

WELLINGTON GOMES DE LIMA

Dinâmica metabólica de benzopiranos em *Peperomia obtusifolia* e seus endófitos *Diaporthe infecunda* e *Fusarium oxysporum*

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química

Orientadora: Prof^a Dr^a Maysa Furlan

Araraquara

2023

L732d Lima, Wellington Gomes de
Dinâmica metabólica de benzopiranos em Peperomia
obtusifolia e seus endófitos Diaporthe infecunda e
Fusarium oxysporum / Wellington Gomes de Lima. --
Araraquara, 2023
109 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Instituto de Química, Araraquara
Orientadora: Maysa Furlan

1. Benzopiranos. 2. Fusarium oxysporum. 3. Fungos
endofíticos. 4. Biossíntese. 5. Metabolômica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca
do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Dinâmica metabólica de benzopiranos em *Peperomia obtusifolia* e seus endófitos *Diaporthe infecunda* e *Fusarium oxysporum*"

AUTOR: WELLINGTON GOMES DE LIMA

ORIENTADORA: MAYSIA FURLAN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Química, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ROSEMEIRE BRONDI ALVES (Participação Virtual)
Departamento de Química / Instituto de Ciências Exatas - UFMG - Belo Horizonte

Dr. EDUARDO HENRIQUE GUIMARÃES DA CRUZ (Participação Virtual)
Cimed Indústria Farmacêutica Ltda - CIMED - Pouso Alegre

Profa. Dra. SILVIA NOELI LÓPEZ (Participação Virtual)
Departamento de Farmacognosia / Universidad Nacional de Rosario - UNR - Argentina

Profa. Dra. LIDIANE GASPARETO FELIPPE (Participação Virtual)
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Profª. Drª. ANDREIA DE ARAUJO MORANDIM GIANNETTI (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia Química / Fundação Educacional Inaciana Padre Sabóia de Medeiros - FEI - São Bernardo do Campo

Araraquara, 03 de março de 2023



Documento assinado digitalmente

ROSEMEIRE BRONDI ALVES
Data: 05/03/2023 10:08:37-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Wellington Gomes de Lima.

Nome em citações bibliográficas: LIMA, W. G.; LIMA, WELLINGTON, G. DE.

Nacionalidade: Brasileiro.

Naturalidade: Maceió – AL.

Estado civil: Solteiro.

Filiação

Nome do pai: Eustácio de Lima Oliveira.

Nome da mãe: Osmina Gomes de Lima.

Nascimento: 08 de dezembro de 1991.

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Graduação: Química bacharelado.

Ano de conclusão: 2014.

Instituição: Universidade Estadual de Santa Cruz.

Mestrado: Química.

Ano de conclusão: 2017.

Instituição: Universidade Estadual de Santa Cruz.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigo publicado em periódicos:

MARQUES, MARIA L. ; LUZARDO, FRANCISCO H. M. ; VELASCO, FERMIN G. ; GONZÁLEZ, LUIS NIETO ; SILVA, EVERTON J. DA ; LIMA, WELLINGTON G. DE . Compatibility of vegetable fibers with Portland cement and its relationship with the physical properties. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental (Online), v. 20, p. 466-472, 2016.

Resumos publicados em anais de congressos:

LIMA, W. G.; OLIVEIRA, R. A. ; BANDEIRA, M. L. S. F. ; LIMA, L. S. . Avaliação de solventes e misturas para a extração de compostos fenólicos em espécimes de *Eriope blanchetii*. In: 39ª Reunião anual da sociedade brasileira de química, 2016, Goiânia - GO. Anais da 39ª RASBQ, 2016.

LIMA, W. G.; OLIVEIRA, R. A. ; OLIVEIRA, F. F. . A DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FLAVONÓIDES, ANTOCIANINAS, COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM FARELO DE CACAU SUBMETIDO A PROCESSOS FERMENTATIVOS. In: I Simpósio de Ensino, Extensão, Inovação, Pesquisa e Pós-graduação e 20º Seminário de iniciação Científica - produção e transferência de conhecimento: diferentes olhares, 2014, Ilhéus. Acervo de Anais - Seminários de Iniciação Científica da UESC, 2014.

LIMA, W. G.; CRUZ, E. S. ; LUZARDO, F. H. M. ; VELASCO, F. L. C. G. . Determinação da compatibilidade de resíduos vegetais com cimento com fins construtivos. In: 19º Seminário de Iniciação Científica -Ética e Pesquisa, 2013, Ilhéus. Caderno de Resumos 2013- SIC- UESC, 2013.

CRUZ, E. S. ; LUZARDO, F. H. M. ; LIMA, W. G. ; VELASCO, F. L. C. G. . Estudo de formulações de composito de argamassa de cimento com adição de fibras de coco. In: 19º Seminário de Iniciação Científica -Ética e Pesquisa, 2013, Ilhéus. Caderno de Resumos 2013- SIC- UESC, 2013.

SANTOS, E. B. C ; AMADO, F. D. R ; OLIVEIRA, E. D. ; CARVALHO, C. R. S ; CAMPOS, J. T. A. ; LIMA, W. G. . Stress Analysis of vegetal fibers reinforced composites using for utilization in high added value civil engineering building materials.

In: XI Encontro do SBPMAT, 2012, Florianópolis. Anais do XI Encontro do SBPMAT. São Paulo, 2012. v. único.

Apresentações de trabalho:

LIMA, W. G.; OLIVEIRA, R. A. ; BANDEIRA, M. L. S. F. ; LIMA, L. S. . Avaliação de solventes e misturas para a extração de compostos fenólicos em espécimes de *Eriope blanchetii*. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

LIMA, W. G; OLIVEIRA, R. A. ; FRANCO, M. ; OLIVEIRA, F. F. . Determinação dos teores de flavonoides, antocianinas, compostos fenólicos e atividade antioxidante em farelo de cacau submetido a processos fermentativos. 2014. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

LIMA, W. G.. Caracterização física de resíduos fibrosos de coco, baronesa, bananeira, cacau e casca de eucalipto e sua compatibilidade com cimento. 2013. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

LIMA, W. G.; LUZARDO, F. H. M. ; VELASCO, F. L. C. G. ; CRUZ, E. S. . Determinação da compatibilidade de resíduos vegetais com cimento com fins construtivos. 2013. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais que não mediram esforços para me ajudar nessa etapa tão importante da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Maysa Furlan pela oportunidade em me aprofundar profissionalmente na área de pesquisa. Destaco a grande paciência, orientação, carinho, exemplo e confiança que tive durante toda a minha formação.

À Profa. Dra. Silvia N. López por ceder amostras fúngicas e a Profa. Dra. Andréia Morandim pelas grandes contribuições nos estudos de planejamento experimental e otimização de cultivo.

Ao Prof. Dr. Massuo Jorge Kato e a Dra. Lydia Fumiko Yamaguchi pela colaboração das análises de HPLC-ESI-QTOF-MS dos extratos de fungos.

Aos meus amigos profissionais Dr. João Bronzel, Dr. Flavio Politi e Dr. Alexandre Alves em que transcenderam em confiança, discussão de idéias, aprendizado e respeito por diversas vezes em momentos de dificuldades e superação no desenvolvimento da pesquisa.

À Profa. Dra. Isabele Rodrigues e a Profa. Dra. Lidiane Gasparetto pela troca de experiências e amizade.

Aos servidores técnicos Dr. Alberto C. Alécio, Dr. Nivaldo Borale e a Dra. Juliana pelo suporte e amizade durante todos esses anos.

Aos meus pais Eustácio de Lima Oliveira e Osminha Gomes de Lima pelo apoio em todos os momentos.

Ao Instituto de Química de Araraquara – UNESP pela infraestrutura, suporte acadêmico e segurança.

Aos professores, funcionários e amigos do Departamento de Bioquímica e Química Orgânica, pelas experiências profissionais e amizades.

Aos membros da seção técnica de pós-graduação do Instituto de Química da UNESP pela competência, disponibilidade e apoio acadêmico.

Aos professores e colegas do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) pela oportunidade de experiência científica e pelos grandes ensinamentos que adquiri com muito respeito e carinho.

À Erica Ribeiro pela companhia, muito amor, paciência, incentivo e carinho nos momentos importantes da minha vida.

Aos meus amigos de longa data Victor Aranha, Fabio Souza, Fabíola Morais, Amanda Oliveira e Vanessa Ramos pela motivação e carinho deles.

Aos amigos Rodolfo Debone, Victor Dasmasceno, Leonardo Bergamasco, Thiago Varão, Marcelo Nogueira, Alan Sakita, Ricardo Alexandrino, Roberth Trindade, Fabiola Sayao e Juliana Moreno em que tive a oportunidade de tê-los como apoio desde cheguei em Araraquara-SP.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil - (CAPES) – Código de financiamento 001.

Aos recursos técnicos de apoio de pesquisa ao NUBBE pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biodiversidade e Produtos Naturais (INCT-BioNat), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

EPÍGRAFE

“Julgue seu sucesso pelas coisas que você teve
que renunciar para conseguir.”

(Dalai Lama)

RESUMO

A espécie *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae) mostra o acúmulo de benzopiranos derivados do ácido orselínico, um policetídeo comumente encontrado em fungos. Estudos anteriores, com enfoque proteômico e transcriptômico, resultaram na identificação de proteínas envolvidas na rota biossintética de benzopiranos, incluindo tocoferol ciclase e preniltransferases. No entanto, as policetídeos sintases, possivelmente envolvidas na produção de um dos prováveis precursores, o ácido orselínico, um policetídeo comumente encontrado em fungos, não foram identificadas, sugerindo que o ácido orselínico pode ser produzido por endófitos intimamente associados a planta. Assim, os endófitos *Diaporthe infecunda* e *Fusarium oxysporum*, foram isolados de *P. obtusifolia* e selecionados para os estudos de possível dinâmica metabólica entre planta-endófito, uma vez que análises prévias demonstraram a presença de policetídeos aromáticos. Os estudos para avaliação de perfil metabolômico foram baseados em técnicas hífenadas (UPLC-ESI-QTOF-MS e HPLC-ESI-QTOF-MS) e ferramentas de análise metabolômica, tais como UNIFI, *molecular networking*, pareamento de base de dados da plataforma GNPS e processamento MZmine dos espectros de MS no modo ESI(-) e ESI(+), para anotações dos policetídeos. Nesse caso, policetídeos aromáticos, incluindo, 1,3,6,8-tetraidroxi-naftaleno, bicaverina, islandicina, ácido astérico, antraquinonas, 6-metilsalicilato, ciperina, ácido lecanórico e zearalanóis foram anotados como derivados da via biossintética do ácido orselínico e estavam presentes nos extratos estudados de *F. oxysporum*, indicando que o ácido orselínico poderia, de forma heteróloga, se constituir no precursor da via de biossíntese dos cromanos em *P. obtusifolia*.

Palavras-chave: *Peperomia obtusifolia*; *Fusarium oxysporum*; *Diaporthe infecunda*; biossíntese; metaboloma; benzopiranos; ácido orselínico, policetídeos aromáticos.

ABSTRACT

The species *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae) shows the accumulation of benzopyrans derived from orsellinic acid, a polyketide commonly found in fungi. Previous studies with a proteomic and transcriptomic focus resulted in the identification of proteins involved in the biosynthetic pathways of benzopyrans, including tocopherol cyclase and prenyltransferases. However, polyketide synthases, possibly involved in the biosynthesis of orsellinic acid, a polyketide commonly found in fungi, were not identified, suggesting that orsellinic acid may be produced by endophytes closely associated with the plant. Thus, the endophytes: *Diaporthe infecunda* and *Fusarium oxysporum* were isolated from *P. obtusifolia* and selected for the studies of possible metabolic dynamics between plant-endophyte, since previous analyzes showed the accumulation of aromatic polyketides. The studies for metabolomic profile evaluation were based on hyphenated techniques (UPLC-ESI-QTOF-MS and HPLC-ESI-QTOF-MS) and metabolomic analysis tools, such as UNIFI, molecular networking, GNPS platform database pairing. and MZmine processing of MS spectra in ESI(-) and ESI(+) mode for polyketide annotations. In such case, aromatic polyketides, including 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene, bikaverine, islandicin, asterric acid, anthraquinones, 6-methylsalicylate, cyperin, lecanoric acid and zearalanols were annotated as derivatives of the orsellinic acid biosynthetic pathway that were present in the studied extracts of *F. oxysporum*. It indicating that orsellinic acid could, in a heterologous way, constitute the precursor of the chroman biosynthesis in *P. obtusifolia*.

Keywords: *Peperomia obtusifolia*; *Fusarium oxysporum*; *Diaporthe infecunda*; biosynthesis; metabolome; benzopyrans; orsellinic acid; aromatic polyketides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produtos Naturais bioativos relevantes na história do desenvolvimento de fármacos: a) plantas; b) fungos e bactérias; c) Substância (ND) obtida pela modificação estrutural de PN.....	22
Figura 2 - Rotas biossintéticas das principais classes de metabólitos secundários.....	25
Figura 3 - Metabólitos complexos isolados em fungos <i>Acremonium</i> sp, <i>Penicillium chrysogenum</i> e <i>griseoroseum</i> derivados das vias dos isoprenóides com as vias dos policetídeos (8) e dos alcalóides (9), e com a via dos policetídeos e via heteróloga* dos flavonóides (10)...	26
Figura 4 - Diversidade de terpenos provenientes de plantas e fungos a partir de blocos construtores DMAPP e IPP.....	27
Figura 5 - Principais vias biossintéticas dos isoprenóides em seres eucariotos de plantas e fungos. A = via do mevalonato comuns em plantas e fungos (citossol) das células. B = via do piruvato em células de plantas (plastídeo).	28
Figura 6 - Via dos ácidos graxos e policetídeos aromáticos. Rotas A→A'= via ácido graxo sintase (FASs), B→B' e C = via das policetídeos sintases (PKSs).....	29
Figura 7 - Arquitetura modular dos conjuntos de domínios enzimáticos da 6-deoxieritronolideo B sintase (DEBS) responsável pela biossíntese de eritromicina A (6).	31
Figura 8 - Construção de policetídeos não reduzidos, norantrona (21) e norpirona (22), e sua arquitetura enzimática não modular.	32
Figura 9 - Domínio cetosintase (KS) das PKSs do tipo III - biossíntese de narigenina.	33
Figura 10 - Diversidade química de policetídeos aromáticos encontrados em espécies de fungos.....	34
Figura 11 - Policetídeos aromáticos: ácido orselínico (via PKSs do tipo I), rubiginosina C (via PKS do tipo II), , ácido olivetólico e resveratrol, (via PKS do tipo III).	35
Figura 12 - Biossíntese de 6-hidroximeleina e dos policetídeos intermediários a partir das mesmas arquiteturas PKS TrA e TrB.	36
Figura 13 - Diversidade de substâncias acumuladas em <i>Peperomia obtusifolia</i>	39
Figura 14 - Rota de biossíntese de cromanos em <i>P. obtusifolia</i> a partir do intermediário ácido orselínico (28) via PKS do tipo I ou III.....	41
Figura 15 - Perfis BPCs no modo ESI-(+) dos extratos brutos avaliados de <i>P. obtusifolia</i> , <i>D. infecunda</i> e <i>F. oxysporum</i> e dos padrões de ácido orselínico e AC.....	59
Figura 16 - Perfis BPCs no modo ESI-(-) dos extratos brutos avaliados de <i>P. obtusifolia</i> , <i>D. infecunda</i> e <i>F. oxysporum</i> e dos padrões de ácido orselínico e AC.....	60
Figura 17 - Perfis BPCs nos modos DDA e MS ^E dos extratos <i>D. infecunda</i> (em azul) e do branco (vermelho) adquiridos por ESI-(-) e ESI-(+).	62

Figura 18 - Perfis BPCs nos modos DDA e MS ^E dos extratos <i>F. oxysporum</i> (em azul) e do branco (vermelho) adquiridos por ESI(-) e ESI(+).	63
Figura 19 - Redes de interações moleculares de <i>D. infecunda</i> representando os clusters formados no modo positivo (vermelho), no modo negativo (azul) e as substâncias identificadas.	64
Figura 20 - Redes de interações moleculares de <i>F. oxysporum</i> representando os clusters formados no modo positivo (vermelho), no modo negativo (azul) e as substâncias identificadas.	65
Figura 21 - Substâncias anotadas pelo UNIFI em <i>D. infecunda</i> e <i>F. oxysporum</i> .	67
Figura 22 - Perfis cromatográficos do tipo DDA do íon extraído <i>m/z</i> 151 no modo ESI(+) dos extratos de <i>D. infecunda</i> , <i>F. oxysporum</i> e padrão de ácido orselínico.	70
Figura 23 - Redes moleculares com anotação direcionada a detecção de policetídeos aromáticos similares. Clusters e nodos adquiridos a partir dos extratos de <i>F. oxysporum</i> (G1;G2) e padrão ácido orselínico (G3;G4). Os nodos vermelho e verde representam os grupos G1 e G3 com as anotações <i>m/z</i> no ESI(+) e os nodos azul e vermelho representam os grupos G2 e G4 no ESI(-).	71
Figura 24 - Representação em pizza de variação metabólica observada em porcentagem de superclasses de MSs para cada condição de cultivo de dias (d) e temperatura (°C). Processamento NAP e MOLNETENHANCER realizado na plataforma GNPS.	72
Figura 25 - Policetídeos aromáticos anotados pelo processamento de dados ESI(+) sob diferentes condições de cultivo de temperatura(°C) e dias(d).	74
Figura 26 - Policetídeos aromáticos anotados pelo processamento de dados ESI(+) sob diferentes condições de cultivo de temperatura(°C) e dias(d).	75
Figura 27 - Policetídeos aromáticos anotados pelo processamento de dados ESI(-) sob diferentes condições de cultivo de temperatura(°C) e dias(d).	76
Figura 28 - Policetídeos aromáticos anotados após processamento MZmine2 utilizando base de dados KEGG.	78
Figura 29 - Perfil LC-MS (BPC/XIC) de Ciperina anotado (<i>m/z</i> 261) de 32°C/9d condição de cultivo no modo ESI(+).	80
Figura 30 - Perfil LC-MS (BPC/XIC) do ácido 6-metilsalicílico anotado (<i>m/z</i> 151) de 22°C/9d condição de cultivo no modo ESI(-).	81
Figura 31 - Demonstrativo dos perfis das placas do cultivo de <i>F. oxysporum</i> variando os dias (d) e temperatura (°C) de cultivo.	82
Figura 32 - Gráfico demonstrando a quantidade de massa de extrato obtido por tempo e temperatura de cultivo de <i>F. oxysporum</i> .	83

Figura 33 - Efeitos das variáveis de temperatura e tempo no fator de resposta do teor de ácido orselínico: a) O gráfico de Pareto com a linha vertical corresponde a um nível de confiança de 95%; b) Superfície de resposta; e c) Área de resposta.	85
Figura 34 - Representação do valor ótimo das variáveis tempo e temperatura para para maximização do teor do ácido orselínico.	87
Figura 35 - Variação do perfil cromatográfico devido a variação do volume de injeção de 1, 5 e 10 μL com concentração fixa de 0,5 mg.mL^{-1} de <i>F. oxysporum</i> (condição otimizada).	89
Figura 36 - Variação do perfil cromatográfico devido a variação da concentração de 0,1; 0,5 e 1 mg.mL^{-1} com volume fixo de 5 μL de <i>F. oxysporum</i> (condição otimizada).....	90
Figura 37 - Variação do perfil cromatográfico das amostras de extrato com fortificação e sem fortificação. Concentração inicial 100% de extrato otimizado de <i>F. oxysporum</i> (0,5 mg.mL^{-1}) e 85% de ácido orselínico ($327 \times 10^{-5} \text{mg.mL}^{-1}$) adicionados com injeção fixa de 10 μL por HPLC-DAD.	93
Figura 38 - a) Perfil cromatográfico de íon extraído m/z 167 do extrato de <i>F. oxysporu</i> ; b) Espectros MS/MS do padrão de ácido orselínico e do extrato de <i>F. oxysporum</i> (condição otimizada).	95
Figura 39 - Proposta de mecanismos de fragmentação do ácido orselínico no modo ESI(-) conforme os espectros MS/MS do íon m/z 167.....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores utilizados como variáveis de entrada de tempo (X1) e de temperatura (X2).....	54
Tabela 2. Substâncias identificadas nas análises de redes moleculares, biblioteca GNPS e dados de massas já publicados dos metabolitos que mostram acúmulo nos gêneros <i>Diaporthe</i> e <i>Fusarium</i>	66
Tabela 3. Substâncias anotadas nos extratos avaliados de <i>D. infecunda</i> e de <i>F. oxysporum</i> pelo processamento do sistema UNIFI	68
Tabela 4 - Anotações de policetídeos aromáticos obtidas pelo processamento MZmine2 de espectros MS/MS no modo ESI(-) e ESI(-) na avaliação dos extratos de planejamento CCR de <i>F. oxysporum</i>	79
Tabela 5 - Teor de ácido orselínico de cada extrato de <i>F. oxysporum</i> obtido por condição de cultivo de tempo e temperatura.....	84
Tabela 6 - Variação da curva analítica, LD, LQ e linearidade do padrão de ácido orselínico mediante ao volume diferentes de injeções de 5 e 10.....	88
Tabela 7 - Avaliação das concentrações finais do extrato de cultivo otimizado de <i>Fusarium oxysporum</i> usando a curva $y = (-707,5 + 165,1) + 107(2 + 0,8)x$, injeção fixa de 5 μL e $n=3$	91
Tabela 8 - Percentual de recuperação de adição de 85% de volume de padrão ácido orselínico após fortificação do extrato ($n=3$) para avaliação do efeito de matriz em cultivo otimizado de <i>F. oxysporum</i>	92
Tabela 9 - Concentração de ácido orselínico e o teor obtido no extrato de cultivo otimizado de <i>F oxysporum</i> avaliado em 3 replicatas.	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1,3,6,8-THN: 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno

2HHC: 2'-hidroxidiidrochalcona

8CRA: 8-C-raminosil apigenina

AC: ácido (E)-5-hidroxi-2,7-dimetil-8-(3-metilbut-2-en-1-il)-2-(4-metilpenta-1,3-dien-1-il)cromano-6-carboxílico

ACN: acetonitrila

AcOEt: acetato de etila

ACP: proteína carregadora de unidade acil,

ACS: acorenil sintase

ADMMB: ácido (E)-3-(4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il)-2,4-dihidroxi-6-metil-5-(3-metilbut-2-en-1-il)benzóico.

AT: aciltransferase,

AT_L: AT específica que reconhece propionil-CoA.

BDA: batata dextrose ágar

BEAC: borneol(E)-5-hidroxi-2,7-dimetil-8-(3-metilbut-2-en-1-il)-2-(4-metilpenta-1,3-dien-1-il)cromano-6-carboxilato

BIS: bisaboleno sintase

BN: bioativo natural

BPC: cromatograma de pico base

CHEBI: Chemical Entities of Biological Interest

Da: unidade de massa atômica unificada em Daltons

DBO: demanda bioquímica de oxigênio

DDA: aquisição dependente de dados

DEBS: 6-desoxieritronolideo B sintase

DH: desidratase

DIA: aquisição independente de dados

DMAPP: difosfato de dimetilalila

DMMB: (E)-2-(4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il)-5-metil-4-(3-metilbut-2-en-1-il)benzeno-1,3-diol

EFS: extração em fase sólida

ER: enoilredutase,

ESI: ionização por electrospray
ESI-MS: espectrometria de massas com fonte de ionização por electrospray
eV: eletrovolt
FAS: ácidos graxos sintases
FEAC: fencol(E)-5-hidroxi-2,7-dimetil-8-(3-metilbut-2-en-1-il)-2-(4-metilpenta-1,3-dien-1-il)cromano-6-carboxilato;
FooDB: food database
FPP: difosfato de farnesila
g.L⁻¹ : grama por litro
g: unidade de massa em grama
G3P: gliceraldeído 3- fosfato
GGPP: difosfato de geranil geranila
GLS: geranilinol sintase
GPP: difosfato de geranila
HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência
HRAZA: rubiginosina C sintase
IDI: pirofosfato de isopentenila delta isomerase
IPP: difosfato de isopentenila
IS: isopreno sintase
ISMR: isosvertisin-4'-metil-eter-2'' α -L-ramnosídeo
ISR : Isoswertisin-2'' α -L-ramnosídeo
KR: cetoreductase
KR₀: função KR desativada
KS: cetosintase
KV: kilovolt
L.h⁻¹: litro por hora
LCY: licopeno ciclase
LS: limoneno sintase
m/m: massa por massa
m/z: relação massa/carga
MeOH: metanol
MEP: 2-C-metileritritol-4-fosfato
mL.min⁻¹: mililitro por minuto
MM: massa molecular

MOLNETENHANCER: Fluxo de trabalho da plataforma GNPS que combina as variáveis de saída em redes moleculares

MPs: metabólitos primários

MS/MS: espectrometria de massas sequencial

MS: espectrometria de massas

MS^E: Aquisição de dados de MS/MS do tipo *all-in-one scan* ou aquisição elevada de dados de MS/MS

MSs: metabólitos secundários

MVA: mevalonato

NAP: network annotation propagation

ND: natural derivado

NPAtlas: natural products atlas

OAC: ácido olivetólico ciclase

OS: orselino sintase

OSQS: oxidoesqualeno sintase

PA: afinidade protônica

PKS: policetídeo sintase

PKSA: PKS de *Aspergillus*

PN: produto natural

PS: penicepene sintase

Q-TOF: analisador do tipo quadrupolo-tempo de vôo

SIGEN: Sistema de genealogia

SpecMZ: razão massa e carga das substâncias acessadas na base de dados MZmine

SQS: esqualeno sintase

STS: estilbeno sintase

TE: tioesterase,

TerA: PKS não redutase de *Aspergillus*

TKS: tetracetídeo sintase

TrB: PKS TerA com domínios enzimáticos modificados

TS: talaronoide sintase

UPLC: cromatografia líquida de ultra eficiência

v/v: volume por volume

XIC: cromatograma de íons extraídos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Química dos Produtos Naturais	21
1.1.1. Via isoprênica	26
1.1.2. Vias biossintéticas dos policetídeos.....	29
1.2. <i>Peperomia obtusifolia</i>	37
1.2.1. Perfil metabolômico de <i>P. obtusifolia</i>	38
1.2.2. Ácido orselínico e a via biossintética dos cromanos de <i>P. obtusifolia</i>	40
1.3. Fungos endofíticos de <i>P. obtusifolia</i>	42
1.3.1. <i>Diaporthe infecunda</i>	43
1.3.2. <i>Fusarium oxysporum</i>	43
1.4. Dinâmica metabólica	44
2. OBJETIVOS	46
2.1. Objetivo Geral.....	46
2.2. Objetivos Específicos	46
3. PARTE EXPERIMENTAL	47
3.1. Obtenção das amostras	47
3.1.1. Material vegetal - <i>Peperomia obtusifolia</i>	47
3.1.2. Cepas fúngicas – <i>Diaporthe infecunda</i> e <i>Fusarium oxysporum</i>	47
3.2. Obtenção dos extratos brutos.....	48
3.2.1. Extratos de <i>P. obtusifolia</i>	48
3.2.2. Extratos de <i>D. infecunda</i> e <i>F. oxysporum</i>	48
3.3. Tratamento dos extratos.....	48
3.3.1. <i>Clean-up</i> dos extratos.....	48
3.3.2. Pré-concentração dos constituintes polares dos extratos	49
3.4. Estudo metabolômico	49
3.4.1. Análise por HPLC-ESI-QTOF-MS.....	49
3.4.2. Análise por UPLC-ESI-QTOF-MS.....	50
3.4.2.1. Aquisição dependente e independente de dados de MS e de MS/MS.....	51
3.4.2.2. Molecular Networking e processamento de dados pelo GNPS	52
3.4.2.3. Processamento de dados pelo UNIFI	53
3.5. Avaliação da dinâmica metabólica.....	53
3.5.1. Planejamento experimental de cultivo fúngico	53
3.5.2. Processamento de dados e detecção de policetídeos aromáticos.....	54

3.5.3. Teor de ácido orselínico e otimização de cultivo fúngico	55
3.6. Método HPLC-DAD para quantificação de ácido orselínico	56
3.6.1. Curva de calibração, linearidade, limites de detecção e de quantificação.....	57
3.6.2. Precisão, efeito de matriz e fator de recuperação.....	58
3.6.3. Estabilidade de extrato	58
4. Resultados e discussões	59
4.1. Avaliação do perfis metabolômicos	59
4.1.1. Análise comparativa dos extratos por UPLC-ESI-QTOF-MS	59
4.1.2. Aquisição de dados de MS e de MS/MS nos modos DDA e MS ^E	61
4.1.3. Redes moleculares e processamento de dados GNPS	64
4.1.4. Anotações de MSs pelo UNIFI.....	67
4.1.5. Triagem dos fungos e a detecção de ácido orselínico	69
4.2. Avaliação da dinâmica metabólica de <i>F. oxysporum</i>	70
4.2.1. Anotação de policetídeos aromáticos empregando NAP e MolNethencencer.....	73
4.2.2. Anotação de policetídeos aromáticos pelo processamento MZmine2.....	77
4.3. Avaliação do teor de ácido orselínico em <i>F. oxysporum</i>	82
4.3.1. Delineamento experimental e otimização das variáveis de cultivo	82
4.3.2. Avaliação dos fatores de resposta e proposta de variáveis otimizadas.....	84
4.3.3. Condição otimizada para o cultivo de <i>F. oxysporum</i>	87
4.3.4. Avaliação do método HPLC-DAD e do extrato do cultivo otimizado.....	88
4.4. Estabilidade da solução de extrato	93
4.5. Detecção de ácido orselínico em solução de extrato de cultivo otimizado de <i>F. oxysporum</i> após de 24 hrs empregando UPLC-ESI-QTOF-MS	94
5. Conclusão.....	97
6. REFERÊNCIAS	99

1. INTRODUÇÃO

1.1. Química dos Produtos Naturais

A descoberta de substâncias bioativas a partir de fontes naturais se configura em fundamental avanço de desenvolvimento de novos fármacos. Os produtos naturais (PNs) apresentam rica diversidade química e se configuram em modelos moleculares únicos, especialmente quanto ao grau de oxidação e complexidade estrutural, especialmente associada ao grande número de centros estereogênicos. Essa diversidade química está expressa em plantas, fungos, bactérias, insetos, organismos marinhos, líquens e algas. Até o momento, os estudos químicos de espécies vegetais expressam maior volume e, conseqüentemente, maior diversidade de metabólitos secundários (MSs). Dos PNs de planta avaliados do ponto de vista biológico, cerca de 20% apresentam atividade antitumoral e antimicrobiana. Dentre as substâncias conhecidas, incluem-se antitumorais, antimalárica e antimicrobiana, tais como taxol (**1**) (*Taxus brevifolia*) e vinblastina (**2**) (*Catharanthus roseus*), e como quinina (**3**) (*Cinchona spp.*) e artemisinina (**4**) (*Artemisia annua*) (Figura 1a) (ALTEMIMI et al., 2017; NEWMAN; CRAGG, 2020; THOMFORD et al., 2018).

Com o advento das descobertas científicas de Alexander Fleming e J. M. McGuire os PNs provenientes de fungos, leveduras e bactérias começaram a ser fortemente estudados a partir do ano 1930 e não parou mais. Denominados de bioativos naturais algumas substâncias impactaram e inovaram, dentre eles, dois antibióticos, a penicilinas (**5**) (*Penicillium notatum*) e a eritromicina A (**6**) (*Saccharopolyspora erythraea*) ganharam notoriedade (Figura 1b) (ABDEL-RAZEK et al., 2020; NEWMAN; CRAGG, 2020; SAYED et al., 2020).

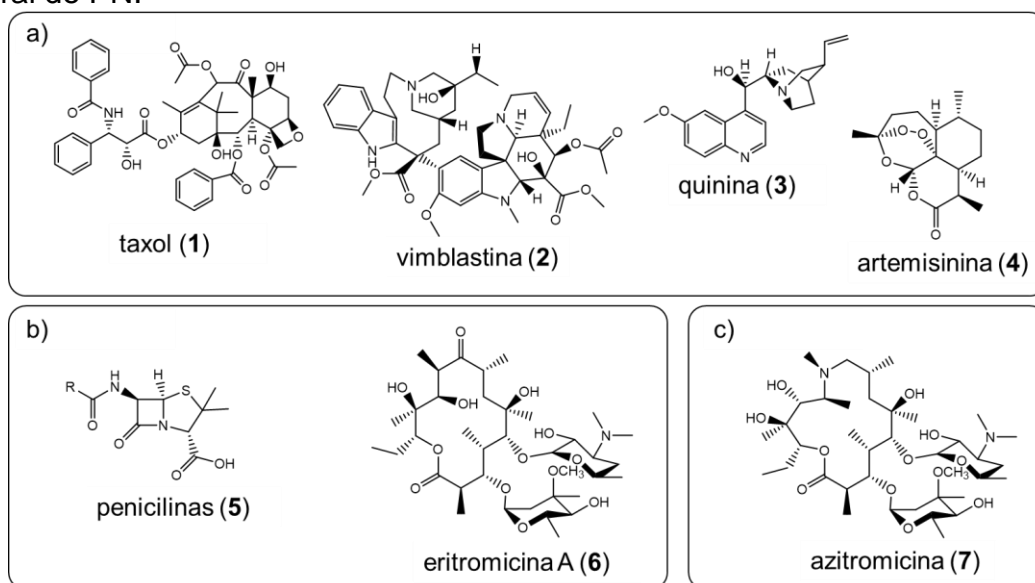
Com o avanço das técnicas de síntese orgânica, muitas dessas substâncias foram submetidas a síntese total e/ou semi-síntese visando inicialmente o aumento da produção em larga escala. Da mesma forma, modificações estruturais de substâncias naturais levaram a obtenção de derivados de produtos naturais (NDs), como a azitromicina (**7**), resultado de etapas de semi-síntese a partir da eritromicina A (**6**) (Figura 1b e c) (THOMFORD et al., 2018).

Nessa perspectiva, a identificação dos constituintes químicos de uma determinada matriz de PN se configura em uma etapa importante para o planejamento e desenvolvimento de novos fármacos, pois possibilita vislumbrar as classes de substâncias produzidas e acumuladas *in natura*. Em pesquisas mais avançadas, as

aplicações de técnicas biotecnológicas e de engenharia genética, a utilização de sistemas heterólogos, especialmente na relação planta/microrganismo, trazem a possibilidade de obter, a partir de fontes heterólogas, eficientes e sustentáveis, metabólitos de interesse farmacológico (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Uma das aplicações da Biologia Sintética, reside na produção da artemisinina, uma importante droga com atividade antimalárica, cuja descoberta levou a cientista Youyou Tu, em conjunto com os cientistas William C. Campbell e Satoshi Ōmura, serem laureados com o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina do ano de 2015 (SHEN, 2015). Originalmente encontrada em quantidades reduzidas na planta, *Artemisia annua*, a artemisinina pode ser biossintetizada em larga escala nos dias de hoje via expressão heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae* (BREITLING; TAKANO, 2015; PADDON; KEASLING, 2014).

Figura 1 - Produtos Naturais bioativos relevantes na história do desenvolvimento de fármacos: a) plantas; b) fungos e bactérias; c) Substância (ND) obtida pela modificação estrutural de PN.



Fonte: Autoria própria.

Assim, a identificação dos constituintes químicos (metabólitos) de uma determinada matriz de PN é a etapa mais importante em pesquisa de desenvolvimento de fármacos, pois possibilita vislumbrar quais são as classes de substâncias produzidas e acumuladas em uma determinada matriz natural. Em pesquisas mais avançadas que envolvem o “mapeamento” de rotas de biossíntese, as aplicações de técnicas biotecnológicas e de engenharia metabólica em plantas e microrganismos se

configuram em ferramentas inovadoras no desenvolvimento de fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2020; THOMFORD et al., 2018).

Para isso, estudar as vias metabólicas dos seres vivos por meio de técnicas ômicas, tais como metabolômica, genômica e proteômica, permite adquirir informações adicionais mais abrangentes sobre os PNs, principalmente sobre os estudos da investigação biossintética (BORNSCHEUER et al., 2021). Vale lembrar, que todos os seres vivos possuem uma dinâmica metabólica complexa sendo que em muitos casos, mais de um ser vivo podem coexistir, como por exemplo a interação planta-microrganismo (NEWMAN; CRAGG, 2020). Além disso, os sistemas vivos são vulneráveis a situações de infecção ou estresse, fatores que afetam a dinâmica metabólica (COMPANT et al., 2019; THOMFORD et al., 2018; YAN et al., 2019).

Estima-se que mais de 300 mil plantas possuem um ou mais microrganismos vivendo harmoniosamente. Esses microrganismos são denominados de endófitos e constituídos de fungos, bactérias e/ou actinomicetos (COMPANT et al., 2019). Normalmente, as partes aéreas (folhas, flores, frutos e caules) tendem a ter colônias de fungos enquanto que nas raízes costumam ser predominantes em colônias de bactérias (COMPANT et al., 2019; CRAGG; NEWMAN, 2013; NEWMAN; CRAGG, 2020).

Durante muito tempo acreditava-se erroneamente que microrganismos eram patógenos (MASI et al., 2018). Somente a partir dos primeiros relatos sobre endófitos em 1904, novas perspectivas foram abordadas e diferentes interesses emergiram, especialmente após os resultados que comprovaram a produção alternativa do taxol (**1**) por *Taxomyces andreanae*, um fungo endofítico de *Taxus brevifolia* (MASI et al., 2018; NEWMAN; CRAGG, 2020; THOMFORD et al., 2018). Isso porque o interesse pela biossíntese do taxol (**1**) surgiu como consequência de atividade antitumoral da molécula em que a descoberta da produção por fungos endófitos trouxe mais interesse ainda. Desde então, houve desenvolvimento de pesquisas em mapear a rota biossintética do taxol e os genes que codificam cada enzima envolvida nas etapas de formação deste metabólito, especialmente da taxadieno sintase, enzima chave na biossíntese dessa substância (**1**) (MASI et al., 2018).

Assim, o estudo químico de PNs é importante para a elucidação de sistemas complexos de interação entre diferentes matrizes naturais e a investigação metabolômica pode se configurar em uma etapa importante e complementar, associada as demais técnicas ômicas, na elucidação de vias biossintéticas que podem trazer luz às interações harmoniosas entre planta e microorganismo (LATA et al., 2018).

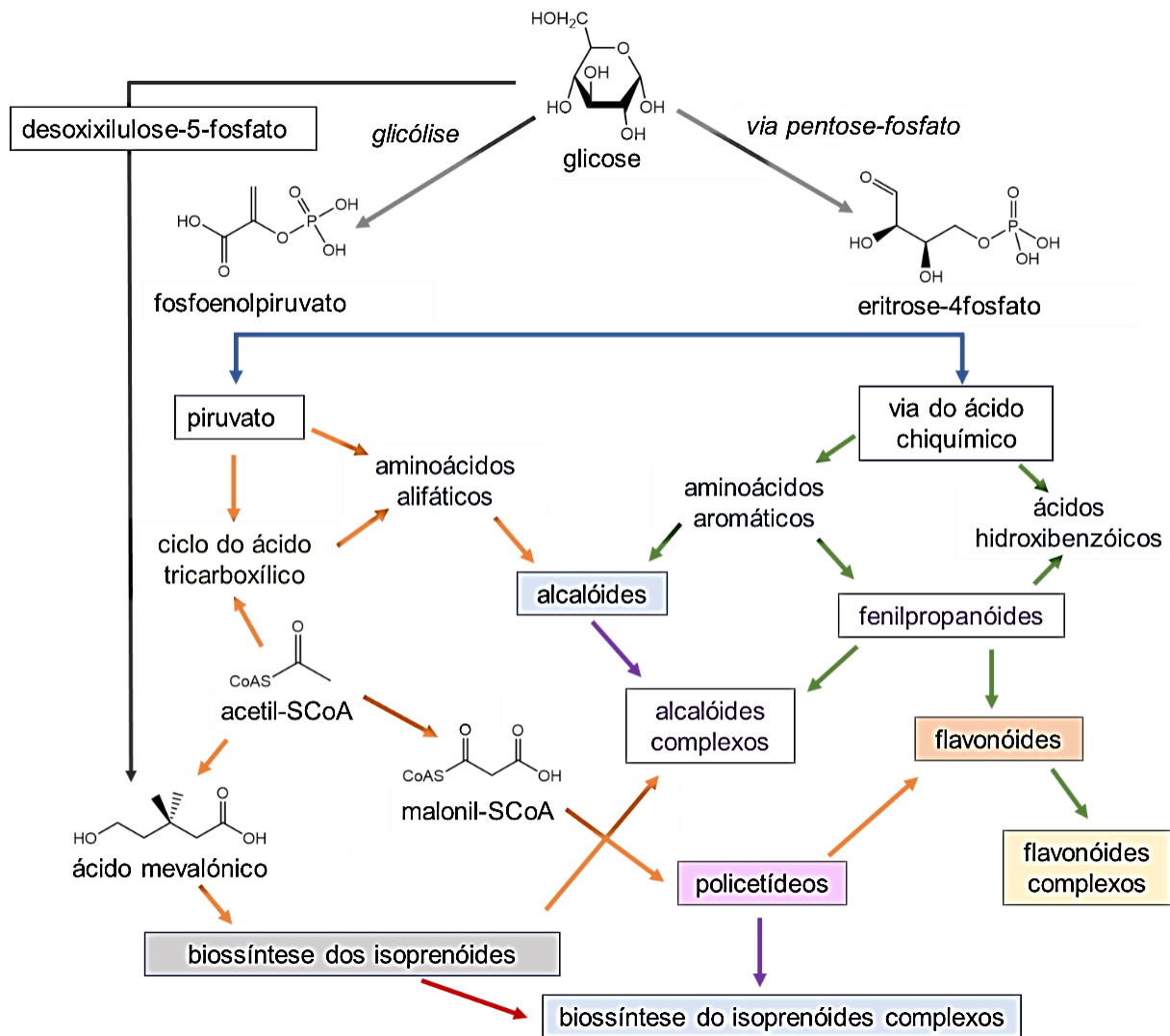
Os seres vivos desenvolvem processos bioquímicos complexos de produção e consumo de substâncias para atender as necessidades de crescimento, desenvolvimento, mecanismo de defesa e reparação (JAN et al., 2021). Essas substâncias são conhecidas como metabólitos primários (MPs) e MSs. Os MPs são produtos oriundos dos processos de respiração, fotossíntese e crescimento celular, como açúcares, aminoácidos e ácidos graxos. Por outro lado, a biossíntese dos MSs depende de vias primárias. (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Nas plantas e nos fungos, as vias glicolítica, desoxixilulose-5-fosfato, pentose fosfato e o ciclo de Krebs são fundamentais para o fornecimento de intermediários biossintéticos de MSs (ISAH et al., 2018; JAN et al., 2021; NEWMAN; CRAGG, 2020).

Conforme a figura 2, esses intermediários são conhecidos como blocos construtores e são oriundos dos processos de glicólise da via piruvato. Essa via participa de muitas outras rotas, principalmente na biossíntese dos ácidos tricarbóxicos, aminoácidos alifáticos, alcalóides, dentre outros (ISAH et al., 2018). Outras fontes de blocos construtores é a via desoxixilulose-5-fosfato e da pentose-fosfato (Figura 2), ambas responsáveis pelas rotas de biossíntese dos isoprenóides (rota do ácido mevalônico) em plantas e microrganismos, e dos MSs dependentes do ácido chiquímico em plantas, tais como os ácidos hidroxibenzóicos, aminoácidos aromáticos, alcalóides, fenilpropanóides e flavonóides (ISAH et al., 2018).

Por fim, o metabolismo do ciclo de krebs em plantas e microrganismos, principalmente em fungos, fornecem outros blocos construtores que são imprescindíveis: unidades acetil-CoA e malonil-CoA (Figura 2). Estas unidades quando ligadas com acetil coenzima A (CoA) estão envolvidas no ciclo do ácido tricarbóxico, a biossíntese dos policetídeos, e a via mevalônica (ISAH et al., 2018; MORISHITA et al., 2019).

Figura 2 – Rotas biossintéticas das principais classes de metabólitos secundários.



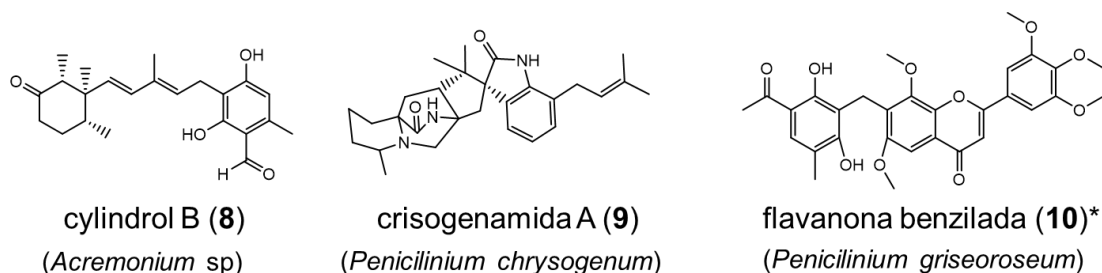
Fonte: Figura adaptada de Isah et al (2018).

Além das principais rotas mencionadas, diferentes vias podem convergir para formar outra variedade de MSs como isoprenóides, alcalóides e flavonóides (ISAH et al., 2018). Exemplos desses casos foram relatados em fungos, tais como *Acremonium* sp., *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium griseoroseum* que convergiram suas diferentes vias metabólicas com as vias biossintéticas da planta hospedeira (KLAS et al., 2018; RAN; LI, 2021; WANG et al., 2020a). Nesse contexto, o *Acremonium* sp é um exemplo de endófito que possui rotas genuínas dos isoprenóides e dos policetídeos, resultando em cilindrol B (8) (Figura 2, via dos isoprenóides complexos). Outro exemplo é a biossintese dos alcalóides complexos em *P. chrysogenum* onde a via do piruvato e dos isoprenóides se convergem e resulta na biossintese da crisogenamida A (9)

(Figuras 2 e 3). Por fim, tem-se o exemplo do *P. griseoroseum* que apresenta um caso de associação endofítica com sementes de *Coffea arabica* que converge a via do ácido chiquimico da planta com a via dos policetídeos do fungo resultando em “benzila flavanona (10)” (Figura 2, via dos flavonoides complexos). (KLAS et al., 2018; RAN; LI, 2021; WANG et al., 2020a).

Atualmente, as pesquisas sobre fungos endofíticos são mais exploradas do que outros tipos de microrganismos como bactérias endofíticas, considerando que boa parte dos MSs são explorados em partes aéreas de plantas e como já mencionado, colônias de fungos são mais comuns (COMPANT et al., 2019). Por isso, o estudo de vias biossintéticas em plantas e fungos associados ou isolados, juntamente com estudos genômicos e proteômicos auxiliam de forma significativa em pesquisas de desenvolvimento de microrganismos para produção bioativos, incluindo bactérias geneticamente modificadas com genes de plantas e/ou fungos (KORNFUEHRER; EUSTÁQUIO, 2019).

Figura 3 - Metabólitos complexos isolados em fungos *Acremonium* sp, *Penicillium chrysogenum* e *griseoroseum* derivados das vias dos isoprenóides com as vias dos policetídeos (8) e dos alcalóides (9), e com a via dos policetídeos e via heteróloga* dos flavonóides (10).



Fonte: Klas et al (2018), Ran e Li (2021) e Wang et al (2020).

Dessa forma, o isolamento de fungos e a compreensão sobre sua dinâmica metabólica de biossíntese de MSs acumulados em planta têm crescido no século XXI juntamente com o avanço da biotecnologia. (ROKAS et al., 2020).

1.1.1. Via isoprênica

Os isoprenóides são comuns em plantas e fungos (BORNSCHEUER et al., 2021) (WANG et al., 2020a). São formados pela condensação das unidades isoprênicas: difosfato de isopentenila (IPP) e seu isômero difosfato de dimetilalila (DMAPP). De

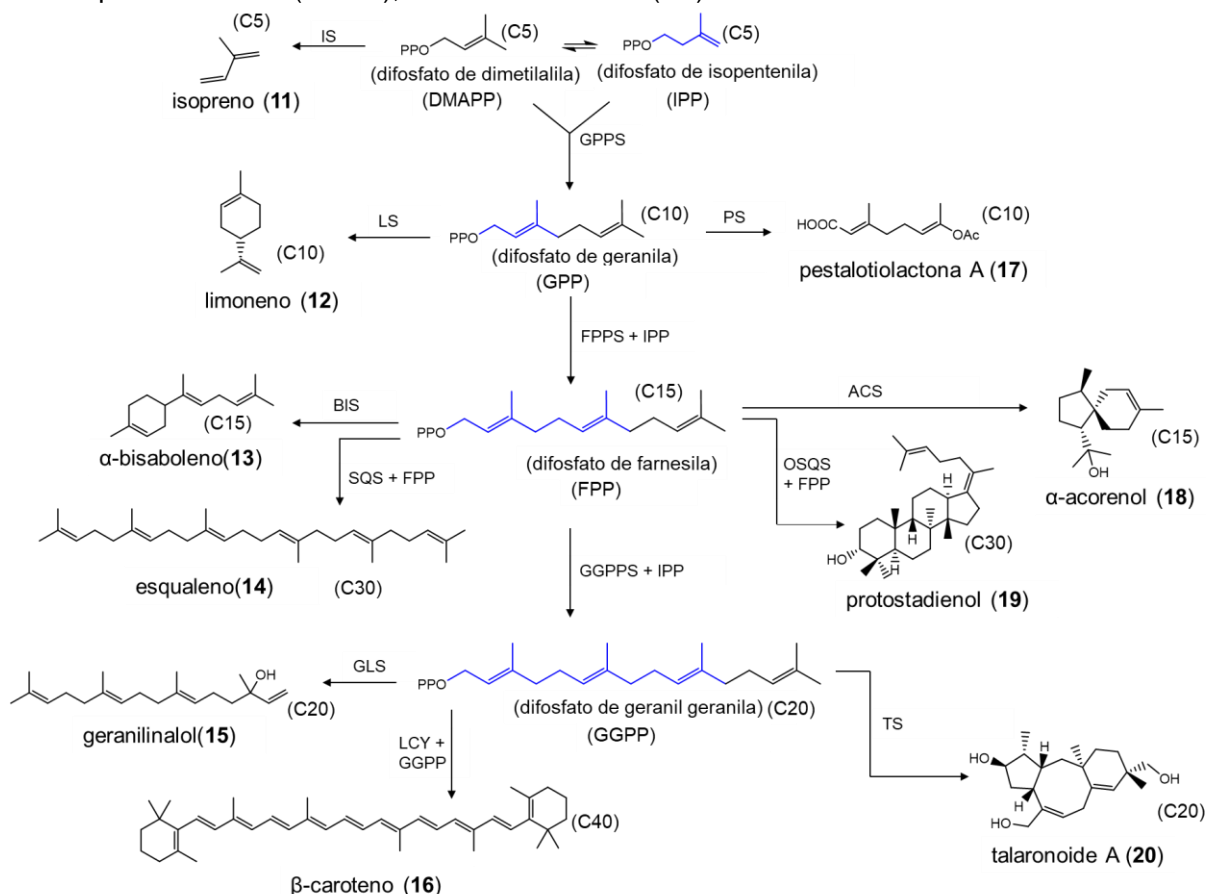
modo geral, as classes de substâncias derivadas da via isoprênica são classificadas em: hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40), e politerpenos (> C45). (BORNSCHEUER et al., 2021; CHATZIVASILEIOU et al., 2019).

Como demonstrado na figura 4, as unidades de IPP e DMAPP são condensados para formar estruturas maiores através da adição sequencial de IPPs. O aumento da cadeia carbônica dos isoprenóides dependem inicialmente das enzimas: difosfato de geranila (GPP), difosfato de farnesila (FPP), difosfato de geranylgeranila (GGPP) e politerpenóides difosfatases (CROTEAU et al., 2011; KO et al., 2019).

Figura 4 - Diversidade de terpenos provenientes de plantas e fungos a partir de blocos construtores DMAPP e IPP.

Enzimas provenientes de plantas: isopreno sintase (IS); limoneno sintase (LS); bisaboleno sintase (BIS); esqualeno sintase (SQS); geranylinal sintase (GLS); licopeno ciclase (LCY).

Enzimas provenientes de fungos: penicepene sintase (PS); acorenol sintase (ACS); oxidoesqualeno sintase (OSQS); talaronoide sintase (TS).



Fonte: Figura adaptada de Ko et al (2019).

Sob essa perspectiva, a depender do organismo eucarioto, as unidades isoprênicas com número de carbono superior a 20 podem originar estruturas químicas complexas, incluindo os sesterterpenos, triterpenos e politerpenos, sendo catalisados

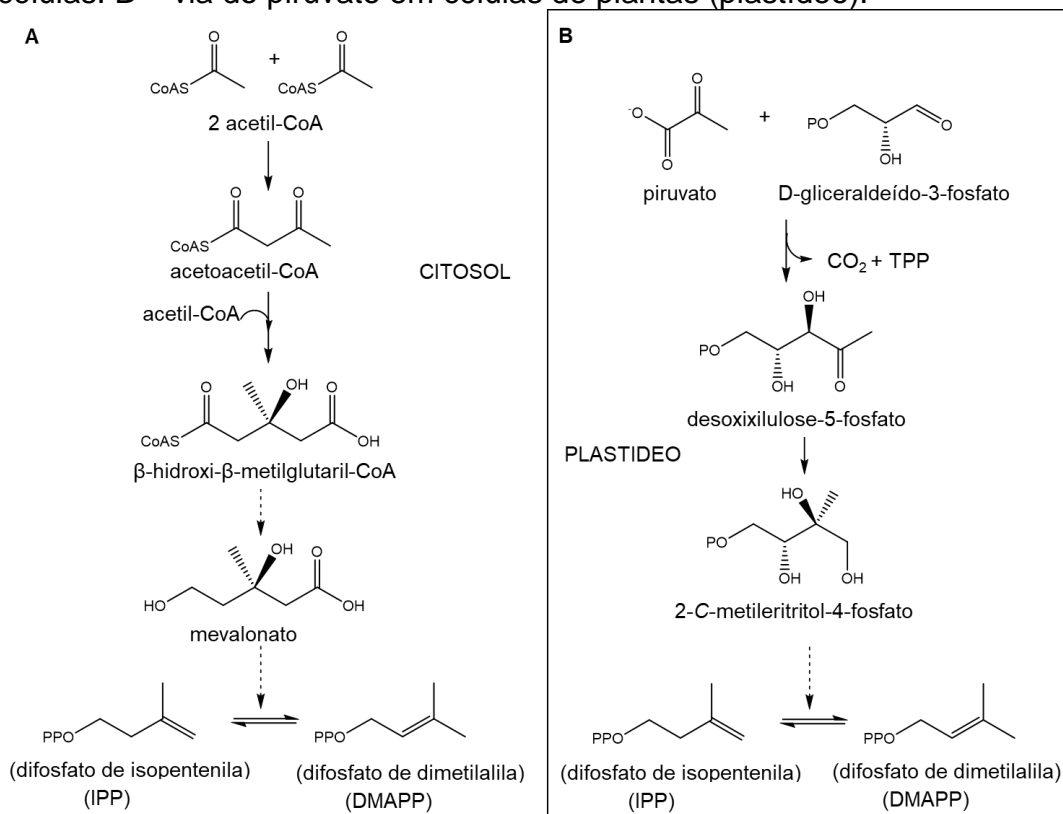
pelas respectivas terpeno sintases, ciclase e monoxigenase (BORNSCHEUER et al., 2021; CHATZIVASILEIOU et al., 2019).

Como já mencionado anteriormente, as unidades de DMAPP e IPP são importantes blocos construtores, e são produzidas por duas vias mais comuns conforme a figura 5 (A e B) (ISAH et al., 2018; PLAXTON, 1996).

A primeira via metabólica ocorre em plantas e fungos e descreve a via do mevalonato (MVA). No caso da segunda via, comum em plantas, corresponde a via do 2-C-metileritritol-4-fosfato (MEP).

Vale ressaltar que a via MEP acontece no plastídeo e envolve a condensação de quantidades equimolares de piruvato e gliceraldeído 3- fosfato (G3P). Em ambas vias o isômero DMAPP é produzido pela isomerização de IPP pela enzima difosfato de isopentenila delta isomerase (IDI) (ISAH et al., 2018; PLAXTON, 1996).

Figura 5 - Principais vias biossintéticas dos isoprenóides em seres eucariotos de plantas e fungos. A = via do mevalonato comuns em plantas e fungos (citossol) das células. B = via do piruvato em células de plantas (plastídeo).

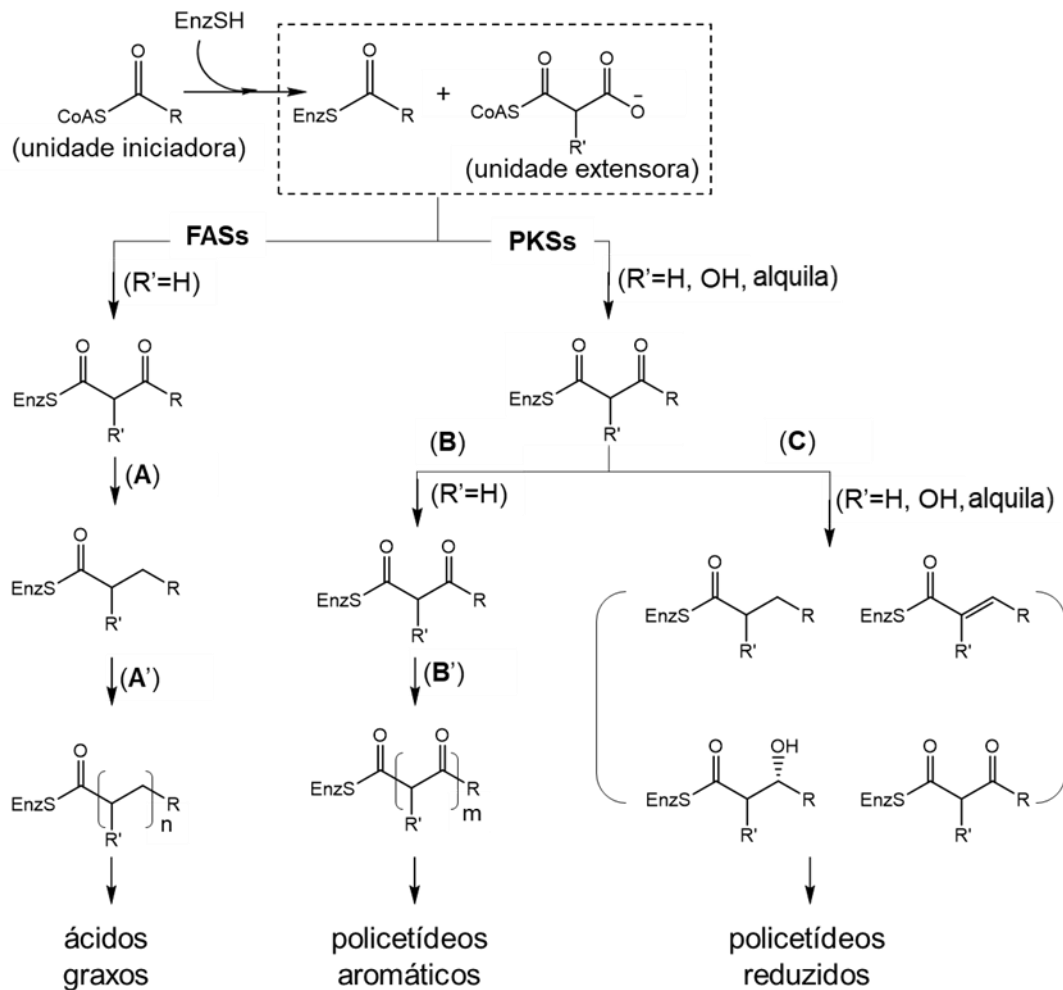


Fonte: Figura adaptada de Isa et al (2018) e Plaxton (1996).

1.1.2. Vias biossintéticas dos policetídeos

Os policetídeos são biossintetizados pela condensação dos blocos construtores, acetil-S-CoA (unidade iniciadora) e malonil-S-coA (unidade extensora) (CROTEAU et al., 2011) (Figura 6).

Figura 6 - Via dos ácidos graxos e policetídeos aromáticos. Rotas A→A' = via ácido graxo sintase (FASs), B→B' e C = via das policetídeos sintases (PKSs).



Fonte: Figura adaptada de Croteau et al (2011).

A via de biossíntese dos policetídeos aromáticos e reduzidos (Figura 6) dependem das arquiteturas enzimáticas das policetídeo sintases (PKSs) (KORNFUEHRER; EUSTÁQUIO, 2019). Do ponto de vista evolutivo das plantas e dos fungos, as PKSs surgiram a partir de mutações adaptativas das ácidos graxos sintases (FASs) (CRAWFORD; TOWNSEND, 2010).

Por alguma razão, as arquiteturas enzimáticas das FASs que eram responsáveis para formação da cadeia linear, foram desativadas devido os domínios enzimáticos alterarem para funções de oxidação e redução, originando assim as PKSs (BORNSCHEUER et al., 2021; COX, 2007)

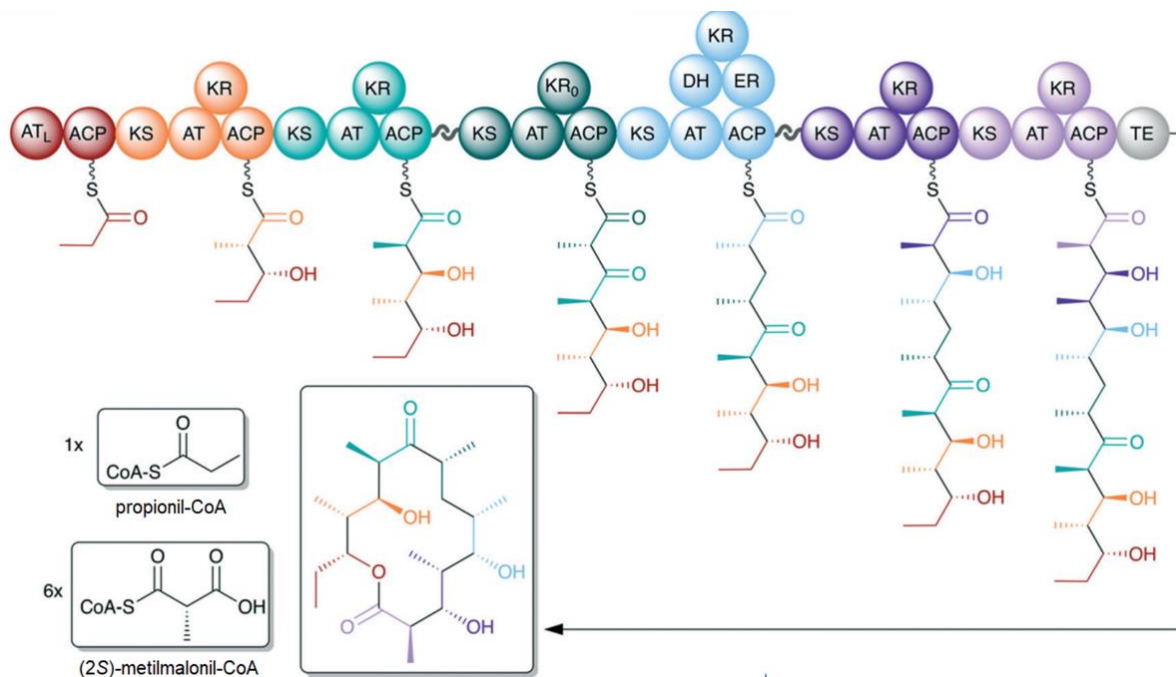
1.1.2.1. Arquitetura das PKSs

As PKSs são enzimas multifuncionais que condensam, oxidam, reduzem ou ciclizam as estruturas dos policetídeos. Essas enzimas possuem sítios catalíticos denominados de domínios que funcionam como “minifábricas” de moléculas (BORNSCHEUER et al., 2021). Cada domínio desempenha uma função enzimática e um conjunto desses domínios organizados constituem uma arquitetura construtora de um determinado policetídeo, como por exemplo 6-deoxieritronolideo B sintase (DEBS) (Figura 7) (BORNSCHEUER et al., 2021; KORNFUEHRER; EUSTÁQUIO, 2019).

A eritromicina A (**6**) é um importante antimicrobiano da classe dos macrolídeos biossintetizado pela DEBS. A arquitetura enzimática dessa PKS é comum em bactérias do gênero *Saccharopolyspora* e em alguns fungos para síntese de policetídeos reduzidos. A sua principal característica é a organização multifuncional em módulos, ou seja, conjunto de domínios que desempenham pelo menos o aumento de cadeia extensora e mudança de estado de níveis de oxidação do C=O a C-OH ou C-H (KORNFUEHRER; EUSTÁQUIO, 2019).

No caso da construção do policetídeo **6** (Figura 7), que é um policetídeo reduzido, requer uma unidade de propionil-CoA (unidade iniciadora) incorporado na DEBS pelo arranjo dos domínios aciltransferase (AT) e proteína carregadora de unidade acila (ACP) e seis etapas de incorporação de unidades de (2S)-metilmalonil-CoA (unidades extensoras), envolvendo arranjos específicos de domínios ceto sintase (KS), ceto redutase (KR), desidratase (DH), enoilredutase (ER) e tioesterase (TE)(KORNFUEHRER; EUSTÁQUIO, 2019).

Figura 7 - Arquitetura modular dos conjuntos de domínios enzimáticos da 6-deoxieritronolideo B sintase (DEBS) responsável pela biossíntese de eritromicina A (**6**). #Domínios enzimáticos: AT = aciltransferase, ACP = proteína carregadora de unidade acil, KS = cetosintase, KR = cetoreductase, DH = desidratase, ER = enoilredutase, TE = tioesterase, KR₀ = função KR desativada (não reduz grupo C=O a COH) e AT_L = AT específica que reconhece propionil-CoA.



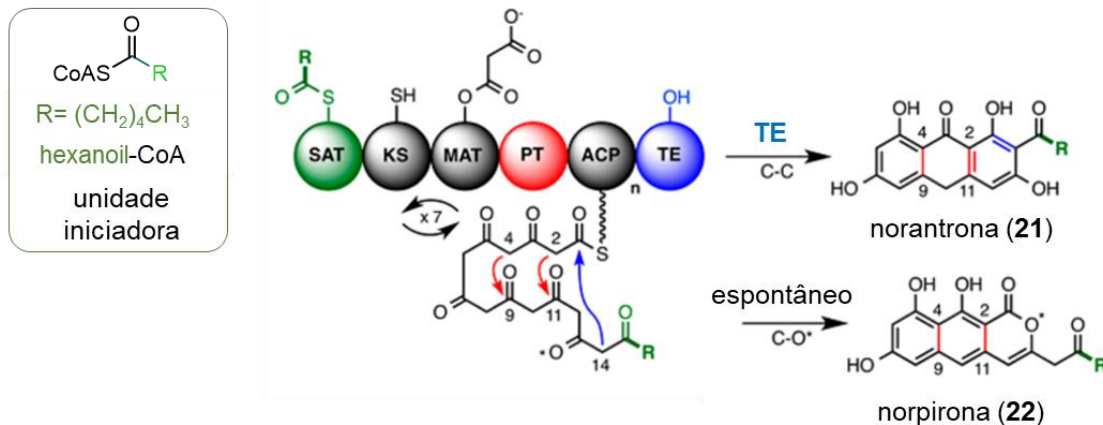
Fonte: Adaptado de Kornfuehrer e Eustáquio (2019).

Para os policetídeos aromáticos, a sua biossíntese mediada pelas PKSs possuem arquiteturas “não modulares”, na qual a construção do policetídeo depende exclusivamente do “domínio molde” PT (do inglês, product template) que é responsável pela conformação da estrutura química do policetídeo formado (KORNFUEHRER; EUSTÁQUIO, 2019).

Dessa forma, tendo como exemplo a arquitetura da PKS de *Aspergillus* (PKSA) (Figura 8) é observado a função do domínio PT para a formação dos anéis aromáticos juntamente com o domínio tioesterase (TE) para a formação catalisada de norantrona (**21**) ou pela inativação do TE, para formação espontânea de norpirona (**22**) em espécies de *Aspergillus* (Figura 8) (NEWMAN et al., 2014).

Figura 8 - Construção de policetídeos não reduzidos, norantrona (21) e norpirona (22), e sua arquitetura enzimática não modular.

#Domínios enzimáticos: SAT = aciltransferase de unidade iniciadora, MAT = aciltransferase da unidade extensora, ACP = proteína carregadora de unidade acil, PT = proteína “*template*” (molde) e TE = tioesterase.



Fonte: Adaptado de Newman et al (2014).

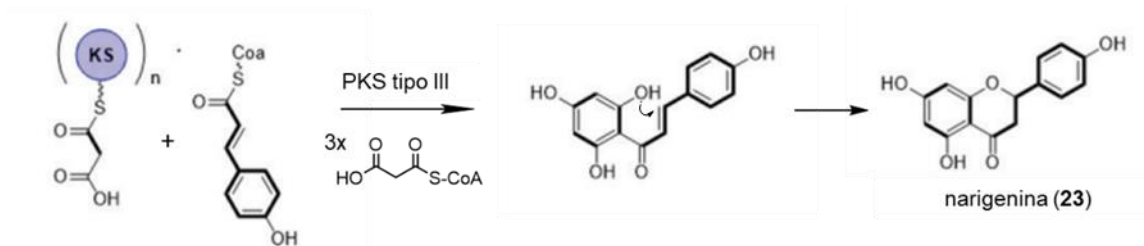
As PKSs modulares e não modulares possuem o domínio TE em suas arquiteturas, responsáveis pela formação de ésteres cíclicos ou aromatização de policetídeos (Figuras 7 e 8). A função desse domínio é a catálise de formação e liberação do policetídeo construído por dois caminhos: (A) formação de lactona pelo ataque nucleofílico intramolecular para a produção do macrocíclico correspondente, tal como ocorre para **6** (Figura 7) e **22** (Figura 8), ou (B) aromatização pelo ataque nucleofílico intermolecular, tal como ocorre para **21** (Figura 8) (KORNFUEHRER; EUSTÁQUIO, 2019; NEWMAN et al., 2014).

Existem uma infinidade de PKSs. São classificadas conforme o tipo de arquitetura que catalisam a formação de policetídeos reduzidos, aromáticos ou lineares. Elas são classificadas como tipo I, II ou III. As PKS tipo I são encontradas em bactérias e fungos, PKS tipo II são restritas a bactérias enquanto PKS tipo III são encontradas em plantas, bactérias e fungos (BORNSCHEUER et al., 2021; COX, 2007)

As PKSs do tipo I possuem um sistema iterativo de domínios organizados em um único módulo de modo que favorecem a construção de policetídeos conforme a quantidade de módulos (Figura 7). No caso das PKSs do tipo II, se configuram em um sistema iterativo de uma ou mais proteínas com funções multienzimáticas que possuem sítios ativos individuais organizados em um único módulo e participam da formação dos policetídeos reduzidos, lineares ou cíclicos, não necessariamente aromáticos (Figura 8). Por fim, as PKSs do tipo III não possuem domínios ACPs, o que diferem do tipo I e

II, além da ausência de domínio PT (Figura 9)(ADHIKARI et al., 2020; PAULO; SIGRIST; DE OLIVEIRA, 2019).

Figura 9 - Domínio cetosintase (KS) das PKSs do tipo III - biossíntese de narigenina.



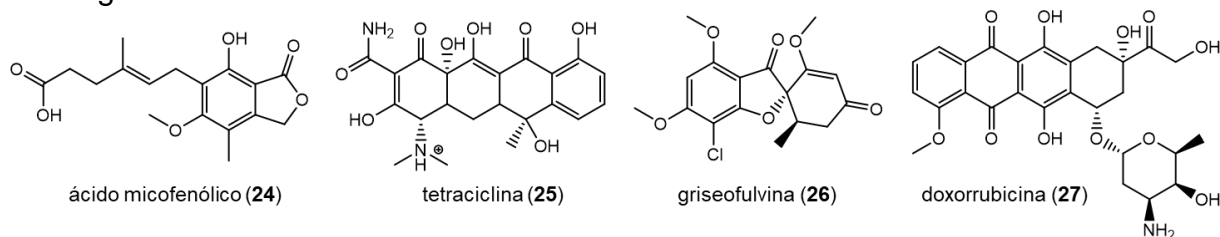
Fonte: Adaptado de Paulo, Sigrist e De Oliveira(2019).

Além disso, algumas particularidades são típicas para as PKSs do tipo III, sendo uma delas o reconhecimento abrangente de unidades iniciadoras ou extensoras diferentes de acetil-CoA e malonil-CoA (SHIMIZU; OGATA; GOTO, 2017). Muitas dessas arquiteturas proporcionam a construção de poliketídeo linear instável e suscetível às reações posteriores para formação de estruturas químicas aromáticas (KORNFUEHRER; EUSTÁQUIO, 2019). Exemplos dessas arquiteturas estão presentes em plantas, principalmente na biossíntese de flavonóides e chalconas, dentre elas a narigenina (**23**). (PAULO; SIGRIST; DE OLIVEIRA, 2019). Embora menos descrito, os fungos também são capazes de biossintetizar flavonóides quando cultivados em laboratórios, sob processos de biotransformação, ou seja metabolização do ácido benzóico envolvendo PKS do tipo III (BORNSCHEUER et al., 2021).

1.1.2.2. Biossíntese dos poliketídeos aromáticos

Os poliketídeos aromáticos são MSs diversos e são produzidos a partir de diferentes PKSs (FÄSEKE; RAPS; SPARR, 2020). Normalmente, são precursores de outros MSs e as estruturas químicas dos poliketídeos variam desde pelo menos um anel aromático (WANG et al., 2020b). Exemplos desses MSs são observados em metabolismos de fungos, tais como os poliketídeos: ácido micofenólico (**24**), tetraciclina (**25**), griseofulvina (**26**) e doxorrubicina (**27**) (Figura 10) que possuem atividades imunossupressoras, antibacterianas, antifúngicas e antitumorais (FÄSEKE; RAPS; SPARR, 2020; HALLE et al., 2019; WANG et al., 2020b).

Figura 10 - Diversidade química de policetídeos aromáticos encontrados em espécies de fungos.



Fonte: Adaptado de Halle et al (2019) e Wang et al (2020b).

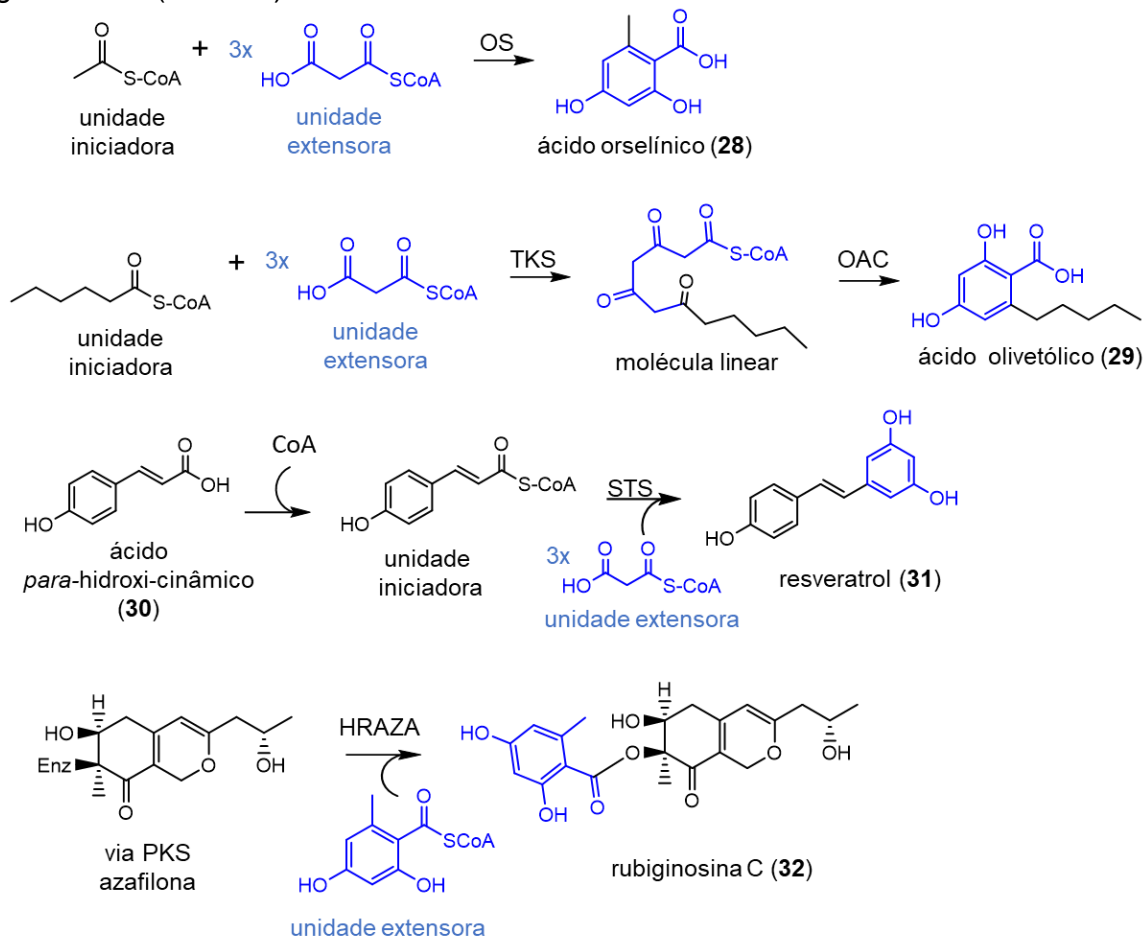
Em alguns casos, as PKSs do tipo III podem produzir derivados policetídeos oriundo de PKS do tipo I ou outras vias. Exemplos recaem sobre a biossíntese de resveratrol (31) e rubiginosina C (32), que ocorre a partir de precursores distintos, derivados ácidos *p*-hidroxibenzoicos (28 e 30) (Figura 11). Nesse caso, o ácido *para*-hidroxicinâmico (30) é o precursor do resveratrol (31) produzido pela ação da estilbeno sintase (STS) de planta, enquanto a rubiginosina C (32) provém do precursor azafilona de via PKS diferente, com a incorporação do ácido orselínico pela ruginosina C sintase (HRAZA) de fungo, que é uma PKS do tipo III, comum em espécies de fungo (ADHIKARI et al., 2020; BECKER et al., 2021).

De modo geral, a depender do tipo de PKS, os policetídeos aromáticos podem ser construídos a partir de unidades iniciadoras e extensoras específicas (Figura 11). Vale lembrar que para as PKS do tipo III, podem requerer outras enzimas não PKSs, tal como a ciclase/aromatase para a formação de policetídeos aromáticos (KAHLERT et al., 2021).

Tendo como exemplo a biossíntese do ácido orselínico (28) em fungos, o mesmo é produzido via arquitetura PKS do tipo I, mediada pela orselino sintase (OS), enquanto o ácido olivetólico (29) (Figura 11) em plantas e bactérias, é produzido pela ação do ácido olivetólico ciclase (OAC) após a formação de tetracetídeo pela tetracetídeo sintase (TKS) que é uma PKS do tipo III (KAHLERT et al., 2021; TAN; CHANG, 2018).

Figura 11 - Policetídeos aromáticos: ácido orselínico (via PKSs do tipo I), ruginosina C (via PKS do tipo II), , ácido olivetólico e resveratrol, (via PKS do tipo III).

Acetilcoenzima A (CoA); orselino sintase (OS); tetracetídeo sintase (TKS); ácido olivetólico ciclase (OAC); estilbeno sintase (STS); policetídeo sintase modular de ruginosina C (HRAZA).



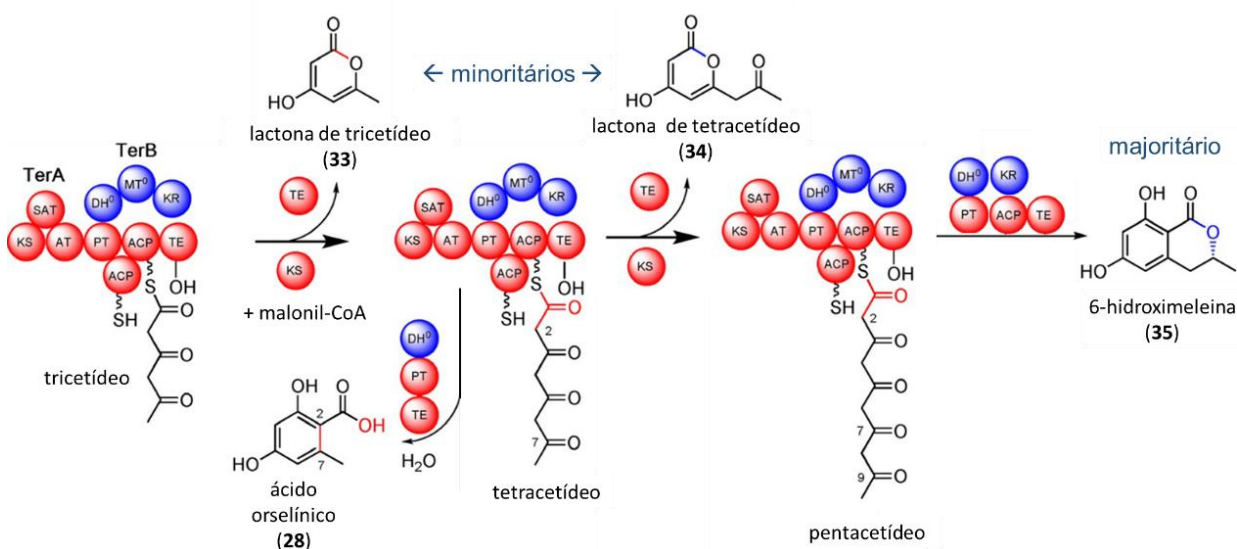
Fonte: Adaptado de Adhikari et al (2020) e Becker et al (2021).

Outra observação é a versatilidade das PKS, principalmente das PKS do tipo I, em relação à cinética de reação das PKSs, durante as etapas catalíticas de incorporações das unidades extensoras nas substituições nucleofílicas, principalmente entre os domínios AT, ACP e TE, em que as ligações C-S são formadas e desfeitas constantemente dentro da arquitetura de uma PKS (KORNFUEHRER; EUSTÁQUIO, 2019). Dessa forma, uma mesma arquitetura PKS favorece a construção de outros policetídeos em diferentes concentrações (KAHLERT et al., 2021).

Esse exemplo de “versatilidade” enzimática foi elucidada em estudos biossintéticos da 6-hidroximeleina (35) e seus intermediários em *Aspergillus niger* pela TerA (PKS não redutase) e TrB (PKS TerA com domínios modificados). Conforme demonstrado na figura 12, os domínios enzimáticos da TrA e TrB são responsáveis

pela construção de intermediários aromáticos, tal como ácido orselínico (**28**), e lactonas (**33**) e (**34**). Segundo os autores desse estudo, o domínio catalítico TE favoreceu a formação e liberação de **28** e **35** em maiores proporções, quando comparado as lactonas **33** e **34** devido a modificação favorável do domínio PT e suas novas interações com os demais domínios (KAHLERT et al., 2021).

Figura 12 - Biossíntese de 6-hidroximeleina e dos poliketídeos intermediários a partir das mesmas arquiteturas PKS TrA e TrB.



Fonte: Adaptado de Kahlert et al (2021).

1.2. *Peperomia obtusifolia*

A espécie *Peperomia obtusifolia* é herbácea e pertence a família Piperaceae, ordem Piperales. O genero *Peperomia*, juntamente com o gênero *Piper* são os mais representativos da subfamília Piperioideae. As espécies de *Peperomia* são nativas das regiões tropicais da América (BATISTA et al., 2017b; MOTA et al., 2011; TANAKA; ASAI; IINUMA, 1998).

A *P. obtusifolia* é conhecida pelo seu vasto uso em ornamentações devido a sua beleza e fácil cultivo (GARCIA-CAPARRÓS et al., 2018; RUIZ MOSTACERO et al., 2019). As plântulas dessa espécie apresentam crescimento rápido em aglomerados de propagação em presença de luz e com nível moderado de umidade (ILYAS et al., 2014). Essa espécie possui folhagem verde oblonga e brilhante, caules curtos e fibrosos, facilmente quebradiços (GIBEAUT; THOMSON, 1989).

Além disso, existem inúmeras variações fenotípicas para essa mesma espécie, as quais são resultado de processos evolutivos diante de diferentes condições, sejam elas climáticas, nutricionais, de luminosidade e até mesmo de estresse (GARCIA-CAPARRÓS et al., 2018).

Nesse contexto, o metabolismo dessa espécie é dinâmico e complexo. Um exemplo, é a sua dinâmica metabólica na produção e no consumo de carboidratos, em que além dos processos de fotossíntese e de respiração, também possui o metabolismo ácido das crassuláceas durante a ausência de luz (BATISTA et al., 2017b).

Outro exemplo, é a produção de de MSs contendo padrões estruturais únicos, envolvidos em rotas biossintéticas diversas e pouco compreendidas. Desse modo, ainda há muito a ser estudado sobre a complexidade metabólica, especialmente as substâncias que pertencem às vias biossintéticas dos isoprenóides, do chiquimato e dos policetídeos aromáticos (BATISTA et al., 2017b; ILYAS et al., 2014; RUIZ MOSTACERO et al., 2019).

1.2.1. Perfil metabolômico de *P. obtusifolia*

Diversos estudos químicos de *P. obtusifolia* possibilitaram identificar e isolar diferentes classes de metabólitos secundários com importante papel biológico (Figura 13 a seguir).

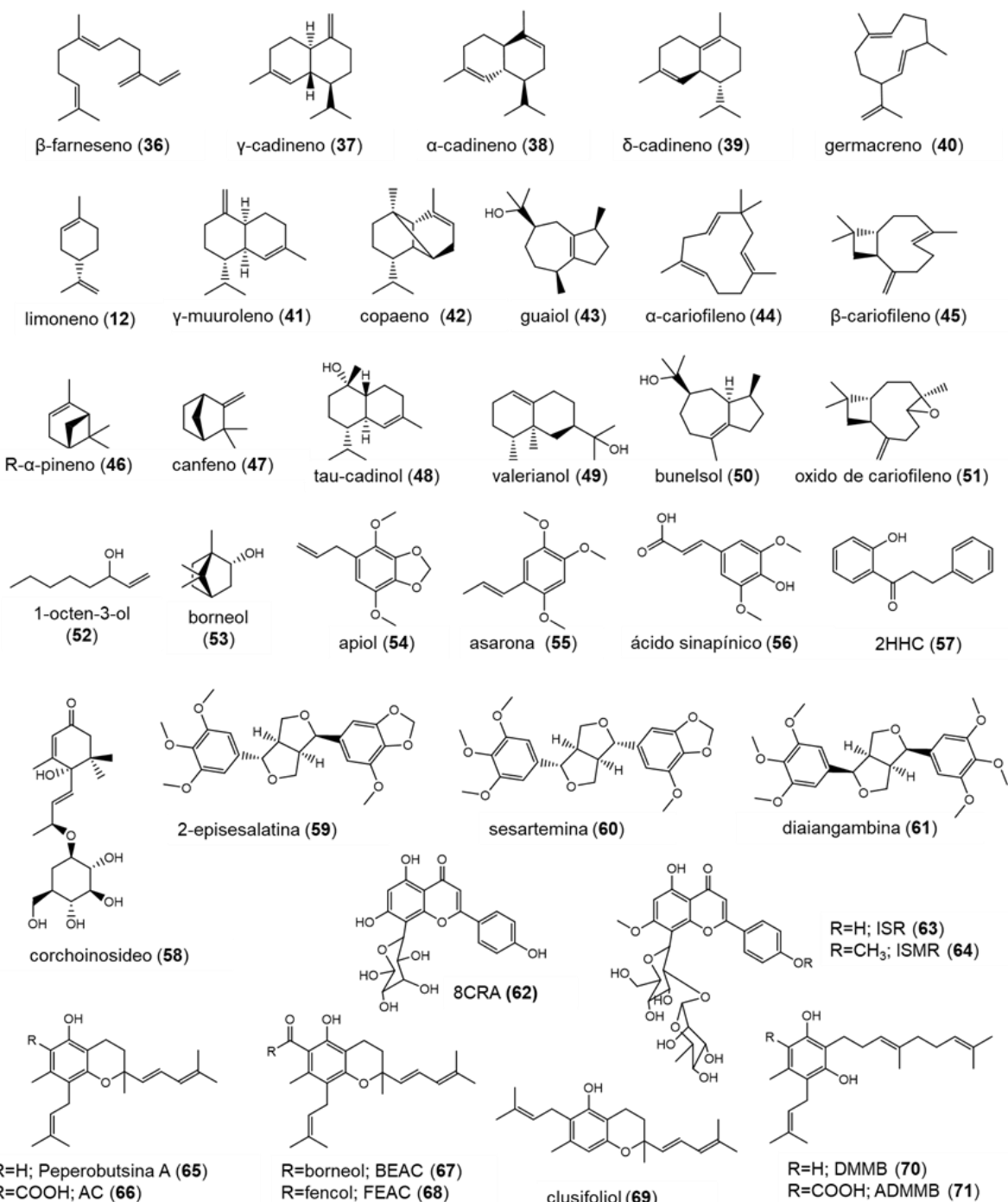
Os terpenos (**36-53**), fenilpropanóides (**54,55**) e meroterpenos e (**65-71**) são os MSs mais representativos no perfil metabolômico dessa espécie, seguido de lignanas (**59-61**), Substâncias glicosiladas (**58,62-64**) e benzopiranos (**62-69**) (ILYAS et al., 2014; RUIZ MOSTACERO et al., 2019; TANAKA; ASAI; IINUMA, 1998).

Como já mencionado anteriormente (Figura 2 do tópico 1.1., pag. 25) os terpenos são oriundos da via dos isoprenóides enquanto que os meroterpenos envolvem mais de uma via, sendo que nessa espécie, as vias dos isoprenóides e a dos flavonóides estão envolvidas (ISAH et al., 2018).

Nesse contexto, tanto os flavonóides **62-64**, como os benzopiranos **65-69** são predominantemente acumulados em *P. obtusifolia*. (BATISTA et al., 2017b; RAN; LI, 2021). Entre os benzopiranos, destacam-se os cromanos peperobutsina A (**65**), ácido cromano (AC) (**66**), cromanos ésteres de borneol (BEAC) (**67**) e de fenchol (FEAC) (**68**), e o cromano clusifoliol (**69**), todos com muitos relatos de atividades biológicas importantes: tripanocida, antibacteriana, antitumoral e antioxidante (BATISTA et al., 2017b; BATISTA JR et al., 2009; FINATO et al., 2018; MOSTACERO et al., 2019).

Figura 13 - Diversidade de substâncias acumuladas em *Peperomia obtusifolia*.

#2HHC: 2'-hidroxiidrochalcona; 8CRA: 8-C-raminosil apigenina; ISMR: isosvertisin-4'-metil-eter-2'' α -L-ramnosídeo; ISR : Isoswertisin-2'' α -L-ramnosídeo; AC: ácido (E)-5-hidroxi-2,7-dimetil-8-(3-metilbut-2-en-1-il)-2-(4-metilpenta-1,3-dien-1-il)cromano-6-carboxílico; BEAC: borneol(E)-5-hidroxi-2,7-dimetil-8-(3-metilbut-2-en-1-il)-2-(4-metilpenta-1,3-dien-1-il)cromano-6-carboxilato; FEAC: fencol(E)-5-hidroxi-2,7-dimetil-8-(3-metilbut-2-en-1-il)-2-(4-metilpenta-1,3-dien-1-il)cromano-6-carboxilato; DMMB: (E)-2-(4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il)-5-metil-4-(3-metilbut-2-en-1-il)benzeno-1,3-diol; ADMMB: ácido (E)-3-(4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il)-2,4-dihidroxi-6-metil-5-(3-metilbut-2-en-1-il)benzóico.



Fonte: Adpatado de Tanala, Asai e linuma (1998), Batista Jr. et al (2009), Ilyas et al (2014), Batista et al (2019), Finato et al (2018) e Mostacero et al (2019).

1.2.2. Ácido orselínico e a via biosintética dos cromanos de *P. obtusifolia*

Os cromanos são marcadores fitoquímicos de *P. obtusifolia*, considerados raros em comparação com os benzopiranos de outras espécies do gênero (BATISTA et al., 2017b; KATO; FURLAN, 2007). Conforme a figura 14, os benzopiranos saturados são biossintetizados a partir do ácido orselínico (**28**) e do orcinol (**28'**) e unidades prenila (BATISTA et al., 2017b). No entanto, o ácido orselínico não é comumente encontrado em plantas, mas em espécies de fungos endofíticos. (BATISTA JR et al., 2009).

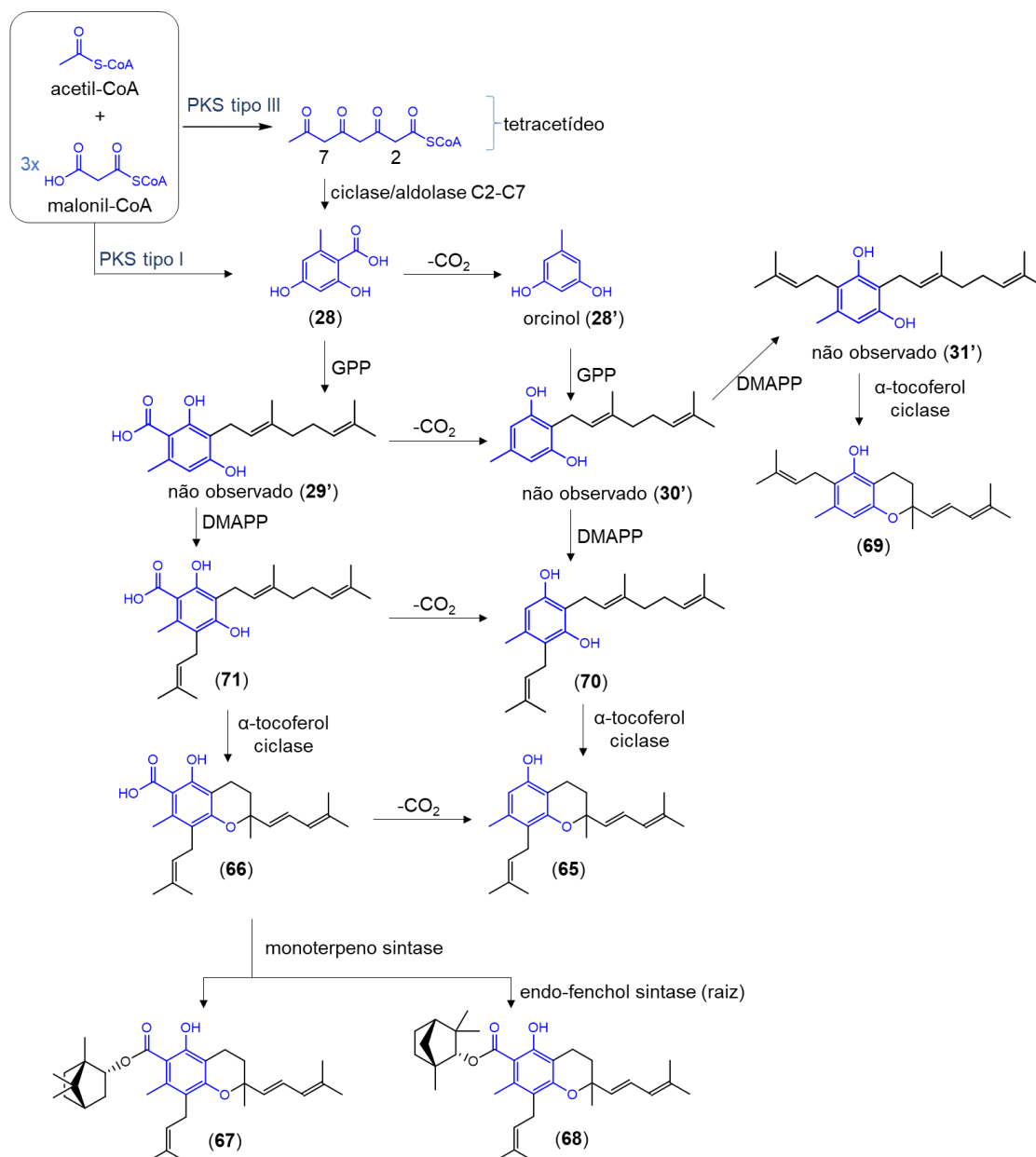
De acordo com a literatura, a via dos cromanos **65-71** está relacionada com a biossíntese dos precursores **28** e **28'**. Em estudos anteriores sobre investigação metabólica, intermediários meroterpenos **29'** e **30'** foram identificados como derivados biossintéticos diretos de policetídeos aromáticos (BATISTA et al., 2017b).

No entanto, embora tenham sido identificados e até isolados boa parte dessas substâncias, alguns desses intermediários ainda não foram isolados e caracterizados nessa planta, entre eles o suposto precursor **28** e meroterpenos **28'-30'**. Muito provavelmente esses intermediários não são suficientemente acumulados para serem quantitativamente isoláveis, detectáveis ou até mesmo são instáveis demais (BATISTA JR et al., 2009).

Trabalhos do nosso grupo de pesquisa empregando ferramentas transcriptoma e proteômica identificaram as prenil transferases difosfato de dimetilalila (DMAPP), difosfato de geranila (GPP) e α -tocoferol ciclase. Essas enzimas estão envolvidas na formação desses anéis benzopiranos, a partir do intermediário ácido orselínico (**28**) e das monoterpenos sintases na formação dos cromanos **70** e **71** (BATISTA et al., 2017b; LUO; YU; ZHOU, 2022).

No entanto, tanto o ácido orselínico (**28**), como o orcinol (**28'**) não foram identificados em *P. obtusifolia* (BATISTA JR et al., 2009). Vale ressaltar que a via do ácido orselínico envolve as PKSs do tipo I ou III, ambas comuns em plantas e fungos (GUTIERREZ et al., 2016; TAN; CLOMBURG; GONZALEZ, 2018).

Figura 14 - Rota de biossíntese de cromanos em *P. obtusifolia* a partir do intermediário ácido orselínico (28) via PKS do tipo I ou III.
 # policetídeo sintase (PKS); difosfato de dimetilalila (DMAPP); difosfato de geranila (GPP).



Fonte: Próprio autor.

Como já proposto por BATISTA et al. (2017), o ácido orselínico (28) pode ser oriundo de fungos endofíticos, visto que esses policetídeos aromáticos são metabólitos comuns desses microrganismos.

1.3. Fungos endofíticos de *P. obtusifolia*

Os fungos endofíticos são microrganismos que habitam o interior de diferentes órgãos vegetais (raiz, caule, folha, frutas e sementes), mais especificamente nos espaços inter- e/ou intracelulares (RUIZ MOSTACERO et al., 2021). Todas as plantas possuem endófitos disseminados em seus tecidos constituindo um microecossistema, e boa parte deles, induzem o crescimento e a resistência sistêmica da planta hospedeira (DOMKA, AGNIESZKA MAŁGORZATA PIOTR; TURNAU, 2019; ROJAS-IDROGO; OLIVERA-MORANTE; PERÚ, 2020). Do ponto de vista evolutivo, as interações fungo-planta são resultado de anos de mutações e adaptabilidade desses seres heterólogos que desenvolveram o “compartilhamento” de processos metabólicos para absorção de nutrientes, crescimento, tolerância a estresses bióticos e abióticos, e proteção contra patógenos (ROJAS-IDROGO; OLIVERA-MORANTE; PERÚ, 2020; RUIZ MOSTACERO et al., 2021).

Por outro lado, os fungos endofíticos são prolíficos e quando cultivados na ausência do metabolismo de planta tendem a produzir diferentes MSs. As cepas fúngicas podem crescer de forma sustentável em diferentes meios de cultura de laboratório produzindo mais ou novas substâncias do que cepas de origem não endofíticas (RUIZ MOSTACERO et al., 2021).

Recentemente, diversos fungos endofíticos foram isolados de folhas de *P. obtusifolia*, com destaque para as cepas *Diaporthe infecunda* e *Fusarium oxysporum* (RUIZ MOSTACERO et al., 2021).

Portanto, as espécies *D. infecunda* e *F. oxysporum* foram selecionadas para os estudos de dinâmica metabólica entre planta-fungo endofítico de forma a contribuir para a elucidação da via metabólica dos cromanos de *P. obtusifolia*. Como já mencionado, esses ascomicetos são conhecidos por produzirem e acumular inúmeras substâncias relacionadas com as vias PKSs, incluindo os policetídeos aromáticos.

1.3.1. *Diaporthe infecunda*

As espécies do gênero *Diaporthe* (Diaporthaceae) pertencem à ordem Diaporthales e à classe Dothideomycetes (CHEPKIRUI; STADLER, 2017). Estima-se que mais de 860 espécies do gênero são capazes de colonizar diversos hospedeiros de plantas como oportunistas, e que várias espécies diferentes podem até concorrer com outras espécies de gêneros diferentes no mesmo hospedeiro (GOMES et al., 2013). No entanto, algumas espécies de *Diaporthe* podem ser endófitos ou patógenos específicos, dependendo do hospedeiro, por exemplo o *D. phaseolorum* que é patogênico em *Glycine max* (soja), mas endófito em *Laguncularia racemosa* (manguezal) (GOMES et al., 2013).

As espécies de *Diaporthe*, incluindo seu estado assexuado, são classificadas e identificadas em relação ao hospedeiro específico vegetal (ROSSMAN; FARR; CASTLEBURY, 2007). No entanto, algumas espécies desse gênero podem alternar as formas sexuais de *Diaporthe* para *Phomopsis* ou vice versa. Além disso, essa alternância de sexualidade tende a resultar na diversificação de biossíntese e acúmulo de metabólitos secundários nos micélios fungicos (CHEPKIRUI; STADLER, 2017).

Atualmente, poucas informações sobre espécies específicas de *Diaporthe* estão disponíveis e confiáveis, inclusive sobre o endófito *D. infecunda* isolado de *P. obtusifolia* (GOMES et al., 2013; RUIZ MOSTACERO et al., 2021). Apesar disso, diversas espécies de *Diaporthe* isoladas de planta e cultivadas em laboratórios são relatados como produtores de PKSs, e conseqüentemente policetídeos aromáticos (CHEPKIRUI; STADLER, 2017; GOMES et al., 2013).

1.3.2. *Fusarium oxysporum*

As espécies do gênero *Fusarium* (Nectriaceae) também possuem algumas particularidades, assim como as espécies do gênero *Diaporthe*, pertencem a um vasto grupo de ascomicetos patogênicos, endófitos e sapróbios (CHEPKIRUI; STADLER, 2017; WEI; WU, 2020).

Quase todas as espécies de *Fusarium* são patógenas de plantas e animais devido sua grande capacidade de produção de toxinas (GORDON, 2017; LUZ et al., 2017). No entanto, um pequeno grupo dessas espécies são tipicamente endofíticos e possuem variantes de mesma espécie denominados de “*Formae Speciales*”, mas ainda pouco explorado (EDEL-HERMANN; LECOMTE, 2019).

Dessa forma, o cultivo de espécie *F. oxysporum* extraído de uma planta hospedeira tende a produzir um perfil de metabólitos secundários específicos quando comparados com a mesma espécie oriundo de outras plantas hospedeiras (EDEL-HERMANN; LECOMTE, 2019; JANGIR et al., 2021; WEI; WU, 2020). Outrossim, a espécie *F. oxysporum* possui uma variabilidade maior de acúmulo de policetídeos aromáticos em relação a espécie *D. infecunda* (HANSEN et al., 2015; SHARMA; MARQUES, 2018; WEI; WU, 2020).

1.4. Dinâmica metabólica

As plantas são organismos sésseis e para compensar o fato de não serem capazes de se locomover quando desafiadas por condições de crescimento desfavoráveis, ataque de pragas ou herbívoros, desenvolveram a sua sobrevivência frente à adaptabilidade ao estresse e à dinâmica biosintética de metabólitos secundários (KATO; FURLAN, 2007; KNUDSEN et al., 2018).

Em termos evolutivos, as plantas desenvolveram plasticidade metabólica com capacidade de síntese, sob demanda, de uma infinidade de fitoquímicos para responder especificamente aos desafios que surgem durante a ontogenia das plantas (KNUDSEN et al., 2018).

No caso de *P. obtusifolia*, poucos estudos foram realizados sobre a sua dinâmica metabólica. Dentre eles, são relatados a variabilidade de produção e acúmulo de pigmentos vermelhos, verdes, azuis em folhas de acordo com a quantidade de luminosidade recebida, sendo que, em condições de baixa luminosidade, a concentração de clorofila, nitrogênio e fósforo tendem a ser maiores (GARCIA-CAPARRÓS et al., 2018). De certo modo, essa dinâmica está fortemente associada com a via dos isoprenóides e com o metabolismo ácido das crassuláceas conforme discutido anteriormente (Tópico 1.2) (BATISTA et al., 2017b)

Como já mencionado, não há indícios de vias biossintéticas do ácido orselínico em plantas (BATISTA et al., 2017b; GUTIERREZ et al., 2016). Nesse contexto, o estudo metabolômico dos fungos endofíticos de *P. obtusifolia* pode auxiliar na descoberta da origem da via do ácido orselínico com base nas evidências de acúmulo dos policetídeos aromáticos existentes em espécies do gênero *Diaporthe* e *Fusarium*. (CHEPKIRUI; STADLER, 2017; HANSEN et al., 2015; WEI; WU, 2020).

Assim, o estudo metabolômico das cepas *D. infecunda* e *F. oxysporum* isoladas de *P. obtusifolia* pode nos fornecer informações valiosas sobre a origem do ácido orselínico (**28**) e/ou orcinol (**28'**). No entanto vale ressaltar que uma vez que o metabolismo fúngico está intimamente relacionado com o estado de crescimento e a forma de desenvolvimento do microrganismo, o acúmulo e a produção de MSs pode variar ao longo do tempo. (TRIASTUTI et al., 2021).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é investigar a dinâmica metabólica dos fungos endofíticos *Diaporthe infecunda* e *Fusarium oxysporum* e associar a via biossintética de cromanos em *Peperomia obtusifolia*.

2.2. Objetivos Específicos

- Cultivar e obter os extratos de *D. infecunda* e *F. oxysporum* para aquisição de espectros de MS e MS/MS empregando diferentes métodos de HPLC-ESI-QTOF-MS e de UPLC-ESI-QTOF-MS;

- Realizar o processamento e interpretação dos dados de MS e MS/MS para detecção dos metabólitos secundários e investigação metabolômica;

- Realizar planejamento experimental composto central rotacional do fungo que possuir maior diversidade de policetídeos aromáticos para avaliação da dinâmica metabólica;

- Quantificar o teor de ácido orselínico por HPLC-DAD dos extratos obtidos do estudo de planejamento experimental do fungo para otimização das variáveis visando a maximização deste metabólito;

.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Obtenção das amostras

3.1.1. Material vegetal - *Peperomia obtusifolia*

A espécie *Peperomia obtusifolia*, registrado no SIGEN: A41D5BF, foi disponibilizada e cultivada na casa de vegetação do Instituto de Química de Araraquara, UNESP, Araraquara, SP, Brasil. A mesma foi previamente identificada pela Dra. Inês Cordeiro do Instituto de Botânica (IBt de São Paulo, SP, Brasil) e depositadas no Herbário do Instituto de Botânica (USP – SP) exsicata Kato 0057, Herbário do Instituto de Biociências (USP – SP) exsicata Kato 093 e no Herbário do Estado “Maria Eneyda P. Kaufmann Fidalgo” (São Paulo) exsicata Kato 070. As folhas foram submetidas à secagem em estufa a 40°C, posteriormente foram trituradas em moinho analítico, armazenadas em frascos âmbar em dessecador e mantidas na ausência de luz.

3.1.2. Cepas fúngicas – *Diaporthe infecunda* e *Fusarium oxysporum*

As cepas de *D. infecunda* e *F. oxysporum* isoladas de folhas de *P. obtusifolia* pela colaboradora Profa. Silvia López da Universidade Nacional de Rosário (Rosário, Argentina) e cedidas para o laboratório do NUBBE/IQ-UNESP (Araraquara-SP, Brasil). Os esporos foram inoculados em placas de petri contendo meio de cultivo preparado de batata dextrose ágar (BDA), Acumedia® (Indaiatuba-SP, Brasil).

O meio de cultivo BDA utilizado foi composto de 4 g de fécula de batata, 20 g de dextrose e 15 g de ágar por litro. O meio foi preparado em meio aquoso a 39 g.L⁻¹, autoclavados (120°C em 1atm), transferidos para placas, repousados em capela de fluxo laminar por 1 hora, seguido de esterilização (30 min de radiação Ultravioleta) e por fim, as placas foram devidamente fechadas com parafilme.

Os esporos de *D. infecunda* e *F. oxysporum* foram inoculados em placas e cultivados na condição inicial de 33°C, em incubadora de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), por 7 dias. Nesta etapa, foram preparadas cerca de 200 placas de cultivos para cada fungo e foram avaliados os perfis metabômicos nessa condição de cultivo a partir da análise dos extratos brutos.

3.2. Obtenção dos extratos brutos

3.2.1. Extratos de *P. obtusifolia*

As amostras trituradas de folhas foram submetidas à extração exaustiva (3 vezes) de 25 mL de acetato de etila (AcOEt) por 24 hr. As soluções obtidas foram filtradas em papel de filtro analítico, rotaevaporadas e transferidas para frascos âmbar para secagem em capela de exaustão. Posteriormente os extratos brutos secos foram liofilizados e mantidos fechados ao abrigo de luz a 4°C.

3.2.2. Extratos de *D. infecunda* e *F. oxysporum*

Os extratos dos fungos foram obtidos empregando o método de Jørgensen e colaboradores (2014) com alterações. Nesse caso, os micélios da camada de BDA foram retirados em fragmentos menores com auxílio de espátula e transferidos para erlenmeyers contendo 25mL de acetato de etila (AcOEt).

O processo de extração ocorreu com os frascos devidamente fechados com papel kraft, em câmara de refrigeração a 20 °C e agitação mecânica por 24 h. Posteriormente, a solução foi filtrada em papel de filtro analítico (Millipore®) e o resíduo foi submetido a novo processo de extração.

A proporção média de extração foi de 20 placas utilizando 25 mL de AcOEt, por 3 vezes consecutivas. As soluções extraídas foram agrupadas (média total de 75 mL), rotaevaporadas e transferidas para frascos âmbar para secagem em capela. Posteriormente, os extratos brutos secos foram liofilizados, e por fim, armazenados e fechados em frascos âmbar ao abrigo da luz em 4°C.

3.3. Tratamento dos extratos

3.3.1. *Clean-up* dos extratos

Os extratos brutos foram ressuspensos em metanol (MeOH) (1mg.mL⁻¹) e submetidos a procedimento de limpeza de amostra (*Clean-up*) para a eliminação de eventuais impurezas. Esse procedimento consistiu na extração em fase sólida (EFS),

utilizando cartucho Chromabond® C-18 (1 mL de fase estacionária octadesil) e uso de solventes ultrapuros: água e MeOH (95:5).

A fase estacionária do cartucho foi ativada com 1 ml de solução de água e MeOH (95:5). Posteriormente, foram adicionados 1 mL de solução de extrato e 2 mL de MeOH para eluição completa do cartucho. O eluato foi coletado em frasco âmbar, liofilizado e armazenado a 4°C ao abrigo da luz.

3.3.2. Pré-concentração dos constituintes polares dos extratos

Considerando a complexidade dos extratos brutos de *P. obtusifolia*, *D. infecunda* e *F. oxysporum* empregou-se como estratégia a pré-concentração dos constituintes polares através de EFS.

Para isso, foi utilizado cartuchos Chromabond® C-18 (1 mL de fase estacionária octadesil) ativados com 1 mL de solução hidroalcoólica de MeOH 5% (v/v). Posteriormente, foram preparados as amostras dos extratos ressuspensão em MeOH (1mg.mL⁻¹), submetidos ao banho de ultrassom (10 min) e centrifugação (5.000 rpm).

A pré-concentração foi realizada com a adição de 1 mL da amostra preparada de extrato ao cartucho ativado, seguido de adição de 2 mL de uma solução hidroalcoólica MeOH a 35% (v/v) e coleta de 3 mL do eluato. O *clean up* dos cartuchos foi realizado utilizando 10 mL de MeOH puro, e, após secos, os cartuchos foram reativados novamente com 1 mL de solução hidroalcoólica MeOH:H₂O 5%. Para cada tipo de amostra foram realizadas 5 pré-concentrações. Os eluatos foram agrupados (cerca de 15 mL), transferidos para tubos cônicos (tipo Falcon) para serem secos em capela de exaustão e liofilizados. Por fim, essas amostras foram armazenadas a 4°C, ao abrigo da luz.

3.4. Estudo metabolômico

3.4.1. Análise por HPLC-ESI-QTOF-MS

Para a análise por HPLC-ESI-QTOF-MS utilizou-se um sistema de HPLC Shimadzu® (Kyoto, Japan) composto por duas bombas LC-20AD, injetor automático SIL-20AHT, detector SPD-20A, forno de coluna CTO-20A e módulo controlador CBM-

20A. Esse sistema foi acoplado ao espectrômetro de massas configurado como ESI-QTOF-MS/MS, modelo Bruker microOTOF-QII.

Para o método de separação, empregou-se coluna Phenomenex Luna PFP (2) 5 μm , 150x2mm numa vazão de 0,2 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ utilizando método gradiente de eluição. As fases móveis utilizadas foram: H_2O com 0,1% de ácido fórmico v/v e acetonitrila (ACN) com 0,1% de ácido fórmico v/v com 0,1% de ácido fórmico. O método de eluição gradiente foi realizado nas seguintes condições: 0-3 min com 2 % de B, 3-32 min com gradiente de 2-100% de B, e 32-34 min com 100 % de B (etapa de limpeza). Nesse método, foi utilizada temperatura de coluna a 40°C e 10 μL de volume de amostra.

O espectrômetro de massas foi configurado com os íons RF2, 2RF e RF hexapole programado a 400, 200 and 200 Vpp, respectivamente. Os espectros MS e MS/MS foram adquiridos nos modos de ionização por electrospray positivo (ESI(+)) e negativo (ESI(-)).

No modo ESI(+), os espectros de MS e MS/MS foram adquiridos com os seguintes parâmetros: gás N_2 de nebulização a 4 Bar com fluxo de 8 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, energia de capilaridade de 4500 V, temperatura de 200 °C, energia de colisão de 12 eV e energia do quadrupolo de 6 eV.

No modo ESI(-), os espectros de MS e MS/MS foram adquiridos com os seguintes parâmetros: gás N_2 de nebulização a 8 Bar com fluxo de 8 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, energia de capilaridade de 3500 V, temperatura de 200 °C, energia de colisão de 10 eV e energia do quadrupolo de 8 eV.

As amostras dos extratos foram preparadas em ependófs, ressuspendidos em ACN; na concentração de 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, seguido de ultrasonificação e centrifugação. Os sobrenadantes foram transferidos para os vials e submetidos à análise.

3.4.2. Análise por UPLC-ESI-QTOF-MS

O equipamento empregado foi composto pelo sistema UPLC Waters® Acquity contendo injetor automático acoplado a um espectrômetro de massas modelo Xevo® G2-XS QTOF configurado com fonte de ionização por electrospray (ESI).

Para o método cromatográfico foi utilizado a coluna C18 Waters®, modelo ACQUITY UPLC BEH (100 mm \times 2,1 mm, 1,7 μm), a 30 ° C. Empregou-se como fases

móveis o eluente A (0,1% ácido fórmico em água ultrapura) e o eluente B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrila de grau de pureza HPLC gradiente), numa vazão de 0,4 mL.min⁻¹ e gradiente exploratório 5-100% (B) de 20 min.

As amostras dos extratos foram preparadas em eppendofs, ressuspendidos em ACN; na concentração de 1 mg.mL⁻¹, seguido de ultrasonificação e centrifugação. Os sobrenadantes foram transferidos para os vials e submetidos à análise nos modos de aquisição dependente (DDA) e independente de dados (DIA).

3.4.2.1. Aquisição dependente e independente de dados de MS e de MS/MS

Os espectros de MS (*full scan*) e de MS/MS foram obtidos nos modos de aquisição de dados dependente (DDA) e aquisição de dados independente (DIA) com intuito de obter o máximo de informação metabolômica dos fungos. Para ambos os modos, foram utilizados ionização positiva (+) e negativa (-) do ESI, no intervalo de 50-1200 Da e com o tempo de aquisição de 0,1 segundo no modo centróide.

O modo DDA foi empregado para detecção de alta precisão e exatidão dos íons observáveis nos espectros de MS e seus espectros de MS/MS isolados para a interpretação dos íons fragmentos. Já no modo DIA, os espectros de MS/MS foram obtidos a partir de todos os íons produtos (MS^E) detectados juntos, ou seja os espectros MS/MS não são provenientes de íons isolados do espectro MS, e sim de vários íons simultaneamente. Diferente do modo DDA, o MS^E permite obter mais informações espectrais de MS/MS (NOBLE; LINNET, 2018).

Para a condição de DDA foi utilizado energia de colisão em rampa de 6-60 eV, voltagem capilar de 3,0 KV e para a condição de MS^E as energias de colisão: mais baixa: 20 eV e rampa de energia de colisão mais alta: 20-50 eV. Os parâmetros instrumentais de ionização no espectrômetro de massas foram: gás de dessolvatação (N₂) 800 Lgh⁻¹ e temperatura de 650 °C, taxa do fluxo de gás do cone 100 L h⁻¹ e temperatura da fonte 100 °C.

3.4.2.2. Molecular Networking e processamento de dados pelo GNPS

Inicialmente, os arquivos de dados de MS e de MS/MS, adquiridos no modo DDA, foram convertidos de extensão “.RAW” para “.mzXML”. A conversão foi realizada utilizando o software MSconvert que é uma das ferramentas disponíveis pelo provedor de código aberto ProteoWizard. Posteriormente, os arquivos mzXML foram adicionados à plataforma Global Natural Products Social (GNPS) por meio do software de transferência de dados seguros, o programa WinSCP (Windows Secure CoPy) respectivamente. A conversão foi necessária para a realização de processamento de dados de MS e de MS/MS na plataforma online de GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>).

Foi empregado a obtenção de redes moleculares pelo método clássico (*workflow* online) disponível pela plataforma GNPS (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>). Para isso foram estabelecidos ajustes de parâmetros de de processamento de dados para detecção de sinais m/z , criação de redes moleculares por similaridades dos espectros e anotações de MSs.

Os parâmetros estabelecidos foram: a eliminação de impurezas espectrais pela eliminação de ruídos de todos os sinais de íons do fragmento MS/MS dentro de +/- 17 Da do precursor m/z ; limitação espectral de MS/MS filtrados com o mínimo de 6 íons de fragmento na janela de +/- 50 Da em todo o espectro; tolerância da massa para detecção do íon precursor ajustada para 2,0 Da; e uma tolerância de detecção do íon do fragmento MS/MS de 0,5 Da (WANG et al., 2016).

Posteriormente a criação de rede foi obtida com base nos seguintes parâmetros: aquisição de arestas filtradas com pontuação de cosseno acima de 0,7; ajuste de detecção mínima de 4 picos com proporções de perdas de fragmentos similares entre todas as janelas espectrais; criação máxima de 10 *nodos* para as similaridades espectrais detectadas; e o tamanho máximo dos *clusters* de uma família molecular foi definido no máximo 100 (WANG et al., 2016).

Por fim, os parâmetros de pareamento entre os espectros de MS e de MS/MS dos experimentos realizados com a base de dados da plataforma GNPS para anotações de MSs foram ajustados da mesma maneira utilizada para os ajustes dos parâmetros iniciais de entrada. Todas as correspondências foram mantidas entre espectros de rede e espectros de biblioteca com anotação a partir de pontuação mínima de 0,7 e com pelo menos 4 picos correspondentes de mesmas proporções de perdas de fragmentos (WANG et al., 2016).

3.4.2.3. Processamento de dados pelo UNIFI

Nessa etapa, os arquivos de dados de MS e de MS/MS, adquiridos no modo DIA (MS^E), foram extraídos pelo software MaxLynx e depositados no software UNIFI (ambos pertencentes a Waters®). O sistema de anotação do UNIFI consistiu na predição teórica das massas exatas dos íons adutos e íons fragmentos de acordo com pareamento de uma base de dados. As anotações são obtidas a partir de detecção dos valores m/z dos espectros de MS e MS/MS (YANG et al., 2018).

Para isso, foi elaborada uma biblioteca de dados com mais de 400 substâncias relatadas em *D. infecunda* e *F. oxysporum* utilizando ferramentas analíticas do estado da arte para desenho de moléculas (arquivos ChemDraw com extensão .mol) e descrição das massas exatas (arquivo com extensão xlm).

Para a anotação das substâncias, os parâmetros de processamento de dados para detecção de picos m/z nas janelas espectrais foram ajustados em relação aos valores de alta energia (*High Energy*, HE) para os espectros de MS, e de baixa energia (*Low Energy*, LE) para os espectros de MS/MS.

Nesse caso, os valores de detecção de HE foram correspondentes a 3x a intensidade do menor sinal m/z detectável e para os valores de LE correspondente a 2x o valor estabelecido no HE. Por fim, estabeleceu-se o erro tolerável de anotação de 5 ppm entre os espectros de MS e de MS/MS e a base de dados (YANG et al., 2018).

3.5. Avaliação da dinâmica metabólica

3.5.1. Planejamento experimental de cultivo fúngico

Esse experimento foi empregado para a espécie de fungo que apresentou maior número e diversidade de policetídeos aromáticos. Foi proposto o estudo de variabilidade metabólica e quantificação do ácido orselínico. Para isso, variou-se as formas de cultivo do fungo em relação ao tempo e a temperatura de crescimento para obtenção de diferentes perfis metabólicos.

Para tal propósito, utilizou-se o modelo de planejamento experimental composto central rotacional (CCR) com dois pontos centrais. As condições de cultivo de fungo foram sugeridas a partir dos valores codificados mínimos (-1) e máximos (+1) das

variáveis de entrada X1 (tempo) e X2 (temperatura) foram: 3-15 dias e 22-32°C (Tabela 1).

Cada condição de cultivo foi realizada em 20 placas contendo meio BDA e fungo inoculado. O crescimento fúngico foi realizado sob DBO seguindo os parâmetros de X1 e X2 para retirada dessas amostras devidamente nos prazos. Os extratos brutos foram obtidos conforme a metodologia anteriormente descrita (tópico 3.1.1).

Nesse planejamento experimental, os extratos foram avaliados por HPLC-ESI-QTOF-MS para estudo de variabilidade metabólica com base no processamento de dados de MS e de MS/MS para detecção de policetídeos aromáticos e por HPLC-DAD para determinação dos teores de ácido orselínico entre os diferentes extratos adquiridos. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata e os dados foram analisados com o software Statistica 7.

Tabela 1. Valores utilizados como variáveis de entrada de tempo (X1) e de temperatura (X2)

Variável codificada		Variável não codificada	
Tempo (X1)	Temperatura (X2)	Tempo (dias)	Temperatura (°C)
-1	-1	4,8	23,5
-1	+1	4,8	30,5
+1	-1	13,2	23,5
+1	+1	13,2	30,5
0	0	9	27
0	0	9	27
0	-1.45	9	22
0	+1.45	9	32
-1.45	0	3	27
+1.45	0	15	27

3.5.2. Processamento de dados e detecção de policetídeos aromáticos

Os dados brutos de MS e de MS/MS obtidos a partir das análises por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, acoplado foram convertidos do formato “.d” para “.mzXML”. Posteriormente, esses dados foram processados de duas formas: a primeira utilizando a plataforma GNPS (Mesma

metodologia do t3pico 3.4.2.2) e a segunda pelo processamento utilizando o software MZmine.

O primeiro processamento pela plataforma GNPS consistiu em obter anota33es mais detalhadas empregando ferramentas avan33adas de an33lise *in silico*. O primeiro m33todo empregado foi o *Network Annotation Propagation* (NAP) para obter mais anota33es de MSs empregando um algoritmo que estende o acesso de base de dados espectrais experimentais e te33ricos al33m do pr33prio acesso a biblioteca GNPS. Nesse caso, foram inclu33dos o acesso 33s bases de dados de SUPNAT, CHEBI, DRUGBANK, FooDB e NPAtlas (PILON et al., 2019). Por fim, aplicou-se o m33todo MolNetEnhancer para visualiza33o de superclasses de MSs, entre eles os derivados arom33ticos e policet33deos, e avaliar a varia33o metab33lica para cada condi33o de cultivo de fungo (ERNST et al., 2019).

O segundo processamento foi realizado utilizando o MZmine com ajustes de detec33o de 33ons dos espectros de MS/MS no n33vel de *Noise* = 10^3 e faixa de reten33o de corrida analisada no m33todo HPLC-ESI-QTOF-MS entre 0-20 min. Posteriormente os valores de *m/z* foram listados e mapeados em cromatogramas de 33ons extra33dos (XIC). Por fim, foram anotadas todas as subst33ncias poss33veis pelo m33todo online que permite o acesso a base de dados da plataforma de *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) nos modos ESI-(+) e ESI-(-). Dentre todas as anota33es, foram considerados e tabelados os todos os policet33deos arom33ticos com base na literatura para discuss33o dos resultados sobre din33mica metab33lica do fungo.

3.5.3. Teor de 33cido orsel33nico e otimiza33o de cultivo f33ngico

Os teores de 33cido orsel33nico dos extratos de *F. oxysporum* foram avaliados como fator resposta nesse estudo de planejamento CCR. Foram avaliando os coeficientes de determina33o (r^2) dos modelos matem33ticos do planejamento CCR que melhor represente os efeitos das vari33veis X1 e X2 com os resultados experimentais, foi admitido $r^2 \geq 0,5$ que 33 considerado como correla33o suficientemente aceit33vel para explicar os diferentes experimentos biol33gicos de cultivo e a complexidade metab33lica envolvida na bioss33ntese de MSs. Nesse contexto, a 33rea e a superf33cie de resposta,

dados estatísticos e o diagrama de Pareto foram avaliados utilizando o software Statística 14.0.

Estabeleceu-se o intervalo de confiança de 95% para todas as análises dos dados. Dessa maneira, os efeitos das variáveis foram padronizados para cada variável de entrada (tempo e temperatura) e a interação entre essas variáveis foi determinada pela equação (1) e o diagrama de paretos.

$$t_{cal} = \frac{\theta}{EP(\theta)} \quad (1)$$

Onde: t_{cal} : efeitos padronizados, θ : valores dos efeitos, e $EP(\theta)$: o erro padrão

A condição otimizada de crescimento do *F. oxysporum* foi definida utilizando a equação 2 e avaliação do gráfico de desejabilidade para cada variável individual X1 e X2 pelo software Statística 14.0 que define a média geométrica de desejabilidade. Nesse caso, o parâmetro de desejabilidade foi estabelecido como a maximização do teor de ácido orselínico.

$$D = \sqrt[m]{d_1 d_2 \dots d_m} \quad (2)$$

Onde: D : desejabilidade individual, m : número de parâmetros analisados.

Por fim, foi cultivado o *F. oxysporum* na condição otimizada de tempo e temperatura, em triplicata, e avaliado novamente o teor de ácido orselínico pelo método de quantificação em HPLC-DAD. O teor de ácido orselínico foi calculado pela razão massa de ácido orselínico determinada pela massa de extrato utilizado (m/m) em escala percentual (%).

3.6. Método HPLC-DAD para quantificação de ácido orselínico

A quantificação de ácido orselínico nas amostras do estudo de planejamento CCR foi realizada a partir do desenvolvimento de método HPLC-DAD comparativo com padrão primário, nesse caso o padrão de ácido orselínico da Sigma-Aldrich®. Para o desenvolvimento de método foi empregado o sistema cromatográfico Shimadzu (Kyoto, Japão), modelo de proeminência, configurado com bombas LC-20AT, desgaseificador

DGU-20A3, amostra SIL-20A alto, módulo detector SPD-M20A, um forno de coluna CTO-20A e um controlador CBM-20A.

O método proposto foi realizado no modo reverso tendo como fase estacionária a coluna C18, modelo Luna® 5µm C18(2) 100 Å, Phenomenex (Cheshire, UK) com 150 mm X 4,6 mm. O modo de eluição foi realizado de forma gradiente, sendo as fases móveis: A (0,1% de ácido fórmico em H₂O) e B (0,1% de ácido fórmico em ACN). A separação por modo gradiente foi configurado como: 20-23% B (10 min), 23-100% B (2 min), 100% B (4 min).

As amostras foram preparadas de forma semelhante aos métodos HPLC-ESI-QTOF-MS e UPLC-ESI-QTOF-MS, empregados anteriormente (Tópicos 3.4.1 e 3.4.2). Todas as análises foram realizadas em triplicata, em 254 nm, no fluxo de 1,0 mL. min⁻¹ e 5-10 µL volume de injeção de amostra dependendo do efeito de matriz de extratos.

Por fim, para validação quantitativa neste estudo, foi proposto a avaliação das amostras de extratos comparativamente com padrão de ácido orselínico a linearidade, precisão, efeito da matriz, fator de recuperação e estabilidade.

3.6.1. Curva de calibração, linearidade, limites de detecção e de quantificação

A curva de calibração foi obtida empregando 7 níveis de concentração, em triplicata, na faixa de trabalho de 10⁻⁷ a 10⁻³ mg.mL⁻¹, obtido pelo método de regressão linear de mínimos quadrados dos valores das integrais. Além disso, essa faixa de trabalho foi obtida em 2 níveis de volume de injeções, 5 e 10 µL, obtendo assim duas curvas de calibração, incluindo os valores das inclinações (b), dos interceptos (a) e dos coeficientes de determinação (r²).

Por fim, os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) foram obtidos conforme as equações (3) e (4). S_{Da} é o desvio padrão da interceptação y e b a inclinação das equações de regressão, respectivamente (VASILEIADOU; KARAPANAGIOTIS; ZOTOU, 2021).

$$LD = 3x \frac{SDa}{b} \quad (3)$$

$$LQ = 10x \frac{SDa}{b} \quad (4)$$

Onde: S_{Da} é o desvio padrão da interceptação y e (b) a inclinação das equações de regressão, respectivamente.

3.6.2. Precisão, efeito de matriz e fator de recuperação

A precisão do método da determinação de teor de ácido orselínico foi observada pela variação do volume de injeção em três níveis (1 μL , 5 μL e 10 μL) e pela variação de concentração, também em três níveis (0,1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) da melhor injeção (melhor visualização) do preparo de solução de extrato.

Além disso, foi realizada a fortificação de solução padrão de ácido orselínico a 85% com 15% de extrato v/v para a avaliação da precisão e a exatidão da matriz de amostra em relação ao fator de recuperação. O fator de recuperação foi calculado pela razão percentual da concentração inicial (antes da fortificação) pela concentração final subtraindo a quantidade de ácido orselínico adicionada depois da fortificação.

Nesse caso, o objetivo foi avaliar se a adição de pequenos volumes de extratos em dois níveis de concentração poderia afetar a robustez do método HPLC-DAD considerando o efeito de matriz no momento de preparo de amostra para determinação de teor de ácido orselínico. As análises foram feitas em triplicatas, considerando volume fixo de 1 mL da solução total e concentração de ácido orselínico de $10^{-5} \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (VASILEIADOU; KARAPANAGIOTIS; ZOTOU, 2021).

3.6.3. Estabilidade de extrato

Devido a complexidade dos extratos de fungos, o que é esperado, avaliou-se também a estabilidade da solução de extrato em relação ao tempo de repouso após o preparo nos intervalos de 0, 12 e 24 horas. Nesse caso, avaliou-se a partir da mesma amostra preparada, a quantificação do ácido orselínico, em três replicatas na condição de 25°C e isento de luz.

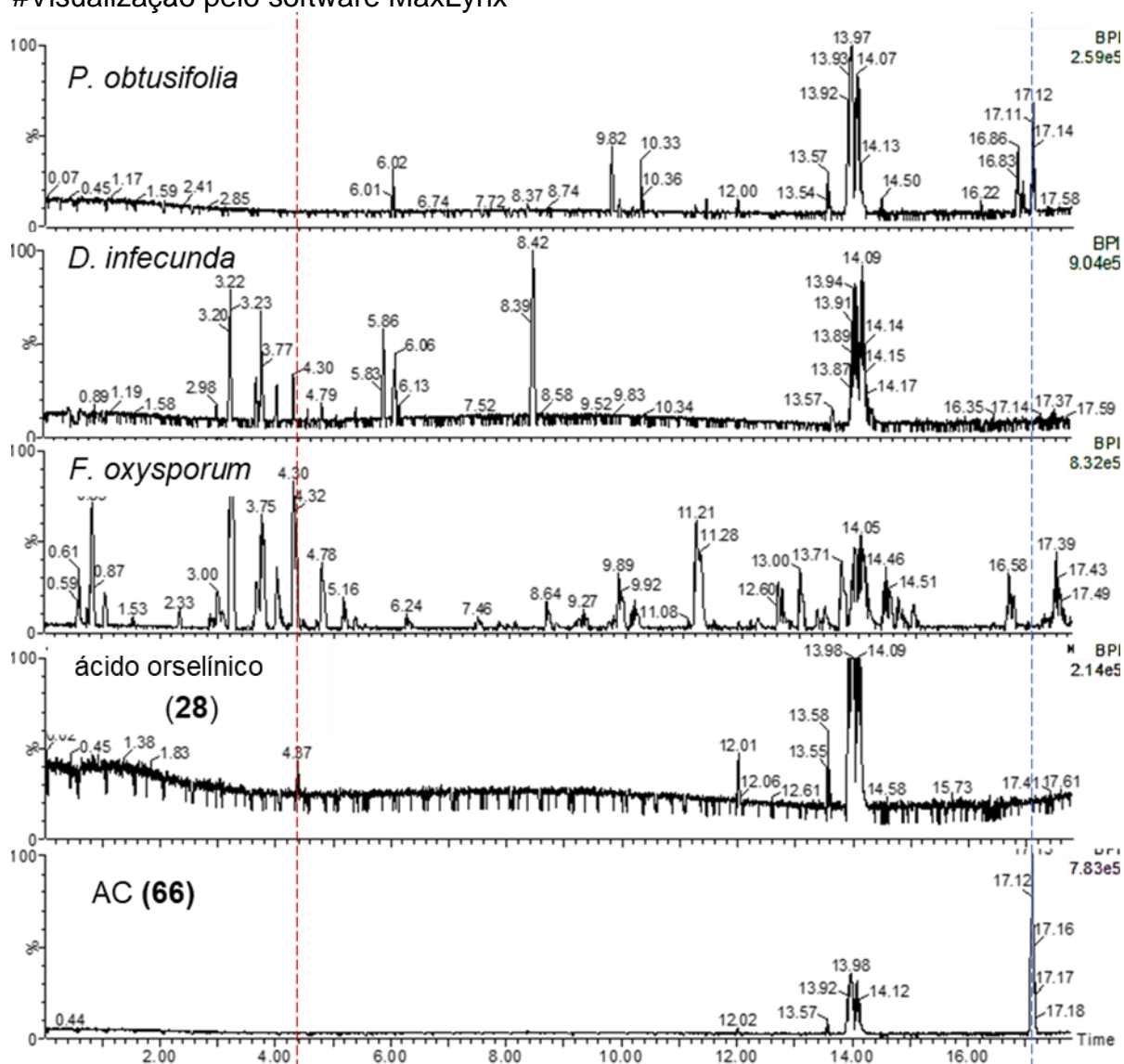
4. Resultados e discussões

4.1. Avaliação do perfis metabolômicos

4.1.1. Análise comparativa dos extratos por UPLC-ESI-QTOF-MS

Os extratos brutos de *P. obtusifolia*, *D. infecunda* e *F. oxysporum* foram analisados previamente por UPLC-ESI-QTOF-MS a fim de comparar os cromatogramas de picos base (BPC) nos modos ESI(+) e ESI(-) com os padrões de ácido orselínico (**28**) e ácido cromano (AC) (**66**) (Figuras 15 e 16).

Figura 15 - Perfis BPCs no modo ESI(+) dos extratos brutos avaliados de *P. obtusifolia*, *D. infecunda* e *F. oxysporum* e dos padrões de ácido orselínico e AC. #Visualização pelo software MaxLynx

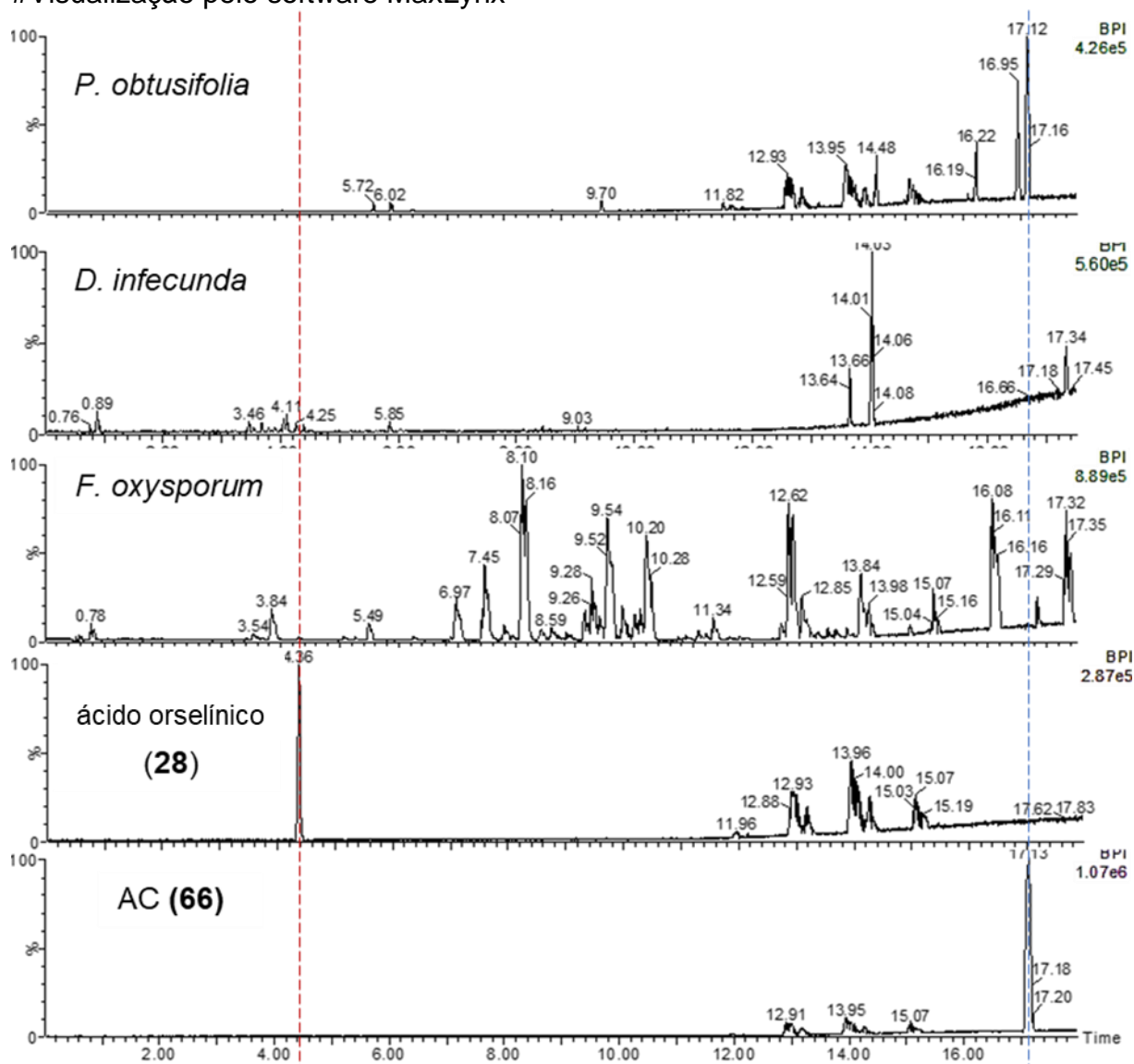


Fonte: Próprio autor.

Em ambos os modos ESI, os tempos de retenção dos padrões **28** e **66** foram 4,37 min e 17,12 min. Dentre os extratos avaliados, nenhum dos extratos de fungos apresentaram a presença de **28** e **66**. Apesar disso, entre os perfis no modo ESI avaliados, apenas no extrato de *F. oxysporum* apresentou uma banda cromatográfica com tempo de retenção próxima de 4,32 min no modo ESI(+), mas ainda inconclusivo por não ser possível adquirir os espectros de MS/MS.

Figura 16 - Perfis BPCs no modo ESI(-) dos extratos brutos avaliados de *P. obtusifolia*, *D. infecunda* e *F. oxysporum* e dos padrões de ácido orselínico e AC.

#Visualização pelo software MaxLynx



Fonte: Próprio autor.

Por outro lado, nessa avaliação, os extratos analisados apresentaram diferentes bandas cromatográficas desconhecidas que podem ser investigadas por ferramentas de análise dos perfis metabolômicos a partir de processamento de dados de MS nos modos ESI-(+) e ESI(-).

Nesse sentido, estratégias de análises por UPLC-ESI-QTOF-MS foram propostas considerando a possibilidade da concentração de ácido orselínico (**28**) dos extratos brutos de *P. obtusifolia*, *D. infecunda* e *F. oxysporum* estarem em quantidades insuficientes para aquisição de espectros de MS/MS.

4.1.2. Aquisição de dados de MS e de MS/MS nos modos DDA e MS^E

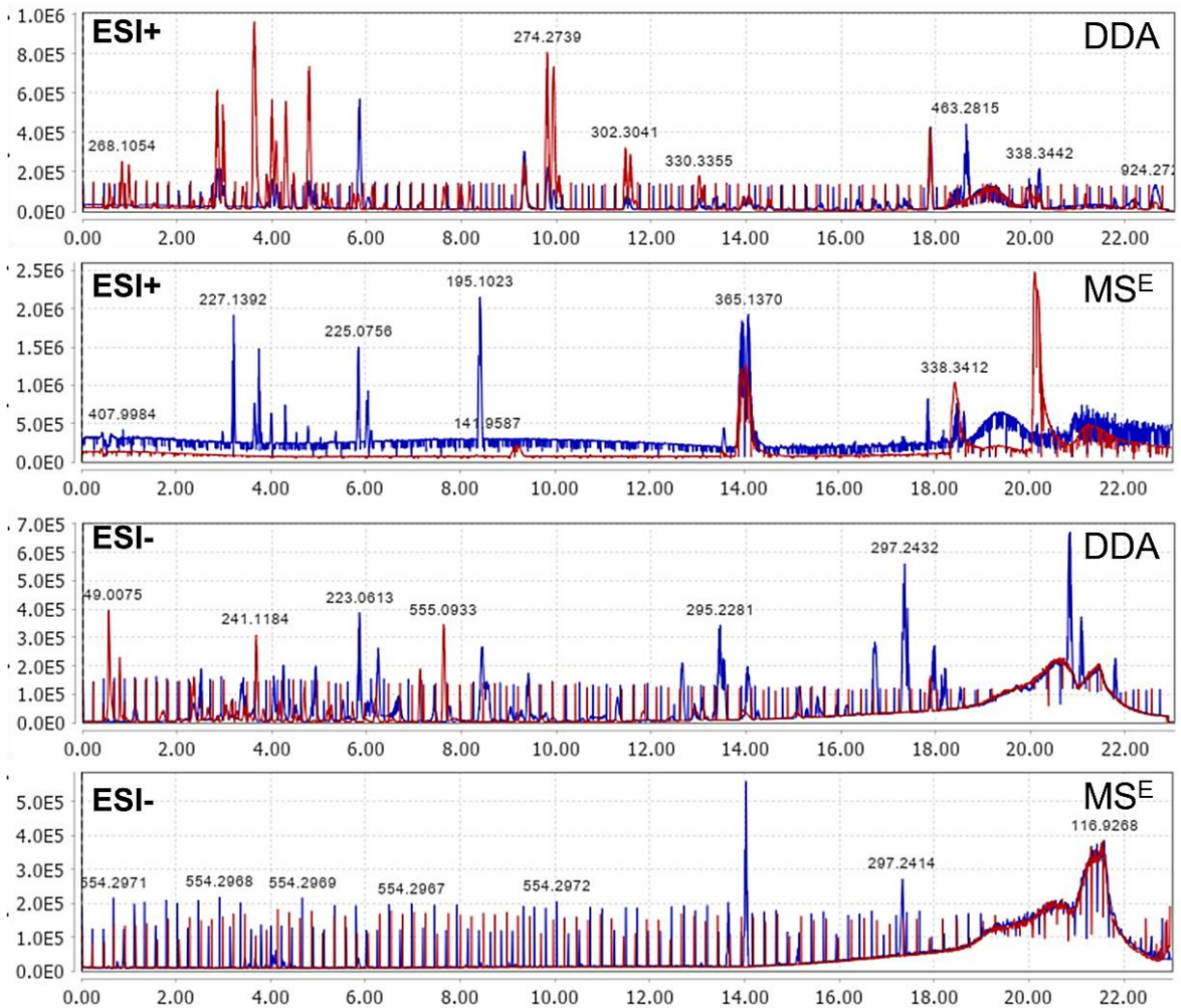
Dando continuidade as análises para detecção do ácido orselínico nos extratos de fungos, foram realizadas aquisição de dados dependentes (DDA) e de dados independente (DIA) do tipo MS^E por UPLC-ESI-QTOF-MS com o intuito de obter mais informações de espectros de MS e de MS/MS. Nesse caso, a aquisição DDA refere-se a obtenção de espectros de MS/MS a partir de íons “isolados” do espectro de MS (*full scan*), enquanto que no modo MS^E corresponde a aquisição de dados DIA que se refere a obtenção de espectros de MS e de MS/MS a partir de todos os íons detectados, ou seja “não isolados” (VIEIRA; CORTELO; CASTRO-GAMBOA, 2020).

Como resultado, foram obtidos os perfis BPCs dos extratos dos fungos de *D. infecunda* (Figura 17) e de *F. oxysporum* (Figura 18). Os perfis cromatográficos das duas espécies de fungo (em azul) foram sobrepostos com os perfis dos extratos do meio de cultivo BDA (em vermelho).

A análise mostrou um maior número de bandas cromatográficas nos extratos de *D. infecunda* e de *F. oxysporum* nos modos MS^E quando comparados com o modo DDA. No entanto, o extrato de *F. oxysporum* demonstrou possuir maior diversidade de MSs em ambos os modos de aquisição, DDA e MS^E.

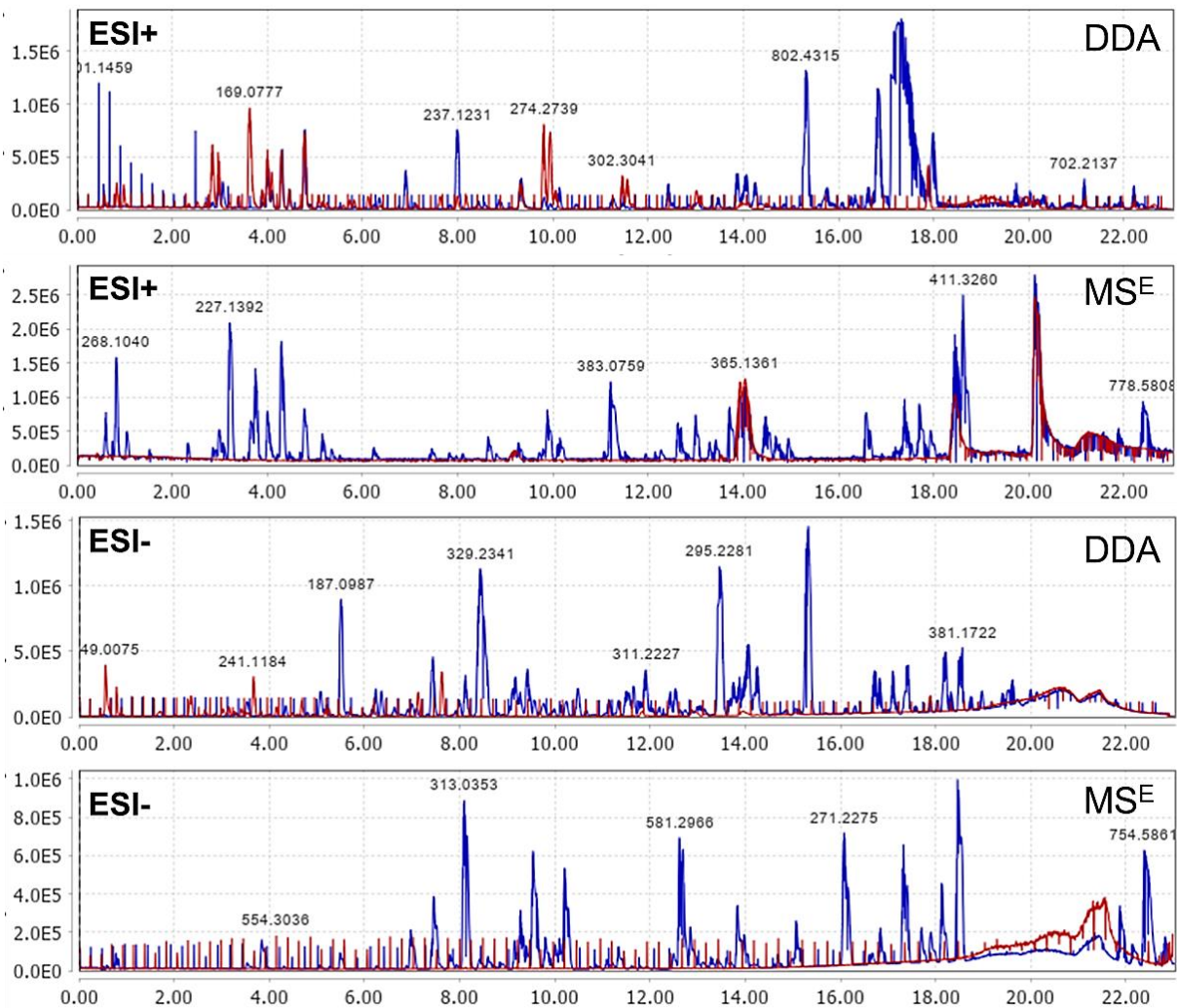
Figura 17 - Perfis BPCs nos modos DDA e MS^E dos extratos *D. infecunda* (em azul) e do branco (vermelho) adquiridos por ESI(-) e ESI(+).

#Visualização pelo software MZmine2.



Fonte: Próprio autor.

Figura 18 - Perfis BPCs nos modos DDA e MS^E dos extratos *F. oxysporum* (em azul) e do branco (vermelho) adquiridos por ESI(-) e ESI(+).
#Visualização pelo software MZmine.

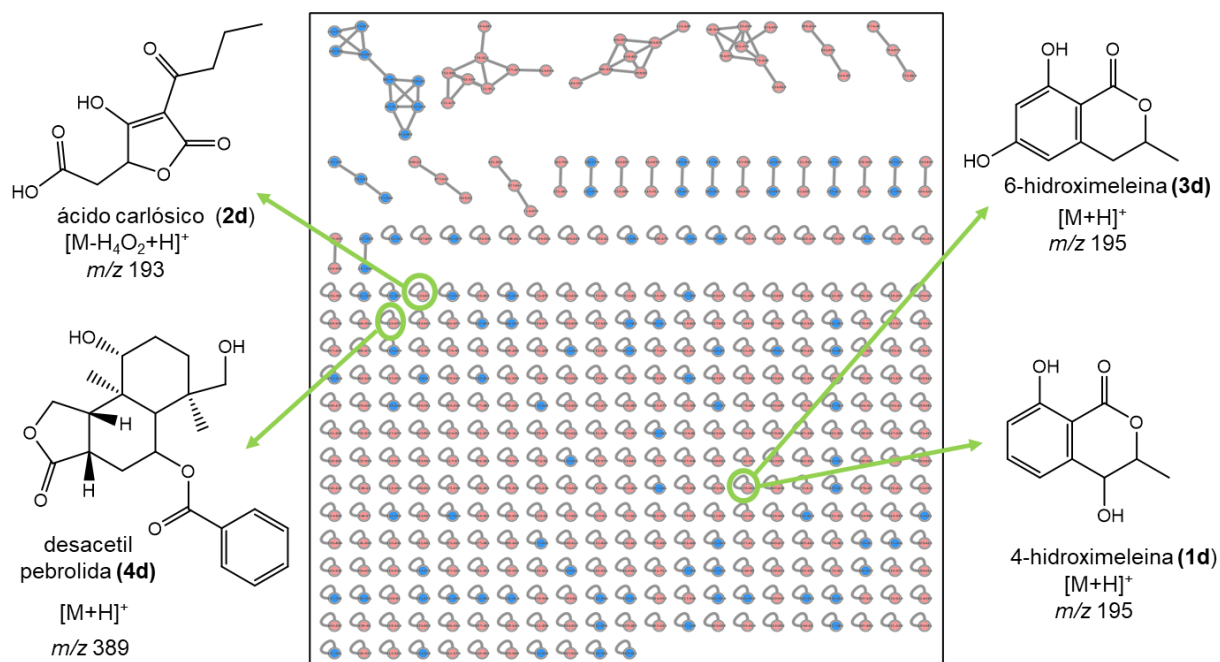


Fonte: Próprio autor.

4.1.3. Redes moleculares e processamento de dados GNPS

Os dados de MS e de MS/MS (adquiridos no modo DDA) foram processados na plataforma GNPS para obtenção das redes moleculares de *D. infecunda* e de *F. oxysporum* (Figuras 8 e 9). Em ambas redes ocorreram formação de pontos (*nodos*) interligados denominadas de *clusters* que representam as anotações dos espectros experimentais que compartilham padrões espectrais similares entre si ($\text{coseno} \geq 0.7$). Paralelo a isso, os *clusters* foram pareados com os espectros disponíveis na biblioteca de dados espectrais de MS e de MS/MS (CHEPKIRUI; STADLER, 2017; MÅNSSON, 2011; NIELSEN; SMEDSGAARD, 2003; WEI; WU, 2020).

Figura 19 - Redes de interações moleculares de *D. infecunda* representando os clusters formados no modo positivo (vermelho), no modo negativo (azul) e as substâncias identificadas.



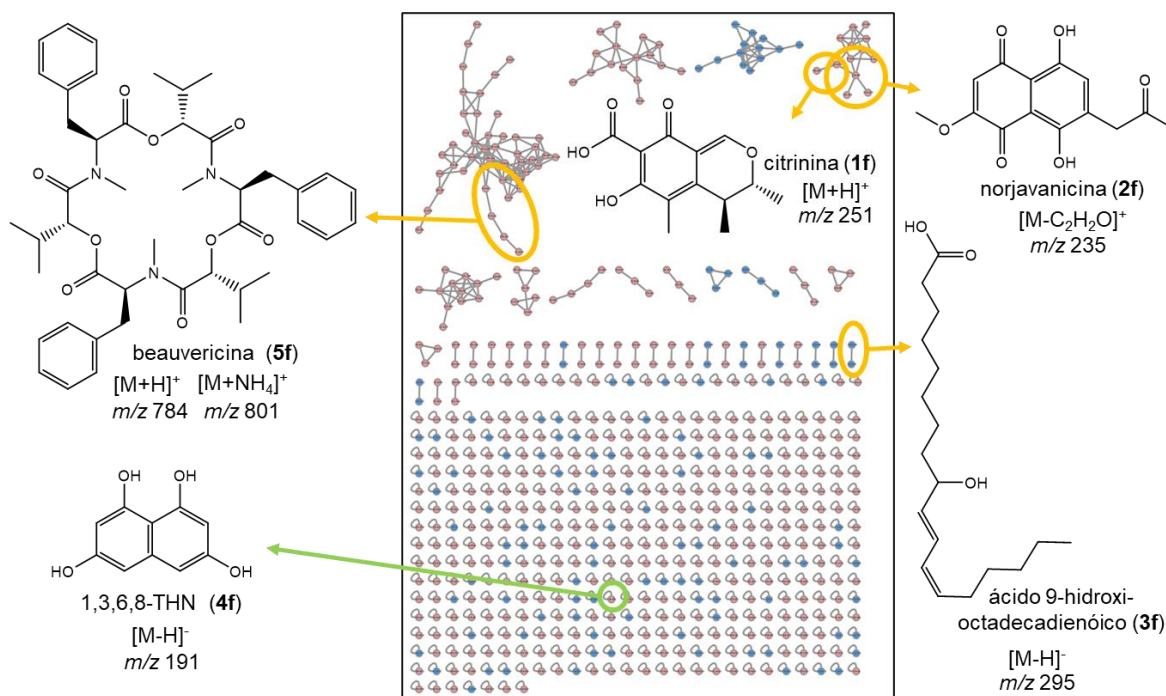
Fonte: Próprio autor

A rede molecular de *D. infecunda* apresentou menor correlação entre os *clusters* gerados (Figura 19), comparado com a rede molecular de *F. oxysporum* (Figura 20), corroborando o perfil metabólico identificado pela análise por UPLC-ESI-QTOF-MS (Figura 17 do Tópico 4.1.2, pag. 62).

De toda forma, foi possível anotar algumas substâncias, tais como o ácido carlósico (**2d**), desacetil pebrolida (**4d**) e isômeros estruturais de hidroximeleina (**1d**) e (**3d**) (Figura 19 e Tabela 2). De acordo com a literatura, esses MSs anotados são oriundos das vias dos isoprenóides e dos policetídeos que são comuns em espécies do gênero *Diaporthe* (CHEPKIRUI; STADLER, 2017). Além disso, as isocoumarinas (**1d**) e (**3d**) anotadas são conhecidas por serem provenientes de vias PKSs do tipo I não redutase (NR-PKS). (KAHLERT et al., 2021).

Na análise da rede molecular de *F. oxysporum* foi possível anotar vários *nodos* como espectros similares ou idênticos de beauvericina (**5f**). Outrossim, o ácido 9-hidroxi-octadecanóico (**3f**) e os policetídeos aromáticos 1,3,6,8-THN (**4f**), citrinina (**1f**) e norjavanicina (**2f**) foram também anotados (Figura 20 e Tabela 2). Dentre esses MSs anotados, os policetídeos aromáticos mostram PKSs com arquiteturas enzimáticas similares das PKS envolvidas na via biossintética do ácido orselínico (AAMIR et al., 2018; GRIFFITHS et al., 2018; HANSEN et al., 2015; KAHLERT et al., 2021; LEBEAU et al., 2019; ZHANG et al., 2016)

Figura 20 - Redes de interações moleculares de *F. oxysporum* representando os clusters formados no modo positivo (vermelho), no modo negativo (azul) e as substâncias identificadas.



Fonte: Próprio autor

Tabela 2. Substâncias identificadas nas análises de redes moleculares, biblioteca GNPS e dados de massas já publicados dos metabolitos que mostram acúmulo nos gêneros *Diaporthe* e *Fusarium*.

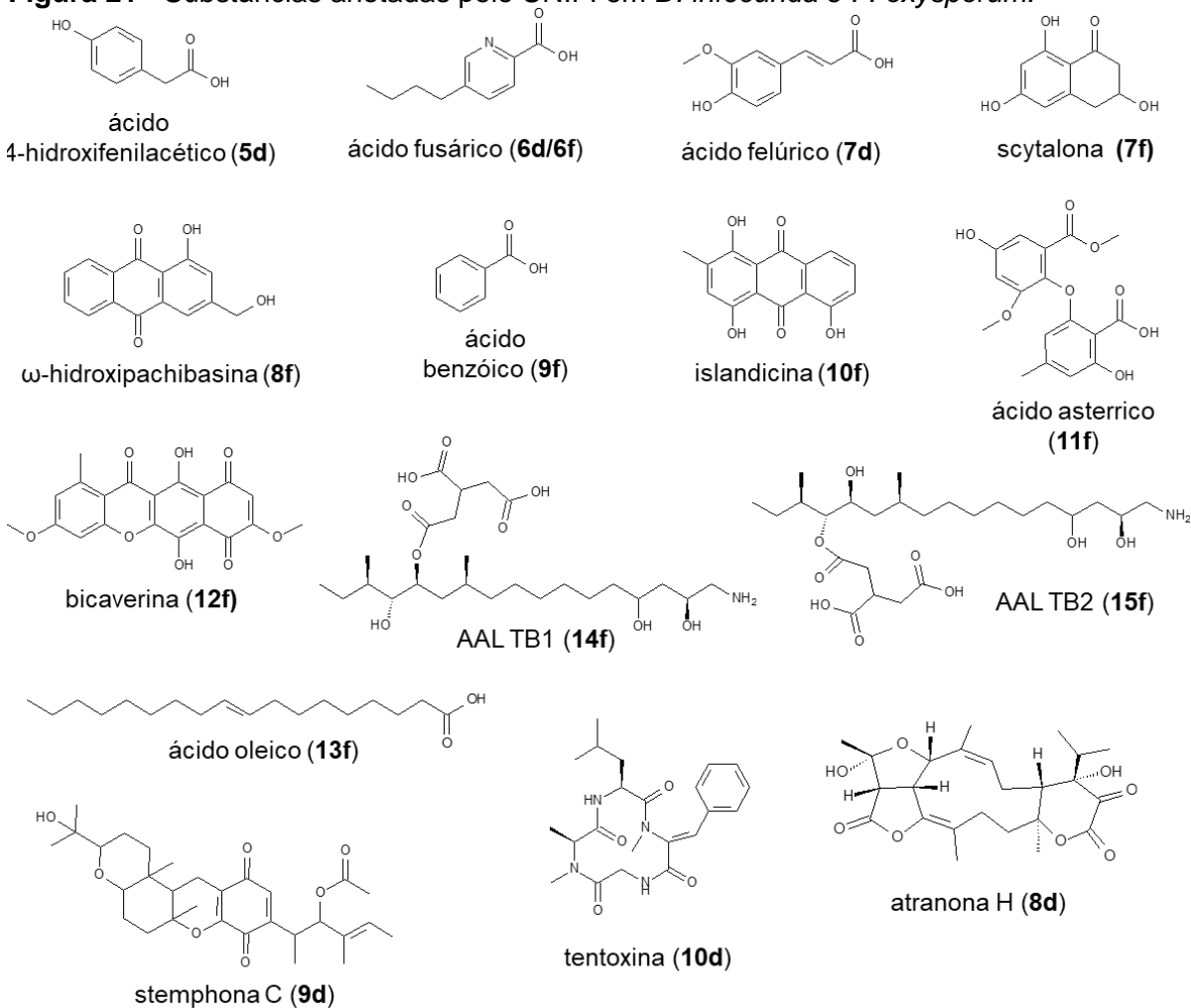
<i>D. infecunda</i>	<i>F. oxysporum</i>	substâncias	tempo de retenção (min)	fórmula molecular	Massa monoisotópica (Da)	Aduto detectado (m/z)	íons fragmentos detectados (m/z)	Referências consultadas
	X	citrinina (1f)	2,26	C ₁₃ H ₁₄ O ₅	250,0841	[M+H] ⁺ (251,0497)	251, 233	(NIELSEN; SMEDSGAARD, 2003)-(HLEBA et al., 2017)
X		4-hidroximeleina (1d)	2,48	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,05791	[M+H] ⁺ (195,0617)	195	(NIELSEN; SMEDSGAARD, 2003; OPUNTIA et al., [s.d.])
X		ácido carlósico (2d)	3,45	C ₁₀ H ₁₂ O ₆	228,0634	[M-H ₄ O ₂ +H] ⁺ (193,0702)	243, 211, 193,123	(MÅNSSON, 2011; NIELSEN; SMEDSGAARD, 2003)
X		6-hidroximeleina (3d)	3,61	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,05791	[M+H] ⁺ (195,0617)	195	(NIELSEN; SMEDSGAARD, 2003; OPUNTIA et al., [s.d.])
	X	norjavanicina (2f)	4,88	C ₁₄ H ₁₂ O ₆	276,0634	[M-C ₂ H ₂ O] ⁺ (235,0579)	318, 235, 277	(NIELSEN; SMEDSGAARD, 2003)-(LAGASHETTI et al., 2019)
X		desacetilpebrolida (4d)	6,52	C ₂₂ H ₂₈ O ₆	388,1886	[M+H] ⁺ (389,1732)	308, 267, 249, 389, 406	(NIELSEN; SMEDSGAARD, 2003)
	X	ácido 9-hidroxiocetadecadecanoico (3f)	6,59	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	296,2355	[M-H] ⁻ (295,155)	295	(MÅNSSON, 2011)-(SONG et al., 2016)
	X	1,3,6,8-THN (4f)	7,01	C ₁₀ H ₈ O ₄	192,0422	[M-H] ⁻ (191,033)	191	(AAMIR et al., 2018)-(GRIFFITHS et al., 2018)
	X	beauvericina (5f)	17,10	C ₄₅ H ₅₇ N ₃ O ₉	783,4095	[M+H] ⁺ (784,4182) [M+NH ₄] ⁺ (801,4119)	806, 801, 784	(NIELSEN; SMEDSGAARD, 2003; ZHANG et al., 2016)

Obs.: As estruturas químicas das substâncias identificadas pela análise de redes moleculares estão representadas na figuras 19 e 20.

4.1.4. Anotações de MSs pelo UNIFI

O sistema de anotação do UNIFI gerou propostas de íons fragmentos de diversas classes de substâncias após a avaliação dos extratos de *D. infecunda* e *F. oxysporum* por UPLC-ESI-QTOF-MS, no modo MS^E, tais como terpenos, ácidos graxos, lactonas, lactamas e policetídeos (Figura 21 e Tabela 3). Dentre eles, destacam-se os policetídeos aromáticos: bicaverina (**12f**), islandicina (**10f**) e o ácido asterrico (**11f**), anotadas em *F. oxysporum*, que estão relacionadas com a via policetídica aromática.

Figura 21 - Substâncias anotadas pelo UNIFI em *D. infecunda* e *F. oxysporum*.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 3. Substâncias anotadas nos extratos avaliados de *D. infecunda* e de *F. oxysporum* pelo processamento do sistema UNIFI

<i>D. infecunda</i>	<i>F. oxysporum</i>	substâncias	tempo de retenção (min)	fórmula molecular	Massa monoisotópica (Da)	Aduto detectado (m/z)	íons fragmentos detectados (m/z)	Referências consultadas
X		ácido 4-hidroxifenilacético (5d)	2,51	C ₈ H ₈ O ₃	152,0473	[M+H] ⁺ (153,0540)	153;107; 148	(NIELSEN; SMEDSGAARD, 2003)
X	X	ácido fusárico (6d/6f)	4,01 4,06	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	179,0946	[M+H] ⁺ (180,1012)	180;152	(NIELSEN; SMEDSGAARD, 2003)
X		ácido felúrico (7d)	4,8	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,05791	[M+CH ₃ COO] ⁻ (253,0701)	253;177; 149	(MÅNSSON, 2011)
	X	scytalona (7f)	5,17	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,05791	[M+H] ⁺ (195,0646)	195; 177; 149	(NIELSEN; SMEDSGAARD, 2003)
	X	ω-hidroxipachibasina (8f)	6,36	C ₅ H ₁₀ O ₄	254,0579	[M-H] ⁻ (253,0506)	253; 224	(MÅNSSON, 2011)
	X	ácido benzóico (9f)	7,43	C ₇ H ₆ O ₂	122,0368	[M+CH ₃ COO] ⁻ (181,0501)	181; 167; 121	(MÅNSSON, 2011)
	X	islandicina (10f)	7,58	C ₅ H ₁₀ O ₅	270,0528	[M-H] ⁻ (269,044)	269	(BOURAS; STRELKOV, 2008; MÅNSSON, 2011)
X		atranona H (8d)	8,71	C ₂₄ H ₃₂ O ₈	448,2097	[M+H] ⁺ (449,2170)	449; 431; 387; 243	(NIELSEN; SMEDSGAARD, 2003)
	X	ácido asterrico (11f)	9,30	C ₁₇ H ₁₆ O ₈	348,08452	[M+Na] ⁺ (371,0755)	371	(NIELSEN; SMEDSGAARD, 2003)(BORUTA; BIZUKOJC, 2016)
	X	bicaverina (12f)	11,27	C ₂₀ H ₁₄ O ₈	382,0688	[M-H] ⁻ (381,0609)	381	(LEBEAU et al., 2019; MÅNSSON, 2011)
X		<i>stemphona</i> C (9d)	18,13	C ₃₀ H ₄₂ O ₇	514,2930	[M-H] ⁻ (513,2869)	513; 469	(MÅNSSON, 2011)
	X	ácido oleico (13f)	18,52	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282,2559	[M+HCOO] ⁻ (327,2539)	327; 281	(MÅNSSON, 2011)
	X	AAL TB1 e 2 (14f e 15f)	18,55 18,74	C ₂₅ H ₄₇ NO ₉	505,3250	[M+NH ₄] ⁺ (523,36)	523; 506	(NIELSEN; SMEDSGAARD, 2003)
X		tentoxina (10d)	19,97	C ₂₂ H ₃₀ N ₄ O ₄	386,2205	[M+Na] ⁺ (437,2125)	437; 415; 302; 199	(MÅNSSON, 2011; NIELSEN; SMEDSGAARD, 2003)

Obs.: As estruturas químicas estão representadas na figura 21 e informações sobre perfis e espectros de MS extraídos no Apêndice A (pag., 108 e 109).

4.1.5. Triagem dos fungos e a detecção de ácido orselínico

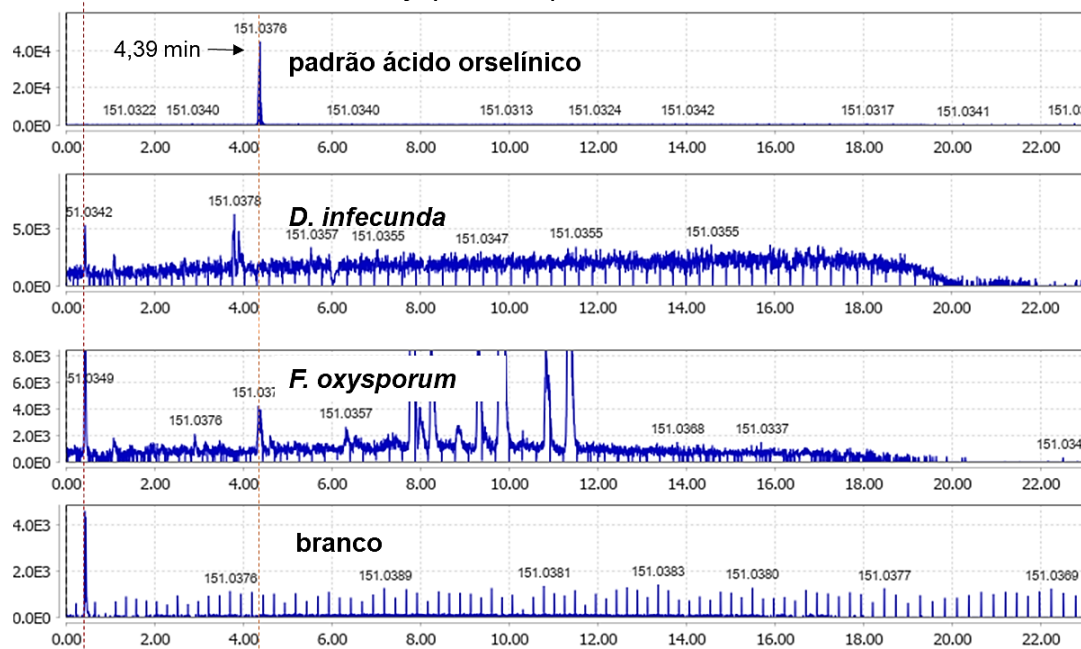
O ácido orselínico (**28**), assim como o orcinol (**28'**), descrevem a via policetílica mediada por PKSs que apresentem arquiteturas similares. As análises realizadas até então indicam que os policetídeos aromáticos anotados de *F. oxysporum* apresentam vias metabólicas mais aderentes a via do ácido orselínico (**28**), quando comparados com os metabólitos secundários anotados em *D. infecunda*.

Entre os policetídeos aromáticos anotados em *F. oxysporum*, destaca-se a bicaverina (**12f**), cuja via biossintética é mediada por PKSs, com arquitetura compatível a PKS16 e a PKS4 envolvidas na biossíntese do ácido orselínico (HANSEN et al., 2015). Nesse contexto, foram analisados os extratos de *D. Infecunda* e *F. oxysporum* por UPLC-QTOF-MS do tipo DDA com o intuito de detectar o ácido orselínico a partir da pré-concentração das amostras (conforme o método empregado no tópico 3.3.2) para posterior comparação com o padrão comercial de ácido orselínico (Sigma-Aldrich®).

Conforme a figura 22, os extratos pré-concentrados de *D. infecunda* e *F. oxysporum* foram avaliados nos modos ESI-(+) para rastreamento do sinal m/z 151 correspondente a espécie protonada $[M-H_2O+H]^+$ de ácido orselínico (**28**).

Dessa forma, apenas em *F. oxysporum* foi observada banda cromatográfica no mesmo tempo de retenção característico de padrão em 4,39 min. Além disso, foi possível observar que os valores de relação m/z das amostras do padrão (151,0376 Da) e do extrato de *F. oxysporum* (151,0373 Da) eram compatíveis. Assim, *F. oxysporum* foi selecionada para a continuidade do trabalho.

Figura 22 - Perfis cromatográficos do tipo DDA do íon extraído m/z 151 no modo ESI-(+) dos extratos de *D. infecunda*, *F. oxysporum* e padrão de ácido orselínico.



Fonte: Autoria própria.

4.2. Avaliação da dinâmica metabólica de *F. oxysporum*

F. oxysporum é sensível à variação do tempo (X1) e temperatura (X2) de crescimento fúngico. Visando avaliar os diferentes perfis de metabólitos os extratos obtidos selecionados foram aqueles obtidos no estudo de planejamento CCR do cultivo fúngico variando X1 e X2 (Conforme o planejamento descrito no tópico 3.5.1, pag. 53).

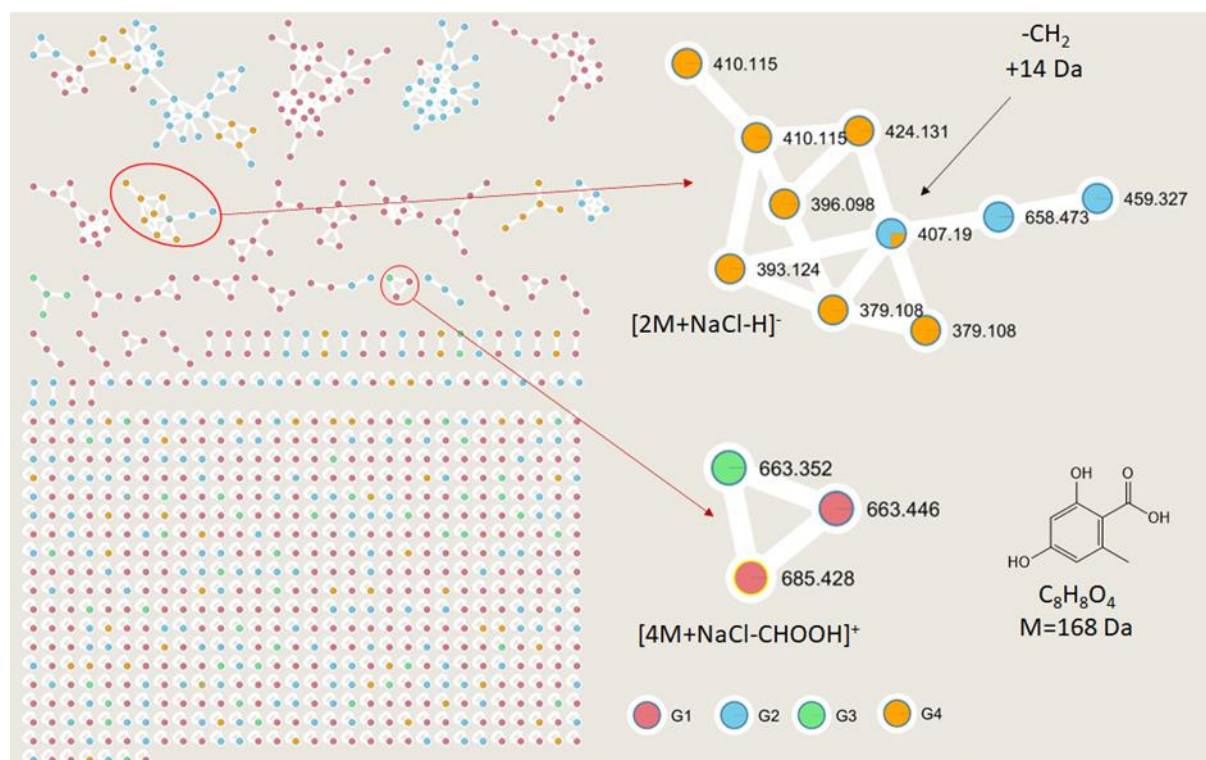
Os extratos obtidos em todas as condições foram analisados em grupos conforme a metodologia de obtenção de redes moleculares (Tópico 3.5.2) e comparados com o padrão do ácido orselínico. Nesse caso a obtenção de redes moleculares consistiu em obter clusters que apresentassem espectros de MS e de MS/MS com padrões de fragmentações idênticos ou similares ao ácido orselínico.

Conforme a figura 23, os nodos vermelhos e azuis foram gerados a partir do agrupamento dos espectros de MS do modo ESI-(+) categorizados no grupo G1 e espectros do modo ESI(-) no grupo G2. Os nodos verdes e amarelos foram gerados

a partir do agrupamento dos espectros de MS do modo ESI(+) categorizados no grupo G3 e espectros do modo ESI(-) no grupo G4.

O processamento na obtenção dessa rede molecular permitiu visualizar clusters que compartilham nodos azul com amarelo (G2-G4) indicando mesmos padrões espectrais de m/z 407 no modo ESI(-), enquanto os nodos vermelho e verde interligados compõem clusteres (G1-G3) com padrões espectrais similares mas com variações de massa exata. Conforme os valores de m/z apresentados nas redes moleculares e considerando a massa exata do padrão de ácido orselínico ($M=168$ Da) foram propostos alguns adutos prováveis para os valores de m/z 393 e m/z 685 como espécies ionizadas $[2M+NaCl-H]^-$ e $[4M+NaCl-CHOOH]^+$.

Figura 23 - Redes moleculares com anotação direcionada a detecção de policetídeos aromáticos similares. Clusters e nodos adquiridos a partir dos extratos de *F. oxysporum* (G1;G2) e padrão ácido orselínico (G3;G4). Os nodos vermelho e verde representam os grupos G1 e G3 com as anotações m/z no ESI(+) e os nodos azul e amarelo representam os grupos G2 e G4 no ESI(-).



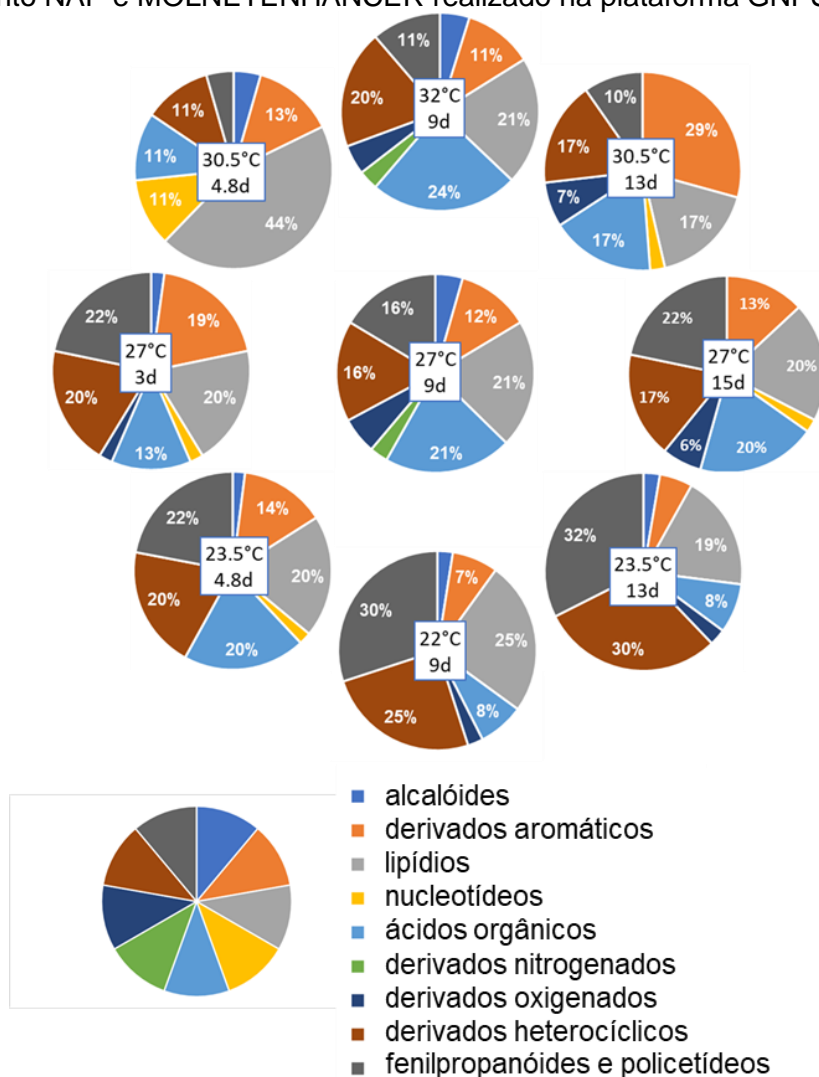
Fonte: Autoria própria.

Em suma, este processamento pela plataforma GNPS dos espectros de MS dos extratos de *F. oxysporum* demonstrou uma relação de similaridades com os espectros de MS do padrão ácido orselínico. Vale ressaltar que existem inúmeras

ferramentas de anotações de substâncias e contextualização “inteligente” de classes de MSs no estudo de perfil metabolômico (VIEIRA; CORTELO; CASTRO-GAMBOA, 2020; WANG et al., 2016).

Nesse sentido, os grupos G3 e G4 foram inibidos para a realização de processamento de dados de MS mais abrangente, disponíveis pela plataforma GNPS, para visualização de classes de MSs e de substâncias relacionadas com a dinâmica metabólica de *F. oxysporum* (descrito no tópico 3.5.2, p.52). Conforme a figura 24, foram anotados agrupamentos de alcalóides, derivados aromáticos, lipídios, nucleotídeos, ácidos orgânicos, derivados nitrogenados, oxigenados, heterocíclicos, fenilpropanóides e policetídeos.

Figura 24 - Representação em pizza de variação metabólica observada em porcentagem de superclasses de MSs para cada condição de cultivo de dias (d) e temperatura (°C). Processamento NAP e MOLNETENHANCER realizado na plataforma GNPS.



Fonte: Autoria própria.

Considerando que os MSs de *F. oxysporum* variaram significativamente em diferentes condições de temperatura e tempo de cultivo pode-se observar que as superclasses benzenóides e policetídeos estão relacionados de forma significativa com a via dos policetídeos aromáticos.

Dessa forma, para os benzenóides foi obtido a porcentagem mais alta (29%) na condição de cultura de 30,5°C em 13 dias e a porcentagem mais baixa (~5%), na condição de cultura de 23,5°C em 13 dias. Para a anotação de policetídeos, a maior porcentagem (32%) foi observada na condição de cultura a 23,5°C em 13 dias e a menor porcentagem (~4%), na condição de cultura a 30,5°C em 4,8 dias (equivalente a 4 dias, 19 horas e 12 min).

4.2.1. Anotação de policetídeos aromáticos empregando NAP e MolNethencencer

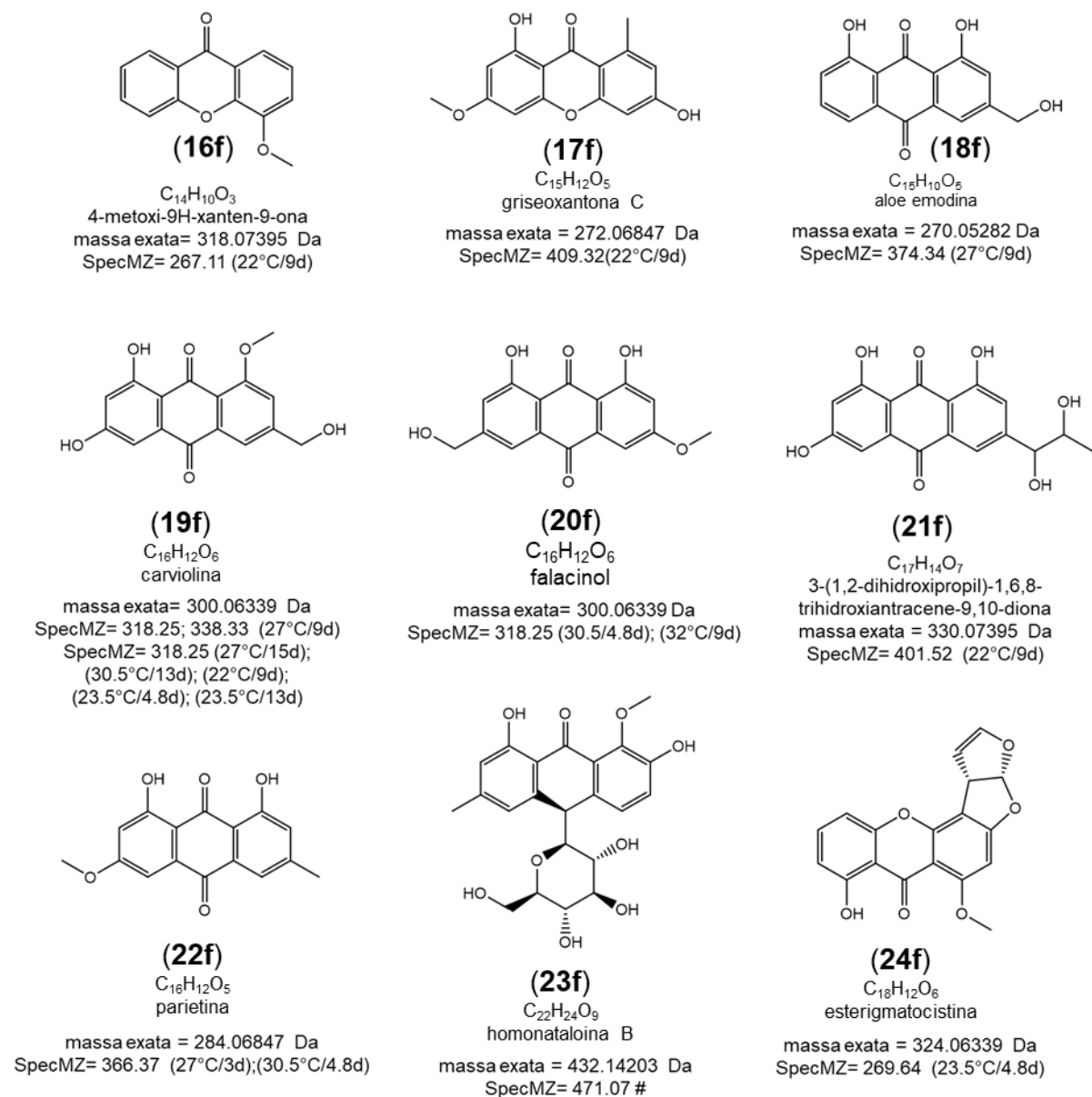
Os dados de MS no modo ESI(+) e ESI(-) obtidos no estudo de planejamento CCR de cultivo de *F. oxysporum*, como já mencionado anteriormente (Tópico 3.5.1.), foram avaliados comparativamente com o banco de dados experimentais de MS depositados no GNPS. Nesse caso, conforme as figuras 25-27, os policetídeos aromáticos **25f-34f** foram propostos de acordo com os dados de MS processados empregando o sistema de anotações NAP e MOLNETHENHANCE (*method in silico*) disponíveis pela plataforma GNPS que permite acessar várias bases de dados de MS de MS/MS (ERNST et al., 2019; VIEIRA; CORTELO; CASTRO-GAMBOA, 2020; WANG et al., 2016).

Nesse contexto, os dados espectrais do modo ESI(+) indicaram “*match*” (cosseno>0,7) entre os espectros MS/MS para os candidatos derivados de ácido orselínico: kioukasin E (**27f**) e 1-[2-hidroxi-4-(3-hidroxi-5-metilfenoxi)-6-metilfenil]-3-metilbutano-2,3-diol (**28f**). Essas anotações foram detectadas em extratos fúngicos cultivados nas condições de 27°C/3d e 23,5°C/13d (Figura 26).

Além das análises por UPLC-ESI-QTOF-MS e as anotações adquiridas (metodologia descrita no tópico 3.4.2), no método ortogonal HPLC-ESI-QTOF-MS foram adquiridos mais informações sobre espectros de MS a partir das análises dos extratos obtidos no planejamento experimental. Nesse sentido, mais ferramentas de anotações, tais como NAP e MolNEtEhance, permitiram obter resultados que

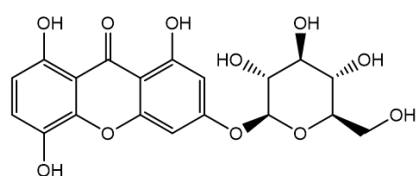
auxiliaram na investigação de dinâmica metabólica e das vias biosintéticas do ácido orselínico (BORUTA; BIZUKOJC, 2016; HARTUNG et al., 2014).

Figura 25 - Policetídeos aromáticos anotados pelo processamento de dados ESI-(+) sob diferentes condições de cultivo de temperatura(°C) e dias(d). Processamento NAP e MOLNETENHANCER realizado na plataforma GNPS.



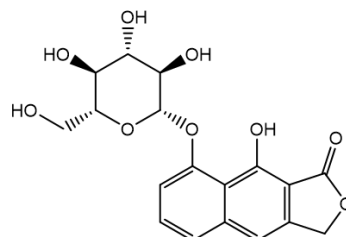
Fonte: Autoria própria.

Figura 26 - Policetídeos aromáticos anotados pelo processamento de dados ESI-(+) sob diferentes condições de cultivo de temperatura(°C) e dias(d).
Processamento NAP e MOLNETENHANCER realizado na plataforma GNPS.



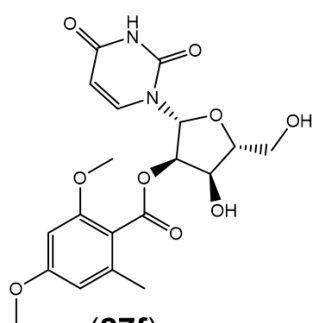
(25f)

$C_{19}H_{18}O_{11}$
1,5,8-trihidroxi-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-yl]oxixanten-9-one
massa exata = 422.08491 Da
SpecMZ= 431.13 (22°C/9d); (32°C/9d)



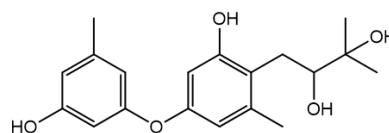
(26f)

$C_{18}H_{18}O_9$
4-hidroxi-5-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxi-1H-benzo[f][2]benzofuran-3-ona
massa exata = 378.09508 Da
SpecMZ= 455.18 # #



(27f)

$C_{22}H_{12}N_2O_9$
Kioukasin E
massa exata = 422.13253 Da
SpecMZ= 393.91 (23.5°C/13d)



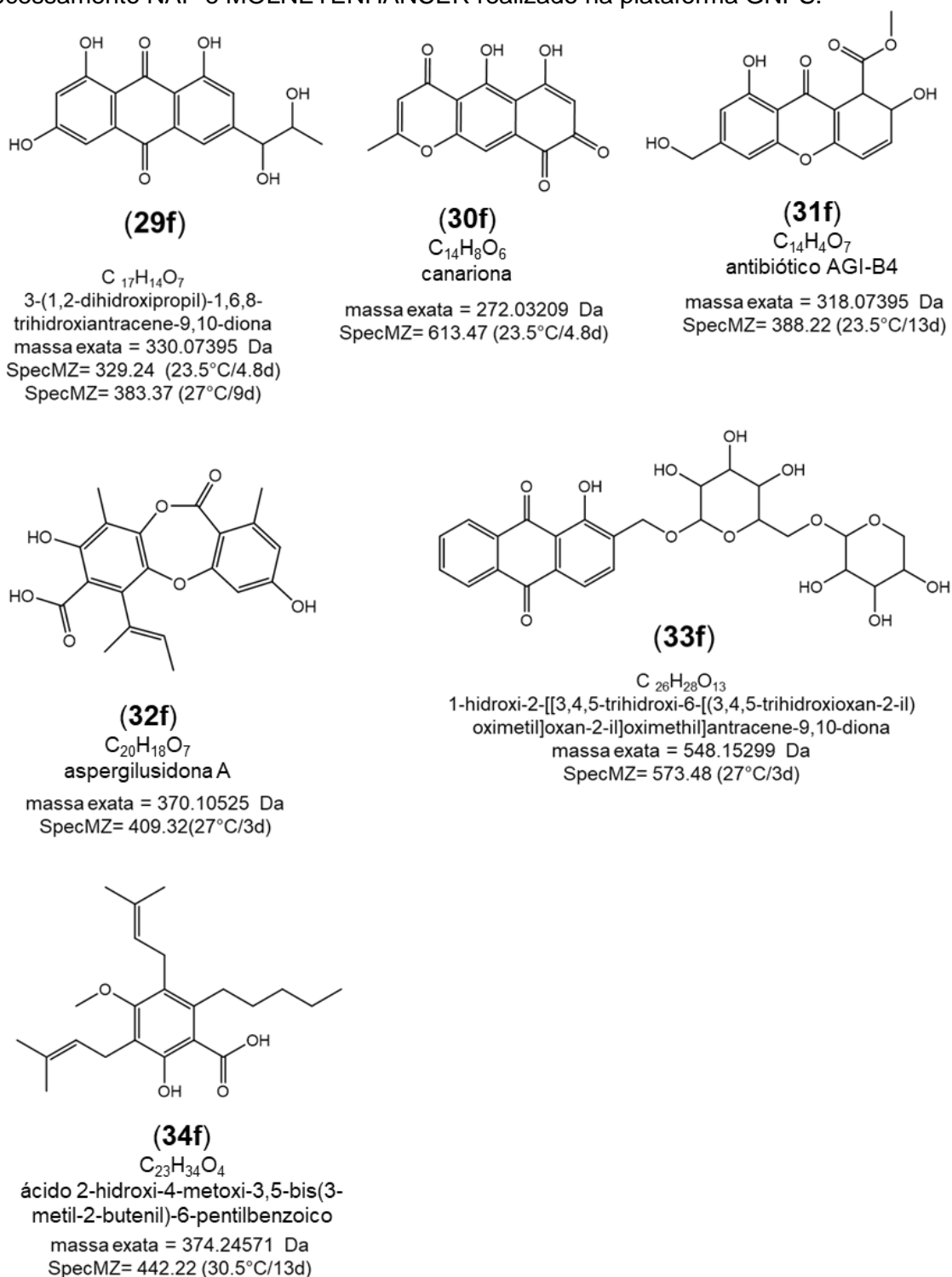
(28f)

$C_{19}H_{24}O_5$
1-[2-hidroxi-4-(3-hidroxi-5-metilfenoxi)-6-metilfenil]-3-metilbutane-2,3-diol
massa exata = 332.16237 Da
SpecMZ= 370.24 (27°C/3d)

Fonte: Aatoria própria.

No processamento de dados de MS no modo ESI(-), poucos policetídeos foram anotados por esse método *in silico* (Figura 27). Mesmo assim, alguns MSs da via de biossíntese de policetídeos aromáticos corroboram como policetídeos comuns do gênero *Fusarium*, tais como antraquinonas **28f-31f**. No entanto, a anotação aspergillusidona A (**32f**) não é comum para a espécie *F. oxysporum*, mas os seus padrões espectrais de MS foram detectados em extratos de cultivo na condição de 27°C/3d.

Figura 27 - Policetídeos aromáticos anotados pelo processamento de dados ESI(-) sob diferentes condições de cultivo de temperatura(°C) e dias(d)
Processamento NAP e MOLNETENHANCER realizado na plataforma GNPS.



Fonte: Autoria própria.

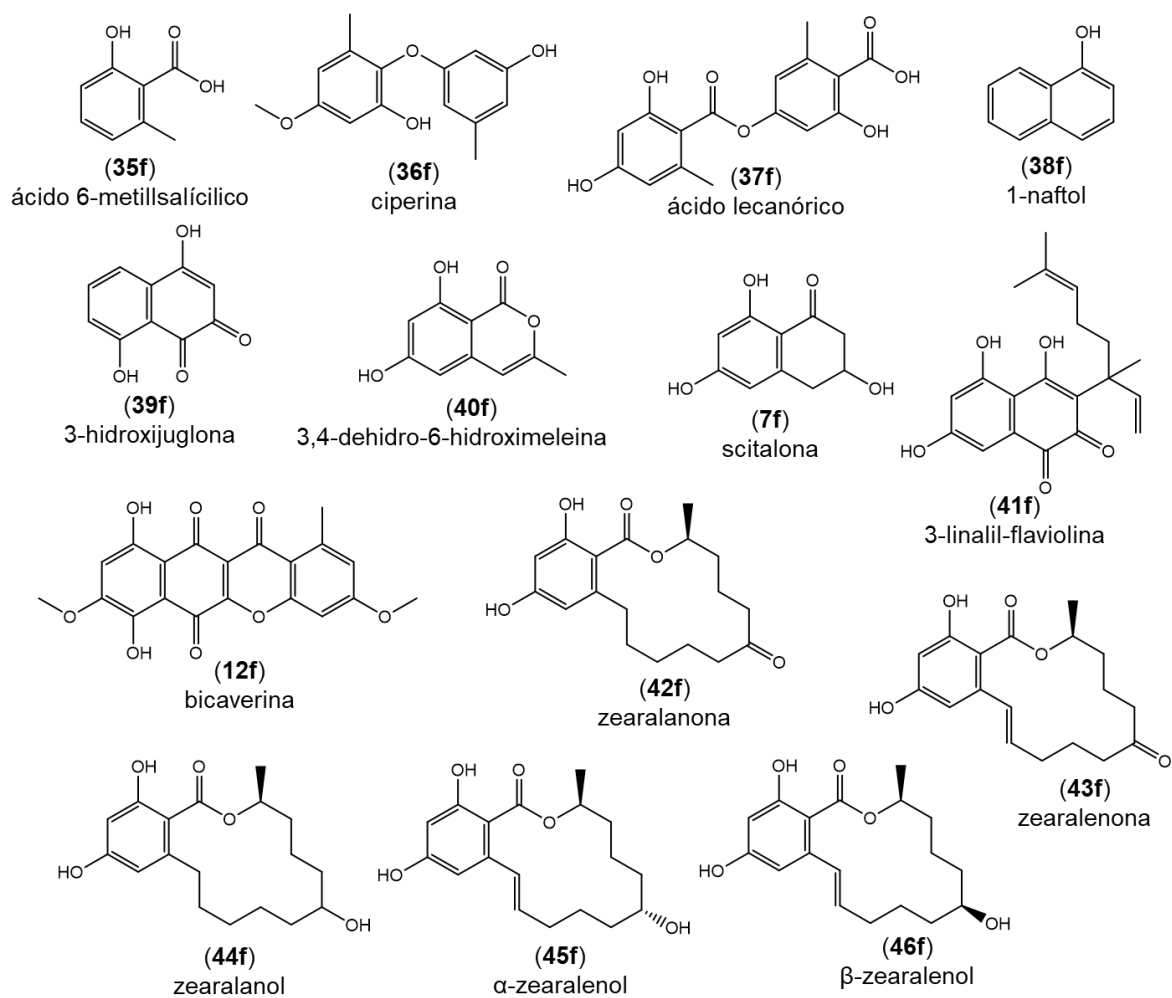
4.2.2. Anotação de policetídeos aromáticos pelo processamento MZmine2

O sistema de anotação pelo MZmine concede acesso ao banco de dados KEGG para a realização de anotações de espectros de MS e de MS/MS e resultou em anotações de diversas substâncias. Sendo assim, mais policetídeos aromáticos (**35f-46f**) foram anotados, conforme a figura 28 e tabela 4.

Na tabela 4, são representados os policetídeos anotados em diferentes condições de cultivo de *F. oxysporum*. Dentre essas anotações, destacam-se 6-metilsalicilato (**35f**), ciperina (**36f**) e ácido lecanórico (**37f**) anotados em diferentes de condição de cultivo. As substâncias **35f e 36f** estão presentes na maioria das condições de cultivo, enquanto que **37f** apenas em condições mais longas de cultivo e temperaturas elevadas.

De modo geral, os demais policetídeos aromáticos também variaram e poucos foram anotados na condição de cultivo de 22°C/9d. Esses resultados sugerem que com tempo longo de cultivo (>3d) ou temperaturas maiores (>22°C) os processos metabólicos de *F. oxysporum* tendem a acumular policetídeos aromáticos de maior massa molecular, tais como bicaverina (**12f**) e metabólitos da via de zearalanol (**42f-46f**). Esses policetídeos são comumente acumulados no gênero *Fusarium* (TRIASTUTI et al., 2021; WEI; WU, 2020).

Figura 28 - Policetídeos aromáticos anotados após processamento MZmine2 utilizando base de dados KEGG.



Fonte: Autoria própria

Tabela 4 - Anotações de poliketóides aromáticos obtidas pelo processamento MZmine2 de espectros MS/MS no modo ESI(-) e ESI(-) na avaliação dos extratos de planejamento CCR de *F. oxysporum*.

Anotações	Íon molecular	Íon Precursor ion (m/z)	Temperatura (°C) /dias (d)									RT (min)	
			22/9	23,5/4,8	23,5/13	27/3	27/9	27/15	30,5/4,8	30,5/13	32/9		
3-hidroxjuglona (39f)	[C ₁₀ H ₆ O ₄ +H] ⁺	191,034	0	2,8-2,9
ciperina (36f)	[[C ₁₅ H ₁₆ O ₄ +H] ⁺	261,112	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13,1-13,5
ácido lecanórico (37f)	[C ₁₆ H ₁₄ O ₇ +H] ⁺	319,080	0	0	0	0	10,8-16,3
ácido 6-metilsalicílico (35f)	[C ₈ H ₈ O ₃ -H] ⁻	151,040	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13,5-13,9
1-naftol (38f)	[C ₁₀ H ₈ O-H] ⁻	143,050	0	0	14,1-14,2
scitalona (7f)	[C ₁₀ H ₁₀ O ₄ +H] ⁺	195,065	0	0	0	14,1-15,7
β-zearalenol (46f)	[C ₁₈ H ₂₄ O ₅ +H] ⁺	321,169	0	0	0	0	0	0	14,4-14,6
bicaverina (12f)	[C ₂₀ H ₁₄ O ₈ +Na] ⁺	405,056	0	16,6-16,7
zearalenona (43f)	[C ₁₈ H ₂₂ O ₅ +H] ⁺	319,154	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16,9-19,2
zearalanol (44f)	[C ₁₈ H ₂₆ O ₅ +Na] ⁺	345,167	0	0	0	0	0	0	0	17,3-19,5
	[C ₁₈ H ₂₆ O ₅ -H] ⁻	321,172	0	0	0	0	
3-linalil-flaviolina (41f)	[C ₂₀ H ₂₂ O ₅ -H] ⁻	341,140	0	18,1-18,2
α-zearalenol (45f) ou zearalanone (46f)	[C ₁₈ H ₂₄ O ₅ +H] ⁺	321,169	0	0	0	0	0	19,1-19,9
	[C ₁₈ H ₂₄ O ₅ -H] ⁻	319,169	0	0	0	
3,4-dehidro-6-hidroimeleina (40f)	[C ₁₀ H ₈ O ₄ -H] ⁻	191,035	0	19,7-19,8

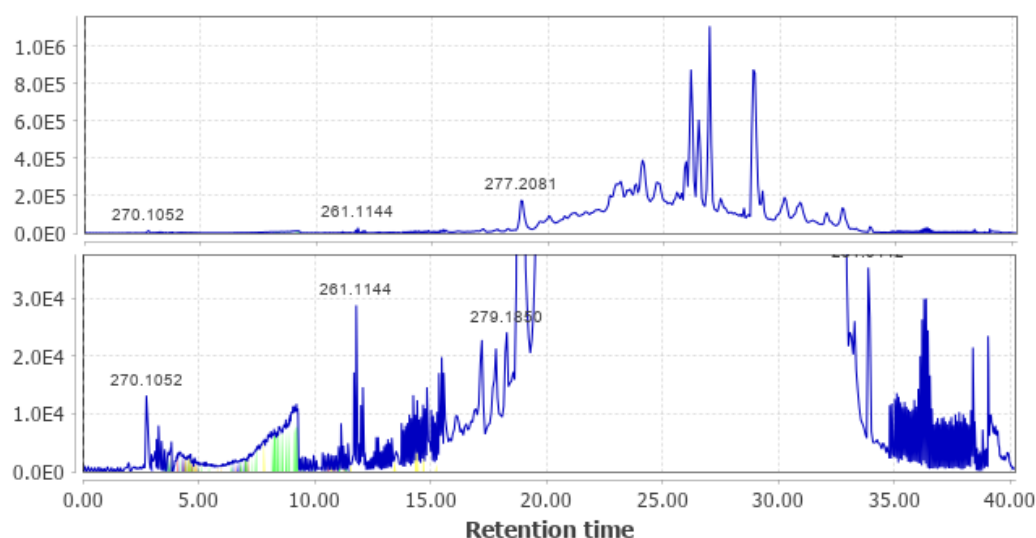
Obs.: A anotação scylatona foi observada também na avaliação do extrato de *F. oxysporum* por UPLC-ESI-QTOF-MS antes da realização do estudo de planejamento por CCR.

Dentre os policetídeos apresentados na figura 28 e na tabela 4, a anotação de scilatona (**7f**) foi observada novamente neste processamento, reforçando a detecção de metabólitos envolvidos com a biossíntese de policetídeos aromáticos. Essa anotação sugere a influência de PKS4 ou PKS16 que está diretamente relacionada com a via do ácido orselínico (**28**) e THN (**4f**) como intermediários da via de biossíntese da bicaverina (**12f**) (COX, 2007).

As anotações da ciperina (**36f**), ácido 6-metilsalicílico (**35f**) e ácido lecanórico (**37f**) reforçam ainda mais a possibilidade das PKSs serem das mesmas arquiteturas envolvendo a biossíntese de ácido orselínico (NEWMAN et al., 2014). Dentre essas anotações, é possível que existam derivados contendo essas estruturas *orto*-metilbenzóicos, pois é observado nos perfis cromatográficos extraídos (XIC) regiões com *m/z* 261 em várias condições de cultivo de *F. oxysporum*.

Nesse caso, as maiores detecções dos extratos avaliados foram para a ciperina (**36f**) no tempo de retenção de 13,1-13,5 min para a amostra de cultivo de 32°C em 9 dias, e para o ácido 6-metil-salicílico (**37f**) com faixa de detecção em 13,5-13,9 min para a amostra de cultivo de 22°C em 9 dias (Figuras 29 e 30).

Figura 29 - Perfil LC-MS (BPC/XIC) de Ciperina anotado (*m/z* 261) de 32°C/9d condição de cultivo no modo ESI-(+).
#Escala de intensidade aumentada do perfil LC-MS (Cromatograma inferior)

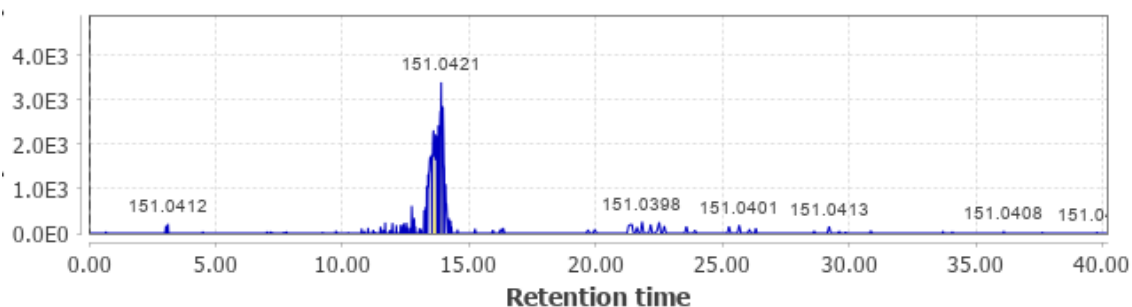


Fonte: Autoria própria

Vale ressaltar que esses policetídeos avaliados nos cromatogramas extraídos estão em quantidades de difícil ionização pela técnica eletrospray, pois os extratos de *F. oxysporum* compõem inúmeros outros metabólitos também ionizáveis, dentre elas os metabólitos nitrogenados no modo ESI-(+) e metabólitos lipídicos no modo ESI(-). No entanto, a anotação de **35f** foi observada de forma seletiva no perfil LC-MS na condição de 22°C/9d por m/z 151 e modo ESI(-) (Figura 30).

Esta condição de cultivo de *F. oxysporum* demonstrou maior seletividade, o que sugere que nessa condição de cultivo, esse fungo acumula policetídeos aromáticos que descrevem a mesma via metabólica do ácido orselínico (**28**) (Figura 30). No entanto, ainda não foi possível avaliar os espectros MS/MS de m/z 151, pois as quantidades ainda foram insuficientes para aquisição de espectros MS/MS.

Figura 30 - Perfil LC-MS (BPC/XIC) do ácido 6-metilsalicílico anotado (m/z 151) de 22°C/9d condição de cultivo no modo ESI(-).



Fonte: Autoria própria

Embora tenhamos uma noção da variabilidade metabólica em diferentes temperaturas e tempos de cultivo do fungo, foi necessário investigar como reduzir a complexidade dos componentes presentes nos extratos a fim de aumentar a detecção de ácido orselínico e conseqüentemente obter espectros MS/MS.

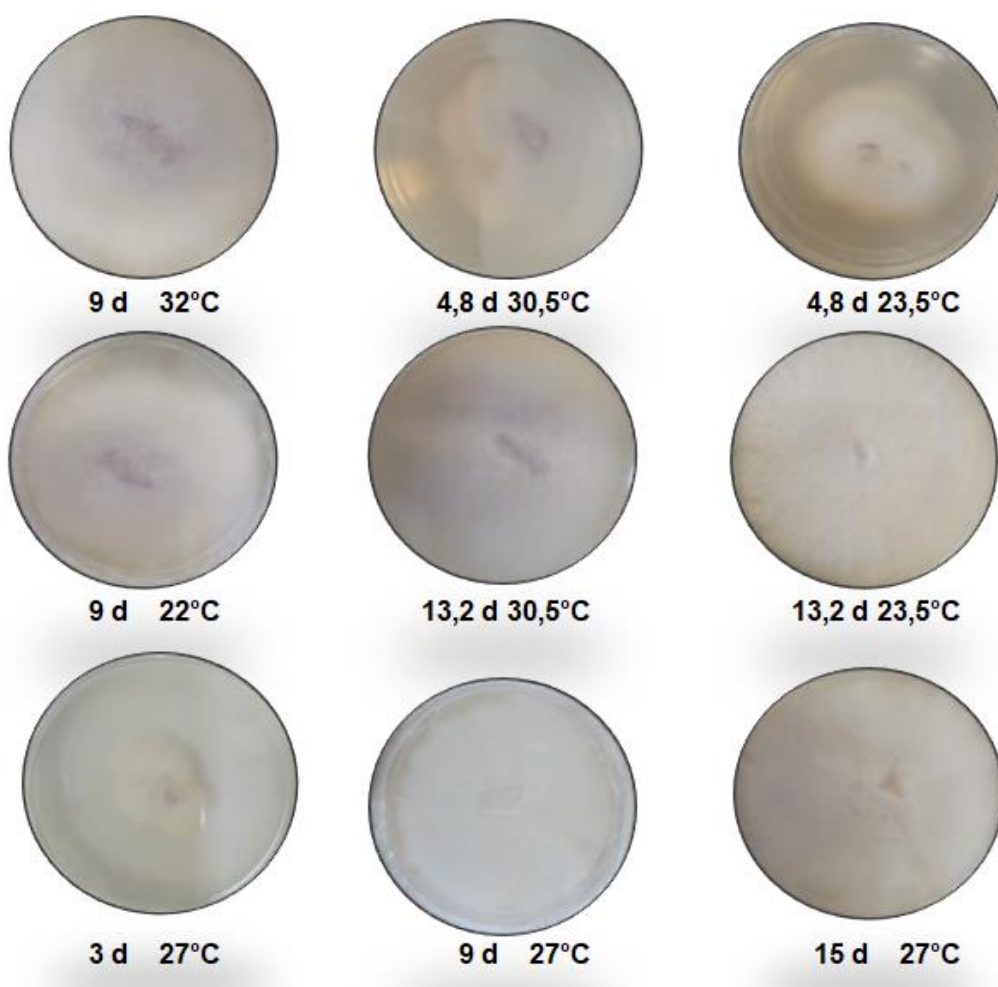
Desta forma, foi proposto avaliação desses extratos por HPLC-DAD empregando o uso de padrão comercial de ácido orselínico para a análise de todos esses extratos do estudo obtidos planejamento CCR, e assim, otimizar a condição ideal de temperatura e dias de cultivo.

4.3. Avaliação do teor de ácido orselínico em *F. oxysporum*

4.3.1. Delineamento experimental e otimização das variáveis de cultivo

Conforme a figura 31, é observado que o perfil de crescimento dos micélios foi menor em condições de 3 dias e 4,8 dias, em intervalos de temperatura de 23,5-30,5°C. Por outro lado, em quantidades superiores a 9 dias, verificou-se que em todas as temperaturas ocorreu o crescimento total dos micélios, ou seja, com preenchimento total na placa.

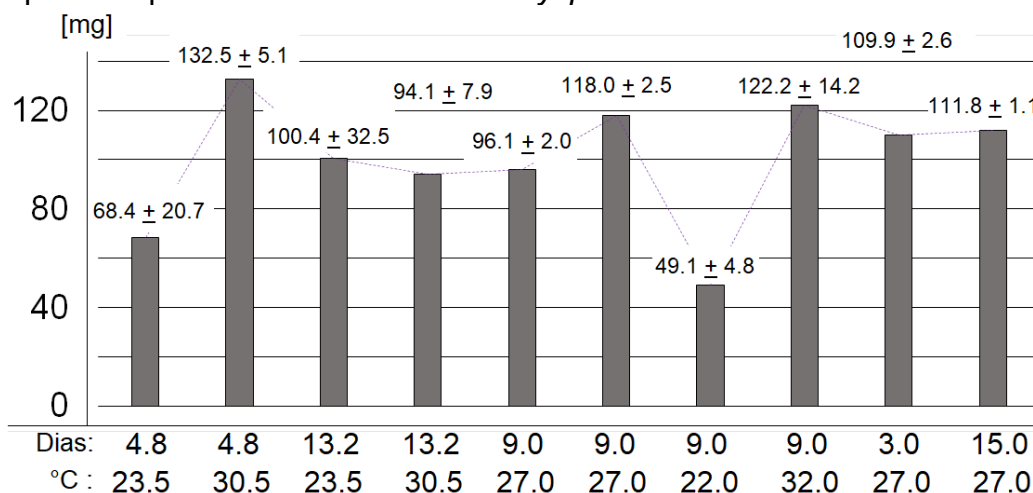
Figura 31 - Demonstrativo dos perfis das placas do cultivo de *F. oxysporum* variando os dias (d) e temperatura (°C) de cultivo.



Fonte: Autoria própria

Em relação a massa dos extratos, as mesmas variaram significativamente (Figura 32). A menor massa de extrato foi adquirida para a condição de 9 dias em 22,0°C com 49,1+4,8 mg e a maior massa para a condição de 4,8 dias e condição de 23,5°C com 132,5 + 5,1 mg.

Figura 32 - Gráfico demonstrando a quantidade de massa de extrato obtido por tempo e temperatura de cultivo de *F. oxysporum*.



Fonte: Autoria própria

Avaliando esses extratos por HPLC-DAD foi observado diferentes níveis de teores de ácido orselínico (Tabela 5). Na figura 32 é observado que o maior acúmulo ocorreu nos extratos obtidos no cultivo de 27°C em 9 dias. Valores próximos do teor máximo também foram observados em condições de cultivo de 27°C em 3 dias e 23,5°C em 13,2 dias. Por fim, apenas para o cultivo em temperatura mínima (22°C), por 9 dias resultou em teor baixo.

Tabela 5 - Teor de ácido orselínico de cada extrato de *F. oxysporum* obtido por condição de cultivo de tempo e temperatura

Variável independente		Variável dependente
Tempo (dias)	Temperatura (°C)	Ácido orselínico (%)
4.8 (-1)	23.5 (-1)	0.0007 ± 0.0001
4.8 (-1)	30.5 (+1)	0.0008 ± 0.0001
13.2 (+1)	23.5 (-1)	0.0039 ± 0.0005
13.2 (+1)	30.5 (+1)	0.0012 ± 0.0002
9.0 (0)	27.0 (0)	0.0040 ± 0.0001
9.0 (0)	27.0 (0)	0.0041 ± 0.0001
9.0 (0)	22.0 (-1.45)	0.0010 ± 0.0001
9.0 (0)	32.0 (+1.45)	0.0026 ± 0.0001
3.0 (-1.45)	27.0 (0)	0.0036 ± 0.0005
15.0 (+1.45)	27.0 (0)	0.0027 ± 0.0003

Nota: X₁= varável tempo; X₂ = variável temperatura.

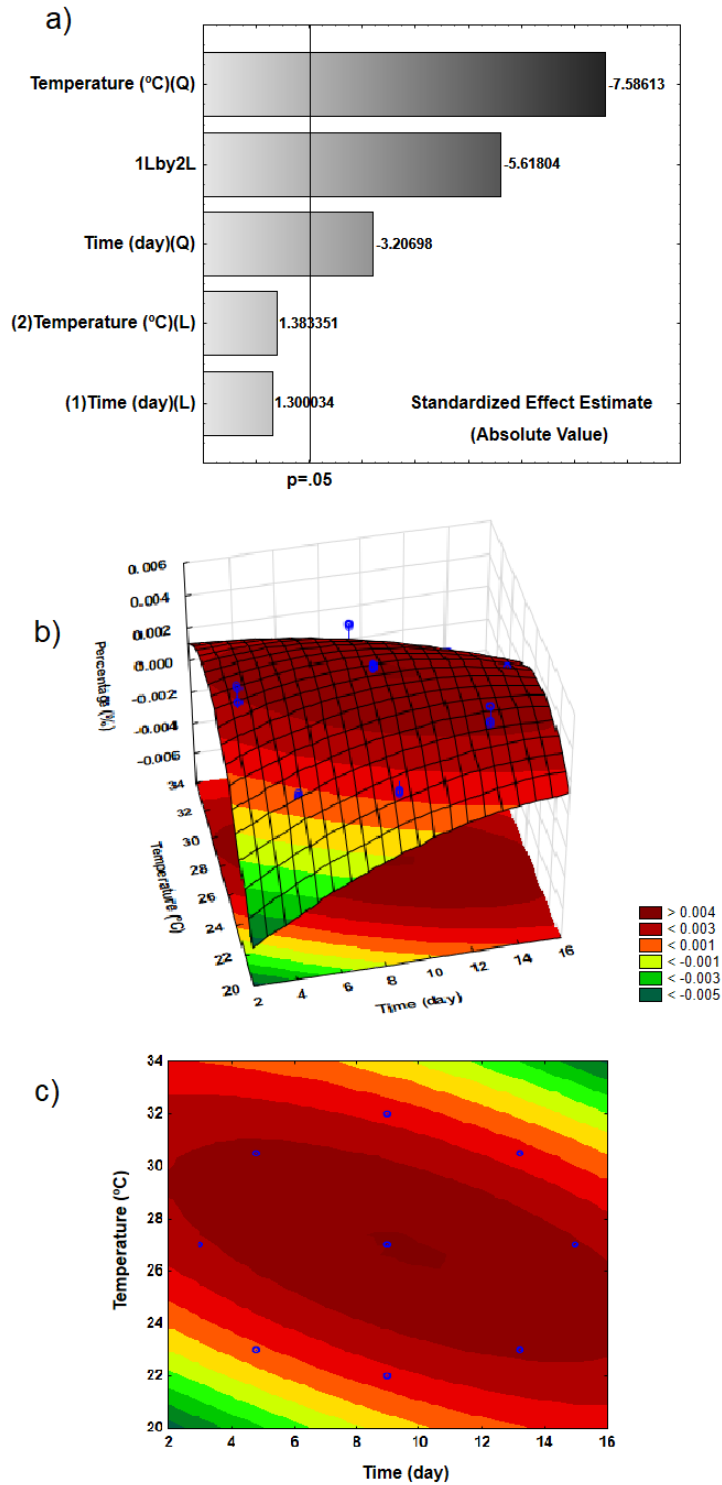
4.3.2. Avaliação dos fatores de resposta e proposta de variáveis otimizadas

Os valores dos fatores respostas expressos em teores de ácido orselínico apresentados na tabela 5 foram processados no modelo matemático de predição de modelos representativos para estimar os coeficientes X1 (tempo) e X2 (temperatura) considerando X1 ≤ 12 dias e X2 ≤ 10°C nos pontos máximo e mínimo.

Dessa forma foi obtido a equação de condição ideal como modelo quadrático: (%) = -0,08474 + 0,00235X1 - 0,00003X1² + 0,00578X2 - 0,00010X2² - 0,0007X1X2 (R²=0,651) com coeficiente de determinação aceitável (R²>0,5).

Além dessa equação matemática, foram obtidos os gráficos de Pareto, a superfície de resposta e a área de resposta para melhor interpretação dos efeitos das variáveis X1 e X2 (Figura 33).

Figura 33 - Efeitos das variáveis de temperatura e tempo no fator de resposta do teor de ácido orselínico: a) O gráfico de Pareto com a linha vertical corresponde a um nível de confiança de 95%; b) Superfície de resposta; e c) Área de resposta.



Fonte: Autoria própria

No gráfico de pareto é avaliado quais são as interações dentre as variáveis mais importantes para maximizar o teor de ácido orselínico, e quais interações estão presentes nessas variáveis (Figura 33a). Nesse caso, as três barras que passam pela linha vertical ($p=0,05$) à direita representam matematicamente as interações quadráticas isoladas (Q) da variável temperatura ($^{\circ}\text{C}$), que representam maior influência (-7,58). Em outras palavras, a variável tempo (dia) influencia a variável temperatura com sinergismo, representando um aumento do fator resposta (teor de ácido orselínico).

Para melhor visualização dos teores nessas variáveis, foi avaliado as superfícies de resposta (Figura 33b) e área de respostas (Figura 33c). Em ambas figuras de fator respostas tem-se os níveis de teor de ácido orselínico em: nível baixo (verde), médio (amarelo) e máximo (vermelho).

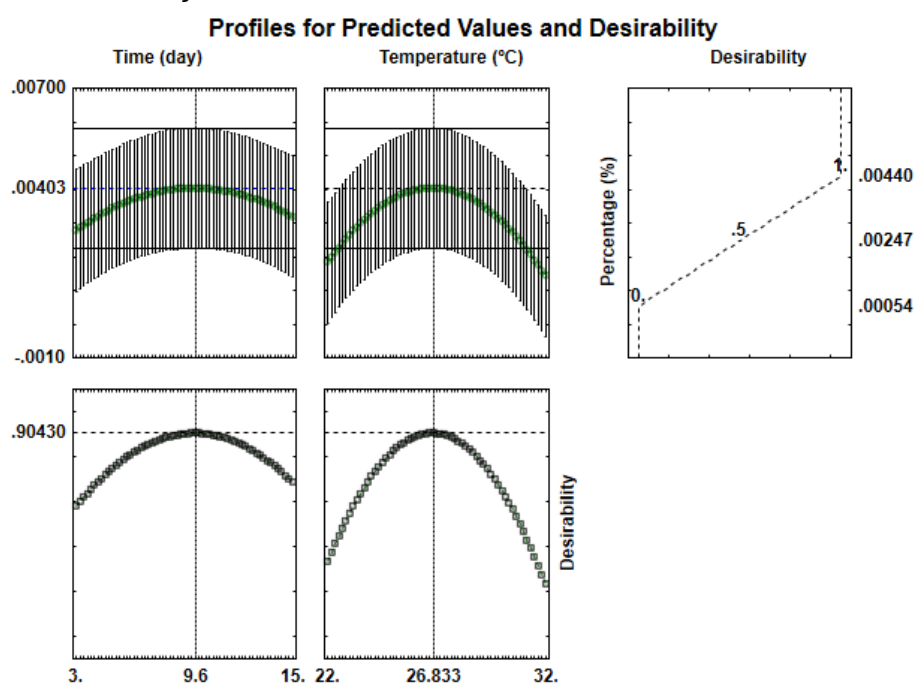
As regiões representando teores máximos foram observadas para condições de temperatura de 30°C , nas quais, a partir de 2 dias, é considerado suficiente para obter um alto teor de ácido orselínico. No entanto, quando avaliados experimentalmente, observamos que temos uma pequena quantidade de micélio (Figura 31) em cultivos ≤ 3 dias, além de pouca massa de extrato (Figura 32). Em cultivo com mais de 3 dias, a temperatura influencia significativamente em condições de temperatura desde 23°C (mínimo) até 26°C (máximo), se estendendo até 16 dias (região em vermelho).

Como já observado anteriormente na tabela 5, o teor de ácido orselínico em *F. oxysporum* é baixo (parte por bilhão, ppb) em todas as condições. Obviamente, não é possível obter teores superiores a 0,0041%, mas podemos condicionar a menor concentração de concomitantes.

4.3.3. Condição otimizada para o cultivo de *F. oxysporum*

A partir da equação obtida pelo estudo de planejamento CCR (resultado descrito no tópico 4.3.2, p. 86), a condição otimizada que garante menor complexidade de metabólitos e maior teor de ácido orselínico foi calculado pelo softwares estatística e proposto como condição ótima, o cultivo de *F. oxysporum* no tempo de 9,6 dias e na temperatura de 26,8°C como parâmetros desejáveis (Figura 34).

Figura 34 - Representação do valor ótimo das variáveis tempo e temperatura para para maximização do teor do ácido orselínico.



Fonte: Autoria própria

Salienta-se que os valores de teores de ácido orselínico foram adquiridos com base na razão percentual de concentração de ácido orselínico e a massa de extrato bruto (Figura 32). Nesse caso empregou-se a curva $y_1 = (-707,5 + 165,1) + 10^7(2 + 0,8)x$ com limite de quantificação (LQ) de $28,9 \cdot (10^{-5})$ mg.mL⁻¹ devido à melhor robustez com base nos resultados dos parâmetros estabelecidos no método HPLC-DAD que são demonstrados a seguir.

4.3.4. Avaliação do método HPLC-DAD e do extrato do cultivo otimizado

O método HPLC-DAD teve como proposta avaliar o teor de ácido orselínico do estudo de planejamento de cultivo CCR e do cultivo otimizado. A fim de garantir a qualidade desse método foi avaliado inicialmente a robustez do método cromatográfico em que foram avaliados o efeito dos volumes das injeções de 5 e 10 µL dos padrões de ácido orselínico na obtenção de curva analítica. Em ambos os volumes avaliados foram mantidos as concentrações finais das soluções da curva analítica de 0,01.(10⁻⁵) mg.mL⁻¹ até 100.(10⁻⁵) mg.mL⁻¹ (faixa de trabalho).

Para o volume de 5 µL, foi preparado e utilizado a solução estoque 1.(10⁻³) mg.mL⁻¹, e para o volume de 10 µL, metade dessa mesma solução estoque. Então elaborados dois conjuntos de diluições abrangendo as mesmas faixas de trabalho, ou seja, mesma quantidade de amostra na coluna. Dessa forma foram obtidas duas curvas analíticas: $y_1 = (-707,5 + 165,1) + 10^7 \cdot (2 + 0,8)x$ e $y_2 = (774,2 + 327,8) + 10^7 \cdot (2 + 0,9)x$ e os valores calculado de LD e de LQ em que variaram $\pm 2,1 \cdot (10^{-5})$ mg.mL⁻¹ e $\pm 6,0 \cdot (10^{-5})$ mg.mL⁻¹ (Tabela 6).

Tabela 6 - Variação da curva analítica, LD, LQ e linearidade do padrão de ácido orselínico mediante ao volume diferentes de injeções de 5 e 10.

Volume de injeção	Curva de calibração* $y = (a \pm SDa) + (b \pm SDb)x$	LD [10 ⁻⁵ mg.mL ⁻¹]	LQ [10 ⁻⁵ mg.mL ⁻¹]	Coef. de determinação
5 µL	$y_1 = (-707,5 \pm 165,1) + 10^7(2 \pm 0,8)x$	8,7 \pm 2,5	28,9 \pm 8,1	r ² =0,9962
10µL	$y_2 = (774,2 \pm 327,8) + 10^7(2 \pm 0,9)x$	6,6 \pm 2,4	22,9 \pm 8,2	r ² =0,9977

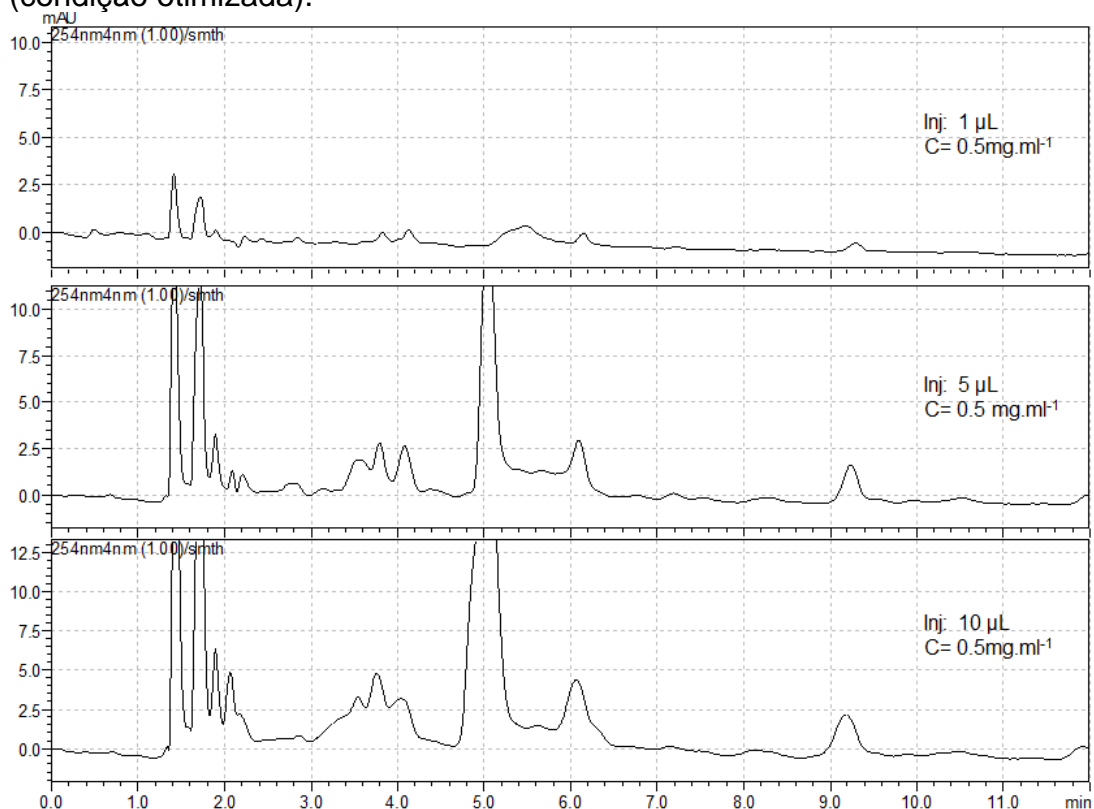
* Faixa de trabalho: 0,01.(10⁻⁵) mg.mL⁻¹ até 100.(10⁻⁵) mg.mL⁻¹

Dessa forma, foram obtidas duas curvas analíticas: $y_1 = (-707,5 + 165,1) + 10^7 \cdot (2 + 0,8)x$ e $y_2 = (774,2 + 327,8) + 10^7 \cdot (2 + 0,9)x$ e os valores calculado de LD e de LQ com variação entre essas duas curvas de $\pm 2,1 \cdot (10^{-5})$ mg.mL⁻¹ e de $\pm 6,0 \cdot (10^{-5})$ mg.mL⁻¹ (Tabela 6). Esse valores demonstram que o volume de injeção afeta a robustez do método cromatografico de forma significativa.

Mais adiante é demonstrado o perfil cromatográfico do padrão avaliado com tempo de retenção de ~7,6 min (Figura 37) e comparado com as amostras de extrato de cultivo otimizado (Figura 36).

Considerando que o preparo da solução do padrão e preparo da solução do extrato de cultivo otimizado de *F. oxysporum* são matrizes diferentes, ou seja no extrato existem muitos componentes além do ácido orselínico, avaliou-se também o efeito de matriz do extrato em relação ao volume de injeção.. Nesse caso, foi preparado a solução desse extrato na concentração de 0,5 mg.mL⁻¹, variando primeiro os volumes de injeção de 1µL, 5 µL e 10 µL e depois a concentração do preparo da solução do mesmo extrato a fim de avaliar a obtenção do melhor perfil cromatográfico neste método HPLC-DAD (Figuras 35 e 36).

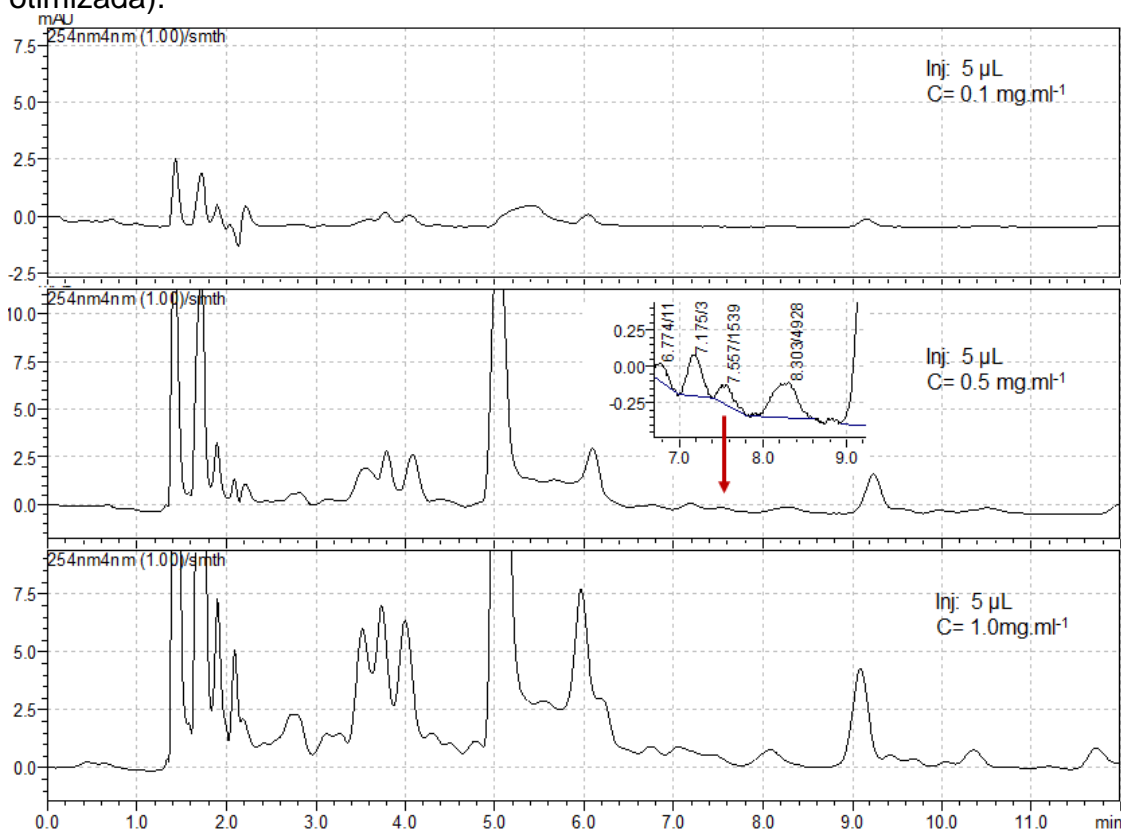
Figura 35 - Variação do perfil cromatográfico devido a variação do volume de injeção de 1, 5 e 10 µL com concentração fixa de 0,5 mg.mL⁻¹ de *F. oxysporum* (condição otimizada).



Fonte: Autoria própria

Mantendo o volume de injeção de 5 μL e variando as concentrações da amostra de extrato desse fungo de cultivo otimizado em 0,1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, foi observado que a concentração de 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi perceptível a banda cromatográfica do ácido orselínico entre 7,2-7,7 min (Figura 36). Embora com pouca área de banda cromatográfica e com deslocamento inferior à 7,9 min, ficou evidente o efeito de matriz desse extrato quando comparado com a solução de padrão demonstrada no cromatograma comparativo na Figura 37 (Tópico 4.5., na pag. 94)

Figura 36 - Variação do perfil cromatográfico devido a variação da concentração de 0,1; 0,5 e 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ com volume fixo de 5 μL de *F. oxysporum* (condição otimizada).



Fonte: Autoria própria

Dessa forma, foi observado que a injeção de 5 µL na concentração de 0,5 mg.mL⁻¹ foi mais satisfatória para visualização de bandas cromatográficas, incluindo o ácido orselínico (Figuras 35 e 36). Visualmente essa condição indicou maior adequabilidade de carga de amostra inserida nessa coluna C18 considerando o menor efeito de matriz dos demais componentes do extrato sob o analíto (ácido orselínico). Nesse contexto, a curva analítica $y = (-707,5 + 165,1) + 10^7(2 + 0,8)x$ foi considerado como parâmetro mais adequado, embora o LQ tenha sido maior, pois foi mantido o mesmo volume de injeção para o preparo de padrão e do extrato.

Para maior precisão e exatidão na determinação do teor de ácido orselínico, avaliou-se a fortificação da solução de extrato de *F. oxysporum* ($0,5 \times 10^{-5}$ mg.mL⁻¹) com 85% (v/v) de adição de padrão em duas concentrações ($a = 327,51 \cdot 10^{-5}$ mg.mL⁻¹ e $b = 667,04 \cdot 10^{-5}$ mg.mL⁻¹).

Na tabela 7 são apresentados os valores de antes e depois da adição de padrão totalizando 1 mL de amostra preparada. Foi observado que os desvios padrões tendem a aumentar com o aumento da adição de padrão no extrato e os coeficientes de variação se manteve inferior a 5% (cálculo de desvio padrão relativo).

Tabela 7 - Avaliação das concentrações finais do extrato de cultivo otimizado de *Fusarium oxysporum* usando a curva $y = (-707,5 + 165,1) + 10^7(2 + 0,8)x$, injeção fixa de 5 µL e n=3.

Composição da amostra preparada (1mL)		Concentração final de ácido orselínico (10 ⁻⁵ mg.mL ⁻¹)	
Extrato	Padrão ácido orselínico	Média	Desvio Padrão
0,15	0,85a	282,49	±8,64
0,15	0,85b	647,50	±5,10
1,0	0,0	13,15	±0,15
0,0	1,0a	327,51	±9,01
0,0	1,0b	667,04	±13,54

Nota: Média das concentrações utilizadas de ácido orselínico: $a = 327,51 \cdot 10^{-5}$ mg.mL⁻¹ e $b = 667,04 \cdot 10^{-5}$ mg.mL⁻¹.

Para melhor avaliação, foram calculados os percentuais de recuperação de padrão na amostra considerando a concentração de padrão conhecida, em que neste caso, o efeito de matriz foi minimizado ao utilizar 85% de adição de volume e concentração de $327,51 \cdot 10^{-5} \text{ mg.mL}^{-1}$ (Tabela 8). Apesar disso, em todas as concentrações foram obtidos valores de recuperação entre 97,1-100,5% o que demonstra boa exatidão e precisão, como já comentado.

No entanto, para a menor concentração de adição de padrão, a exatidão e a precisão foram maiores, ou seja mais próximo de 100% (concentração esperada). Em todos os casos avaliados nas tabelas 7 e 8, o método para determinação de ácido orselínico por adição de padrão na amostra ou sem adição de padrão apresentaram robustez aceitável utilizando o método HPLC-DAD.

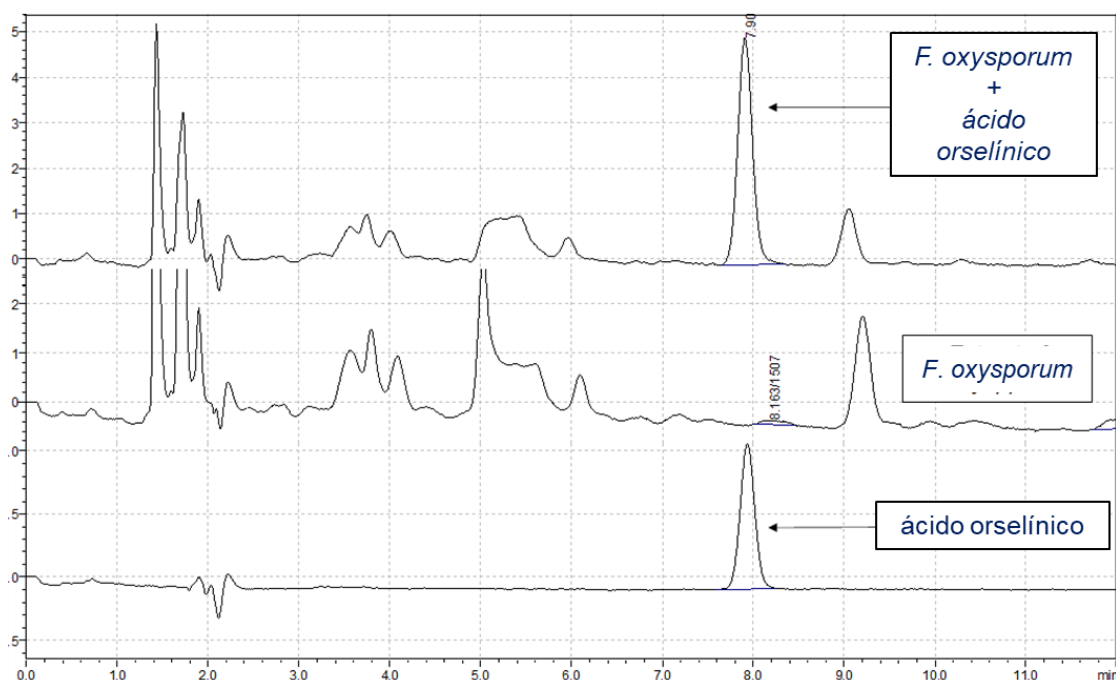
Tabela 8 - Percentual de recuperação de adição de 85% de volume de padrão ácido orselínico após fortificação do extrato (n=3) para avaliação do efeito de matriz em cultivo otimizado de *F. oxysporum*.

Volume Adicionado (mL)	Concentração obtida ($10^{-5} \text{ mg.mL}^{-1}$)		Concentração teórica ($10^{-5} \text{ mg.mL}^{-1}$)		Recuperação (%)	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
0,85a	282,49	$\pm 8,64$	281,19	$\pm 8,64$	100,5	$\pm 2,2$
0,85b	647,50	$\pm 5,10$	667,04	$\pm 5,03$	97,1	$\pm 0,8$

Nota: Proporção de 0,85 mL de concentração de ácido orselínico (a= $327,51 \cdot 10^{-5} \text{ mg.mL}^{-1}$ e b= $667,04 \cdot 10^{-5} \text{ mg.mL}^{-1}$) contidas no volume total de 1mL.

Na figura 37 são apresentados os perfis cromatográficos da adição de padrão com recuperação de 100,5%, o extrato sem adição e o padrão de ácido orselínico. Visualmente o cromatograma com a adição de padrão apresentou menor complexidade, comparado ao cromatograma do extrato. Além disso, volumes menores de adição podem aumentar a precisão e exatidão nesse método de análise.

Figura 37 - Variação do perfil cromatográfico das amostras de extrato com fortificação e sem fortificação. Concentração inicial 100% de extrato otimizado de *F. oxysporum* (0,5 mg.mL⁻¹) e 85% de ácido orselínico (327x10⁻⁵mg.mL⁻¹) adicionados com injeção fixa de 10 µL por HPLC-DAD.



Fonte: Autoria própria

4.4. Estabilidade da solução de extrato

Avaliando intervalos de 0 a 24 horas das amostras preparadas, observou-se aumento significativo na concentração e teor de ácido orselínico nos extratos otimizados de *F. oxysporum* (Tabela 9).

Tabela 9 - Concentração de ácido orselínico e o teor obtido no extrato de cultivo otimizado de *F. oxysporum* avaliado em 3 replicatas.

Tempo (h)	Concentração (10 ⁻⁵ mg.mL ⁻¹)	Teor (%)
0	24,3±8,2	0,0048±0,0002
12	37,5±8,1	0,0075±0,0001
24	39,1±8,2	0,0078±0,0001

Obs.: Solução de amostra preparada na concentração de 1 mg.mL⁻¹, injeção de 5 uL e curva analítica utilizada $y = (774,2 \pm 327,8) + 10^7(2 \pm 0,8)x$.

Conforme foi apresentado anteriormente, tem-se como justificativa a possível degradação de outros policetídeos aromáticos ou outras substâncias que ocasionem o aumento da concentração do ácido orselínico na solução de extrato avaliado. Vale salientar, que diversas substâncias foram anotadas durante a investigação metabolômica por processamento de espectros de MS, incluindo policetídeos aromáticos envolvidos com a via do ácido orselínico. Mais uma vez, os dados corroboram e reforçam a observação da complexidade dos extratos de *F. oxysporum*, incluindo a dificuldade de se obter uma precisão com desvios menores dos valores quantificados pelo método HPLC-DAD.

Por fim, embora tenha sido observado um aumento da concentração de ácido orselínico ocasionado por causa da instabilidade da solução preparada e degradação de outras substâncias, as concentrações e teores de ácido orselínico ainda se encontram ainda em escala ppm. Em outras palavras, não foi tão significativo embora se tenha diminuído a complexidade na obtenção do extrato de cultivo otimizado e com todas as estratégias empregadas.

4.5. Detecção de ácido orselínico em solução de extrato de cultivo otimizado de *F. oxysporum* após de 24 hrs empregando UPLC-ESI-QTOF-MS

Com base em todos os resultados apresentados, optou-se por avaliar novamente o fungo *F. oxysporum* em todas as condições melhor otimizadas de: cultivo fúngico, ajustes de método cromatográfico, pré concentração, e estabilidade de solução com o intuito de detectar o ácido orselínico por UPLC-ESI-QTOF-MS, incluindo os espectros MS/MS.

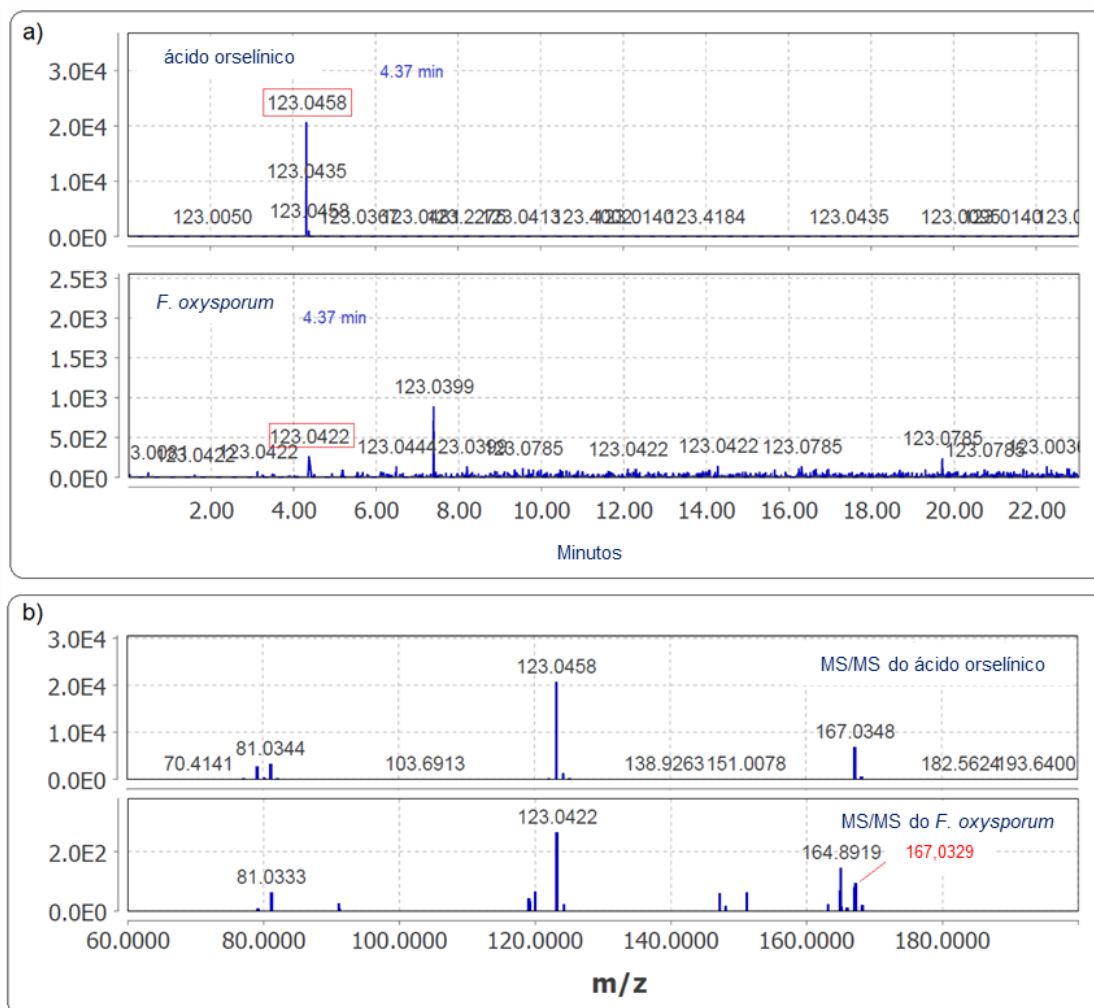
Nesse caso, foi utilizado o extrato de *F. oxysporum* (cultivo otimizado) após 24h do preparo dessa solução. Esse extrato foi pré concentrado em cartucho C18 conforme a metodologia empregada de extração por fase sólida e eluição de solução H₂O:MeOH na proporção 67:33 v/v.

Considerando que os espectros MS apresentaram menor complexidade no modo ESI(-), optou-se avaliar esse extrato nessa condição comparando com o padrão de ácido orselínico por UPLC-ESI-QTOF-MS/MS.

Conforme a figura 38, diversas regiões no tempo de retenção da amostra avaliada de *F. oxysporum* foram constatados bandas cromatográficas com

íons detectados com m/z 123. Conforme o padrão de fragmentação do ácido orselínico ionizado a partir de m/z 167 é observado na avaliação do extrato o ácido orselínico e o padrão no mesmo tempo de tempo de retenção de 4,37 min.

Figura 38 - a) Perfil cromatográfico de íon extraído m/z 167 do extrato de *F. oxysporu*; b) Espectros MS/MS do padrão de ácido orselínico e do extrato de *F. oxysporum* (condição otimizada).



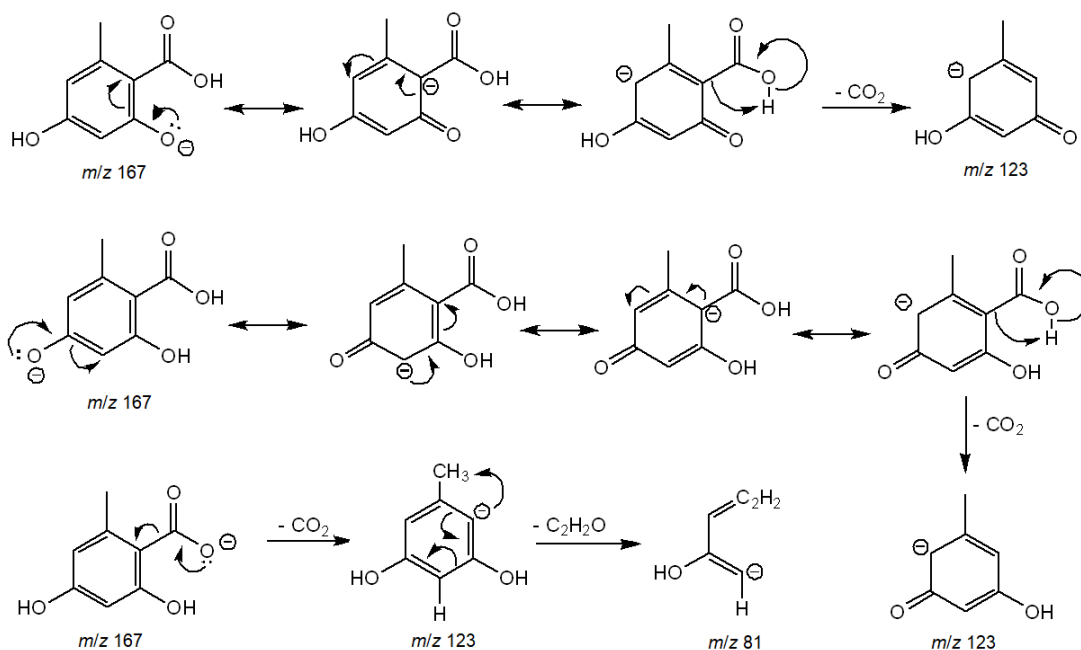
Fonte: Autoria própria

Nesse mesmo tempo de retenção foram extraídos os espectros MS/MS a partir do sinal m/z 123 correspondente ao pico base nos espectros de MS/MS do extrato de *F. oxysporum* e do padrão para comparação. Constatou-se similaridades entre os espectros de MS/MS da amostra e do padrão ácido orselínico e a partir desses espectros foram propostos mecanismos de fragmentação (Figura 39).

Conforme a figura 39, os mecanismos de migração de cargas é uma das propostas mais prováveis de fragmentação do ácido orselínico no modo ESI(-) a partir do íon instável m/z 167. Esta molécula carregada negativamente como espécie $[M-H]^-$ é facilmente descarboxilada (perda de CO_2) produzindo íon produto $[M-H-44]^-$ com m/z $167 \rightarrow 123$. Isso acontece devido ao sitio de carga negativa formado após a perda de CO_2 serem mais estáveis conferindo assim, maior intensidade de íon m/z 123 conforme o espectro MS/MS da figura 38.

Por outro lado, quando a carga negativa inicial está no grupo $COOH$ ocorre a formação de carbânion instável com m/z $167 \rightarrow 123$ seguido pela perda de fragmento neutro C_2H_2O e formação de íon estável $[C_5H_5O]^-$ com mudança de m/z $123 \rightarrow 81$, respectivamente.

Figura 39 - Proposta de mecanismos de fragmentação do ácido orselínico no modo ESI(-) conforme os espectros MS/MS do íon m/z 167.



Fonte: Autoria própria

Esses mecanismos são comuns e bastante relatados na literatura em estudos sobre mecanismos de fragmentações de substâncias aromáticas ionizadas por electrospray (DEMARQUE et al., 2016). Por fim, pode-se confirmar a presença de ácido orselínico no metabolismo de *F. oxysporum* que pode estar envolvido na biossíntese de cromanos em *P. obtusifolia*, como sugerido por Batista, 2017.

5. Conclusão

O presente trabalho teve como principal foco contribuir com a proposta de que o precursor ácido orselínico envolvido na rota biossintética dos cromanos em *Peperomia obtusifolia*, é oriundo de fungos endofíticos uma vez que a via metabólica nesses microrganismos que ainda não foi descrita em espécies de plantas.

Nosso grupo de pesquisa desenvolveu estudos proteômicos e transcriptômicos (BATISTA et al., 2017a, 2017b; BATISTA JR et al., 2009; FINATO et al., 2018; KATO; FURLAN, 2007; RUIZ MOSTACERO et al., 2019; SOUZA et al., 2019) que corroboram nessa proposta. Desta forma, os endófitos de *P. obtusifolia*, *Diaporthe infecunda* e *Fusarium oxysporum*, foram investigados quanto ao seu perfil metabólico, por análises de UPLC-ESI-QTOF-MS e processamento de dados de MS para anotação e estudo da composição dos policetídeos. Após estudos cromatográficos, acoplados a espectrometria de massas, apenas *F. oxysporum* apresentou perfil metabólico aderente a biossíntese de policetídeos aromáticos, diretamente relacionados com a via do ácido orselínico. Dentre os metabólitos detectados, a bicaverina, marcador biossintético dessa cepa e resultante da PKS4, que é uma policetídeo sintase relacionada corroborou o possível acúmulo do ácido orselínico em *F. oxysporum*.

A realização do planejamento experimental composto central rotacional de cultivo do *F. oxysporum*, em diferentes temperaturas e tempos de crescimento, permitiu analisar a composição química dos extratos com maior amplitude e acurácia. Tendo como foco a detecção do ácido orselínico, análises por HPLC-DAD e uso de padrão comercial para quantificação, mostrou a presença desse metabólito chave. As melhores condições para a detecção do ácido orselínico nos extratos, centraram especialmente na sua pré-concentração, empregando extração de fase sólida. Os teores de ácido orselínico, foram determinados nas seguintes condições de cultivo: tempo de 9,6 dias e temperatura de 26,8 °C. Além disso, os extratos foram avaliados por HPLC-ESI-QTOF-MS para aquisição de mais dados de MS e submetidos ao sistemas de anotações do UNIFI, métodos *in silico* de anotações da plataforma GNPS e método de acesso de base de dados online KEGG do software

MZmine2 para anotações de metabólitos, destacando-se as micotoxinas da via dos zearalenóis e zearalenonas, tetraidroxinaftalenos e ésteres de ácido orselínico.

A condição ótima de cultivo de *F. oxysporum* permitiu obter extratos brutos menos complexos. No método proposto de HPLC-DAD, o extrato foi submetido à pré-concentração de fase sólida seguido de avaliação de estabilidade no período de 24 horas o que foi constatado um aumento significativo do teor de ácido orselínico de 0,0048% para 0,0078%, correspondentes às concentrações de $24 \cdot 10^{-5}$ mg.mL⁻¹ e $39 \cdot 10^{-5}$ mg.mL⁻¹. Embora essas concentrações ainda tenham se mostrado baixas, na ordem de ppm, foi finalmente possível obter o espectro de MS/MS pela análise por UPLC-ESI-TOF-MS do extrato de cultivo otimizado correspondente ao mesmo padrão de fragmentação do espectro do padrão comercial ácido orselínico no modo ESI(-).

Por fim, os resultados apresentados e discutidos neste trabalho reforçam a presença do ácido orselínico, proveniente do *F. oxysporum*, como possível fonte heteróloga no metabolismo de *P. obtusifolia*, corroborando assim os estudos proteômicos e transcriptômicos previamente desenvolvidos (BATISTA et al., 2017a, 2017b; BATISTA JR et al., 2009; FINATO et al., 2018; KATO; FURLAN, 2007; RUIZ MOSTACERO et al., 2019; SOUZA et al., 2019). Nesse sentido, ressalta-se a importância também do estudo dos demais policetídeos aromáticos e suas PKSs relacionadas, pois o ácido orselínico pode ser também intermediário ou subproduto de diferentes PKSs.

Assim, o nosso grupo de pesquisa avançou na proposta de interação mutualista para biossintetizar os cromanos de *Peperomia obtusifolia*, cuja relação interespecífica deve ser bastante harmônica como a natureza e seu papel na vida humana.

6. REFERÊNCIAS

AAMIR, M.; SINGH, V. K.; DUBEY, M. K.; MEENA, M. In silico Prediction, Characterization, Molecular Docking, and Dynamic Studies on Fungal SDRs as Novel Targets for Searching Potential Fungicides Against *Fusarium Wilt* in Tomato. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 1–28, October, 2018.

ABDEL-RAZEK, A. S.; EL-NAGGAR, M. E.; ALLAM, A.; MORSY, O. M.; OTHMAN, S. I. Microbial natural products in drug discovery. **Processes**, v. 8, n. 4, p. 1–19, 2020.

ADHIKARI, K.; LO, I. W.; CHEN, C. L.; WANG, Y. L.; LIN, K. H.; ZADEH, S. M.; RATTINAM, R.; LI, Y. S.; WU, C. J.; LI, T. L. Chemoenzymatic synthesis and biological evaluation for bioactive molecules derived from bacterial benzoyl coenzyme a ligase and plant type III polyketide synthase. **Biomolecules**, v. 10, n. 5, p. 738, 2020.

ALTEMIMI, A.; LAKHSSASSI, N.; BAHARLOUEI, A.; WATSON, D. G.; LIGHTFOOT, D. A. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. **Plants**, v. 6, n. 4, p.42, 2017.

BATISTA JR, O. M.; NOELI, S.; DA, J.; MOTA, S.; DA, V.; BOLZANI, S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Resolution and Absolute Configuration Assignment of a Natural Racemic Chromane from *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae). **Chirality: The Pharmacological, Biological, and Chemical Consequences of Molecular Asymmetry**, v. 21, n. 9, p. 799–801, 2009.

BATISTA, A. N. L.; SANTOS-PINTO, J. R. A. Dos; BATISTA, J. M.; SOUZA-MOREIRA, T. M.; SANTONI, M. M.; ZANELLI, C. F.; KATO, M. J.; LÓPEZ, S. N.; PALMA, M. S.; FURLAN, M. The Combined Use of Proteomics and Transcriptomics Reveals a Complex Secondary Metabolite Network in *Peperomia obtusifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 5, p. 1275–1286, 2017. b.

BATISTA, A.; BATISTA JR., J.; SOUZA-MOREIRA, T.; VALENTINI, S.; KATO, M.; ZANELLI, C.; FURLAN, M. Biosynthetic Insights into p-Hydroxybenzoic Acid-Derived Benzopyrans in *Piper gaudichaudianum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 00, p. 1107–1114, 2017. a.

BECKER, K.; KUHNERT, E.; COX, R. J.; SURUP, F. Azaphilone pigments from *Hypoxylon rubiginosum* and *H. texense*: absolute configuration, bioactivity, and biosynthesis. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2021, n. 36, p. 5094-5103, 2021.

BORNSCHEUER, U. T.; YI, D.; BAYER, T.; BADENHORST, C. P. S.; WU, S. Recent trends in biocatalysis. **Chem Soc Rev**, v. 50, n. 14, p. 7883–8346, 2021.

BORUTA, T.; BIZUKOJC, M. Induction of secondary metabolism of *Aspergillus terreus* ATCC 20542 in the batch bioreactor cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 7, p. 3009–3022, 2016.

BOURAS, N.; STRELKOV, S. E. The anthraquinone catenarin is phytotoxic and produced in leaves and kernels of wheat infected by *Pyrenophora tritici-repentis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, n. June 2020, 2008.

BREITLING, R.; TAKANO, E. Synthetic biology advances for pharmaceutical production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 35, p. 46–51, 2015.

CHATZIVASILEIOU, A. O.; WARD, V.; EDGAR, S. M.; STEPHANOPOULOS, G. Two-step pathway for isoprenoid synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 2, p. 506–511, 2019.

CHEPKIRUI, C.; STADLER, M. The genus *Diaporthe*: a rich source of diverse and bioactive metabolites. **Mycological Progress**, v. 16, n. 5, p. 477–494, 2017.

COMPANT, S.; SAMAD, A.; FAIST, H.; SESSITSCH, A. A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. **Journal of Advanced Research**, v. 19, p. 29–37, 2019.

COX, R. J. Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nano-machines begin to reveal their secrets. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 5, n. 13, p. 2010, 2007.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CRAWFORD, J. M.; CRAIG, A. T. New insights into the formation of fungal aromatic polyketides. **Nature Publishing Group**, v. 8, n. 12, p. 879–889, 2010.

CROTEAU, R.; DAVIS, E. M.; HARTMANN, T. HEMSCHEIDT, T.; SANZ-CERVERA, J. F.; SHEN, B.; WILLIAMS, R. M. **Biosynthesis: aromatic polyketides, isoprenoids, alkaloids**. Springer, 2003.

DEMARQUE, D. P.; CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 432–455, 2016.

DOMKA, A. M.; ROZPAADEK, P.; TURNAU, K. Are Fungal Endophytes Merely Mycorrhizal Copycats? The Role of Fungal Endophytes in the Adaptation of Plants to Metal Toxicity. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. March, 2019.

EDEL-HERMANN, V.; LECOMTE, C. Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. **Phytopathology**, v. 109, n. 4, p. 512–530, 2019.

ERNST, M.; KANG, K. Bin; NOTHIAS, L.; WANDY, J.; CHEN, C.; WANG, M.; ROGERS, S.; MEDEMA, M. H.; DORRESTEIN, P. C.; HOOFT, J. J. J. Van Der. MolNetEnhancer: Enhanced Molecular Networks by Integrating Metabolome Mining and Annotation Tools. **Metabolites**, v.9, n.7, p. 144, 2019.

FÄSEKE, V. C.; RAPS, F. C.; SPARR, C. Polyketide Cyclizations for the Synthesis of Polyaromatics. **Angewandte Chemie**, v. 59, n. 18, p. 6975–6983, 2020.

FINATO, A. C. et al. Biosynthetic Insights into. **Vibrational Spectroscopy**, v. 80, n. 1, p. 136–140, 2018.

GARCIA-CAPARRÓS, P.; GONZ, O.; CALATRAVA, R.; URBANO, D. S.; MAR, R.; URBANO, D. S. Types of Shelter and Covering Materials Influencing Growth, Pigment, and Nutrient Concentrations of Baby Rubber Plants (*Peperomia obtusifolia*). **HortScience**, v. 53, n. 10, p. 1434–1440, 2018.

GIBEAUT, D. M.; THOMSON, W. W. Leaf ultrastructure of *Peperomia obtusifolia*, *P. Camptotricha*, and *P. Scandens*. **Botanical Gazette**, v. 150, n. 2, p. 108–114, 1989.

GOMES, R. R.; GLIENKE, C.; VIDEIRA, S. I. R.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 31, p. 1–41, 2013.

GORDON, T. R. *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* Wilt Syndrome. **Annual Review of Phytopathology**, v. 55, n. 1, p. 23–39, 2017.

GRIFFITHS, S. A.; COX, R. J.; OVERDIJK, E. J. R.; MESARICH, C. H.; SACCOMANNO, B.; LAZARUS, C. M.; WIT, P. J. G. M. De. Assignment of a dubious gene cluster to melanin biosynthesis in the tomato fungal pathogen *Cladosporium fulvum*. **PLoS One**, p. 1–18, 2018.

GUTIERREZ, Y. V.; YAMAGUCHI, L. F.; DE MORAES, M. M.; JEFFREY, C. S.; KATO, M. J. Natural products from *Peperomia*: occurrence, biogenesis and bioactivity. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 6, p. 1009–1033, 2016.

HALLE, M. B.; LEE, W.; YUDHISTIRA, T.; KIM, M.; CHURCHILL, D. G. Mycophenolic acid: Biogenesis, compound isolation, biological activity, and historical advances in total synthesis. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2019, n. 13, p. 2315-2334, 2019..

HANSEN, F. T.; GARDINER, D. M.; LYSØE, E.; ROMANS, P.; TUDZYNSKI, B.; WIEMANN, P.; ESBEN, T.; GIESE, H.; BRODERSEN, D. E.; LAURIDS, J. An update to polyketide synthase and non-ribosomal synthetase genes and nomenclature in *Fusarium*. **Fungal genetics and biology**, v. 75, p. 20–29, 2015.

HLEBA, L.; CÍSAROVÁ, M.; SHARIATI, M. A.; TANČINOVÁ, D.; LUKÁŠ, I.; PH, D. Detection of mycotoxins using MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2021, p. 181-185, 2021.

ILYAS, S.; NAZ, S.; ASLAM, F.; PARVEEN, Z.; ALI, A. Chemical composition of essential oil from in vitro grown *Peperomia obtusifolia* through GC-MS. **Pakistan Journal of Botany**, v. 46, n. 2, p. 667–672, 2014.

ISAH, T.; UMAR, S.; MUJIB, A.; PRASAD, M. Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures : strategies , approaches , and limitations to achieving higher yield. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 132, n. 2, p. 239–265, 2018.

JAN, R.; ASAF, S.; NUMAN, M.; LUBNA; KIM, K. M. Plant secondary metabolite biosynthesis and transcriptional regulation in response to biotic and abiotic stress conditions. **Agronomy**, v. 11, n. 5, p. 1–31, 2021.

JANGIR, P.; MEHRA, N.; SHARMA, K.; SINGH, N.; RANI, M. Secreted in Xylem Genes: Drivers of Host Adaptation in *Fusarium oxysporum*. **Frontiers in plant science**, v. 12, p. 1–17, 2021.

JØRGENSEN, S. H., FRANDBSEN, R. J. N., NIELSEN, K. F., LYSØE, E., SONDERGAARD, T. E., WIMMER, R., ... & SØRENSEN, J. L. *Fusarium graminearum* PKS14 is involved in orsellinic acid and orcinol synthesis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 70, p. 24-31, 2014.

KAHLERT, L.; VILLANUEVA, M.; COX, R. J.; SKELLAM, E. J. Biosynthesis of 6-Hydroxymellein Requires a Collaborating Polyketide Synthase-like Enzyme. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 60, n. 20, p. 11423–11429, 2021.

KATO, M. J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure and applied chemistry** v. 79, n. 4, p. 529–538, 2007.

KLAS, K. R.; KATO, H.; FRISVAD, J. C.; YU, F.; NEWMISTER, S. A.; FRALEY, A. E.; SHERMAN, D. H.; WILLIAMS, R. M. Structural and stereochemical diversity in prenylated indole alkaloids containing the bicyclo terrestrial fungi. **Natural Product Reports**, v. 35, n. 6, p. 532–558, 2018.

KNUDSEN, C.; GALLAGE, N. J.; HANSEN, C. C.; MØLLER, B. L.; LAURSEN, T. Dynamic metabolic solutions to the sessile life style of plants. **Natural Product Reports**, v. 35, n. 11, 2018.

KO, S. C.; LEE, H. J.; CHOI, S. Y.; CHOI, J. II; WOO, H. M. Bio-solar cell factories for photosynthetic isoprenoids production. **Planta**, v. 249, n. 1, p. 181–193, 2019.

KORNFUEHRER, T.; EUSTÁQUIO, A. S. Diversification of polyketide structures: Via synthase engineering. **MedChemComm**, v. 10, n. 8, p. 1256–1272, 2019.

LAGASHETTI, A. C.; DUFOSS, L.; SINGH, S. K.; SINGH, P. N. Fungal Pigments and Their Prospects in different Industries. **Microorganisms**, v.7, n. 12, p. 604, 2019.

LATA, R.; CHOWDHURY, S.; GOND, S. K.; JR, J. F. W. Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 4, 2018.

LEBEAU, J.; PETIT, T.; DUFOSSÉ, L.; CARO, Y. Putative metabolic pathway for the bioproduction of bikaverin and intermediates thereof in the wild *Fusarium oxysporum* LCP531 strain. **AMB Express**, v.9, n.1, 2019.

LI, L.; JIANG, W.; LU, Y. New strategies and approaches for engineering biosynthetic gene clusters of microbial natural products. **Biotechnology Advances**, v. 35, p. 936–949, 2017.

LUO, F.; YU, Z.; ZHOU, Q. Multi-Omics-Based Discovery of Plant Signaling Molecules. **Metabolites**, v. 12, n. 1, 2022.

LUZ, C.; SALADINO, F.; LUCIANO, F. B.; MAÑES, J.; MECA, G. Occurrence, toxicity, bioaccessibility and mitigation strategies of beauvericin, a minor *Fusarium* mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, p. 430–439, 2017.

MÅNSSON, M. Discovery of bioactive natural products from marine bacteria. **Technical University of Denmark, Kgs. Lyngby, Denmark**, 2011.

MASI, M.; ALOI, F.; NOCERA, P.; CACCIOLA, S. O.; SURICO, G.; EVIDENTE, A. Phytotoxic metabolites isolated from *Neufusicoccum batangarum*, the causal agent of the scabby canker of cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L.). **Toxins**, v. 12, n. 2, p. 126, 2020.

MASI, M.; MADDAU, L.; LINALDEDDU, B. T.; SCANU, B.; EVIDENTE, A.; CIMMINO, A. Bioactive Metabolites from Pathogenic and Endophytic Fungi of Forest Trees. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 208–252, 2018.

MORISHITA, Y.; OKAZAKI, Y.; LUO, Y. Y.; NUNOKI, J.; TANIGUCHI, T.; OSHIMA, Y.; ASAI, T. Use of plant hormones to activate silent polyketide biosynthetic pathways in *Arthrinium sacchari*, a fungus isolated from a spider. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 17, p. 780–784, 2019.

MOSTACERO, N. R.; CASTELLI, M. V.; CUTRÓ, A. C.; MARCOS, J.; JR, B.; FURLAN, M.; VALLES, J.; LUISA, C.; LÓPEZ, S. N.; RUIZ, N.; CASTELLI, M. V.; CUTRÓ, A. C.; MARCOS, J.; JR, B.; FURLAN, M.; VALLES, J.; FULGUEIRA, C. L.; PIPERACEAE, P.; HOLLMANN, A. Antibacterial activity of prenylated benzopyrans from *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae). **Natural Product Research**, v.35, n.10, 2021.

MOTA, J. S.; LEITE, A. C.; KATO, M. J.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; LEITE, A. C.; KATO, M. J.; YOUNG, M. C. M. Isoswertisin flavones and

other constituents from *Peperomia obtusifolia*. **Natural Product Research**, v. 25, n. 1, p. 1–7, 2011.

NEWMAN, A. G.; VAGSTAD, A. L.; STORM, P. A.; TOWNSEND, C. A. Systematic domain swaps of iterative, nonreducing polyketide synthases provide a mechanistic understanding and rationale for catalytic reprogramming. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 20, p. 7348–7362, 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, 2020.

NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: Database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. **Journal of Chromatography A**, v. 1002, n. 1–2, p. 111–136, 2003.

NOBLE, C.; LINNET, K. Application of a screening method for fentanyl and its analogues using UHPLC - QTOF - MS with data - independent acquisition (DIA) in MS E mode and retrospective analysis of authentic forensic blood samples. **Drug Testing and Analysis**, v. 10, n. 4, p. 651–662, 2018.

PADDON, C. J.; KEASLING, J. D. Semi-synthetic artemisinin: A model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 355–367, 2014.

PAULO, B. S.; SIGRIST, R.; DE OLIVEIRA, L. G. AVANÇOS RECENTES EM BISSÍNTESE COMBINATÓRIA DE POLICETÍDEOS: PERSPECTIVAS E DESAFIOS. **Quimica Nova**, v. 42, n. 1, p. 71–83, 2019.

PILON, A. C.; GU, H.; RAFTERY, D.; BOLZANI, V. da S.; LOPES, N. P.; CASTRO-GAMBOA, I.; CARNEVALE NETO, F. Mass Spectral Similarity Networking and Gas-Phase Fragmentation Reactions in the Structural Analysis of Flavonoid Glycoconjugates. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 16, p. 10413–10423, 2019.

PLAXTON, W. C. THE ORGANIZATION AND REGULATION OF PLANT GLYCOLYSIS. **Annual review of plant biology**, v. 47, n. 1, p. 185–214, 1996.

RAN, H.; LI, S. Fungal benzene carbaldehydes: occurrence, structural diversity, activities and biosynthesis. **Natural Product Reports**, v. 38, n. 1, p. 240–263, 2021.

ROJAS-IDROGO, C.; OLIVERA-MORANTE, M. I.; PERÚ, L. In vitro propagation of *Peperomia albovittata* and *Peperomia galioides* by organogenesis. **Biotechnologia Vegetal**, v. 20, n. 2, p. 92–103, 2020.

ROKAS, A.; MEAD, M. E.; STEENWYK, J. L.; RAJA, H. A.; OBERLIES, N. H. Biosynthetic gene clusters and the evolution of fungal chemodiversity. **Natural Product Reports**, v. 37, n. 7, p. 868–878, 2020.

ROSSMAN, A. Y.; FARR, D. F.; CASTLEBURY, L. A. A review of the phylogeny and biology of the Diaporthales. **Mycoscience**, v. 48, n. 3, p. 135–144, 2007.

RUIZ MOSTACERO, N.; CASTELLI, M. V.; BAROLO, M. I.; AMIGOT, S. L.; FULGUEIRA, C. L.; LÓPEZ, S. N. Fungal endophytes in *Peperomia obtusifolia* and their potential as inhibitors of chickpea fungal pathogens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 1–16, 2021.

RUIZ MOSTACERO, N.; CASTELLI, M. V.; CUTRÓ, A. C.; HOLLMANN, A.; BATISTA, J. M.; FURLAN, M.; VALLES, J.; FULGUEIRA, C. L.; LÓPEZ, S. N. Antibacterial activity of prenylated benzopyrans from *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae). **Natural Product Research**, v. 35, n. 10, 2021.

SAYED, A. M.; ABDEL-WAHAB, N. M.; HASSAN, H. M.; ABDELMOHSEN, U. R. *Saccharopolyspora*: an underexplored source for bioactive natural products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, n. 2, p. 314–329, 2020.

SHARMA, L.; MARQUES, G. *Fusarium*, an Entomopathogen — A Myth or Reality? . **Pathogens**, v. 7, n. 4, p. 93, 2018.

SHEN, B. A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. **Cell**, v. 163, n. 6, p. 1297–1300, 2015.

SHIMIZU, Y.; OGATA, H.; GOTO, S. Type III Polyketide Synthases: Functional Classification and Phylogenomics. **ChemBioChem**, v. 18, n. 1, p. 50–65, 2017.

SONG, H.; WU, H.; GENG, Z.; SUN, C.; REN, S. and 9 , 10 , 13-THODE in Cured Meat Products by LC-MS / MS. **Food Analytical Methods**, p. 2832–2841, 2016.

SOUZA, A. A.; VESSECCHI, R.; CASTRO-GAMBOA, I.; FURLAN, M. Combined use of tandem mass spectrometry and computational chemistry to study 2H-chromenes from *Piper aduncum*. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 54, n. 7, p. 634–642, 2019.

TAN, Y.; CHANG, S. K. C. Isolation and characterization of collagen extracted from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin. **Food Chemistry**, v. 242, p. 147–155, 2018.

TAN, Z.; CLOMBURG, J. M.; GONZALEZ, R. Synthetic Pathway for the Production of Olivetolic Acid in *Escherichia coli*. **ACS Synthetic Biology**, v.7, n.8, 2018.

TANAKA, T.; ASAI, F.; IINUMA, M. Phenolic compounds from *Peperomia obtusifolia*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 1, p. 229–232, 1998.

THOMFORD, N. E.; SENTHEBANE, D. A.; ROWE, A.; MUNRO, D.; SEELE, P.; ID, A. M.; DZOBO, K. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences Review**, v. 19, n. 1578, p. 29, 2018.

TRIASTUTI, A.; HADDAD, M.; BARAKAT, F.; MEJIA, K.; RABOUILLE, G.; DEV, U. M. R. P.; TOULOUSE, U. De. Dynamics of Chemical Diversity during Co-Cultures : An Integrative Time-Scale Metabolomics Study of Fungal Endophytes *Cophiniforma mamane* and *Fusarium solani*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 18, n. 2, 2021.

TU, Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. **Nature Medicine**, v. 17, n. 10, p. 1217–1220, 2011.

VASILEIADOU, A.; KARAPANAGIOTIS, I.; ZOTOU, A. Development and validation of a liquid chromatographic method with diode array detection for the determination of anthraquinones, flavonoids and other natural dyes in aged silk. **Journal of Chromatography A**, v. 1651, p. 462312, 2021.

VIEIRA, N. C.; CORTELO, P. C.; CASTRO-GAMBOA, I. Rapid qualitative profiling of metabolites present in *Fusarium solani*, a rhizospheric fungus derived from *Senna spectabilis*, using GC/MS and UPLC-QTOF/MSE techniques assisted by UNIFI information system. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 26, n. 4, p. 281–291, 2020.

WANG, J.; LIU, S.; SONG, Z.; XU, T.; LIU, C. Naturally Occurring Flavonoids and Isoflavonoids and Their Microbial Transformation: A Review. **Molecules**, v. 25, n. 21, 2020. a.

WANG, J.; ZHANG, R.; CHEN, X.; SUN, X.; YAN, Y.; SHEN, X.; YUAN, Q. Biosynthesis of aromatic polyketides in microorganisms using type II polyketide synthases. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 1–11, 2020. b.

WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; PENG, Y.; BANDEIRA, N. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016.

WEI, J.; WU, B. Chemistry and bioactivities of secondary metabolites from the genus *Fusarium*. **Fitoterapia**, v.146, p. 104638, 2020.

YAN, L.; ZHU, J.; ZHAO, X.; SHI, J.; JIANG, C.; SHAO, D. Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.103, 2019.

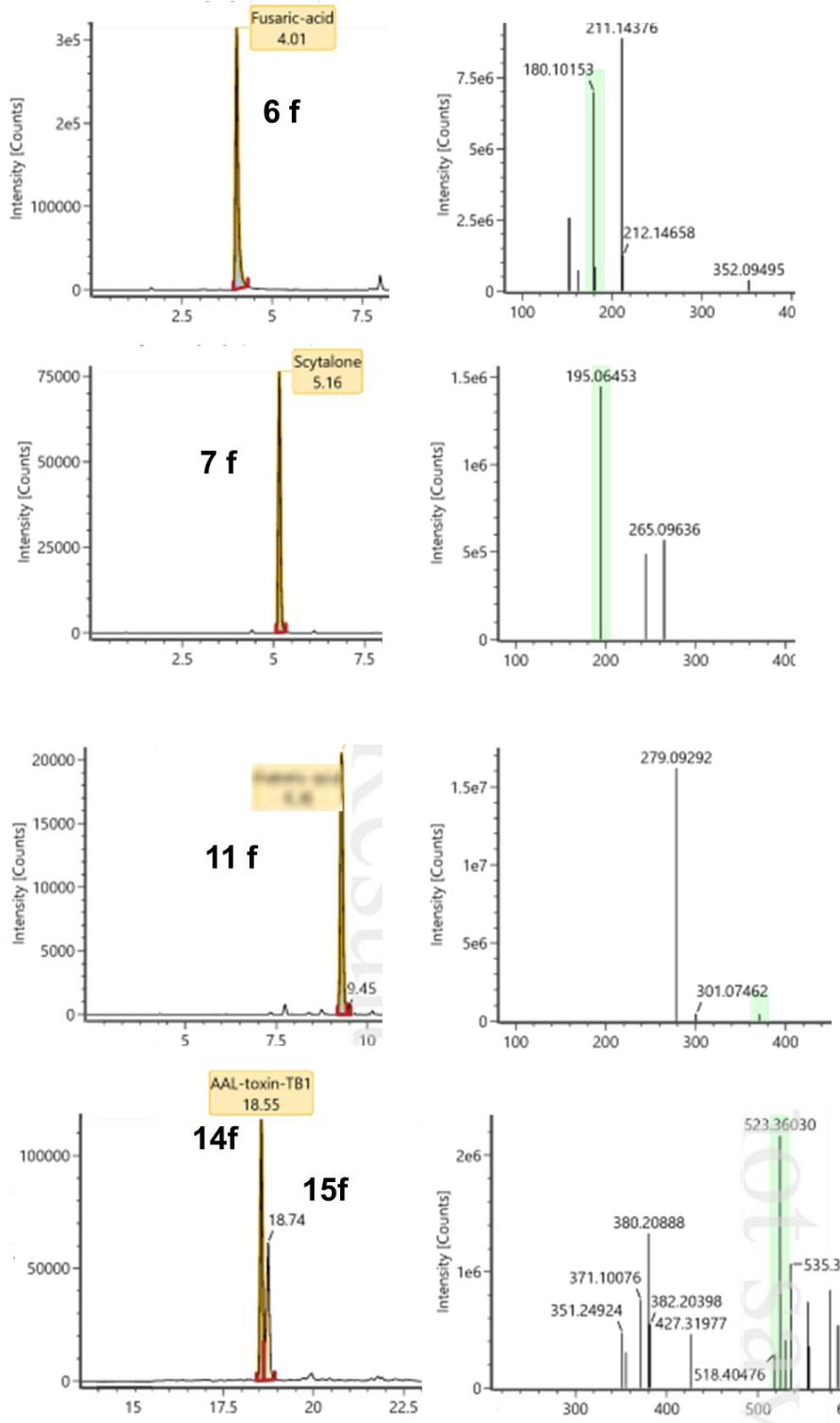
YANG, X.; WEI, S.; LIU, B.; GUO, D.; ZHENG, B.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; LUO, L.; HUANG, D. A novel integrated non-targeted metabolomic analysis reveals significant metabolite variations between different lettuce (*Lactuca sativa* L.) varieties. **Horticulture Research**, p. 1–14, 2018

ZHANG, H.; RUAN, C.; BAI, X.; ZHANG, M.; ZHU, S.; JIANG, Y. Isolation and identification of the antimicrobial agent beauvericin from the endophytic *Fusarium*

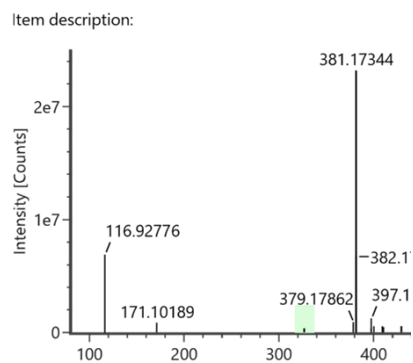
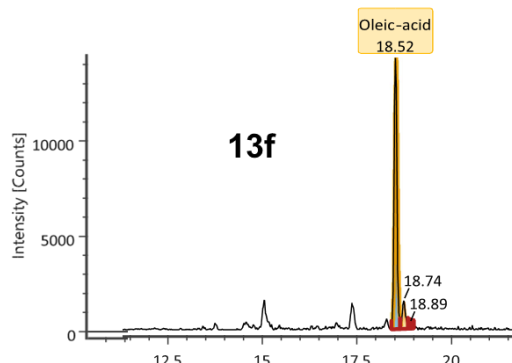
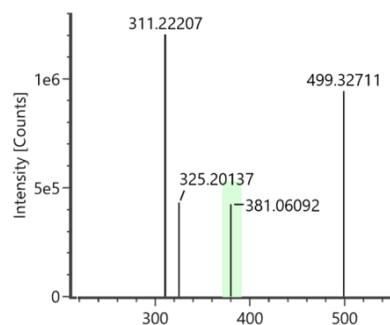
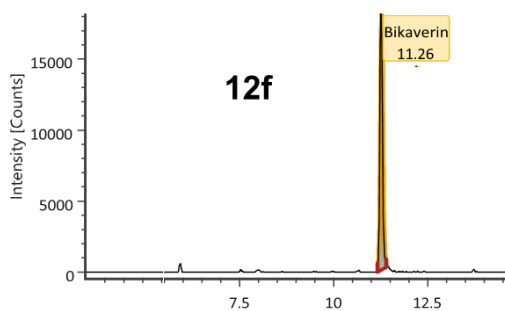
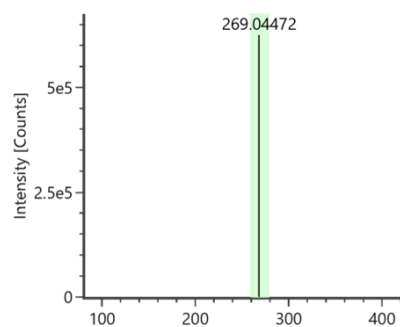
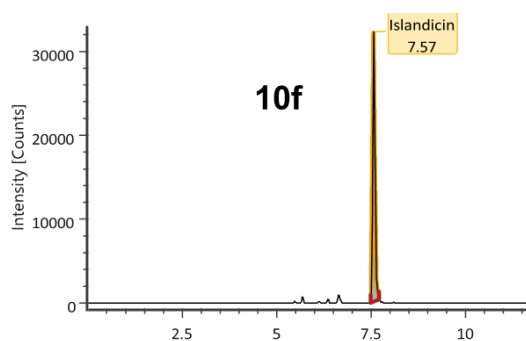
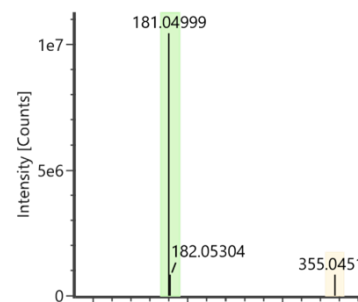
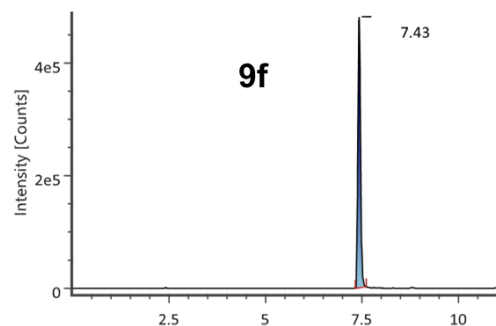
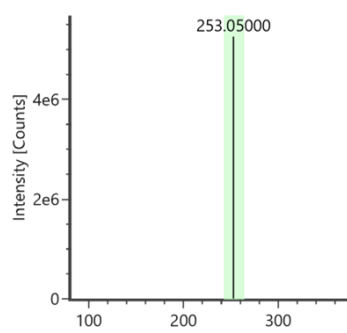
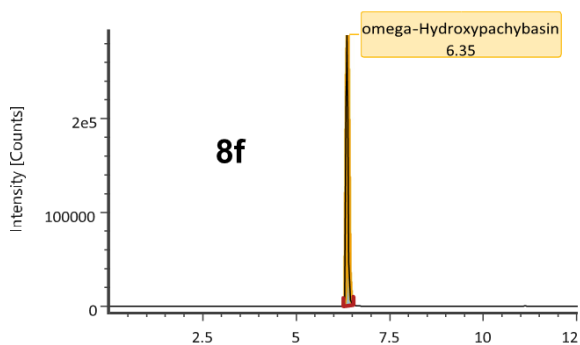
oxysporum 5-19 with NMR and ESI-MS/MS. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–5, 2016.

APENDICE A

Anotações do UNIFI - dados MS^E - ESI(+) *F. oxysporum*



Anotações do UNIFI - dados MS^E - ESI(-) *F. oxysporum*



#