



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE GURUPI
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

KAROLINA LIMA NOGUEIRA

ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO FUNGO ENDOFÍTICO
Coriopsis rigida ISOLADO DE *Cochlospermum regium*

Gurupi, TO

2022

Karolina Lima Nogueira

**Estudo químico e atividades biológicas do fungo endofítico *Coriopsis rigida* isolado de
*Cochlospermum regium***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química como requisito parcial à obtenção do grau
de Mestre em Química

Orientadora: Dra. Vanessa Mara Chapla
Coorientador: Dr. Ednilson dos Santos Niculau

Gurupi, TO

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

N778e Nogueira, Karolina Lima.

Estudo químico e atividades biológicas do fungo endofítico *Coriolopsis rigida* isolado de *Cochlospermum regium*. / Karolina Lima Nogueira. – Gurupi, TO, 2022.

105 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Química, 2022.

Orientadora : Vanessa Mara Chapla

Coorientador: Ednilson Dos Santos Niculau

1. Algodãozinho do Cerrado. 2. *Coriolopsis rigida*. 3. Metabólitos secundários. 4. Atividade alelopática. I. Título

CDD 540

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

KAROLINA LIMA NOGUEIRA


ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO FUNGO ENDOFÍTICO

Corioloopsis rigida ISOLADO DE *Cochlospermum regium*


Dissertação apresentada à UFT – Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitário de Gurupi, Programa de Pós-graduação em Química foi avaliado para a obtenção do título de Mestre em Química e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data da Aprovação 01/09/2022


Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 VANESSA MARA CHAPLA
Data: 23/09/2022 10:24:52-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>


Prof^a. Dr^a. Vanessa Mara Chapla – Orientadora – UFT

Documento assinado digitalmente
 EDENILSON DOS SANTOS NICULAU
Data: 22/09/2022 19:36:49-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Edenilson dos Santos Niculau – Coorientador – UFNT

Documento assinado digitalmente
 DARLISSON DE ALEXANDRIA SANTOS
Data: 21/09/2022 14:20:06-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Darlisson de Alexandria Santos – Examinador – UFPE

Documento assinado digitalmente
 MELISSA BUDKE RODRIGUES
Data: 22/09/2022 09:02:01-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof^a. Dr^a. Melissa Budke – Examinadora – UFT

Dedico este trabalho a todos que acreditam no poder da educação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que desde o início esteve comigo. Quando o meu coração desejou a aprovação na seleção, ele acolheu o meu desejo. Quando nas dificuldades, ele me sustentou, me deu forças e colocou pessoas em meu caminho que me permitiram chegar até aqui.

À minha família pelas orações, pelo apoio, pelo porto seguro que me foi oferecido.

Agradeço à professora Dra. Vanessa Mara Chapla, que foi muito mais que uma orientadora. Uma profissional que eu admiro e uma pessoa que me inspira.

Ao meu coorientador professor Dr. Ednilson dos Santos Niculau que foi o primeiro a me incentivar e a acreditar que eu era capaz de vencer esse desafio, além de todos os ensinamentos e contribuições despendidos.

Aos membros da banca de qualificação e defesa pelos ensinamentos e contribuições de melhoria para esse trabalho.

À Universidade Federal do Tocantins, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade e a todos os professores, técnicos e funcionários envolvidos.

À Universidade Federal do Norte do Tocantins, em especial o colegiado de Química, pelo espaço, apoio e suporte para realização de parte da pesquisa.

À professora Mônica Tallarico Pupo da Universidade de São Paulo – USP campus de Ribeirão Preto e à Universidade Federal de São Carlos - UFSCar pelas análises de RMN.

À minha amiga Renata Ferreira Lins que sempre que eu dizia que a carga estava pesada ela me falava em outras palavras que a carga era pesada, mas que eu era forte.

E pensando na citação de Ernest Hemingway:

“Quem estará nas trincheiras ao teu lado?”

- E isso importa?

- Mais do que a própria guerra!”

Gostaria de agradecer aos meus colegas de curso Adão Marcos Ferreira Costa, Amanda Cristina Lança, Daniela Francisca Soares, Frankinaldo Pereira Lima, Kassio de Jesus Souza, Katia Pereira Alves Barbosa, Mayre Manny Porto Barros e Milian Pereira Santana Silva. Foi um prazer dividir “essa trincheira” com vocês!

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação.

“Saber muito é muito pouco.”
(Pontes Indestrutíveis – Charlie Brown Jr.)

RESUMO

O estudo de metabólitos secundários produzidos por fungos tem despertado interesse dos pesquisadores que buscam encontrar novas fontes de compostos que venham a contribuir para o desenvolvimento da indústria, agricultura ou saúde. O presente estudo avaliou o perfil químico por CCDC e CLAE dos extratos brutos das frações acetonitrila e hexano obtidas a partir do cultivo do fungo endofítico *Coriolopsis rigida*, isolado de *Cochlospermum regium*, em meio sólido de arroz, os quais apresentaram uma variedade de compostos. Com as mesmas técnicas comparou-se o perfil químico do extrato bruto ACN obtido do cultivo em meio sólido de arroz com perfil químico do extrato bruto acetato de etila obtido do cultivo em meio líquido Czapek. A partir das análises observou-se que o extrato obtido do fungo cultivado em arroz sinalizou uma maior diversidade de compostos que o extrato obtido do fungo cultivado em Czapek. O extrato bruto ACN foi submetido a fracionamento utilizando técnicas cromatográficas resultando em duas substâncias isoladas, tirosol (**1**) e o 1-*N*-metil-*p*-fenol-acetamida-2-*O*-glicosídeo-propan-1-ona (**2**), as quais tiveram suas estruturas elucidadas através de análises de RMN. O ensaio de atividade alelopática e toxicidade do extrato bruto ACN indicou a inibição da germinação das sementes de alface e se configurou como não tóxico para o microcrustáceo *Artemia* sp. Os compostos orgânicos voláteis do fungo endofítico cultivado em meio sólido de arroz, obtido por hidrodestilação, foram analisado por CG-EM, resultando em 16 compostos identificados e tendo como majoritário o 5-metil-2-furanocarboxaldeído, semi-quantificado com 29,24% e 620,05 µg. Também foram analisados por CG-EM os constituintes voláteis produzidos pelo fungo cultivado em meio BDA utilizando microextração em fase sólida, foram identificados 5 compostos e teve como majoritário o álcool feniletílico, semi-quantificado com 49,17% e 935,43 ng. O ensaio aleloquímico dos compostos orgânicos voláteis do fungo foi avaliado sobre a germinação de sementes de alface, apresentando baixa inibição, reduzindo as médias dos comprimentos das raízes em 18% e 8% na média dos comprimentos das plântulas. O fungo *C. rigida* apresenta-se então, como um importante objeto de pesquisa uma vez que sua produção metabólica confere uma variedade de substâncias a serem investigadas.

Palavras-Chave: Algodãozinho do Cerrado. *Coriolopsis rigida*. Metabólitos secundários. Atividade alelopática.

ABSTRACT

The study of secondary metabolites produced by fungi has aroused the interest of researchers who want to find new sources of compounds that may contribute to the development of industry, agriculture or health. The present study evaluated the chemical profile by TLC and HPLC of crude extracts of the acetonitrile and hexane fractions obtained from the cultivation of the endophytic fungus *Coriolopsis rigida*, isolated from *Cochlospermum regium*, in rice solid medium, which showed a variety of compounds. Using the same techniques, the chemical profile of the crude ACN extract obtained from cultivation in rice was compared with the chemical profile of the crude extract of the ethyl acetate obtained from cultivation in Czapek liquid medium. From analyzes it was observed that the extract obtained from the fungus grown in rice signaled a greater diversity of compounds than the extract obtained from the fungus grown in Czapek. The crude ACN extract was subjected to fractionation using chromatographic techniques resulting in two isolated substances, tyrosol (**1**) and 1-*N*-methyl-*p*-phenol acetamide-2-*O*-glycoside-propan-1-one (**2**), which had their structures elucidated through NMR analyses. The allelopathy and toxicity assay of the crude extract ACN indicated the inhibition of the germination of the lettuce seeds and it was configured as non-toxic for the microcrustacean *Artemia* sp. The volatile organic compounds of the endophilic fungus cultivated in solid rice medium, obtained by hydrodistillation, were analyzed by GC-MS, resulting in 16 identified compounds and having as majority the 5-methyl-2-furanocarboxaldehyde, semi-quantified with 29.24% and 620.05 µg. Volatile compounds produced by the fungus grown in PDA medium using solid phase microextraction were also analyzed by GC-MS, 5 compounds were identified and the majority compound was semi-quantified phenylethyl alcohol with 49.17% and 935.43 ng. The allelochemical assay of the volatile organic compounds of the fungus was evaluated on the germination of lettuce seeds, showing low inhibition, reducing the average root lengths by 18% and 8% in the average length of the seedlings. The fungus *C. rigida* presents itself as an important object of research since its metabolic production provides a variety of substances to be investigated.

Keywords: Algodãozinho do Cerrado. *Coriolopsis rigida*. Secondary metabolites. Allelopathic activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 - A proporção de cada continente e Top 10 países com maioria de novas espécies de fungos nomeadas para a ciência em 2019	21
Figura 2 - Espécie vegetal <i>Cochlospermum regium</i> : A) planta adulta; B) flor e botões florais; C) frutos.....	26
Figura 3 - 10 países com maior número de ocorrências do fungo <i>Coriolopsis rigida</i> (Berk. & Mont.) Murrill registradas no Global Biodiversity Information Facility Backbone Taxonomy 2021.	28
Figura 4 - Basidioma de <i>Coriolopsis rigida</i>	28
Figura 5 - Metabólitos produzidos pelo endófito <i>Coriolopsis rigida</i> isolado de <i>Cochlospermum regium</i>	29
Figura 6 - Rota de síntese dos compostos alelopáticos sugerido por Rice (1984 apud PIRES & OLIVEIRA, 2011).	30
Figura 7 - Esquemática do ensaio aleloquímico dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelo <i>Coriolopsis rigida</i> sobre a germinação de sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i> L.).	42
Figura 8 - Cromatografia em Camada Delgada Comparativa dos extratos brutos ACN e HEX (Clorofórmio:Metanol - 9:1 v/v). A= plaquinha revelada em luz UV ($\lambda = 254$ nm). B= plaquinha revelada em vapor de iodo.....	43
Figura 9 - Sobreposição dos Cromatogramas obtidos por CLAE dos extratos brutos ACN (rosa) e HEX (verde) ($\lambda = 254$ nm).....	44
Figura 10 - Cromatografia em Camada Delgada Comparativa dos extratos brutos ACN e CZA (Clorofórmio:Metanol - 8:2 v/v + 2 gotas de Ácido acético Glacial). A= plaquinha revelada em luz UV ($\lambda = 254$ nm). B= plaquinha revelada em vapor de iodo.	44
Figura 11 - Sobreposição dos Cromatogramas obtidos por CLAE dos extratos brutos ACN (verde) e Czapek (rosa) ($\lambda = 190$ nm).....	45
Figura 12 - Substâncias isoladas: tirosol (1) e 1- <i>N</i> -metil- <i>p</i> -fenol acetamida-2- <i>O</i> -glicosídeo-propan-1-ona (2).....	46
Figura 13 - Estrutura química do tirosol (1).....	46
Figura 14 - Correlação observada em HMBC para a substância 1	47
Figura 15 - Estrutura química do e 1- <i>N</i> -metil- <i>p</i> -fenol-acetamida-2- <i>O</i> -glicosídeo propan-1-ona (2)	48
Figura 16 - Correlação observada em HMBC para a substância 2	50

Figura 17 - Germinação das sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i> L.) nas concentrações do extrato bruto ACN 500, 1.000, 2.000, 3.000 mg/L e o controle.....	51
Figura 18 - Medições de salinidade e pH das soluções do extrato bruto ACN no ensaio de toxicidade frente aos náuplios de <i>A. salina</i>	53
Figura 19 - Compostos identificados nos cromatogramas (CG-EM) das amostras F1H, F2H e F3H.....	55
Figura 20 - Estrutura dos compostos identificados no ensaio de hidrodestilação.....	57
Figura 21 - Espectro de massas e proposta de fragmentação do composto majoritário do ensaio de hidrodestilação (5-metil-2-furanocarboxialdeído).....	58
Figura 22 - Compostos identificados nos cromatogramas (CG-EM) das amostras F1, F2 e F3.....	60
Figura 23 - Estrutura dos compostos identificados no ensaio de microextração em fase sólida.....	61
Figura 24 - Espectro de massas e proposta de fragmentação do composto majoritário do ensaio de microextração em fase sólida (álcool feniletílico).....	62
Figura 25 - Ensaio aleloquímico dos compostos orgânicos voláteis do fungo <i>Corioloopsis rigida</i> com a germinação de sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i>): A) Controle plântulas; B) Plântulas x Fungo; C) Controle fungo.....	63
Figura 26 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO- <i>d</i> 6, 600 MHz) da substância 1	73
Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO- <i>d</i> 6, 600 MHz) da substância 1 δ 5-8ppm.....	74
Figura 28 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO- <i>d</i> 6, 600 MHz) da substância 1 δ 2-4ppm.....	75
Figura 29 - Espectro COSY da substância 1 (DMSO- <i>d</i> 6, 600 MHz).....	76
Figura 30 - Espectro HSQC da substância 1 (DMSO- <i>d</i> 6, 600 MHz).....	77
Figura 31 - Espectro HMBC da substância 1 (DMSO- <i>d</i> 6, 600 MHz).....	78
Figura 32 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO- <i>d</i> 6, 600 MHz) da substância 2	79
Figura 33 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO- <i>d</i> 6, 600 MHz) da substância 2 com supressão da água do DMSO.....	80
Figura 34 - Espectro COSY da substância 2 (DMSO- <i>d</i> 6, 600 MHz).....	81
Figura 35 - Espectro HSQC da substância 2 (DMSO- <i>d</i> 6, 600 MHz).....	82
Figura 36 - Espectro HMBC da substância 2 (DMSO- <i>d</i> 6, 600 MHz).....	83
Figura 37 - Cromatogramas das amostras F1H, F2H e F3H.....	84
Figura 38 - Cromatogramas das amostras F1, F2 e F3.....	85
Figura 39 - Espectro de massas do 1-(2-furanyl)etanona.....	86
Figura 40 - Espectro de massas do 5-metil-2-furanocarboxialdeído.....	86

Figura 41 - Espectro de massas do 2-etil-5-metilpirazina	87
Figura 42 - Espectro de massas do 1-(2-furanyl)-1-Propanona.....	87
Figura 43 - Espectro de massas do 2-etenil-6-metil-pirazina	88
Figura 44 - Espectro de massas do 2-acetiltiazol	88
Figura 45 - Espetro de massas do 2-acetil-5-metil-furano	89
Figura 46 - Espectro de massas do 3,4,5-trimetil-2-Ciclopenten-1-ona.....	89
Figura 47 - Espectro de massas do Benzenoacetaldeído	90
Figura 48 - Espectro de massas do 1-(1H-pirrol-2-il)etanona.....	90
Figura 49 - Espectro de massas do 2,6-dietilpirazina.....	91
Figura 50 - Espectro de massas do Álcool feniletílico	91
Figura 51 - Espectro de massas do 2-(2-furanilmetil)-5-metil-furano	92
Figura 52 - Espectro de massas do 4-fenilpiridina	92
Figura 53 - Espectro de massas do 3,5-di-terc-Butil-4-hidroxibenzaldeído.....	93
Figura 54 - Espectro de massas do 1-Hexadecanol	93
Figura 55 - Espectro de massas do Acetato de isopentil	94
Figura 56 - Espectro de massas do Ácido acético, éster 2-feniletílico	94
Figura 57 - Espectro de massas do (4R,4aS,6S)-4,4a-Dimetil-6-(prop-1-en-2-il)- 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahidronaftaleno	95
Figura 58 - Espectro de massas do α -Muuroleno	95
Fluxograma 1 - Metodologia de fracionamento de 500 mg do extrato bruto ACN.	36
Gráfico 1 - Germinação das sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i> L.) nas concentrações do extrato bruto ACN 500, 1.000, 2.000, 3.000 mg/L e o controle.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados de RMN (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) da substância 1 (δ em ppm e <i>J</i> em Hz).	47
Tabela 2 - Dados de RMN (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) da substância 2 (δ em ppm e <i>J</i> em Hz).	49
Tabela 3 - Comprimento médio total das raízes e plântulas em milímetros (mm) do ensaio aleloquímico do extrato bruto ACN.	51
Tabela 4 - Médias ponderadas dos constituintes químicos identificados por CG-EM dos ensaios de hidrodestilação.	56
Tabela 5 - Médias ponderadas dos constituintes químicos identificados por CG-EM dos ensaios de microextração em fase sólida.	59
Tabela 6 - Comprimento médio total das raízes e plântulas em milímetros (mm) do ensaio aleloquímico dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelo fungo <i>Coriolopsis rigida</i> . ..	64
Tabela 7 - Compostos identificados e não identificados da amostra F1H.	96
Tabela 8 - Compostos identificados e não identificados da amostra F2H.	98
Tabela 9 - Compostos identificados e não identificados da amostra F3H.	100
Tabela 10 - Compostos identificados e não identificados da amostra F1.	102
Tabela 11 - Compostos identificados e não identificados da amostra F2.	103
Tabela 12 - Compostos identificados e não identificados da amostra F3.	104

LISTA DE SIGLAS

%_X – porcentagem do composto identificado;

Σ_T – somatório das áreas dos picos cromatográficos de todos os compostos identificados e não identificados (Não considerando as áreas dos picos dos compostos excluídos);

ACN – Acetonitrila;

AcOEt – Acetato de etila;

BDA – Batata Dextrose Ágar;

C1 – Controle 1;

C1H – Controle 1 Hidrodestilação;

C_A = massa do padrão interno adicionada;

CC – Cromatografia em Coluna;

CCDC - Cromatografia em Camada Delgada Comparativa;

CE₅₀ – Concentração efetiva 50%;

CG/EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas;

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;

CNCFlora – Centro Nacional de Conservação da Flora;

CZA – Czapek;

CLAE-DAD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos;

COSY – Homonuclear Correlation Spectroscopy;

COVs – Compostos orgânicos voláteis;

C_X – Massa do composto identificado;

DMSO – Dimetilsulfóxido;

DMSO-*d*₆ – Dimetilsulfóxido deuterado;

DNA – Ácido desoxirribonucleico;

F1 – Fungo 1;

F2 – Fungo 2;

F3 – Fungo 3;

F1H – Fungo 1 Hidrodestilação;

F2H – Fungo 2 Hidrodestilação;

F3H – Fungo 3 Hidrodestilação;

HEX – Hexano;

HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Coherence;

HSQC – Heteronuclear Multiple Quantum Coherence;

i – diferença entre o número de carbono que elui antes (HA) e depois (HD);
IR – Índice de Retenção;
SI – Índice de Similaridade;
MIC - Minimum Inhibitory Concentration;
MRSA - Methicillin-resistant Staphylococcus aureus;
N – Número de carbonos do hidrocarboneto que eluíram antes (HA);
pH – Potencial Hidrogeniônico;
PLL – Partição Líquido-Líquido;
PS – Poliestireno;
QSMs - quorum-sensing molecules;
RMN – Ressonância magnética nuclear;
S_A – área do pico cromatográfico do padrão interno;
SPME - Solid Phase Micro Extration;
S_X – área do pico cromatográfico do composto identificado;
TRX – tempo de retenção do composto (X);
TRHA – tempo de retenção do hidrocarboneto que elui antes do composto (X);
TRHD – tempo de retenção do hidrocarboneto que elui depois do composto (X);
UFNT – Universidade Federal do Norte do Tocantins;
UFPE – Universidade Federal de Pernambuco;
UFT – Universidade Federal do Tocantins;
USP – Universidade de São Paulo;
UV – Ultravioleta.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVO	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 Fungos	20
3.2 Fungos Endofíticos	22
3.2.1 Importância dos Fungos Endofíticos	23
3.3 Compostos Produzidos por Fungos com Bioatividades	23
3.4 Cerrado	24
3.5 Planta Hospedeira – <i>Cochlospermum Regium</i>	25
3.6 Fungo – <i>Coriopsis rigida</i>	27
3.7 Atividade Aleloquímica	29
4 METODOLOGIA	32
4.1 Crescimento do fungo endofítico em meio de arroz e meio Czapek	32
4.1.1 Meio de arroz.....	32
4.1.2 Meio Czapek.....	32
4.2 Obtenção dos extratos brutos	33
4.2.1 Meio de arroz.....	33
4.2.2 Meio Czapek.....	33
4.3 Avaliação do perfil químico	34
4.3.1 Meio de arroz.....	34
4.3.2 Meio Czapek.....	34
4.4 Isolamento e elucidação dos compostos químicos isolados	35
4.5 Ensaios aleloquímico e de toxicidade aguda	37
4.5.1 Teste de germinação (Alelopatia).....	37
4.5.2 Ensaio de toxicidade aguda	37
4.6 Caracterização dos Compostos Orgânicos Voláteis	38
4.6.1 Extração por hidrodestilação	38
4.6.2 Método microextração em fase sólida (SPME).....	39
4.6.3 Identificação dos compostos orgânicos voláteis.....	40

4.7 Ensaio aleloquímico dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelo fungo endofítico <i>Coriolopsis rigida</i>	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Avaliação do perfil químico	43
5.1.1 Meio de arroz.....	43
5.1.2 Meio Czapek.....	44
5.2 Isolamento e elucidação dos compostos químicos isolados	45
5.2.1 Substância 1 (tirosol).....	46
5.2.2 Substância 2 (1- <i>N</i> -metil- <i>p</i> -fenol acetamida-2- <i>O</i> -glicosídeo-propan-1-ona)	48
5.3 Ensaio aleloquímico e de toxicidade aguda	50
5.3.1 Teste de germinação (Alelopatia).....	50
5.3.2 Ensaio de toxicidade aguda	52
5.4 Caracterização dos Compostos Orgânicos Voláteis	53
5.4.1 Extração por hidrodestilação	53
5.4.2 Método microextração em fase sólida (SPME).....	59
5.5 Ensaio aleloquímico dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelo fungo endofítico <i>Coriolopsis rigida</i>	63
6 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICE	73

INTRODUÇÃO

Os fungos endofíticos são microrganismos que habitam os tecidos internos das plantas e que, dependendo das condições, não causam prejuízos perceptíveis ao hospedeiro (CHAPLA, BIASETTO & ARAUJO, 2013; STROBEL, 2018; GUPTA *et al.*, 2020). Esses microrganismos podem ser isolados de diversas partes das plantas como raízes, caules, folhas, frutos, sementes e flores (STROBEL, 2018).

Muitos têm sido os estudos sobre fungos endofíticos nos quais eles foram capazes de sintetizar *in vitro* metabólitos secundários bioativos idênticos aos da planta hospedeira (CONTI, GUIMARÃES, & PUPO, 2012; CHAPLA, BIASETTO & ARAUJO, 2013), o que os tornam uma rica fonte de produtos naturais bioativos (GUPTA *et al.*, 2020) de interesse farmacêutico e comercial (STROBEL, 2018).

Um bom exemplo disso é a droga anticancerígena de bilhões de dólares, o taxol, usada com sucesso no tratamento de diversos cânceres. Nenhuma outra espécie de planta teve relato de produzir o taxol senão pelo gênero *Taxus* (árvores de teixo) da família Taxaceae pertencente à ordem Coniferales de Gimnospermas. No entanto, muitos trabalhos relataram o isolamento do taxol de diversos fungos endofíticos, inclusive de fungos de várias outras plantas de espécies diferentes da espécie *Taxus* (GUPTA *et al.*, 2020).

A busca por novos agentes terapêuticos para tratar necessidades médicas que permanecem desatendidas também é causa motivadora nos estudos de produtos naturais, que desempenham importante papel na descoberta de medicamentos (KARTHIKEYAN, JOSEPH & NAIR, 2022). Nesse sentido, os fungos estão entre as mais importantes fontes de metabólitos secundários estruturalmente diversos e biologicamente importantes (ZHANG & FENG, 2022). A exemplo temos os importantes fármacos terapêuticos produzidos por fungos endofíticos, podofilotoxina (atividade anticâncer, serve como precursora de três principais fármacos quimioterápicos: etoposide, teniposide e fosfato etoposide), alcaloides vinca (notáveis quimiotáticas utilizadas no tratamento de neoplasias hematológicas e linfáticas), camptotecina (pertence às drogas quimioterápicos mais importantes) e ácido fusídico (antibiótico particularmente importante em infecções por estafilococos, incluindo o *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA)) (GALINDO-SOLÍS & FERNÁNDEZ, 2022).

A possibilidade de, a partir de fungos endofíticos, descobrir novos produtos naturais bioativos (STROBEL, 2018), ou de obter esses produtos de importância medicinal minimizando a exploração de plantas medicinais é de grande relevância levando-se em conta

que essas plantas podem ter taxa de crescimento lenta, ser de difícil acesso e serem raras, sem mencionar o aumento da população mundial que necessita cada vez mais desses produtos (GUPTA *et al.*, 2020).

Como compromisso da Estratégia Global para Conservação de Plantas, o Brasil assumiu como meta a produção de uma lista abrangendo todas as plantas, algas e fungos encontrados no país. Essa lista foi finalizada e disponibilizada de forma online em maio de 2010 e com uma revisão detalhada publicaram o Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil, o qual contém informações sobre 40.989 espécies de plantas, algas e fungos nativos e não nativos (THE BRAZIL FLORA GROUP, 2018).

O Cerrado, segundo maior Bioma do Brasil, possui 12.356 espécies de plantas já listadas (RESENDE & GUIMARÃES, 2007) e é berço da *Cochlospermum regium*. A *C. regium*, conhecida como algodão-do-campo, tem suas raízes utilizadas na medicina popular no tratamento de doenças como infecções uterinas, intestinais e ovarianas, gastrite, úlceras, artrite e afecções da pele (ANTUNES, 2009; CAMILLO *et al.*, 2009). Essa espécie encontrada não somente no Cerrado, mas também nos biomas Amazônia e Mata Atlântica está sob atenção na Lista Vermelha da Flora Brasileira versão 2012.2, pois o extrativismo influenciado pelo potencial medicinal de suas raízes pode futuramente colocá-la como ameaçada de extinção (CNCFLORA, 2012).

Considerando a atual situação acerca da inviabilidade da produção de fitoterápicos industrializados a partir da *C. regium* devido à ameaça que essa espécie enfrenta, o estudo de sua microbiota fúngica e diversidade química se torna relevante. Dessa forma, o fungo endofítico identificado como *Corioloopsis rigida*, isolado de *C. regium*, foi objeto de estudo na avaliação de seus metabólitos secundários, visando a descoberta de novos metabólitos bioativos e contribuir para a preservação da espécie com a possibilidade de oferecer uma nova fonte dos compostos úteis ao homem.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o perfil químico e a atividade biológica do fungo endofítico *Coriolopsis rígida*, isolado da folha de *Cochlospermum regium*, cultivado em diferentes meios e variando métodos de extração.

2.2 Objetivos específicos

- Cultivar o fungo endofítico em meio de arroz e meio Czapek;
- Obter os respectivos extratos brutos;
- Avaliar o perfil químico dos extratos por CCDC e CLAE;
- Realizar o isolamento e elucidção estrutural dos constituintes majoritários obtidos do extrato bruto, utilizando técnicas cromatográficas e espectroscópicas, respectivamente;
- Avaliar o extrato bruto nos ensaios das atividades aleloquímica e toxicidade frente à *Artemia salina*;
- Obter os compostos orgânicos voláteis da fermentação fúngica em meio sólido de arroz utilizando hidrodestilação;
- Avaliar o perfil de compostos voláteis dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação e microextração em fase sólida por CG-EM.
- Avaliar a atividade alelopática dos compostos voláteis produzidos pelo fungo endofítico;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fungos

O reconhecimento da importância dos fungos para o bem-estar humano é recente e por muito tempo os fungos foram deixados de lado se comparados a pesquisas com plantas e animais (CANUTO *et al.*, 2012; WILLIS, 2018). Muitos dos primeiros escritos sobre fungos os descreviam como plantas simples e inferiores. Foram os estudos das características dos fungos como parede celular, métodos para digerir e armazenar alimentos e DNA que os classificaram em um reino próprio e os colocaram mais próximos dos animais do que das plantas (WILLIS, 2018).

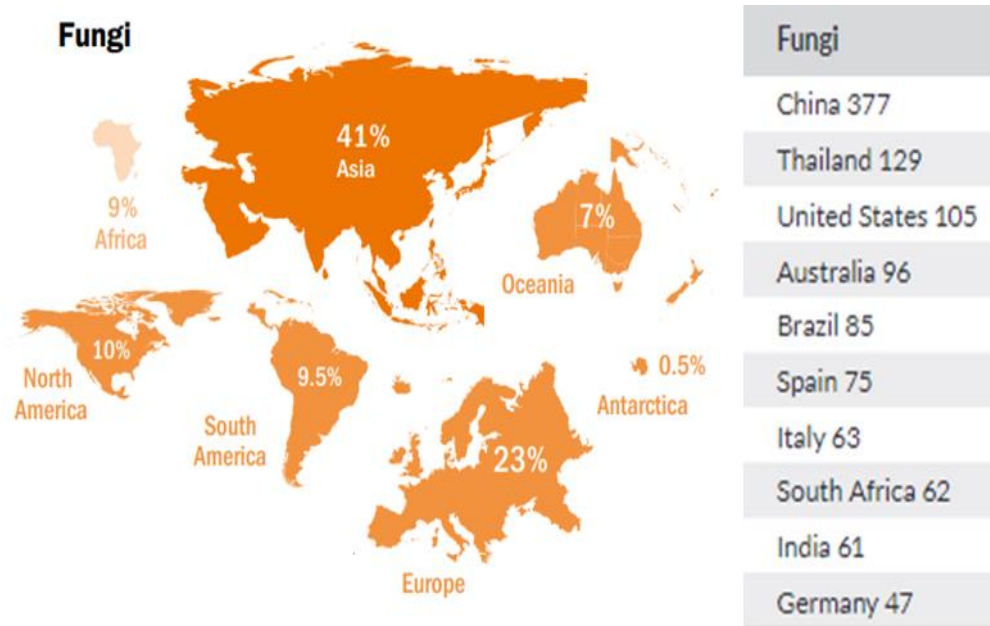
Eles são organismos eucariontes, sua membrana celular possui esteróis e a parede celular possui glicanos, mananas e quitina sem peptideoglicano. Seu metabolismo é heterotrófico, em sua maioria são aeróbios, mas podem ser anaeróbios facultativos. Se reproduzem de forma sexuada e assexuada com a produção de esporos (TORTORA, 2017).

A estimativa da diversidade de espécies de fungos ainda é incerta. Em 1991 a estimativa era de 1,5 milhões de espécies baseada na proporção de fungos conhecidos para espécies de plantas de 6:1 em regiões onde o estudo de fungos era considerado bem estudado (BLACKWEL, 2011). As estimativas variam de 500 mil a quase 10 milhões de espécies, sendo que a maior parte dos micologistas apoiam a faixa de 1,5 a 5 milhões de espécies de fungos no mundo (HAWKSWORTH & LÜCKING, 2017).

O relatório publicado em 2018, State Of The World's Fungi (2018 apud ZANNE *et al.*, 2020) relatou que havia aproximadamente 144 mil espécies de fungos descritas, o que expõe um grande abismo entre o número de espécies estudadas e o número de espécies estimadas (GOLDMAN, 2020).

Todos os anos, à medida que os cientistas exploram os ecossistemas do mundo, esse abismo diminui. Em 2019 os micologistas registraram 1.886 novos fungos e a América do Sul contribuiu com 9,5% dos novos registros, ficando em 4º lugar no ranking mundial (Figura 1). Dentro desse contexto, o Brasil ficou entre os 10 principais países com a maioria das novas espécies de fungos descritas em 2019. Nesse ranking mundial ele ocupou o 5º lugar com 85 novas espécies de fungos publicadas, ficando atrás da China (377), Tailândia (129), Estados Unidos (105) e Austrália (96) (CHEEK *et al.*, 2020).

Figura 1 - A proporção de cada continente e Top 10 países com maioria de novas espécies de fungos nomeadas para a ciência em 2019



Fonte: “Adaptado de” Cheek *et al.*, 2020

O reino está basicamente organizado nas classes Basidiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Blastocladiomycota e Chytridiomycota e são capazes de sobreviver em uma variedade de condições de crescimento e interações biológicas (GOLDMAN, 2020). Crescem em quase todos os habitats da Terra, mas considera-se que regiões tropicais têm a maior diversidade dos grupos de organismos. O pensamento por trás da necessidade de salvar as florestas tropicais tem influência nos potenciais produtores de drogas que podem ser encontrados ali, entre eles os fungos (BLACKWEL, 2011).

Eles desempenham papéis essenciais em muitos ecossistemas (GOLDMAN, 2020), são importantes na cadeia alimentar decompondo matéria vegetal morta, importantes para as plantas, pois quase todas dependem de simbioses com fungos que auxiliam na absorção de minerais e água do solo e importantes para os animais, entre eles o homem, seja no consumo como alimentos, na produção de alimentos e fármacos (TORTORA, 2017).

Os fungos também podem ser patógenos de plantas e animais podendo causar sérias consequências de caráter econômico e ambiental. Como por exemplo, epidemias de doenças de plantas causadas por fungos (fome da batata irlandesa no século XIX, praga do olmo holandês e praga da castanha no século XX), e doenças em animais causadas por fungos como a síndrome do nariz branco, que em 2007 se espalhou em regiões de Nova York, Estados Unidos e Canadá diminuindo consideravelmente o número de morcegos, sendo que a espécie *Myotis lucifugus* tem mais de 99% de chances de se tornar extinta no local (FISHER *et al.*, 2012).

É de se perceber que os microrganismos podem alterar o ambiente ao redor e afetar quase todos os processos da biosfera (GUPTA *et al.*, 2020). Fungos associados a plantas podem ser agrupados entre fungos endofíticos, epifíticos e fitopatogênicos. Os endofíticos são não patogênicos e colonizam o interior dos tecidos saudáveis, os epifíticos se diferem dos endofíticos porque habitam na superfície dos vegetais e se diferem dos fitopatogênicos por não causarem doenças nas plantas (CANUTO *et al.*, 2012). Essa associação entre fungos endofíticos e seus hospedeiros não é definitiva, podendo um fungo endofítico se tornar patogênico em um estado de desequilíbrio (GUPTA *et al.*, 2020).

3.2 Fungos Endofíticos

Os fungos endofíticos representam uma ampla gama de grupos taxonômicos (BLACKWEL, 2011) e foram divididos em dois grupos: clavicipitáceos e não clavicipitáceos. Os quais se distinguem por suas relações evolutivas, taxonômicas, relações com a planta hospedeira e funções ecológicas (AMORIM, 2018; YAN *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2020).

Os endofitos clavicipitáceos apresentam um único filo e possuem uma pequena faixa de hospedeiros, geralmente são relatados por infectar gramíneas. Já os não clavicipitáceos possuem vários filos e uma ampla gama de plantas hospedeiras (AMORIM, 2018; GUPTA *et al.*, 2020). Os não clavicipitáceos têm recebido grande interesse por suas funções ecológicas e potencial para várias aplicações biotecnológicas (YAN *et al.*, 2018).

Com relação ao modo de transmissão eles são divididos em quatro classes. As classes 1 e 2 podem ser transmitidas de modo horizontal ou vertical e as classes 3 e 4 apenas de modo vertical. Os fungos endofíticos do grupo clavicipitáceos seguem o modo de transmissão classe 1 e os não clavicipitáceos seguem o modo de transmissão da classe 2, 3 e 4. A transmissão vertical ocorre na penetração das hifas no embrião das sementes e a transmissão horizontal ocorre entre plantas através de esporos assexuados e sexuados (GUPTA *et al.*, 2020).

Em geral os microrganismos endofíticos são estudados a partir de dois objetivos principais:

- 1) Bioprospecção de metabólitos secundários – os estudos são voltados aos potenciais metabólitos da planta hospedeira, potenciais metabólitos do fungo e compostos orgânicos voláteis;

- 2) Entendimento da interação planta-hospedeiro – são voltados à adaptação, tolerância ao estresse e produtividade aprimorada, efeito da simbiose no metabolismo secundário da planta e no metabolismo secundário do microrganismo (FLORINDO, 2019).

3.2.1 Importância dos Fungos Endofíticos

Estudos de fungos endofíticos já relataram sua importância no combate a fungos fitopatogênicos de plantas, podendo ser uma solução para combater doenças em plantas causadas por fungos evitando o uso de pesticidas químicos. Também podem influenciar o crescimento de plantas e auxiliar na tolerância da planta a metais pesados (YAN *et al.*, 2018).

Na lista de compostos produzidos por fungos endofíticos é possível encontrar agentes anticâncer, antibióticos, compostos imunossupressores, antioxidantes e até hidrocarbonetos relacionados aos combustíveis (STROBEL, 2018; YAN *et al.*, 2018).

Espécies de fungos endofíticos dos gêneros *Chaetomium*, *Piriformospora*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Epicoccum*, *Penicillium* e *Trichoderma* são conhecidos por tornar a planta hospedeira mais tolerante a estresses bióticos e abióticos (RAJANI *et al.*, 2021).

Os estudos dos metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos traz consigo possibilidades de substituir pesticidas sintéticos no combate de microrganismos patogênicos (YAN *et al.*, 2018), de fornecer novos fármacos (FLORINDO, 2019) e de auxiliar no desenvolvimento da planta mesmo com estresses bióticos e abióticos (RAJANI *et al.*, 2021). Também traz a possibilidade de ajudar na preservação da biodiversidade de várias espécies de plantas que são amplamente exploradas por suas propriedades medicinais. Isso porque a interação simbiótica entre fungo e planta favorece a capacidade do fungo em produzir metabólitos que são produzidos pela planta hospedeira (CANUTO *et al.*, 2012; GUPTA *et al.*, 2020).

3.3 Compostos Produzidos por Fungos com Bioatividades

Substâncias bioativas em geral são derivadas de metabolismo secundário (CANUTO *et al.*, 2012). Os metabólitos secundários são moléculas que não são diretamente necessárias para o desenvolvimento de seu produtor, mas, elas são associadas à adaptação do vegetal no ambiente em que estão, aos mecanismos de defesa e são fundamentais nas interações metabólicas entre planta hospedeira e fungo endofítico (FLORINDO, 2019). Eles são de baixo peso molecular e pertencem às classes de policetídeos, alcalóides, terpenos e peptídeos não ribossômicos (CANUTO *et al.*, 2012). Eles têm recebido atenção devido ao potencial para o desenvolvimento de novos fármacos que são considerados mais vantajosos se comparados aos sintéticos (FLORINDO, 2019).

A descoberta por Fleming em 1929 do metabólito fúngico penicilina produzido pelo fungo *Penicillium chrysogenum* abriu horizontes para estudos desses compostos secretados por fungos (SPECIAN *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2020; GUPTA *et al.*, 2020). Atualmente 10 dos 20 produtos mais rentáveis no início deste século são de processamentos industriais envolvendo fungos (SPECIAN *et al.*, 2014).

Os fungos são capazes de produzir alguns dos antibióticos e medicamentos anticâncer mais amplamente usados. Como os penicilenóis, extraídos de *Penicillium* sp., que são citotóxicos a numerosas linhas celulares, o taxol, isolado de *Taxomyces andreanae*, que é anticâncer, Clavatol (*Torreya mairei*), sordaricina (*Fusarium* sp.), jesterona (*Pestalotiopsis jesteri*) e javanicina (*Chloridium* sp.) são todos conhecidos por possuírem fortes propriedades antibacterianas e antifúngicas contra vários agentes infecciosos de origem alimentar e a pestacina, isolada de *P. microspora*, possui excelentes propriedades antioxidantes (GOUDA *et al.*, 2016).

A produção de metabólitos secundários é na verdade uma resposta fisiológica a múltiplos estímulos bióticos e abióticos, assim um fungo pode produzir uma variedade de metabólitos secundários. Como é o caso do fungo *Lasiodiplodia theobromae* que já tem relatos de 119 compostos produzidos por ele, destes 66 já foram relatados algum tipo de bioatividade como antibacteriana, citotóxica, antimicrobiana, anti-inflamatória, atividade citotóxica contra câncer humano, atividade antioxidante entre outras (SALVATORE, ALVES & ANDOLFI, 2020).

O trabalho de revisão de Ribeiro *et al.* (2020) levantou a identificação de 303 compostos químicos produzidos por 60 cepas de fungos endofíticos no Brasil. Esses 303 compostos foram avaliados e apresentaram principalmente bioatividades citotóxicas, antibacteriana, antifúngica e antiparasitária. O estudo ainda reforça que a diversidade de fungos endofíticos no país pode estar na casa dos milhares, no entanto a maioria nunca foi estudada.

3.4 Cerrado

Resultados divulgados no Catálogo de Plantas e Fungos colocaram o Brasil como o país com maior número de espécies de plantas do mundo (THE BRAZIL FLORA GROUP, 2018). Desde 1990 ele tem estado consistentemente entre os 3 países que produziram o maior número de espécies de planta recém descritas. Em 2019 foram 216 espécies catalogadas, o que o manteve em primeiro lugar no ranking mundial, lugar que ocupa desde 2008. Todos os anos

200 ou mais novas espécies de plantas são descritas no Brasil, o que corresponde a 10% do total mundial (CHEEK *et al.*, 2020).

Com 22% do território brasileiro, o Cerrado é o segundo maior bioma do país, abrigando uma diversidade biológica que se compara à biodiversidade de florestas úmidas como a Amazônica e Atlântica. O Bioma é considerado um dos 35 hotspots de biodiversidade do mundo devido à intensa degradação que seus habitats têm sofrido (MARTINELLI, MESSINA & FILHO, 2014).

Das 12.070 espécies de flora catalogadas no cerrado brasileiro, 645 encontram-se ameaçadas de extinção (MARTINELLI, MESSINA & FILHO, 2014). A intensificação de atividades como a agricultura e a criação de gado nesse bioma tem contribuído para alteração desse habitat e ameaça levar a elevadas perdas da biodiversidade (LOYOLA *et al.*, 2014).

Com relação à diversidade de fungos, Forzza *et al.* (2010) registraram 291 espécies no Cerrado, ficando atrás dos Biomas Mata Atlântica com 1.664 espécies, Caatinga com 734 espécies e Amazônia com 519 espécies.

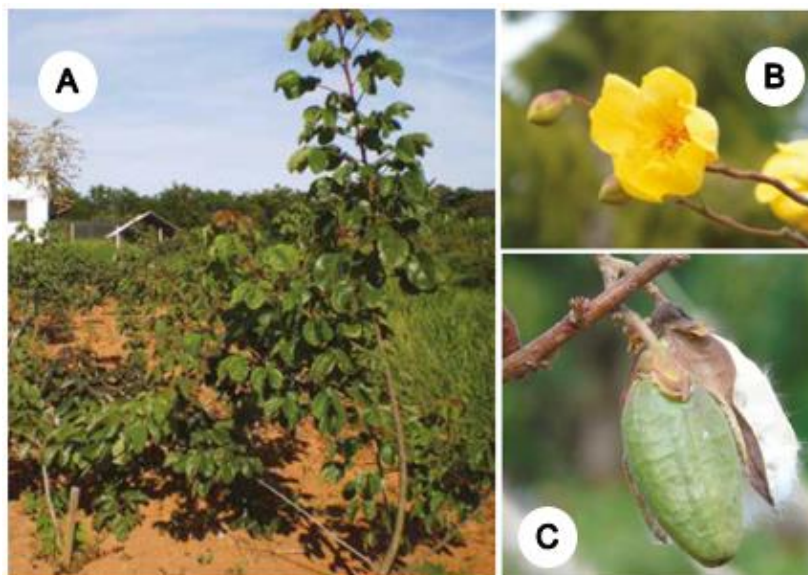
3.5 Planta Hospedeira – *Cochlospermum Regium*

A *Cochlospermum regium* (Figura 2) é uma espécie nativa do Brasil onde pode ser encontrada nos estados Alagoas, Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Rondônia, São Paulo, Sergipe e Tocantins. É comum em ambientes de cerrado, savana amazônica, caatinga e pantanal (VIEIRA, CAMILLO & CORADIN, 2018).

Está entre as plantas que compõem a Farmacopeia Popular do Cerrado. Suas raízes são utilizadas na forma de fatias, cavaco ou pó, no preparo de infusões e garrafadas que são indicadas para tratamentos de inflamações uterinas, intestinais, ovarianas, gastrite, úlcera, cravos, espinhas, manchas de pele, regulador menstrual entre outras. Os chás das raízes e das cascas também são utilizados na medicina popular (VIEIRA, CAMILLO & CORADIN, 2018).

Na CNCFlora (2012) a espécie é classificada abundante e amplamente distribuída, portanto, consta como espécie não ameaçada, mas devido ao potencial medicinal de suas raízes, o extrativismo da espécie pode futuramente categorizá-la como ameaçada de extinção.

Figura 2 - Espécie vegetal *Cochlospermum regium*: A) planta adulta; B) flor e botões florais; C) frutos.



Fonte: “Adaptado de” Vieira, Camillo & Coradin (2018).

Abaixo segue relatos de alguns estudos envolvendo a investigação de metabólitos extraídos da planta e ensaios de bioatividade já publicados:

Estudos de Pedroso *et al.* (2019) detectaram a presença de compostos fenólicos (1.443,04 mg/g \pm 8,34), flavonoides (708,75 mg/g \pm 12,54), e flavonóis (306,97 mg/g \pm 10,29) no extrato hidrometanólico das raízes da *C. regium* e análises de CLAE-DAD apresentou três ácidos fenólicos: ácido gálico, ácido cafeíco e ácido elágico.

Carvalho *et al.* (2018) estudou o efeito inibitório do extrato acetato de etila das raízes da *C. regium* frente às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Análise do extrato das raízes em acetato de etila por CLAE indicou a presença de ácido gálico e Dihidrokaempferol-3-*O*- β -glucopiranoside nas quantidades de 3,07 e 22,61 mg/g respectivamente, e apresentou atividade inibitória contra as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. agalactiae*, contra as bactérias gram-negativas *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. Com as demais bactérias do estudo o efeito inibitório foi considerado insatisfatório. Os testes com as leveduras também apresentaram efeito inibitório, exceto para *Candida tropicalis*.

Almeida-Apolonio *et al.* (2018) em seus estudos observaram que o extrato etanólico de folhas da *C. regium* teve efeito inibitório com MIC variando de 62,5 a 250 μ g/mL contra o fungo *Cryptococcus gattii*, agente primário da criptococose que é uma infecção predominante em pacientes imunocomprometidos. Também apresentou atividade antibiofilme reduzindo em 42,58% das células viáveis de *C. gattii* na concentração 10 mg/mL do ex, indicando seu

potencial uso na profilaxia uma vez que a formação de biofilmes contribui para a permanência dos microrganismos no hospedeiro e auxilia na proteção contra antimicrobianos.

Leme *et al.* (2017) também estudaram o extrato etanólico das folhas de *C. regium* o qual foi detectado $87,4 \pm 0,9$ miligramas equivalentes de quercetina (mg/EQ) de flavonoides, $167,2 \pm 2,7$ miligramas equivalentes de ácido gálico (mg/EAG) do total de compostos fenólicos e $21,7 \pm 0,1$ miligramas equivalentes de catequina (mg/ECA) de taninos condensados. Além disso, a atividade antimicrobiana contra microrganismos associados à infecção urinária foi avaliada e apresentou baixa atividade contra *Escherichia coli* (ATCC 25922) a 1 mg/mL e atividade moderada contra *Candida tropicalis* (ATCC 750) a 0,5 mg/mL.

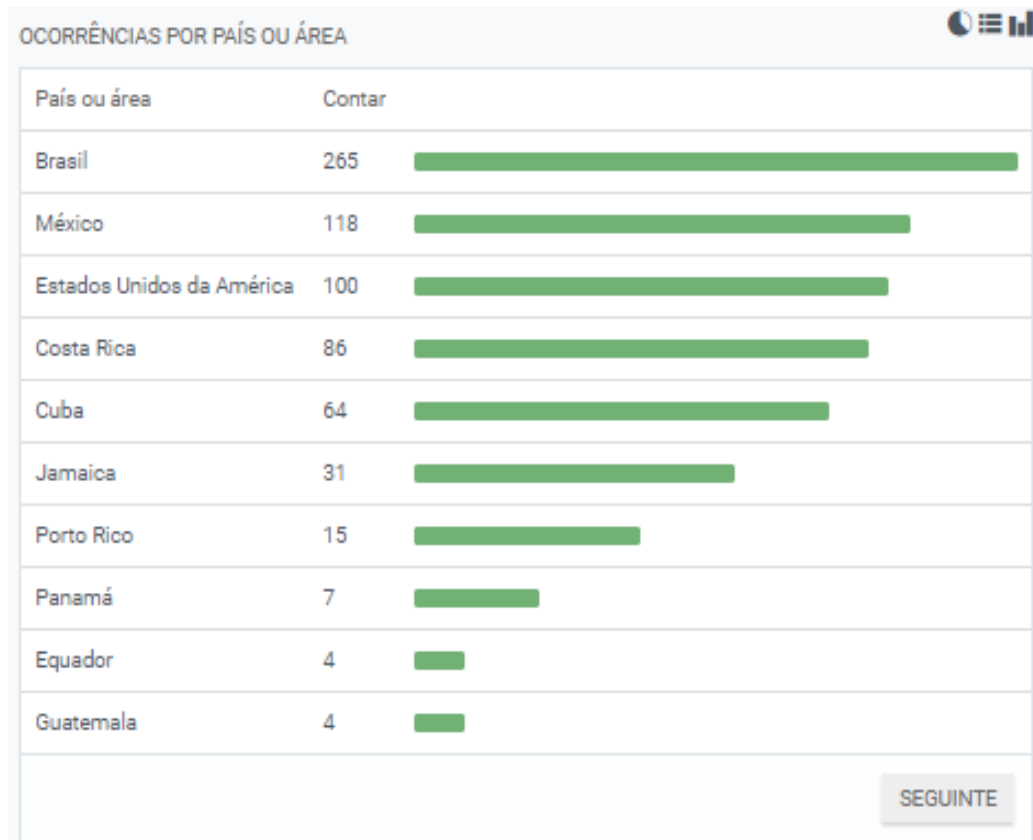
Moraes (2018) isolou 53 fungos endofíticos a partir de folhas e caules jovens e sadios da *C. regium* pelos métodos de secção e maceração, os quais foram nomeados por Cr-n, sendo Cr vindo de *C. regium* e n o número do fungo isolado. Dos fungos Cr-1 ao Cr-53, três foram identificados, sendo o fungo Cr-1 identificado como *Coriolopsis rigida* com 99% de similaridade genética por Dantas (2020), o fungo Cr-8 identificado como *Asordaria Conoidea* com 100% de similaridade do material genético por Arruda (2019) e o fungo Cr-32 identificado por Moraes (2020) como *Phomopsis* sp. com 99% de semelhança.

3.6 Fungo – *Coriolopsis rigida*

O fungo *Coriolopsis rigida* (Berk. & Mont.) Murrill possui a seguinte classificação: filo Basidiomycota, classe Agaricomycetes, ordem Poliporais e família Polyporaceae. A espécie apresenta ocorrência em 34 países e o Brasil é o país que apresenta a maioria das ocorrências (Figura 3) (GBIF, 2021).

É uma espécie neotropical com basidiomas efusos-reflexos amarelados que provocam a podridão branca da madeira (Figura 4) (SAPARRAT *et al.*, 2014). Estudos desse fungo estão concentrados em sua capacidade de degradar lignina, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e corantes (DÍAZ *et al.*, 2010). A liberação de enzimas extracelulares como lignina-peroxidases, peroxidases dependentes de Mn e lacase tem sido associada à capacidade de degradação de lignina por parte dos fungos da podridão branca e essas mesmas enzimas podem participar tanto na remoção de fenóis monoméricos quanto na descoloração de resíduos de azeitona (SAMPEDRO *et al.*, 2004).

Figura 3 - 10 países com maior número de ocorrências do fungo *Coriolopsis rigida* (Berk. & Mont.) Murrill registradas no Global Biodiversity Information Facility Backbone Taxonomy 2021.



Fonte: GBIF, 2021

Figura 4 - Basidioma de *Coriolopsis rigida*.



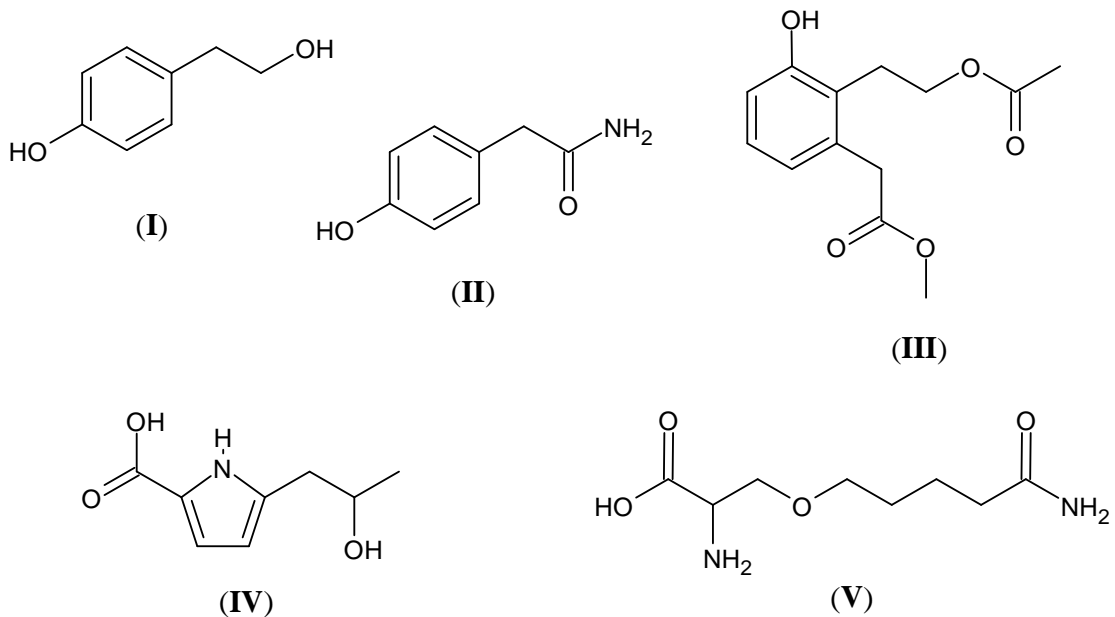
Fonte: “Adaptado de” SAPARRAT *et al.* (2014)

Estudos dos metabólitos secundários produzidos por este fungo e suas atividades biológicas tiveram início a partir do isolamento do microrganismo na qualidade de endófito da espécie vegetal *Cochlospermum regium* por Moraes (2018).

No estudo químico dos compostos produzidos pelo fungo *Coriolopsis rigida*, isolado da *C. regium*, Dantas (2020) identificou cinco substâncias a partir do extrato bruto AcOEt (Figura 5), sendo elas o tirosol (I), p-hidroxifenilacetamida (II), 3-[4-etil-oxiacetil-5-hidroxi-fenil]-etanoato de metila (III), 2-ácido-5-isopropanol-1H-pirrol-carboxílico (IV) e ácido 3-

oxipentanamida-2-amino-propanóico (V). O mesmo extrato identificou a presença de flavonas, flavonóis e xantonas, apresentou atividade antioxidante de 78,87% (1.000 mg/mL) e um valor de CE_{50} de 0,33 mg/mL, além de atividade aleloquímica com a inibição do crescimento das plântulas de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. em 63% e 55%, respectivamente.

Figura 5 - Metabólitos produzidos pelo endófito *Corioloropsis rigida* isolado de *Cochlospermum regium*.



Fonte: “Adaptado de” Dantas (2020)

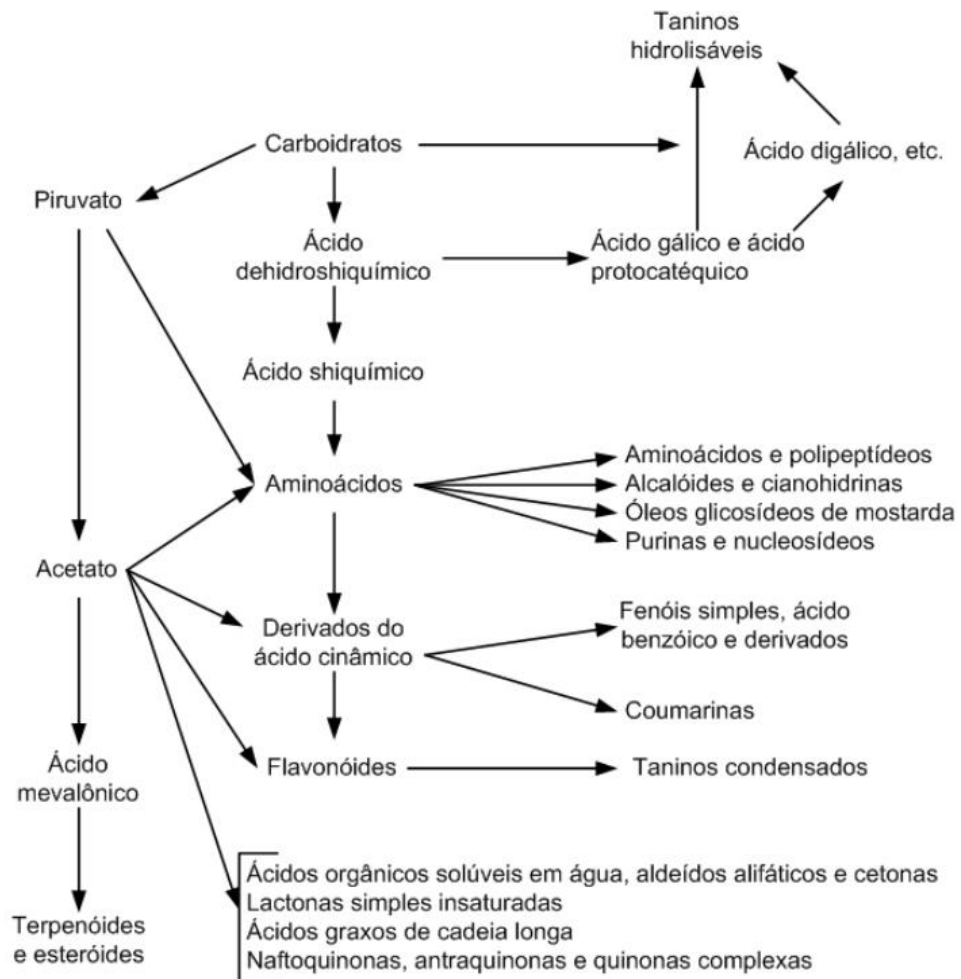
3.7 Atividade Aleloquímica

As estratégias experimentais tradicionais da química de produtos naturais envolvem o isolamento da linhagem microbiana de seu habitat, o cultivo em laboratório e a triagem dos extratos obtidos em diferentes ensaios biológicos além do isolamento e identificação dos produtos naturais obtidos (CONTI, GUIMARÃES, & PUPO, 2012). Dentre os ensaios biológicos, o estudo da alelopatia apresenta importância ecológica e possibilidade de fornecer novas estruturas químicas para produção de bioativos que combatam as pragas e sejam menos danosos ao ambiente (SANTORE, 2013).

A alelopatia é um fenômeno que ocorre quando há a interferência no funcionamento e crescimento dos ecossistemas agrícolas e biológicos a partir de um ou mais metabólitos secundários (aleloquímico) produzidos por um organismo, seja plantas, fungos, bactérias, vírus ou algas (STASZEK *et al.*, 2021; JMII, ZORRILLA & HAOUALA, 2022).

Pesquisas tentam agrupar os aleloquímicos, como é o caso de Whittaker & Feeny (1971 apud PIRES & OLIVEIRA, 2011) que atribui 5 grupos a esses compostos, ácido cinâmico, flavonóides, terpenóides, esteróides e alcalóides. Além disso, eles relataram que muitos compostos ocorrem na forma de glicosídeos e essas substâncias, que podem ser tóxicas, tornam-se ineficazes dentro da planta ao se combinarem com açúcares. Rice (1984 apud PIRES & OLIVEIRA, 2011) agrupa os compostos alelopáticos em 14 grupos e propõe as vias de síntese (Figura 6).

Figura 6 - Rota de síntese dos compostos alelopáticos sugerido por Rice (1984 apud PIRES & OLIVEIRA, 2011).



Fonte: Pires & Oliveira (2011)

Os fitoquímicos que compõem os metabólitos secundários usados como autodefesa das plantas são alternativas para atuar como agrotóxicos, pesticidas, farmacêuticos e inseticidas botânicos (PENGSOOK *et al.*, 2022).

Na busca de soluções alternativas aos pesticidas convencionais que têm poluído o meio ambiente e têm perdido eficácia, uma vez que pragas vêm se tornando resistentes a esses, os produtos naturais, com o estudo da alelopatia, demonstra crescente interesse na descoberta de novos produtos que possibilite uma agricultura sustentável e amiga do meio ambiente (PÉREZ & LAZO, 2010).

Nesse contexto, para verificar a atividade alelopática de extratos e compostos isolados, o bioensaio mais utilizado é a inibição da germinação de sementes, no qual sementes da espécie selecionada são dispostas em um substrato saturado com a solução teste (PIRES & OLIVEIRA, 2011). Uma das espécies mais amplamente utilizadas nos ensaios de laboratório é a alface (*Lactuca sativa* L.), uma vez que suas cipselas (frutos) são pequenas e, por possuírem grande área de superfície de contato, são bastante sensíveis ao meio que as rodeiam (LIMA *et al.*, 2011).

Pensando nos riscos ambientais de toxicidade que os agrotóxicos oferecem ao permanecerem no ambiente, atingirem o meio aquático e acumularem ao longo da cadeia alimentar, se faz necessário o estudo de ecotoxicidade nas pesquisas envolvendo novos herbicidas (LIMA *et al.*, 2011).

Dentre os testes utilizados para avaliar os efeitos nocivos dos agrotóxicos ao meio ambiente, existe o ensaio com *Artemia* sp. (Crustacea, Brachiopoda) (LIMA *et al.*, 2011), o qual a Associação Brasileira de Normas Técnicas especifica um método de ensaio através da norma ABNT NBR 16530:2016.

A *Artemia* sp. é um dos organismos de medição ambiental (MARRERO *et al.*, 2020) e a atividade detectada através do ensaio com esse microcrustáceo é um indicador de toxicidade contra insetos-praga além de ser útil para prever atividade pesticidas e farmacológica uma vez que responde a uma ampla gama de compostos quimicamente e farmacologicamente variados (PÉREZ & LAZO, 2010).

4 METODOLOGIA

4.1 Crescimento do fungo endofítico em meio de arroz e Czapek

As cepas do fungo endofítico *Coriopsis rigida*, isolado da folha de *C. regium* por Moraes (2018) e identificado por Dantas (2020), foram obtidas na micoteca do Laboratório de Reatividade de Compostos Orgânicos da Universidade Federal do Tocantins-UFT Câmpus de Gurupi sob supervisão da Prof. Dra. Vanessa M. Chapla.

4.1.1 Meio de arroz

O inóculo do fungo endofítico *C. rigida* foi repicado em placa de Petri (90 x 15 mm, vidro) em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) durante 7 dias (fotoperíodo de 12 horas) a fim de se obter micélio-ágar para as fermentações em estado sólido. O inóculo no meio sólido de arroz foi realizado em 10 sacos de polietileno (500 g) com 180 g de arroz tipo 1 (Tio Jorge®) e 160 mL de água destilada, previamente autoclavados 2x por 40 min em temperatura acima de 120°C e 1,1 kgf/cm² de pressão. Foram utilizadas 5 placas de Petri para inocular os 10 sacos de arroz, sendo adicionada metade do conteúdo de uma placa de Petri em cada saco. Estes foram incubados em temperatura ambiente por 21 dias.

4.1.2 Meio Czapek

O inóculo do fungo endofítico *C. rigida* foi repicado em placa de Petri (90 x 15 mm, vidro) em meio BDA durante 7 dias (fotoperíodo de 12 horas) a fim de se obter micélio-ágar para as fermentações em estado líquido. O inóculo no meio líquido Czapek (HIMEDIA) foi realizado em 3 erlenmeyers de vidro (500 mL) com 300 mL de meio Czapek, previamente autoclavados 2 x por 20 min em temperatura acima de 120 °C e 1,1 kgf/cm² de pressão. Foram utilizadas 2 placas de Petri para inocular os 3 erlenmeyers com meio líquido Czapek, sendo adicionada metade do conteúdo de uma placa de petri em cada erlenmeyer. Estes foram incubados em temperatura ambiente por 21 dias.

4.2 Obtenção dos extratos brutos

4.2.1 Meio de arroz

Após o período de fermentação em meio de cultura, a biomassa formada foi submersa com álcool metílico P.A. para extração dos compostos por maceração, por período de 12 horas por 3 vezes. O excesso de solvente foi evaporado em rotaevaporador para obtenção do extrato bruto. Contudo não foi possível rotaevaporar totalmente o solvente, constatou-se que havia cerca de 20 mL de água no extrato bruto o que impossibilitou a quantificação da massa seca do extrato bruto metanólico.

O extrato bruto em meio aquoso foi submetido à partição líquido-líquido (PLL). Adicionou-se 150 mL de acetato de etila P.A. e levou a banho ultrassônico por 50 min para solubilização. Transferiu-se a solução para um funil de separação e adicionou-se 50 mL de água destilada, homogeneizou-se e aguardou-se a separação das fases por diferença de densidade. A fase orgânica em acetato de etila foi separada em balão de fundo redondo e a fase aquosa, 312 mL, retornou para o funil de separação. O procedimento de PLL foi repetido por 3 vezes. Após recolher as fases com acetato de etila em balão de fundo redondo o excesso de solvente foi evaporado em rotaevaporador e recolhido em recipiente de massa conhecida. O extrato em acetato de etila ficou em capela de exaustão por aproximadamente 9h para evaporação do excesso de solvente resultando em 3 g de extrato seco.

O extrato bruto seco obtido da fração de acetato de etila foi solubilizado em 40 mL de acetonitrila P.A. transferido para funil de separação. Realizou-se uma PLL com hexano P.A. (3 x 20 mL). O excesso de solvente foi evaporado em rotaevaporador e a massa seca dos extratos obtidos das frações de acetonitrila (extrato bruto ACN) e hexano (extrato bruto HEX) foram 1,3662 g e 1,2045 g respectivamente.

4.2.2 Meio Czapek

O meio com o fungo foi submetido a uma filtração à vácuo, obtendo 940 mL do filtrado, o filtrado foi submetido a PLL com acetato de etila P.A. (3 x 470 mL). O extrato foi concentrado utilizando o rotaevaporador para evaporar o excesso de solvente e a massa seca do extrato bruto do meio Czapek (CZA) foi de 148,7 mg.

4.3 Avaliação do perfil químico

4.3.1 Meio de arroz

O perfil químico dos extratos brutos obtidos das frações de acetonitrila e hexano foram avaliados por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), realizadas no Laboratório de Reatividade de Compostos Orgânicos (UFT-Gurupi).

Na CCDC utilizou-se placas de sílica gel DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄ como fase estacionária e a fase móvel foi composta de clorofórmio/metanol na proporção de 9:1 (v/v). Os extratos brutos de ACN e HEX foram solubilizados em acetona P.A. para serem aplicados na placa de sílica gel e eluídos em cuba de vidro com a fase móvel. Após eluição a placa foi retirada da cuba e revelada com luz UV ($\lambda = 254$ nm) e com vapores de iodo.

O perfil químico no CLAE foi obtido utilizando Shimadzu® LC-6A com controlador CBM 20A, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A, bombas LC-6AD para modo analítico, injetor manual (7725i) com alça de amostragem de 20 μ L (analítico). A coluna utilizada foi a Eclipse Plus C18 Agilent® (5 μ m e 4,6 x 250 mm) e a eluição foi programada com gradiente exploratório água/metanol (95:5 a 0:100 v/v por 45 min. permanecendo nesta condição por mais 10 min), com uma vazão de 1,0 mL/min. Injetou-se 20 μ L das soluções metanólicas dos respectivos extratos brutos na concentração de 3 mg/mL previamente filtradas em Chromabond® C18ec.

4.3.2 Meio Czapek

O perfil químico do extrato bruto proveniente do meio Czapek e obtido da fração de acetato de etila (extrato bruto Czapek) também foi avaliado por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), realizadas no Laboratório de Reatividade de Compostos Orgânicos (UFT-Gurupi).

Na CCDC utilizou-se placas de sílica gel DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄ como fase estacionária e a fase móvel foi composta de clorofórmio/metanol na proporção de 8:2 + 2 gotas de ácido acético glacial P.A. O extrato bruto CZA foi solubilizado em metanol P.A. e aplicado na placa de sílica gel e eluídos em cuba de vidro com a fase móvel.

Para comparação, o extrato ACN foi aplicado nas mesmas condições que o extrato CZA. Após eluição a placa foi retirada da cuba e revelada com luz UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) e com vapores de iodo.

O perfil químico no CLAE foi obtido utilizando Shimadzu® LC-6A com controlador CBM 20A, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A, bombas LC-6AD para modo analítico, injetor manual (7725i) com alça de amostragem de 20 μL (analítico). A coluna utilizada foi a Shim-pack PREP-ODS (H) KIT Shimadzu® (5 μm e 4,6 x 250mm) e a eluição foi programada com gradiente exploratório água/metanol (95:5 a 0:100 v/v por 45 min. permanecendo nesta condição por mais 10 min), com uma vazão de 1,0 mL/min. Injetou-se 20 μL do extrato bruto CZA na concentração de 3 mg/mL em metanol (grau HPLC) previamente filtradas em Chromabond® C18ec.

4.4 Isolamento e elucidação dos compostos químicos isolados

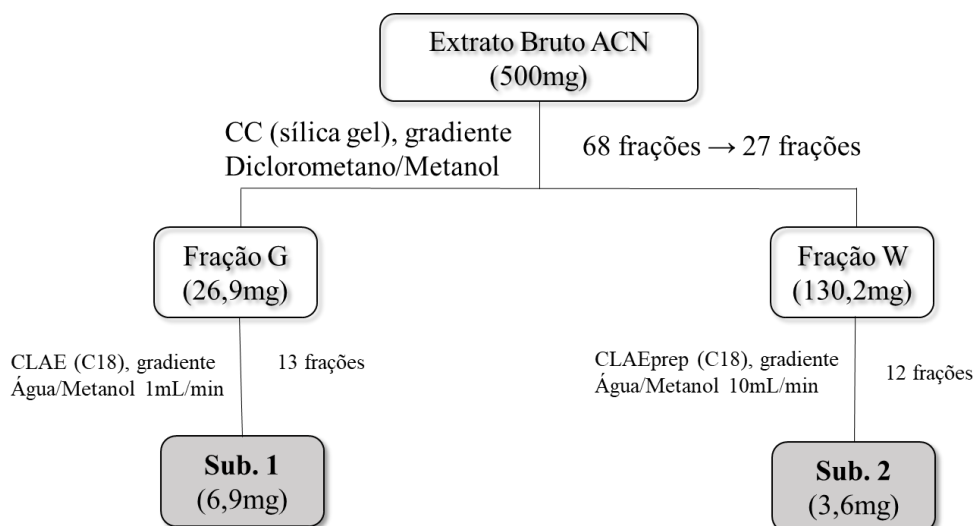
O extrato bruto ACN foi submetido a fracionamento cromatográfico de acordo com o fluxograma 01 em coluna de vidro de diâmetro 2,5 cm e preenchida com sílica gel com altura 18,5 cm no Laboratório de Reatividade de Compostos Orgânicos (UFT-Gurupi). A fase móvel foi composta de diclorometano/metanol em gradiente 100:0, 97:3, 95:5, 90:10, 50:50 e 0:100. Obteve-se 68 frações as quais após análise cromatográfica (CCDC) foram reagrupadas em 27 frações nomeadas de A, B, C, D, ..., Z e AA.

A fração G (26.9 mg, eluída na CC com fase móvel diclorometano/metanol 97:3 v/v) foi submetida a fracionamento cromatográfico em CLAE Shimadzu® com detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A, bombas LC-20AT para modo analítico, injetor manual (7725i) com alça de amostragem de 164 μL (analítico). A coluna utilizada foi a Shim-pack VP-ODS Shimadzu® (5 μm e 4,6 x 150 mm) no Laboratório de Cromatografia (UFNT-Araguaína). A eluição da fração G foi programada com gradiente exploratório água/metanol (95:5 a 50:50 v/v por 5 min, 50:50 a 0:100 por 35 min, permanecendo nesta condição por mais 5 min, retornando para condição inicial em 3 min e permanecendo nesta por 2 min), com uma vazão de 1,0 mL/min. Antes de injetar, a fração foi filtrada em Ks-Tek® PVDF 0,22 μ . Para o monitoramento dos compostos utilizou-se os comprimentos de onda 220 e 254 nm. O fracionamento resultou em 13 frações, entre elas a substância **1** (TR 9,6 min, 6,9 mg).

A fração W (130,2 mg, eluída na CC com fase móvel diclorometano/metanol 50:50 v/v) foi submetida a fracionamento cromatográfico em modo preparativo em CLAE Shimadzu® LC-6A com controlador CBM 20A, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A, bombas

LC-6AD para modo analítico, injetor manual (7725i) com alça de amostragem de 500 μ L (preparativo). A coluna utilizada foi a Shim-pack PREP-ODS (H) KIT Shimadzu® (15 μ m e 20 x 250 mm) no Laboratório de Reatividade de Compostos Orgânicos (UFT-Gurupi). A programação utilizada foi de gradiente exploratório água/metanol (75:25 a 67:43 v/v por 5 min, 67:43 a 10:90 por 3 min, 10:90 a 0:100 por 9 min permanecendo nesta condição por mais 13 min), com uma vazão de 10,0 mL/min. Antes de injetar, a fração foi filtrada em Chromabond® C18ec. Para o monitoramento dos compostos utilizou-se os comprimentos de onda 254 nm. O fracionamento resultou em 12 frações, entre elas a substância **2** (TR 1,7 min, 3,6 mg).

Fluxograma 1 - Metodologia de fracionamento de 500 mg do extrato bruto ACN.



CC – Cromatografia em Coluna

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Fonte: Autora

As substâncias isoladas foram submetidas à análise de ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H (600 MHz), HMBC, HMQC) em espectrofotômetro Bruker Avance III 600 14,1T, utilizando sinal de solvente residual não deuterado como referência. As análises foram realizadas na Universidade Federal de São Carlos.

4.5 Ensaios aleloquímico e de toxicidade aguda

4.5.1 Teste de germinação (Alelopatia)

O estudo do efeito aleloquímico foi realizado com o extrato bruto ACN sobre a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) Feltrin© (lote 0002601910000020 e % de germinação 98%) no Laboratório de Reatividade de Compostos Orgânicos (UFT-Gurupi). O ensaio foi realizado em triplicata nas concentrações de 500, 1.000, 2.000, 3.000 mg/L e o controle, o qual não continha o extrato bruto ACN. As soluções foram preparadas a partir da diluição de uma solução estoque do extrato bruto ACN na concentração de 15.000 mg/L utilizando metanol como solvente. Placas de petri em poliestireno (PS) 90 x 15mm foram forradas com papel filtro e a elas adicionou-se 1 mL das soluções do extrato bruto ACN e 1 mL de metanol para o controle. Após o período de 24h adicionou-se às placas 4 mL de água destilada e 15 sementes de alface. Após 5 dias realizou-se as medições das raízes e plântulas utilizando um paquímetro.

4.5.2 Ensaio de toxicidade aguda

O ensaio de toxicidade aguda foi realizado nas condições estabelecidas na ABNT NBR 16530 com o extrato bruto ACN contra o microcrustáceo *Artemia* sp. (Crustacea, Brachiopoda) no Laboratório de Química Geral (UFNT-Araguaína). Preparou-se 1L de água reconstituída e realizou-se a medição de pH ($8,0 \pm 0,5$) e salinidade (34 ± 2), 400 mL foram destinados para eclosão dos cistos de artemia e 600 mL foram reservados para preparar as soluções testes. Transferiu-se 400 mL de água reconstituída em funil de separação de 500 mL e adicionou-se 62,3 mg de cisto de artemia Maramar® lote 209 e aguardou-se o período de 24h para eclosão dos cistos.

As soluções testes foram preparadas em balão volumétrico de 50 mL nas concentrações 10, 20, 30, 50 e 100 mg/L do extrato bruto de ACN. As soluções testes foram diluídas com a água reconstituída a partir de uma solução estoque do extrato bruto ACN 2.500 mg/L a qual foi preparada diluindo 15 mg do extrato bruto ACN em 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) P.A. e após solubilização, adicionou-se 4 mL da água reconstituída. Para o controle preparou-se uma solução estoque com 2 mL de DMSO e 4 mL de água reconstituída. Pipetou-se 2 mL da solução estoque do controle (quantidade de solução estoque do extrato bruto ACN utilizada no preparo

da solução teste de maior concentração – 100 mg/mL), transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com água reconstituída.

Antes de iniciar o ensaio, o pH das soluções testes e do controle foi medido. Em recipientes de vidro adicionou-se 10 mL das soluções testes e controle, sendo destinados 4 recipientes para cada concentração. Em cada recipiente adicionou-se 10 náuplios de artemia. A contagem de organismos vivos e mortos ocorreu com 24 e 48h e o pH das soluções foi medido ao final do ensaio. Manteve-se a temperatura do ambiente entre 23 e 27°C durante todo o ensaio.

4.6 Caracterização dos Compostos Orgânicos Voláteis

4.6.1 Extração por hidrodestilação

A metodologia do ensaio de hidrodestilação foi adaptada a partir dos estudos de Zhao et al. (2016), Santos Filho, Amaral & Rodrigues-Filho (2011), Santos Filho (2010) e Jerković et al. (2007).

O inóculo do fungo endofítico *C. rigida* foi repicado em placa de Petri (poliestireno (PS) 90 x 15 mm) em meio BDA durante 7 dias (fotoperíodo de 12 horas) a fim de se obter disco de micélio-ágar para as fermentações em estado sólido. O inóculo no meio sólido de arroz foi realizado em 6 balões de fundo redondo (boca esmerilhada 24/40 e capacidade 500 mL) com 100 g de arroz tipo 1 (Cristal®) e 170 mL de água destilada, previamente autoclavados 2 x por 30 min em temperatura acima de 120°C e 1,1 kgf/cm² de pressão. Foram utilizadas 2 placas de Petri contendo os discos de micélio-ágar para inocular 4 balões de fundo redondo com o meio de arroz e 2 balões de fundo redondo com meio de arroz foram reservados para o ensaio do controle. Estes foram incubados em temperatura ambiente por 21 dias.

Após o período de incubação utilizou-se 01 balão que continha somente o meio de arroz (controle) e 3 balões que continham o meio de arroz com o fungo *C. rigida* com o objetivo de realizar o ensaio em triplicata. Adicionou-se aos balões 250 mL de água destilada, 100 µL do padrão interno Timol 1 mg/mL (solvente acetato de etila) e com o auxílio do bastão de vidro homogeneizou-se a mistura. O balão foi acoplado ao sistema Clevenger e foi submetido à hidrodestilação por 3h. Após o resfriamento do sistema, o hidrolato obtido foi transferido para funil de separação para realização da PLL por 3 vezes com 20 mL de solução hexano/ éter etílico 2:1. A fase orgânica foi filtrada com sulfato de sódio anidro para remover partículas de água e o excesso de solvente foi rotaevaporado. As amostras concentradas foram transferidas

para vial e identificadas C1H (Controle 1 Hidrodestilação), F1H (Fungo 1 Hidrodestilação), F2H (Fungo 2 Hidrodestilação) e F3H (Fungo 3 Hidrodestilação).

As amostras foram analisadas no Laboratório de Cromatografia (UFNT-Araguaína) em Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas (CG-EM) Agilent® CG system 7990B com injetor automático G4513A e MSD 5977B, coluna HP-5MS 5% Phenyl Methyl Silox (30 m x 250 µm x 0.25 µm), fonte de ionização por impacto eletrônico (70 eV), analisador quadrupolo. O gás de arraste utilizado foi o hélio analítico 5.0 com fluxo de 1 mL/min. A programação de temperatura do forno iniciou-se com 50°C sendo mantido por 1 min depois aumentou 8°C/min até a temperatura de 250°C e finalizando com isoterma por 5 min. O volume de amostra injetada foi de 1 µL em modo splitless e o intervalo de aquisição dos espectros de massas foi de 40 a 500 u. Programou-se para iniciar a detecção após 4,3 min para não detectar o solvente e saturar o detector.

Na mesma programação acima citada, analisou-se um padrão de n-alcenos em acetato de etila (C7-C31) e a solução de hexano/ éter etílico 2:1 utilizado na PLL.

4.6.2 Método microextração em fase sólida (SPME)

Para o ensaio utilizando a metodologia de microextração em fase sólida, adaptações foram realizadas a partir do estudo de Zhao et al. (2016).

O inóculo do fungo endofítico *C. rigida* foi repicado em placa de Petri (poliestireno (PS) 90 x 15 mm) em meio BDA e reservou-se placas de Petri contendo somente o meio BDA. Após o período de 4 dias (fotoperíodo de 12 horas) de crescimento do fungo, separou-se 01 placa contendo somente o meio BDA (controle) e 3 placas contendo o meio BDA e o fungo para realizar o ensaio em triplicata.

O ensaio foi realizado no Laboratório de Cromatografia (UFNT-Araguaína) onde com o auxílio de um prego perfurou-se as placas de petri e com uma microseringa de vidro inseriu-se no centro do disco de micélio 2 µL do padrão interno Timol 50 µg/mL em acetato de etila.

As placas foram então colocadas em placa aquecedora com temperatura de 80°C e em seu interior em modo headspace foi inserido uma fibra da Supelco® de 65 µm de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB), previamente condicionada segundo as instruções da empresa fabricante (Supelco®). Após o período de 20 minutos, a fibra foi retraída e analisada em Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas (CG-EM) Agilent® CG system 7990B com injetor automático G4513A e MSD 5977B, coluna HP-5MS 5% Phenyl

Methyl Silox (30 m x 250 µm x 0.25 µm), fonte de ionização por impacto eletrônico (70 eV), analisador quadrupolo. O gás de arraste utilizado foi o hélio analítico 5.0 com fluxo de 1 mL/min. A programação de temperatura do forno iniciou-se com 50°C sendo mantido por 1min depois aumentou 8°C/ min até a temperatura de 250°C e finalizando com isoterma por 5 min. A injeção dos compostos extraídos da fibra ocorreu em modo splitless e o intervalo de aquisição dos espectros de massas foi de 40 a 500 u.

As amostras analisadas foram identificadas como C1 (Controle 1) e para as placas que continham os discos de micélio do *Corioloropsis rigida*, F1 (Fungo 1), F2 (Fungo 2) e F3 (Fungo 3).

4.6.3 Identificação dos compostos orgânicos voláteis

Para a identificação dos compostos voláteis das amostras F1H, F2H e F3H (Tabela 5, apêndice: Tabela 8-10) excluiu-se os compostos que foram identificados na amostra C1H (controle) e do solvente usado na PLL (hexano/ éter etílico 2:1). Já na identificação dos compostos das amostras F1, F2 e F3 (Tabela 6, apêndice: Tabela 11-13) excluiu-se os compostos identificados na amostra C1.

Os resultados da análise do padrão de n-alcenos foram utilizados para determinar o índice de retenção (IR) baseado na modificação de Van den Dool & Kratz (1963) utilizando a seguinte fórmula:

$$IR = 100i \times \left(\frac{TRX - TRHA}{TRHD - TRHA} \right) + 100 N$$

Onde:

TRX = tempo de retenção do composto (X);

TRHA = tempo de retenção do hidrocarboneto que elui antes do composto (X);

TRHD = tempo de retenção do hidrocarboneto que elui depois do composto (X);

i = diferença entre o número de carbono que elui antes (HA) e depois (HD);

N = número de carbonos do hidrocarboneto que eluíram antes (HA).

Os critérios utilizados para considerar o composto como identificado foi o valor do IR ± 10 comparado com o valor da literatura ADAMS 2017, NIST Web Book e NIST MS Search

2.2 além do SI baseado no R. Match $\geq 90\%$. Os compostos que não atenderam a esses critérios foram considerados não identificados (NI).

Para estimar a proporção dos compostos identificados e não identificados utilizou-se o tradicional método de considerar a porcentagem da área relativa aos picos do cromatograma calculados pela seguinte fórmula:

$$\%_X = \frac{S_X}{\Sigma S_T} \cdot 100$$

Onde:

$\%_X$ = porcentagem do composto identificado;

S_X = área do pico cromatográfico do composto identificado;

ΣS_T = somatório das áreas dos picos cromatográficos de todos os compostos identificados e não identificados (Não considerando as áreas dos picos dos compostos excluídos).

Adicionalmente, o timol foi utilizado como padrão interno com o objetivo de semi-quantificar os compostos identificados. Considerando que adicionou-se 100 μg de timol às amostras obtidas no método de hidrodestilação e 100 ng de timol às amostras obtidas no método de microextração em fase sólida, Zhao *et al.* (2016) foi usado como referência utilizando a fórmula abaixo para semi-quantificar os compostos identificados:

$$C_X = \frac{C_A \cdot S_X}{S_A}$$

Onde:

C_X = massa do composto identificado;

S_X = área do pico cromatográfico do composto identificado;

C_A = massa do padrão interno adicionada;

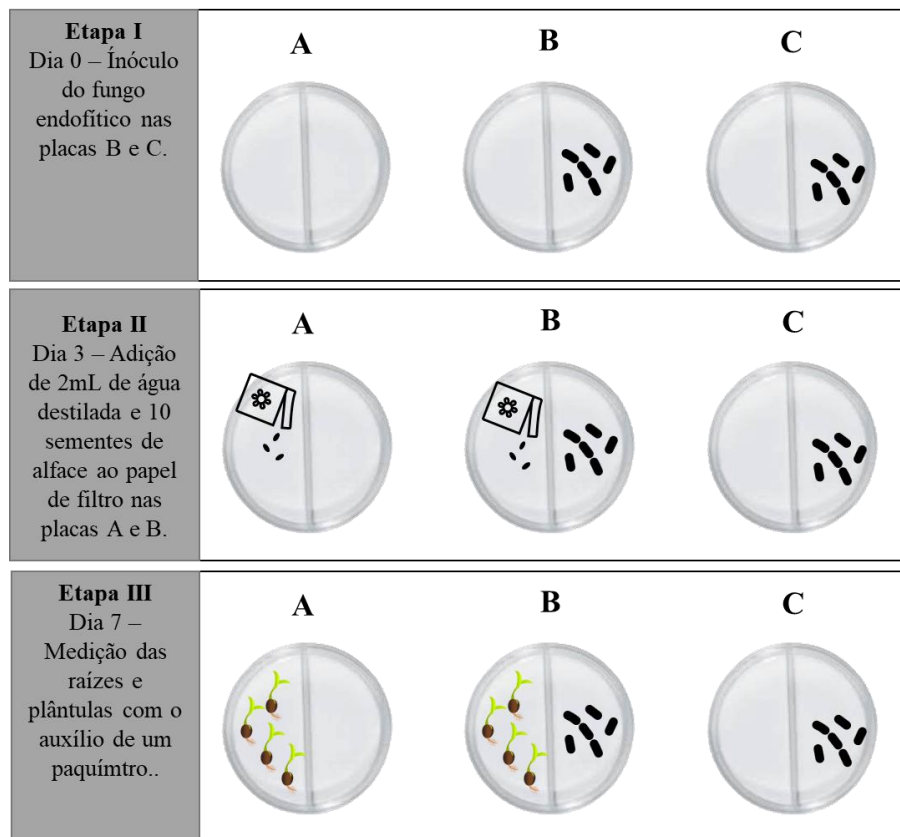
S_A = área do pico cromatográfico do padrão interno.

4.7 Ensaios aleloquímico dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelo fungo endofítico *Coriopsis rigida*

O estudo do efeito aleloquímico foi realizado sobre a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) Feltrin© (lote 00031020100000030 e % de germinação = 100) no

Laboratório de Química Geral (UFNT-Araguaína). O ensaio foi realizado em triplicata utilizando placas de petri em poliestireno (PS) 90 x 15 mm com uma divisória. Em 6 placas de Petri adicionou-se, em metade da placa de Petri, o meio de cultivo BDA e repicou-se o fungo ao centro da área do meio de cultivo. Após 3 dias de crescimento do fungo, adicionou-se papel filtro para cobrir a outra metade de 03 placas que continha o fungo e em 3 placas que não continha o fungo (Figura 7). Aos papéis filtro, adicionou-se 2 mL de água destilada previamente autoclavada e 10 sementes de alface. Após 4 dias realizou-se as medições das raízes e plântulas utilizando um paquímetro.

Figura 7 - Esquematisação do ensaio aleloquímico dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelo *Corioloopsis rigida* sobre a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.).



Fonte: Autora

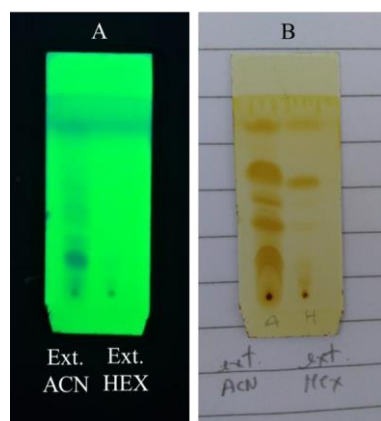
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do perfil químico

5.1.1 Meio de arroz

Após a obtenção dos extratos, os mesmos foram submetidos a análise do perfil químico por CCDC e CLAE (Figura 8 e 9). As análises de CCDC indicam uma variedade de compostos existentes nos extratos brutos ACN e HEX (Figura 8). Nas revelações em UV e vapor de iodo observa-se que o extrato bruto ACN possui maior variedade de compostos. Os compostos eluídos na base na placa cromatográfica possuem maior afinidade com a fase estacionária que nesse caso é a sílica gel podendo ser atribuída a esses compostos caráter polar e os compostos eluídos na parte superior da placa são compostos que conferem maior afinidade com a fase móvel composta por clorofórmio e metanol na proporção de 9:1 (v/v).

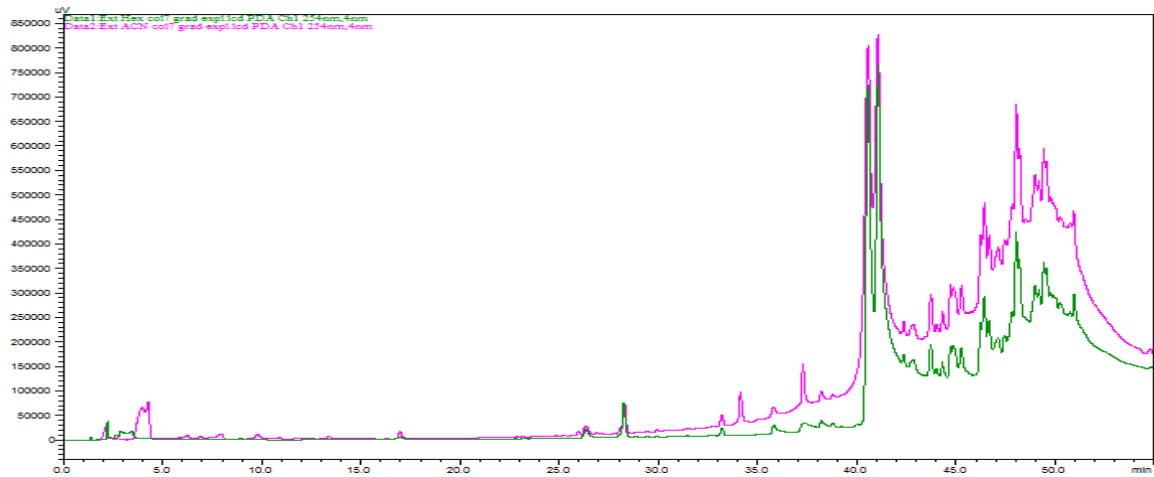
Figura 8 - Cromatografia em Camada Delgada Comparativa dos extratos brutos ACN e HEX (Clorofórmio:Metanol - 9:1 v/v). A= plaquinha revelada em luz UV ($\lambda = 254$ nm). B= plaquinha revelada em vapor de iodo.



Fonte: Autora

As análises de CLAE com o gradiente exploratório dos extratos brutos ACN e HEX (Figura 9) apresentaram perfis cromatográficos semelhantes, indicando a presença de uma variedade de compostos sendo a maioria eluídos ao final da programação, o que significa que esses compostos possuem maior interação com a fase estacionária do que com a fase móvel quando esta continha grande proporção de água.

Figura 9 - Sobreposição dos Cromatogramas obtidos por CLAE dos extratos brutos ACN (rosa) e HEX (verde) ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

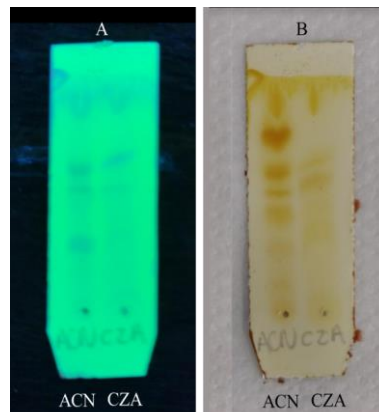


Fonte: Autora

5.1.2 Meio Czapek

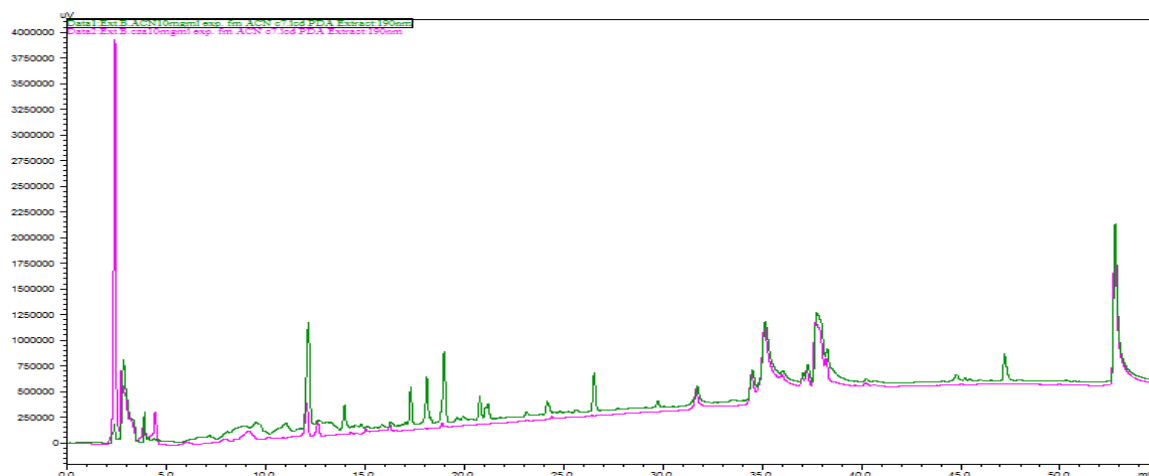
Comparando as análises de CCDC dos extratos brutos ACN e CZA (Figura 10 e Figura 11) observa-se maior variedade de compostos no extrato bruto ACN, pela maior presença de picos no cromatograma.

Figura 10 - Cromatografia em Camada Delgada Comparativa dos extratos brutos ACN e CZA (Clorofórmio:Metanol - 8:2 v/v + 2 gotas de Ácido acético Glacial). A= plaquinha revelada em luz UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$). B= plaquinha revelada em vapor de iodo.



Fonte: Autora

Figura 11 - Sobreposição dos Cromatogramas obtidos por CLAE dos extratos brutos ACN (verde) e Czapek (rosa) ($\lambda = 190$ nm).



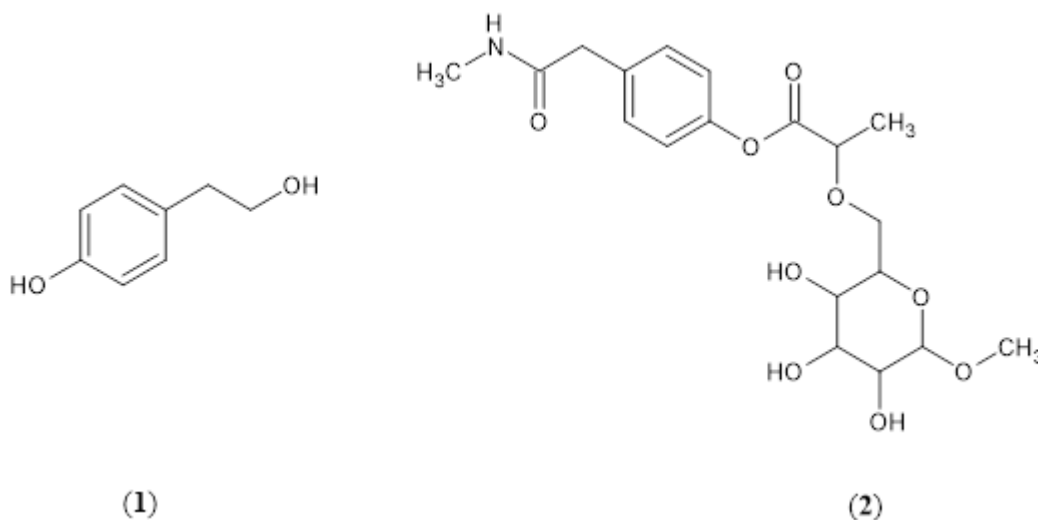
Fonte: Autora

Essa maior variedade de compostos produzidos no meio de arroz pode ser justificada pela relação C/N na composição dos meios de cultivos que é um dos fatores que mais afetam os produtos de fermentação (MIRANDA, 2019). O arroz se apresenta como meio de cultivo mais rico em fontes de carbono pela presença de carboidratos e proteínas além de alguns sais minerais enquanto o Czapek é constituído de sacarose e outros sais minerais sendo este meio de cultivo mais pobre em fontes de carbono.

5.2 Isolamento e elucidação dos compostos químicos isolados

O fracionamento do extrato bruto ACN resultou no isolamento de duas substâncias, denominadas compostos **1** e **2**. As substâncias isoladas tiveram suas estruturas químicas elucidadas por técnicas espectroscópicas e foram nomeadas como tirosol (**1**) e 1-*N*-metil-*p*-fenol acetamida-2-*O*-glicosídeo-propan-1-ona (**2**) (Figura 12).

Figura 12 - Substâncias isoladas: tirosol (1) e 1-*N*-metil-*p*-fenol acetamida-2-*O*-glicosídeo-propan-1-ona (2)



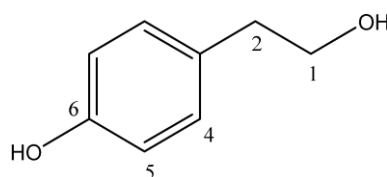
Fonte: Autora

5.2.1 Substância 1 (tirosol)

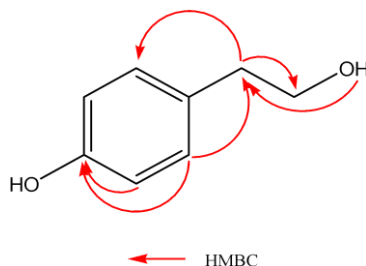
A substância **1** (Figura 13, Tabela 2) foi identificada por técnicas de RMN uni e bidimensionais (Tabela 2, Apêndice: Figuras 26-31). No espectro de RMN de ¹H foi observado 2 dubletos, em δ_{H} 6,98 (*d*, 2H, *J*=8,6 Hz) e em δ_{H} 6,65 (*d*, 2H, *J*=8,6 Hz), indicando um sistema aromático com acoplamento *orto* e um anel *para*-disubstituído. Uma de suas substituições, um grupo -OH, foi atribuído devido às correlações em HMBC dos hidrogênios aromáticos com um carbono oxiquaternário em δ_{C} 155,9 (Figura 14).

Foram ainda observados dois sinais no espectro de RMN de ¹H em δ_{H} 2,59 (δ_{C} 38,7; *t*, 2H, *J*=7,0 Hz) e δ_{H} 3,50 (δ_{C} 63,1; 2H, *m*), que apresentaram correlação COSY e associados aos deslocamentos químicos observados nos espectros de RNM de ¹H e ¹³C, indicaram ser um grupo -CH₂CH₂OH. A correlação observada em HMBC (Figura 14) do H-2 (δ_{H} 2,59) com o C-4/8 (δ_{C} 129,7) confirmam esse grupo como o outro substituinte no anel aromático.

Figura 13 - Estrutura química do tirosol (1)



Fonte: Autora

Figura 14 - Correlação observada em HMBC para a substância **1**.

Fonte: Autora

A partir das análises espectroscópicas e comparações dos dados com a literatura, foi possível identificar a substância **1** como o álcool *p*-hidroxi-fenil-etílico (tirosol) (CHRISTOPHORIDOU & DAIS, 2009). O tirosol é uma pequena molécula semelhante a hormônio considerada molécula de detecção de quórum (quorum-sensing molecules - QSMs). Em bactérias e fungos, vários processos ecologicamente e medicamente importantes, como competência e bioluminescência, patogênese, formação de biofilme, esporulação, secreção, morfogênese fúngica e produção de antibióticos são regulados por QSMs. Entre outros papéis no metabolismo microbiano, o tirosol regula a morfologia fúngica juntamente com o farnesol, outra QSMs. O tirosol é relatado por aumentar o crescimento de hifas, promovendo a formação de tubos germinativos em *Candida albicans*. Contrariamente, o farnesol evita a mudança morfológica de leveduras para hifas, inibindo a formação de tubos germinativos em *C. albicans* (KIZILER *et al.*, 2022).

Tabela 1 - Dados de RMN (DMSO-*d*₆, 600 MHz) da substância **1** (δ em ppm e *J* em Hz).

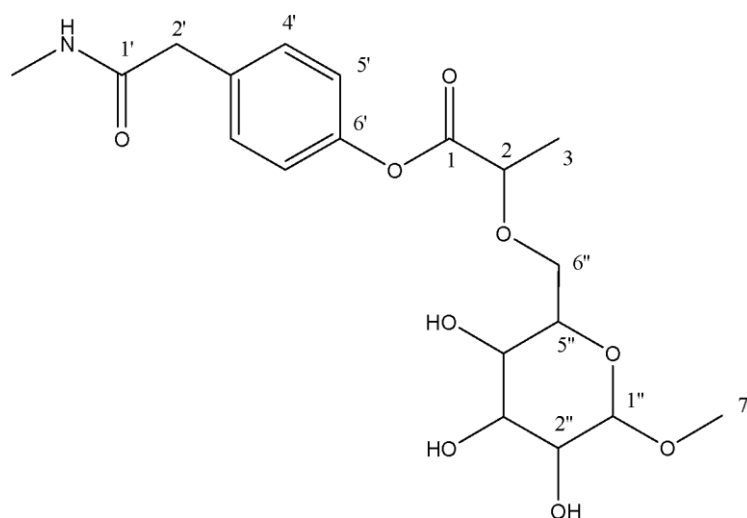
Posição	δ_H ppm (<i>J</i> em Hz)	δ_C	HMBC
1	3,50 – 3,52 (m)	63,1	C2
2	2,59 (t, 7,0)	38,7	C1/C4
3	–	–	–
4 e 8	6,98 (d, 8,6)	129,7	C2/C5/C6/C8
5 e 7	6,65 (d, 8,6)	115,1	C4/C6/C7
6	–	155,9	–
OH-1	4,56 (sl)	–	C1/C2
OH-6	9,19 (sl)	–	–

Fonte: Autora

5.2.2 Substância 2 (1-*N*-metil-*p*-fenol-acetamida-2-*O*-glicosídeo-propan-1-ona)

A substância **2** (Figura 15) foi identificada por técnicas de RMN de ^1H uni e bidimensionais (Tabela 03, apêndice: figuras 32-36). O espectro de RMN de ^1H revelou sinais que caracterizam um sistema aromático *para*-dissubstituído (Tabela 3) com acoplamento *orto*: em δ_{H} 6,98 (d, 2H, $J=8,2$ Hz, H-4' e H-8') e em δ_{H} 6,59 (d, 2H, $J=8,2$ Hz, H-5' e H-7').

Figura 15 - Estrutura química do e 1-*N*-metil-*p*-fenol-acetamida-2-*O*-glicosídeo propan-1-ona (**2**)



Fonte: Autora

No espectro foi possível identificar ainda três sinais singletos em δ_{H} 3,08 (s, 2H, δ_{C} 45,0), δ_{H} 1,62 (s, 3H, δ_{C} 25,2) e δ_{H} 3,25 (s, 3H, δ_{C} 54,2), além do sinal duplete em δ_{H} 1,09 (d, 3H, $J=7,0$ Hz, δ_{C} 21,6) e do multiplete em δ_{H} 3,54-3,52 (m, δ_{C} 67,0), todos referentes a hidrogênios de grupos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$.

O grupo substituinte *N*-metilacetamida foi identificado como um dos substituintes do anel devido a correlações observadas no espectro de HMBC (Figura 16) do sinal H-2' com o sinal de uma carbonila de amida em δ_{C} 174,9 (C-1') e com o carbono aromático δ_{C} 129,9 (C-4'), foi observado também o acoplamento do sinal em 1,62 (N- CH_3) com o sinal de uma carbonila de amida em δ_{C} 174,9 (C-1').

O espectro de HBMC também indicou correlação do sinal de H2 (3,54 – 3,52, m, H-2) com o sinal uma carbonila em δ_{C} 177,7 (C-1), além do acoplamento do hidrogênio H-3 (δ_{H} 1,09) com o sinal da carbonila em δ_{C} 177,7 (C-1) e C-2. Foi observado acoplamento no espectro de COSY do H-2 com H-3, indicando assim a propanona como subestrutura.

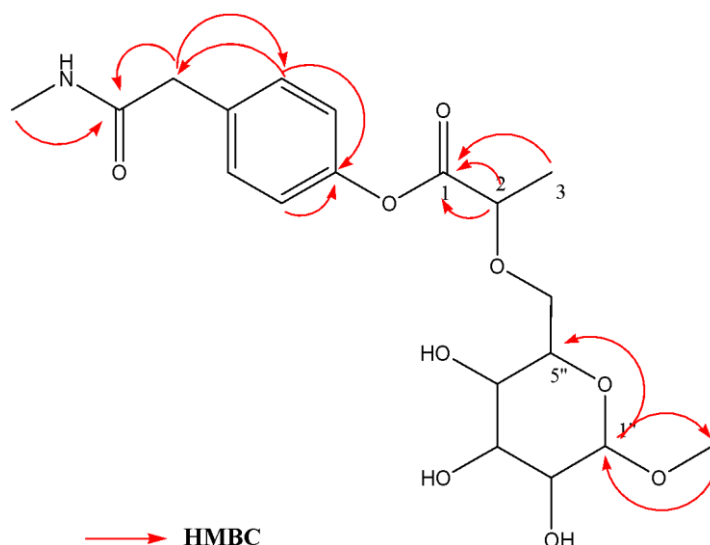
Os sinais na faixa de δ_H 3,05 a 3,61, em conjunto com o sinal do hidrogênio anomérico em δ_H 4,5 (H-1''), indicaram a presença de uma unidade β -glicosídica, a qual foi correlacionada a partir do espectro de HBMC do hidrogênio anomérico com o sinal metilênico δ_C 54,2 (C-7'') e com o sinal em δ_C 71,9 (C-5'').

Tabela 2 - Dados de RMN (DMSO-*d*₆, 600 MHz) da substância **2** (δ em ppm e *J* em Hz).

Posição	δ_H ppm (<i>J</i> em Hz)	δ_C	HMBC
1	-	177,7	-
2	3,54 – 3,52 (m)	67,0	C1/C3
3	1,09 (d, 7,0)	21,6	C1/C2
1'	-	174,9	-
2'	3,08 (s)	45,0	C3'/C4'
3'	-	128,0	-
4' e 8'	6,98 (d, 8,2)	129,9	C2'/C5'/C6'
5' e 7	6,59 (d, 8,2)	114,4	C4'/C6'
6'	-	154,9	-
N-CH ₃	1,62 (s)	25,2	C1'
1''	4,5	99,7	C7''/C5''
2''	3,37	73,3	C3''/C5''/C7''
3''	3,27	72,7	C2''/C5''
4''	3,05	70,3	C2''/C6''
5''	3,18	71,9	C2''
6''	3,61	60,9	C4''
7''	3,25 (s)	54,2	C1''

Fonte: Autora

Figura 16 - Correlação observada em HMBC para a substância **2**.



Fonte: Autora

A partir das análises espectroscópicas e das correlações observadas nos experimentos uni e bidimensionais, foi possível identificar a substância **2** como o 1-[*N*-metil-*p*-fenol acetamida]-2-*O*-glicosídeo-propan-1-ona. Devido à inexistência de dados referentes a essa substância na literatura, ela foi considerada como inédita. Contudo outras análises espectrométricas deverão ser realizadas para confirmação da estrutura proposta.

5.3 Ensaio aleloquímico e de toxicidade aguda

5.3.1 Teste de germinação (Alelopatia)

O estudo do efeito aleloquímico indica que o extrato bruto ACN inibiu as germinações das sementes de alface (Tabela 4, Figura 17 e Gráfico 1). O ensaio indicou ação inibitória em todas as concentrações do extrato bruto ACN utilizadas no ensaio apresentando redução na média das dimensões das raízes de 20% na concentração 500 mg/L (24,89 mm), 78% na concentração 1000 mg/L (6,71 mm), 90% na concentração 2000 mg/L (3,03 mm) e 92% na concentração 3000 mg/L (2,39 mm) quando comparadas com a média das dimensões das raízes no Controle (31,14 mm).

Comportamento semelhante se observa na média das dimensões das plântulas que apresentaram redução de aproximadamente 19% na concentração 500 mg/L (19,70 mm) e 48% na concentração 1000 mg/L (12,55 mm), 63% na concentração 2000 mg/L (9,03 mm) e 68%

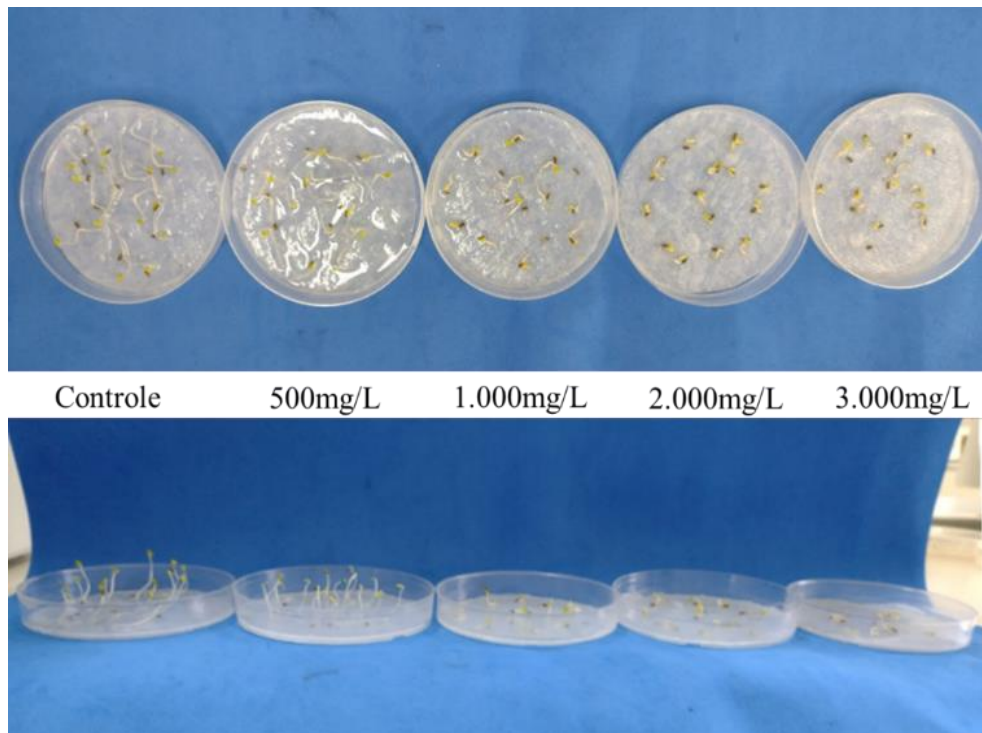
na concentração 3000 mg/L (7,72 mm) quando comparadas com a média das dimensões das plântulas no Controle (24,18 mm).

Tabela 3 - Comprimento médio total das raízes e plântulas em milímetros (mm) do ensaio aleloquímico do extrato bruto ACN.

Tratamentos	Raíz	Plântula	Raíz + Plântula
Controle	31,14	24,18	55,32
500 mg L ⁻¹	24,89	19,70	44,59
1000 mg L ⁻¹	6,71	12,55	19,26
2000 mg L ⁻¹	3,03	9,03	12,06
3000 mg L ⁻¹	2,39	7,72	10,11

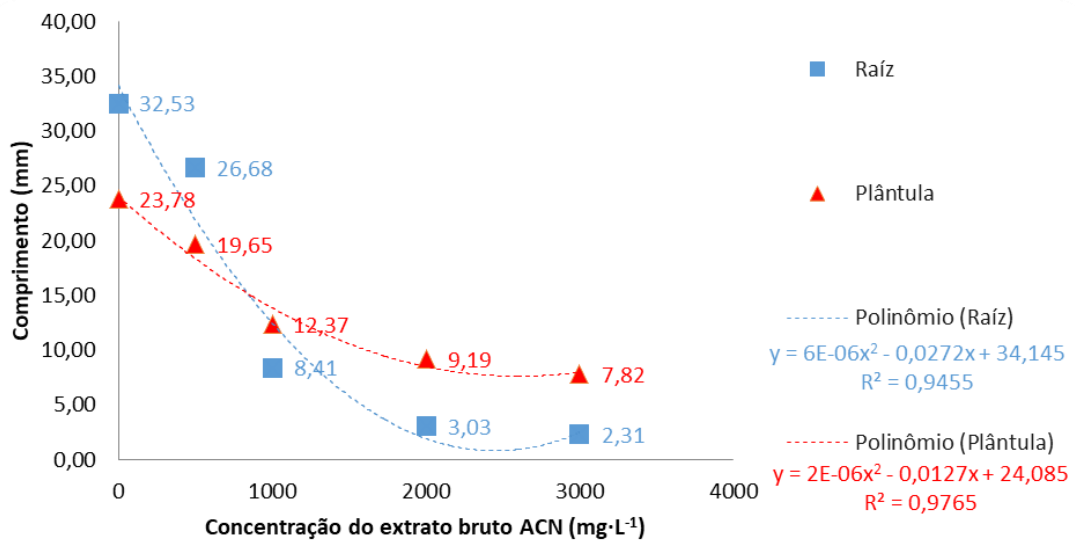
Fonte: Autora

Figura 17 - Germinação das sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) nas concentrações do extrato bruto ACN 500, 1.000, 2.000, 3.000 mg/L e o controle.



Fonte: Autora

Gráfico 1 - Germinação das sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) nas concentrações do extrato bruto ACN 500, 1.000, 2.000, 3.000 mg/L e o controle.



Fonte: Autora

O comportamento inibitório na germinação das sementes de alface também foi identificado no ensaio realizado por Dantas (2020), que avaliou a atividade alelopática do extrato bruto (clorofórmio), obtido a partir do cultivo em meio sólido de arroz do fungo endofítico *C. rigida*, isolado de *Cochlospermum regium*, sobre a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) e rabanete (*Raphanus sativus* L.). O ensaio resultou em redução de 67% no comprimento médio das raízes e 63% no comprimento médio das plântulas de alface utilizando a concentração de 3.000 mg/L do extrato; e na redução de 63% no comprimento médio das raízes e 55% no comprimento médio das plântulas de rabanete utilizando a concentração de 4.000 mg/L do extrato.

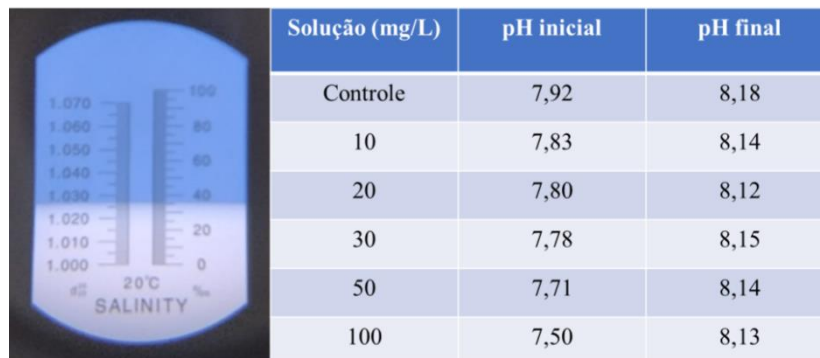
No estudo de Arruda *et al.* (2021), a atividade alelopática de três extratos obtidos do fungo endofítico *Asordaria conoidea*, isolado de *Cochlospermum regium*, também foi observada, tendo como melhor resultado de inibição na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) o extrato bruto C (metanol) que reduziu em 70% o comprimento médio das raízes e 66% no comprimento das plântulas com a concentração de 2.000 mg/L do extrato.

5.3.2 Ensaio de toxicidade aguda

O ensaio de toxicidade frente aos náuplios de *A. salina* resultou no efeito não tóxico das soluções do extrato bruto ACN nas concentrações testadas. Seguindo as orientações da ABNT

NBR 16530:2016 Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Artemia* sp (Crustacea, Brachiopoda) a salinidade da água processada no início do ensaio foi de 35. O pH inicial mensurado (figura 18) teve um leve decréscimo conforme o aumento da concentração do extrato de ACN, o que pode indicar que o extrato teve caráter acidulante na água processada. Após 48h de ensaio e a confirmação de que não houve morte de nenhum náuplio o pH mensurado (figura 18) indicou um leve acréscimo comparado às medições iniciais mostrando-se semelhante em todas as concentrações de extrato bruto ACN e permanecendo dentro da faixa de pH indicada para o ensaio.

Figura 18 - Medições de salinidade e pH das soluções do extrato bruto ACN no ensaio de toxicidade frente aos náuplios de *A. salina*.



Fonte: Autora

O resultado obtido no ensaio por um lado configura um produto que não representa perigo ambiental, nas concentrações utilizadas, uma vez que não causou mortalidade nos microcrustáceos. Por outro lado, pode indicar a ausência de atividade pesticida e farmacológica.

5.4 Caracterização dos Compostos Orgânicos Voláteis

5.4.1 Extração por hidrodestilação

Os resultados obtidos das amostras em triplicatas F1H, F2H e F3H (Figura 19, apêndice: Figura 37 e Tabelas 7-9) após o tratamento dos dados, apontou uma variação significativa entre a amostra F3H e as amostras F1H e F2H que pode ser explicada pela ausência de padronização durante o ensaio realizado. O tempo de resfriamento da amostra no Clevenger não foi cronometrado e a amostra F3H ficou em tempo bem superior se comparada às amostras F1H e F2H. Processos de extração têm sua eficiência influenciada por diversos fatores como tipo de

solvente usado, tempo de extração, tamanho da partícula da amostra, temperatura de extração, razão sólido/solvente entre outros fatores (PATRA, ABDULLAH & PRADHAN, 2022). Pode-se entender que a amostra F3H teve maior tempo de maceração o que possibilitou a identificação de maior número de compostos e do aumento dos picos cromatográficos de compostos identificados em comum com as demais amostras.

Para apresentar os resultados levando em consideração a variação da amostra, optou-se por calcular a média aritmética ponderada levando em consideração as áreas dos picos dos cromatogramas de cada amostra. O resultado pode ser verificado na Tabela 4 que apresenta o total de 16 compostos identificados (Figura 20) tendo como composto majoritário o 5-metil-2-furanocarboxaldeído com 29,24% em relação às áreas dos picos dos cromatogramas e 620,05 µg em relação ao padrão interno adicionado.

Estudos publicados identificaram o 5-metil-2-furanocarboxialdeído em análises de jujuba (SONG *et al.*, 2022), chá verde (GUO *et al.*, 2021) e em crostas de pão integral (NOR QUAIRUL IZZREEN, HANSEN & PETERSEN, 2016). Liu *et al.* (2012) aponta que aldeídos podem ser derivados da autoxidação e oxidação enzimólise da ligação dupla carbono-carbono de ácidos graxos insaturados presentes em cereais, e Santos (2013) explica que os furanos são formados no processo de degradação térmica dos açúcares, durante a pirólise. Como o composto não foi identificado na amostra controle infere-se que este seja produto da ação fúngica sobre o meio sólido de arroz.

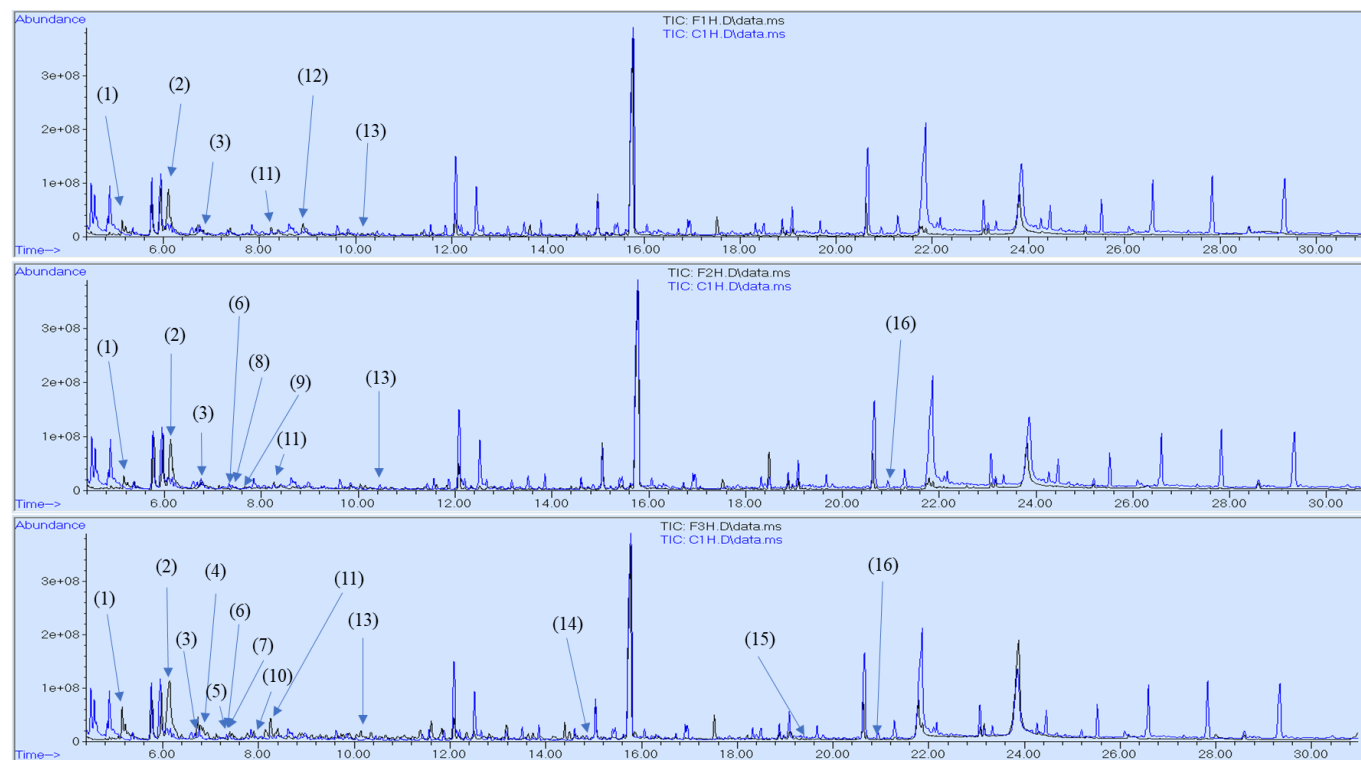
Além das fontes alimentícias citadas, o 5-metil-2-furanocarboxialdeído também foi identificado em análises de plantas como em grãos de *Eragrostis tef* (Zuccagni) Trotter variedades branca e marrom (grãos de teff) (YISAK *et al.*, 2021), frutos de *Annona muricata* (SRIRAM *et al.*, 2018) e semente de *Lepidium sativum* L. (HUSSEIN, 2016). Atividades antimicrobiana (SRIRAM *et al.*, 2018; HUSSEIN, 2016), antioxidante e de conservação (SRIRAM *et al.*, 2018) foram atribuídas ao composto.

Com fórmula $C_6H_6O_2$ e massa molecular 110 g/mol, o 5-metil-2-furanocarboxialdeído foi identificado com 91% de similaridade baseada no R. Match (Tabela 4). No espectro de massas (Figura 21) é possível observar o pico do íon molecular com m/z 110 bastante intenso e outros fragmentos como em m/z 109 referente ao pico M-1 característico da perda de -H da função aldeído e em m/z 81 referente à perda de -CO representando uma clivagem alfa-carbonílica na molécula M-1.

Ao todo, os cromatogramas das amostras F1H, F2H e F3H sinalizaram a presença de 67 compostos extraídos da fermentação fúngica em meio sólido de arroz pelo método de hidrodestilação. Dos 67 compostos 51 não foram identificados (apêndice: tabelas 7-9).

Figura 19 - Compostos identificados nos cromatogramas (CG-EM) das amostras F1H, F2H e F3H.

- (1) 1-(2-furânil)etanona
- (2) 5-metil-2-furanocarboxaldeído
- (3) 2-etil-5-metilpirazina
- (4) 1-(2-furânil)-1-Propanona
- (5) 2-etil-6-metil-pirazina
- (6) 2-acetiliazol
- (7) 2-acetil-5-metil-furano
- (8) 3,4,5-trimetil-2-Ciclopenten-1-ona
- (9) Benzenoacetaldeído
- (10) 1-(1H-pirrol-2-il)etanona
- (11) 2,6-dietilpirazina
- (12) Álcool feniletílico
- (13) 2-(2-furanilmetil)-5-metil-furano
- (14) 4-fenilpiridina
- (15) 3,5-di-terc-Butil-4-hidroxibenzaldeído
- (16) 1-Hexadecanol



Autora

Tabela 4 - Médias ponderadas dos constituintes químicos identificados por CG-EM dos ensaios de hidrodestilação.

Número	Composto	TR (min)	IR exp.*	IR lit.**	SI %	Área do pico no cromatograma	Semi-quantificação	
							%	(µg)
1	1-(2-furanyl)etanona	5,152	903	909	90	1132356411,16	4,35	113,27
2	5-metil-2-furanocarboxaldeído	6,132	959	957	91	6288290175,09	29,24	620,05
3	2-etil-5-metilpirazina	6,785	998	1.001 ¹	90	677200226,24	2,74	67,56
4	1-(2-furanyl)-1-Propanona	6,931	1.006	1.007 ³	92	614000000,00	1,68	62,21
5	2-etenil-6-metil-pirazina	7,066	1.013	1.016 ¹	94	114000000,00	0,31	11,55
6	2-acetiltiazol	7,125	1.016	1.014	90	238980766,59	1,03	23,17
7	2-acetil-5-metil-furano	7,452	1.034	1.031	92	294000000,00	0,81	29,79
8	3,4,5-trimetil-2-Ciclopenten-1-ona	7,464	1.035	1.033 [#]	91	112000000,00	0,80	10,00
9	Benzenoacetaldeído	7,617	1.043	1.036	93	63900000,00	0,45	5,71
10	1-(1H-pirrol-2-il)etanona	7,902	1.058	1.054	92	580000000,00	1,59	58,76
11	2,6-dietilpirazina	8,253	1.078	1.078 ²	96	900822009,57	3,22	90,34
12	Álcool feniletílico	8,905	1.113	1.114	91	1160000000,00	7,94	119,10
13	2-(2-furanylmetil)-5-metil-furano	10,141	1.181	1.189 [#]	93	452536138,08	1,49	45,37
PI	Timol	12,082	1.291	1.291	91	1031238234,34	5,87	100,00
14	4-fenilpiridina	14,960	1.468	1.471 [#]	92	144000000,00	0,40	14,59
15	3,5-di-terc-Butil-4-hidroxibenzaldeído	19,342	1.771	1.774 ³	91	75300000,00	0,21	7,63
16	1-Hexadecanol	20,709	1.876	1.874	92	179534883,72	0,73	17,54

Fonte: Autora

* = índice de retenção calculado usando a equação de Van den Dool e Kratz.

** = Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2017) baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

= identificado pelo NIST Web Book e/ou NIST MS Search 2.2

SI = índice de similaridade com base no R.Match

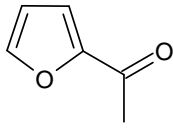
PI = padrão interno

1= Nist- webbook: WAN AIDA *et al*, 2008.

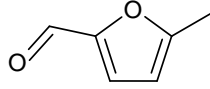
2= Nist- webbook: FAN, XU & ZHANG, 2007.

3= Nist- webbook: ZHAO *et al*, 2008.

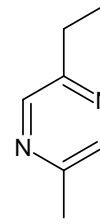
Figura 20 - Estrutura dos compostos identificados no ensaio de hidrodestilação.



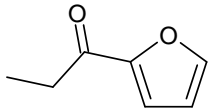
1-(2-furanyl)etanona



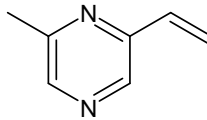
5-metil-2-furanocarboxaldeído



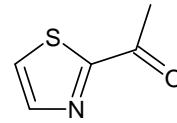
2-etil-5-metilpirazina



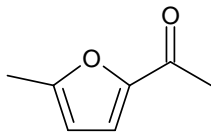
1-(2-furanyl)-1-Propanona



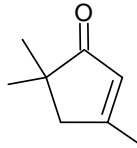
2-etenil-6-metil-pirazina



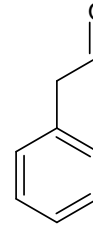
2-acetiltiazol



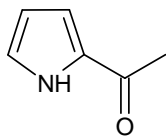
2-acetil-5-metil-furano



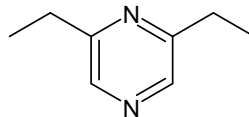
3,4,5-trimetil-2-Ciclopenten-1-ona



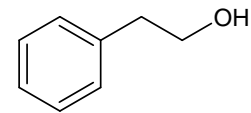
Benzenoacetaldeído



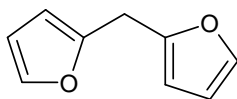
1-(1H-pirrol-2-il)etanona



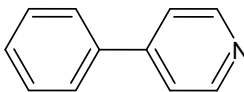
2,6-dietilpirazina



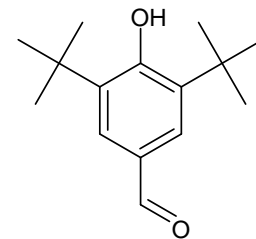
Álcool feniletílico



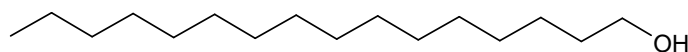
2-(2-furanilmetil)-5-metil-furano



4-fenilpiridina

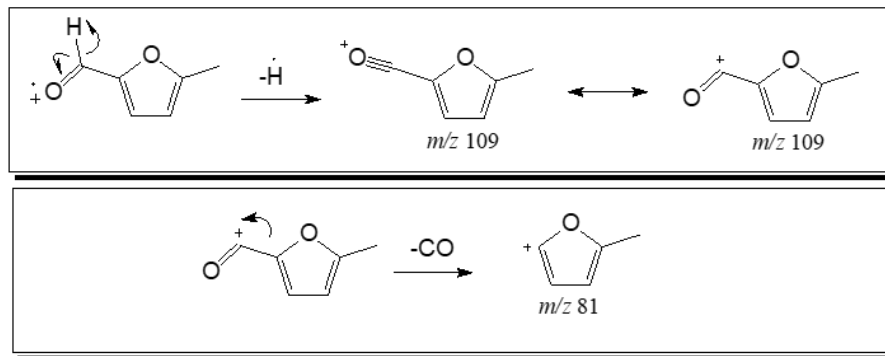
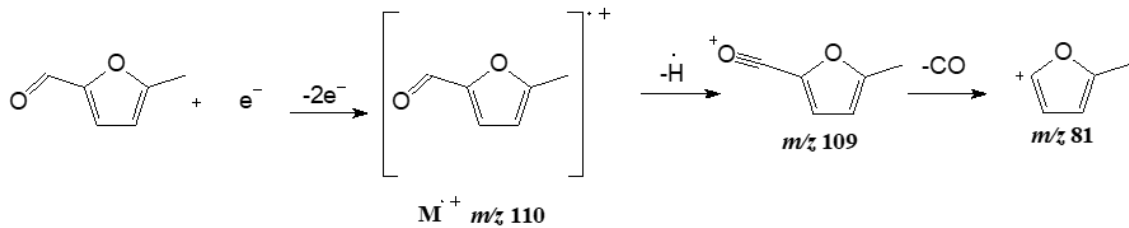
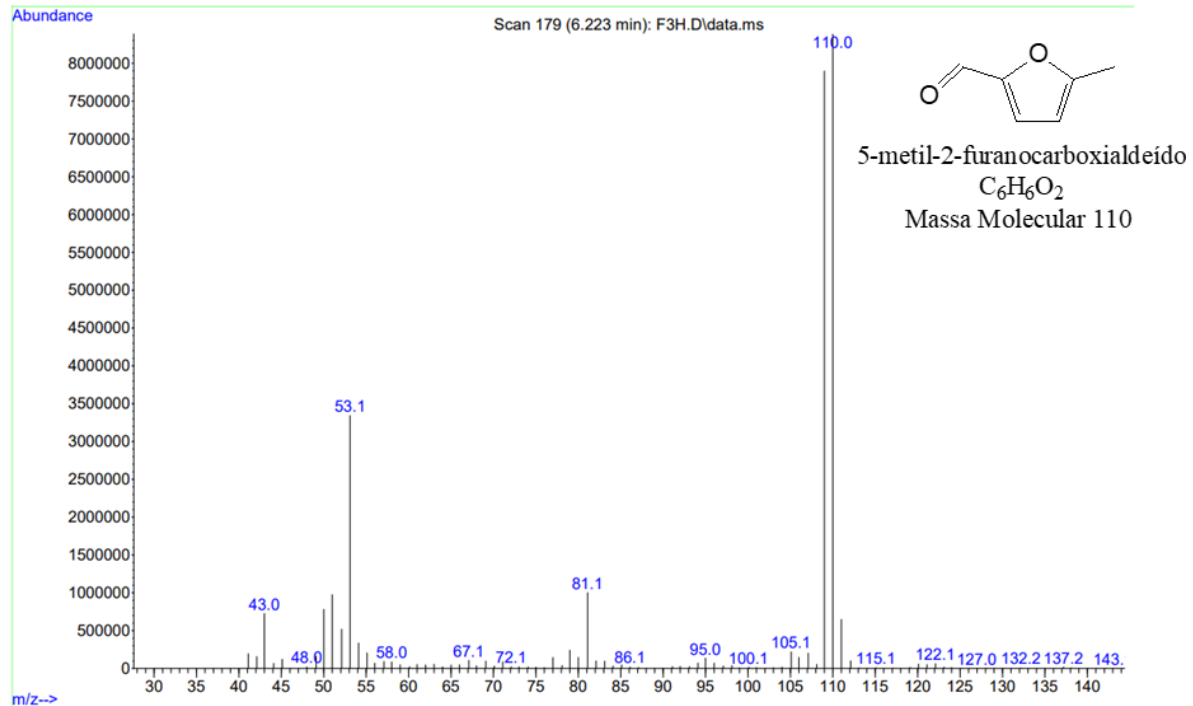


3,5-di-terc-Butil-4-hidroxi-benzaldeído



1-Hexadecanol

Figura 21 - Espectro de massas e proposta de fragmentação do composto majoritário do ensaio de hidrodestilação (5-metil-2-furanocarboxialdeído).



Autora

5.4.2 Método microextração em fase sólida (SPME)

Semelhante ao tratamento utilizado no ensaio de hidrodestilação calculou-se a média aritmética ponderada, em relação à área dos picos dos cromatogramas, das amostras em triplicata do ensaio de microextração em fase sólida F1, F2 e F3 (Figura 22, apêndice: Figura 38 e Tabelas 10-12), cujos resultados são apresentados na Tabela 5. O ensaio teve como resultado 5 compostos identificados (Figura 23, Tabela 5), entre eles o composto majoritário o álcool feniletílico com 49,17% em relação às áreas dos picos dos cromatogramas e 935,43 ng em relação ao padrão interno adicionado.

Tabela 5 - Médias ponderadas dos constituintes químicos identificados por CG-EM dos ensaios de microextração em fase sólida.

Número	Composto	TR (min)	IR exp.*	IR lit.**	SI %	Área do pico no cromatograma	Semi- quantificação	
							%	(ng)
1	Acetato de isopentil	4,682	876	869	94	1757073196,42	25,48	492,05
2	Álcool feniletílico	8,957	1.116	1.107	91	3377193515,70	49,17	935,43
3	Ácido acético, éster 2-feniletílico	11,531	1.260	1.254	95	490292984,87	7,06	136,28
PI	Timol	12,101	1.292	1.291	92	359787482,65	5,22	100,00
4	(4R,4aS,6S)-4,4a-Dimetil-6-(prop-1-en-2-il)-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahidronaftaleno	15,140	1.480	1.476	91	28049460,04	0,42	7,69
5	α -Muuroleno	15,577	1.508	1.500	94	54776728,00	0,82	14,95

Fonte: Autora

* = índice de retenção calculado usando a equação de Van den Dool e Kratz.

** = Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007) baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

= identificado pelo NIST Web Book e/ou NIST MS Search 2.2

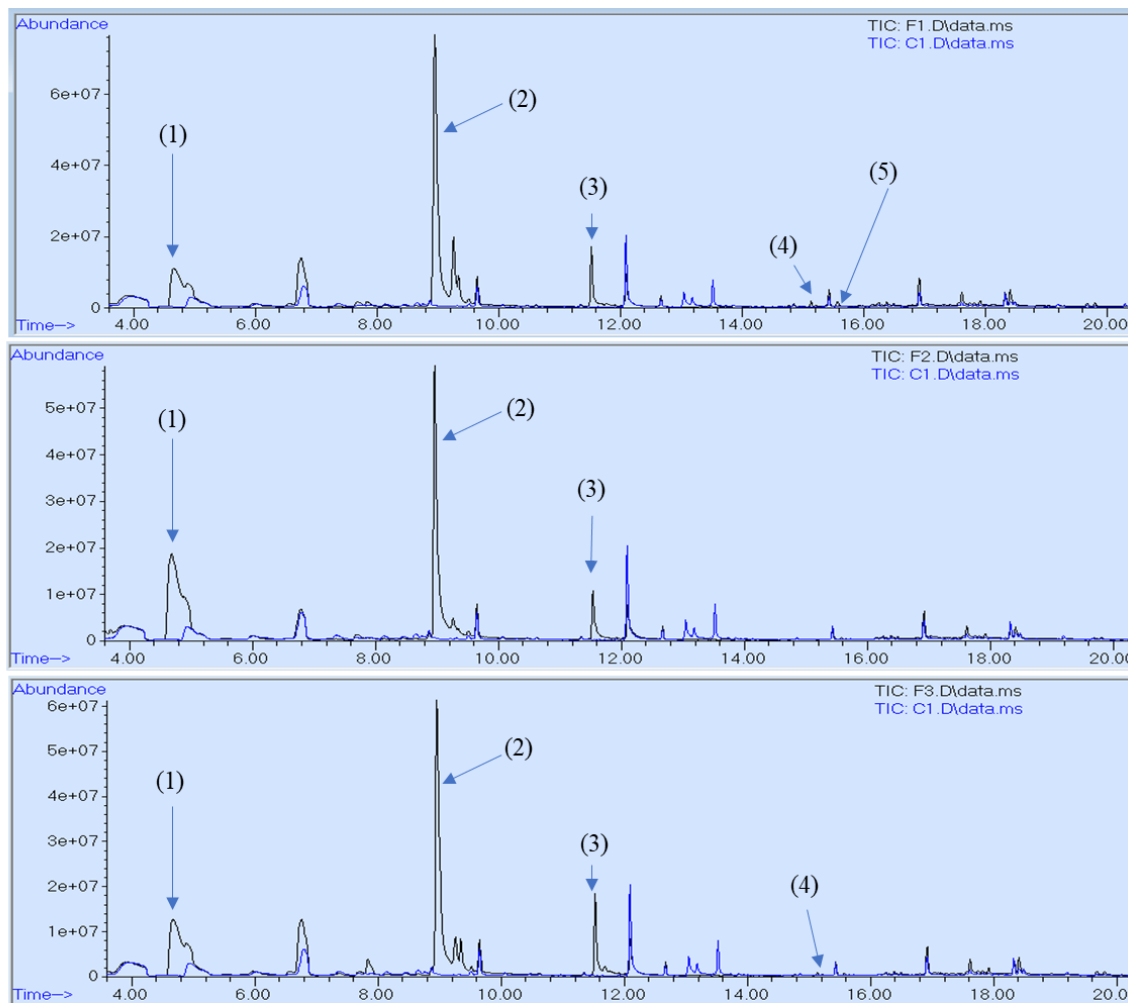
SI = índice de similaridade com base no R.Match

PI = padrão interno

5= Nist- webbook: MALLARD *et al*, 2014.

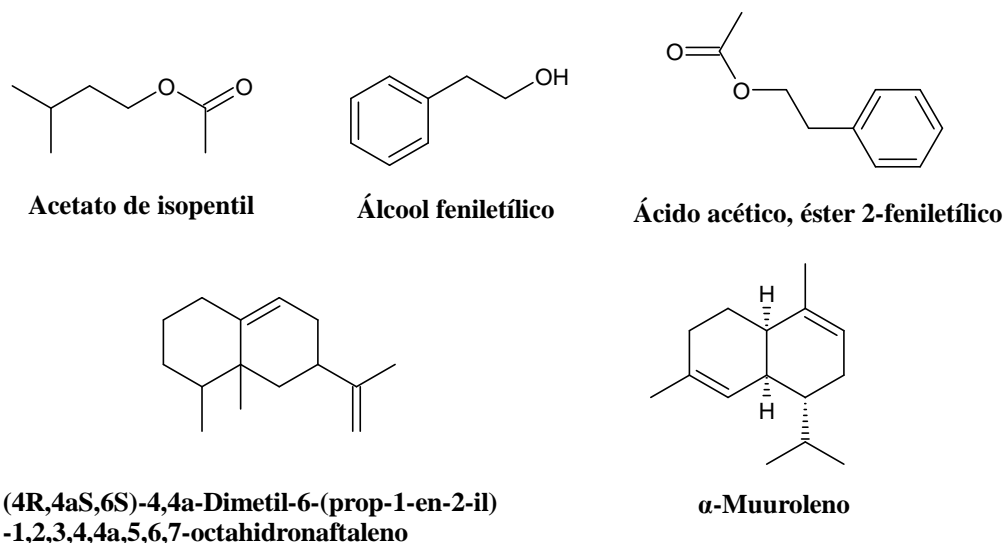
Figura 22 - Compostos identificados nos cromatogramas (CG-EM) das amostras F1, F2 e F3.

- (1) Acetato de isopentil
- (2) Álcool feniletílico
- (3) Ácido acético, éster 2-feniletílico
- (4) (4R,4aS,6S)-4,4a-Dimetil-6-(prop-1-en-2-il)-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahidronaftaleno
- (5) α -Muuroleno



Autora

Figura 23 - Estrutura dos compostos identificados no ensaio de microextração em fase sólida.



Fonte: Autora

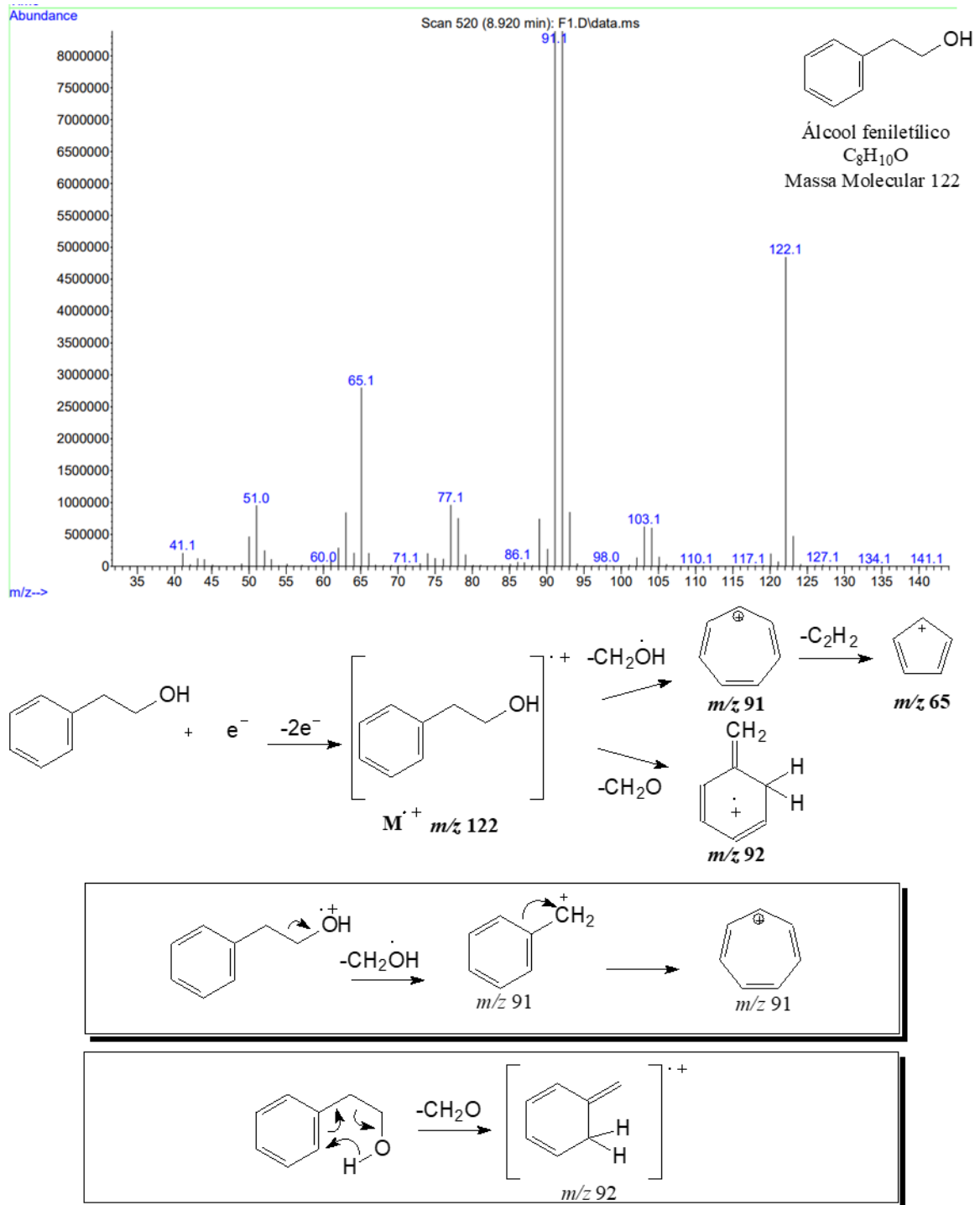
O álcool feniletílico é um líquido oleoso incolor com odor suave e quente semelhante a rosa-mel e tem o uso mundial em cerca de mais de mil toneladas métricas por ano, sendo encontrado em fragrâncias usadas em cosméticos decorativos, fragrâncias finas, xampus, sabonetes entre outros e em produtos não cosméticos como produtos de limpeza (SCOGNAMIGLIO *et al.*, 2012).

O álcool feniletílico também foi identificado como composto majoritário em estudos publicados de compostos orgânicos voláteis extraídos dos fungos endofíticos *Hypoxylon anthochroum* cepa Blaci, *Muscodor albus* E6, *Neofusicoccum ribis*, *Botryosphaeria mamane* cultivados em meio BDA e *Hypoxylon anthochroum* cepas Blaeg1, Gseg1, Haeg2, Smeg4 cultivados em meio de arroz e possui atividade antifúngica contra fitopatógenos (MORAES, FERRAZ & CHAPLA, 2020).

Com fórmula $C_8H_{10}O$ e massa molecular 122 u, o álcool feniletílico foi identificado com 91% de similaridade baseada no R. Match (Tabela 5). No espectro de massas (Figura 24) é possível observar o pico do íon molecular com m/z 122 e outros fragmentos como em m/z 91 referente ao íon tropílio, atribuição que pode ser relacionada ao pico em m/z 65 que corresponde a perda do fragmento C_2H_2 deste. O pico em m/z 92 se refere à perda de CH_2O da molécula.

Ao todo, os cromatogramas das amostras F1, F2 e F3 sinalizaram a presença de 18 compostos extraídos da fermentação fúngica em meio BDA pelo método de microextração em fase sólida. Dos 18 compostos 13 não foram identificados (apêndice: tabelas 11-13).

Figura 24 - Espectro de massas e proposta de fragmentação do composto majoritário do ensaio de microextração em fase sólida (álcool feniletílico).



Autora

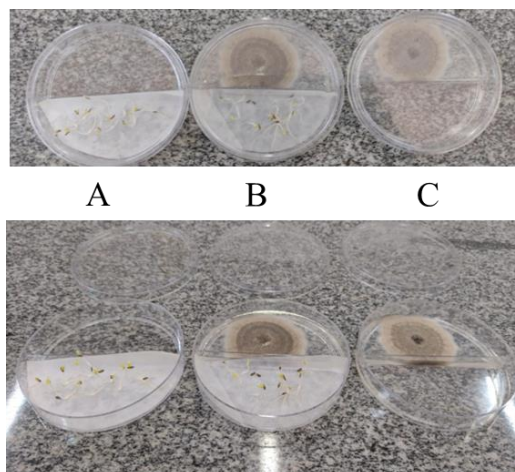
5.5 Ensaio aleloquímico dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelo fungo endofítico *Coriolopsis rigida*.

O estudo da atividade aleloquímica dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelo fungo endofítico *C. rigida* foi avaliado sobre as germinações das sementes de alface e apresentou leve redução nos comprimentos das plântulas cultivadas na presença do fungo, quando comparados aos comprimentos das plântulas cultivadas no controle (ausência do fungo). A média do comprimento das raízes (Tabela 6, figura 25) foi de 23,84 mm no controle e de 19,61 mm com o fungo, o que representa uma redução de aproximadamente 18% de redução na média dos comprimentos das raízes das sementes expostas aos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos pelo fungo.

A média do comprimento das plântulas (Tabela 6) foi de 14,58 mm no controle e de 13,47 mm com o fungo, o que representa aproximadamente 8% de redução na média dos comprimentos das plântulas das sementes expostas aos COVs produzidos pelo fungo.

Resultado semelhante pode ser observado no estudo de Moraes (2018) cujas médias dos comprimentos totais foi de 25 mm para o controle e 23 mm para as plantas que foram expostas aos COVs do fungo *C. rigida* pelo período de 3 dias, o que significa a redução de 8% na média dos comprimentos. O presente ensaio teve a redução na média dos comprimentos totais de aproximadamente 14% com 4 dias de exposição das plântulas aos COVs do fungo *C. rigida* com 38,42 mm na média do controle e 33,08 mm na média das plantas com o fungo.

Figura 25 - Ensaio aleloquímico dos compostos orgânicos voláteis do fungo *Coriolopsis rigida* com a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*): A) Controle plântulas; B) Plântulas x Fungo; C) Controle fungo.



Fonte: Autora

Tabela 6 - Comprimento médio total das raízes e plântulas em milímetros (mm) do ensaio aleloquímico dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelo fungo *Coriolopsis rigida*.

Tratamentos	Raíz	Plântula	Raíz + Plântula
Controle	23,84	14,58	38,42
Fungo	19,61	13,47	33,08

Fonte: Autora

6 CONCLUSÃO

A partir do cultivo do fungo *C. rigida* isolado de *Cochlospermum regium*, em meio sólido de arroz, obteve-se dois extratos brutos das frações acetone e hexano. O perfil químico obtido por CCDC e CLAE de ambos os extratos apresentaram a existência de uma variedade de substâncias a serem exploradas, sendo que os cromatogramas indicaram maior incidência de compostos com caráter apolar.

A comparação do perfil químico por CCDC e CLAE do extrato bruto ACN, obtido da fermentação fúngica em meio sólido de arroz, indicou maior produção de metabólitos em comparação com o perfil químico do extrato bruto obtido da fermentação fúngica em meio líquido Czapek, o que pode indicar que o meio sólido de arroz propicia melhores condições para a produção de metabólitos secundários pelo fungo.

Utilizando técnicas de Cromatografia em Coluna e Cromatografia em Alta Eficiência duas substâncias foram isoladas do extrato ACN, e tiveram sua estrutura química elucidada por RMN. Os compostos foram identificados como tirosol (**1**) e 1-*N*-metil-*p*-fenol acetamida-2-*O*-glicosídeo-propan-1-ona (**2**).

O ensaio aleloquímico com o extrato bruto ACN indicou a inibição das sementes de alface nas concentrações testadas, destacando-se as concentrações 2.000 e 3.000 mg/L com maior inibição. O ensaio de toxicidade do extrato bruto ACN frente ao microcrustáceo *Artemia* sp. apresentou-se como não tóxico nas concentrações testadas.

As amostras obtidas pelo método de hidrodestilação e microextração em fase sólida foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Das amostras referentes ao método de hidrodestilação, 16 compostos foram identificados, sendo o 5-metil-2-furanocarboxaldeído o composto majoritário e das amostras referentes ao método de microextração em fase sólida, o álcool feniletílico foi o composto majoritário do total de 5 compostos identificados.

O ensaio aleloquímico dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelo fungo endofítico *C. rigida* teve um leve efeito inibitório na germinação das sementes de alface.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, Robert P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4.1 ed. Carol Stream: Allured, 2017. 804 p.
- ALMEIDA-APOLONIO, Adriana A. et al, Control of *Cryptococcus Gattii* Biofilms by an Ethanolic Extract of *Cochlospermum Regium* (Schrank) Pilger Leaves. **The Scientific World Journal**, p.1-6, 2018.
- AMORIM, Soraya Sander. **Taxonomia, diversidade e bioprospecção de fungos endofíticos associados à planta medicinal *Lafoensia pacari* A. St. Hil. (mangava-brava) presente no Pantanal Mato-grossense**. 2018. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Pós-Graduação em Microbiologia, Belo Horizonte, 2018.
- ANTUNES, Marlene Neves. **Constituintes Químicos de *Cochlospermum regium* (Martius e Schrank) Pilger (Bixaceae)**. 2009. Dissertação (Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica) - Universidade Católica De Goiás, Universidade Estadual De Goiás, Centro Universitário De Anápolis, Programa de Pós-Graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica, Goiânia, 2009.
- ARRUDA, Gabriel Leda de. **Avaliação da produção metabólica do fungo endofítico *Asordaria conoidea* isolado de *Cochlospermum regium* utilizando o método OSMAC**. 2019. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Química, Gurupi, 2019.
- ARRUDA, Gabriel Leda de et al. Aromatic compounds from the endophytic fungus *Asordaria conoidea* and their allelochemical property using OSMAC strategy. **Natural Product Research**, p.1-4, 2021.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16530: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Artemia* sp. (Crustacea, Brachiopoda)**. ABNT NBR 16530:2016: Rio de Janeiro, 2016, 16p.
- BLACKWELL, Meredith. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 Million Species? **American Journal of Botany**, v.98, n.3, p.426-438, 2011.
- CAMILLO, J. et al. Conservação in vitro de *Cochlospermum regium* (Schrank) pilg.- cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n.2, p.185, 2009.
- CANUTO, Kirley Marques et al. **Fungos Endofíticos: Perspectiva de Descoberta e Aplicação de Compostos Bioativos na Agricultura**. 1. Ed. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, Brasília, 2012. 34p.
- CARVALHO, R.S. et al. Antibacterial and antifungal activities of phenolic compound-enriched ethyl acetate fraction from *Cochlospermum regium* (mart. Et. Schr.) Pilger roots: Mechanisms of action and synergism with tannin and gallic acid. **South African Journal of Botany**, v. 114, p.181-187, 2018.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Revista Virtual de Química**, v.5, n.3, p.423 e 425, maio-junho, 2013.

CHEEK, Martin et al. New scientific discoveries: Plants and fungi. **Plants, People, Planet**, v.2, p.371-388, 2020.

CHEN, Bo et al. Bioactive Metabolites and Potential Mycotoxins Produced by *Cordyceps* Fungi: A Review of Safety. **Toxins**, v.12, n.410, p.1-13, 2020.

CNCFlora. *Cochlospermum regium* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 **Centro Nacional de Conservação da Flora**. Disponível em <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cochlospermum_regium>. Acesso em 21 setembro 2020.

CONTI, R.; GUIMARÃES, D. O.; PUPO, M. T. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. **Ciência e Cultura**, v.64, n.3, p.44, São Paulo, 2012.

CHRISTOPHORIDOU, S.; DAIS, P. Detection and quantification of phenolic compounds in olive oil by high-resolution ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v.633, n.2, p.283-292, 2009.

DANTAS, Sara Bruna Sousa. **Estudo químico do fungo endofítico *Corioliopsis rigida* isolado de *Cochlospermum regium***. 2020. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Química, Gurupi, 2020.

DÍAZ, Rosario et al. Biochemical and molecular characterization of *Corioliopsis rigida* laccases involved in transformation of the solid waste from olive oil production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.88, p.133-142, 2010.

FAN, W.; XU, Y.; ZHANG, Y.; Characterization of Pyrazines in Some Chinese Liquors and Their Approximate Concentrations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p. 9956-9962, 2007.

FISHER, Matthew C. et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, v.484, p.186-194, abril 2012.

FLORINDO, Raissa Hellen da Silva. **Bioprospeção de metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos endofíticos associados à *Piper sp.* coletada no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais**. 2019. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Ouro Preto, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Ouro Preto, 2019.

FORZZA, Rafaela Campostrini et al. **Catálogo de Plantas e Fungos**. v.1. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. 871p.

GALINDO-SOLÍS, J. M.; FERNÁNDEZ, F. J. Endophytic Fungal Terpenoids: Natural Role and Bioactivities. **Microorganisms**, v.10, n.339, p.1-22, 2022.

GBIF Backbone Taxonomy. *Corioloopsis rigida* (Berk. & Mont.) Murrill in GBIF Secretariat (2021). **Global Biodiversity Information Facility**. Disponível em <<https://www.gbif.org/species/2546474>>. Acesso em 22 julho 2022.

GOLDMAN, Gustavo Henrique. New Opportunities for Modern Fungal Biology. **Frontiers in Fungal Biology**, v.1, p.1-3, 2020.

GOUDA, Sushanto et al. Endophytes: A Treasure House of Bioactive Compounds of Medicinal Importance. **Frontiers in Microbiology**, v.7, n.1538, p.1-8, 2016.

GUO, Xiangyang et al. Aroma profiles of green tea made with fresh tea leaves plucked in summer. **Food Chemistry**, v.363, p.1-10, 2021.

GUPTA Shubhpriya et. al. A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi. **Biotechnology Advances**, v.39, p.1, 2 e 9, Mar–Apr, 2020.

HAWKSWORTH, D.L.; LÜCKING R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. **Microbiology Spectrum**, v.5, n.4, p.1-17, 2017.

HUSSEIN, Haider Mashkoor. Analysis of trace heavy metals and volatile chemical compounds of *Lepidium sativum* using atomic absorption spectroscopy, gas chromatography mass spectrometric and fourier-transform infrared spectroscopy. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v.7, n.4, p.2529-2555, 2016.

JERKOVIĆ, I. et al. Comparison of hydrodistillation and ultrasonic solvent extraction for the isolation of volatile compounds from two unifloral honeys of *Robinia pseudoacacia* L. and *Castanea sativa* L. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.14, p.750-756, 2007.

JMII, G.; ZORRILLA, J.G.; HAOUALA, R. Allelochemicals from *Thapsia garganica* leaves for *Lolium perenne* L. control: the magic of mixtures. **Chemoecology**, v.32, p.81-87, 2022.

KARTHIKEYAN, A.; JOSEPH, A.; NAIR, B. G. Promising bioactive compounds from the marine environment and their potential effects on various diseases. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v.20, n.14, p.1-38, 2022.

KIZILER, Muhammed Enes et al. Farnesol and tyrosol: novel inducers for microbial production of carotenoids and prodigiosin. **Archives of Microbiology**, v.204:107, p.1-8, 2022.

LEME, Danny Ellen Meireles et al. In Vitro Control of Uropathogenic Microorganisms with the Ethanolic Extract from the Leaves of *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-8, 2017.

LIMA, Cristina Peitz de et al. Efeito alelopático e toxicidade frente à *Artemia salina* Leach dos extratos do fruto de *Euterpe edulis* Martius. **Acta Botanica Brasilica**, v.25, n.2, p.331-336, 2011.

- LIU, Jingke et al. Determination of the Volatile Composition in Brown Millet, Milled Millet and Millet Bran by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry. **Molecules**. v.17, p.2271-2282, 2012.
- LOYOLA, Rafael et al. **Áreas Prioritárias para Conservação e Uso Sustentável da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro : CNCFlora, 2014. 80p.
- MALLARD, W. Gary et al. Creation of Libraries of Recurring Mass Spectra from Large Data Sets Assisted by a Dual-Column Workflow. **Analytical Chemistry**, v.86, p.10231-10238, 2014.
- MARRERO, Osmany et al. Evaluación ecotoxicológica de aguas residuales industriales del Centro de Bioactivos Químicos (Santa Clara, Cuba) en *Artemia* sp. **Tecnología y ciencias del agua**, v.11, n.2, p.291-308, 2020.
- MARTINELLI, G.; MESSINA, T.; FILHO L.S. **Livro vermelho da flora do Brasil – Plantas raras do Cerrado**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro: CNCFlora, 2014. 320p.
- MIRANDA, Luiz Renato Lima Silva. **Modulação do perfil metabólico do fungo endofítico *Coriopsis rigida* utilizando o método OSMAC**. 2019. Monografia (Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2019.
- MORAES, Gleys Kellen Aquino. **Estudo do potencial bioherbicida do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado de *Cochlospermum regium***. 2020. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Gurupi, 2020.
- MORAES, G. K. A.; FERRAZ, L. F.; CHAPLA, V. M. Compostos Orgânicos Voláteis de Fungos Endofíticos e suas Aplicações Biotecnológicas. **Revista Virtual de Química**, v.12, p.1498-1510, 2020.
- MORAES, Gleys Kellen Aquino. **Isolamento e avaliação biológica de fungos endofíticos associados à *Cochlospermum regium***. 2018. Monografia (Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2018.
- NOR QUAIRUL IZZREEN, M. N.; HANSEN, A. S.; PETERSEN, M. A. Volatile compounds in whole meal bread crust: The effects of yeast level and fermentation temperature. **Food Chemistry**, v.210, p.566-576, 2016.
- PATRA, A.; ABDULLAH, S.; PRADHAN, R. C. Review on the extraction of bioactive compounds and characterization of fruit industry by-products. **Bioresources and Bioprocessing**, v9, n.14, p1-25, 2022.
- PEDROSO, Thiago Félix de Miranda et al. Chemical constituents of *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. root and its antioxidant, antidiabetic, antiglycation, and anticholinesterase effects in Wistar rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, p.1383-1392, 2019.

PENGSOOK, Anchulee et al. Antifeedant Activity and Biochemical Responses in *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) Infesting Broccoli, *Brassica oleracea* var. alboglabra exposed to *Piper ribesoides* Wall Extracts and Allelochemicals. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v.9, p.1-10, 2022.

PÉREZ, O. P.; LAZO, F. J. Ensayo de artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. **Revista de Protección Vegetal**, v.25, n.1, p.34-43, 2010.

PIRES, N. de M.; OLIVEIRA, V. R. Alelopatia. In: OLIVEIRA JR, Rubem Silvério de; COSTANTIN, Jamil; INOUE, Mirian Hiroko. **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. 22, ed. Curitiba: Omnipax, 2011. Cap. 5.

RAJANI, P. et al. Inhibition of plant pathogenic fungi by endophytic *Trichoderma* spp. through mycoparasitism and volatile organic compounds. **Microbiological Research**, v.242, p.1-12, 2021.

RESENDE, M. de L. F.; GUIMARÃES. L. de L. **Inventários da Biodiversidade do Bioma Cerrado: Biogeografia de Plantas**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2007. 14p.

RIBEIRO, Bruno A. et al. Chemical Diversity of Secondary Metabolites Produced by Brazilian Endophytic Fungi. **Current Microbiology**, v.78, p.33-54, 2020.

SALVATORE, M.M; ALVES, A.; ANDOLFI, A. Secondary Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*: Distribution, Chemical Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. **Toxins**, v.12, n.457, p.1-29, 2020.

SAMPEDRO, Inmaculada et al. Removal of monomeric phenols in dry mill olive residue by saprobic fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p. 4487-4492, 2004.

SANTORE, Thaís. **Atividade alelopática de extratos de plantas medicinais sobre a germinação de corda-de-viola (*Ipomoea nil* (L.) Roth.)**. 2013. Monografia (Curso de Graduação em Tecnologia em Biotecnologia) – Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2013.

SANTOS FILHO, F. C.; AMARAL, L. da S.; RODRIGUES-FILHO, E. Composition of essential oils from *Cupressus lusitanica* and a *Xylariaceae* fungus found on its leaves. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.39, p.485-490, 2011.

SANTOS FILHO, Florisvaldo Clementino. **Análise dos constituintes fixos e voláteis de fungos endofíticos dos gêneros *penicillium* e *xylaria* e de suas plantas hospedeiras**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, São Carlos, 2010.

SANTOS, Gabriella. **Perfil de compostos voláteis de condensados obtidos a partir da fumaça gerada na torração do café**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência dos alimentos) Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Lavras, 2013.

- SAPARRAT, Mario C. N. et al. *Corioloopsis rigida*, a potential model of white-rot fungi that produce extracellular laccases. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.41, p.607-617, 2014.
- SCOGNAMIGLIO, J. et al. Fragrance material review on phenylethyl alcohol. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p.S224-S239, 2012.
- SONG, Jianxin et al. Assessment of characteristics aroma of heat pump drying (HPD) jujube based on HS-SPME/GC-MS and e-nose. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.110, p.1-7, 2022.
- SPECIAN, Vânia et al. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, v.16, n.14, p.345-351, 2014.
- SRIRAN, V. et al. Identification of phytochemicals in hydro alcohol extract of *Annona muricata* fruit using GC-MS analysis. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n.2, p.120-122, 2018.
- STASZEK, Pawel et al. ROS Metabolism Perturbation as an Element of Mode of Action of Allelochemicals. **Antioxidants**, v.10, p.1-23, 2021.
- STROBEL, Gary. The Emergence of Endophytic Microbes and Their Biological Promise. **Journal of Fungi**, v.4, n. 2, p.2, may., 2018.
- THE BRAZIL FLORA GROUP. Brazilian Flora 2020: Innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). **Rodriglésia**, v.69, n.4, p.1517 e 1518, 2018.
- TORTORA, Gerard J. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 964p.
- VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. J. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.11, p.463-471, 1963.
- VIEIRA, R. F.; CAMILLO, J.; CORADIN, L. (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Centro-Oeste**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2018. 1160p. (Série Biodiversidade; 44).
- WAN, Aida Wan Mustapha et al. Relating Descriptive Sensory Analysis to Gas Chromatography/Mass Spectrometry of Palm Sugars Using Partial Least Squares Regression. **ASEAN Food Journal**, v.15, n.1, p.35-45, 2008.
- WILLIS, K. J. **State of the World's Fungi**. Royal Botanic Gardens, Kew, ed. 2018. 92p. ISBN: 978-1-84246-678-0.
- YAN, Lu et al. Production of bioproducts by endophytic fungi: chemical ecology, biotechnological applications, bottlenecks, and solutions. **Microbiology and Biotechnology**, v.102, p.6279-6298, Germany, 2018.

YISAK, Hagos et al. Volatile compounds in two varieties of teff (*Eragrostis tef* (Zuccagni) Trotter) cultivated in Ethiopia by gas chromatography-mass spectrometry. **International Journal of Food Properties**, v.24, n.1, p.1279-1288, 2021.

ZANNE, Amy E. et al. Finding fungal ecological strategies: Is recycling an option? **Fungal Ecology**, v.46, 2020.

ZHANG, F.; FENG, T. Diterpenes Specially Produced by Fungi: Structures, Biological Activities, and Biosynthesis (2010–2020). **J. Fungi**, v.8, n.3, p.1-32, 2022.

ZHAO, Yuping et al. Extraction, preparation and identification of volatile compounds in Changyu XO brandy, **Chinese Journal of Chromatography**, v.26, n.2, p.212-222, 2008.

ZHAO, Ya-Zhou et al. Differential volatile organic compounds in royal jelly associated with different nectar plants. **Journal of Integrative Agriculture**, v.15, n.5, p.1157-1165, 2016.

APÊNDICE

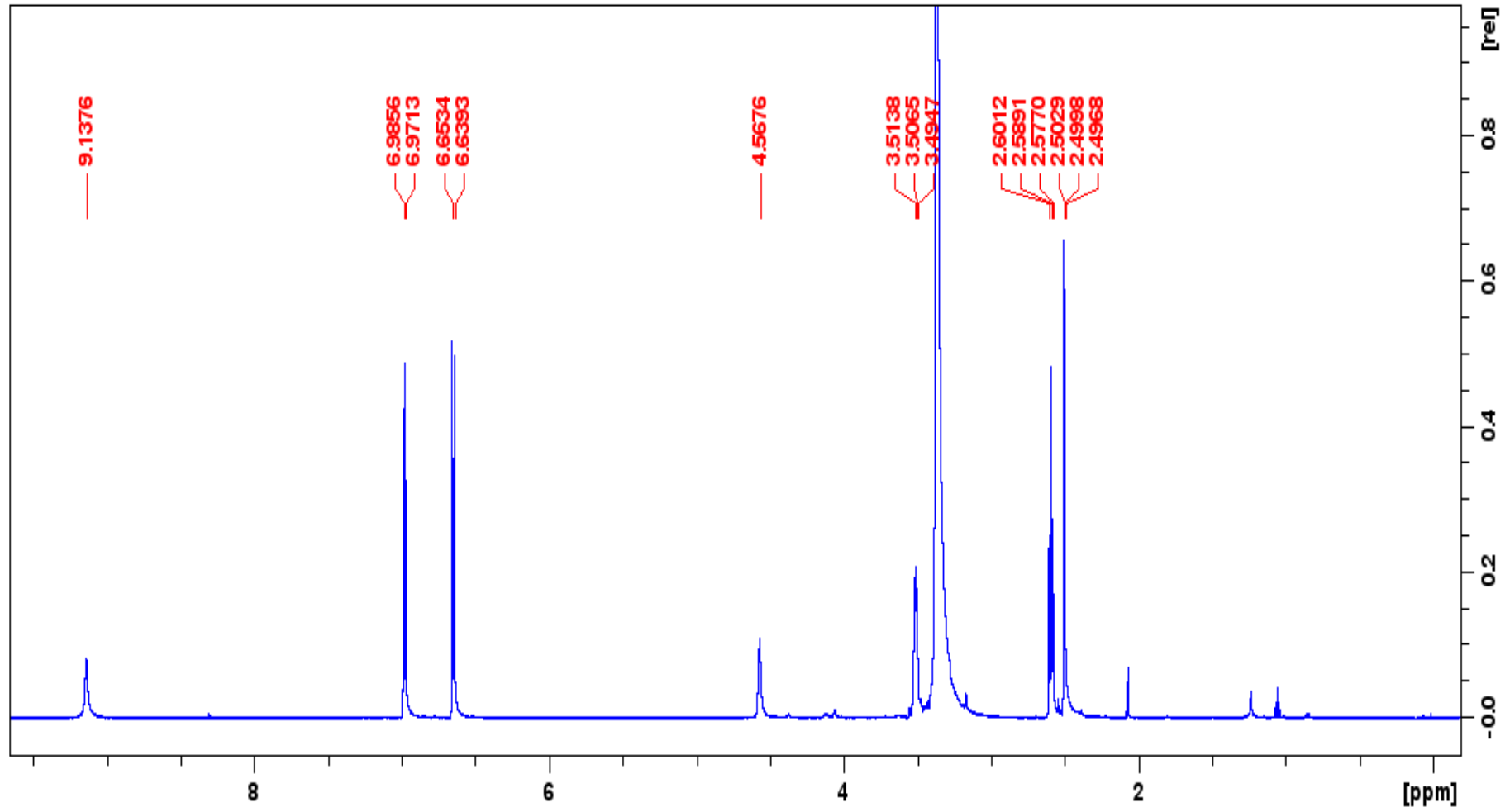
Figura 26 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO-*d*₆, 600 MHz) da substância **1**

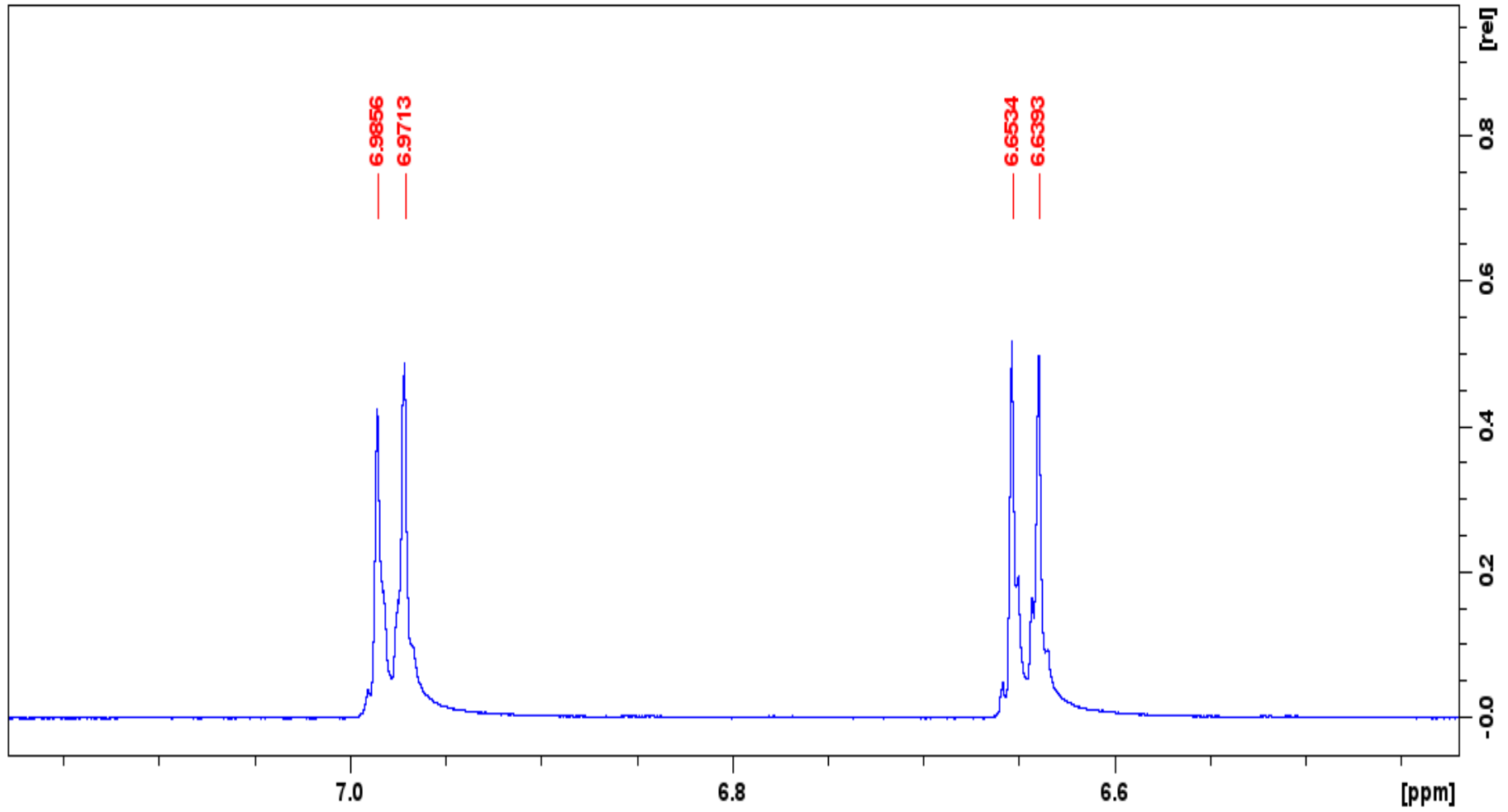
Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO-*d*₆, 600 MHz) da substância **1** δ 5-8ppm

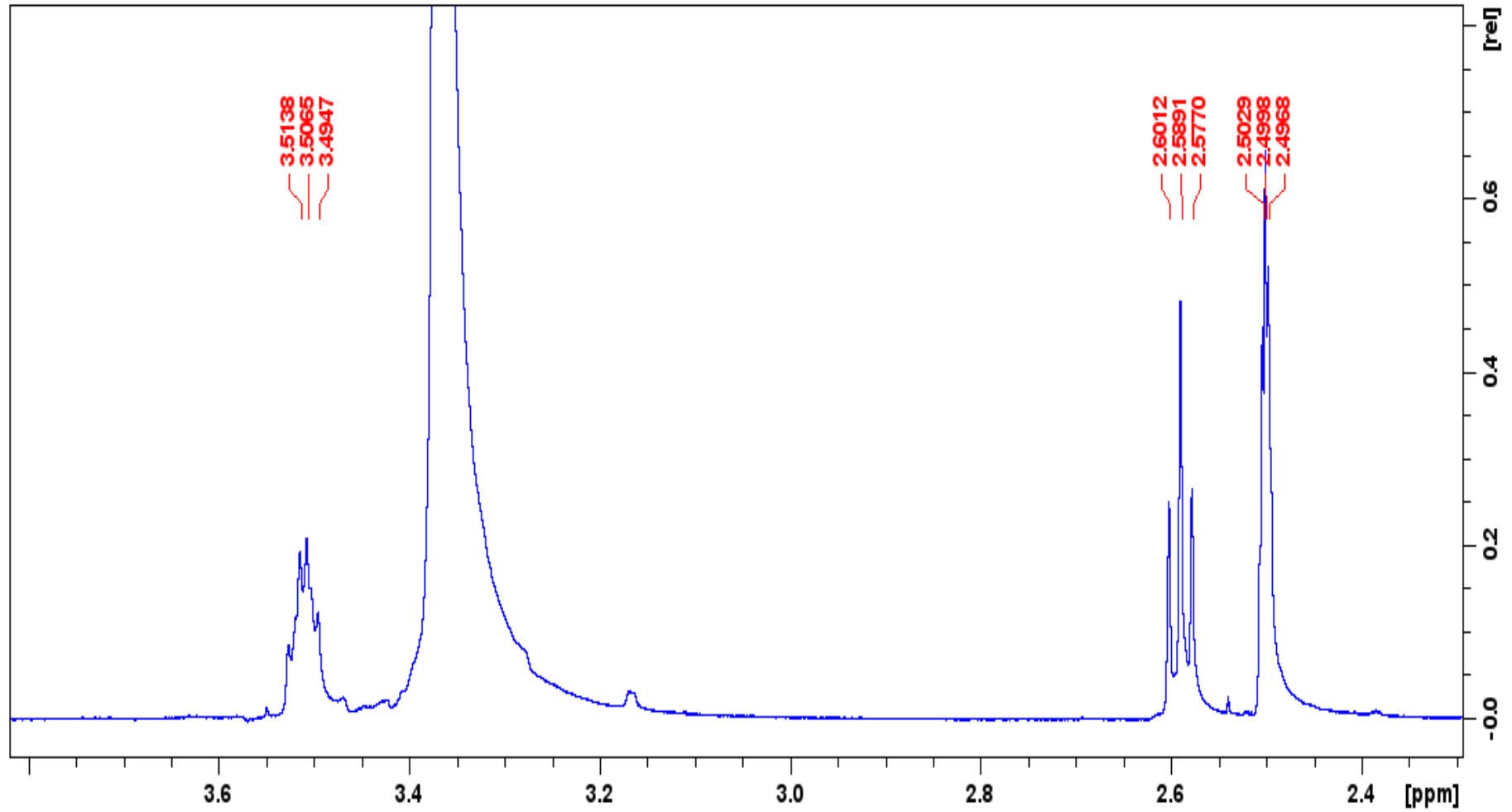
Figura 28 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) da substância **1** δ 2-4ppm

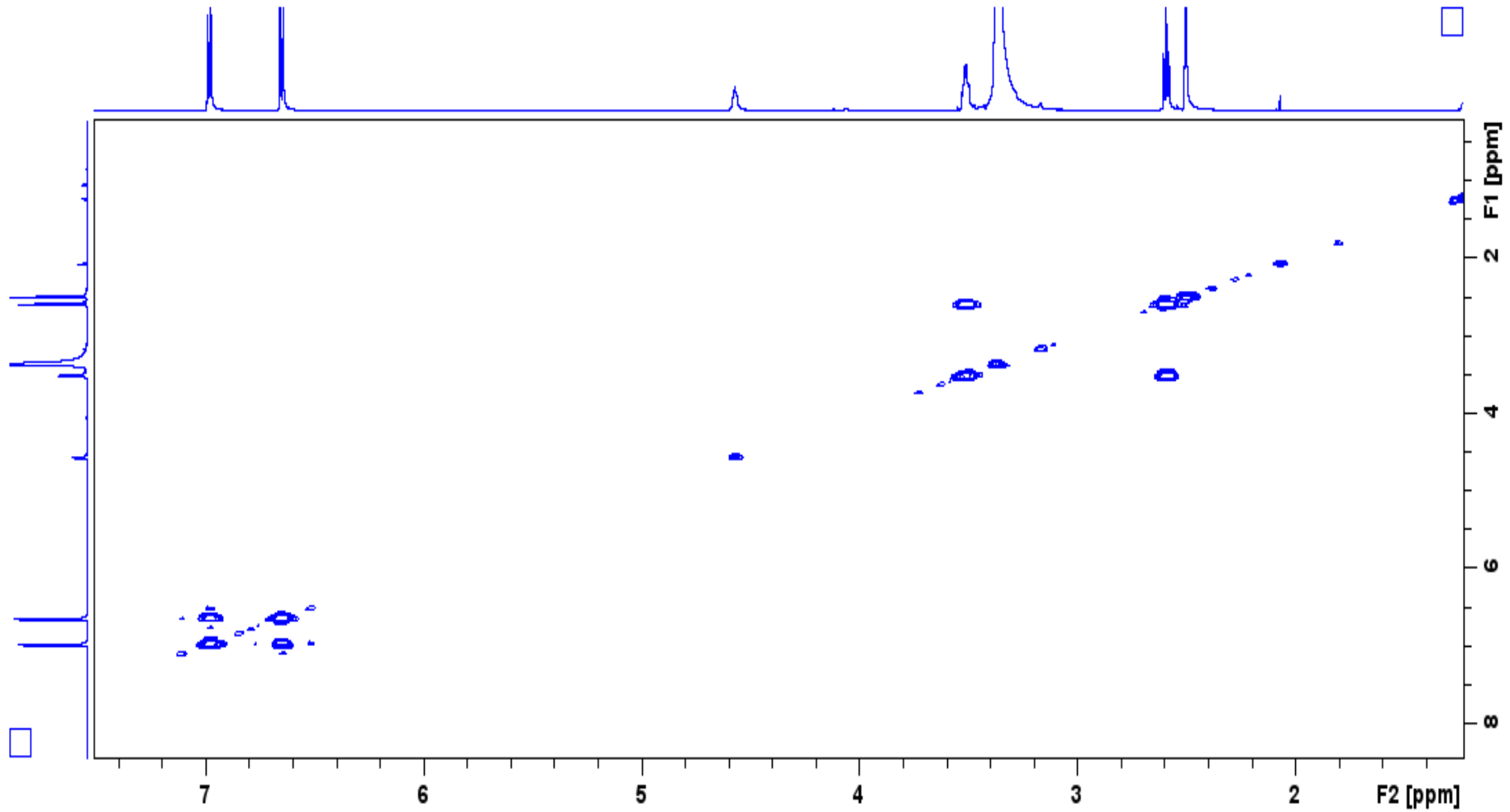
Figura 29 - Espectro COSY da substância **1** (DMSO-*d*₆, 600 MHz)

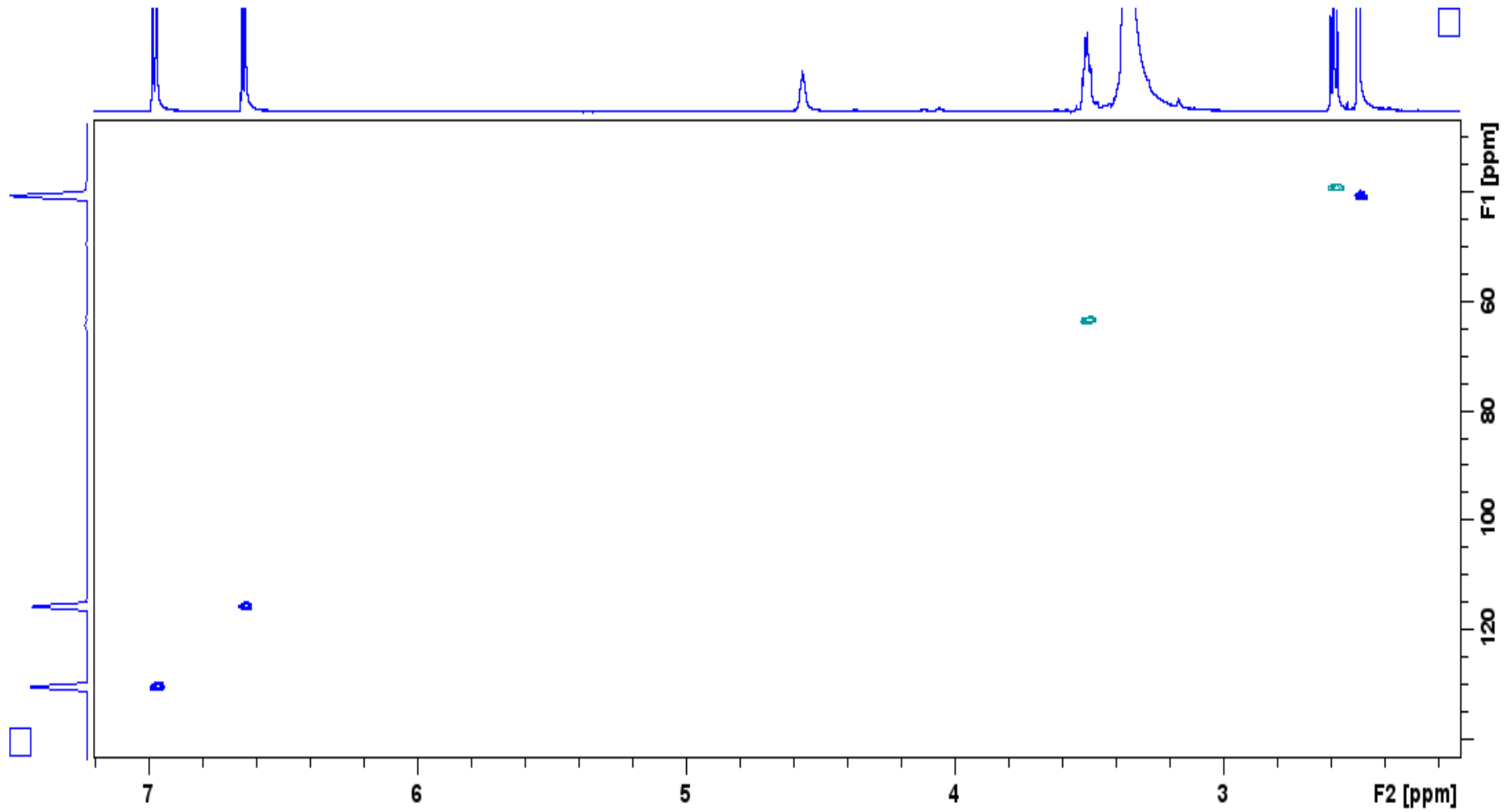
Figura 30 - Espectro HSQC da substância **1** (DMSO-*d*₆, 600 MHz)

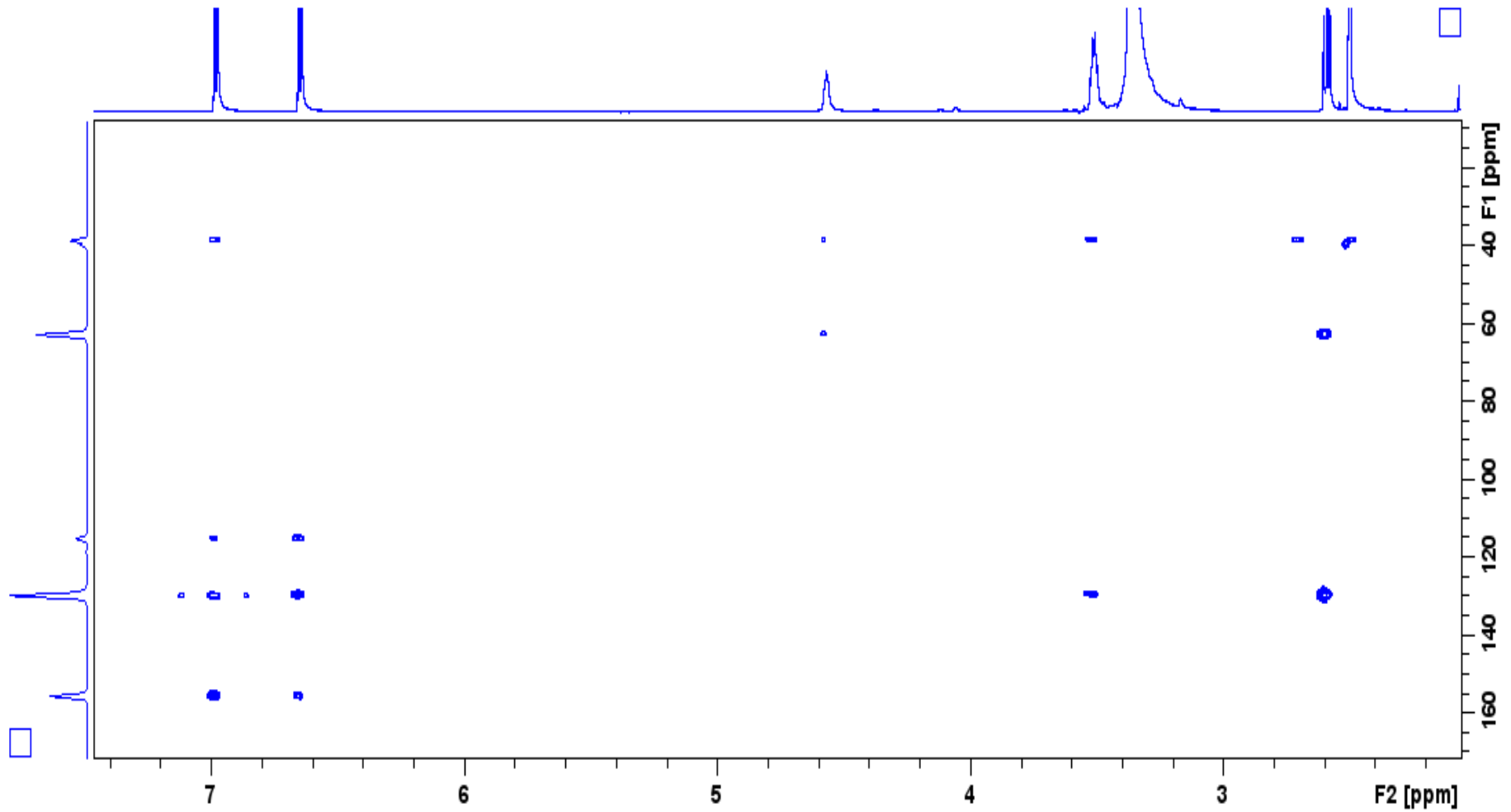
Figura 31 - Espectro HMBC da substância **1** (DMSO-*d*₆, 600 MHz)

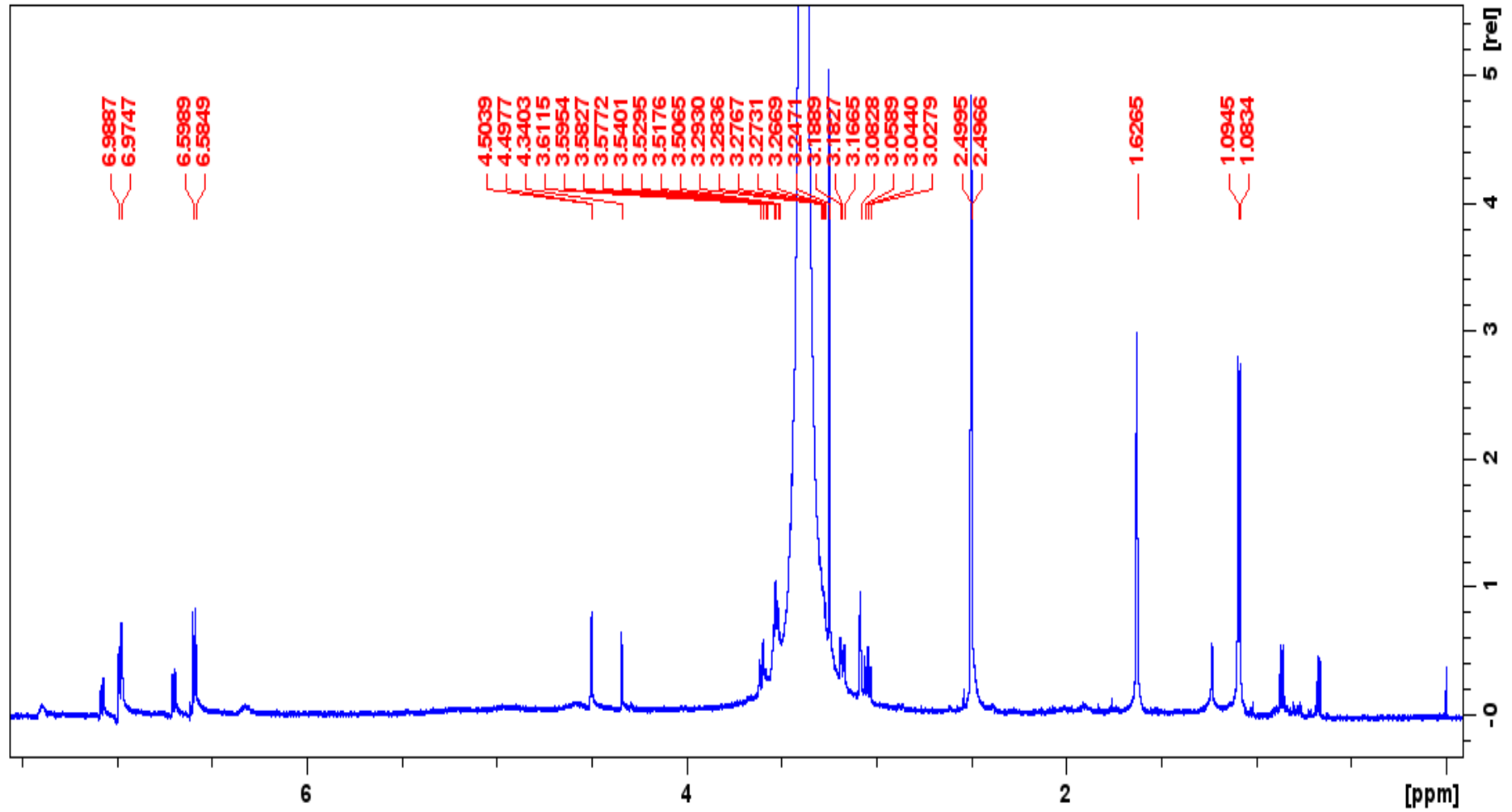
Figura 32 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) da substância 2

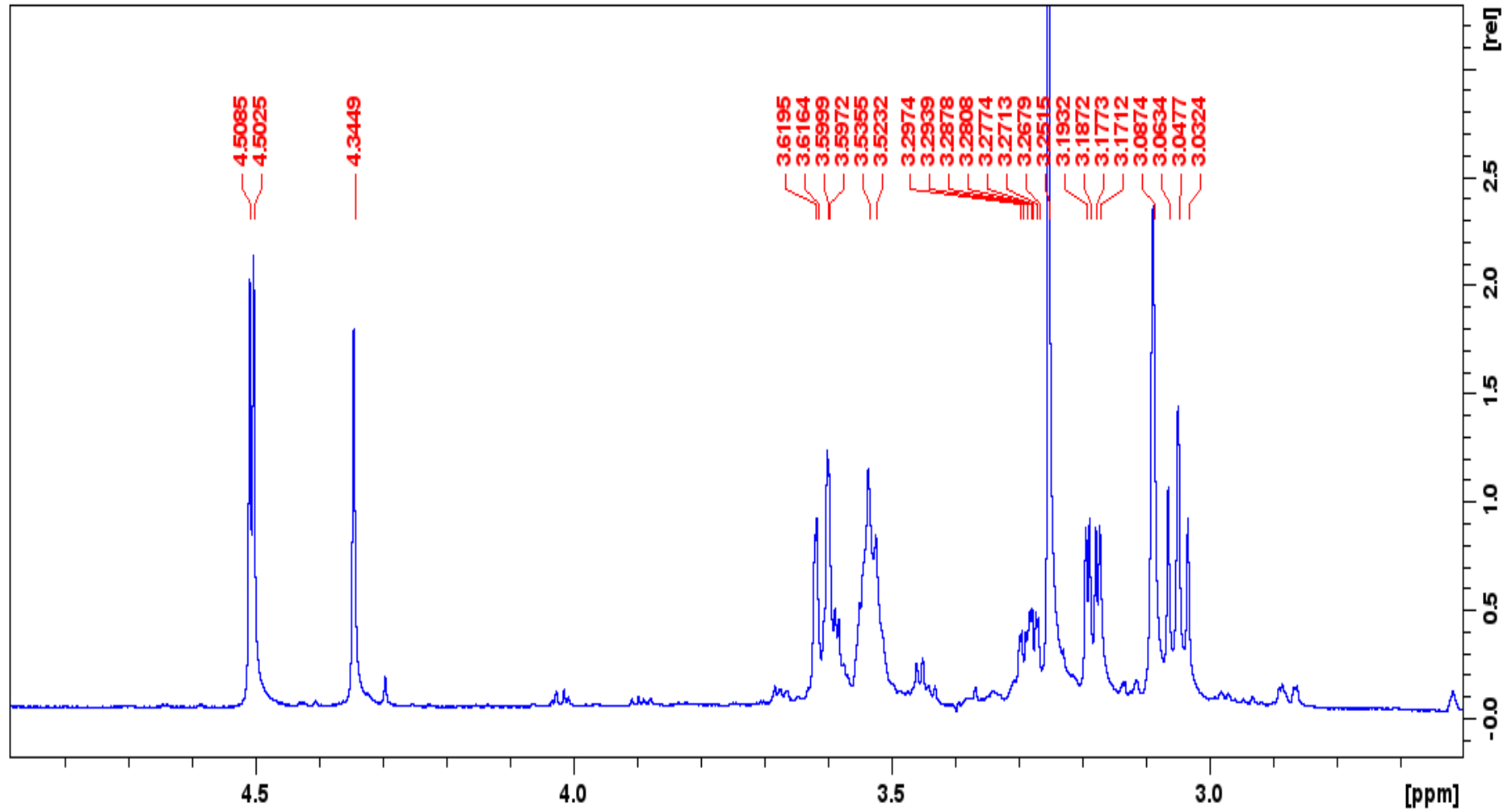
Figura 33 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) da substância **2** com supressão da água do DMSO

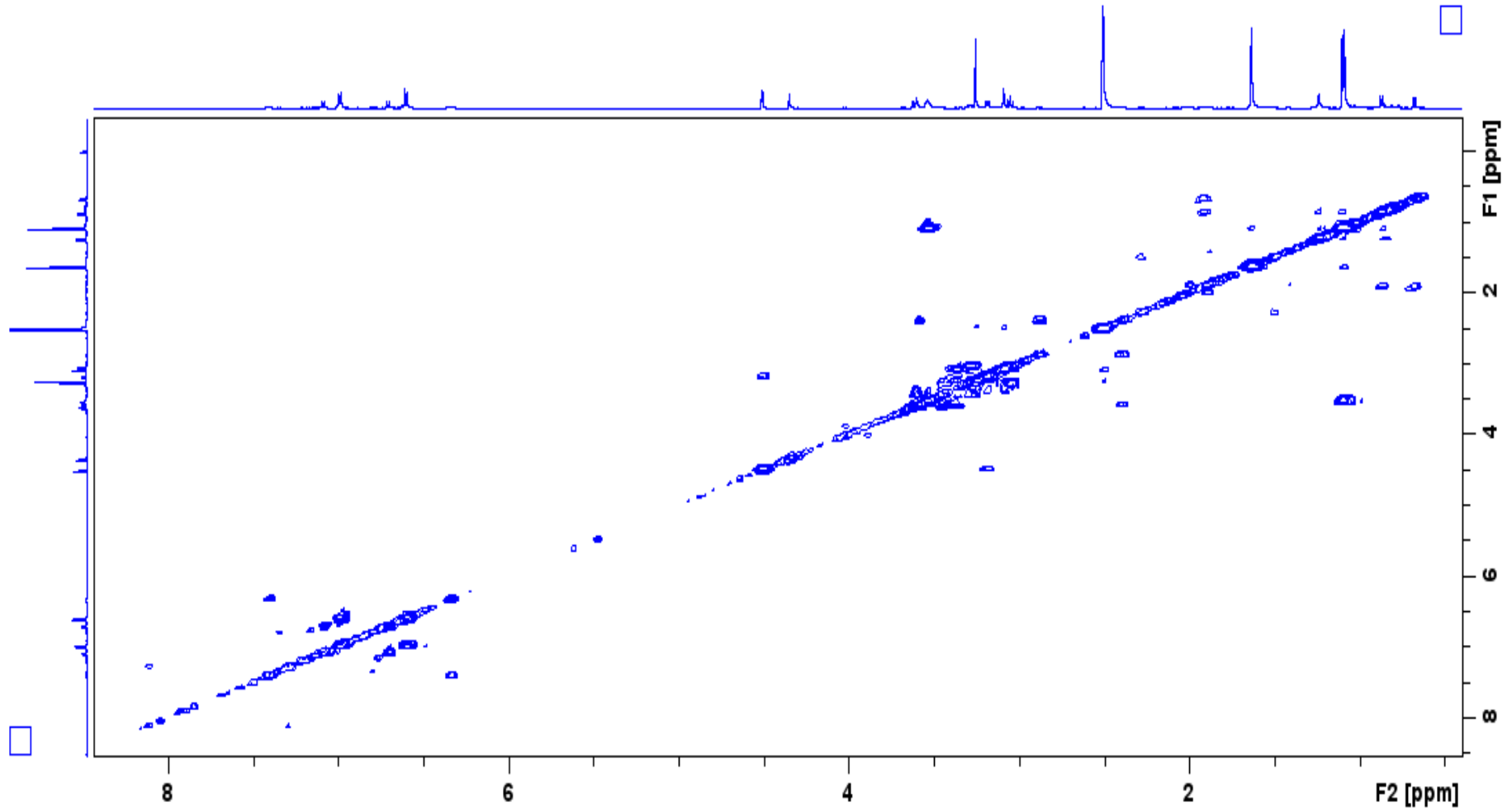
Figura 34 - Espectro COSY da substância **2** (DMSO-*d*₆, 600 MHz)

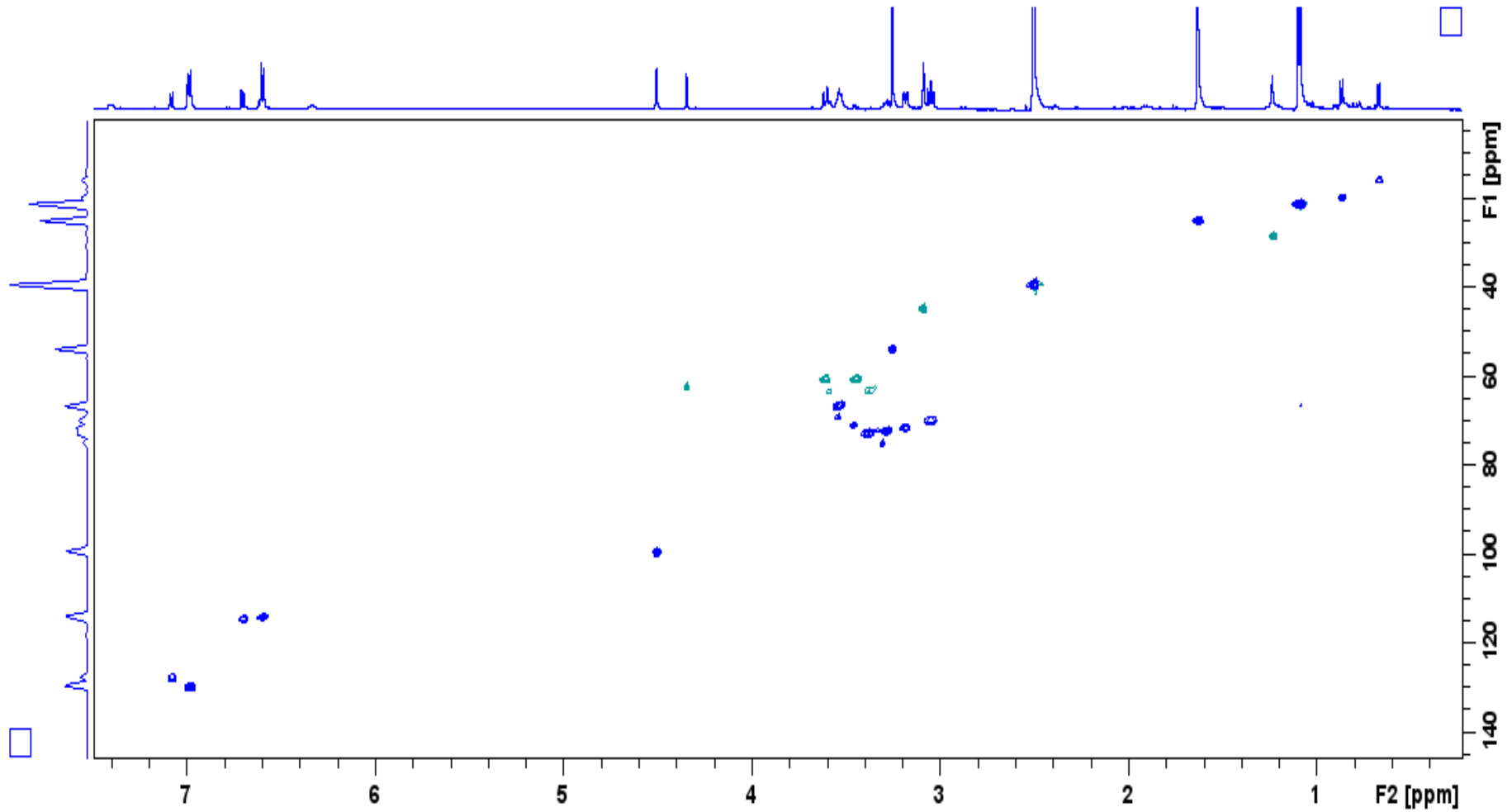
Figura 35 - Espectro HSQC da substância **2** (DMSO-*d*₆, 600 MHz)

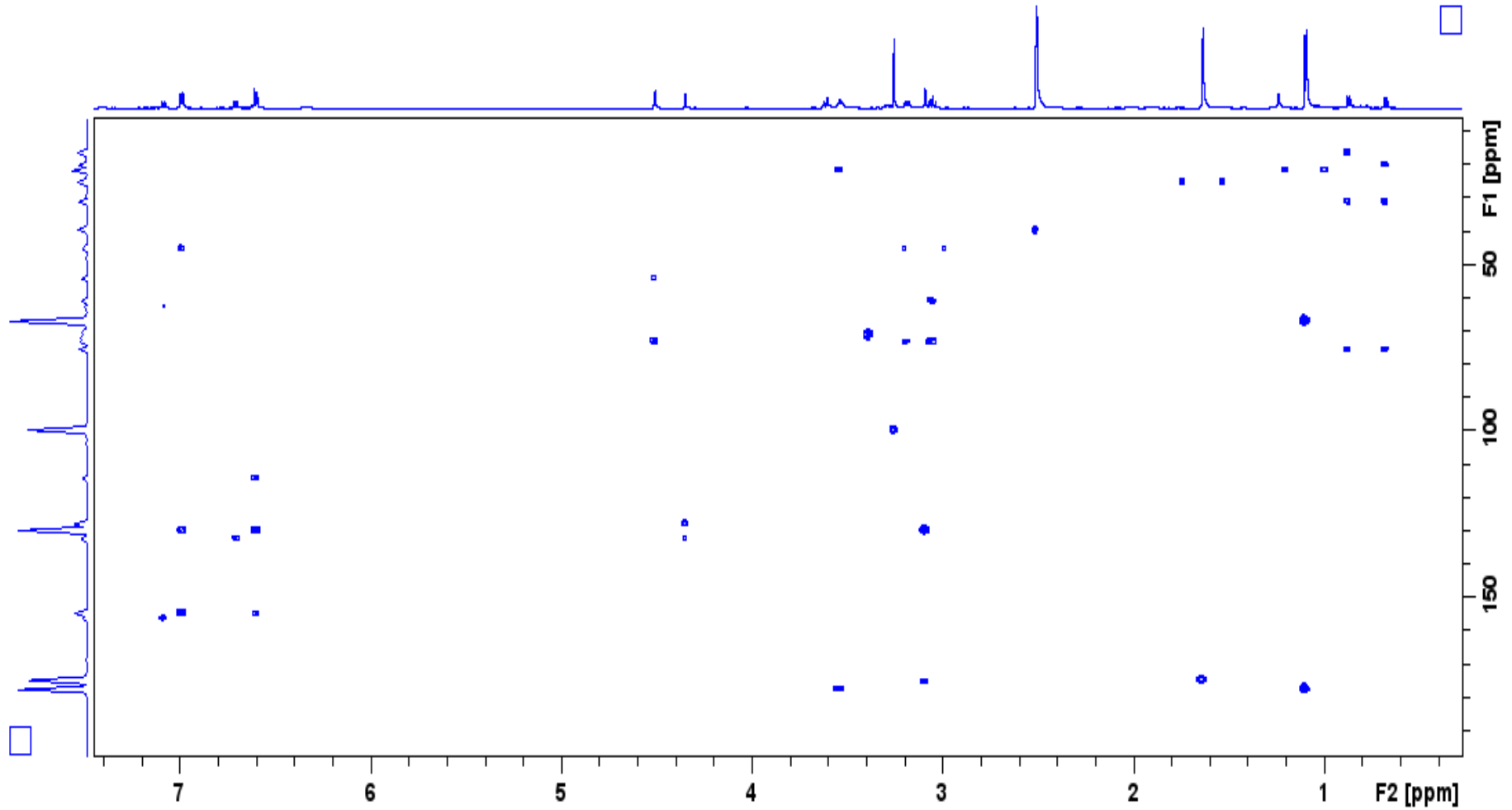
Figura 36 - Espectro HMBC da substância **2** (DMSO-*d*₆, 600 MHz)

Figura 37 - Cromatogramas das amostras F1H, F2H e F3H

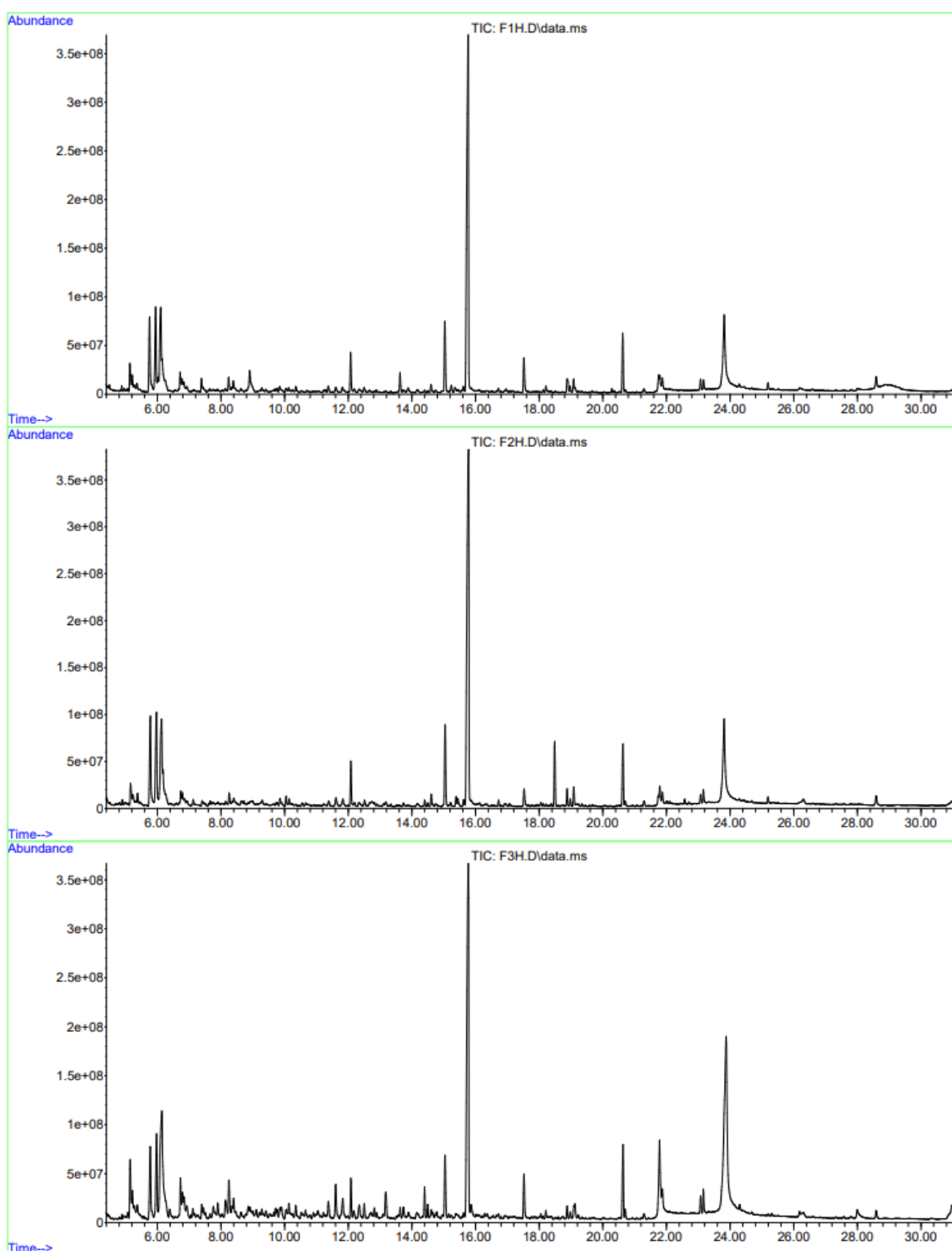


Figura 38 - Cromatogramas das amostras F1, F2 e F3

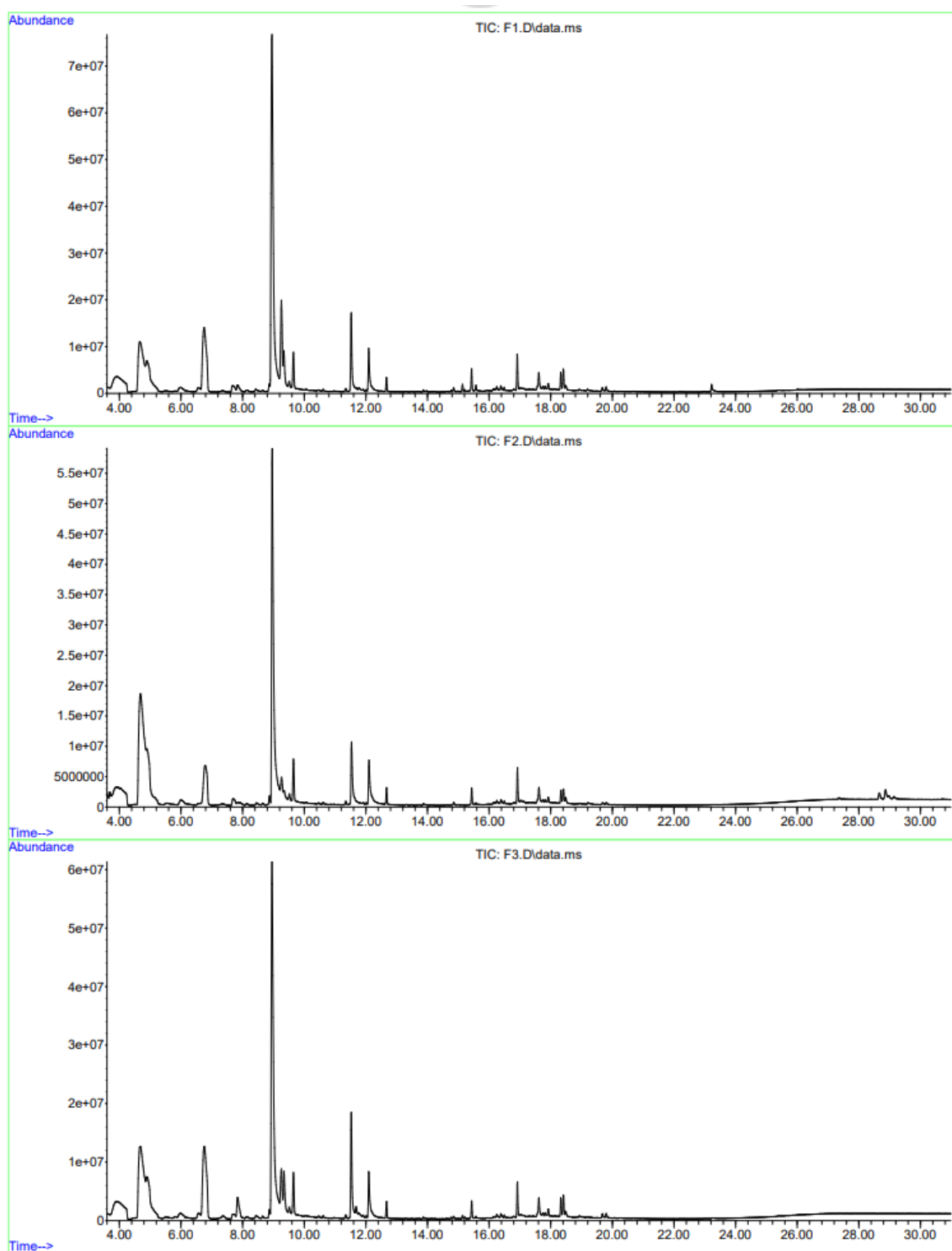


Figura 39 - Espectro de massas do 1-(2-furânil)etanonã

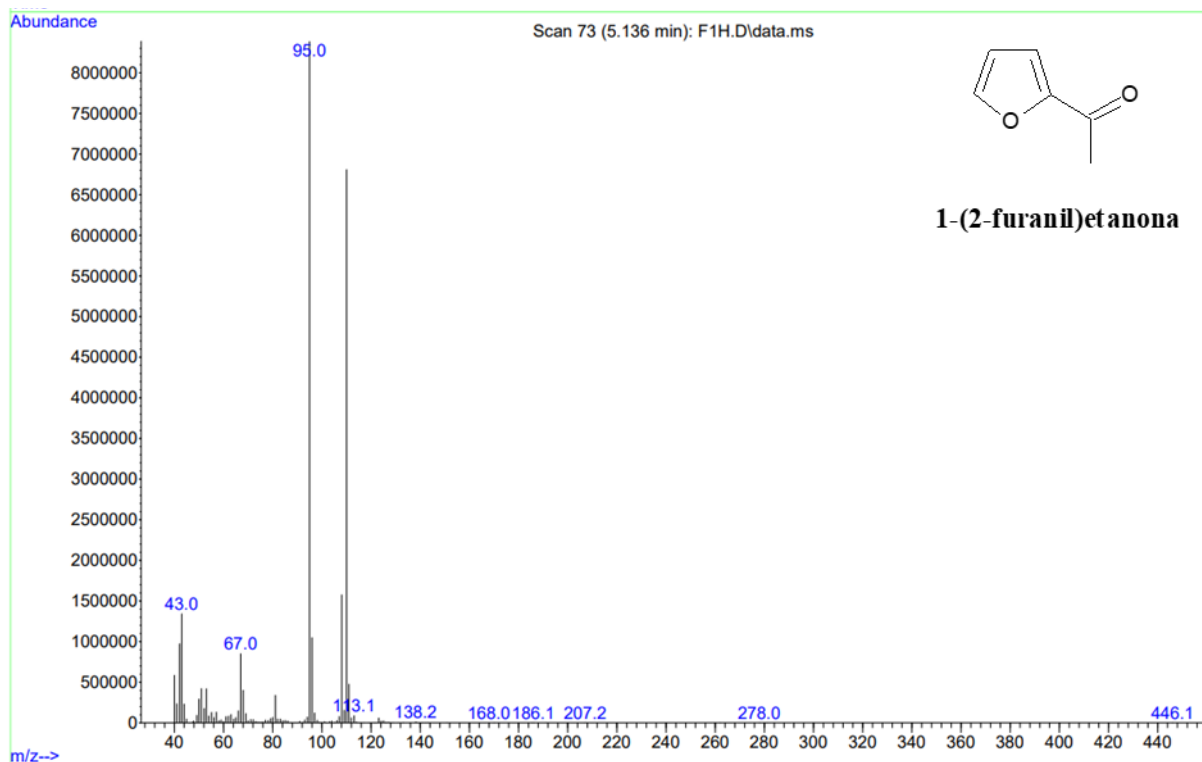


Figura 40 - Espectro de massas do 5-metil-2-furanocarboxaldeído

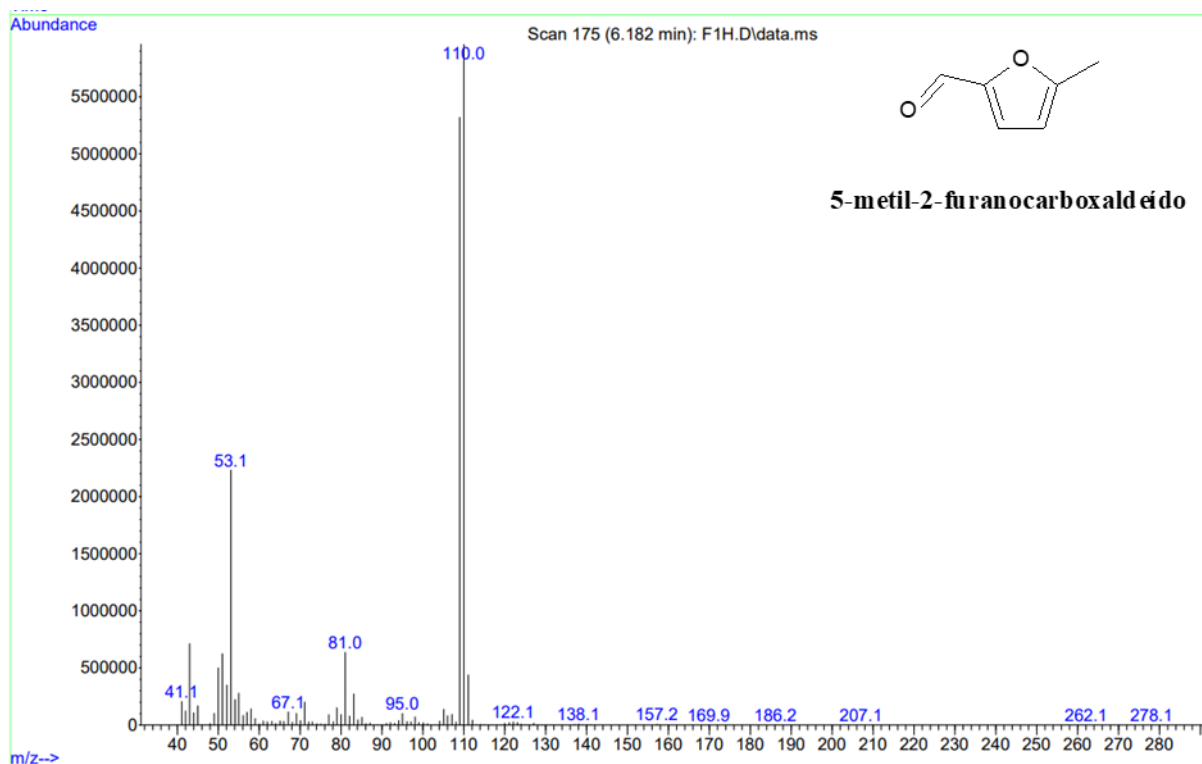


Figura 41 - Espectro de massas do 2-etil-5-metilpirazina

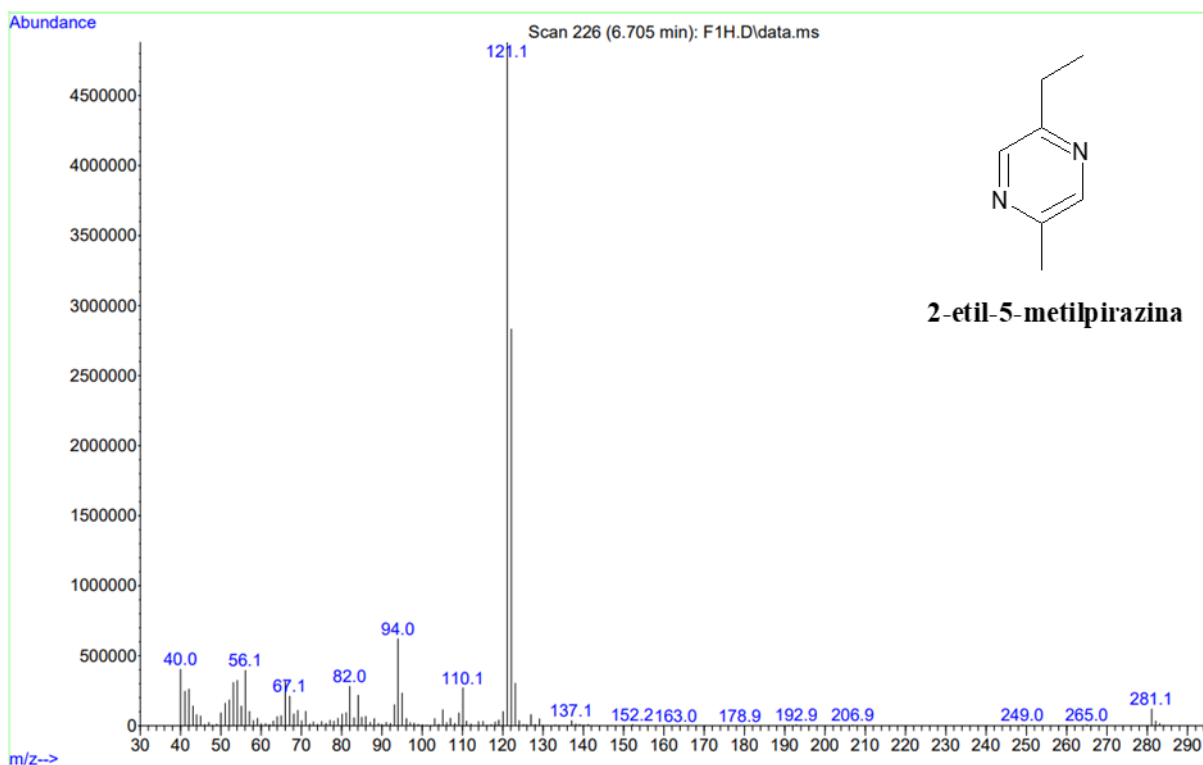


Figura 42 - Espectro de massas do 1-(2-furânil)-1-Propanona

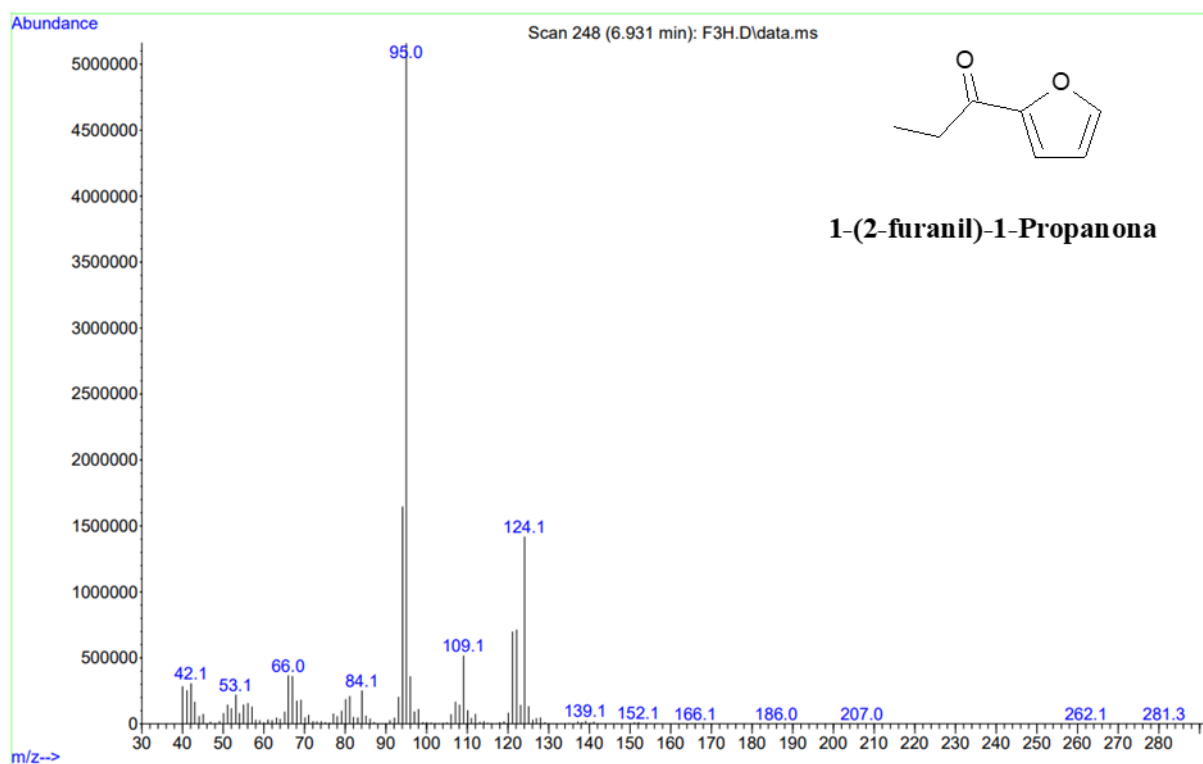


Figura 43 - Espectro de massas do 2-etnil-6-metil-pirazina

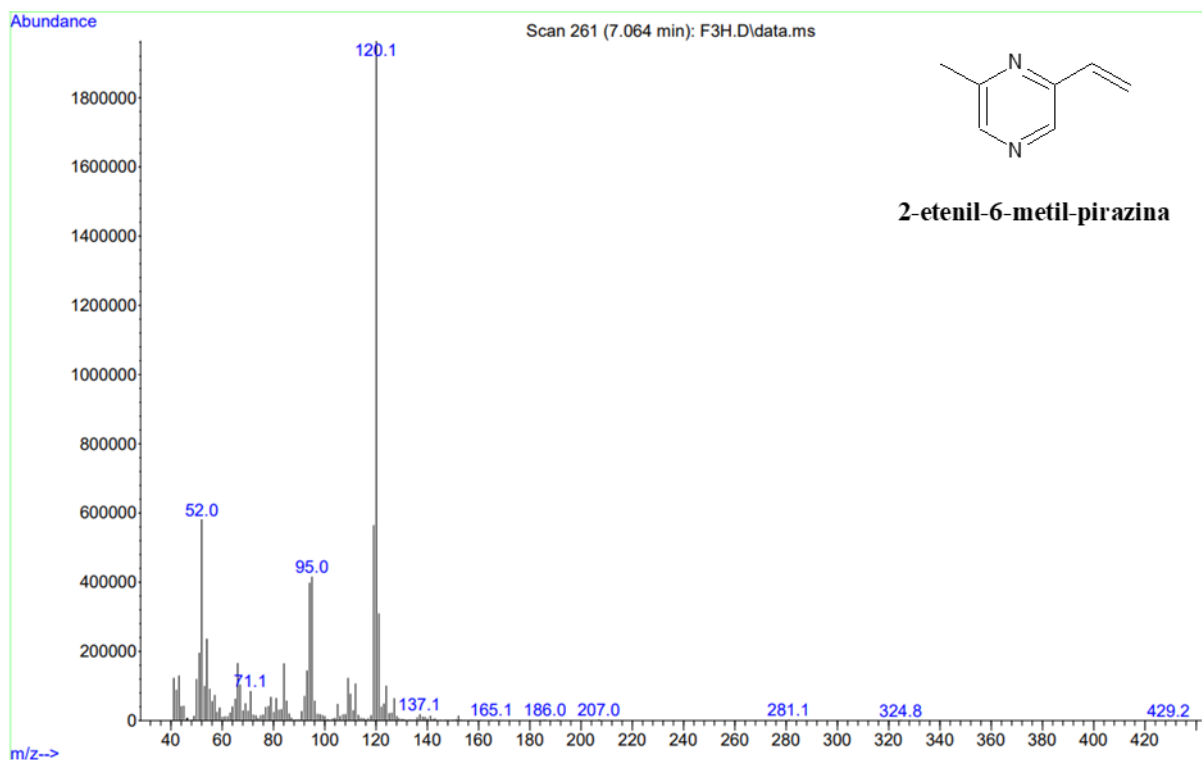


Figura 44 - Espectro de massas do 2-acetiltiazol

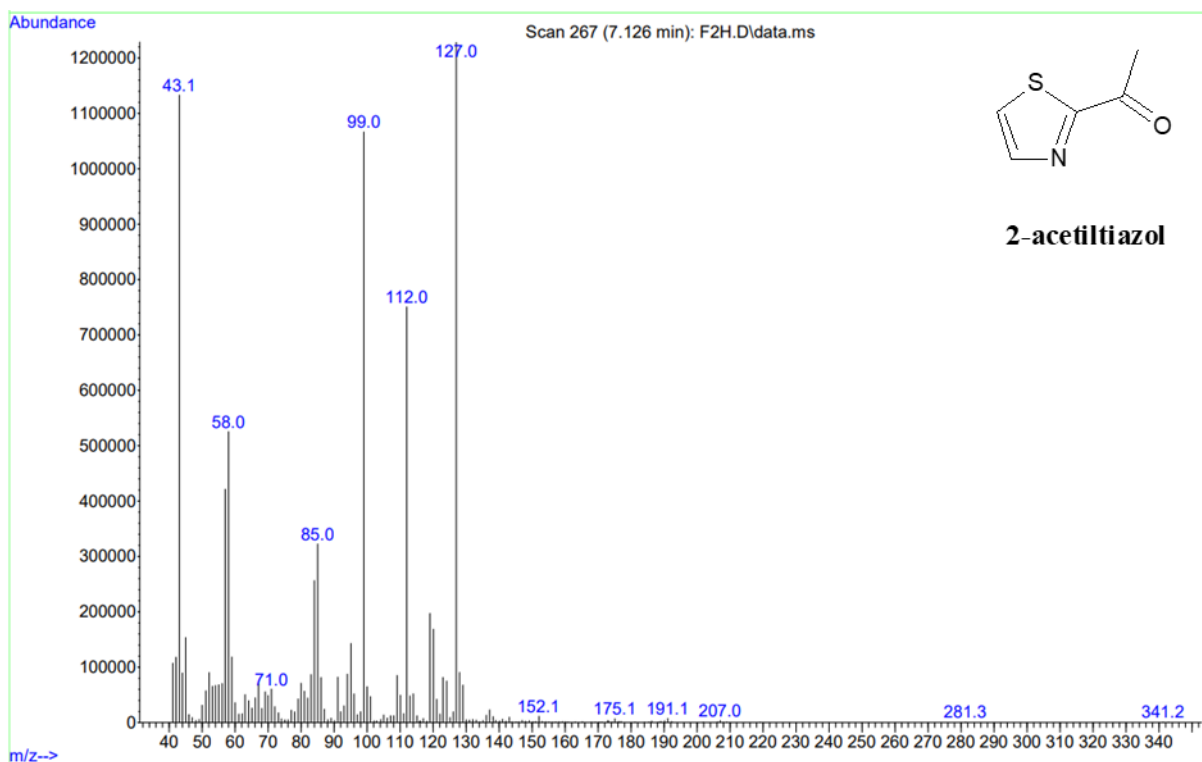


Figura 45 - Espectro de massas do 2-acetil-5-metil-furano

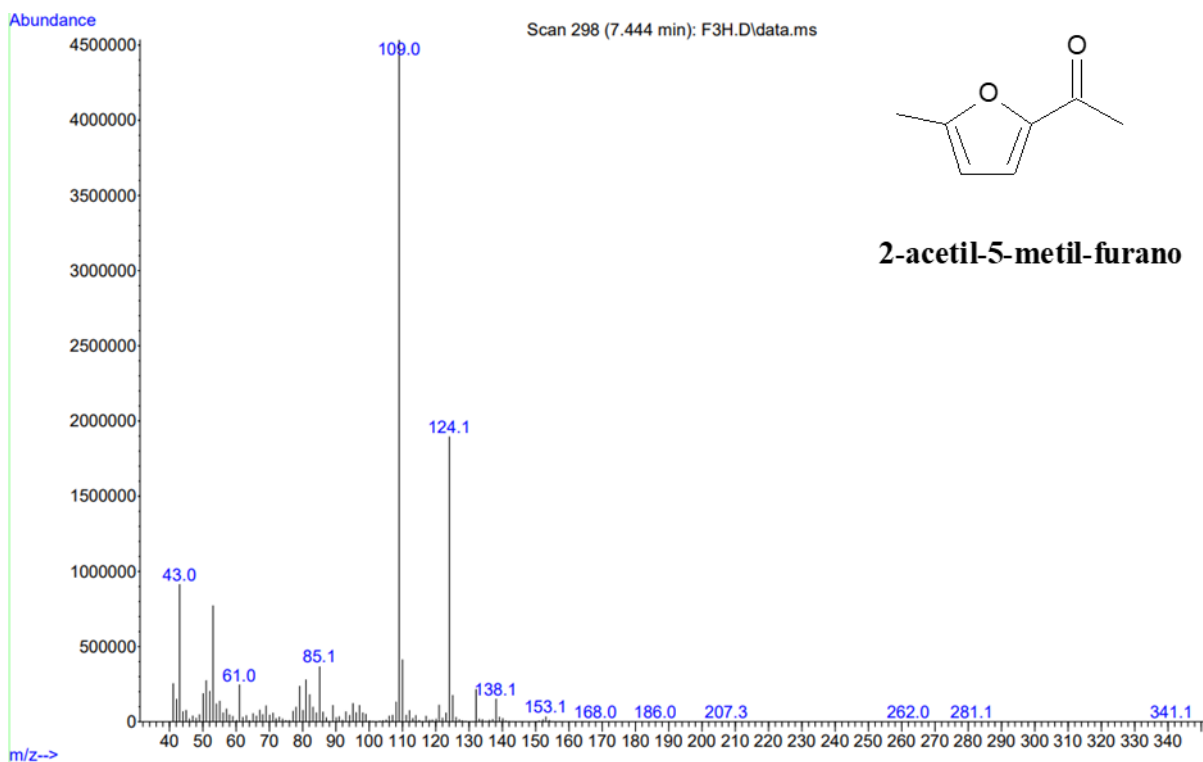


Figura 46 - Espectro de massas do 3,4,5-trimetil-2-Ciclopenten-1-ona

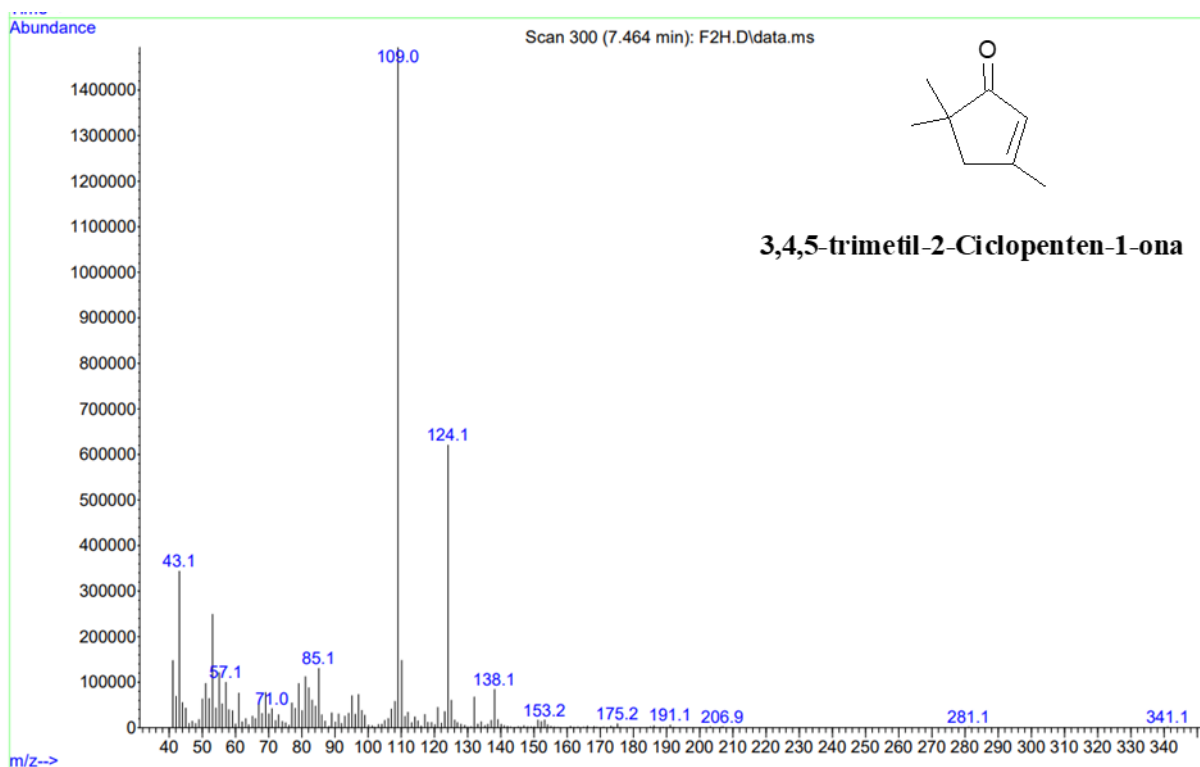


Figura 47 - Espectro de massas do Benzenoacetaldeído

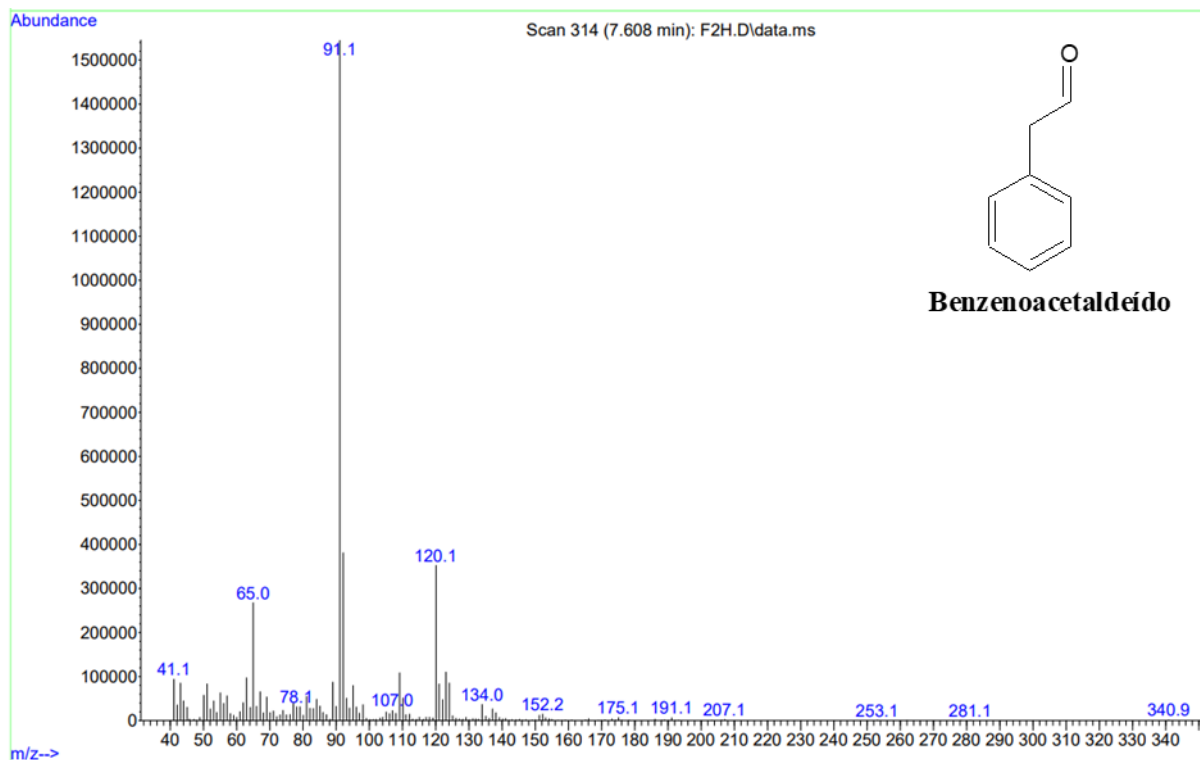


Figura 48 - Espectro de massas do 1-(1H-pirrol-2-il)etanona

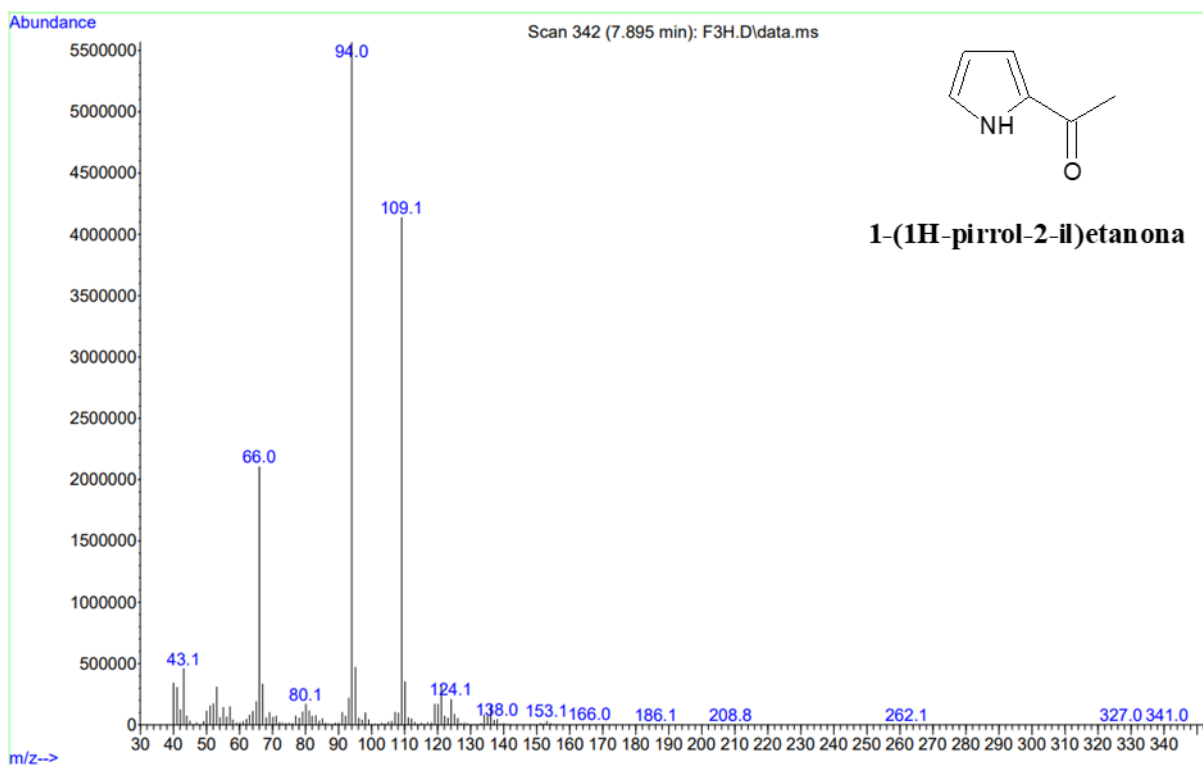


Figura 49 - Espectro de massas do 2,6-dietilpirazina

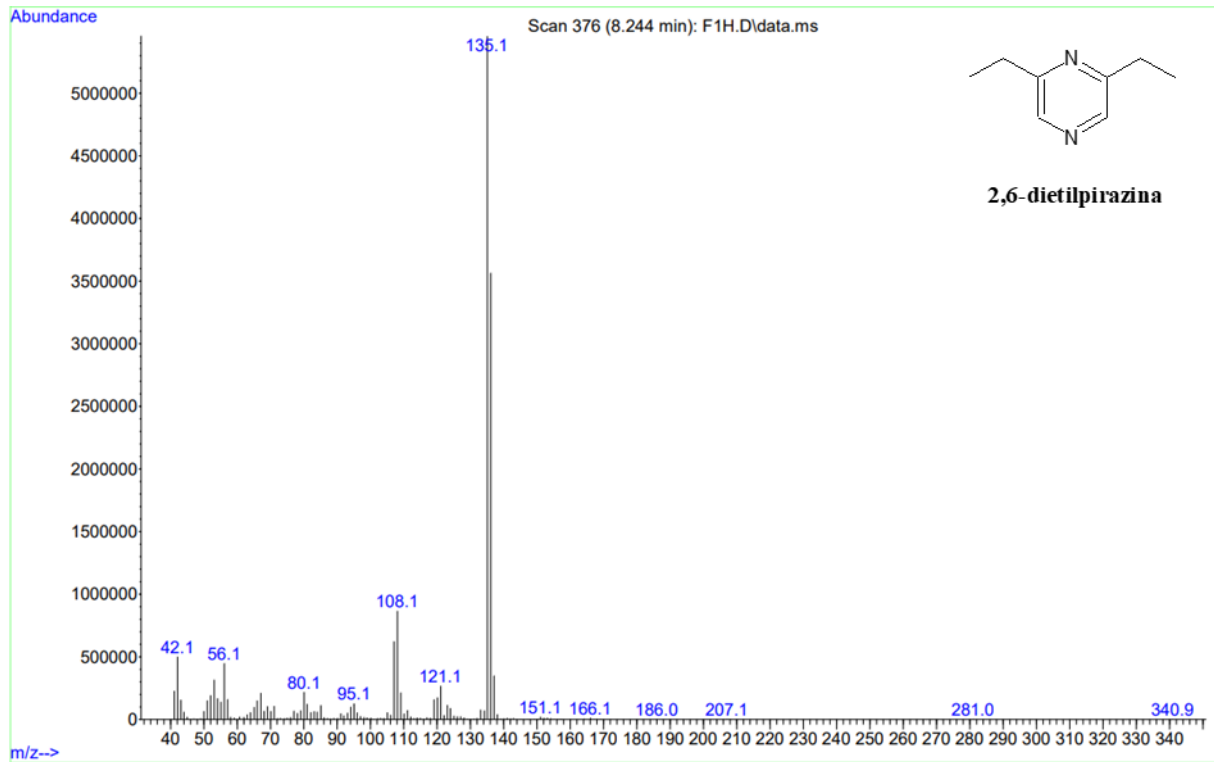


Figura 50 - Espectro de massas do Álcool fenilético

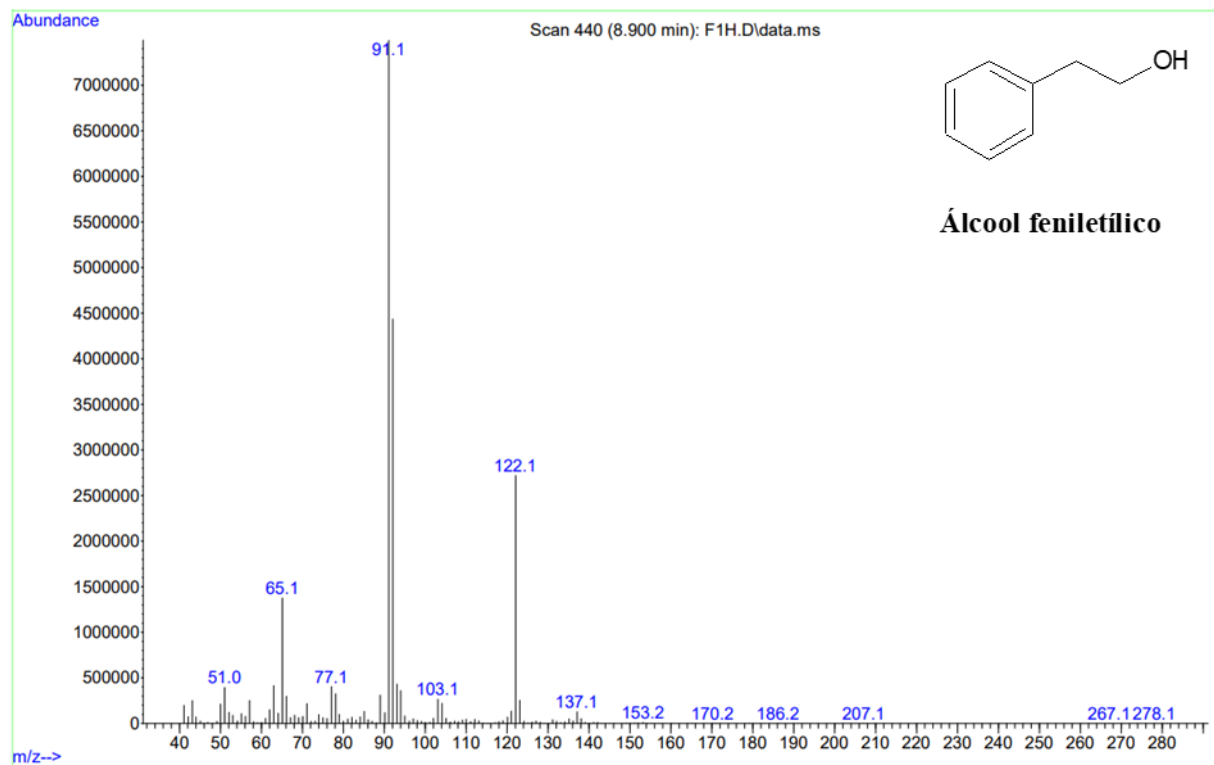


Figura 51 - Espectro de massas do 2-(2-furanilmetil)-5-metil-furano

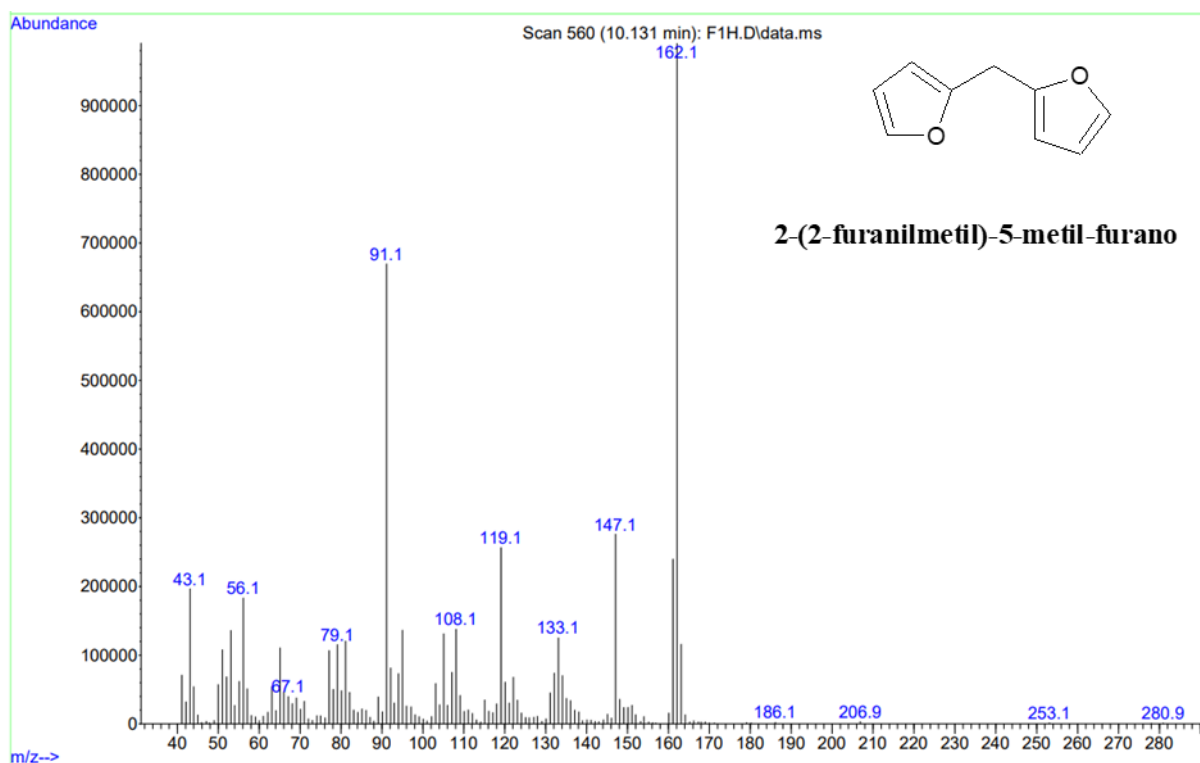


Figura 52 - Espectro de massas do 4-fenilpiridina

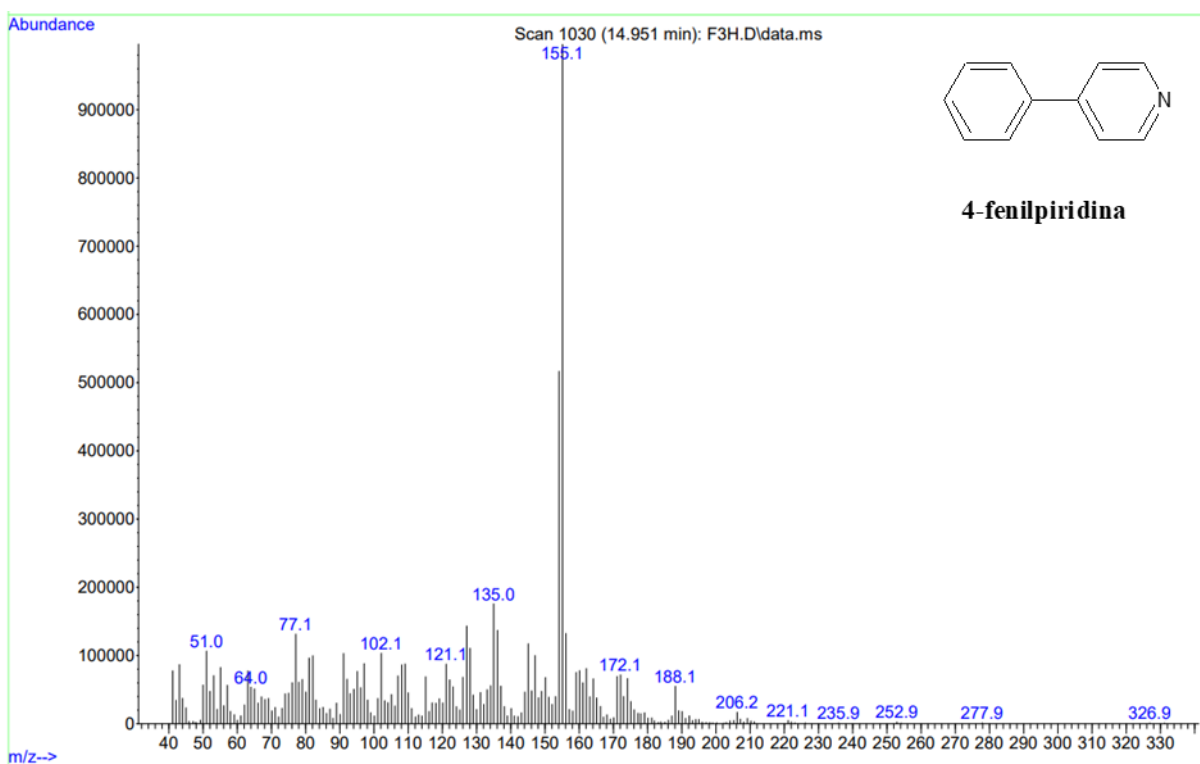


Figura 53 - Espectro de massas do 3,5-di-terc-Butil-4-hidroxibenzaldeído

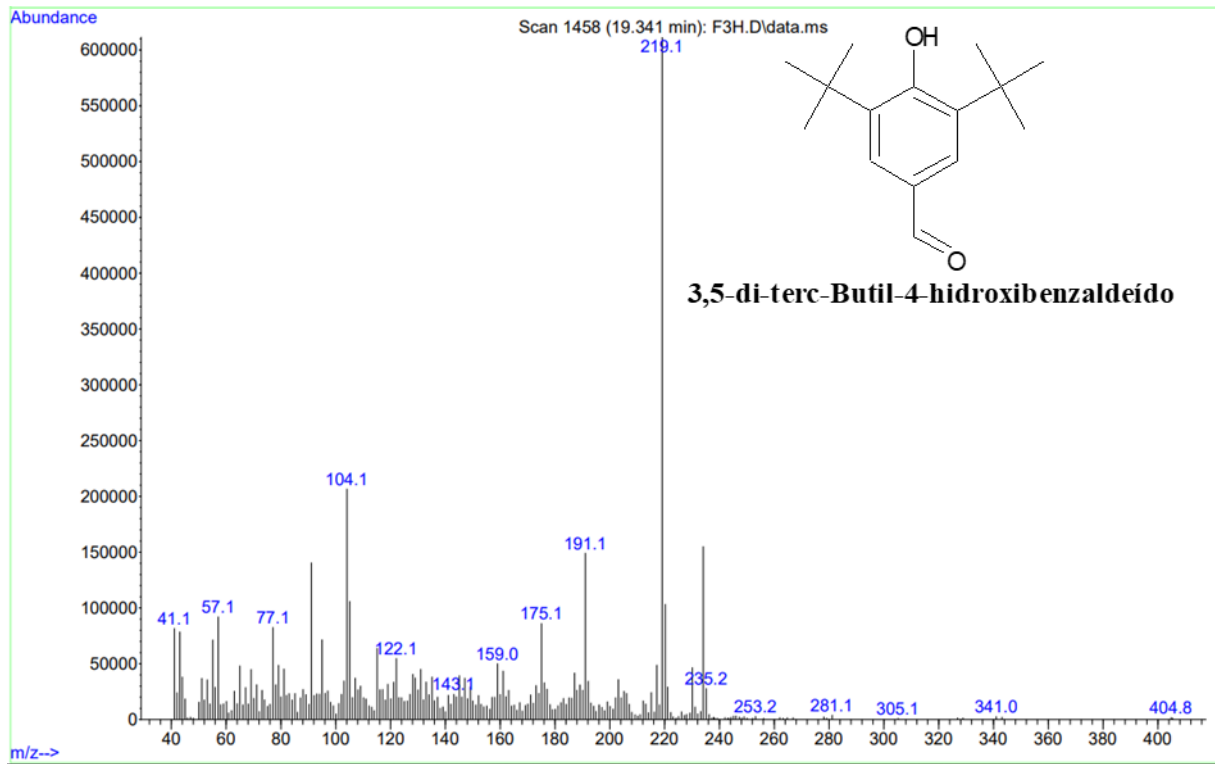


Figura 54 - Espectro de massas do 1-Hexadecanol

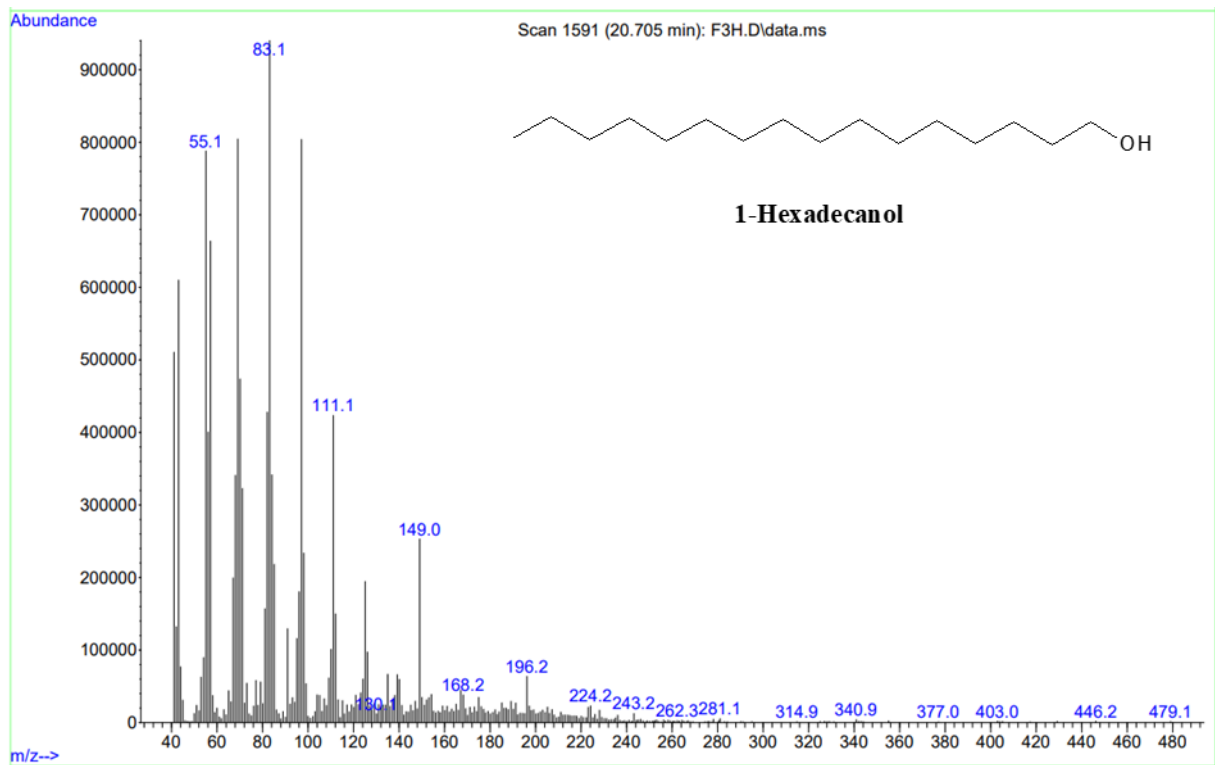


Figura 55 - Espectro de massas do Acetato de isopentil

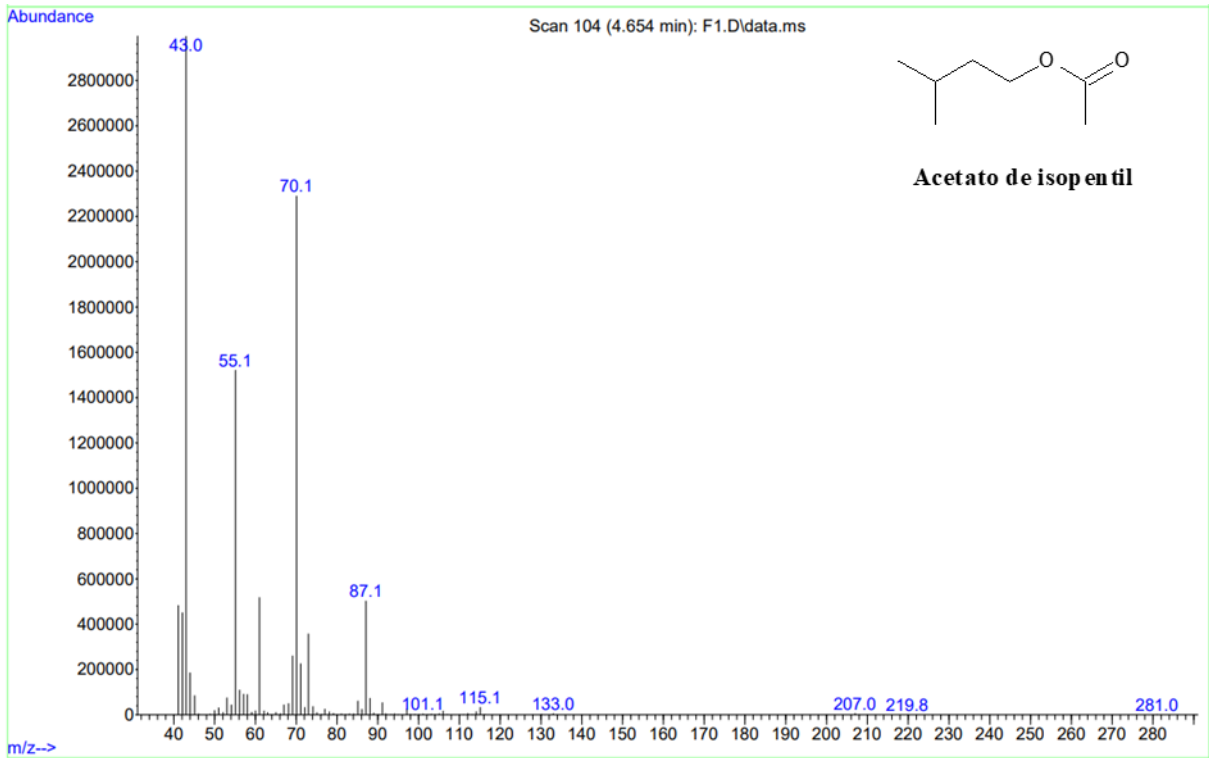


Figura 56 - Espectro de massas do Ácido acético, éster 2-feniletílico

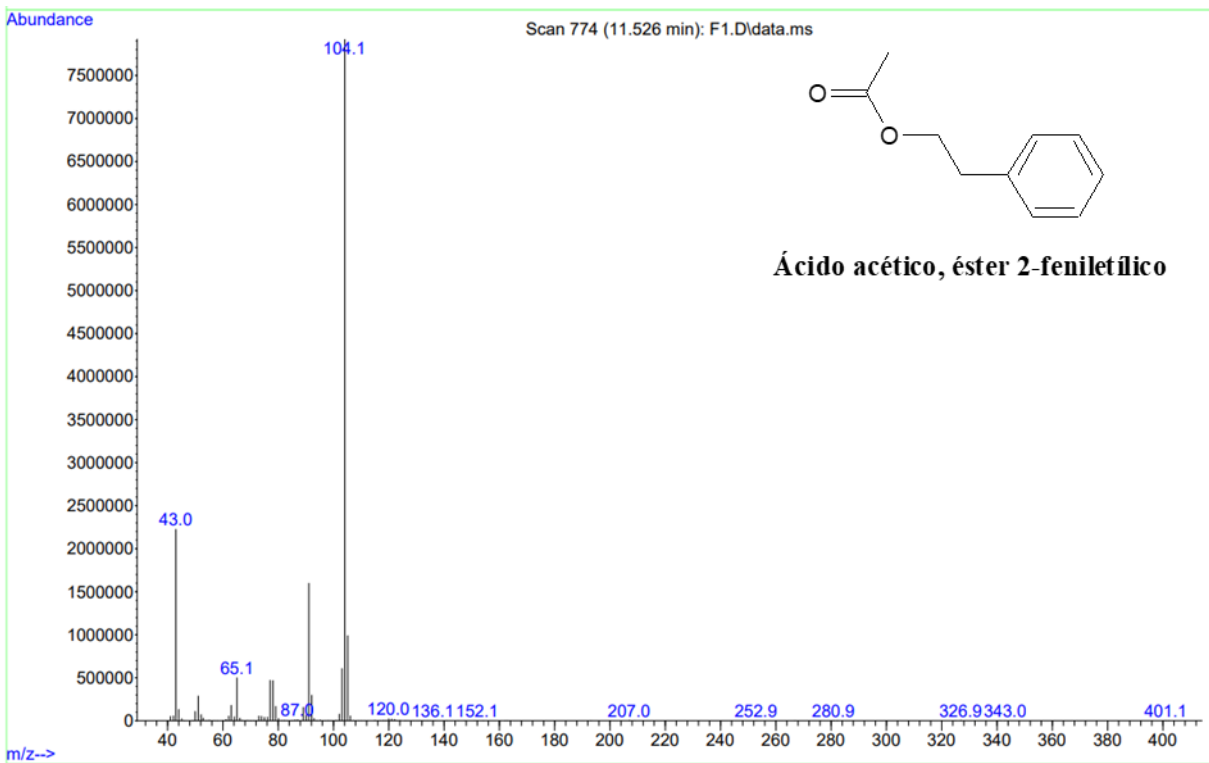


Figura 57 - Espectro de massas do (4R,4aS,6S)-4,4a-Dimetil-6-(prop-1-en-2-il)-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahidronaftaleno

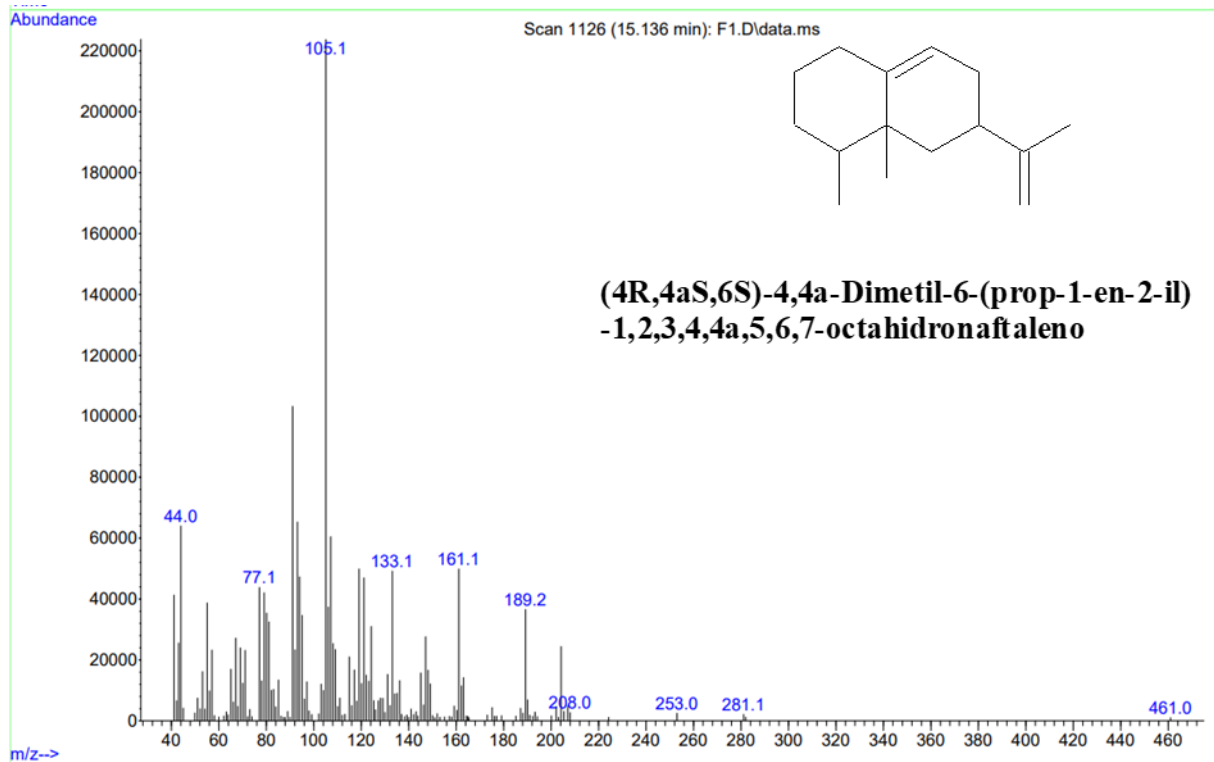


Figura 58 - Espectro de massas do α -Muuroleno

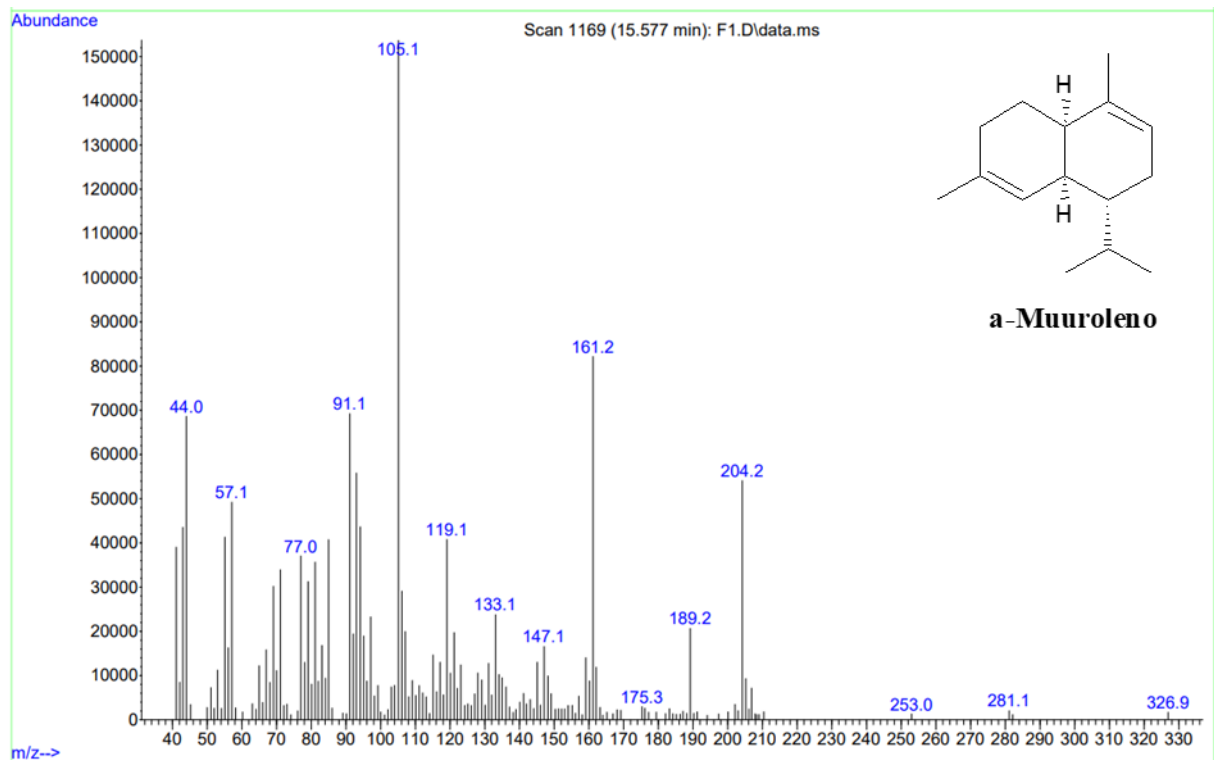


Tabela 7 - Compostos identificados e não identificados da amostra F1H

Amostra		F1H						
Número	Composto	TR (min)	IR exp.*	IR lit.**	SI	Área do pico no cromatograma	Semi-quantificação	
					%		%	(µg)
1	1-(2-furanyl)etanona	5,143	902	909	90,4	665.000.000	4,55	68,28
2	NI-1	5,214	906			448.000.000	3,07	46,00
3	NI-2	5,293	911			203.747.041	1,39	20,92
4	NI-3	6,025	953			380.513.842	2,60	39,07
5	5-metil-2-furanocarboxaldeído	6,109	958	957	93,0	4.764.000.000	32,60	489,12
6	NI-4							
7	NI-5	6,721	994			432.000.000	2,96	44,35
8	2-etil-5-metilpirazina	6,776	997	1.001	90,2	437.000.000	2,99	44,87
9	NI-6	6,836	1.000			312.517.686	2,14	32,09
10	NI-7	6,930	1.006			256.325.747	1,75	26,32
11	1-(2-furanyl)-1-Propanona							
12	2-etenil-6-metil-pirazina							
13	2-acetiltiazol							
14	NI-8	7,447	1.034			186.626.384	1,28	19,16
15	NI-9							
16	2-acetil-5-metil-furano							
17	3,4,5-trimetil-2-Ciclopenten-1-ona							
18	Benzenoacetaldeído							
19	NI-10	7,652	1.045			105.099.338	0,72	10,79
20	NI-11							
21	1-(1H-pirrol-2-il)etanona							
22	NI-12							
23	2,6-dietilpirazina	8,246	1.077	1.078	98,6	433.000.000	2,96	44,46
24	NI-13	8,348	1.083			125.107.571	0,86	12,84
25	NI-14	8,392	1.085			351.000.000	2,40	36,04
26	NI-15							
27	Álcool feniletílico	8,905	1.113	1.114	90,6	1.160.000.000	7,94	119,10
28	NI-16							
29	NI-17							
30	NI-18							
31	NI-19							
32	NI-20							
33	NI-21							
34	NI-22							
35	NI-23	9,768	1.160			97.246.981	0,67	9,98
36	NI-24							
37	2-(2-furanilmetil)-5-metil-furano	10,135	1.181	1.190	93,6	126.000.000	0,86	12,94
38	NI-25	10,354	1.193			218.964.667	1,50	22,48

39	NI-26	10,532	1.202			79.638.883	0,54	8,18
40	NI-27							
41	NI-28							
42	NI-29							
43	NI-30							
44	NI-31	11,222	1.242			58.365.912	0,40	5,99
45	NI-32	11,278	1.245			88.274.359	0,60	9,06
46	NI-33	11,378	1.251			199.285.142	1,36	20,46
47	NI-34	11,614	1.264			203.605.462	1,39	20,90
48	NI-35	11,823	1.276			179.238.244	1,23	18,40
PI	Timol	12,077	1.291	1.291	91,6	974.000.000	6,67	100,00
49	NI-36							
50	NI-37							
51	NI-38							
52	NI-39	13,631	1.384			481.653.140	3,30	49,45
53	NI-40	13,884	1.399			206.987.910	1,42	21,25
54	NI-41							
55	NI-42	14,502	1.439			54.248.378	0,37	5,57
56	4-fenilpiridina							
57	NI-43	15,359	1.494			207.621.441	1,42	21,32
58	NI-44							
59	NI-45	17,525	1.639			984.759.387	6,74	101,10
60	NI-46							
61	NI-47	18,215	1.688			193.142.861	1,32	19,83
62	NI-48							
63	NI-49							
64	3,5-di-terc-Butil-4-hidroxibenzaldeído							
65	1-Hexadecanol							
66	NI-50							
67	NI-51							
TOTAL		30 compostos + o padrão interno, 6 identificados e 24 não identificados. As áreas dos picos cromatográficos dos compostos identificados somam 58,57% incluindo o padrão interno. 41,43 % não foram identificados				14.612.970.376	100,00	1.500,30

Tabela 8 - Compostos identificados e não identificados da amostra F2H

Amostra		F2H						
Número	Composto	TR (min)	IR exp.*	IR lit.**	SI	Área do pico no cromatograma	Semi-quantificação	
					%		%	(µg)
1	1-(2-furanyl)etanona	5,163	903	909	91,3	626.000.000	4,45	55,89
2	NI-1							
3	NI-2	5,238	908			392.238.124	2,79	35,02
4	NI-3							
5	5-metil-2-furanocarboxaldeído	6,132	960	957	92,5	5.290.000.000	37,58	472,32
6	NI-4							
7	NI-5	6,739	995			451.000.000	3,20	40,27
8	2-etil-5-metilpirazina	6,791	998	1.001	90,2	420.000.000	2,98	37,50
9	NI-6	6,855	1.001			244.861.048	1,74	21,86
10	NI-7	6,938	1.006			239.722.877	1,70	21,40
11	1-(2-furanyl)-1-Propanona							
12	2-etenil-6-metil-pirazina							
13	2-acetiltiazol	7,129	1.016	1.014	89,8	201.933.190	1,43	18,03
14	NI-8							
15	NI-9							
16	2-acetil-5-metil-furano							
17	3,4,5-trimetil-2-Ciclopenten-1-ona	7,464	1.035	1.033	91,0	112.000.000	0,80	10,00
18	Benzenoacetaldeído	7,617	1.043	1.036	93,4	63.900.000	0,45	5,71
19	NI-10	7,667	1.046			155.209.676	1,10	13,86
20	NI-11							
21	1-(1H-pirrol-2-il)etanona							
22	NI-12							
23	2,6-dietilpirazina	8,261	1.078	1.078	98,7	427.000.000	3,03	38,13
24	NI-13	8,363	1.084			141.446.842	1,00	12,63
25	NI-14							
26	NI-15							
27	Álcool feniletílico							
28	NI-16							
29	NI-17							
30	NI-18							
31	NI-19							
32	NI-20							
33	NI-21							
34	NI-22							
35	NI-23	9,779	1.161			102.236.089	0,73	9,13
36	NI-24							
37	2-(2-furanimetil)-5-metil-furano	10,146	1.181	1.184	90,5	197.000.000	1,40	17,59
38	NI-25							

39	NI-26							
40	NI-27	10,665	1.210			110.970.036	0,79	9,91
41	NI-28							
42	NI-29							
43	NI-30							
44	NI-31							
45	NI-32							
46	NI-33	11,389	1.251			222.257.402	1,58	19,84
47	NI-34	11,618	1.264			359.535.020	2,55	32,10
48	NI-35	11,834	1.277			339.335.082	2,41	30,30
PI	Timol	12,084	1.291	1.291	91,6	1.120.000.000	7,96	100,00
49	NI-36							
50	NI-37							
51	NI-38							
52	NI-39							
53	NI-40							
54	NI-41	14,404	1.432			155.239.183	1,10	13,86
55	NI-42	14,506	1.439			93.761.738	0,67	8,37
56	4-fenilpiridina							
57	NI-43							
58	NI-44							
59	NI-45	17,531	1.639			551.359.673	3,92	49,23
60	NI-46	18,058	1.677			135.909.503	0,97	12,13
61	NI-47							
62	NI-48	18,491	1.708			1.495.353.135	10,62	133,51
63	NI-49							
64	3,5-di-terc-Butil-4-hidroxibenzaldeído							
65	1-Hexadecanol	20,710	1.876	1.874	91,2	136.000.000	0,97	12,14
66	NI-50	26,307	2.366			293.652.664	2,09	26,22
67	NI-51							
TOTAL		26 compostos + o padrão interno, 9 identificados e 17 não identificados. A área dos picos cromatográficos dos compostos identificados somam 61,04% incluindo o padrão interno. 38,96% não foram identificados				14.077.921.282	100,00	1.256,96

Tabela 9 - Compostos identificados e não identificados da amostra F3H

Amostra		F3H						
Número	Composto	TR (min)	IR exp.*	IR lit.**	SI	Área do pico no cromatograma	Semi-quantificação	
					%		%	(µg)
1	1-(2-furanyl)etanona	5,151	903	909	88,8	1.540.000.000	4,23	156,03
2	NI-1	5,217	906			828.449.307	2,27	83,94
3	NI-2	5,281	910			462.020.478	1,27	46,81
4	NI-3							
5	5-metil-2-furanocarboxaldeído	6,145	960	957	89,0	7.880.000.000	21,62	798,38
6	NI-4	6,395	975			344.897.207	0,95	34,94
7	NI-5	6,731	994			1.060.000.000	2,91	107,40
8	2-etil-5-metilpirazina	6,787	998	1.001	90,1	911.000.000	2,50	92,30
9	NI-6	6,846	1.001			615.565.188	1,69	62,37
10	NI-7							
11	1-(2-furanyl)-1-Propanona	6,931	1.006	1.007	91,5	614.000.000	1,68	62,21
12	2-etenil-6-metil-pirazina	7,066	1.013	1.016	94,1	114.000.000	0,31	11,55
13	2-acetiltiazol	7,122	1.016	1.014	89,5	267.000.000	0,73	27,05
14	NI-8							
15	NI-9	7,401	1.031			346.803.861	0,95	35,14
16	2-acetil-5-metil-furano	7,452	1.034	1.031	92,3	294.000.000	0,81	29,79
17	3,4,5-trimetil-2-Ciclopenten-1-ona							
18	Benzoacetaldeído							
19	NI-10	7,657	1.045			195.122.984	0,54	19,77
20	NI-11	7,766	1.051			671.785.947	1,84	68,06
21	1-(1H-pirrol-2-il)etanona	7,902	1.058	1.054	92,4	580.000.000	1,59	58,76
22	NI-12	8,145	1.072			822.359.596	2,26	83,32
23	2,6-dietilpirazina	8,253	1.078	1.078	94,7	1.230.000.000	3,38	124,62
24	NI-13	8,356	1.083			337.642.174	0,93	34,21
25	NI-14	8,400	1.086			628.000.000	1,72	63,63
26	NI-15	8,860	1.111			432.277.759	1,19	43,80
27	Álcool fenilético							
28	NI-16	8,912	1.113			495.161.541	1,36	50,17
29	NI-17	9,114	1.125			418.031.631	1,15	42,35
30	NI-18	9,213	1.130			210.202.038	0,58	21,30
31	NI-19	9,344	1.137			167.236.237	0,46	16,94
32	NI-20	9,418	1.141			309.116.093	0,85	31,32
33	NI-21	9,667	1.155			208.549.441	0,57	21,13
34	NI-22	9,724	1.158			263.740.073	0,72	26,72
35	NI-23	9,772	1.161			258.290.450	0,71	26,17
36	NI-24	9,903	1.168			430.884.290	1,18	43,66
37	2-(2-furanilmetil)-5-metil-furano	10,140	1.181	1.190	93,8	604.000.000	1,66	61,20
38	NI-25	10,352	1.192			576.051.829	1,58	58,36

39	NI-26	10,530	1.202			192.953.703	0,53	19,55
40	NI-27	10,659	1.210			358.754.386	0,98	36,35
41	NI-28	10,804	1.218			198.231.680	0,54	20,08
42	NI-29	10,910	1.224			228.364.000	0,63	23,14
43	NI-30	11,049	1.232			375.950.259	1,03	38,09
44	NI-31	11,223	1.242			183.291.995	0,50	18,57
45	NI-32	11,278	1.245			132.990.770	0,36	13,47
46	NI-33	11,380	1.251			674.998.662	1,85	68,39
47	NI-34	11,609	1.264			1.139.061.809	3,13	115,41
48	NI-35	11,831	1.277			934.700.649	2,56	94,70
PI	Timol	12,086	1.291	1.291	90,2	987.000.000	2,71	100,00
49	NI-36	12,719	1.329			467.876.025	1,28	47,40
50	NI-37	12,825	1.335			321.835.060	0,88	32,61
51	NI-38	12,894	1.339			239.064.502	0,66	24,22
52	NI-39	13,634	1.384			282.812.093	0,78	28,65
53	NI-40	13,895	1.399			315.492.598	0,87	31,96
54	NI-41	14,402	1.432			802.121.700	2,20	81,27
55	NI-42	14,500	1.438			388.910.295	1,07	39,40
56	4-fenilpiridina	14,960	1.468	1.471	92,2	144.000.000	0,40	14,59
57	NI-43							
58	NI-44	15,864	1.527			736.000.000	2,02	74,57
59	NI-45	17,527	1.639			1.245.025.603	3,42	126,14
60	NI-46	18,057	1.677			139.838.969	0,38	14,17
61	NI-47	18,214	1.688			214.622.039	0,59	21,74
62	NI-48							
63	NI-49	19,125	1.755			696.299.020	1,91	70,55
64	3,5-di-terc-Butil-4-hidroxibenzaldeído	19,342	1.771	1.774	90,9	75.300.000	0,21	7,63
65	1-Hexadecanol	20,709	1.876	1.874	93,2	208.000.000	0,57	21,07
66	NI-50							
67	NI-51	28,003	2.505			643.342.030	1,77	65,18
TOTAL		58 compostos + o padrão interno, 13 identificados e 45 não identificados. As áreas dos picos cromatográficos dos compostos identificados somam 43,39% incluindo o padrão interno. 57,61% não foram identificados				36.443.025.971	100,00	3.692,30

Tabela 10 - Compostos identificados e não identificados da amostra F1

Amostra		F1							
Número	Composto	TR (min)	IR exp.*	IR lit.**	SI	Área do pico no cromatograma	Semi- quantificação		
					%		%	(ng)	
1	NI-1								
2	Acetato de isopentil	4,662	875	869	93,5	208000000,00	3,13	56,78	
3	NI-2								
4	NI-3								
5	NI-4	7,842	1.055			99977522,00	1,50	27,29	
6	Álcool feniletílico	8,952	1.116	1.107	90	402000000,00	60,41	1097,33	
7	NI-5	9,263	1.133			771825223,00	11,60	210,68	
8	NI-6	9,343	1.137			349711205,00	5,25	95,46	
9	Ácido acético, éster 2-feniletílico	11,527	1.259	1.254	94,8	517000000,00	7,77	141,12	
10	NI-7								
11	NI-8								
PI	Timol	12,097	1.292	1.291	92,6	366344281,00	5,50	100,00	
12	(4R,4aS,6S)-4,4a-Dimetil-6-(prop-1-en-2-il)-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahidronaftaleno	15,140	1.480	1.476	92,3	33800000,00	0,51	9,23	
13	NI-9	15,211	1.484			10845705,00	0,16	2,96	
14	α -Muuroleno	15,577	1.508	1.500	93,7	54776728,00	0,82	14,95	
15	NI-10	18,414	1.702			116296221,00	1,75	31,75	
16	NI-11	19,678	1.796			23010035,00	0,35	6,28	
17	NI-12	19,805	1.806			29031877,00	0,44	7,92	
18	NI-13	23,223	2.084			54327064,00	0,82	14,83	
TOTAL		13 compostos + o padrão interno, 5 identificados e 8 não identificados. A área dos picos cromatográficos dos compostos identificados somam 78,14% incluindo o padrão interno. 21,86 % não foram identificados					6654945861,00	100,00	1.816,58

Tabela 11 - Compostos identificados e não identificados da amostra F2

Amostra		F2							
Número	Composto	TR (min)	IR exp.*	IR lit.**	SI	Área do pico no cromatograma	Semi-quantificação		
					%		%	(ng)	
1	NI-1	3,694	821			14682481,00	0,22	4,10	
2	Acetato de isopentil	4,687	876	869	94,4	2100000000,00	31,62	586,04	
3	NI-2	4,887	888			603745986,00	9,09	168,48	
4	NI-3								
5	NI-4								
6	Álcool feniletílico	8,963	1.116	1.107	91,5	2750000000,00	41,41	767,43	
7	NI-5	9,267	1.133			216052946,00	3,25	60,29	
8	NI-6	9,350	1.138			122414664,00	1,84	34,16	
9	Ácido acético, éster 2-feniletílico	11,539	1.260	1.254	95,5	411000000,00	6,19	114,70	
10	NI-7								
11	NI-8								
PI	Timol	12,105	1.292	1.291	91,8	358340127,00	5,40	100,00	
12	(4R,4aS,6S)-4,4a-Dimetil-6-(prop-1-en-2-il)-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahidronaftaleno								
13	NI-9								
14	α -Muuroleno								
15	NI-10	18,416	1.702			64751385,00	0,98	18,07	
16	NI-11								
17	NI-12								
18	NI-13								
TOTAL		8 compostos + o padrão interno, 3 identificados e 5 não identificados. A área dos picos cromatográficos dos compostos identificados somam 84,62% incluindo o padrão interno. 15,38% não foram identificados					6640987589,00	100,00	1.853,26

Tabela 12 - Compostos identificados e não identificados da amostra F3

Amostra		F3							
Número	Composto	TR (min)	IR exp.*	IR lit.**	SI	Área do pico no cromatograma	Semi-quantificação		
					%		%	(ng)	
1	NI-1								
2	Acetato de isopentil	4,678	876	869	93,5	149000000,00	19,93	420,34	
3	NI-2	4,899	888			824191973,00	11,03	232,51	
4	NI-3	6,573	985			78388239,00	1,05	22,11	
5	NI-4	7,843	1.055			212406312,00	2,84	59,92	
6	Álcool feniletílico	8,957	1.116	1.107	91,9	310000000,00	41,47	874,53	
7	NI-5	9,262	1.133			361028163,00	4,83	101,85	
8	NI-6	9,349	1.137			293999362,00	3,93	82,94	
9	Ácido acético, éster 2-feniletílico	11,530	1.260	1.254	95,9	526000000,00	7,04	148,39	
10	NI-7	11,689	1.268			79115503,00	1,06	22,32	
11	NI-8	11,779	1.274			51360642,00	0,69	14,49	
PI	Timol	12,100	1.292	1.291	91,9	354474262,00	4,74	100,00	
12	(4R,4aS,6S)-4,4a-Dimetil-6-(prop-1-en-2-il)-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahidronaftaleno	15,141	1.480	1.476	87,4	12500000,00	0,17	3,53	
13	NI-9								
14	α -Muuroleno								
15	NI-10	18,416	1.702			91965511,00	1,23	25,94	
16	NI-11								
17	NI-12								
18	NI-13								
TOTAL		12 compostos + o padrão interno, 4 identificados e 8 não identificados. A área dos picos cromatográficos dos compostos identificados somam 73,35% incluindo o padrão interno. 26,65% não foram identificados					7475429967,00	100,00	2.108,88