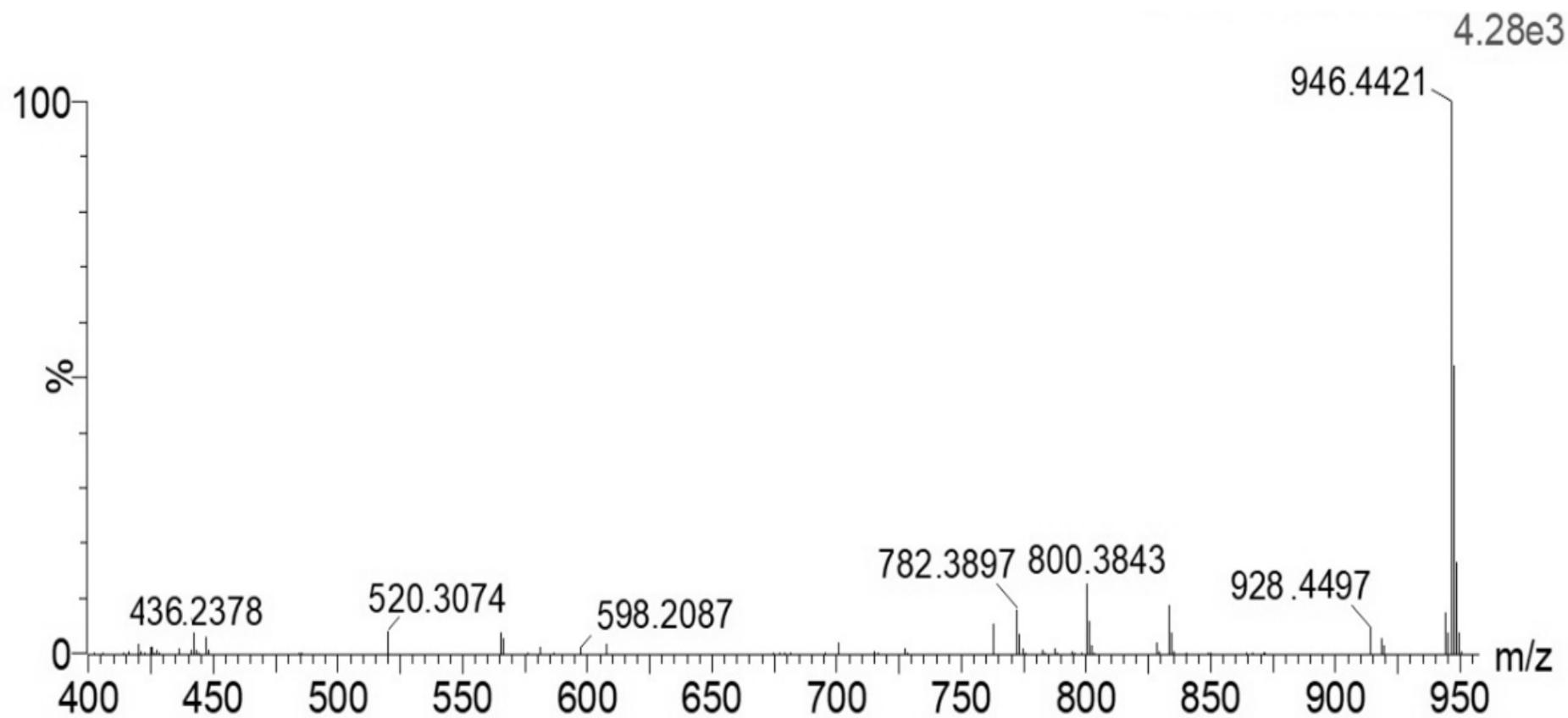
8. Espectro da substancia luteolina (ESI +).



9. Espectro da substancia canferol (ESI +).



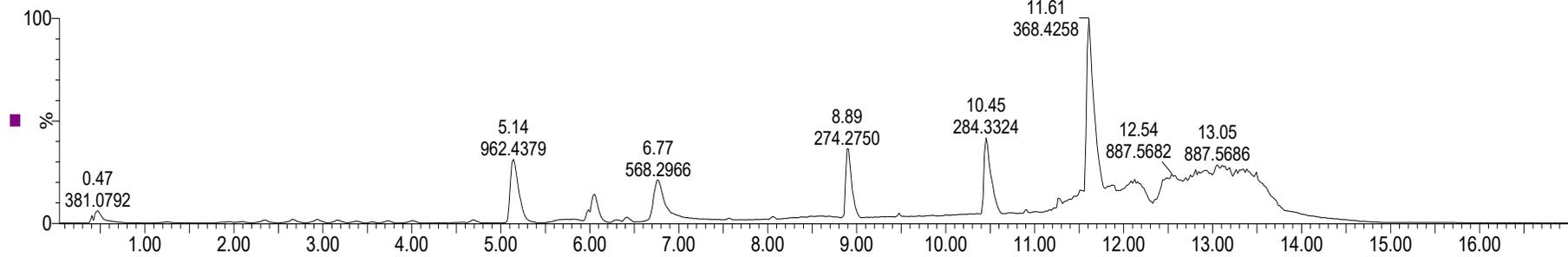
10. Espectro de massas da substância Bifloratoxina (m/z 946,4421) (ESI +).



11. Cromatograma do extrato obtido do cultivo de 3 meses de sementes coletadas em SC, cultivadas em casa de vegetação. Em triplicata.

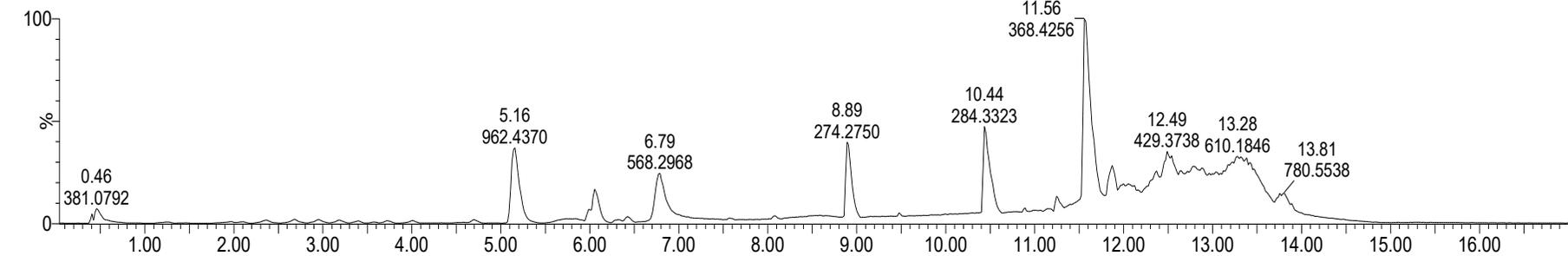
sc_3meses_1c_pos

1: TOF MS ES+
BPI
3.31e6



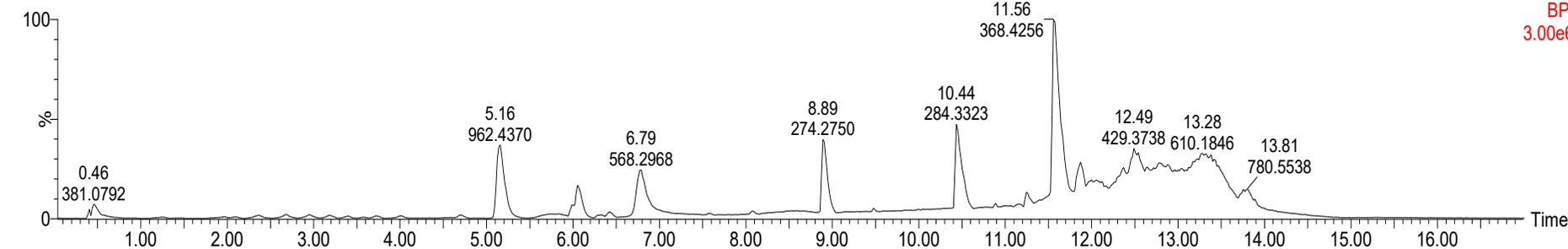
sc_3meses_1a_pos

1: TOF MS ES+
BPI
3.00e6

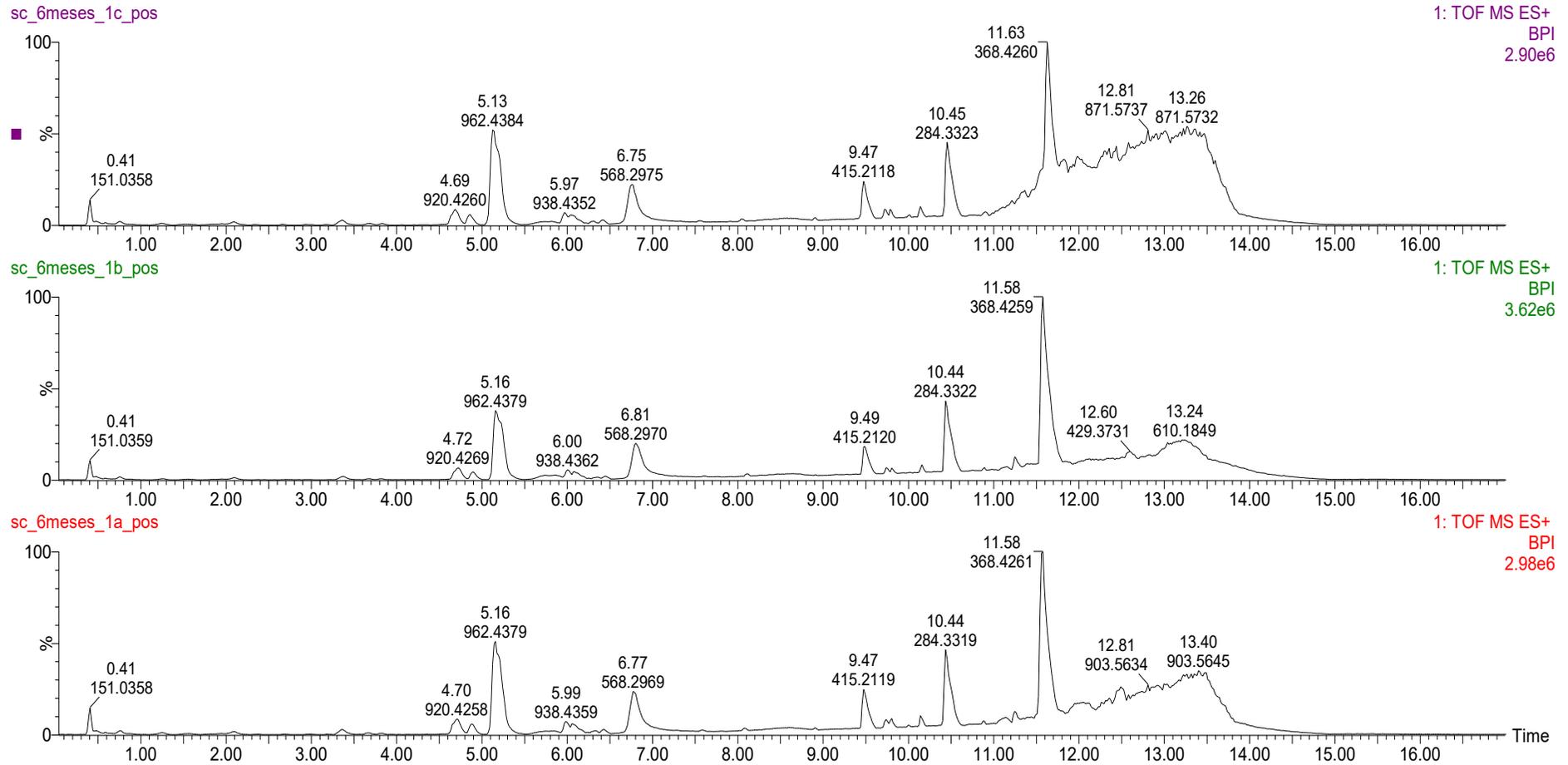


sc_3meses_1a_pos

1: TOF MS ES+
BPI
3.00e6

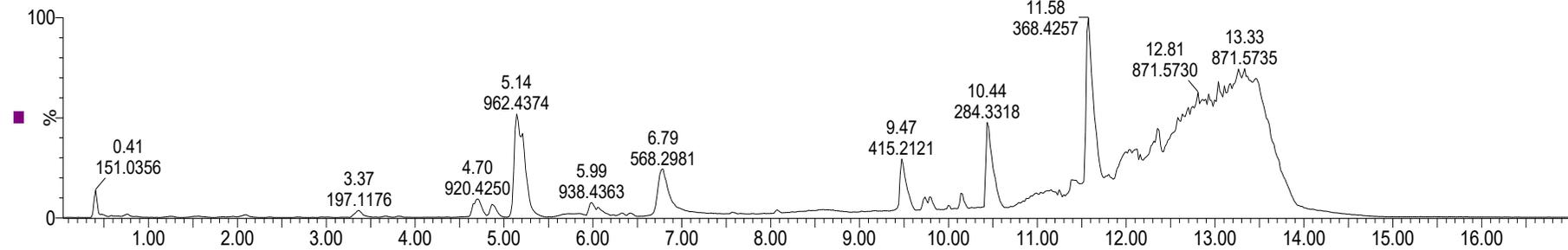


12. Cromatograma do extrato obtido do cultivo de 6 meses de sementes coletadas em SC, cultivadas em casa de vegetação. Em triplicata.

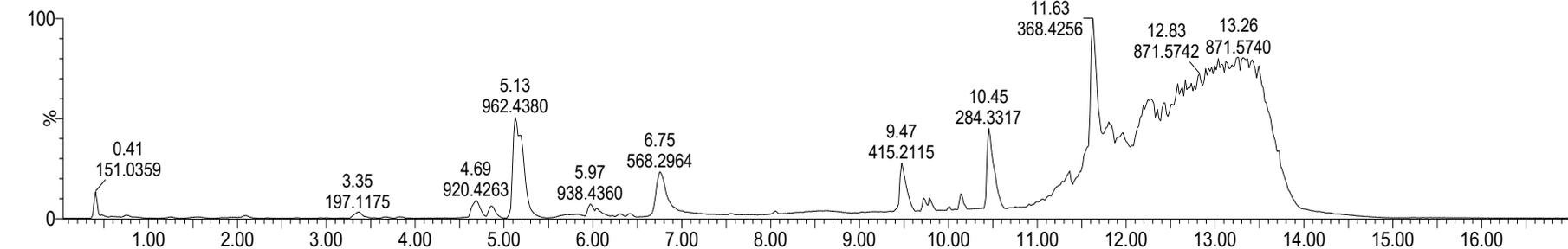


13. Cromatograma do extrato obtido do cultivo de 6 meses de sementes coletadas em SC, cultivadas em casa de vegetação. Em triplicata.

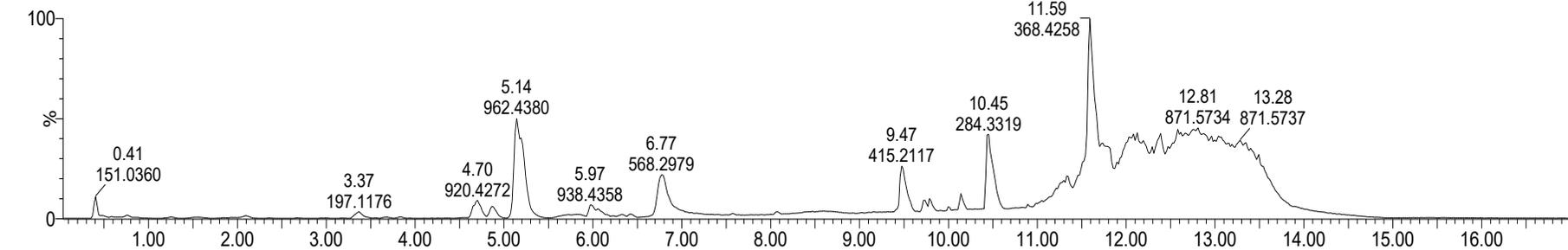
sc_6meses_2c_pos



sc_6meses_2b_pos



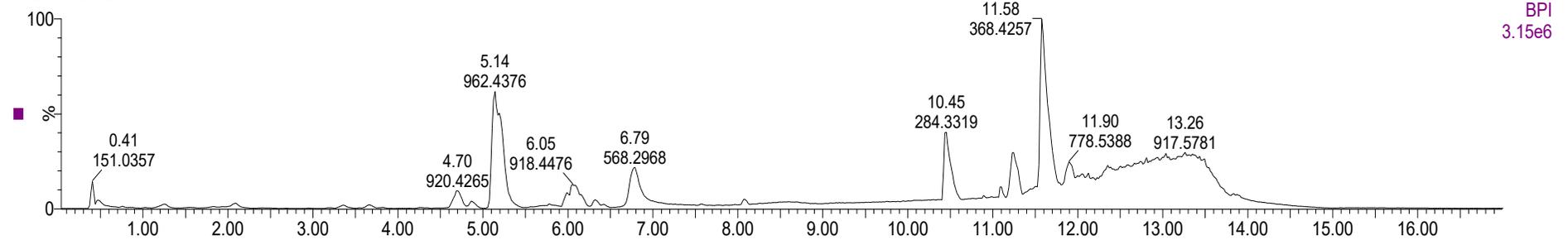
sc_6meses_2a_pos



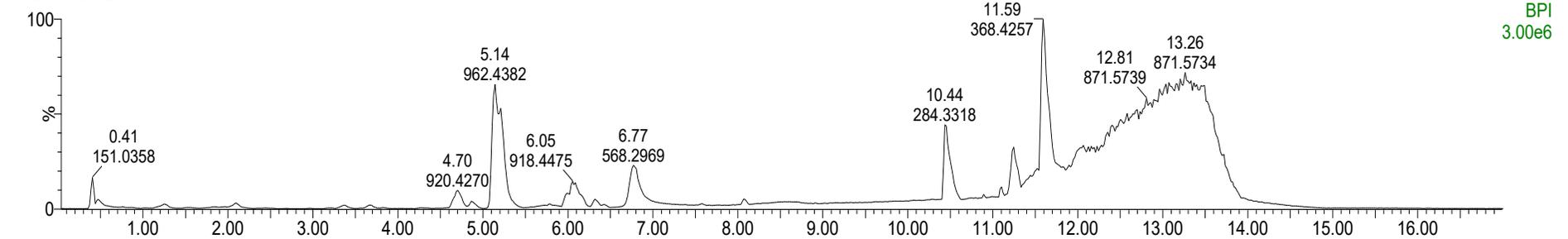
Time

14. Cromatograma do extrato obtido do cultivo de 12 meses de sementes coletadas em SC, cultivadas em casa de vegetação. Em triplicata.

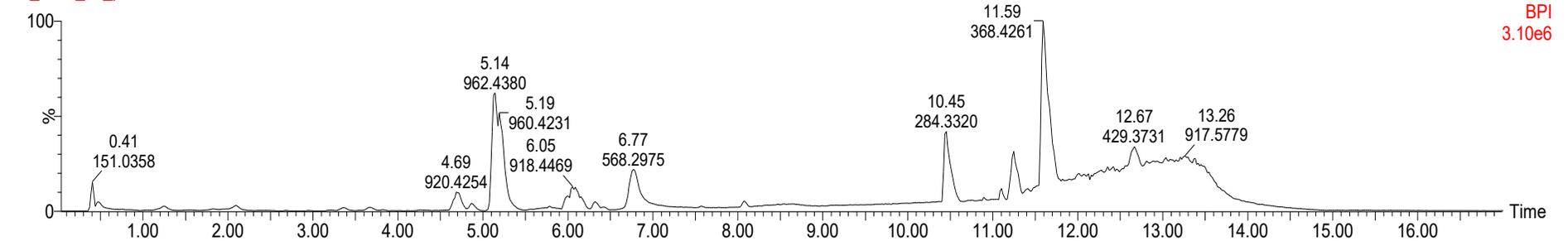
sc_1ano_1c_pos



sc_1ano_1b_pos

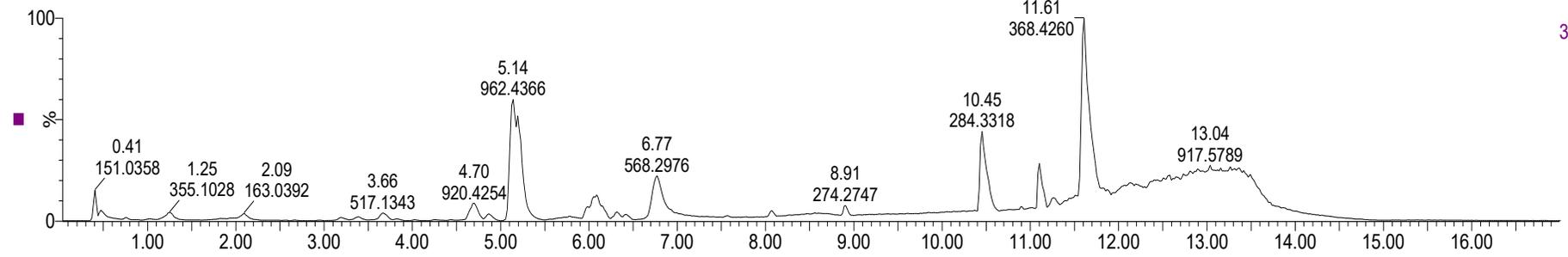


sc_1ano_1a_pos

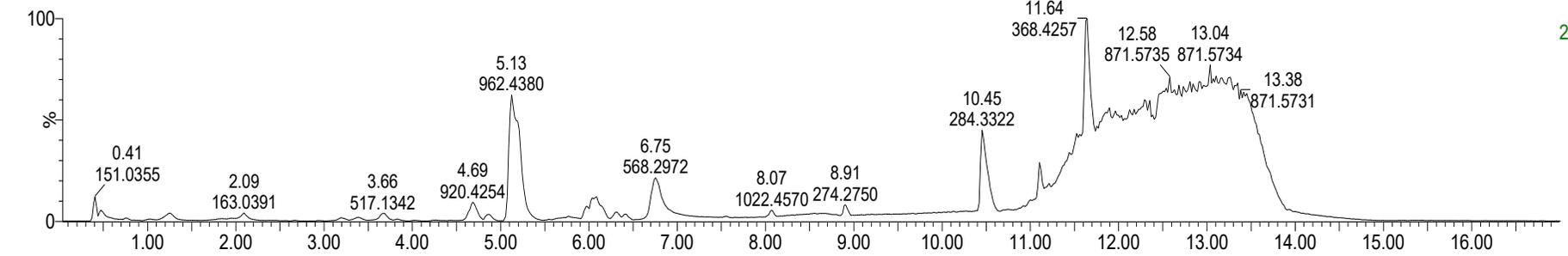


15. Cromatograma do extrato obtido do cultivo de 12 meses de sementes coletadas em SC, cultivadas em casa de vegetação. Em triplicata.

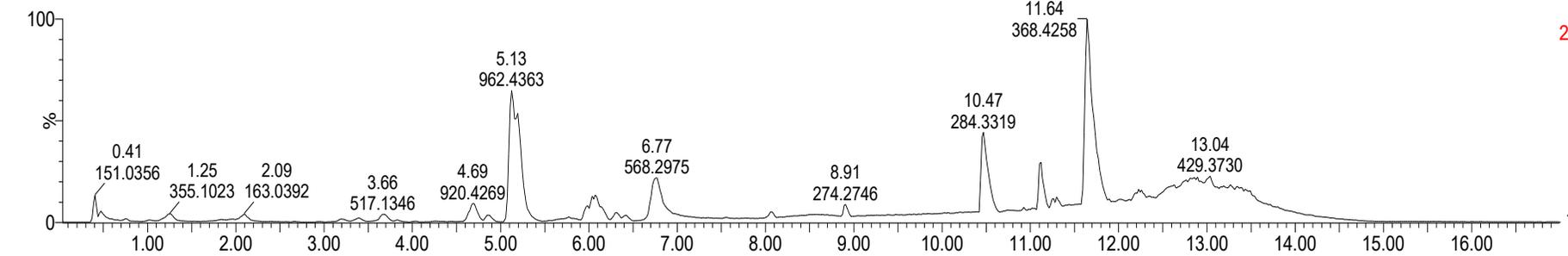
sc_1ano_2c_pos



sc_1ano_2b_pos



sc_1ano_2a_pos

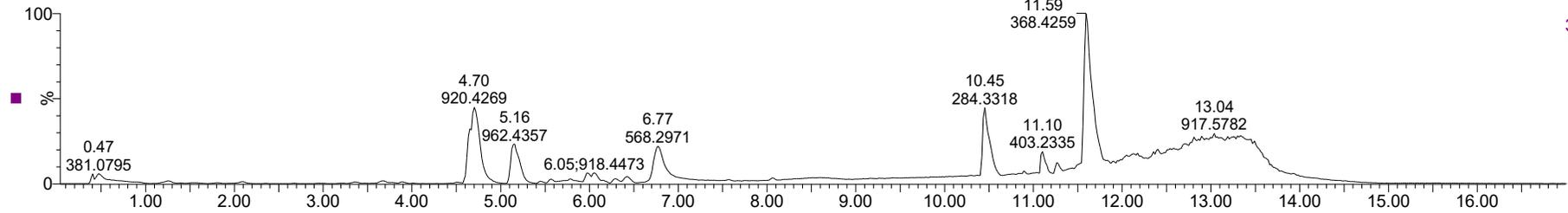


Time

16. Cromatograma do extrato obtido do cultivo de 3 meses de sementes coletadas em PR, cultivadas em casa de vegetação. Em triplicata.

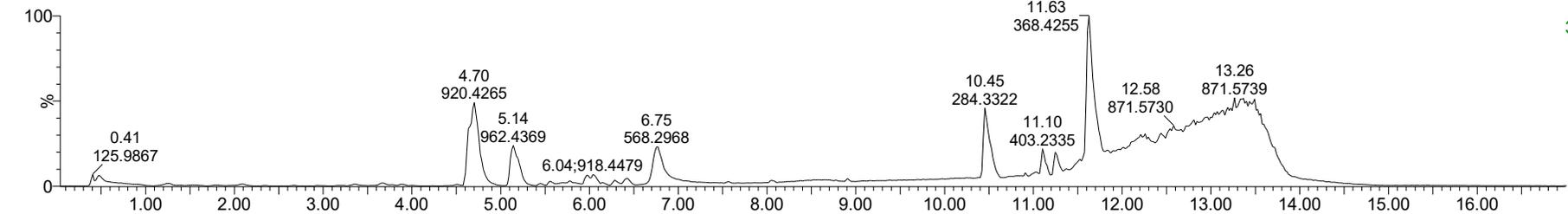
pr_3meses_1c_pos

1: TOF MS ES+
BPI
3.15e6



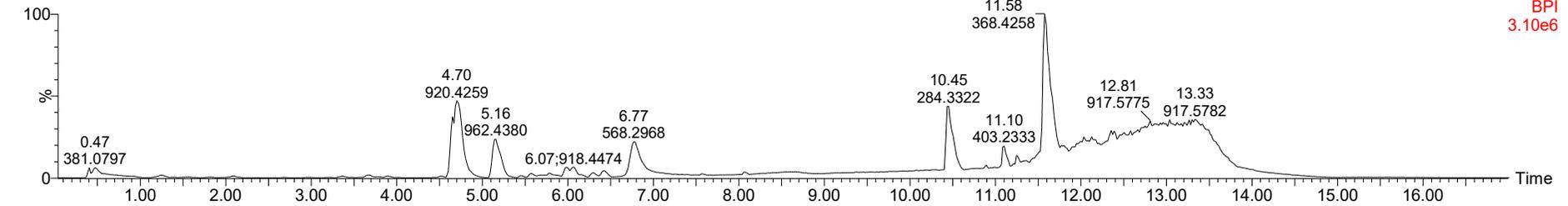
pr_3meses_1b_pos

1: TOF MS ES+
BPI
3.02e6



pr_3meses_1a_pos

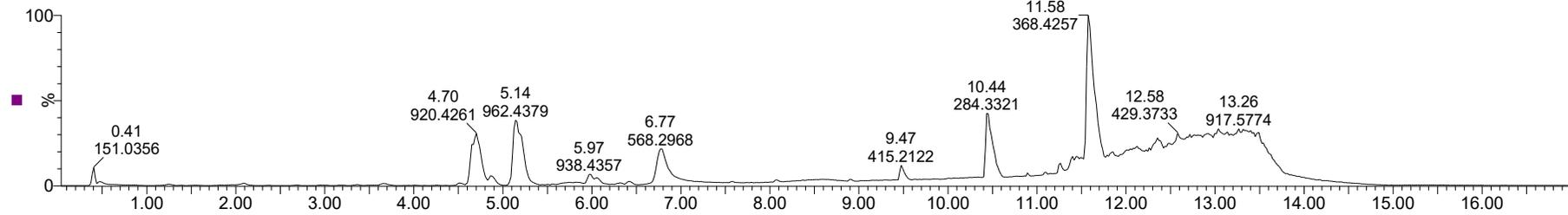
1: TOF MS ES+
BPI
3.10e6



17. Cromatograma do extrato obtido do cultivo de 6 meses de sementes coletadas em PR, cultivadas em casa de vegetação. Em triplicata.

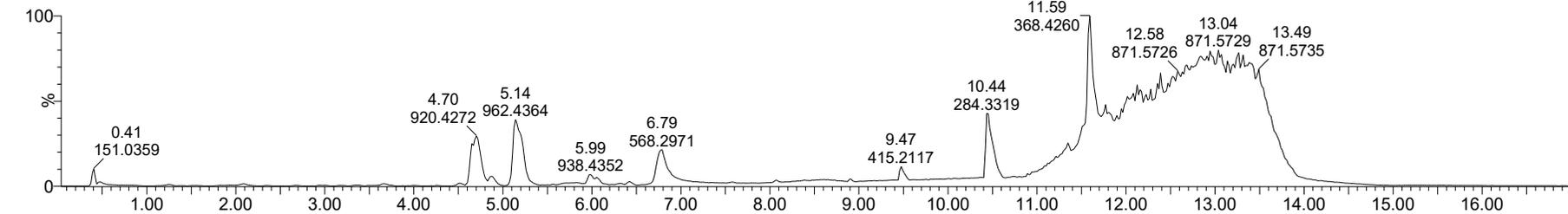
pr_6meses_1c_pos

1: TOF MS ES+
BPI
3.14e6



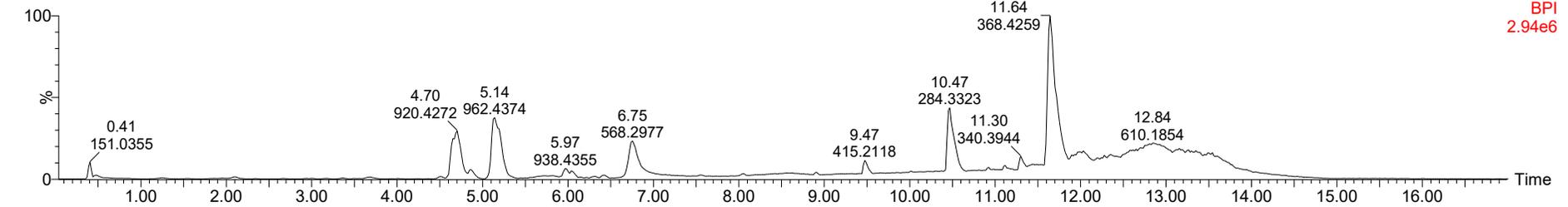
pr_6meses_1b_pos

1: TOF MS ES+
BPI
3.12e6

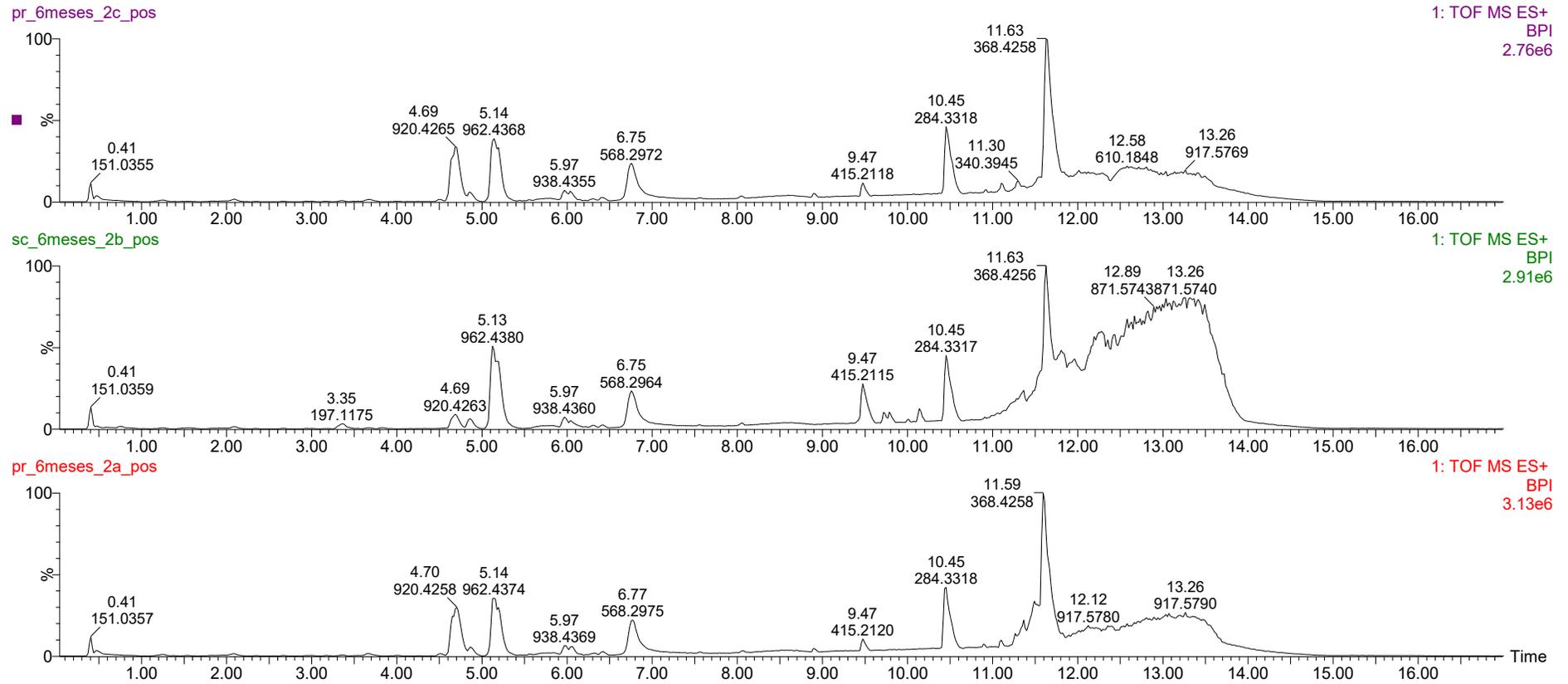


pr_6meses_1a_pos

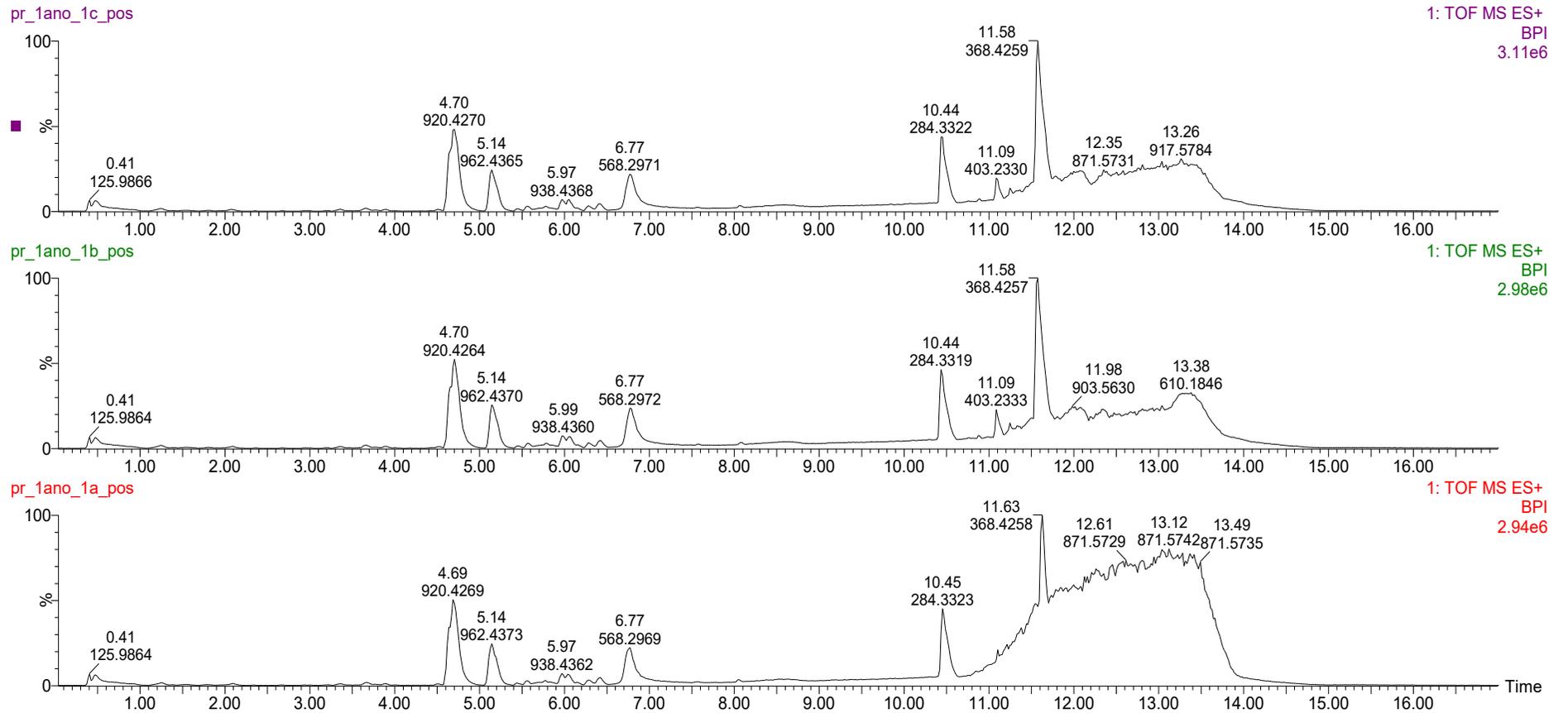
1: TOF MS ES+
BPI
2.94e6



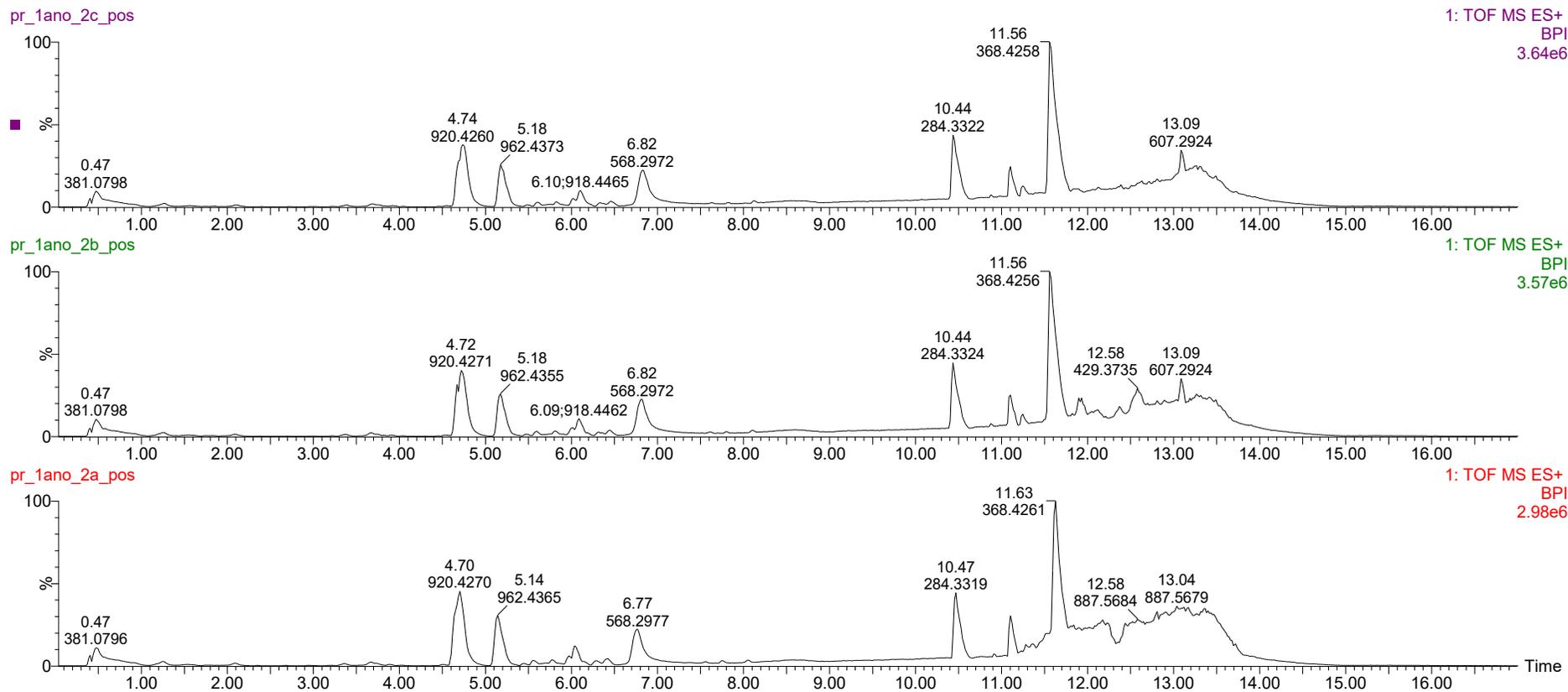
18. Cromatograma do extrato obtido do cultivo de 6 meses de sementes coletadas em PR, cultivadas em casa de vegetação. Em triplicata.



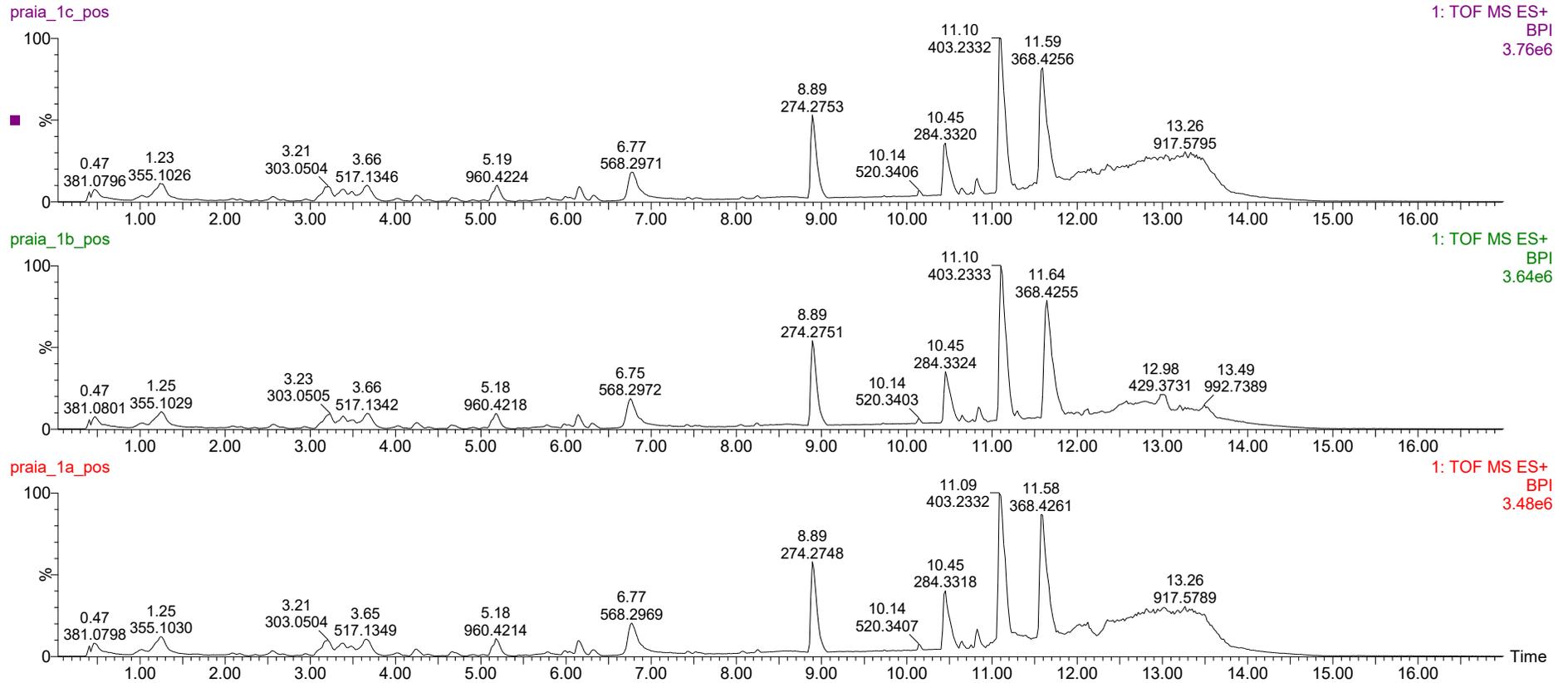
19. Cromatograma do extrato obtido do cultivo de 12 meses de sementes coletadas em PR, cultivadas em casa de vegetação. Em triplicata.



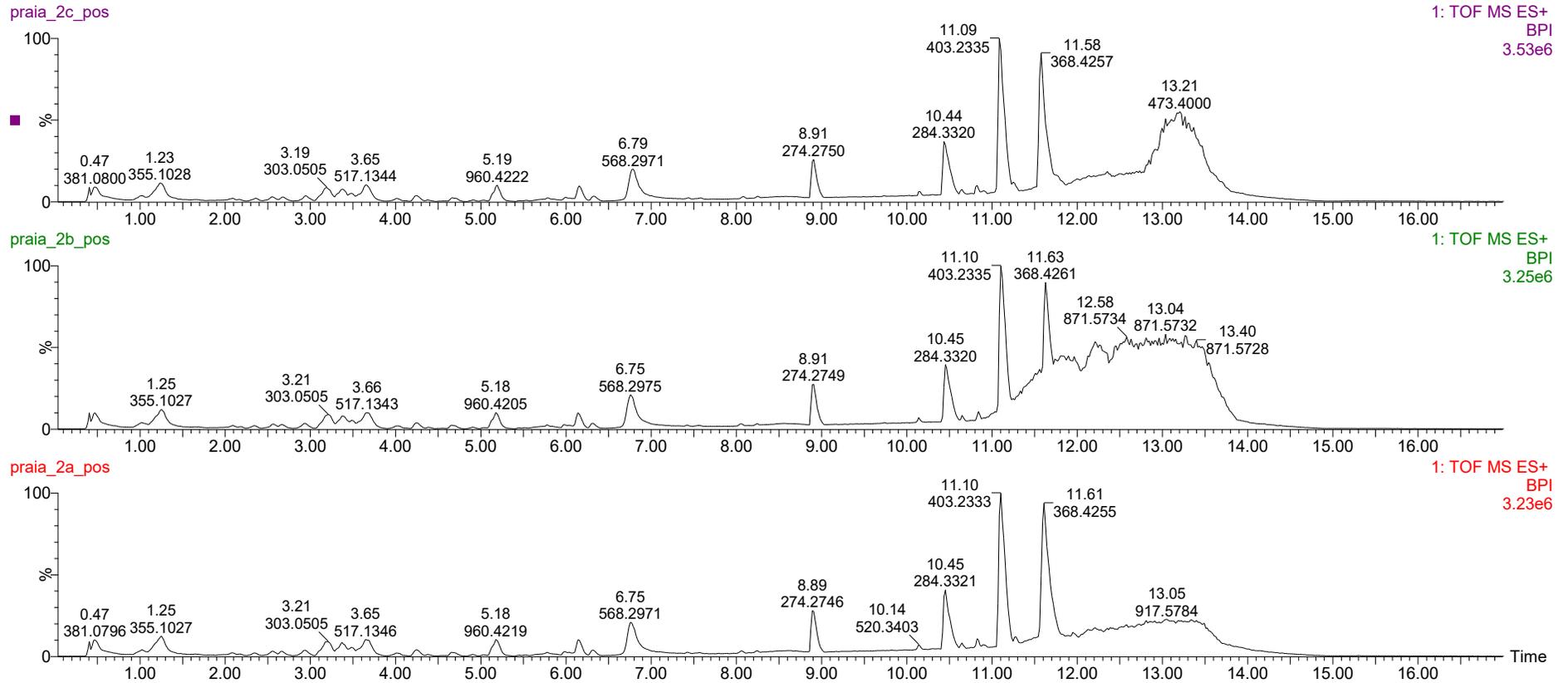
20. Cromatograma do extrato obtido do cultivo de 12 meses de sementes coletadas em PR, cultivadas em casa de vegetação. Em triplicata.



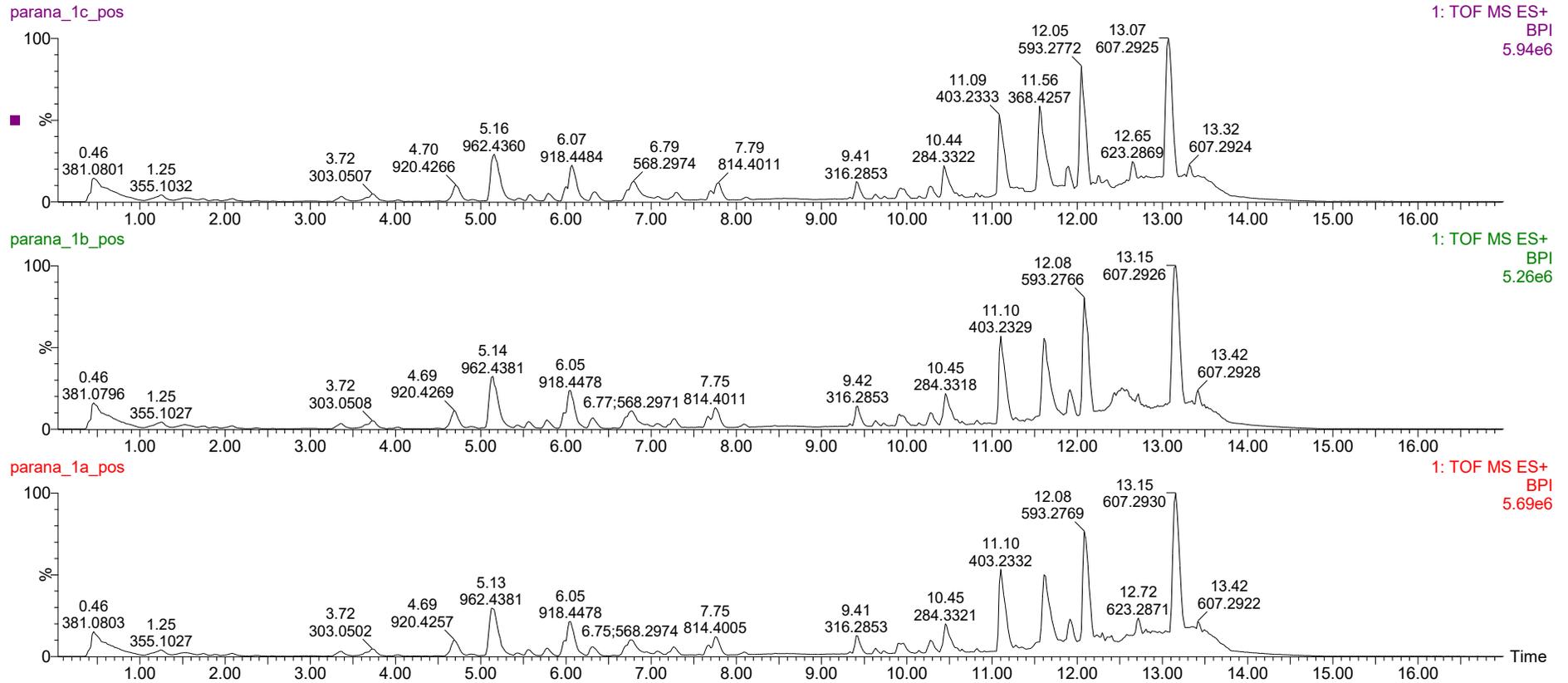
21. Cromatograma do extrato obtido da planta coletada em campo em SC. Em triplicata.



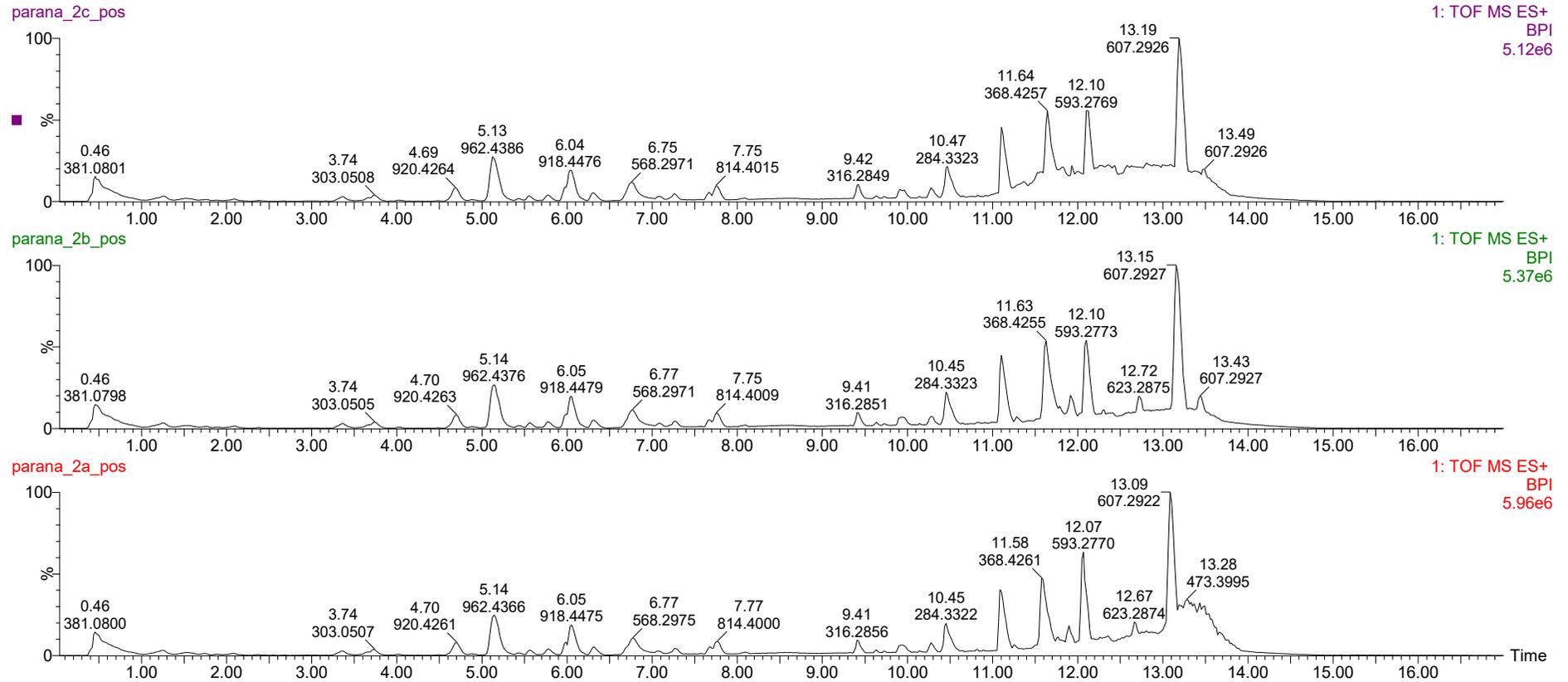
22. Cromatograma do extrato obtido da planta coletada em campo em SC. Em triplicata.



23. Cromatograma do extrato obtido da planta coletada em campo em PR. Em triplicata.

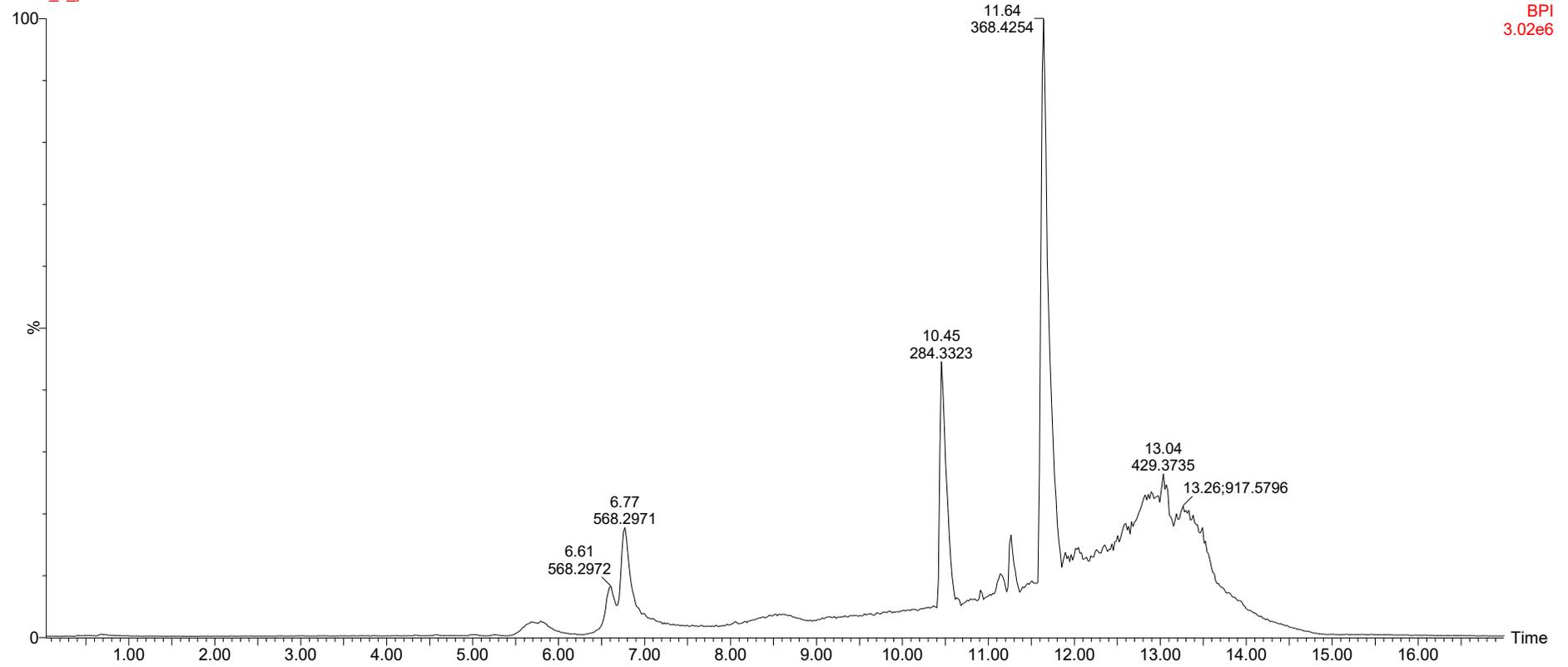


24. Cromatograma do extrato obtido da planta coletada em campo em PR. Em triplicata.



25. Branco, ESI +.

Blank_c_pos

1: TOF MS ES+
BPI
3.02e6

APENDICE

1. Sistema Arizona (BERTHOD; HASSOUN; RUIZ-ANGEL, 2005)

Table 2 The 23 Arizona system compositions

Letter	v/v/v/v				Initial % v/v				Upper/lower phase ratio	Settling time (s)
	Heptane	Ethyl acetate	Methanol	Water	Heptane	Ethyl acetate	Methanol	Water		
A	0	1	0	1	0.0	50.0	0.0	50.0	0.88	36
B	1	19	1	19	2.5	47.5	2.5	47.5	0.92	31
C	1	9	1	9	5.0	45.0	5.0	45.0	0.965	28
D	1	6	1	6	7.1	42.9	7.1	42.9	0.96	29
F	1	5	1	5	8.3	41.7	8.3	41.7	0.95	30
G	1	4	1	4	10.0	40.0	10.0	40.0	0.95	25
H	1	3	1	3	12.5	37.5	12.5	37.5	0.945	25
J	2	5	2	5	14.3	35.7	14.3	35.7	0.91	20
K	1	2	1	2	16.7	33.3	16.7	33.3	0.88	21
L	2	3	2	3	20.0	30.0	20.0	30.0	0.84	18
M	5	6	5	6	22.7	27.3	22.7	27.3	0.80	17
N	1	1	1	1	25.0	25.0	25.0	25.0	0.70	22
P	6	5	6	5	27.3	22.7	27.3	22.7	0.69	21
Q	3	2	3	2	30.0	20.0	30.0	20.0	0.68	20
R	2	1	2	1	33.3	16.7	33.3	16.7	0.68	18
S	5	2	5	2	35.7	14.3	35.7	14.3	0.70	15
T	3	1	3	1	37.5	12.5	37.5	12.5	0.735	14
U	4	1	4	1	40.0	10.0	40.0	10.0	0.76	14
V	5	1	5	1	41.7	8.3	41.7	8.3	0.78	14
W	6	1	6	1	42.9	7.1	42.9	7.1	0.775	13
X	9	1	9	1	45.0	5.0	45.0	5.0	0.77	11
Y	19	1	19	1	47.5	2.5	47.5	2.5	0.71	10
Z	1	0	1	0	50.0	0.0	50.0	0.0	0.45	10

The upper to lower phase volume ratios and settling times are given for freshly prepared heptane-containing liquid systems (± 5 s)