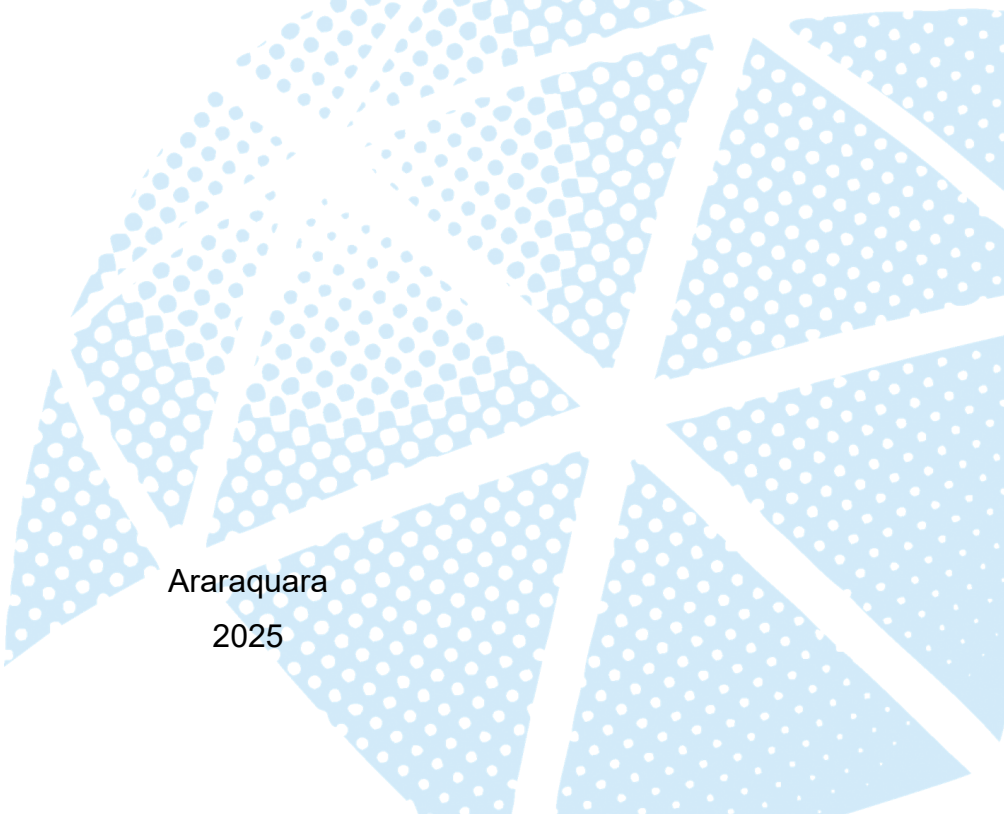


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

VICTOR HUGO LINO RUFINO

**APLICAÇÃO DO PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN E DE MODULADORES
EPIGENÉTICOS NA BIOPROSPECÇÃO DO FUNGO ENDOFÍTICO *HYPOXYLON*
INVESTIENS, ISOLADO DA ALGA MARINHA *ASPARAGOPSIS TAXIFORMIS***

Araraquara
2025



VICTOR HUGO LINO RUFINO

**APLICAÇÃO DO PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN E DE MODULADORES
EPIGENÉTICOS NA BIOPROSPECÇÃO DO FUNGO ENDOFÍTICO *HYPOXYLON*
INVESTIENS, ISOLADO DA ALGA MARINHA *ASPARAGOPSIS TAXIFORMIS***

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena S. Silva

Araraquara

2025

R926a

Rufino, Victor Hugo Lino

Aplicação do planejamento Plackett-Burman e de moduladores epigenéticos na bioprospecção do fungo endofítico *Hypoxylon investiens*, isolado da alga marinha *Asparagopsis taxiformis* / Victor Hugo Lino Rufino. -- Araraquara, 2025
217 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Química, Araraquara
Orientadora: Dulce Helena Siqueira Silva

1. Fungos endofíticos. 2. Planejamento experimental. 3.
Epigenética. 4. Citotoxicidade. 5. Alga vermelha. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Esse estudo contribui para o aumento do conhecimento sobre a quimiodiversidade de fungos endofíticos de organismos marinhos, através da análise metabolômica do fungo *Hypoxyton investiens* que foi isolado da alga marinha *Asparagopsis taxiformis*. Os organismos marinhos e seus micro-organismos associados são fontes relativamente novas para obtenção de substâncias bioativas e que tenham potencial para se tornarem novos fármacos ou serem utilizadas em processos biotecnológicos. Essa pesquisa demonstrou a importância da aplicação de métodos de planejamento experimental no cultivo de fungos, ao avaliar diversas condições de cultivo com número reduzido de experimentos. Além disso, a aplicação de moduladores epigenéticos no cultivo de fungos representa um grande avanço na área de bioprospecção, pois permite ativar a expressão de vias metabólicas silenciadas e que não podem ser ativadas só com a variação das condições físico-químicas e dos nutrientes. Por fim, foi demonstrada a importância das redes moleculares, que permitem processar e agrupar milhares de espectros de massas, evitando a perda de informação e acelerando a identificação de metabólitos. De forma global, os impactos deste trabalho verificam-se também por destacar a importância do ambiente marinho brasileiro como um bioma de grande potencial químico e biotecnológico, capaz de providenciar descobertas inovadoras com desdobramentos socioeconômicos e ambientais. Além disso, o alinhamento aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da ONU é claro, especialmente o ODS 3, com metas associadas ao bem estar e melhoria da saúde, ODS 14, direcionado à conservação e uso sustentável do bioma e dos recursos marinhos para o desenvolvimento sustentável, e também o ODS 13, que prevê a adoção de medidas para combater as alterações climáticas e os seus impactos, considerando que os resultados deste estudo trazem informações relevantes no contexto de maior entendimento do metabolismo fúngico, bem como de relações ecológicas que podem contribuir para a conservação dos oceanos.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This study contributes to expanding the knowledge on the chemodiversity of endophytic fungi from marine organisms through the metabolomic analysis of the fungus *Hypoxyton investiens*, which was isolated from the marine alga *Asparagopsis taxiformis*. Marine organisms and their associated microorganisms are relatively new sources for the discovery of compounds with significant biological activities and potential to become new drugs or to be used in biotechnological processes. This research demonstrated the importance of applying experimental design methods to fungal cultivation by evaluating various culture conditions with a reduced number of experiments. Moreover, the use of epigenetic modulators in fungal cultivation represents a major advancement in the field of bioprospecting, as it enables the activation of metabolic pathways that cannot be triggered solely by changes in physicochemical conditions or nutrient composition. Finally, the relevance of molecular networking was demonstrated, as this approach allows for the processing and clustering of thousands of mass spectra, preventing data loss and accelerating metabolite identification. Overall, the impacts of this work also highlight the importance of the Brazilian marine environment as a biome of great chemical and biotechnological potential, capable of providing innovative discoveries with socioeconomic and environmental implications. In addition, the alignment with the UN Sustainable Development Goals is clear, especially SDG 3, with targets associated with well-being and improved health, SDG 14, aimed at the conservation and sustainable use of the marine biome, and resources for sustainable development, and also SDG 13, which provides for the adoption of measures to combat climate change and its impacts, considering that the results of this study provide relevant information in the context of a greater understanding of fungal metabolism, as well as ecological relationships that can contribute to the conservation of the marine biome.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Aplicação do planejamento Plackett-Burman e de moduladores epigenéticos na bioprospecção do fungo endofítico *Hypoxylon Investiens*, isolado da alga marinha *Asparagopsis taxiformis*"

AUTOR: VICTOR HUGO LINO RUFINO

ORIENTADORA: DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA

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



Prof.^a Dr.^a DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. ALAN CESAR PILON (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. LUIS OCTÁVIO REGASINI (Participação Virtual)
Departamento de Química e Ciências Ambientais / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP - São José Rio Preto

Prof.^a Dr.^a LIVIA SOMAN DE MEDEIROS (Participação Virtual)
Departamento de Química / Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - São Paulo

Prof. Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 24 de junho de 2025

Documento assinado digitalmente
 LIVIA SOMAN DE MEDEIROS
Data: 25/06/2025 07:29:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
 LUIS OCTAVIO REGASINI
Data: 25/06/2025 08:30:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
 André Gonzaga dos Santos
Data: 25/06/2025 08:30:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
 ALAN CESAR PILON
Data: 25/06/2025 09:31:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO	
	VICTOR HUGO LINO RUFINO 12/02/1992
Nacionalidade	Brasileiro
Nome em citações bibliográficas:	Rufino, Victor Hugo RUFINO, V. H. L.
Currículo Lattes	7913569582563487
FORMAÇÃO ACADÊMICA	
2017 – 2019	Mestrado em Química Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil Título: Bioprospecção do fungo endofítico <i>Hypoxyton investiens</i> isolado da alga marinha <i>Asparagopsis taxiformis</i> para obtenção de compostos bioativos. Orientador: Dulce Helena Siqueira Silva. Coorientador: Rebeca Perviate Medina.
2011 – 2016	Graduação em Química Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil Título: Agentes quimiopreventivos e outras substâncias bioativas da flora brasileira: bioprospecção em <i>Garcinia brasiliensis</i> Orientador: Dulce Helena Siqueira Silva

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

RUFINO, V. H. L.; MENDONÇA, I. C.; ALARCÓN, K. P.; ALMEIDA, A. M. F.; SILVA, G. S.; REZENDE-TEIXEIRA, P.; LOTUFO, L.; SILVA, D. H. S.
Bioactive extracts and annotation of compounds from the fungus *Hypoxylon investiens* using epigenetic modulators, Plackett-Burman design, and Feature-Based Molecular Networking.

9ª Conferência Brasileira sobre Produto Natural/XXXV RESEM, 2023, Universidade Federal da Bahia, de 24 a 27 de outubro.

MENDONÇA, I. C.; SILVA, G. S.; **RUFINO, V. H. L.**; SÁ, E. J.; SILVA, L. H.; SIQUEIRA, D. H. S.

Induction of secondary metabolites through Coculture of endophytic fungi strains isolated from marine red algae.

Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 46, 2023, Águas de Lindoia- SP.

MENDONÇA, I. C.; **RUFINO, V. H. L.**; SILVA, R. V.; SILVA, G. S.; SIQUEIRA, D. H. S.

Estudo de metabólitos secundários de fungos endofíticos isolados de alga marinha vermelha utilizando GNPS molecular network.

Simpósio Regional Sudeste de Farmacognosia em Penedo, 2, 2022, Penedo-RJ.

OUTRAS ATIVIDADES ACADÊMICAS RELEVANTES

Minicurso “Análise de dados de metabolômica explorando ferramentas do GNPS: dos princípios básicos a ferramentas *in silico* de anotação”. 28 e 29 de abril de 2021, 5 horas.

Workshop "Feature-Based Molecular Networking (FBMN)". 9 e 10 de dezembro de 2020, 4 horas.

Avaliador no XXXII Congresso de Iniciação Científica da Unesp. 20, 21 e 22 de outubro e 24 e 25 de novembro de 2020.

1º Workshop de Química de Micro-Organismos PROCAD - AM. 17 de setembro de 2020, 8 horas.

Dedico este trabalho aos meus pais, Celio e Cida, pelo imenso apoio à minha educação e pelo esforço incansável em formar filhos com caráter íntegro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Dulce Helena S. Silva, por ter acompanhado minha vida acadêmica desde a graduação, pelos ensinamentos não somente técnicos, mas também éticos e pessoais, e pela compreensão sobre os desafios da vida acadêmica e pessoal, nos ajudando a transpor essas barreiras com objetividade e leveza.

A todos atuais e ex-integrantes do nosso grupo de pesquisa, formado por pessoas incríveis, sempre dispostas a ajudar e com quem compartilhei diversas frustrações e alegrias, especialmente: Rebeca, Leonardo, Alana, Iatã, Yan, Givaldo e Lucas.

Aos outros colegas pós-graduandos do NuBBE, por enriquecerem meu trabalho ao compartilharem informações e experiências, ajudando a formar esse núcleo de pesquisa do qual tenho muito orgulho de ter feito parte.

Agradeço também aos outros professores do Departamento de Bioquímica e Química Orgânica, em especial à Profa. Dra. Isabele Rodrigues, minha supervisora durante o estágio docência, e ao professor Dr. Ian Castro-Gamboa pelas contribuições feitas ao meu trabalho desde o meu mestrado.

Um agradecimento especial à professora Dra. Kelly Johana Dussán Medina, pelos ensinamentos sobre quimiometria, tanto em sala de aula quanto pessoalmente.

Aos técnicos do NuBBE, Dra. Juliana Rodrigues e Dr. João Bronzel, por zelarem pelos laboratórios e equipamentos, pela paciência e por toda ajuda, principalmente nas análises cromatográficas e de espectrometria de massas.

Aos responsáveis pelos laboratórios de RMN, Dr. Nivaldo Boralle, Dr. Uenifer Couto e Dra. Lidiane Gaspareto, que foram fundamentais para meu aprendizado sobre RMN.

Aos demais trabalhadores do Instituto de Química da UNESP, que formam a base essencial que mantém toda essa estrutura funcionando e possibilitam que nossas pesquisas sejam feitas com qualidade.

Ao Instituto de Química da UNESP, pela administração da estrutura e dos recursos humanos. É um lugar do qual tenho muito orgulho de ter frequentado.

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

RESUMO

Os fungos endofíticos marinhos são reconhecidos como fontes promissoras de novos metabólitos bioativos, devido à sua elevada quimiodiversidade e capacidade de sintetizar compostos com potencial farmacológico. No entanto, em condições laboratoriais, muitos desses micro-organismos apresentam silenciamento gênico, resultando na inatividade de vias biossintéticas na ausência dos estímulos presentes em seu habitat natural. Para superar essa limitação, este estudo investigou o potencial metabólico do fungo *Hypoxylon investiens*, isolado da alga vermelha *Asparagopsis taxiformis*, por meio da modulação epigenética e da variação de condições físico-químicas de cultivo. Inicialmente, foram realizados cultivos em placas de 6 poços para avaliar a tolerância do fungo a diferentes concentrações de moduladores epigenéticos, como SAHA, 5-azacitidina, nicotinamida, procaína e butirato de sódio. As análises com a plataforma GNPS indicaram um aumento na diversidade de metabólitos, evidenciado pelo maior número de nós nas redes moleculares, especialmente com o uso de SAHA, 5-azacitidina e nicotinamida. Com base nesses resultados, foi conduzido um planejamento experimental do tipo Plackett–Burman para identificar as variáveis físico-químicas mais significativas na produção metabólica. Os extratos obtidos foram analisados por UHPLC-QTOF-MS² e submetidos à metodologia de *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN) na plataforma GNPS, permitindo a anotação de diversas substâncias e quantificação de *features* que foram utilizados como resposta no planejamento experimental. As condições que mais influenciaram positivamente a diversidade química incluíram temperaturas mais baixas (23°C), ausência de agitação e o uso dos moduladores SAHA, nicotinamida, butirato de sódio e procaína. Com esses dados, foi feito o cultivo em escala ampliada gerando os extratos Exp1 e Exp9. Diversas substâncias, foram isoladas incluindo dicetopiperazinas como ciclo(Pro-Tyr), ciclo(Pro-Phe), ciclo(Pro-Val), ciclo(Pro-Ile) e ciclo(Pro-Leu), além de compostos fenólicos e isocumarínicos, como 4-(2-hidroxietil)fenol, 6-hidroximeleína, 5-metilmeleína e (3S,4S)-3,4,8-trihidroxi-3,4-diidronaftalen-1(2H)-ona. Uma terfenilquinona possivelmente inédita foi isolada da fração Exp9 Fr3 e identificada como 4-hidroxi-3',4'',6'-trimetoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-2',5'-diona. Nos ensaios de bioatividade, os extratos PB01, PB02, PB03, Exp9 Fr1 e Exp9 Fr3 apresentaram atividade citotóxica contra células tumorais HCT-116, enquanto PB03 e PB12 revelaram atividade antifúngica frente a *Candida albicans*. Esses achados evidenciam o potencial de *H. investiens* como fonte de novos produtos naturais e demonstram a eficácia do uso combinado de estratégias epigenéticas, planejamento experimental e ferramentas metabolômicas como o GNPS para incremento de quimiodiversidade e bioprospecção de metabólitos bioativos.

Palavras-chave: fungos endofíticos; planejamento experimental; epigenética; citotoxicidade; alga vermelha.

ABSTRACT

Marine endophytic fungi are recognized as promising sources of novel bioactive metabolites due to their high chemodiversity and ability to synthesize compounds with pharmacological potential. However, under laboratory conditions, many of these microorganisms exhibit gene silencing, leading to the inactivity of biosynthetic genes in the absence of environmental stimuli present in their natural habitats. To overcome this limitation, this study investigated the metabolic potential of the fungus *Hypoxylon investiens*, isolated from the red alga *Asparagopsis taxiformis*, through epigenetic modulation and variation of physicochemical cultivation conditions. Initially, cultures were conducted in 6-well plates to assess the fungus's tolerance to different concentrations of epigenetic modulators, including SAHA, 5-azacytidine, nicotinamide, procaine, and sodium butyrate. Preliminary analyses using the GNPS platform indicated an increase in metabolite diversity, evidenced by a higher number of nodes in molecular networks, particularly with the use of SAHA, 5-azacytidine, and nicotinamide. Based on these results, a Plackett–Burman experimental design was conducted to identify the most significant physicochemical variables affecting metabolic production. The obtained extracts were analyzed by UHPLC-QTOF-MS² and subjected to Feature-Based Molecular Networking (FBMN) on the GNPS platform, enabling the annotation of various substances and quantification of features, which were used as responses in the experimental design. The conditions that positively influenced chemical diversity included lower temperatures (23°C), absence of agitation, and the use of SAHA, nicotinamide, sodium butyrate, and procaine. Using these data, scaled-up cultivation was performed, generating extracts Exp1 and Exp9. After fractionation steps, several substances were isolated, including diketopiperazines such as cyclo(Pro-Tyr), cyclo(Pro-Phe), cyclo(Pro-Val), cyclo(Pro-Ile), and cyclo(Pro-Leu), as well as phenolic and isocoumarin compounds like 4-(2-hydroxyethyl)phenol, 6-hydroxymellein, 5-methylmellein, and (3S,4S)-3,4,8-trihydroxy-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one. A potentially novel terphenylquinone was isolated from fraction Exp9 Fr3 and identified as 4-hydroxy-3',4'',6'-trimethoxy-[1,1':4',1''-terphenyl]-2',5'-dione. In bioactivity assays, extracts PB01, PB02, PB03, Exp9 Fr1, and Exp9 Fr3 exhibited cytotoxic activity against HCT-116 tumor cells, while PB03 and PB12 demonstrated antifungal activity against *Candida albicans*. These findings highlight the potential of *H. investiens* as a source of new natural products and demonstrate the effectiveness of combining epigenetic strategies, experimental design, and metabolomic tools such as GNPS to trigger chemodiversity and in the bioprospecting of bioactive metabolites.

Keywords: endophytic fungi; design of experiments; epigenetics; cytotoxicity; red algae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 — Estrutura química da artemisinina e de alguns derivados.....	30
Figura 2 — Todos os novos medicamentos aprovados de 1º de janeiro de 1981 a 30 de setembro de 2019; $n = 1881$. B (Biológico) : Peptídeo ou proteína de grande porte (geralmente com mais de 50 resíduos), isolado de um organismo ou linhagem celular, ou produzido por meios biotecnológicos em um hospedeiro substituto. N (Produto Natural) : Composto obtido diretamente de fontes naturais, sem modificações estruturais significativas. NB (Produto Natural Botânico) : Mistura botânica definida, geralmente aprovada recentemente, reconhecida como entidade farmacêutica por órgãos reguladores como o FDA. ND (Derivado de Produto Natural) : Composto derivado de um produto natural, geralmente por modificação semissintética. S (Fármaco Totalmente Sintético) : Fármaco desenvolvido por síntese total, frequentemente descoberto por triagem aleatória ou modificação de um agente existente. S* (Fármaco Sintético com Farmacóforo Natural) : Fármaco produzido por síntese total, mas cujo farmacóforo é ou foi derivado de um produto natural. V (Vacina) : Preparação biológica que fornece imunidade adquirida contra uma doença específica. NM : Mímico de Produto Natural.	31
Figura 3 — Fármacos comerciais derivados de organismos marinhos.	33
Figura 4 — Contagem de novos compostos de origem marinha por região/país no período de 1965 a 2014.	36
Figura 5 — Binaftalenos inéditos isolados de <i>Hypoxylon investiens</i>	61
Figura 6 — Exemplos de estruturas semelhantes aos binaftalenos descritos na literatura.	62
Figura 7 — Visão geral da regulação epigenética da expressão gênica. (A): modificações nas caudas de histonas. (B): metilação do DNA. (C): interferência de RNA.....	64
Figura 8 — Esquema de funcionamento do GNPS.	68
Figura 9 — Representação esquemática dos vetores dos espectros A e B.	69
Figura 10 — Redes moleculares de espectros LC-MS/MS de derivados de triptofano e biotina (obtidos da biblioteca espectral EMBL MCF do GNPS).....	70
Figura 11 — Dois métodos para a geração de redes moleculares a partir de dados de MS com a plataforma GNPS. MN clássico: espectros de MS^2 são agrupados com o algoritmo MS-Cluster e os espectros de consenso MS^2 obtidos são usados para	

geração de redes moleculares. FBMN: primeiro é aplicado uma ferramenta de detecção e alinhamento de <i>features</i> para processar os dados de LC-MS ² . Os resultados são exportados como tabela de quantificação de <i>features</i> (formato .TXT) e sumário espectral MS ² (formato .MGF) ou um arquivo mzTab-M e carregados para a plataforma GNPS para análise por redes moleculares.	71
Figura 12 — Placas de cultivo de <i>Hypoxylon investiens</i> (AT-01) depois de 7 dias de crescimento em meio BDA e discos de micélios retirados com ponteira de 1 mL.....	77
Figura 13 — Início do cultivo fúngico em placa de 6 poços, no qual duas placas foram usadas para cada modulador.	77
Figura 14 — Esquema de obtenção dos extratos fúngicos cultivados em placa de 6 poços.....	79
Figura 15 — Parâmetros utilizados na plataforma GNPS para geração de redes moleculares método “clássico”.	81
Figura 16 — Frascos do cultivo com o planejamento Plackett-Burman dentro da incubadora.....	84
Figura 17 — Fluxograma de obtenção dos extratos do cultivo realizado com o planejamento Plackett-Burman e análises realizadas com esses extratos.	86
Figura 18 — Parâmetros utilizados na plataforma GNPS para geração de redes moleculares dos extratos do planejamento Plackett-Burman.....	88
Figura 19 — Parâmetros utilizados na plataforma GNPS para geração das redes de <i>features</i> (FBMN).	91
Figura 20 — <i>Hypoxylon investiens</i> após 11 dias de cultivo em placas de 6 poços na presença de moduladores epigenéticos em diversas concentrações. 5-Aza, Nicotinamida, Prc HCl e SAHA: Poço 1 = 1000 µM, 2 = 200 µM, 3 = 40 µM, 4 = 8,0 µM, 5 = 1,6 µM, 6 = 0,0 µM. NaBut: 1 = 500 mM, 2 = 50 mM, 3 = 5 mM, 4 = 0,5 mM, 5 = 0,05 mM, 6 = 0,0 mM.	98
Figura 21 — <i>Molecular networking</i> “clássico” dos extratos do cultivo em placa de 6 poços (modo de ionização positivo). Vermelho: SAHA, amarelo: nicotinamida, verde: procaína, ciano: NaBut, azul: 5-Aza e magenta: sem modulador. Os nós estão rotulados com a massa do íon precursor e os números destacados são referentes às substâncias anotadas.....	102
Figura 22 — <i>Molecular networking</i> “clássico” dos extratos do cultivo em placa de 6 poços filtrado para exibir os nós relativos ao extrato fúngico sem modulador (cor magenta).	103

Figura 23 — Nós obtidos com uso de SAHA coloridos em vermelho. O brilho da cor é proporcional à concentração do modulador. Os nós dos outros moduladores estão coloridos em cinza.....	104
Figura 24 — Nós obtidos com uso de 5-azacitidina coloridos em azul. Os nós dos outros moduladores estão coloridos em cinza.	105
Figura 25 — Nós obtidos com uso de procaína coloridos em verde. Os nós dos outros moduladores estão coloridos em cinza.	105
Figura 26 — Nós obtidos com uso de nicotinamida coloridos em amarelo. Os nós dos outros moduladores estão coloridos em cinza.	106
Figura 27 — Nós obtidos com uso de butirato de sódio coloridos em ciano. Os nós dos outros moduladores estão coloridos em cinza.....	106
Figura 28 — Extratos obtidos seguindo o planejamento Plackett-Burman.....	108
Figura 29 — Gráficos de média de efeito principal para cada fator nos níveis -1, +1 e ponto central.....	113
Figura 30 — Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados. As barras que ultrapassam a linha vermelha estão associadas aos fatores significativos ($\alpha = 0,05$).	114
Figura 31 — Gráfico normal dos efeitos padronizados ($\alpha = 0,05$).	115
Figura 32 — Cromatogramas de pico base obtidos por UHPLC-MS/MS dos extratos PB01–PB16 e dos brancos, modo de ionização positiva. Acetonitrila e H ₂ O como fase móvel. Gradiente de 5-100% de Acetonitrila em 10 minutos.....	116
Figura 33 — <i>Feature-Based Molecular Networking</i> dos extratos do cultivo com planejamento Plackett-Burman (modo de ionização positivo). Cores diferentes para cada extrato. Os nós estão rotulados com a massa de íon precursor e os números destacados são referentes às substâncias anotadas.	120
Figura 34 — Espectros MS/MS das estruturas exclusivas dos extratos fúngicos (PB01–PB16). Espectros obtidos, coloridos de preto, e os da biblioteca, de verde.	126
Figura 35 — Rede molecular clássica dos extratos do cultivo com planejamento Plackett-Burman (modo de ionização positivo). Cores diferentes para cada extrato. Os nós estão rotulados com a massa de íon precursor e os números destacados são referentes às substâncias anotadas.....	132
Figura 36 — Cromatograma em gradiente exploratório do extrato Exp1 (preto), Exp9 (rosa), branco do malte (azul) e branco do PDB (marrom). Eluição em gradiente de 5-100% MeOH em 30 min e detecção em $\lambda = 254$ nm.	136

Figura 37 — Espectros MS/MS das estruturas anotadas nos extratos fúngicos Exp1 e Exp9, obtidos de cultivos em escala ampliada. Espectros obtidos, coloridos em preto, e os da biblioteca em verde.....	142
Figura 38 — <i>Feature-Based Molecular Networking</i> dos extratos do cultivo em escala ampliada (modo de ionização positivo). Cores diferentes para cada extrato. Os nós estão rotulados com a massa de íon precursor e os números destacados são referentes às substâncias anotadas.....	145
Figura 39 — Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD analítico das frações Exp1 Fr1 (preto), Fr2 (rosa) e Fr3 (azul). $\lambda = 254$ nm. 5–100 % de MeOH em 35 min.	147
Figura 40 — Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD analítico das frações Exp1 Fr1 (preto), Fr2 (rosa) e Fr3 (azul). $\lambda = 220$ nm. 5–100 % de MeOH em 35 min.	147
Figura 41 — Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD analítico da amostra Exp1 Fr1 ($\lambda = 220$ nm). Cromatograma de cima (preto): Gradiente exploratório 5–100 % de MeOH em 40 min. Cromatograma de baixo (azul escuro): 5–18–40–60–100 % de MeOH em 0–13–15–40–42 min, método escolhido para realizar o isolamento.	148
Figura 42 — Cromatograma de pico base de UHPLC-MS da fração Exp1 Fr1. Modo de ionização negativa na parte superior e modo positivo na inferior. Eluição com acetonitrila e H ₂ O como fase móvel. Gradiente de 5-100% de Acetonitrila em 10 minutos.....	148
Figura 43 — Cromatograma de pico base de UHPLC-MS do branco do sistema (somente solvente). Modo de ionização negativa na parte superior e modo positivo na inferior.	149
Figura 44 — Cromatograma de HPLC-DAD semipreparativo da fração Exp1 Fr1 ($\lambda = 220$ nm). Gradiente: 5–18–40–60–100 % de MeOH em 0–13–15–40–42 min. Injeção: 100 μ L.	149
Figura 45 — Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD analítico das amostras Sx1–Sx6 ($\lambda = 220$ nm). Gradiente de eluição: 5–100 % de MeOH em 30 min.	151
Figura 46 — Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD analítico da amostra Exp9 Fr1 (rosa: $\lambda = 220$ nm, azul: $\lambda = 254$ nm e marrom: $\lambda = 320$ nm). Gradiente de eluição: 5–100 % de MeOH em 30 min.	152
Figura 47 — Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD analítico das amostras Sx7–Sx13 ($\lambda = 220$ nm). Gradiente de eluição: 5–100 % de MeOH em 30 min.	152

Figura 48 — Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD analítico da amostra Exp9 Fr2 (rosa: $\lambda = 220$ nm, azul: $\lambda = 254$ nm e marrom: $\lambda = 320$ nm). Gradiente de eluição: 5–100 % de MeOH em 30 min.	153
Figura 49 — Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD analítico das amostras Sx14–Sx20 ($\lambda = 220$ nm). Gradiente de eluição: 5–100 % de MeOH em 30 min.	153
Figura 50 — Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD analítico da amostra Exp9 Fr3 (rosa: $\lambda = 220$ nm, azul: $\lambda = 254$ nm e marrom: $\lambda = 320$ nm). Gradiente de eluição: 5–100 % de MeOH em 30 min.	154
Figura 51 — Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD analítico das amostras Sx21–Sx26 ($\lambda = 220$ nm). Gradiente de eluição: 5–100 % de MeOH em 30 min.	154
Figura 52 — Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD analítico das amostras Sx27–Sx33 ($\lambda = 220$ nm). Gradiente de eluição: 5–100 % de MeOH em 30 min.	155
Figura 53 — Cromatograma de HPLC-DAD semipreparativo da fração Exp9 Fr3 ($\lambda = 220$ nm). Gradiente: 5–10–35–75–100 % de MeOH em 0–5–10–50–55 min. Injeção: 100 μ L.	155
Figura 54 — Estrutura e espectro UV-Vis da substância Fr1 P5.....	158
Figura 55 — Espectro de RMN de ^1H da substância Fr1 P5 (CD_3OD , 600 MHz)...	159
Figura 56 — Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) da substância Fr1 P5 (CD_3OD , 150 MHz). Sinais negativos referentes aos carbonos quaternários e metilênicos.	159
Figura 57 — Mapa de contorno de COSY da substância Fr1 P5.	160
Figura 58 — Mapa de contorno de HSQC da substância Fr1 P5. Carbonos metilênicos nas correlações em vermelho.	161
Figura 59 — Mapa de contorno de HMBC da substância Fr1 P5.....	161
Figura 60 — Cromatograma de pico base de UHPLC-MS da amostra Fr1 P5. Modo de ionização negativa na parte superior e modo positivo na inferior. Eluição com acetonitrila e H_2O como fase móvel. Gradiente de 5-100% de Acetonitrila em 10 minutos.....	163
Figura 61 — Estrutura e espectro UV-Vis da substância Fr1 P9.....	164
Figura 62 — Espectro de RMN de ^1H da substância Fr1 P9 (CD_3OD , 600 MHz)...	164
Figura 63 — Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) da substância Fr1 P9 (CD_3OD , 150 MHz). Sinais negativos referentes aos carbonos quaternários e metilênicos.	165
Figura 64 — Mapa de contorno de COSY da substância Fr1 P9.	166
Figura 65 — Mapa de contorno de HSQC da substância Fr1 P9. Carbonos metilênicos nas correlações em vermelho.	166

Figura 66 — Mapa de contorno de HMBC da substância Fr1 P9.....	167
Figura 67 — Cromatograma de pico base de UHPLC-MS da amostra Fr1 P9. Modo de ionização negativa na parte superior e modo positivo na inferior. Eluição com acetonitrila e H ₂ O como fase móvel. Gradiente de 5-100% de Acetonitrila em 10 minutos.....	169
Figura 69 — Estrutura e espectro UV-Vis da substância Fr1 P6.....	169
Figura 70 — Espectro de RMN de ¹ H da substância Fr1 P6 (CD ₃ OD, 600 MHz)...	170
Figura 70 — Espectro de RMN de ¹³ C (DEPTQ) da substância Fr1 P6 (CD ₃ OD, 150 MHz). Sinais negativos referentes aos carbonos quaternários e metilênicos.	171
Figura 71 — Mapa de contorno de COSY da substância Fr1 P6.	171
Figura 72 — Mapa de contorno de HSQC da substância Fr1 P6. Carbonos metilênicos nas correlações em vermelho.	172
Figura 73 — Mapa de contorno de HMBC da substância Fr1 P6.....	172
Figura 74 — Cromatograma de pico base de UHPLC-MS da amostra Fr1 P6. Modo de ionização negativa na parte superior e modo positivo na inferior. Eluição com acetonitrila e H ₂ O como fase móvel. Gradiente de 5-100% de Acetonitrila em 10 minutos.....	174
Figura 75 — Estrutura e espectro UV-Vis da substância Fr1 P7.....	175
Figura 76 — Estrutura e espectro UV-Vis da substância Fr1 P8.....	175
Figura 77 — Espectro de RMN de ¹ H da substância Fr1 P7 (CD ₃ OD, 600 MHz)...	176
Figura 78 — Espectro de RMN de ¹ H da substância Fr1 P8 (CD ₃ OD, 600 MHz)...	176
Figura 79 — Espectro de RMN de ¹³ C (DEPTQ) da substância Fr1 P7 (CD ₃ OD, 150 MHz). Sinais negativos referentes aos carbonos quaternários e metilênicos.	177
Figura 80 — Espectro de RMN de ¹³ C (DEPTQ) da substância Fr1 P8 (CD ₃ OD, 150 MHz). Sinais negativos referentes aos carbonos quaternários e metilênicos.	177
Figura 81 — Mapa de contorno de COSY da substância Fr1 P7.	178
Figura 82 — Mapa de contorno de COSY da substância Fr1 P8.	178
Figura 83 — Mapa de contorno de HSQC da substância Fr1 P7. Carbonos metilênicos nas correlações em vermelho.	179
Figura 84 — Mapa de contorno de HSQC da substância Fr1 P8. Carbonos metilênicos nas correlações em vermelho.	179
Figura 85 — Mapa de contorno de HMBC da substância Fr1 P7.....	180
Figura 86 — Mapa de contorno de HMBC da substância Fr1 P8.....	180

Figura 87 — Cromatogramas de pico base de UHPLC-MS/MS da amostra Fr1 P7. Modo de ionização negativa na parte superior e modo positivo na inferior.	184
Figura 88 — Cromatogramas de pico base de UHPLC-MS/MS da amostra Fr1 P8. Modo de ionização negativa na parte superior e modo positivo na inferior.	184
Figura 89 — Estrutura e espectro UV-Vis da substância Fr3 P6.	185
Figura 90 — Espectro de RMN de ^1H da substância Fr3 P6 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	185
Figura 91 — Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) da substância Fr3 P6 (DMSO- d_6 , 150 MHz). Sinais negativos referentes aos carbonos quaternários e metilênicos.	186
Figura 92 — Mapa de contorno de HSQC da substância Fr3 P6. Carbonos metilênicos nas correlações em vermelho.	186
Figura 93 — Mapa de contorno de HMBC da substância Fr3 P6.	187
Figura 94 — Cromatogramas de pico base de UHPLC-MS/MS da amostra Fr3 P6. Modo de ionização negativa na parte superior e modo positivo na inferior. Acetonitrila e H_2O como fase móvel. Gradiente de 5-100% de Acetonitrila em 10 minutos.	188
Figura 95 — Espectro de massas MS/MS da substância Fr3 P6. $t_R = 2,48$ min, <i>full scan</i> , modo negativo.	188
Figura 96 — Estrutura e espectro UV-Vis da substância Fr3 P7.	189
Figura 97 — Espectro de RMN de ^1H da substância Fr3 P7 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	190
Figura 98 — Espectro NOESY da substância Fr3 P7. Sinal de referência irradiado: δ_{H} 3,99 ppm, H-3 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	190
Figura 99 — Estruturas dos quatro possíveis estereoisômeros da 3,4,8-trihidroxi-3,4-diidronaftalen-1(2 <i>H</i>)-ona. As linhas e números em verde mostram a distância, em ângstrons, entre o núcleo irradiado H-3 e os H-2a e H-2b, conforme cálculos preliminares realizados pelo ChemDraw.	191
Figura 100 — Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) da substância Fr3 P7 (DMSO- d_6 , 150 MHz). Sinais negativos referentes aos carbonos quaternários e metilênicos.	191
Figura 101 — Mapa de contorno de HSQC da substância Fr3 P7. Carbonos metilênicos nas correlações em vermelho.	192
Figura 102 — Mapa de contorno de HMBC da substância Fr3 P7.	192
Figura 103 — Cromatogramas de pico base de UHPLC-MS/MS da amostra Fr3 P7. Modo de ionização negativa na parte superior e modo positivo na inferior.	194

Figura 104 — Espectro de massas MS/MS da substância Fr3 P7. $t_R = 2,88$ min, <i>full scan</i> , modo negativo.	194
Figura 105 — Estrutura e espectro UV-Vis da substância Fr3 P10.	195
Figura 106 — Estrutura e espectro UV-Vis da substância Fr3 P13.	195
Figura 107 — Espectro de RMN de ^1H da substância Fr3 P10 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	196
Figura 108 — Espectro de RMN de ^1H da substância Fr3 P13 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	196
Figura 109 — Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) da substância Fr3 P10 (DMSO- d_6 , 150 MHz). Sinais negativos referentes aos carbonos quaternários e metilênicos...	197
Figura 110 — Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) da substância Fr3 P13 (DMSO- d_6 , 150 MHz). Sinais negativos referentes aos carbonos quaternários e metilênicos...	197
Figura 111 — Mapa de contorno de HSQC da substância Fr3 P10. Carbonos metilênicos nas correlações em vermelho.	198
Figura 112 — Mapa de contorno de HSQC da substância Fr3 P13. Carbonos metilênicos nas correlações em vermelho.	198
Figura 113 — Mapa de contorno de HMBC da substância Fr3 P10.	199
Figura 114 — Mapa de contorno de HMBC da substância Fr3 P13.	199
Figura 115 — Cromatogramas de pico base de UHPLC-MS/MS da amostra Fr3 P10. Modo de ionização negativa na parte superior e modo positivo na inferior.	202
Figura 116 — Espectro de massas MS/MS da substância Fr3 P10. $t_R = 3,84$ min, <i>full scan</i> , modo negativo e positivo.	202
Figura 117 — Cromatogramas de pico base de UHPLC-MS/MS da amostra Fr3 P13. Modo de ionização negativa na parte superior e modo positivo na inferior.	203
Figura 118 — Espectro de massas MS/MS da substância Fr3 P13. $t_R = 4,89$ min, <i>full scan</i> , modo positivo.	203
Figura 119 — Estrutura e espectro UV-Vis da substância Fr3 P14.	204
Figura 120 — Espectro de RMN de ^1H da substância Fr3 P14 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	205
Figura 121 — Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) da substância Fr3 P14 (DMSO- d_6 , 150 MHz). Sinais negativos referentes aos carbonos quaternários e metilênicos...	205
Figura 122 — Mapa de contorno de HSQC da substância Fr3 P14. Carbonos metilênicos nas correlações em vermelho.	206
Figura 123 — Mapa de contorno de HMBC da substância Fr3 P14.	207

Figura 124 — Correlações J_{H-C} observadas no experimento HMBC (setas azuis) para Fr3 P14 e estrutura da Floricolin O.	207
Figura 125 — Cromatogramas de pico base de UHPLC-MS/MS da amostra Fr3 P14. Modo de ionização negativa na parte superior e modo positivo na inferior.	209
Figura 126 — Espectro de massas MS/MS da substância Fr3 P14. $t_R = 4,76$ min, <i>full scan</i> , modo negativo e positivo. Setas e números em vermelho: variação de m/z . 209	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Concentração dos moduladores epigenéticos em cada poço da placa utilizada para cultivo do fungo <i>H. investiens</i>	78
Tabela 2 — Fatores avaliados no planejamento Plackett-Burman e seus respectivos valores.....	82
Tabela 3 — Cultivo fúngico seguindo o planejamento Plackett-Burman com 11 variáveis (fatores) e 4 pontos centrais.....	83
Tabela 4 — Parâmetros utilizados no <i>software</i> MZmine para o processamento dos dados de LC-MS/MS.	90
Tabela 5 — Massa (mg) dos extratos obtidas do cultivo em placa de 6 poços na presença de moduladores epigenéticos nas concentrações especificadas da Figura 10.	98
Tabela 6 — Substâncias anotadas a partir do cultivo em placa de 6 poços e respectivas relações massa/carga (<i>m/z</i>).	99
Tabela 7 — Estruturas e espectros MS/MS das substâncias anotadas a partir do cultivo em placas de 6 poços. Espectros obtidos, coloridos de preto, e os da biblioteca, de verde.	100
Tabela 8 — Quantidade de nós considerando diferentes concentrações de cada modulador, epigenético, excluindo aqueles presentes no extrato controle.	104
Tabela 9 — Quantidade de nós exclusivos nos extratos obtidos com cada modulador em diferentes concentrações.	107
Tabela 10 — Rendimento de massa de extrato do cultivo com planejamento Plackett-Burman.....	109
Tabela 11 — Resultado da avaliação antifúngica dos extratos e de agentes antifúngicos comerciais para <i>Candida albicans</i> . MIC: concentração inibitória mínima 90%, MFC: concentração fungicida máxima.	110
Tabela 12 — Teste de inibição de HCT-116 (carcinoma colorretal) de extratos selecionados em duas concentrações (50 µg/mL e 5 µg/mL).	111
Tabela 13 — Quantidade e média das intensidades dos <i>features</i> dos extratos obtidos com o planejamento Plackett-Burman.....	112
Tabela 14 — Valores dos efeitos principais para cada fator do planejamento Plackett-Burman.....	113

Tabela 15 — Substâncias anotadas com FBMN (alta resolução) do cultivo com planejamento Plackett-Burman e respectivas relações massa/carga (m/z).	121
Tabela 16 — Substâncias anotadas com rede molecular clássica (alta resolução) do cultivo com planejamento Plackett-Burman e respectivas relações massa/carga (m/z).	133
Tabela 17 — Extratos obtidos em escala ampliada do crescimento do fungo <i>H. investiens</i>	135
Tabela 18 — Substâncias anotadas com FBMN (MS de alta resolução) do cultivo em escala ampliada e respectivas relações massa/carga (m/z).	137
Tabela 19 — Frações obtidas por cromatografia em coluna do extrato Exp1.....	146
Tabela 20 — Massas das subfrações referentes picos cromatográficos isolados da fração 1 do extrato Exp1.	150
Tabela 21 — Frações obtidas por cromatografia por exclusão de tamanho do extrato Exp9.	151
Tabela 22 — Massas das subfrações relativas aos picos cromatográficos obtidas da fração 3 do extrato Exp9.	156
Tabela 23 — Teste de inibição da linhagem HCT-116 (carcinoma colorretal) de algumas frações em duas concentrações (50 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$).	157
Tabela 24 — Teste de inibição da linhagem MCF7 (adenocarcinoma de mama) de algumas frações em duas concentrações (50 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$).	157
Tabela 25 — Sinais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância Fr1 P5 e correlações observadas nos experimentos 2D de RMN.	162
Tabela 26 — Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr1 P5 (600 e 150 MHz, CD_3OD) e para ciclo(L-Pro-L-Tir).	162
Tabela 27 — Sinais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância Fr1 P9 e correlações observadas nos experimentos 2D de RMN.	167
Tabela 28 — Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr1 P9 (600 e 150 MHz, CD_3OD) e para ciclo(Phe-Pro).	168
Tabela 29 — Sinais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância Fr1 P6 e correlações observadas nos experimentos 2D de RMN.	173
Tabela 30 — Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr1 P6 (600 e 150 MHz, CD_3OD) e para ciclo(Pro-Val).	173
Tabela 31 — Sinais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância Fr1 P7 e correlações observadas nos experimentos 2D de RMN.	181

Tabela 32 — Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr1 P7 (600 e 150 MHz, CD_3OD) e para ciclo(Pro-Ile).	181
Tabela 33 — Sinais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância Fr1 P8 e correlações observadas nos experimentos 2D de RMN.	182
Tabela 34 — Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr1 P8 (600 e 150 MHz, CD_3OD) e para ciclo(L-Pro-L-Leu).	183
Tabela 35 — Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância Fr3 P6 e correlações observadas nos experimentos 2D de RMN.	187
Tabela 36 — Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr3 P6 (600 e 150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) e comparação com dados da literatura para o 4-(2-hidroxietil)fenol*.	187
Tabela 37 — Sinais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância Fr3 P7 e correlações observadas nos experimentos 2D de RMN.	193
Tabela 38 — Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr3 P7 (600 e 150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) e comparação com dados da literatura para a (3S,4S)-3,4,8-trihidroxi-3,4-diidronaftalen-1(2H)-ona*.	193
Tabela 39 — Sinais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância Fr3 P10 e correlações observadas nos experimentos 2D de RMN.	200
Tabela 40 — Sinais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância Fr3 P13 e correlações observadas nos experimentos 2D de RMN.	200
Tabela 41 — Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr3 P10 (600 e 150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) e comparação com dados da literatura para a 6-Hidroximeleína*.	200
Tabela 42 — Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr3 P13 (600 e 150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) e comparação com dados da literatura para a 5-Metilmeleína*.	201
Tabela 43 — Sinais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância Fr3 P14 e correlações observadas nos experimentos 2D de RMN.	207
Tabela 44 — Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr3 P14 (600 e 150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) e comparação com dados da literatura para a Floricolin O*.	208

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 — Substâncias isoladas de espécies de <i>Hypoxylon</i> e suas respectivas atividades biológicas.	40
Quadro 2 — Solventes e elicitores epigenéticos utilizados durante a execução da pesquisa.	74
Quadro 3 — Meios de cultivos utilizados.	74
Quadro 4 — Alguns equipamentos usados para o desenvolvimento do projeto	75

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

^{13}C	Carbono-13
^1H	Prótio
5-Aza	5-Azacitidina
AA'BB'	Padrão de acoplamento aromático simétrico
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CD_3OD	Metanol deuterado
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COSY	Correlation Spectroscopy
d	Dubleto
Da	Dalton
DEPTQ	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer with Quaternary Suppression
δ	Deslocamento químico
$\text{DMSO-}d_6$	Dimetilsulfóxido deuterado
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FBMN	Feature-Based Molecular Networking
FDA	Food and Drug Administration
GNPS	Global Natural Products Social Molecular Networking
HCT-116	Linhagem celular de carcinoma colorretal humano
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC-DAD	High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
J	Constante de acoplamento
LC-MS/MS	Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry
λ	Comprimento de onda (UV-Vis)
m	Multiplete
m/z	Razão massa/carga
$[\text{M}+\text{H}]^+$	Íon protonado
$[\text{M}-\text{H}]^-$	Íon desprotonado
MeOD	Metanol deuterado

MeOH	Metanol
MFC	Maximum Fungicidal Concentration
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MS/MS	Espectro de fragmentação
MSV000093521	Código do dataset público no MassIVE
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
MZmine	Software para processamento de dados de MS
NaBut	Butirato de sódio (Sodium Butyrate)
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
PDB	Potato Dextrose Broth
ppm	Partes por milhão
Prc HCl	Cloridrato de procaína
<i>q</i>	Quarteto
QToF	Analizador quadrupolo tempo de voo
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPM	Rotações por minuto
RT	Retention Time
®	Marca registrada
<i>s</i>	Singleto
SAHA	Suberoylanilide hydroxamic acid
<i>sl</i>	Singleto largo
<i>t</i>	Tripleto
<i>t_R</i>	Tempo de retenção
UA	Unidade Arbitrária
UHPLC-MS/MS	Ultra High Performance Liquid Chromatography - Tandem MS
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
1.1 PRODUTOS NATURAIS	29
1.1.1 Produtos Naturais Marinhos	32
1.1.2 Algas marinhas	37
1.1.3 Fungos endofíticos	38
1.1.3.1 Fungos do gênero <i>Hypoxylon</i>	38
1.2 EPIGENÉTICA	62
1.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	65
1.4 MOLECULAR NETWORKING (REDES MOLECULARES)	66
1.4.1 <i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i> (GNPS)	67
1.4.2 <i>Feature-based molecular networking</i>	70
2 OBJETIVO GERAL	73
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	73
3 MATERIAIS E MÉTODOS	74
3.1 SOLVENTES, MEIOS DE CULTIVOS E ELICITORES EPIGENÉTICOS	74
3.2 EQUIPAMENTOS PARA CULTIVO FÚNGICO E PREPARO DE AMOSTRAS ..	75
3.3 COLETA DA ALGA, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA LINHAGEM FÚNGICA	75
3.4 CULTIVO EM PLACA DE 6 POÇOS	76
3.4.1 Cromatografia Líquida com analisador <i>ion trap</i>	79
3.4.2 Análise por rede molecular “clássica” no GNPS	80
3.6 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTO PLACKETT-BURMAN	81
3.6.1 Cultivo e extração dos fungos seguindo o planejamento Plackett-Burman	84
3.6.2 Análise por UHPLC-MS/MS	87
3.6.3 Geração das redes moleculares	87
3.6.3.1 Processamento no software <i>MZmine</i>	89
3.6.3.2 <i>Feature-Based Molecular Networking</i>	90
3.7 CRESCIMENTO FÚNGICO EM ESCALA AMPLIADA	91
3.7.1 Análises cromatográficas dos extratos obtidos em escala ampliada	92
3.7.2 Fracionamento dos extratos	92
3.7.2.1 Fracionamento por cromatografia em coluna	92
3.7.2.1 Fracionamento por cromatografia por exclusão de tamanho	93

3.7.3 Purificação das frações por HPLC-DAD semi-preparativo	94
3.8 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS POR RMN E UHPLC-MS.....	94
3.9 ANÁLISES DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	95
3.9.1 Testes de atividade antifúngica	95
3.9.2 Testes de atividade citotóxica	95
4 RESULTADOS.....	97
4.1 CULTIVO EM PLACA DE 6 POÇOS	97
4.1.1 Análise metabolômica por <i>molecular networking</i> “clássico” dos extratos	99
4.1.1.1 Anotação de substâncias dos extratos	99
4.1.1.2 Análise das redes moleculares dos extratos	101
4.2 CULTIVO COM PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN.....	108
4.2.1 Testes de atividades biológicas.....	109
4.2.1.1 Atividade antifúngica	110
4.2.1.2 Atividade citotóxica.....	111
4.2.2 Análise do planejamento Plackett-Burman.....	111
4.2.3 Análises metabolômica com os dados de UHPLC-MS/MS	115
4.2.3.1 Redes moleculares baseadas em features (FBMN).....	119
4.2.3.2 Rede molecular “clássica”	130
4.3 CRESCIMENTO EM ESCALA AMPLIADA	134
4.3.1 Análise por HPLC-DAD	135
4.3.2 Análise por FBMN dos extratos Exp1 e Exp9.....	136
4.3.3 Fracionamento dos extratos	146
4.3.3.1 Fracionamento e purificação do extrato Exp1	146
4.3.3.2 Fracionamento e purificação do extrato Exp9	150
4.3.4 Testes de atividade citotóxica	156
4.4 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	157
4.4.1 Exp1 Fr1 P5	158
4.4.2 Exp1 Fr1 P9	163
4.4.3 Exp1 Fr1 P6	169
4.4.3 Exp1 Fr1 P7 e P8	174
4.4.4 Exp9 Fr3 P6	184
4.4.5 Exp9 Fr3 P7	189
4.4.6 Exp9 Fr3 P10 e Exp9 Fr3 P13.....	194

4.4.7 Exp9 Fr3 P14	204
5 CONCLUSÃO	210
REFERÊNCIAS	212

1 INTRODUÇÃO

1.1 PRODUTOS NATURAIS

Durante os milhares de anos da história humana, os preparos com plantas foram essenciais para a cura e tratamento de doenças, especialmente em períodos nos quais os procedimentos cirúrgicos eram precários e o conhecimento sobre micro-organismos e mecanismos metabólicos era inexistente (PATRIDGE et al., 2016).

O acúmulo desse conhecimento milenar, aliado ao avanço tecnológico das técnicas relacionadas ao estudo de produtos naturais, resultou na descoberta de diversos fármacos e produtos biotecnológicos. Um dos exemplos mais notáveis é o caso da artemisinina (**Figura 1**), presente na planta *Artemisia annua*, que rendeu à pesquisadora Tú Yōuyōu o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2015.

Ao consultar os registros de Gě Hóng, datados de aproximadamente 1700 anos, a professora Tú encontrou uma receita descrevendo como obter um “suco” de Qīnghāo (*A. annua*), utilizado tradicionalmente no tratamento de febres. Duas informações cruciais estavam contidas nessa receita: o uso de água gelada para o preparo e a utilização das folhas como fonte da infusão.

Com base nisso, a professora Tú substituiu o etanol por éter e realizou a extração em baixa temperatura das folhas, obtendo um extrato mais estável, capaz de inibir a malária em roedores e macacos com 100% de eficácia. Devido a esses resultados excepcionais, diversos pesquisadores passaram a se dedicar ao isolamento, caracterização e produção em larga escala da artemisinina e de seus derivados (SU; MILLER, 2015).

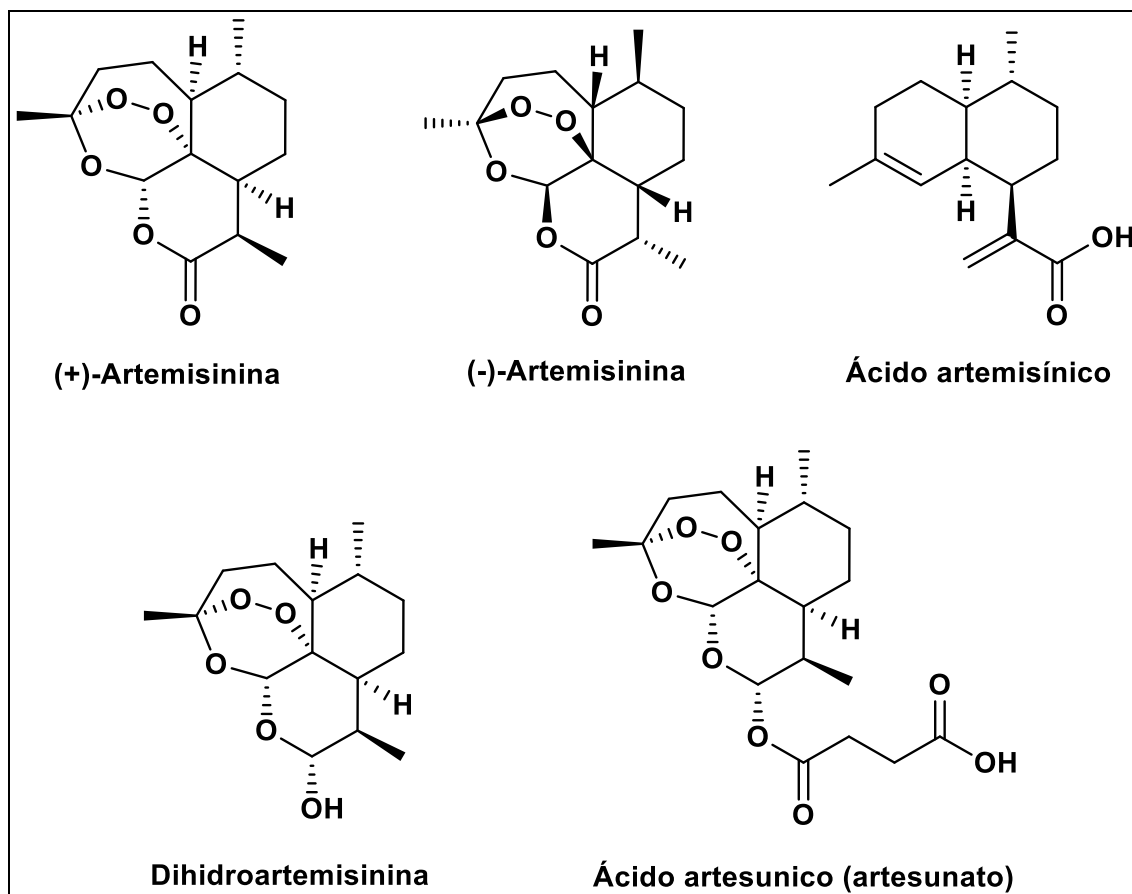


Figura 1 — Estrutura química da artemisinina e de alguns derivados.

Fonte: Adaptado de PETER et al., 2021

Nas últimas décadas, observou-se uma diminuição nos grupos de pesquisa da indústria farmacêutica voltados ao uso de produtos naturais como fonte para o desenvolvimento de novos fármacos. Ainda assim, os produtos naturais continuam sendo uma fonte fundamental na descoberta de novas substâncias bioativas. Em uma revisão recente, Newman e Cragg (2020) demonstraram que 46% dos fármacos aprovados para uso humano entre 1981 e 2019 são produtos naturais ou derivados sintéticos inspirados em produtos naturais (**Figura 2**).

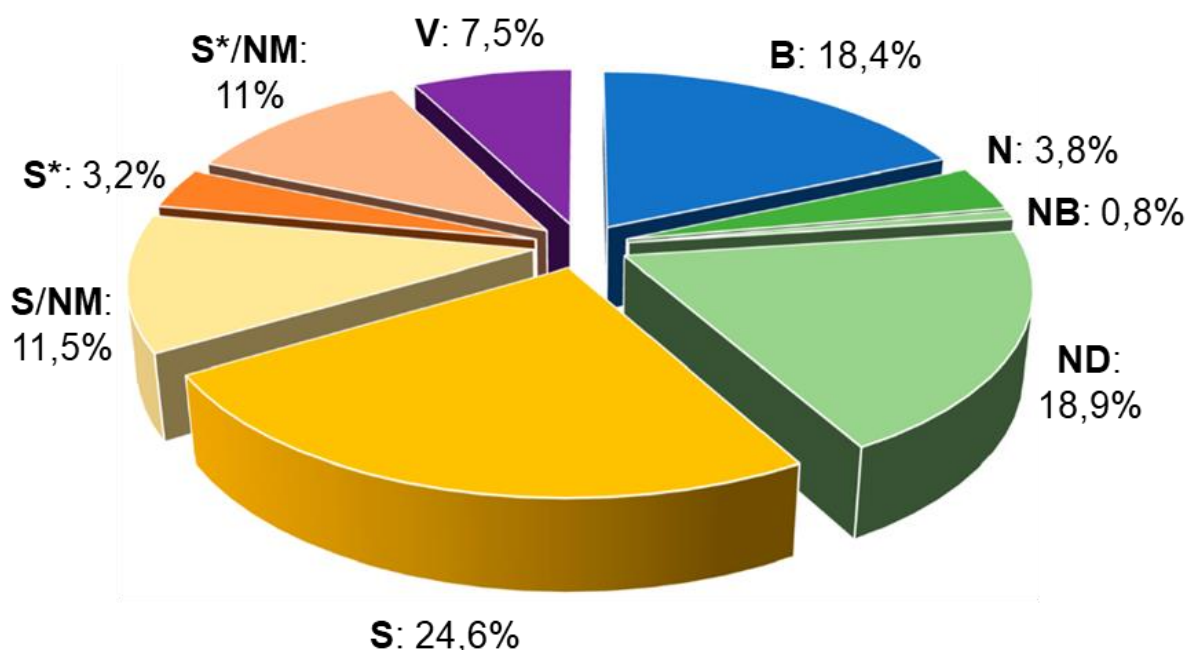


Figura 2 — Todos os novos medicamentos aprovados de 1º de janeiro de 1981 a 30 de setembro de 2019; $n = 1881$. **B (Biológico)**: Peptídeo ou proteína de grande porte (geralmente com mais de 50 resíduos), isolado de um organismo ou linhagem celular, ou produzido por meios biotecnológicos em um hospedeiro substituto. **N (Produto Natural)**: Composto obtido diretamente de fontes naturais, sem modificações estruturais significativas. **NB (Produto Natural Botânico)**: Mistura botânica definida, geralmente aprovada recentemente, reconhecida como entidade farmacêutica por órgãos reguladores como o FDA. **ND (Derivado de Produto Natural)**: Composto derivado de um produto natural, geralmente por modificação semissintética. **S (Fármaco Totalmente Sintético)**: Fármaco desenvolvido por síntese total, frequentemente descoberto por triagem aleatória ou modificação de um agente existente. **S* (Fármaco Sintético com Farmacóforo Natural)**: Fármaco produzido por síntese total, mas cujo farmacóforo é ou foi derivado de um produto natural. **V (Vacina)**: Preparação biológica que fornece imunidade adquirida contra uma doença específica. **NM**: Mímico de Produto Natural.

Fonte: NEWMAN; CRAGG, 2020

Os fármacos desenvolvidos a partir de produtos naturais possuem alto valor comercial, estando entre os mais lucrativos comercializados nos Estados Unidos. A atorvastatina (Lipitor), um hipocolesterolêmico derivado diretamente de um produto natural microbiano, gerou vendas totais de US\$ 94,67 bilhões no período de 1992 a 2017. O inalador Advair, que combina um corticosteroide modificado com um agonista β_2 -adrenérgico (ambos compostos derivados de produtos naturais), obteve vendas de US\$ 69,1 bilhões no mesmo período (NEWMAN; CRAGG, 2020). Portanto, os trabalhos com produtos naturais, quando integrados à química sintética e às ciências biológicas, representam uma das estratégias mais eficazes para a descoberta de fármacos cada vez mais eficientes no tratamento de diversas patologias humanas.

1.1.1 Produtos Naturais Marinhos

Historicamente, a humanidade dependia principalmente de plantas e organismos terrestres para o tratamento de doenças. Até o século XX, a maioria dos produtos naturais utilizados em terapias era derivada de fontes terrestres, enquanto o ambiente marinho permanecia relativamente inexplorado devido às dificuldades associadas à coleta e manipulação dos organismos. Somente a partir da década de 1970 houve um aumento significativo na descoberta de novos produtos naturais marinhos, impulsionado pelo avanço de técnicas analíticas e de coleta (GERWICK; MOORE, 2012).

A **Figura 3** mostra uma linha do tempo com a evolução cronológica dos fármacos aprovados de origem marinha. Em 1969, foi aprovado o primeiro fármaco antitumoral de origem marinha, a citarabina (Ara-C, Cytosar-U®), um nucleosídeo arabinosídeo isolado de esponjas marinhas, utilizado no tratamento de leucemias. Posteriormente, em 1976, a vidarabina (Ara-A, Vira-A®), foi aprovada como antiviral, marcando o início da aplicação terapêutica de compostos marinhos.

Nas décadas seguintes, a diversificação terapêutica dos produtos naturais marinhos se intensificou. Em 2004, foi aprovado o ziconotídeo (Prialt®), um peptídeo isolado da toxina do caramujo marinho *Conus magus*, utilizado no tratamento de dores crônicas. No mesmo período, a trabectedina (Yondelis®), um alcaloide extraído do tunicado *Ecteinascidia turbinata*, recebeu aprovação para o tratamento de sarcomas de tecidos moles, representando um marco na oncologia.

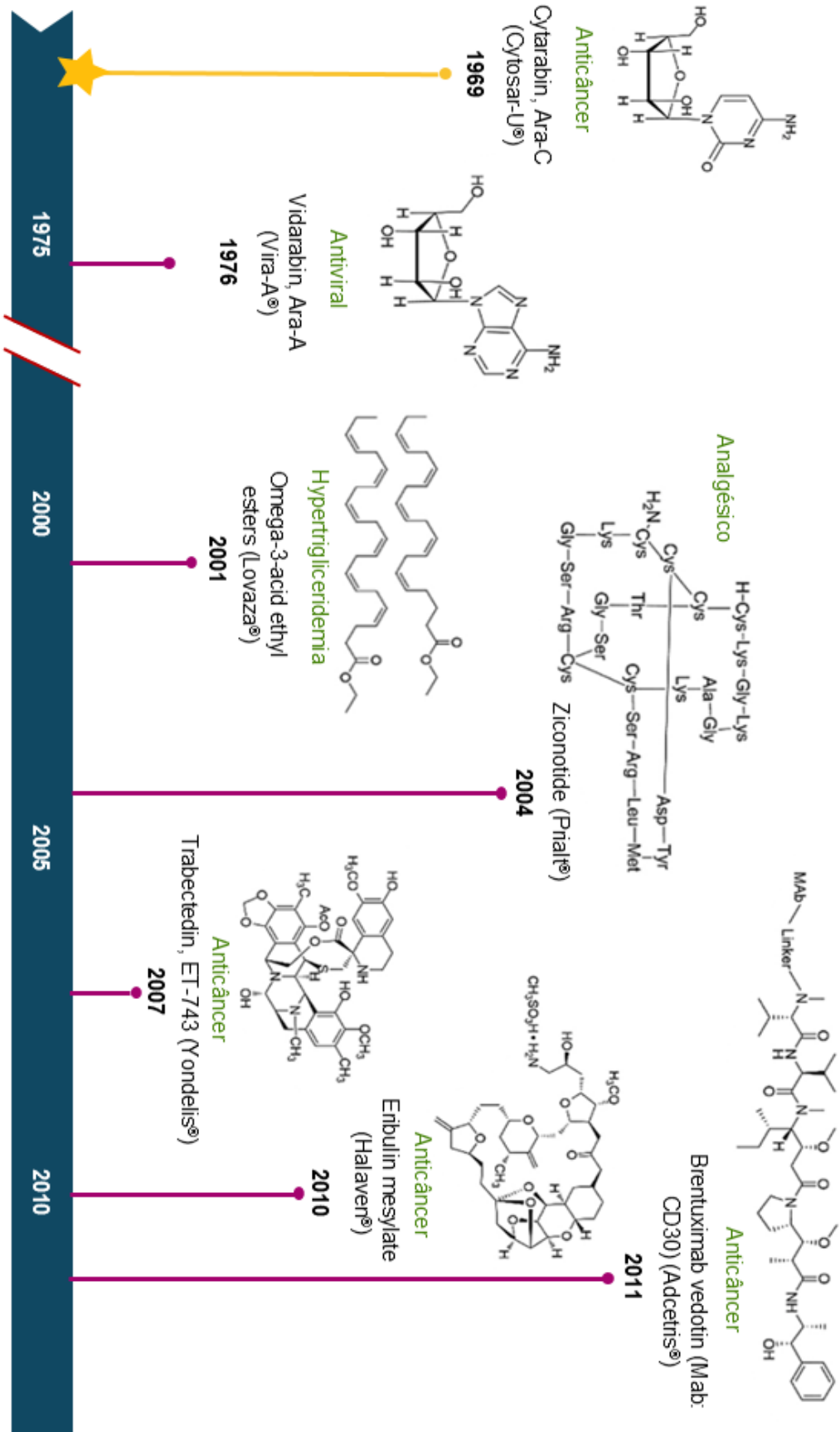


Figura 3 — Fármacos comerciais derivados de organismos marinhos.
Fonte: adaptado de LIANG; LUO; LUESCH, 2019. MAYER et al., 2021.

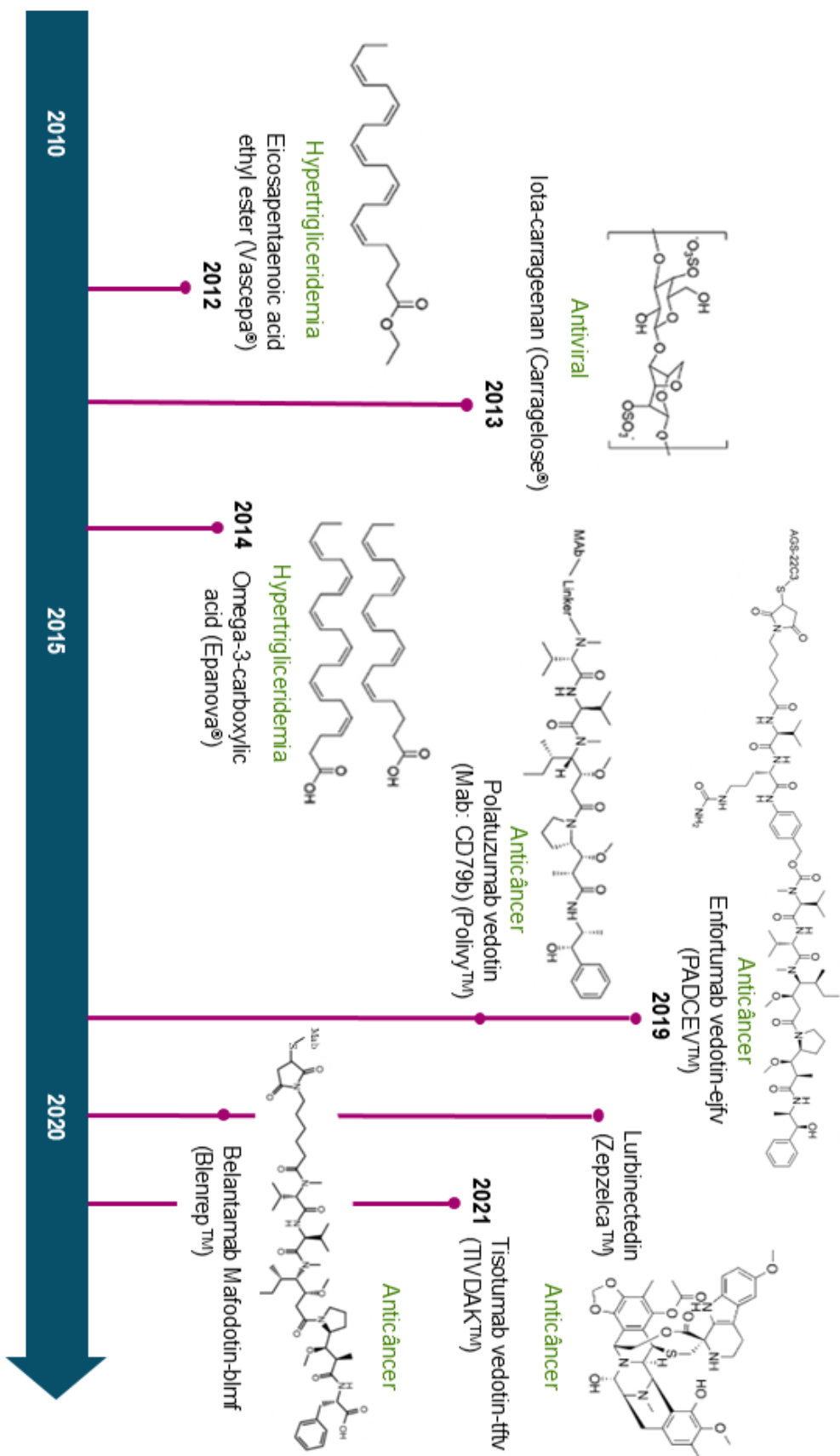


Figura 3 — Fármacos comerciais derivados de organismos marinhos, continuação.
Fonte: adaptado de LIANG; LUO; LUESCH, 2019. MAYER et al., 2021.

O desenvolvimento de tecnologias de conjugação de anticorpos a toxinas marinhas levou à aprovação de diversos anticorpos conjugados a fármacos na década de 2010. Destacam-se o brentuximabe vedotina (Adcetris®), aprovado em 2011 para linfoma de Hodgkin; o Padcev™, aprovado em 2019 para carcinoma urotelial e o Tivdak™, aprovado em 2021 para câncer cervical metastático.

Além desses, outros compostos marinhos que se destacaram incluem o mesilato de eribulina (Halaven®), um análogo sintético da halicondrina B, aprovado em 2010 para o tratamento de câncer de mama metastático, e a lurbinectedina (Zepzelca™), um alcaloide aprovado em 2020 para o tratamento de câncer de pulmão.

Devido às diferentes condições de crescimento, os organismos marinhos apresentam diferenças na produção metabólica em relação aos terrestres. Esses compostos frequentemente apresentam cadeias laterais e anéis maiores, mais alta halogenação, são mais hidrofóbicos e possuem menos anéis aromáticos. Essas características químicas podem ser consequência de adaptações evolutivas específicas devido às condições ambientais dos oceanos, como alta salinidade, pressão e disponibilidade de luz (SHANG et al., 2018).

Os primeiros estudos sobre produtos naturais provenientes dos oceanos foram realizados com macro-organismos. Posteriormente foram desenvolvidas linhas de pesquisa focadas nos micro-organismos que vivem associados a esses macro-organismos marinhos. Um estudo recente publicado por Voser e colaboradores, analisou compostos isolados de macro e micro-organismos marinhos e micro-organismos terrestres, concluindo que somente 14,3% dos produtos naturais são exclusivos dos micro-organismos marinhos. Esses dados revelam a necessidade de inovações na seleção de linhagens e nas técnicas de cultivo específicas para organismos marinhos (VOSER; CAMPBELL; CARROLL, 2022).

A necessidade de explorar mais o sistema marinho é especialmente importante para o Brasil, já que temos uma das maiores costas litorâneas do mundo, apresentando uma grande biodiversidade e, ainda assim, a descoberta de novos compostos a partir dos mares da América do Sul é muito pequena em comparação com outras regiões do planeta (**Figura 4**) (BLUNT et al., 2016).

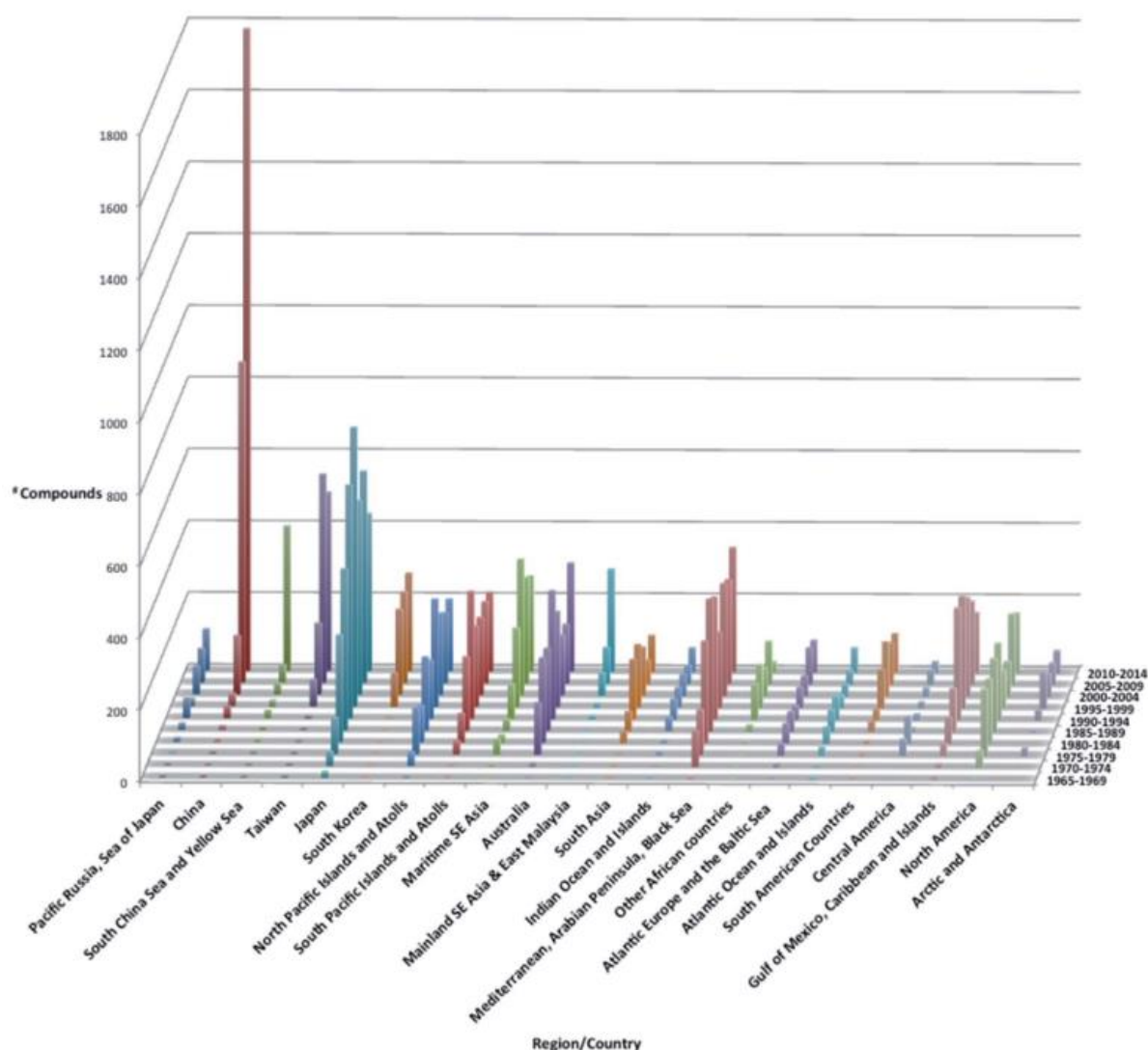


Figura 4 — Contagem de novos compostos de origem marinha por região/país no período de 1965 a 2014.

Fonte: BLUNT et al., 2016.

Além disso, os ecossistemas marinhos são extremamente suscetíveis a impactos ambientais, como o aumento da temperatura dos oceanos e a poluição, o que torna ainda mais relevante a pesquisa científica nesse campo. Esses fatores contribuem para a diminuição da biodiversidade, que pode resultar em perdas de informações essenciais para o desenvolvimento científico e tecnológico em diversas áreas.

A diminuição da biodiversidade não apenas compromete a saúde da vida nos oceanos, mas também ameaça os serviços ecossistêmicos essenciais para a humanidade, como a regulação do clima e provisão de alimentos. Portanto, é importante fomentar a preservação desses ecossistemas, alinhando-se ao Objetivo

de Desenvolvimento Sustentável (ODS) número 14 da ONU, que visa conservar e utilizar de forma sustentável os oceanos, os mares e os recursos marinhos para o desenvolvimento sustentável. Por esses motivos, o presente trabalho pretende contribuir com o aumento do conhecimento sobre a quimiodiversidade da vida marinha através da análise da produção metabólica do fungo endofítico *Hypoxylon investiens*, isolado da alga vermelha *Asparagopsis taxiformis*.

1.1.2 Algas marinhas

As algas têm sido utilizadas durante milênios como um alimento nutritivo e nas últimas décadas elas foram exploradas com intuito de obter substâncias biologicamente ativas. As pesquisas com fármacos de fontes naturais sugerem que as algas são um dos principais produtores de metabólitos secundários bioativos com alto potencial de interferir na patogênese de muitas doenças humanas e agrícolas (PINTEUS, 2015).

As macro-algas vermelhas (Rhodophyta) encontradas em águas rasas foram um dos primeiros organismos marinhos a serem estudados por serem de fácil coleta. Aproximadamente 7300 espécies de Rhodophyta estão descritas na literatura, tornando-o um dos filos mais populosos dentre as algas (GUIRY; GUIRY, 2021). Essas algas podem ser encontradas em diversas regiões do globo, a maioria no fundo do mar, mas também podem viver ligadas em substratos rochosos perto da costa e são conhecidas por produzirem metabólitos halogenados com diversificadas estruturas (FAULKNER, 2001; GREFF et al., 2014).

O fungo a ser estudado neste trabalho, *Hypoxylon investiens*, foi isolado da alga vermelha *Asparagopsis taxiformis*, uma espécie que pode ser encontrada em áreas temperadas, subtropicais e tropicais. Estudos com extratos dessa alga relataram algumas bioatividades importantes para o desenvolvimento de fármacos, uma delas é a atividade antifúngica contra espécies de *Aspergillus* (GENOVESE et al., 2013). Também foram relatadas atividades citotóxicas contra *Leishmania infantum*, antiproliferativa e antioxidante (VITALE et al., 2015; NEETHU; SUTHINDHIRAN; JAYASRI, 2017). A obtenção de extratos bioativos das macro-algas incentiva a exploração de sua microbiota, já que os micro-organismos

associados podem ser os responsáveis por metabólitos bioativos, além de serem mais fáceis de serem cultivados em laboratório (OLIVEIRA; FELÍCIO; DEBONSI, 2012).

1.1.3 Fungos endofíticos

Os micro-organismos endofíticos vivem entre os tecidos do hospedeiro onde conseguem obter nutrientes sem provocar danos, podendo até produzir substâncias que protegem o hospedeiro de agentes patógenos ou ajudam em seu desenvolvimento. Para sobreviver nesse ambiente os endófitos precisam resistir ao sistema imunológico do hospedeiro e vencer a competição por nutrientes com outros micro-organismos, por isso a maioria dos endófitos dominantes são produtores de metabólitos secundários que agem como antifúngicos, anticarcinogênicos, imunossupressores ou antioxidantes (JIA et al., 2016; KLIMOVA; PEÑA; SÁNCHEZ, 2016).

Como os estudos de bioprospecção com organismos marinhos são mais recentes do que aqueles com organismos terrestres, relativamente poucos estudos sobre endófitos de algas marinhas são encontrados na literatura. Sendo assim, o estudo metabolômico desses micro-organismos oferece um grande potencial de descoberta de compostos inéditos com importância farmacêutica e agrícola (PARTHASARATHY et al., 2020).

1.1.3.1 Fungos do gênero *Hypoxylon*

O gênero *Hypoxylon* pertencia à família Xylariaceae até alguns anos atrás e passou por diversas revisões taxonômicas que reorganizaram algumas espécies desse gênero e família em outros táxons. Estudos de quimiotaxonomia e morfologia realizados nos últimos anos revelaram diferenças entre os fungos *Hypoxylon* e outras linhagens da família Xylariaceae, justificando a criação da família Hypoxylaceae para incluir o gênero *Hypoxylon* e outros (WENDT et al., 2018). *Hypoxylon* é o maior gênero da família Hypoxylaceae com aproximadamente 230 espécies descritas e apresenta uma rica quimiodiversidade (HYDE et al., 2020). Os estromas desses fungos são frequentemente encontrados em madeiras mortas em áreas florestadas, enquanto os micélios geralmente são isolados de plantas com sementes. A ocorrência global das

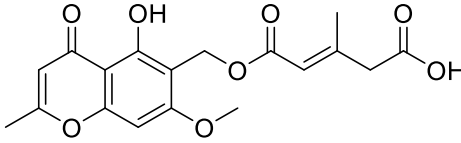
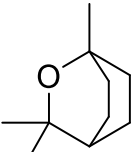
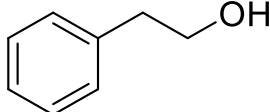
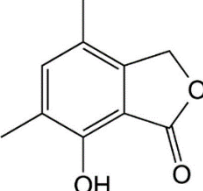
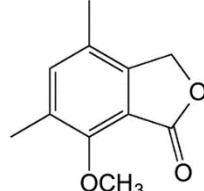
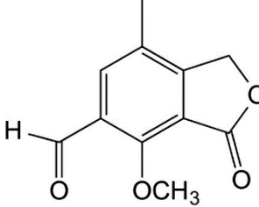
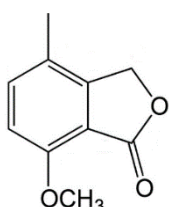
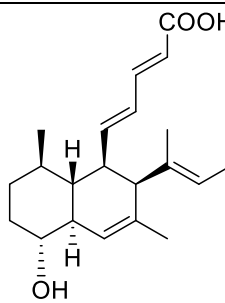
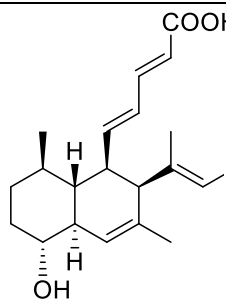
espécies de *Hypoxylon* como endófitos de plantas evidencia a importância ecológica desses fungos (BECKER et al., 2020).

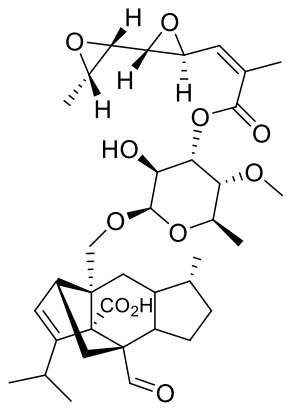
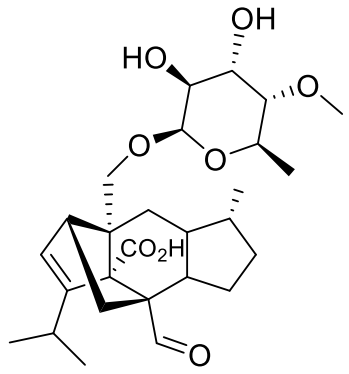
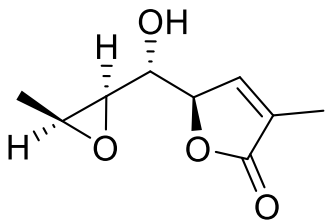
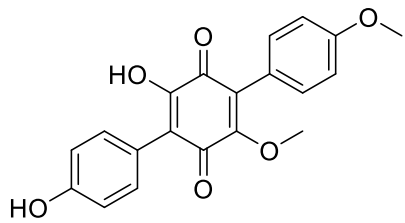
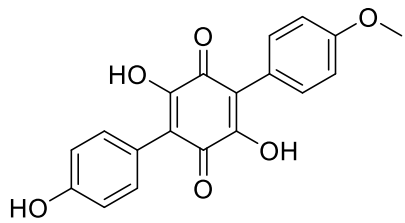
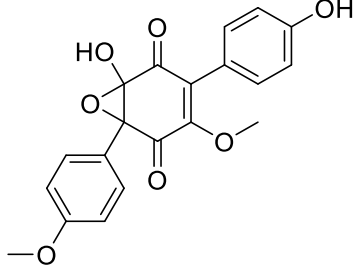
Diversos trabalhos metabolômicos com fungos *Hypoxylon* resultaram na obtenção de substâncias inéditas e bioativas, além de substâncias conhecidas que são utilizadas no desenvolvimento de fármacos e em processos biotecnológicos. Em um trabalho de revisão recente, foram analisadas patentes relacionadas com metabolismo secundário e aplicações em biotransformações de fungos endofíticos no período de 2001 até 2019 (TORRES-MENDOZA; ORTEGA; CUBILLA-RIOS, 2020). As patentes relacionadas com fungos *Hypoxylon* envolveram: a produção do antioxidante Neohexahidrocurcumina, metodologia de produção de compostos voláteis e produção da Huperzina A, um inibidor de acetilcolinesterase, considerado para o desenvolvimento de agentes terapêuticos para tratamento de doença de Alzheimer.

Outros exemplos de moléculas bioativas isoladas de espécie de *Hypoxylon* incluem a Sordarina e Hypoxysordarina, que são caracterizadas por um núcleo de diterpeno tetracíclico formando uma ligação em ponte (**Quadro 1**). Essas moléculas foram encontradas em um extrato de *H. croceum* e apresentaram alta atividade antifúngica, inibindo a biossíntese de proteínas (DAFERNER et al., 1999). Alguns estudos metabolômicos com *H. rickii* foram realizados por KUHNERT e colaboradores (2015), seus trabalhos resultaram no isolamento dos derivados terfenílicos Rickenil A, D e E, que apresentaram atividade antioxidante. Também foi isolado o Hypoxylano A desse fungo, que apresentou atividade citotóxica e antibacteriana.

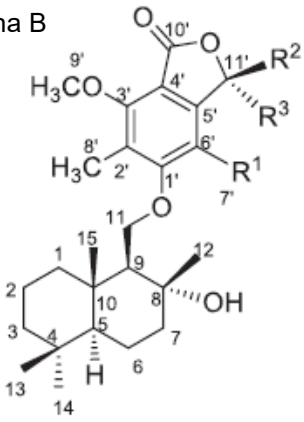
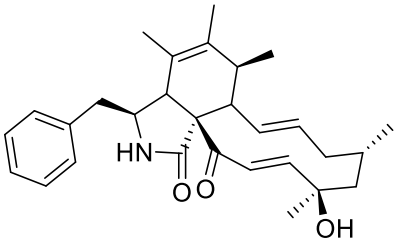
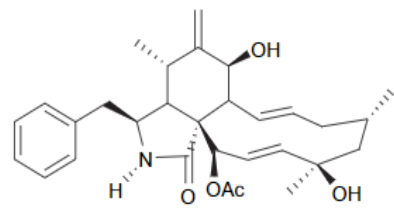
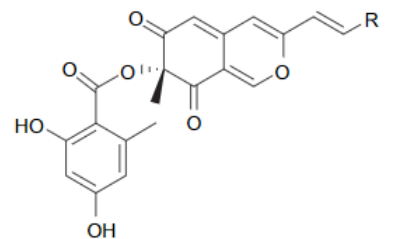
A espécie *H. investiens* possui poucos estudos de prospecção. O trabalho desenvolvido por Chang e colaboradores (2014) descreveu o isolamento de três substâncias inéditas, hypoxyloamida, hypoxylonol e 8-metoxi-naftaleno-1,7-diol, além de substâncias já conhecidas ou descritas pela primeira vez na natureza. As estruturas das substâncias isoladas de fungos *Hypoxylon* que foram citadas acima, além de outras, estão mostradas no **Quadro 1**. Na coluna ao lado de cada substância estão descritas suas respectivas atividades biológicas, as células com “-” indicam atividade fraca ou não determinada.

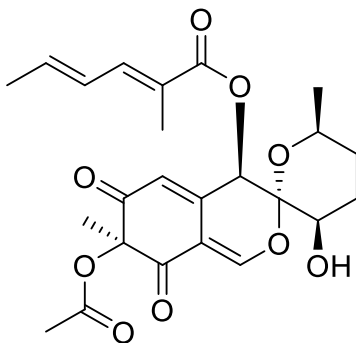
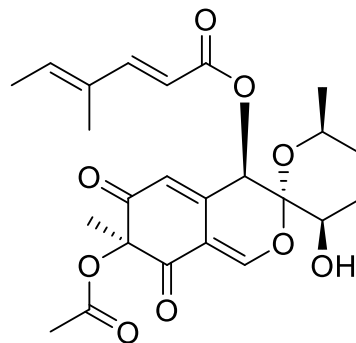
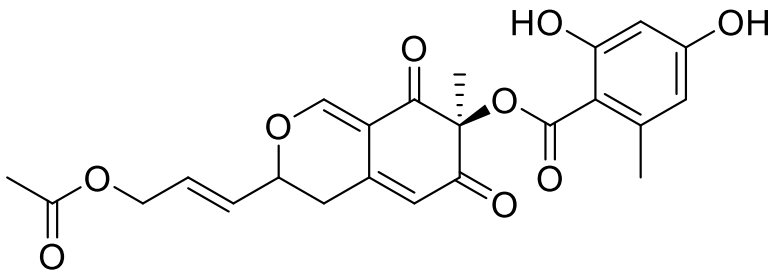
Quadro 1 — Substâncias isoladas de espécies de *Hypoxylon* e suas respectivas atividades biológicas.

Espécie	Atividade biológica	Substância isolada	Referência
<i>H. aeruginosum</i>	-	 Ácido leprárico	(LÆSSØE et al., 2010)
<i>H. anthochroum</i>	-	 Eucaliptol  8-metileno-triciclo [3.2.1.0(2,4)] octano  Álcool feniletílico	(MACÍAS-RUBALCAVA et al., 2018)
	Antifúngica (patógeno agrícola) Antioomicetos	 7-Hidróxi-4,6-dimetil-3H-isobenzofuran-1-ona  7-Metóxi-4,6-dimetil-3H-isobenzofuran-1-ona  6-Formil-4-metil-7-metóxi-3H-isobenzofuran-1-ona  7-Metóxi-4-metil-3H-isobenzofuran-1-ona	(SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ et al., 2020)
<i>H. carneum</i>	Antibacteriana Antifúngica	 Ác. carneico A  Ác. carneico B	(QUANG et al., 2006)

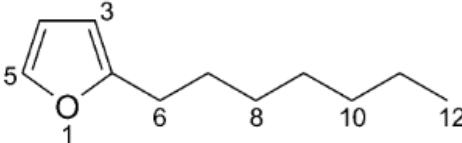
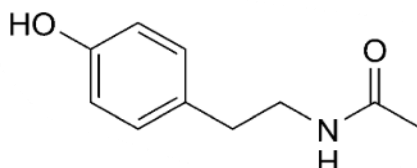
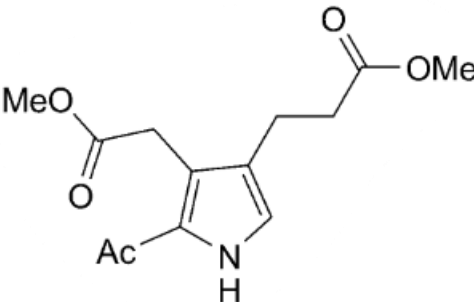
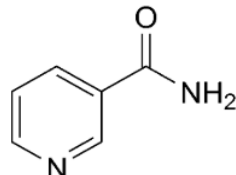
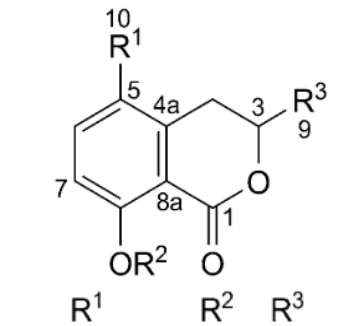
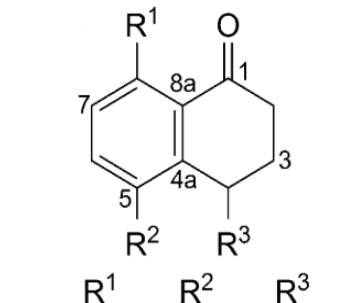
<i>H. croceum</i>	Antifúngica	 Hypoxysordarina  Sordarina	(DAFERNER et al., 1999)
	-	 Hypoxylactona	
<i>H. fendleri</i>	Antimicrobiana	 Fendleril A  Fendleril B  Fendleril C	(INTARAUDOM; BUNBAMRUNG; DRAMAE, 2017)

<i>H. fendleri</i>	Antimicrobiana	Fendleril D Fendlerinina A Fendlerinina B Fendlerinina C: $R = -\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ Fendlerinina D: $R = -\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOH}$ Fendlerinina E: $R = -\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ Fendlerinina F $R = -\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	(INTARAUDOM; BUNBAMRUNG; DRAMAE, 2017)
--------------------	----------------	--	--

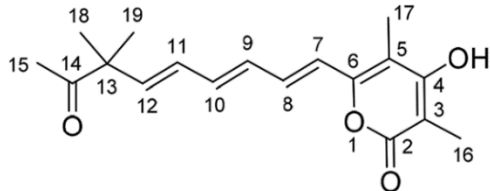
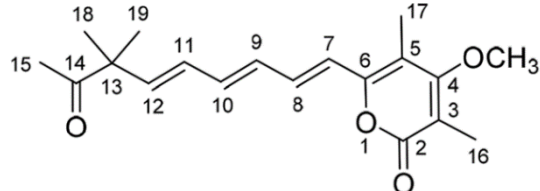
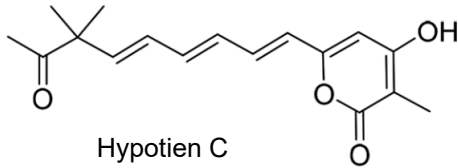
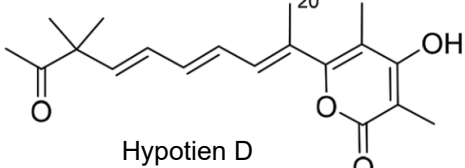
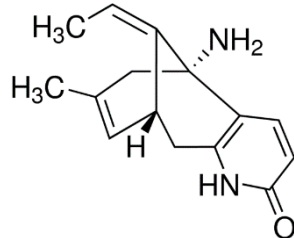
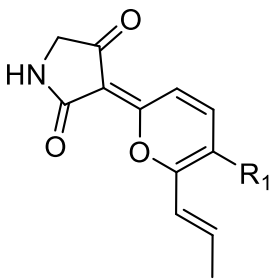
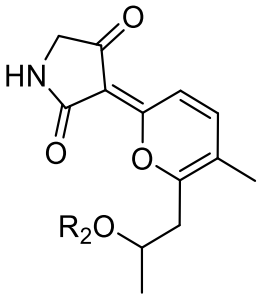
<i>H. fendleri</i>	Antimalárica Antimicrobiana Antifúngica Citotóxica	Fragiformina B  Fendleral A (R¹ = CHO, R² = H, R³ = OCH₃) Fendleral B (R¹ = CHO, R² = OCH₃, R³ = H)	(INTARAUDOM et al., 2019)
<i>H. fragiforme</i>	Nematicida Antimicrobiana Antifúngica	Fragiformina A  Citocalasina H  Ácido Mitorubrínico 	(STADLER et al., 2006)

<i>H. fuscum</i>	Antioxidante	 Daldinina E  Daldinina F	(QUANG et al., 2004a)
<i>H. hypomiltum</i> <i>H. intermedium</i>	-	 Hypomiltina	(HELLWIG et al., 2005)

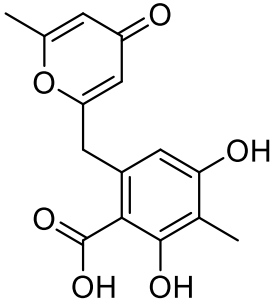
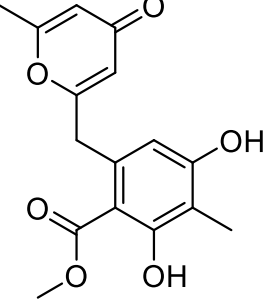
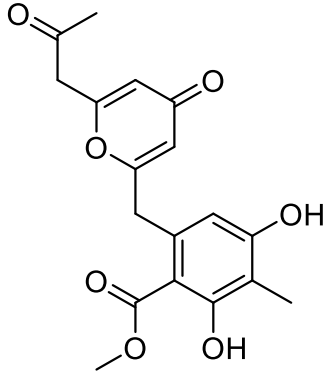
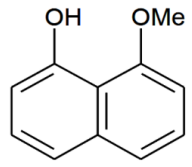
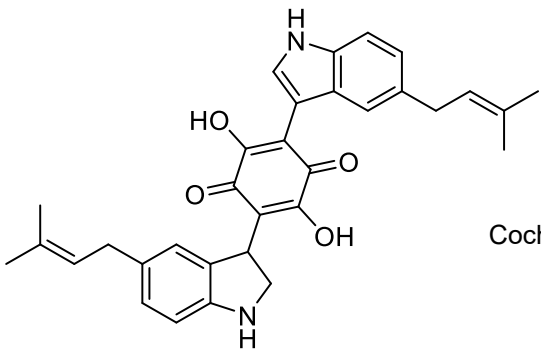
	Anti-NO e Citotóxica	8-metóxinaftaleno-1,7-diol 8-metóxinaftalen-1-ol 1,8-dimetóxinaftaleno	
<i>H. investiens</i>	-	Hypoxyloamida Hypoxylonol Investiamida Hypoxypropanamida Hypoxylonol A Investienol	(CHANG et al., 2014)

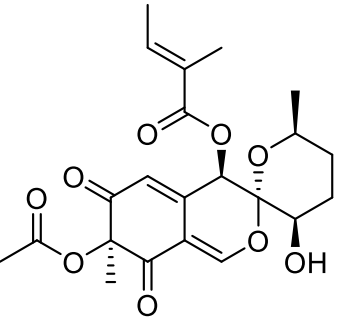
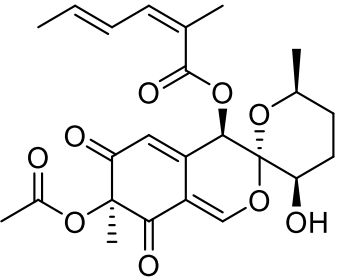
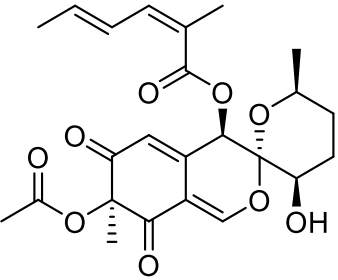
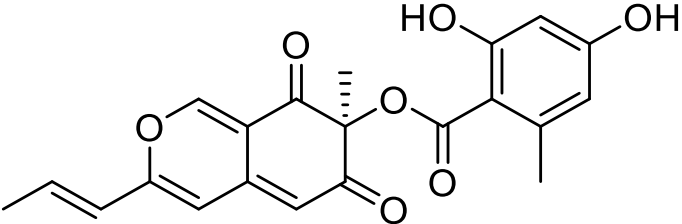
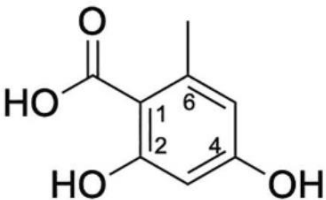
<i>H. investiens</i>	-	 2-heptilfurano  N-acetiltiramina  Monascuspirrol  Nicotinamida  <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>R¹</th> <th>R²</th> <th>R³</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>(3<i>S</i>)-5-metil-8-<i>O</i>-metilmeleina:</td> <td>Me</td> <td>Me</td> <td>α-Me</td> </tr> <tr> <td>(3<i>R</i>)-5-hidr�ximetilmeleina:</td> <td>HOCH₂</td> <td>H</td> <td>β-Me</td> </tr> <tr> <td>(3<i>R</i>)-8-<i>O</i>-metilmeleina:</td> <td>H</td> <td>Me</td> <td>β-Me</td> </tr> <tr> <td>(3<i>R</i>)-5-metilmeleina:</td> <td>Me</td> <td>H</td> <td>β-Me</td> </tr> </tbody> </table>  <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>R¹</th> <th>R²</th> <th>R³</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>(4<i>R</i>)-<i>O</i>-metil-sclerona:</td> <td>H</td> <td>MeO</td> <td>β-OH</td> </tr> <tr> <td>(-)-Regiolona:</td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>α-OH</td> </tr> <tr> <td>Xylarenona:</td> <td>MeO</td> <td>H</td> <td>β-OH</td> </tr> </tbody> </table>		R ¹	R ²	R ³	(3 <i>S</i>)-5-metil-8- <i>O</i> -metilmeleina:	Me	Me	α -Me	(3 <i>R</i>)-5-hidr�ximetilmeleina:	HOCH ₂	H	β -Me	(3 <i>R</i>)-8- <i>O</i> -metilmeleina:	H	Me	β -Me	(3 <i>R</i>)-5-metilmeleina:	Me	H	β -Me		R ¹	R ²	R ³	(4 <i>R</i>)- <i>O</i> -metil-sclerona:	H	MeO	β -OH	(-)-Regiolona:	OH	H	α -OH	Xylarenona:	MeO	H	β -OH	(CHANG et al., 2014)
	R ¹	R ²	R ³																																				
(3 <i>S</i>)-5-metil-8- <i>O</i> -metilmeleina:	Me	Me	α -Me																																				
(3 <i>R</i>)-5-hidr�ximetilmeleina:	HOCH ₂	H	β -Me																																				
(3 <i>R</i>)-8- <i>O</i> -metilmeleina:	H	Me	β -Me																																				
(3 <i>R</i>)-5-metilmeleina:	Me	H	β -Me																																				
	R ¹	R ²	R ³																																				
(4 <i>R</i>)- <i>O</i> -metil-sclerona:	H	MeO	β -OH																																				
(-)-Regiolona:	OH	H	α -OH																																				
Xylarenona:	MeO	H	β -OH																																				

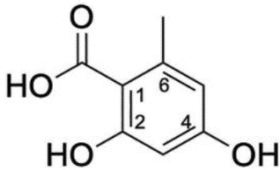
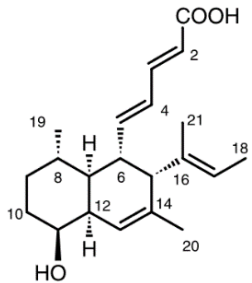
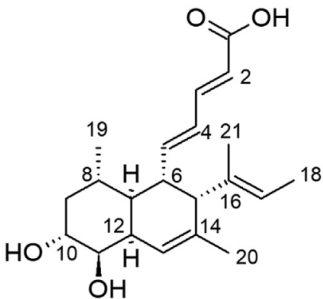
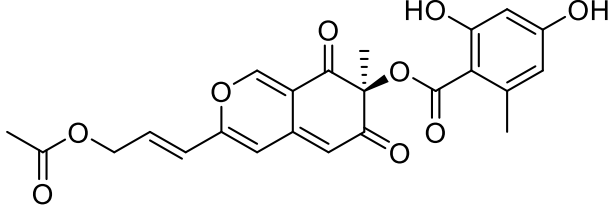
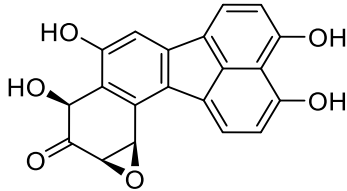
<i>H. investiens</i>	-	Indol-3-carbaldeído Xylaranol B <i>Epi</i>-guaidiol A Ciclo(L-Pro-L-Tyr) Álcool 2-hidróxifenetil 3-hidróxi-2- metil-4H-piran- 4-ona 4-hidróxi-6- metil-2H- piran-2-ona Peróxido de Ergosterol Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona	(CHANG et al., 2014)
-----------------------------	----------	---	-----------------------------

<i>H. investiens</i>	-	 Hypotien A  Hypotien B  Hypotien C  Hypotien D	(YUAN et al., 2019)
	Anticolinesterásica	 Huperzina A	(ZHANG et al., 2015)
<i>H. lechatii</i>	Antimicrobiana Citotóxica	 Vermelhotina: R₁ = H Hypoxyvermelhotina A: R₁ = CH₃  Hypoxyvermelhotina B: R₂ = H Hypoxyvermelhotina C: R₂ = CH₃	(KUHNERT et al., 2014)

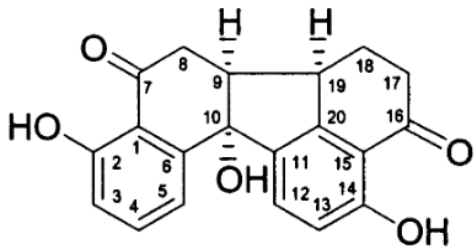
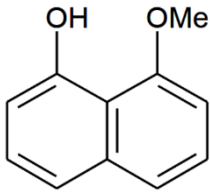
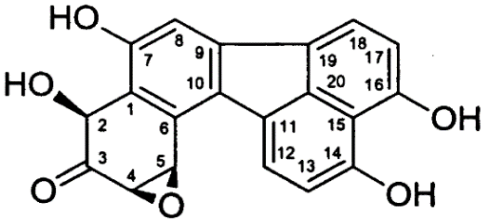
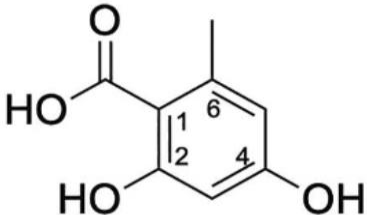
<i>H.</i> <i>lenormandii</i>	-	Lenormandina A Lenormandina B Lenormandina C Lenormandina D Lenormandina E Lenormandina F Lenormandina G	(KUHNERT et al., 2015a)
---	----------	--	--------------------------------

<i>H. macrocarpum</i>	-	 Macrocarpona A  Macrocarpona B  Macrocarpona C	(MÜHLBAUER et al., 2002)
<i>H. nicaraguense</i>	Citotóxica	 8-Metóxi-1-naftol	(STADLER, 2011)
	Antibiótica	 Cochliodinol	

<i>H. notatum</i>	-	 Daldinina C  Daldinina E  Binaftalenotetrol (BNT)	(HASHIMOTO et al., 1994) (QUANG et al., 2004a) (STADLER et al., 2001)
<i>H. novemexicanum</i>	-	 Mitorubrina	(STADLER et al., 2008)
	Antioxidante	 Ácido orselínico	(MALIK et al., 2020)

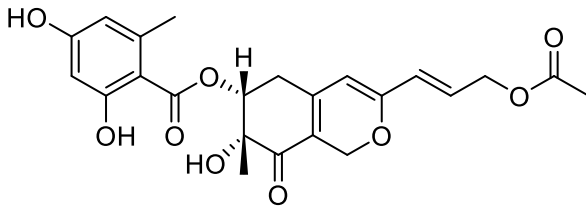
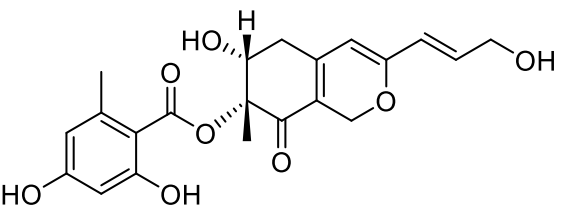
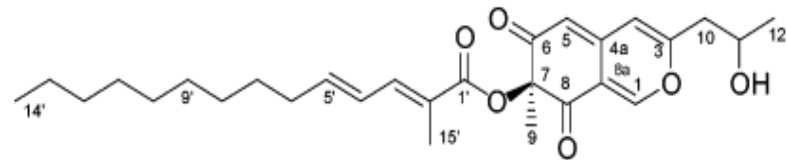
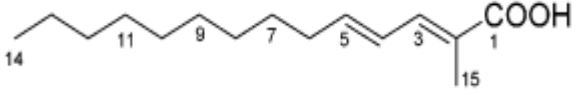
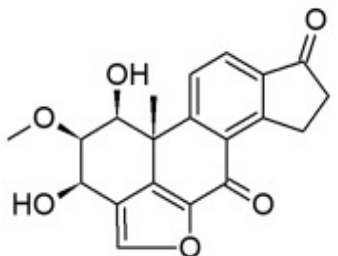
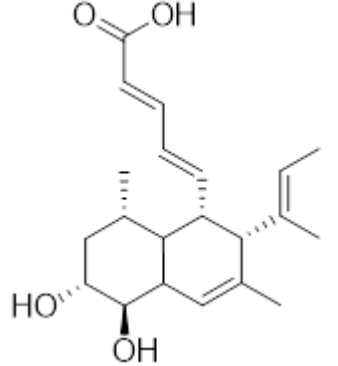
<i>H. perforatum</i>	Antioxidante	 Ácido orselínico	(MALIK et al., 2020)
	Antimicrobiana citotóxica	 Phomopsidina	KOBAYASHI et al., 2003
	Citotóxica	 10-hidróxiphomopsidina	POURMOGHA DDAM et al., 2020
	-	 Hypomiltina  Daldinona B	HELLWIG et al., 2005 QUANG et al., 2002

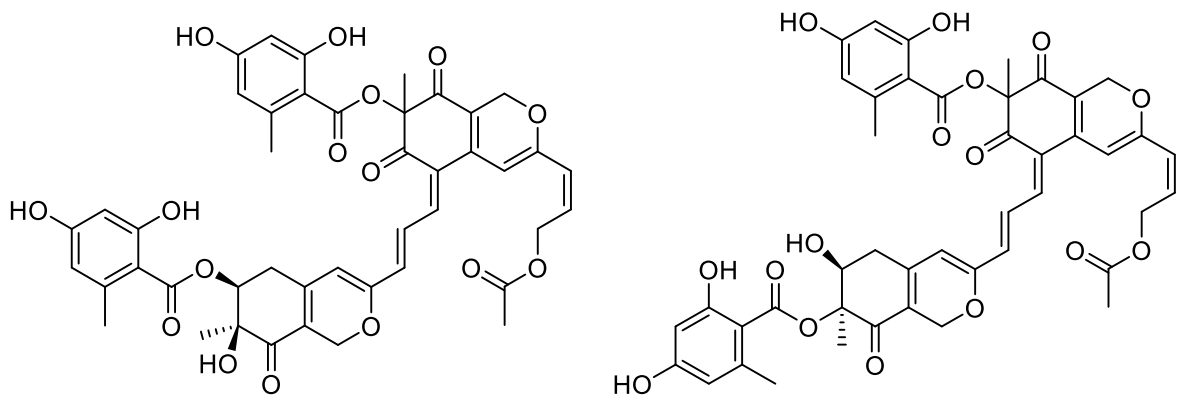
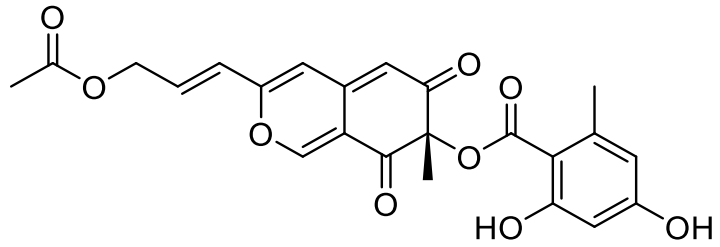
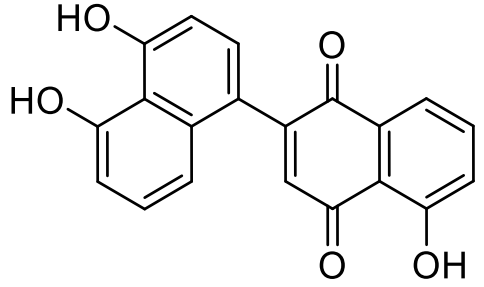
<i>H. piceum</i>	-	Ácido orselínico Binaftalenotetrol (BNT) Hypomiltina Macrocarpona A	STADLER; LÆSSØE; VASILYEVA, 2005
<i>H. pilgerianum</i>	-	Mitorubrinol + Ácido orselínico, Acetato de mitorubrinol, BNT e Mitorubrina	HELLWIG et al., 2005

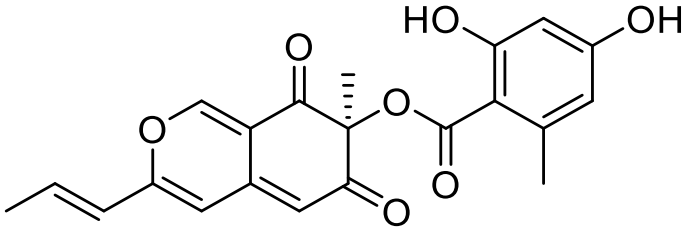
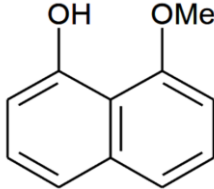
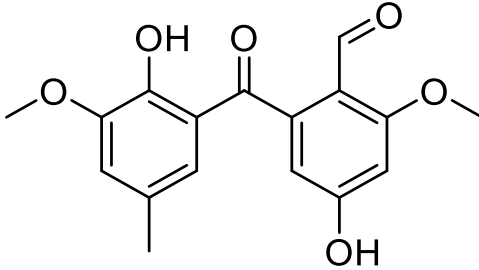
<i>H. placentiforme</i>	-	 Daldinona A  8-Metóxi-1-naftol + BNT	STADLER; FOURNIER, 2006
<i>H. porphyreum</i>	-	 Daldinona B + BNT	STADLER et al., 2008
<i>H. retpela</i>	Antioxidante	 Ácido orselínico	

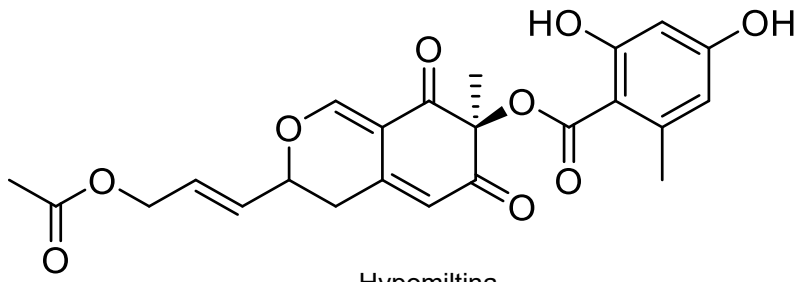
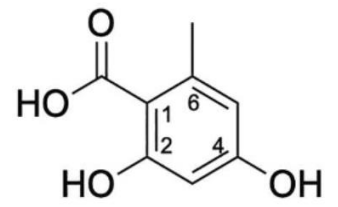
	Antioxidante	Rickenil A Rickenil D Rickenil E	KUHNER et al., 2015b
<i>H. rickii</i>	Citotóxica	(3aS)-7-hidroxi-3a, 5,5,8-tetrametil-3,3a, 4,5-tetrahidro-1H-ciclopenta [de] isocromen-1-ona (3aS)-6-hidroxi-3a, 5,5,8-tetrametil-3,3a, 4,5-tetrahidro-1H-ciclopenta [de] isocromen-1-ona (1S)-7-[(2E)-but-2-enil] - 1,3,3,6-tetrametil-2,3-dihidro-1H-indeno-1-carbaldeído Hypoxylano A	KUHNER et al., 2015c

	Antibacteriana	Hypoxylano A	
<i>H. rickii</i>	-	Rickenil B Rickenil C Hypoxylano B Hypoxylano C	KUHNERT et al., 2015b KUHNERT et al., 2015c
<i>H. rubiginosum</i>	Antimicrobiana citotóxica	Fomopsidina	HALECKER et al., 2020

	-	 Rubiginosina A  Rubiginosina B	QUANG et al., 2004b
<i>H. rubiginosum</i>	-	 Rubiginosina C  Ác. rubiginósico  Viridiol  10-hidroxifompsidina	(HALECKER et al., 2020) (QUANG et al., 2004b)

<i>H. rutilum</i>	-	 Rutilina A Rutilina B	(QUANG et al., 2005c)
<i>H. salicicola</i>	-	 Acetato de mitorubrinol	(STADLER, 2011)
<i>H. sclerophaeum</i>	-	 Hypoxylona	(BODO et al., 1983)

<i>H. subcrocopeplum</i> <i>H. subgilvum</i> <i>H. subrutiloides</i> <i>H. subrutilum</i> <i>H. subticinense</i> <i>H. ticinense</i>	-	 Mitorubrina + Ácido orselínico, acetato de mitorubrina e mitorubrinol	HELLWIG et al., 2005 STADLER et al., 2001, 2008 BÜCHI; WOGAN; WHITE, 1965
<i>H. symphyon</i>	Citotóxica	 8-Metóxi-1-naftol	NADEAU; SORENSEN, 2011
	Anti-NO	 Daldinal A	HASHIMOTO; ASAKAWA, 1998

<i>H. trugodes</i>	-	 Hypomiltina  Ácido orselínico	HELLWIG et al., 2005
--------------------	---	---	----------------------

Trabalhos realizados anteriormente em nosso grupo levaram ao isolamento e cultivo de sete linhagens (AT-01 – AT-07) de fungos endofíticos isolados da alga *Asparagopsis taxiformis*; as linhagens foram preservadas em meio sólido BDA (batata, dextrose e ágar) em frascos contendo água estéril (MilliQ® ou do mar) (MEDINA, 2016).

A linhagem codificada como AT-01 foi identificada como *Hypoxylon investiens* e foi estudada anteriormente. Neste trabalho foi possível isolar duas substâncias inéditas derivadas do naftaleno: 5'-metoxi-1,2,3,4-tetraidro-1,1'-binaftaleno-2,4,4',8-tetrol (I) e 8'-metoxi-1,2,3,4-tetraidro-1,1'-binaftaleno-2,2',4,8-tetrol (II) (SILVA, 2016).

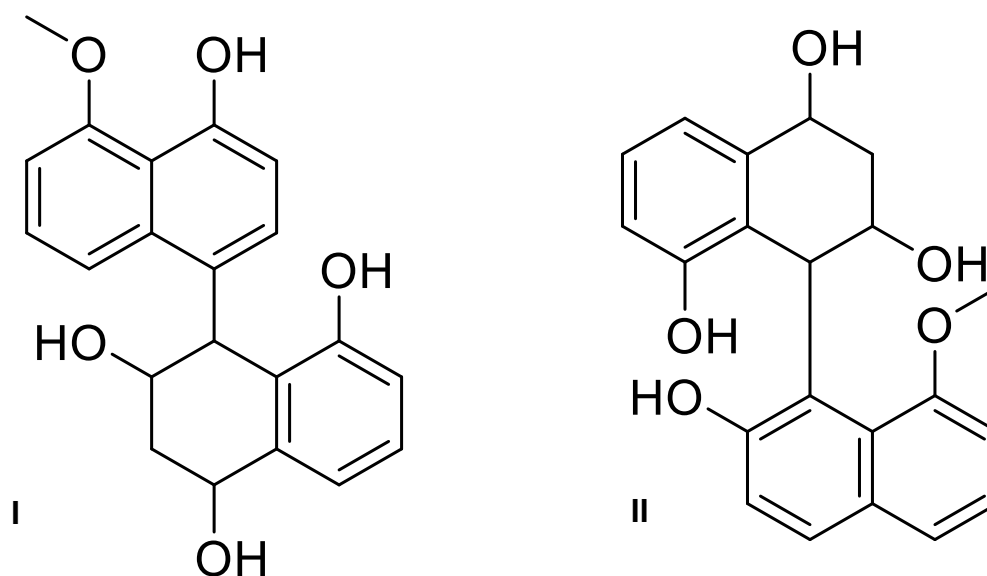


Figura 5 — Binaftalenos inéditos isolados de *Hypoxylon investiens*.
Fonte: SILVA, 2016

Algumas substâncias similares e com importantes bioatividades foram encontradas na literatura através da ferramenta SciFinder®. Um exemplo é o Cladosporol C (III), que apresenta capacidade de inibir a germinação de esporos do *Uromyces appendiculatus*, o fungo causador da ferrugem em feijoeiros (NASINI et al., 2004). Outro exemplo é o Nodulisporin D (IV), que apresentou atividade antifúngica, antialgal e antibacteriana (DAI et al., 2009).

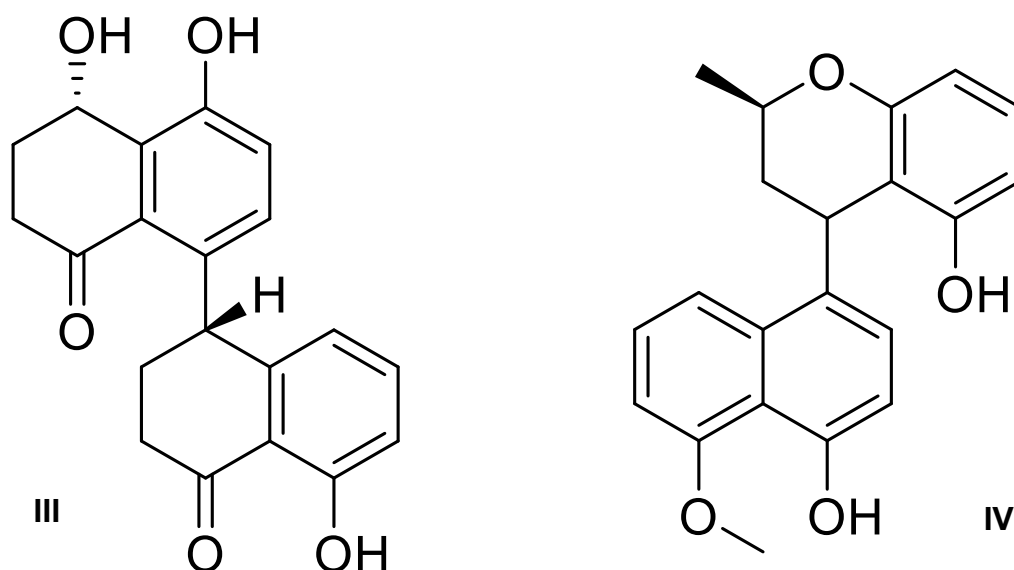


Figura 6 — Exemplos de estruturas semelhantes aos binaftalenos descritos na literatura.
Fonte: NASINI et al., 2004. DAI et al., 2009

O presente estudo visa dar continuidade à busca por metabólitos bioativos a partir do extrato do fungo *H. investiens* (AT-01). Com o objetivo de aumentar o rendimento e quimiodiversidade de compostos derivados de naftaleno e outros metabólitos, serão realizados experimentos usando ferramentas de análise fatorial e epigenética.

1.2 EPIGENÉTICA

Estudos de metabolômica com fungos isolados de organismos marinhos são relativamente novos e apresentam desafios a serem superados, um deles é o silenciamento de genes quando esses microrganismos são cultivados em laboratório. Para despertar possíveis genes adormecidos, os fungos investigados neste trabalho foram cultivados com moduladores epigenéticos e em diferentes condições físico-químicas. O uso de moduladores epigenéticos para estimular a produção metabólica de micro-organismos é um método emergente da última década e representa uma nova maneira de compreender e estimular a maquinaria biossintética de fungos.

Quando um fungo está em seu ambiente natural, ele está sujeito a diversas interações bióticas e abióticas. Devido a essas interações, os fungos ativam rotas biossintéticas que irão produzir metabólitos secundários importantes para sobrevivência do organismo como, por exemplo, substâncias antifúngicas que

poderão afastar outros fungos que competem pelos mesmos nutrientes. As enzimas que produzem os metabólitos secundários são codificadas por genes que estão aglomerados no genoma. Em condições laboratoriais esses genes podem estar silenciados devido à ausência do estresse biótico e/ou abiótico (PFANNENSTIEL; KELLER, 2019).

O método mais comum utilizado para estimular a produção metabólica em fungos é a variação de propriedades físico-químicas do meio de cultivo, como pH, temperatura e concentração de nutrientes (FRISVAD, 2012). Outro método bastante utilizado é a co-incubação de um fungo com outro micro-organismo, o que leva a ativação de rotas biossintéticas devido à presença de substâncias sinalizadoras que são produzidas por esse segundo micro-organismo (MARMANN et al., 2014). A aplicação dessas estratégias costuma ser referida pelo acrônimo OSMAC (*One Strain Many Compounds*), que visa aumentar a diversidade de metabólitos de uma espécie por meio de variações nas condições de cultivo.

Mesmo utilizando os dois métodos citados, eventualmente diversos genes do fungo não serão expressos. Um outro método que pode ser utilizado para induzir a expressão de genes silenciados, é a adição de moduladores epigenéticos no meio de cultivo. Epigenética é o estudo da alteração de fenótipos herdáveis, como a produção de metabólitos secundários, sem que haja alteração no genótipo (sequência de DNA inalterada). Os principais mecanismos de regulação epigenética conhecidos são: metilação do DNA, modificação de histonas e interferência de RNA (AGHCHEH; KUBICEK, 2015).

A metilação do DNA ocorre pela adição de um grupo metila no C-5 do anel da citosina catalisada pelas DNA metiltransferases (DNMTs) (**Figura 7**). Quando o DNA fica muito metilado, os nucleossomos ficam mais compactos, impedindo o acesso da maquinaria de transcrição. A regulação da expressão dos genes também pode ocorrer através de modificações pós-traducionais em determinados aminoácidos presentes nas caudas de histonas. As reações de acetilação e metilação de lisinas são as modificações mais compreendidas. A acetilação da lisina neutraliza sua carga positiva, o que enfraquece a atração eletrostática das histonas com o DNA negativamente carregado, resultando em uma cromatina com configuração mais aberta e acessível. A metilação do DNA também atrai enzimas envolvidas na

modificação de histonas, portanto os dois mecanismos são interligados e coordenam, de forma conjunta, a expressão de genes (JOOSTEN et al., 2018).

O terceiro mecanismo citado é a interferência de RNA, no qual a regulação dos genes ocorre devido a ação de pequenos RNAs não codificantes como, por exemplo, o emparelhamento de microRNAs com sequências complementares do RNA mensageiro, inibindo a tradução em proteínas. A manipulação desses mecanismos em fungos é uma ferramenta inovadora e seu uso pode resultar na descoberta de novos metabólitos secundários, assim como o aumento de rendimento de metabólitos de interesse.

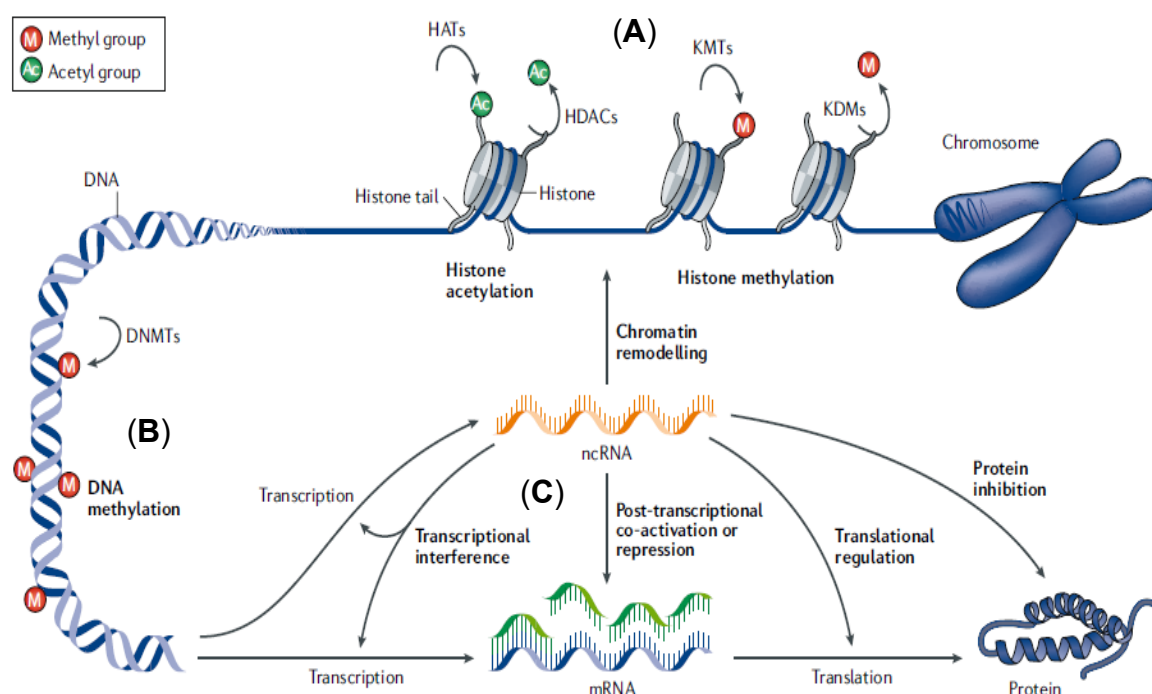


Figura 7 — Visão geral da regulação epigenética da expressão gênica. (A): modificações nas caudas de histonas. (B): metilação do DNA. (C): interferência de RNA.

Fonte: JOOSTEN et al., 2018.

Os chamados moduladores epigenéticos são compostos conhecidos por atuar nos mecanismos epigenéticos, a maioria deles age inibindo enzimas responsáveis pela transferência de grupos metil, acetil ou alquil, no DNA e nas histonas. Moléculas que inibem as enzimas histona desacetilase (HDAC) e DNA metiltransferase (DNMT) provaram ser eficientes na modificação da produção metabólica de fungos, por meio da indução de agrupamento de genes biossintéticos silenciosos (TOGHUEO; SAHAL; BOYOM, 2020). Algumas HDACs dependem do íon Zn^{2+} enquanto outras dependem

do NAD^+ para que tenham atividade. Ácido hidroxâmico suberoilânilida (SAHA), tricostatina A, ácido valpróico e butirato de sódio (NaBut) são conhecidos inibidores de HDACs dependentes de Zn^{2+} , enquanto a Nicotinamida é o principal representante dos inibidores de HDACs dependentes de NAD^+ . Existem dois tipos de inibidores de DNMTs: os nucleosídeos (5-Azacidina e zebularina) e aqueles que não são nucleosídeos ((-)-epigallocatequina-3-galato, procaína e *N*-ftaloil-L-triptofano) (LI et al., 2020).

Poças-Fonseca e colaboradores (2020) publicaram um artigo de revisão reunindo estudos com fungos filamentosos cultivados com moduladores epigenéticos, evidenciando o potencial de aplicação dessas substâncias para modificar a produção metabólica de fungos. Um exemplo é a aplicação de 50 μM de 5-Aza e 100 μM de SAHA no cultivo de uma espécie de *Hypoxylon*, o que induziu o fungo a produzir compostos orgânicos voláteis, terpenos, ácidos orgânicos e derivados de benzeno. Em um outro estudo, o cultivo de *Penicillium brevicompactum* com Nicotinamida (100 μM) e NaBut (100 mM) resultou na produção de 11 compostos fenólicos inéditos, sendo que alguns apresentaram atividade citotóxica contra células tumorais.

1.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A variação das condições de cultivo de forma univariada e aleatória, pode resultar em um aumento da produção metabólica. No entanto, se as interações entre as variáveis não forem analisadas, o resultado pode não corresponder às condições de cultivo que levam ao ótimo verdadeiro (PERALTA-ZAMORA, 2005). Além disso, esse método requer um grande número de experimentos, o que demanda tempo e gastos desnecessários. Para diminuir o número de experimentos e obter o ótimo verdadeiro, é necessário realizar análises multivariadas e utilizar metodologias de planejamento experimental estatístico (PIMENTA, 2010).

Diversos fatores físico-químicos (concentração de modificador epigenético, pH, tempo de crescimento, entre outros) podem influenciar no crescimento e produção metabólica de um fungo. Nos casos em que as informações sobre esses fatores são pouco conhecidas, é importante realizar um planejamento exploratório de variáveis (triagem) para identificar e separar os fatores que têm maior efeito sobre as respostas desejadas (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

A triagem de variáveis desse estudo foi realizada com o planejamento Plackett-Burman, desenvolvido por R.L. Plackett e J.P. Burman em 1946. Ele é considerado um planejamento fatorial saturado de dois níveis, onde cada fator é testado em dois valores distintos (PLACKETT; BURMAN, 1946). Uma característica desse tipo de planejamento é que o número de experimentos (n) deve ser um múltiplo de 4, mas não uma potência de 2 (12, 20, 24, 28, 36), uma restrição relacionada à construção matemática das matrizes ortogonais.

Essa estrutura permite avaliar até $n - 1$ fatores em n execuções experimentais, maximizando a eficiência na estimativa dos efeitos principais com o menor número possível de experimentos. Uma limitação desse planejamento é que os efeitos principais estão parcialmente confundidos com outros efeitos, portanto as interações entre fatores devem ser desconsideradas. Isso não é necessariamente um problema nessa etapa do trabalho, já que o objetivo é avaliar uma grande quantidade de fatores utilizando o menor número possível de experimentos e identificar quais os fatores mais importantes para serem melhor avaliados posteriormente (ANTONY, 2014).

Com as técnicas de planejamento experimental é possível obter um modelo matemático que prevê, com alta confiabilidade, quais os fatores e seus respectivos valores devem ser utilizados para otimizar a produção de metabólitos secundários a partir do cultivo de uma determinada linhagem de fungo em condições específicas.

1.4 MOLECULAR NETWORKING (REDES MOLECULARES)

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) se tornou uma ferramenta essencial para a pesquisa em produtos naturais e levou ao desenvolvimento de novas metodologias para explorar a imensa diversidade dessas moléculas. Mesmo após décadas de avanços dos estudos de metabolômica com MS, ainda é difícil atribuir estruturas químicas a maioria dos espectros que podem ser obtidos em um experimento (QUINN et al., 2017).

Estimativas revelam que somente 1,8% dos espectros obtidos em um estudo de metabolômica global (*untargeted*) são anotados, ou seja, a maioria da informação espectral é desperdiçada. Esses sinais químicos perdidos podem ser referentes aos análogos desconhecidos de compostos conhecidos, estruturas químicas inéditas, íons resultantes de fragmentações na fonte e adutos. Além disso, parte dos sinais que não

foram anotados podem ser de estruturas conhecidas que não são caracterizadas devido à ausência de seus espectros de referência em bancos de dados de MS. Muitas vezes os espectros são comparados manualmente o que demanda muito tempo do pesquisador e aumenta a probabilidade de erro humano (DA SILVA; DORRESTEIN; QUINN, 2015).

Todos esses problemas expostos evidenciam a necessidade de soluções computacionais para aumentar a eficiência das análises por espectrometria de massas. A partir dessa necessidade, os pesquisadores têm utilizado "redes moleculares" (*molecular networking*) como ferramenta computacional em estudos de metabolômica. Esse método permite visualizar o conteúdo químico da amostra como grupos de famílias moleculares. As moléculas são agrupadas conforme o grau de similaridade entre os dados da fragmentação que é determinado por meio de correlações vetoriais e exibidas como uma rede de espectros de fragmentações (MS/MS) (WATROUS et al., 2012).

1.4.1 *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS)

Os trabalhos com redes moleculares levaram ao desenvolvimento do *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) (<http://gnps.ucsd.edu>), uma plataforma *online* de redes moleculares e compartilhamento de dados. Utilizando a infraestrutura do *Center for Computational Mass Spectrometry* (CCMS) da Universidade da Califórnia em San Diego (UCSD), o GNPS fornece deposição e/ou recuperação de conjuntos de dados públicos por meio do repositório de dados do *Mass Spectrometry Interactive Virtual Environment* (MassIVE). Atualmente, com o GNPS é possível realizar desreplicação *online*, análise automatizada de rede molecular e curadoria de espectros MS/MS por colaboração coletiva (*crowdsourcing*) (WANG et al., 2016). Um esquema de funcionamento do GNPS está ilustrado na **Figura 8**.

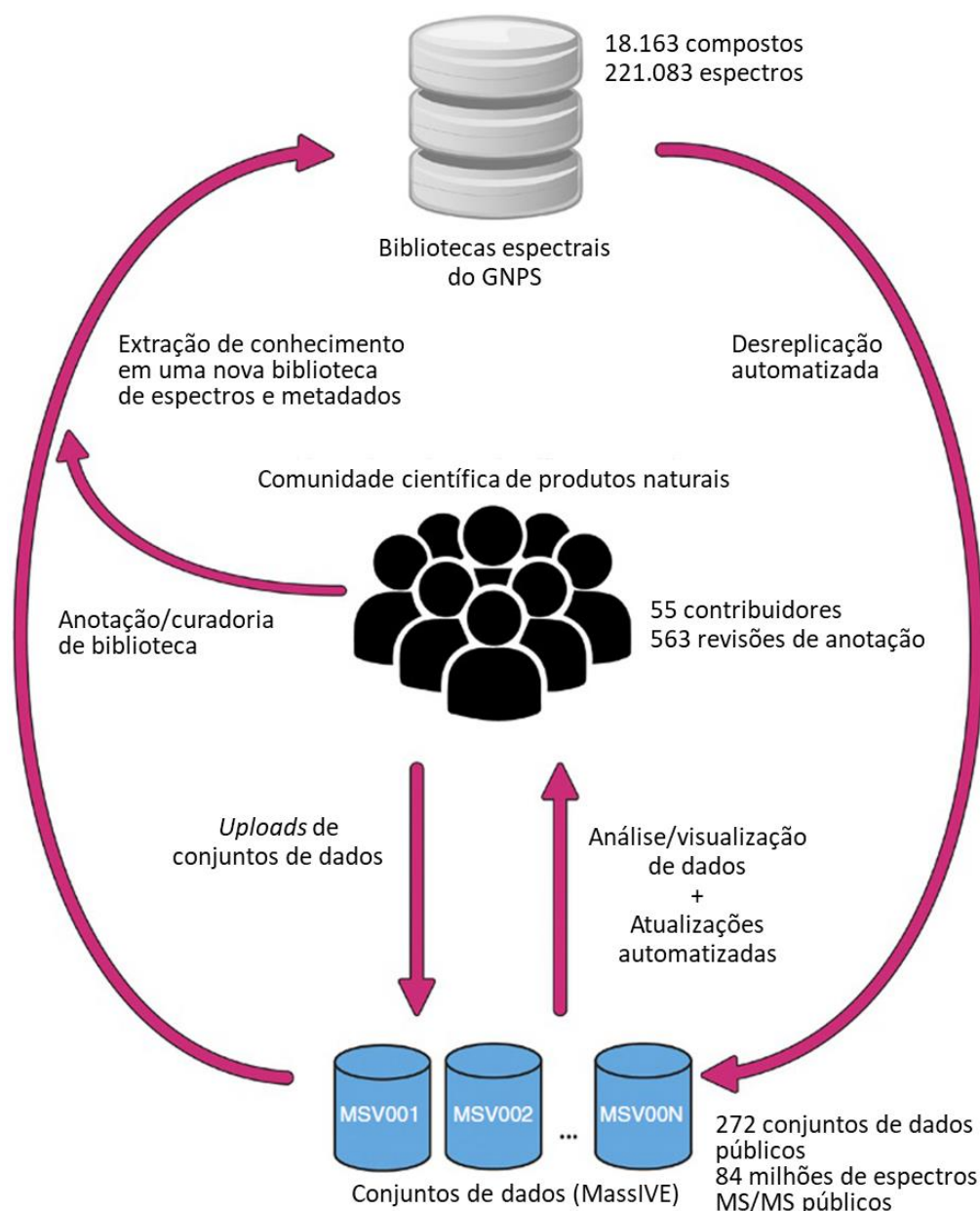


Figura 8 — Esquema de funcionamento do GNPS.

Fonte: WANG et al., 2016.

A primeira etapa de geração de uma rede molecular é a simplificação dos dados de MS/MS para reduzir a demanda por processamento computacional, em que os íons de fragmentos de baixa intensidade e os íons precursores são removidos dos espectros. Além disso, espectros com a mesma razão massa-carga (m/z) de íons precursores e que têm espectros MS/MS semelhantes são unidos em um único espectro de consenso. Após a filtragem de dados, os espectros de consenso são transformados em vetores em um espaço n -dimensional, onde cada dimensão representa um valor de razão massa-carga (**Figura 9**).

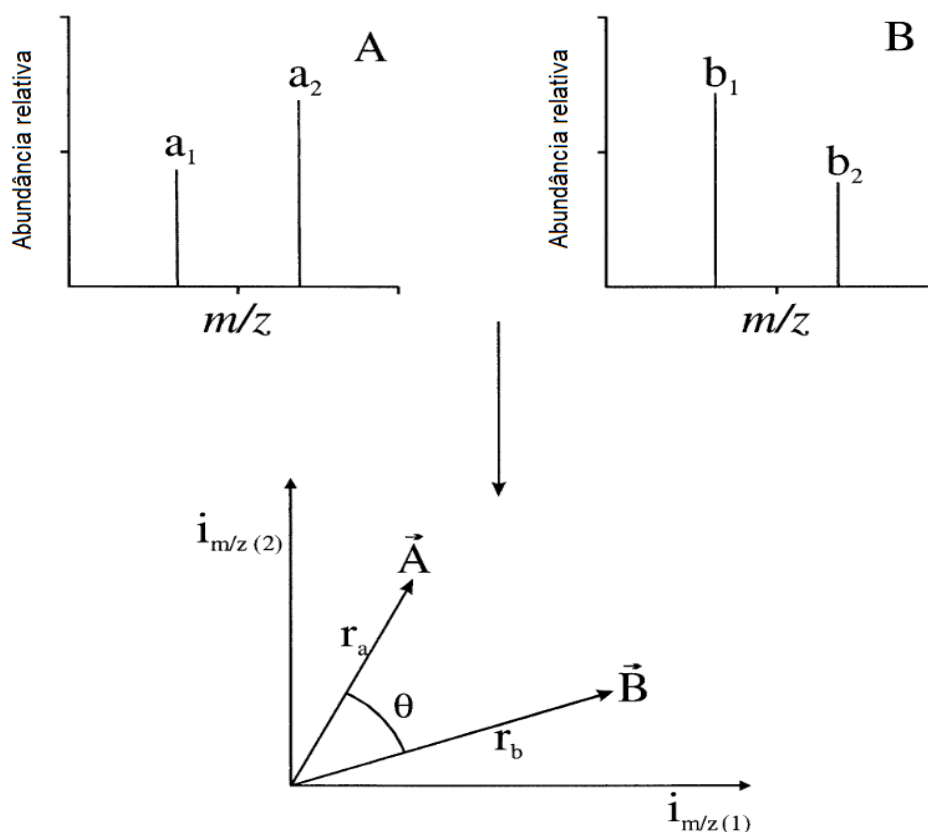


Figura 9 — Representação esquemática dos vetores dos espectros A e B.
Fonte: WAN; VIDAUSKY; GROSS, 2002.

Nesse exemplo, os espectros de dois compostos isoméricos (A e B) estão representados em vetores ($\vec{A}$ e $\vec{B}$) em um espaço bidimensional pois os picos são referentes a dois valores de razão massa-carga ($i_{m/z(1)}$ e $i_{m/z(2)}$). O comprimento (r_a e r_b) e a direção do vetor são determinados pelos valores e intensidades dos picos. A comparação quantitativa dos espectros é feita pela análise do ângulo (θ) formado entre os vetores, um ângulo de 0° significa que os espectros são idênticos (WAN; VIDAUSKY; GROSS, 2002). A partir dos valores dos ângulos são feitas pontuações de cosseno que varia de 0 a 1, em que o zero indica a máxima diferenciação entre os espectros ($\cos 90^\circ = 0$).

Na última etapa de geração das redes moleculares os resultados das comparações entre espectros são visualizados como gráficos, onde cada nó representa um espectro de consenso MS/MS e as arestas entre os nós indicam a pontuação de cosseno entre os espectros (**Figura 10**). A pontuação mínima aceitável pode ser definida pelo usuário, no exemplo mostrado foi escolhido 0,7 como limite (QUINN et al., 2017).

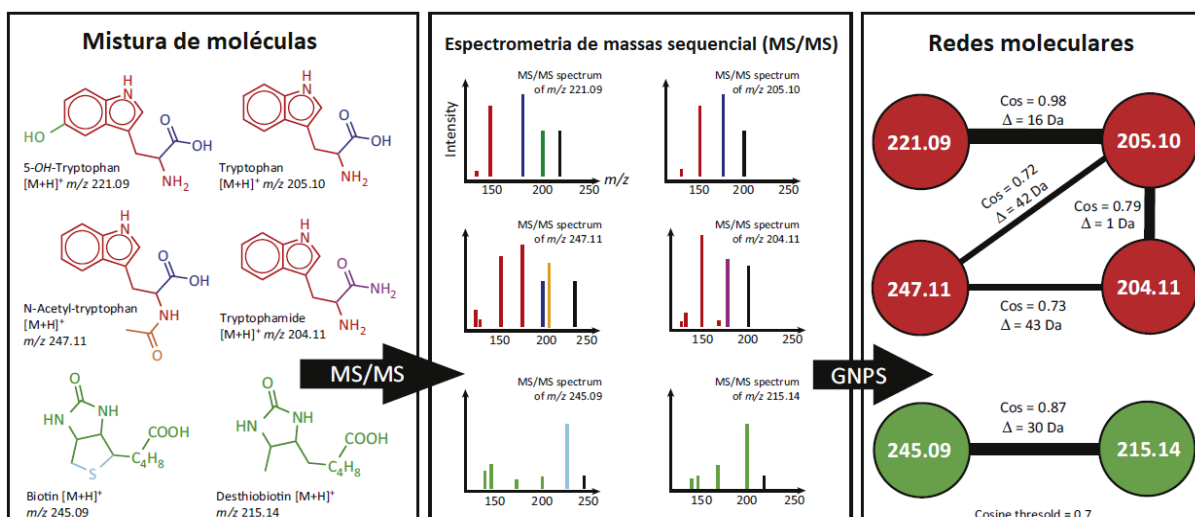


Figura 10 — Redes moleculares de espectros LC-MS/MS de derivados de triptofano e biotina (obtidos da biblioteca espectral EMBL MCF do GNPS).

Fonte: QUINN, 2017.

Esse método de construção de redes moleculares é muito utilizado desde quando o GNPS se tornou acessível ao público, em 2013, e hoje é chamado de *Molecular Networking* “clássico”.

1.4.2 Feature-based molecular networking

Mais recentemente foi criado o *feature-based molecular networking* (FBMN), um método complementar que utiliza a infraestrutura do GNPS (NOTHIAS et al., 2020). Nesse método os dados brutos são pré-processados usando ferramentas como o MZmine, que podem detectar sinais característicos de MS, como padrões isotópicos, e de LC, como tempos de retenção e áreas de pico (SCARPATO et al., 2020). Essas informações obtidas do íon precursor (MS¹) teriam que ser analisadas separadamente da rede molecular no MN clássico, tornando o processo de união dos resultados muito trabalhoso. No método FBMN os resultados obtidos pelas ferramentas de alinhamento e detecção de *feature* de LC-MS (definido como o sinal de um íon detectado para uma molécula eluída) são incorporados no fluxo de trabalho de construção de redes moleculares (**Figura 11**).

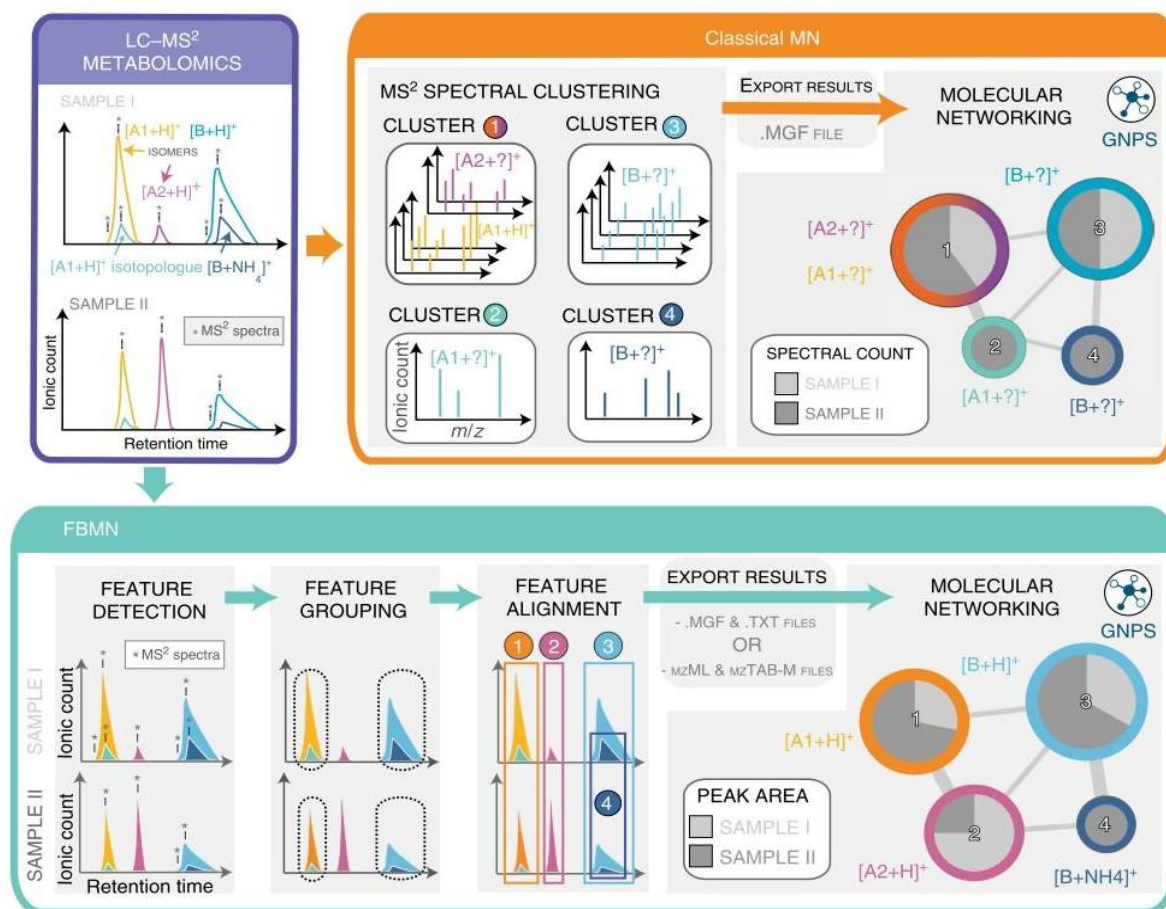


Figura 11 — Dois métodos para a geração de redes moleculares a partir de dados de MS com a plataforma GNPS. MN clássico: espectros de MS² são agrupados com o algoritmo MS-Cluster e os espectros de consenso MS² obtidos são usados para geração de redes moleculares. FBMN: primeiro é aplicada uma ferramenta de detecção e alinhamento de *features* para processar os dados de LC-MS². Os resultados são exportados como tabela de quantificação de *features* (formato .TXT) e sumário espectral MS² (formato .MGF) ou um arquivo mzTab-M e carregados para a plataforma GNPS para análise por redes moleculares. **Fonte:** NOTHIAS et al., 2020.

Uma das vantagens das redes moleculares geradas com FBMN é a capacidade de visualização e anotação eficiente de isômeros dos conjuntos de dados de LC-MS/MS. Com o FBMN é possível resolver estereoisômeros que apresentam espectros MS/MS semelhantes e tempos de retenção distintos, o que não seria possível com o MN clássico.

Outra melhoria do FBMN em relação ao MN clássico é a capacidade de quantificar as substâncias de maneira mais eficiente. Ao utilizar os dados de abundância dos *features* de LC-MS (área ou altura do pico), Nothias e colaboradores obtiveram uma resposta mais linear entre concentração molecular e abundância de íons em relação ao MN clássico. Isso demonstrou que o método FBMN é capaz de

quantificar substâncias com maior precisão e exatidão (NOTHIAS et al., 2020). Por esses motivos, o FBMN será utilizado para identificação e quantificação relativa das substâncias dos extratos de *Hypoxylon investiens*. Os valores obtidos pela quantificação dos *features* serão utilizados como resposta no planejamento experimental deste trabalho, portanto serão fundamentais para escolha das condições de cultivo do fungo. O uso combinado de métodos de planejamento experimental, epigenética e redes moleculares potencializam os estudos metabolômicos com micro-organismos marinhos.

2 OBJETIVO GERAL

Realizar análise metabolômica dos extratos do fungo *Hypoxyton investiens* e obter substâncias inéditas e/ou com atividade biológica.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações dos moduladores epigenéticos no crescimento e na quimiodiversidade do fungo *Hypoxyton investiens*;
- Determinar estatisticamente o efeito de variáveis físico-químicas, fonte de nutrientes e adição de moduladores epigenéticos na produção metabólica de *H. investiens* por métodos de planejamento experimental;
- Avaliar o perfil metabólico dos extratos por métodos de geração de redes moleculares na plataforma GNPS;
- Cultivar o fungo em escala suficiente para isolamento e identificação de substâncias;
- Isolar e determinar a estrutura dos metabólitos secundários isolados por cromatografia, ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas;
- Avaliar atividade citotóxica e antifúngica dos extratos e frações produzidos pelo fungo;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SOLVENTES, MEIOS DE CULTIVOS E ELICITORES EPIGENÉTICOS

Os solventes e moduladores epigenéticos utilizados nos cultivos, análises cromatográficas e análises espectrométricas estão disponíveis no **Quadro 2**.

Quadro 2 — Solventes e elicitores epigenéticos utilizados durante a execução da pesquisa.

Solvente	Especificação	Fabricante
CH ₃ OD	Deuterado	Sigma-Aldrich®
DMSO- <i>d</i> 6	Deuterado	Sigma-Aldrich®
CH ₃ OH	Grau HPLC	Merck®
CH ₃ OH	P.A.	Synth®
AcOEt	P.A.	Synth®
Butirato de Sódio	98,0%	Oakwood
Ácido hidroxâmico suberoilânida (SAHA)	98,0%	ChemScene
Cloridrato de procaína (Prc HCl)	97,0%	Oakwood
5-Azacidina (5-Aza)	99,4%	Combi Blocks
Nicotinamida	99,0%	Combi Blocks

Fonte: próprio autor.

Os meios de cultivo utilizados neste trabalho estão descritos no **Quadro 3**.

Quadro 3 — Meios de cultivos utilizados.

Meios de Cultura	Concentração (g/L)	Composição	Fabricante
Caldo de Batata Dextrose (PDB)	24	Fécula de batata (4 g), dextrose (20 g)	Neogen®
Extrato de malte	20	Extrato de cevada maltada desidratado	Neogen®
Batata Dextrose Ágar (BDA)	39	Fécula de batata (4 g), dextrose (20 g), ágar (15 g)	Acumedia®

Fonte: próprio autor.

3.2 EQUIPAMENTOS PARA CULTIVO FÚNGICO E PREPARO DE AMOSTRAS

Os equipamentos utilizados nos cultivos fúngicos e no preparo das amostras estão descritos no **Quadro 4**. Os equipamentos usados nas análises cromatográficas, espectrometria de massas e espectroscopia de ressonância magnética estão descritos nas seções posteriores.

Quadro 4 — Alguns equipamentos usados para o desenvolvimento do projeto

Equipamento	Fabricante e modelo
Autoclave vertical	Phoenix Luferco AV-137
Balanças Analíticas	Mettler Toledo AG245 e AG204
Balança Semi-analítica	Marconi BG2000 e Bel S 2202
Bomba de vácuo	Buchi V-300
Evaporador Rotativo	Heidolph Laborota 400 efficient
Estufa de secagem	Marconi MA 033
Liofilizador	Alpha 1-2 LD Plus
Câmara de fluxo laminar vertical	Pachane
Ultrapurificador de água	Milli-Q Millipore
Incubadora SHAKER	Solab SL-223
Centrífuga	Eppendorf MiniSpin 5452
Ultrassom	Elma Elmasonic S 60 H

Fonte: próprio autor.

3.3 COLETA DA ALGA, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA LINHAGEM FÚNGICA

Essa etapa do trabalho foi realizada pela Dra. Rebeca Previante Medina durante seu doutorado em 2013 (MEDINA, 2016). A alga e seus microrganismos associados foram registrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sob o número de cadastro A7ED4A6.

A fase diploide (estado *Falkenbergia*) de *Asparagopsis taxiformis* foi coletada em junho de 2013, no costão direito da praia da Fortaleza em Ubatuba, SP. A alga foi identificada pela Dr^a Nair Yokoya do Instituto de Botânica (Secretaria do Meio

Ambiente do Estado de São Paulo) e uma exsicata foi depositada no Herbário do Instituto de Botânica (SP 428533). A alga foi lavada cuidadosamente em água do mar e armazenada em frascos contendo água do mar esterilizada e o antibiótico cloranfenicol (200 mg.L^{-1}). Estes frascos foram acondicionados em caixas térmicas e transportados ao Instituto de Química - UNESP/Araraquara. Já no laboratório, a alga foi esterilizada superficialmente através de imersão em solução de NaOCl 1% por 6 segundos e em etanol 70% por 2 segundos, seguido de lavagem com água do mar esterilizada por 10 minutos.

Após o processo de esterilização, a alga foi fragmentada com uso de pinça e bisturis cirúrgicos estéreis, e transferida para placas de Petri contendo meio de cultivo de BDA, água do mar esterilizada e o antibiótico cloranfenicol (200 mg.L^{-1}). Para controle da eficácia do método de esterilização, uma alíquota de água de lavagem foi inoculada em BDA em água do mar.

O crescimento dos fungos foi monitorado e repiques sucessivos foram realizados até a obtenção das linhagens puras, que foram preservadas em “slants” (frascos contendo água do mar ou água ultrapura esterilizada e o fungo em meio sólido BDA), que foram lacrados e mantidos em temperatura ambiente.

A identificação do fungo foi feita através do sequenciamento Sanger de regiões específicas do DNA (ITS) do micro-organismo. Inicialmente foi feita a extração do material genético kit (ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™), seguido do preparo das reações para o sequenciamento. O sequenciamento das amostras foi feito automaticamente por eletroforese capilar no equipamento ABI3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) e, em seguida, foi realizado o alinhamento das sequências de nucleotídeos produzidas com as sequências de referência depositadas no *GenBank* (banco de dados genômicos).

3.4 CULTIVO EM PLACA DE 6 POÇOS

Esse experimento foi realizado para determinar a melhor concentração de cada modulador, dependendo do crescimento do fungo e também do perfil químico dos extratos. Amostras do fungo *Hypoxylon investiens* (AT-01), preservado em frasco *slant* contendo água do mar, foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultivo BDA. Após sete dias de crescimento a 25°C , foram feitos discos de micélios

com ponteira de 1 mL (**Figura 12**) e esses foram transferidos para placas de 6 poços contendo meio líquido de malte e moduladores. Foram utilizadas duas placas por modulador totalizando dez placas (**Figura 13**).



Figura 12 — Placas de cultivo de *Hypoxylon investiens* (AT-01) depois de 7 dias de crescimento em meio BDA e discos de micélios retirados com ponteira de 1 mL.

Fonte: próprio autor.

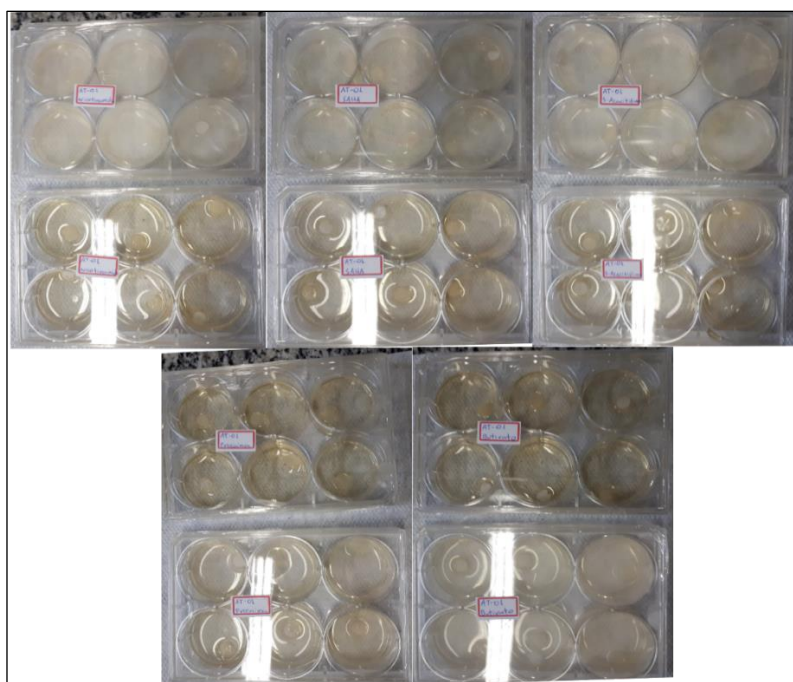


Figura 13 — Início do cultivo fúngico em placa de 6 poços, no qual duas placas foram usadas para cada modulador.

Fonte: próprio autor.

Os meios com moduladores em diferentes concentrações foram preparados por meio de diluição seriada. No poço número 1 de cada placa foi adicionado uma solução do meio de malte com o modulador em sua maior concentração. Em seguida, uma alíquota deste poço foi transferida para o poço seguinte, que continha 2000 µL do meio sem modulador, e esse processo se repetiu sucessivamente até o poço 5. O sexto poço de cada placa foi utilizado para controle (branco analítico) e continha somente suspensão do fungo com meio de malte. Todos os poços ficaram com 2000 µL de meio e as concentrações dos moduladores estão mostrados na **Tabela 1**.

Tabela 1 — Concentração dos moduladores epigenéticos em cada poço da placa utilizada para cultivo do fungo *H. investiens*.

Poço	[Butirato de sódio] (mM)	[Nicotinamida], [SAHA], [5-Aza] e [Prc HCl] (µM)
1	500	1000
2	50	200
3	5	40
4	0,5	8,0
5	0,05	1,6
6	0,0	0,0

Fonte: próprio autor.

Depois de 11 dias de crescimento o conteúdo de cada poço foi transferido para frascos de Erlenmeyer de 50 mL, seguido de três adições de 2 mL de acetato de etila para realizar a extração (**Figura 14**). Os micélios dos poços (1–5) de mesma numeração, de cada par de placas, foram unidos em só frasco de Erlenmeyer e o extrato controle foi feito unindo os dez poços que não continham moduladores (poço 6).

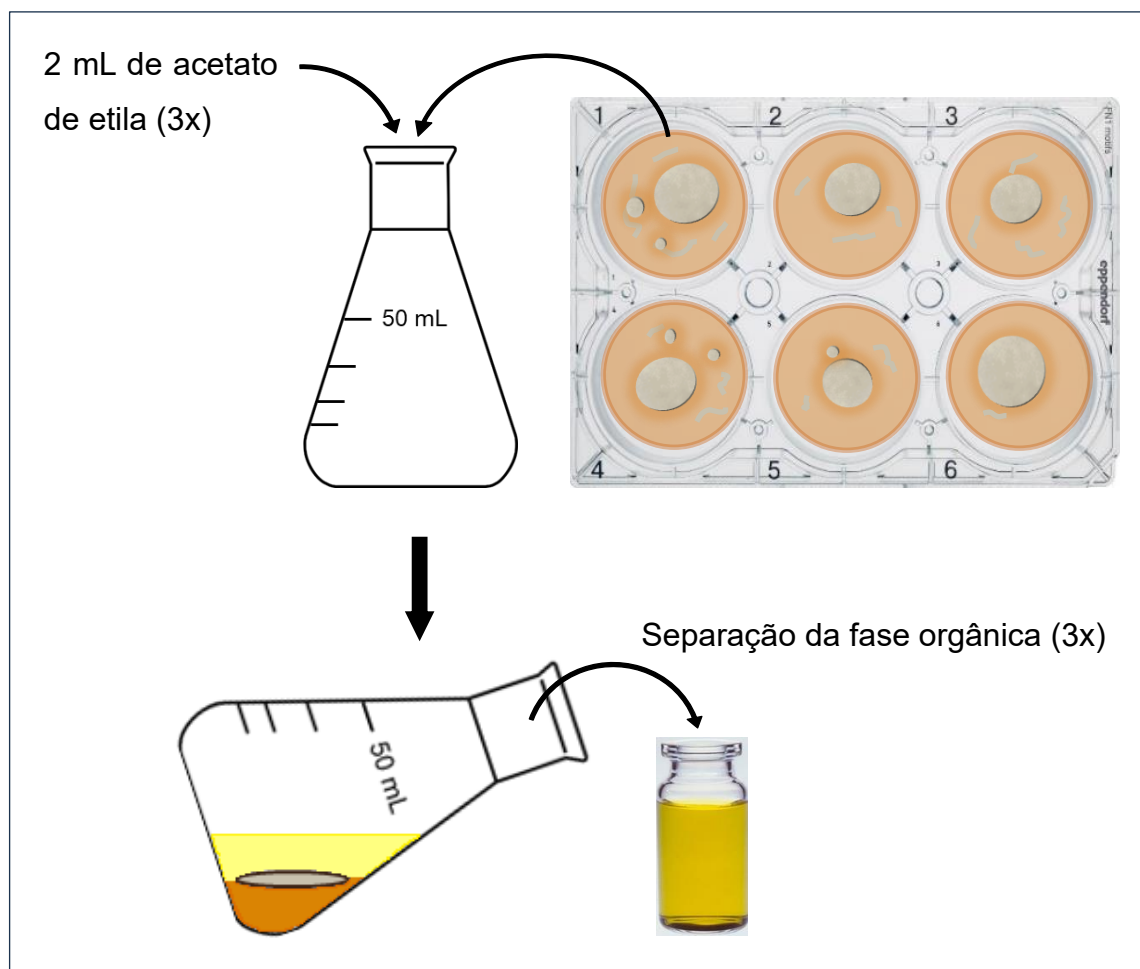


Figura 14 — Esquema de obtenção dos extratos fúngicos cultivados em placa de 6 poços.
Fonte: próprio autor.

3.4.1 Cromatografia Líquida com analisador *ion trap*

Os extratos obtidos com o cultivo em placa de 6 poços foram submetidos ao *clean up* utilizando um cartucho de extração em fase sólida (SPE) RP18. Os cartuchos foram ativados com MeOH e equilibrados com MeOH:H₂O 95:5 (v/v). As amostras foram aplicadas no cartucho e eluídas com MeOH:H₂O 95:5 (v/v). Após secas, as amostras foram preparadas com concentração de 1 mg/mL MeOH e colocadas em frascos *vials* de 2 mL para análise.

Os extratos obtidos com o cultivo em placa de 6 poços foram analisados por HPLC-MS em baixa resolução, usando um cromatógrafo líquido Shimadzu®, composto por bombas LC-20AD, desgaseificador DGU-20A3, injetor automático SIL-20AHT, detector ultravioleta com arranjo de diodos SPD-M20A, módulo de comunicação CBM-20A. Foi utilizada uma coluna cromatográfica de fase reversa C18

(octadecil silano) Phenomenex® LUNA® medindo 250 mm x 4,60 mm e com partículas de 5 µm. O sistema de solventes consistiu em H₂O e Metanol (MeOH), usando taxa de fluxo de 1,0 mL/min, temperatura de coluna de 40 °C e volume de injeção de 2 µL. O método empregado para cada análise consistiu em um gradiente de 5% a 100% de MeOH em 40 minutos.

O espectrômetro de massas usado foi o modelo Amazon SL da Bruker®, equipado com fonte de ionização Eletrospray (ESI), analisador Ion Trap e *software* TrapControl. Amplitude de fragmentação MS/MS: 75%. Faixa de aquisição: 50-1200 *m/z*, operando com o *software* HighStar. Tensão do capilar de transferência: 4,5 kV, nitrogênio utilizado como gás nebulizador e de secagem (50 psi, 10 L/min, 300 °C). Os dados foram processados através do *software* Bruker Compass Data Analysis 4.3.

3.4.2 Análise por rede molecular “clássica” no GNPS

Com os espectros de massas desses extratos foram geradas redes moleculares, utilizando a plataforma GNPS, com objetivo de avaliar a variação da produção metabólica associada ao uso dos moduladores epigenéticos. Os dados brutos foram convertidos para o formato mzXML no *software* MSConvert e inseridos na plataforma GNPS para gerar as redes moleculares (WANG et al., 2016). Os parâmetros utilizados estão mostrados na **Figura 15**. Todas as redes moleculares deste trabalho foram visualizadas e organizadas no software Cytoscape 3.10.

Basic Options

Spectrum files must be centroided and be in an open spectrum format (mzXML, mzML, or mgf)

Spectrum Files (Required): 25 files and 0 folders are selected [See here for further documentation about molecular networking.](#)

Spectrum Files G2: [Click Here here to run a demo molecular network.](#)

Spectrum Files G3:

Spectrum Files G4:

Spectrum Files G5:

Spectrum Files G6: 1 file and 0 folders are selected [For custom group/attribute documentation click here](#)

Precursor Ion Mass Tolerance: Da Fragment Ion Mass Tolerance: Da

Advanced Network Options

Min Pairs Cos: Minimum Matched Fragment Ions: Maximum shift: Da

Network TopK: Minimum Cluster Size: Run MSCluster:

Maximum Connected Component Size:

Google Sheets Metadata URL (Experimental): Metadata File:

Group Mapping (Legacy):

Attribute Mapping (Legacy):

Advanced Library Search Options

Spectral Library: 0 files and 1 folder are selected [To import libraries for search click here](#)

Library Search Min Matched Peaks: Score Threshold:

Search Analogs: Maximum Analog Search Mass Difference:

Advanced Filtering Options

Filter below Std Dev: Minimum Peak Intensity:

Filter Precursor Window:

Filter peaks in 50Da Window:

Filter Spectra from G6 as Blanks Before Networking:

Advanced GNPS Repository Search Options

Find Related Datasets (Temporarily Deprecated):

Advanced Output Options

Create Cluster Buckets and qiime2/Biom/PCoA Plots output:

Create Ili Mapping Output:

Ili STL Model:

Figura 15 — Parâmetros utilizados na plataforma GNPS para geração de redes moleculares método “clássico”.

Fonte: adaptado de <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>, acesso 31 de janeiro de 2022.

3.6 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTO PLACKETT-BURMAN

Para as análises na etapa inicial de triagem foram selecionados os seguintes fatores: temperatura (°C), agitação (RPM), fotoperíodo (horas), concentração do meio de malte (no nível -1 foi utilizado somente PDB), volume de água do mar (no nível -1 foi utilizado somente água ultrapura), tempo de cultivo (dias), e concentração dos

moduladores epigenéticos: SAHA (μM), nicotinamida (μM), butirato de sódio (mM), 5-Azacidina (μM) e cloridrato de procaína (μM) (**Tabela 2**).

Tabela 2 — Fatores avaliados no planejamento Plackett-Burman e seus respectivos valores.

Fator	Nível baixo (-1)	Nível alto (+1)	Ponto central
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	23	33	28
Agitação (RPM)	0	100	50
Fotoperíodo (horas)	0	24	12
% Malte	0*	100	50
% Água do mar	0**	100	50
Tempo (dias)	14	28	21
[SAHA] (μM)	0	100	50
[Nicotinamida] (μM)	0	100	50
[NaBut] (mM)	0	5	2,5
[5-Aza] (μM)	0	100	50
[Prc HCl] (μM)	0	100	50

*Somente meio de PDB **Somente água ultrapura

Fonte: próprio autor.

No planejamento de Plackett-Burman com dois níveis a matriz é construída com colunas que representam os fatores em seus respectivos níveis (+1) e (-1) e é gerada a partir de um conjunto de sinais (+) e (-), que são ordenados conforme o valor de experimentos n (CALADO; MONTGOMERY, 2003). Para o planejamento com 11 fatores e 12 experimentos utilizou-se o conjunto (++-++-+-+), que foi escrito como a primeira coluna. A segunda coluna foi gerada ao deslocar o último sinal da primeira para o começo da segunda, seguindo a ordem do conjunto. Quando todas as 11 colunas foram preenchidas dessa maneira, uma linha com sinais negativos foi adicionada como 12º experimento. Para finalizar o planejamento, foram adicionadas 4 linhas referentes aos pontos centrais (**Tabela 3**).

Tabela 3 — Cultivo fúngico seguindo o planejamento Plackett-Burman com 11 variáveis (fatores) e 4 pontos centrais.

Experimento	Temperatura	Agitação	Fotoperíodo	% Malte	% Água do mar	Tempo de cultivo	[SAHA]	[Nicotinamida]	[NaBut]	[5-Aza]	[Prc HCl]
1	33	0	24	0	0	14	100	100	5	0	100
2	33	100	0	100	0	14	0	100	5	100	0
3	23	100	24	0	100	14	0	0	5	100	100
4	33	0	24	100	0	28	0	0	0	100	100
5	33	100	0	100	100	14	100	0	0	0	100
6	33	100	24	0	100	28	0	100	0	0	0
7	23	100	24	100	0	28	100	0	5	0	0
8	23	0	24	100	100	14	100	100	0	100	0
9	23	0	0	100	100	28	0	100	5	0	100
10	33	0	0	0	100	28	100	0	5	100	0
11	23	100	0	0	0	28	100	100	0	100	100
12	23	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0
13	28	50	12	50	50	21	50	50	2.5	50	50
14	28	50	12	50	50	21	50	50	2.5	50	50
15	28	50	12	50	50	21	50	50	2.5	50	50
16	28	50	12	50	50	21	50	50	2.5	50	50

Fonte: próprio autor.

Esse planejamento foi usado para identificar quais fatores tiveram maior efeito sobre a resposta “número de *features*”. Decidiu-se utilizar somente os *features* como resposta no planejamento, já que os valores de atividade biológica não puderam ser usados, conforme discutido na Seção 4.2.1. A quantificação dos *features* foi realizada por meio do processamento dos dados obtidos por UHPLC-MS no *software* MZmine

2.53. Os resultados foram determinantes para o cultivo fúngico em escala ampliada visando o isolamento de substâncias.

3.6.1 Cultivo e extração dos fungos seguindo o planejamento Plackett-Burman

Para esse cultivo as amostras do fungo foram transferidas para placas de Petri contendo meio BDA da mesma maneira que foi descrita na seção 3.4 porém, em vez da placa de 6 poços, os fungos foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 500 mL com abertura de 3 cm de diâmetro e contendo 200 mL de meio de cultivo. Os frascos foram colocados nas incubadoras de agitação orbital (*shaker*) que possibilitam o controle de agitação e temperatura. Para os experimentos em que o fotoperíodo foi de 0 horas, os frascos foram cobertos com papel alumínio de maneira a bloquear a entrada de luz (**Figura 16**).



Figura 16 — Frascos do cultivo com o planejamento Plackett-Burman dentro da incubadora.
Fonte: próprio autor.

No total 18 frascos foram utilizados para o cultivo, sendo 16 deles referentes aos experimentos do planejamento Plackett-Burman, um continha somente o meio de cultivo PDB e o outro somente malte. Esses frascos, contendo somente os meios de cultivos, foram usados como branco analítico para evitar que as substâncias dos meios fossem atribuídas como produtos metabólicos do fungo.

Após o período de incubação o caldo foi separado do micélio por filtração a vácuo com papel filtro e o micélio foi descartado. O filtrado foi transferido para outros frascos limpos e aproximadamente 50 mL de acetato de etila (AcOEt) foi adicionado em cada frasco para inativação dos fungos. No outro dia, cada filtrado diferente foi submetido à partição líquido-líquido em funil de separação com AcOEt (3 vezes de 100 mL). O solvente orgânico foi evaporado no evaporador rotativo e os extratos secos foram preparados para as análises por UHPLC-MS e atividade biológica. Um fluxograma resumindo essa etapa do trabalho está mostrado na **Figura 17**.

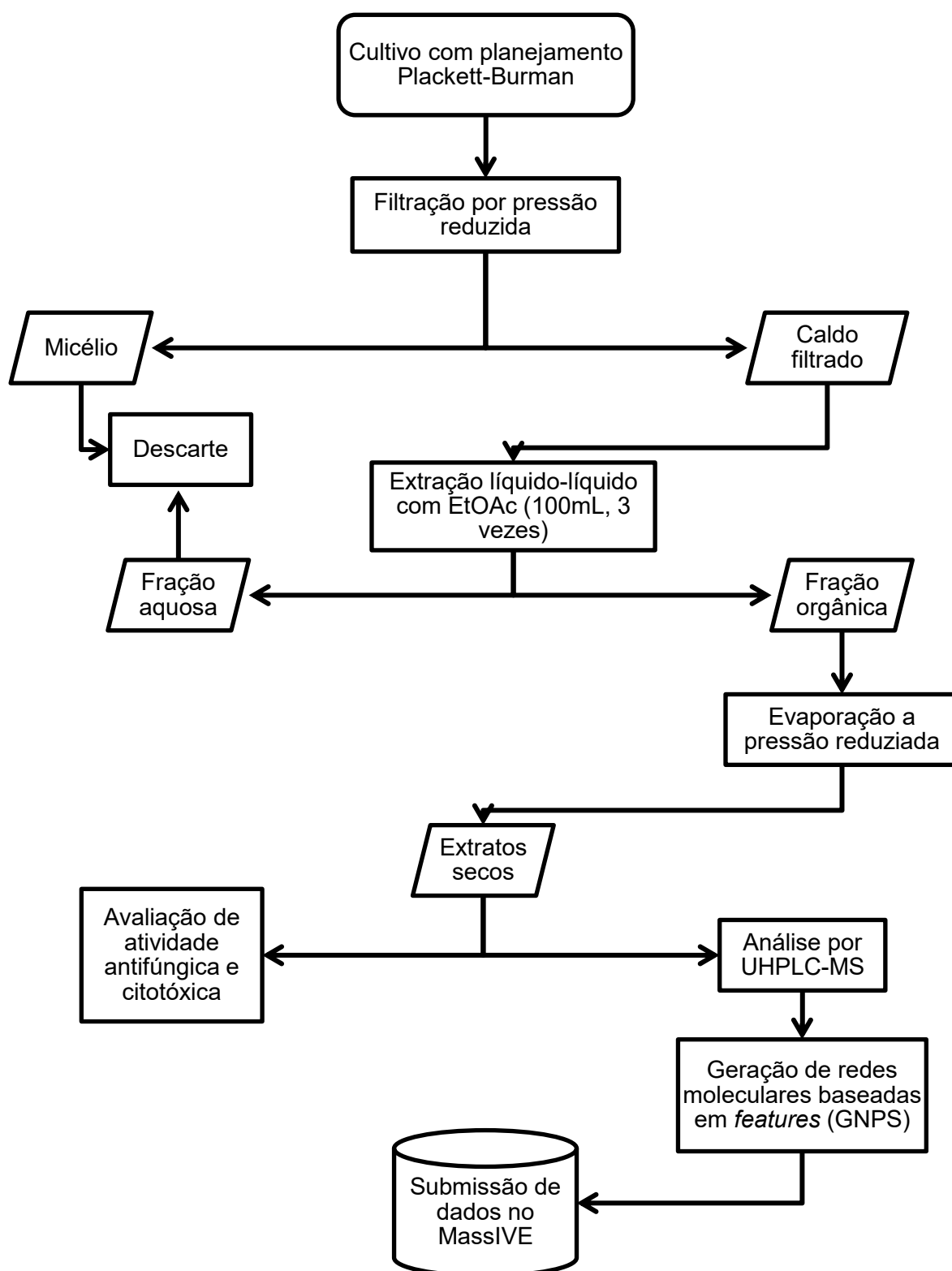


Figura 17 — Fluxograma de obtenção dos extratos do cultivo realizado com o planejamento Plackett-Burman e análises realizadas com esses extratos.

Fonte: próprio autor.

3.6.2 Análise por UHPLC-MS/MS

O preparo das amostras para essa análise seguiu o mesmo procedimento descrito no item 3.4.1, com exceção que a concentração da amostra foi ajustada para 0,5 mg/mL, para extratos, e 0,05 para substâncias isoladas.

O sistema UHPLC-MS/MS em alta resolução constitui de um cromatógrafo Acquity H-Class (Waters®) equipado com bomba quaternária (Quaternary Solvent Manager), detector de arranjo de diodos (DAD e λ Detector), forno de coluna e injetor automático (Sample Manager - FTN). Foi utilizada uma coluna de fase reversa (Waters Acquity UPLC HSS T3 1,8 μ m 2,1 x 100 mm) e uma pré-coluna (Waters Acquity UPLC HSS T3 1,8 μ m VanGuard 2,1 x 5 mm) para a realização das análises.

O sistema cromatográfico estava acoplado a um espectrômetro de massas Xevo G2-XS QToF, equipado com fonte de ionização por Eletrospray (ESI), analisador Q-ToF (*Quadrupole-Time of Flight*) e *software* MassLynx®. O volume de injeção foi de 0,80 μ L e a vazão aplicada foi de 10 μ L/min. A fase móvel foi composta por água (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico. O método cromatográfico utilizado foi um gradiente de 5% a 100% de B em 15 minutos.

Os seguintes parâmetros de espectrometria de massas (MS) foram utilizados para a aquisição dos dados: faixa de massa entre m/z 100–1500 Da; voltagem do capilar de 2,0 kV; fluxo do gás do cone de transferência de 50 L/h; fluxo de gás de dessolvatação de 800 L/h; temperatura da fonte de 120 °C; e temperatura de dessolvatação de 350 °C. A fragmentação por MS/MS foi obtida por meio de uma rampa de energia de colisão (*collision energy*, CE), variando de 10 a 40 eV para íons de baixa razão m/z , e de 50 a 80 eV para íons de alta razão m/z .

3.6.3 Geração das redes moleculares

Os dados obtidos por UHPLC-MS foram processados no *software* MZmine e na plataforma GNPS para geração das redes moleculares. A produção metabólica desses extratos, obtidos pelo planejamento Plackett-Burman, foram avaliados por *feature-based molecular networking* e por rede molecular “clássica”. As redes do método clássico foram obtidas como descrito na seção 3.4.2, com algumas diferenças

dos parâmetros do GNPS (**Figura 18**), enquanto a metodologia para obtenção das redes de *features* estão descritas nas seções seguintes.

Basic Options

Spectrum files must be centroided and be in an open spectrum format (mzXML, mzML, or mgf)

Spectrum Files (Required): 1 file and 0 folders are selected [See here for further documentation about molecular networking.](#)

Spectrum Files G2: 2 files and 0 folders are selected [Click Here here to run a demo molecular network.](#)

Spectrum Files G3: 16 files and 0 folders are selected

Spectrum Files G4:

Spectrum Files G5:

Spectrum Files G6: [For custom group/attribute documentation click here](#)

Precursor Ion Mass Tolerance: Da Fragment Ion Mass Tolerance: Da

Advanced Network Options

Min Pairs Cos: Minimum Matched Fragment Ions: Maximum shift: Da

Network TopK: Minimum Cluster Size: Run MSCluster:

Maximum Connected Component Size:

Google Sheets Metadata URL (Experimental):

Metadata File: 1 file and 0 folders are selected

Group Mapping (Legacy):

Attribute Mapping (Legacy):

Advanced Library Search Options

Spectral Library: 0 files and 1 folder are selected [To import libraries for search click here](#)

Library Search Min Matched Peaks: Score Threshold:

Search Analogs: Maximum Analog Search Mass Difference:

Advanced Filtering Options

Filter below Std Dev: Minimum Peak Intensity:

Filter Precursor Window:

Filter peaks in 50Da Window:

Filter Spectra from G6 as Blanks Before Networking:

Advanced GNPS Repository Search Options

Find Related Datasets (Temporarily Deprecated):

Advanced Output Options

Create Cluster Buckets and qiime2/Biom/PCoA Plots output:

Create Ili Mapping Output:

Ili STL Model:

Figura 18 — Parâmetros utilizados na plataforma GNPS para geração de redes moleculares dos extratos do planejamento Plackett-Burman.

Fonte: adaptado de <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>, acesso 4 de janeiro de 2023.

3.6.3.1 Processamento no software MZmine

Os dados brutos do UHPLC-MS/MS foram convertidos para o formato .MZml no *software* msConvert (ProteoWizard) e processados no *software* MZmine 2.53 (FOR et al., 2022) até obtenção dos arquivos necessários para gerar redes moleculares pelo método FBMN (*Feature-Based Molecular Networking*).

Na primeira etapa de processamento no MZmine são criadas listas de massas com os dados de LC-MS/MS. Na segunda etapa, as listas de massas são usadas para construir os cromatogramas de íon extraído (MYERS et al., 2017). Nos EICs (*extracted ion chromatogram*) produzidos na etapa anterior, pode ocorrer a presença de dois ou mais sinais cromatográficos por *feature* (informação produzida pela combinação de um dado de MS e um dado cromatográfico). Para separar esses sinais cromatográficos em *features* únicos, é realizada a etapa de desconvolução cromatográfica. A etapa seguinte é o agrupamento de sinais isotópicos, na qual diferentes *features* que compõem um perfil isotópico são combinados em um único *feature*. Por fim, na quinta etapa, as listas de *features* de cada amostra são alinhadas em uma única lista.

Após a obtenção da lista de *features* citada anteriormente, dois arquivos foram gerados pelo MZmine: uma tabela de integração dos *features* (.csv) e um arquivo contendo todos os dados de MS/MS (.mgf). Os dois arquivos são necessários para construção das redes moleculares pelo método FBMN e a tabela de integração dos *features* permitiu a quantificação dos íons para serem utilizados como resposta no planejamento Plackett-Burman. Os parâmetros utilizados em cada etapa e seus valores estão mostrados na **Tabela 4**.

Tabela 4 — Parâmetros utilizados no *software* MZmine para o processamento dos dados de LC-MS/MS.

Etapa	Parâmetro	Valor
Mass Detection	Noise level	MS 1 1.0E3 MS 2 1.0E1
ADAP Chromatogram Builder	Minimum group size number of scans	2
	Group intensity threshold	1.0E3
	Minimum highest intensity	1.0E3
	<i>m/z</i> tolerance	0.2
Chromatogram deconvolution	Algorithm	Baseline cut-off
	<i>m/z</i> range for MS ² scan pairing (Da)	0.2
	<i>RT</i> range for MS ² scan pairing (min)	0.1
Isotopic peaks grouper	<i>m/z</i> tolerance (ppm)	20
	Retention time tolerance (min)	0.1
	Maximum charge	3
LC-MS feature alignment	<i>m/z</i> tolerance (ppm)	20
	Weight for <i>m/z</i>	75
	Retention time tolerance (min)	0.1
	Weight for <i>RT</i>	25

Fonte: próprio autor.

3.6.3.2 Feature-Based Molecular Networking

Os dados brutos de LC-MS e os arquivos gerados pelo MZmine foram inseridos na plataforma GNPS para geração das redes moleculares. As configurações do GNPS utilizadas na análise por FBMN estão mostradas na **Figura 19**.

File Selection

MS2 File MGF/MSP(Progenesis Q1)/mzML(MzTab-M): 1 file and 0 folders are selected

Feature Quantification Table: 1 file and 0 folders are selected

Original mzML Files: 19 files and 0 folders are selected

Google Sheets Metadata URL (Experimental):

Sample Metadata Table: 1 file and 0 folders are selected

Basic Options

Quantification Table Source:

Precursor Ion Mass Tolerance: Da

Fragment Ion Mass Tolerance: Da

Advanced Network Options

Min Pairs Cos: Minimum Matched Fragment Ions: Maximum shift between precursors: Da

Network TopK: Maximum Connected Component Size (Beta):

Advanced Library Search Options

Spectral Library: 0 files and 1 folder are selected

[To import libraries for search click here](#)

Library Search Min Matched Peaks: Score Threshold:

Search Analogs: Maximum Analog Search Mass Difference: Da

Top results to report per query:

Advanced Filtering Options

Minimum Peak Intensity:

Filter Precursor Window:

Filter peaks in 50Da Window:

Filter Library:

Figura 19 — Parâmetros utilizados na plataforma GNPS para geração das redes de *features* (FBMN).

Fonte: adaptado de <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>, acesso 4 de dezembro de 2022.

3.7 CRESCIMENTO FÚNGICO EM ESCALA AMPLIADA

A partir das análises dos resultados obtidos no cultivo com o planejamento Plackett-Burman, foi decidido cultivar o fungo em duas condições diferentes: um cultivo nas condições do experimento 1, devido à anotação de cliclopeptídeos, e outro nas condições do experimento 9, por ter resultado no maior número de *features*. Foram utilizados 12 frascos para o experimento 1 e 60 frascos para o experimento 9 com o objetivo de obter pelo menos 1g de extrato em cada condição. Para obter amostras de branco analítico foi preparado um frasco para cada experimento, nas mesmas condições, porém sem a adição dos fungos.

A metodologia para esse cultivo e extração foi a mesma descrita na seção 3.6.1, com a exceção de que os frascos referentes ao experimento 9 ficaram em uma prateleira envolta com papel pardo para bloquear a entrada de luz.

3.7.1 Análises cromatográficas dos extratos obtidos em escala ampliada

Para poder analisar os dois extratos fúngicos (**Exp1** e **Exp9**) por métodos cromatográficos, foi feito o procedimento de *clean up*, como descrito na seção 3.4.1, com a diferença do ajuste da concentração final de 2 mg/mL para as análises por HPLC-DAD no modo analítico e 0,5 mg/mL para as análises por UHPLC-MS.

As análises por HPLC-DAD no modo analítico foram feitas com um cromatógrafo líquido Shimadzu®, composto por bombas LC-20AT, injetor automático SIL-20A, detector ultravioleta SPD-M20A baseado em arranjo de diodos, módulo de comunicação CBM-20A, degaseificador DGU-20A3 e *software* LC-Solution. Também foi utilizada uma coluna de fase reversa Phenomenex® LUNA® C18, com as dimensões de 250 mm x 4,60 mm e partículas com granulação de 5 µm.

As análises por UHPLC-MS foram feitas nas mesmas condições descritas na seção 3.6.2, com o objetivo de comparar a produção metabólica do fungo cultivado com o planejamento Plackett-Burman e o cultivo em escala ampliada.

3.7.2 Fracionamento dos extratos

Os dois extratos obtidos no cultivo em escala ampliada tiveram rendimento de massa e produção metabólica diferentes, por isso foram aplicados métodos de fracionamento distintos para os dois. Os fracionamentos foram realizados com o objetivo de facilitar o isolamento de substâncias.

3.7.2.1 Fracionamento por cromatografia em coluna

O extrato **Exp1** teve o menor rendimento de massa e também menor variabilidade de metabólitos, por esses motivos foi decidido fracionar esse extrato por cromatografia em coluna com octadecil silano (sílica C18, fase reversa). Esse é um método rápido para simplificar o extrato ao excluir os metabólitos com polaridade

muito alta ou muito baixa, que provavelmente são sacarídeos e lipídios provenientes do meio de cultivo, além de possíveis contaminantes.

10 g de sílica derivatizada C18 foram adicionados a uma coluna de vidro de 3 cm de diâmetro, usando MeOH como eluente e bomba a vácuo para auxiliar a eluição. Após 24 h de empacotamento, a altura da sílica na coluna foi de 14 cm, permitindo o cálculo de volume morto (50 mL). Após o condicionamento do sistema, 507,5 mg do extrato, dissolvido em MeOH, foi cuidadosamente aplicado na coluna. A eluição começou com uma solução de MeOH:H₂O 35:65, seguida de MeOH:H₂O 60:40 e, por fim, MeOH 100%. Três frações foram obtidas através desse método: **Exp1 Fr1**, **Exp1 Fr2** e **Exp1 Fr3**.

3.7.2.1 Fracionamento por cromatografia por exclusão de tamanho

O extrato **Exp9** foi fracionado por cromatografia por exclusão de tamanho, no qual uma coluna de vidro de 3 cm de diâmetro foi preenchida com Sephadex® LH-20, uma resina à base de dextrana. A resina foi adicionada com MeOH na coluna e, depois de 24 h, foi formado o gel empacotado com 43 cm de altura. O extrato (894,5 mg) foi aplicado na coluna e MeOH foi usado como fase móvel para eluição. Cada vez que 13 mL de líquido passava pela coluna era feita uma coleta em um tubo de fundo cônico (tipo falcon) de 15 mL e outro tubo era posicionado na saída da coluna. Dessa maneira foram obtidas 33 frações que foram secas e analisadas por HPLC-DAD em modo analítico, assim como descrito na seção 3.7.1. Após essas análises por HPLC as frações com perfis químicos semelhantes foram agrupadas, resultando em 5 frações desse extrato: **Exp9 Fr1**, **Exp9 Fr2**, **Exp9 Fr3**, **Exp9 Fr4** e **Exp9 Fr5**.

O presente estudo foi inicialmente planejado de forma que as frações dos extratos fossem purificadas por HPLC-DAD, em modo semi-preparativo, com sílica C18 até o isolamento de substâncias. Para aumentar a eficiência desse processo foi utilizada a cromatografia por exclusão de tamanho para formar um sistema ortogonal com a cromatografia com sílica C18, ou seja, um sistema com mecanismos de separação independentes entre si e que possuem diferentes perfis de seletividade. Esse método foi escolhido para fracionar o extrato **Exp9** por ele ser mais complexo em relação ao extrato **Exp1**, devido a quantidade de massa e variedade de sinais observados no cromatograma.

3.7.3 Purificação das frações por HPLC-DAD semi-preparativo

As análises por HPLC-DAD no modo semi-preparativo foram feitas com um cromatógrafo líquido Shimadzu®, composto por bombas LC-6AD, injetor manual, detector ultravioleta SPD-38-M20A baseado em arranjo de diodos, módulo de comunicação CBM-20A, desgaseificador DGU-20A5R e *software* LC-Solution. Foi utilizada uma coluna de fase reversa Phenomenex® LUNA® C18, com as dimensões de 250 mm x 10,0 mm e partículas com granulação de 5 µm. As amostras foram diluídas em MeOH formando soluções com concentração de 20 mg/mL e foram injetadas em volumes que variaram entre 50 e 400 µL. MeOH e H₂O em diversas proporções foram utilizados como fase móvel.

Diversos métodos cromatográficos foram testados nesse HPLC de modo a obter cromatogramas com picos bem resolvidos no menor tempo de análise. O método cromatográfico para purificação da fração **Exp1 Fr1** constituiu de um gradiente de 5 a 100% MeOH em 42 minutos, seguindo as etapas: 5–18–40–60–100 % de MeOH em 0–13–15–40–42 min. Para a fração **Exp9 Fr3** foi utilizado um gradiente de 5–10–35–75–100 % de MeOH em 0–5–10–50–55 min

3.8 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS POR RMN E UHPLC-MS

Todas as substâncias isoladas das frações **Exp1 Fr1** e **Exp9 Fr3** foram analisadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e por UHPLC-MS. As análises por UHPLC-MS das substâncias foram feitas no mesmo equipamento descrito na seção 3.6.2, com a diferença que a concentração das amostras foi ajustada para 0,1 mg/mL.

As análises por RMN foram feitas no equipamento Bruker Avance III HD com campo magnético de 14,1 T, equipado com crio-sonda TCI (*Triple Channel Inverse*) de 5 mm. TMS foi usado como referência interna e algumas amostras foram solubilizadas em metanol deuterado (CH₃OD), enquanto outras foram solubilizadas em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*6). Foram realizados experimentos uni e bidimensionais, sendo eles: 1D ¹H, 1D ¹³C, TOCSY, NOESY, HSQC, COSY e HMBC.

3.9 ANÁLISES DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Alguns extratos obtidos através do planejamento Plackett-Burman foram enviados para análises de atividade citotóxica e antifúngica. Posteriormente as frações obtidas em escala ampliada **Exp1 Fr1**, **Exp9 Fr1**, **Exp9 Fr2** e **Exp9 Fr3** foram enviadas para testes de atividade citotóxica.

3.9.1 Testes de atividade antifúngica

O teste de determinação da concentração inibitória mínima (MIC₉₀) para *C. albicans* foi realizado de acordo com as diretrizes estipuladas pelo protocolo do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) M27-A3 (2008). Esses testes foram realizados pela equipe da Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, localizada em Araraquara.

Para o estabelecimento do MIC, um inóculo inicial foi preparado em solução salina de NaCl a 0,85% contendo de 1 a 5×10^6 células/mL. A partir desse inóculo, foram feitas duas diluições subsequentes de 1:100 e 1:20 em RPMI 1640, de modo que a concentração final de células estivesse entre 5×10^2 a $2,5 \times 10^3$ células/mL. Os extratos foram preparados a partir de uma concentração estoque de 500 µg/mL, e 100 µL do inóculo foram pipetados em placas de 96 poços. Em seguida, 100 µL do extrato foram adicionados em RPMI 1640, de modo que a concentração inicial do extrato variasse de 0,48 a 250 µg/mL.

A esterilidade do meio foi utilizada como controle negativo de crescimento e as drogas Anfotericina B, Caspofungina e Itraconazol (0,0624 a 32 µg/mL) foram utilizadas como controle positivo. Para obter os resultados, uma leitura visual do crescimento foi realizada com e sem a adição de 30 µL do corante de viabilidade celular resazurina a 0,01%, com leitura subsequente em um espectrofotômetro em 570 e 600 nm.

3.9.2 Testes de atividade citotóxica

Esses ensaios foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo, do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais Marinhos

(LAFARMAR) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP).

Foram plaqueadas $0,6 \times 10^4$ ($0,2 \times 10^4$ para o teste com extratos) células da linhagem HCT-116 (carcinoma coloretal) por poço, em placas de 96 poços (3×10^4 células/mL sendo 200 μ L de meio/poço) e, para a linhagem MCF7 (adenocarcinoma de mama), foram plaqueadas $0,6 \times 10^4$ células por poço, em placas de 96 poços (3×10^4 células/mL sendo 200 μ L de meio/poço). Após 24 horas, os extratos foram adicionados nas concentrações de 50 μ g/mL ou 5 μ g/mL, em duplicatas, e incubados por 72 horas. A doxorubicina (0,00064–10 μ M) foi utilizada como controle positivo e dimetilsulfóxido (DMSO 0,05%) como controle negativo.

Após 72 horas de incubação, o sobrenadante foi substituído por meio de cultura contendo MTT (0,5 mg/mL). Três horas mais tarde, o sobrenadante foi removido, e após secagem da placa, o precipitado contendo azul de formazan de MTT foi dissolvido em 150 μ L de DMSO, e a absorbância foi medida a 570 nm. Foram realizados dois experimentos independentes para as linhagens HCT-116 e MCF7 em duplicata (MOSMANN, 1983).

4 RESULTADOS

4.1 CULTIVO EM PLACA DE 6 POÇOS

Após 11 dias de cultivo, foi observada visualmente a inibição completa do crescimento do fungo com o uso do modulador epigenético butirato de sódio na concentração de 500 mM e inibição em menor intensidade com SAHA na concentração de 1000 μ M e butirato de sódio 50 mM (**Figura 20**). Esse experimento foi importante para entender que esses moduladores epigenéticos não deveriam ser utilizados em concentrações muito altas. Nenhuma mudança morfológica foi observada em outras concentrações ou com outros moduladores.

Conforme descrito na seção 3.4 os extratos com moduladores desse cultivo foram obtidos ao unir os poços de mesma numeração de cada par de placas e o extrato controle foi feito com os 10 poços de número 6 de todas as placas juntas. O extrato controle rendeu somente 3,0 mg (~0,30 mg por poço), sendo que a média de rendimento dos extratos com moduladores epigenéticos foi de 0,83 mg por poço (**Tabela 5**). Isso significa que o uso dos moduladores resultou em um maior rendimento de extratos, sugerindo que eles estimularam a produção metabólica do fungo.

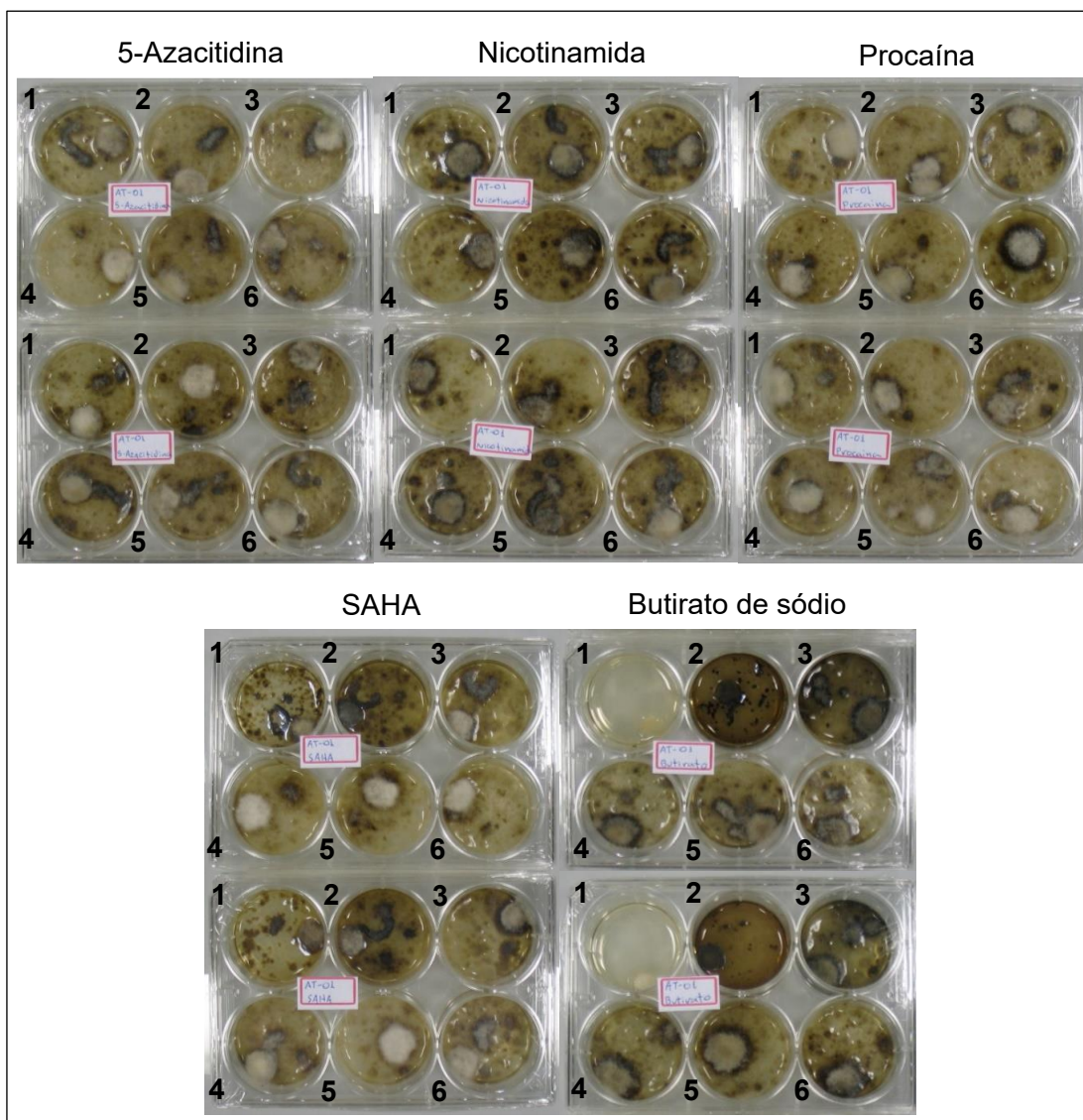


Figura 20 — *Hypoxylon investiens* após 11 dias de cultivo em placas de 6 poços na presença de moduladores epigenéticos em diversas concentrações. 5-Aza, Nicotinamida, Prc HCl e SAHA: Poço 1 = 1000 μ M, 2 = 200 μ M, 3 = 40 μ M, 4 = 8,0 μ M, 5 = 1,6 μ M, 6 = 0,0 μ M. NaBut: 1 = 500 mM, 2 = 50 mM, 3 = 5 mM, 4 = 0,5 mM, 5 = 0,05 mM, 6 = 0,0 mM.

Fonte: próprio autor.

Tabela 5 — Massa (mg) dos extratos obtidas do cultivo em placa de 6 poços na presença de moduladores epigenéticos nas concentrações especificadas da Figura 10.

Poço	SAHA	5-Aza	Nicotinamida	Procaína	NaBut	Controle
1	1,9	1,1	0,9	2,6	0,0	
2	1,2	1,3	1,0	1,7	1,0	
3	2,3	3,8	0,6	1,7	1,3	3,0
4	3,0	1,6	1,3	1,2	1,9	
5	1,6	2,5	1,3	1,7	1,3	

Fonte: próprio autor.

4.1.1 Análise metabolômica por *molecular networking* “clássico” dos extratos

Foram geradas redes moleculares, utilizando a plataforma GNPS, a partir dos dados de HPLC-MS/MS (baixa resolução) dos extratos do cultivo em placa de 6 poços. O objetivo dessa análise foi avaliar se houve mudança na produção metabólica com o uso dos moduladores em diferentes concentrações.

4.1.1.1 Anotação de substâncias dos extratos

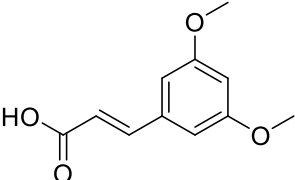
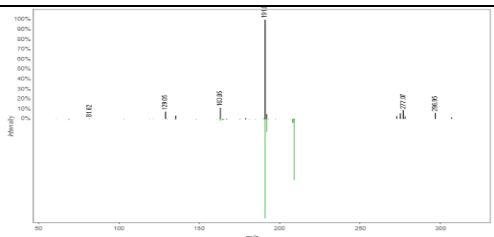
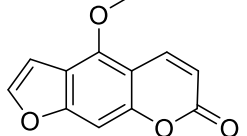
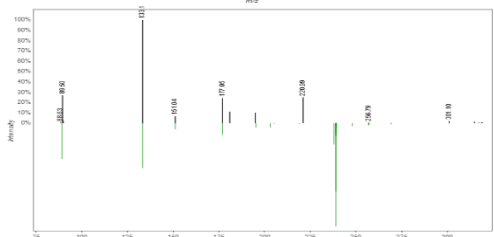
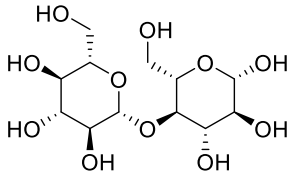
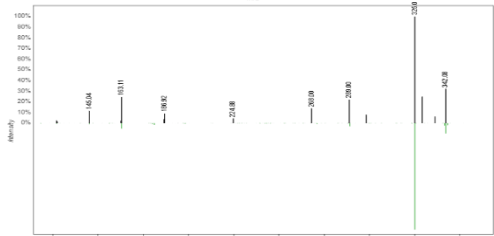
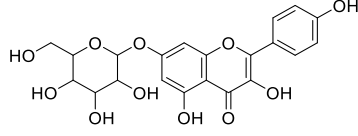
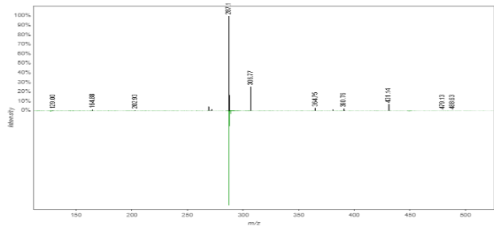
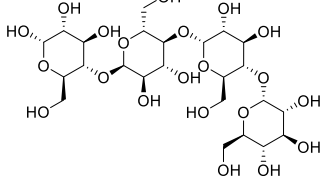
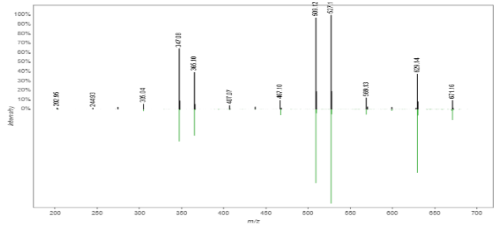
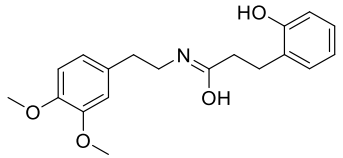
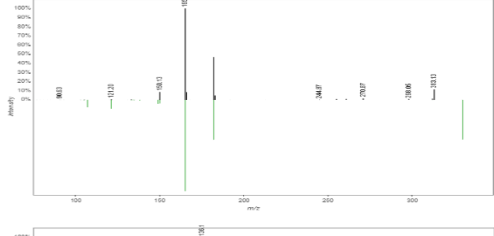
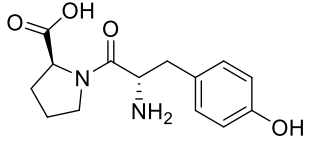
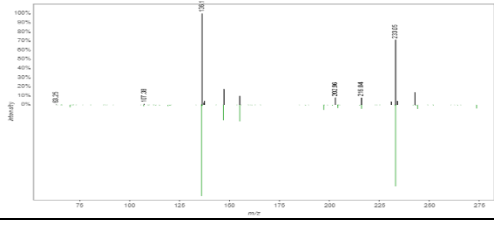
A análise com o método de *molecular networking* “clássico”, na plataforma GNPS, resultou em 51 anotações de substâncias dos extratos no modo de ionização positivo, porém foram descartadas as estruturas com diferença de massa maior que 0,5 m/z em relação a massa teórica, bem como as substâncias encontradas no extrato controle (branco) e os ftalatos contaminantes. Também foram realizadas comparações dos espectros obtidos das substâncias anotadas com os espectros das bibliotecas espectrais, e aquelas com maior probabilidade de estarem corretas estão mostradas na **Tabela 6**.

Tabela 6 — Substâncias anotadas a partir do cultivo em placa de 6 poços e respectivas relações massa/carga (m/z).

Substância	Aduto	m/z do íon precursor	m/z teórica	Erro de m/z (ppm)
(1) 3,5-Dimethoxycinnamic acid	$[M+H]^+$	209.024	209.0808	0.05 (271)
(2) 4-methoxy-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one	$[M+Na]^+$	239.088	239.0314	0.05 (236)
(3) D-(+)-Cellobiose	$[M+NH_4]^+$	359.77	360.1500	0.38 (1055)
(4) Kaempferol-7-O-hexoside	$[M+H]^+$	449.372	449.1078	0.26 (588)
(5) Maltotetraose	$[M+Na]^+$	689.427	689.2110	0.21 (313)
(6) <i>N</i> -[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]-3-(2-hydroxyphenyl)propanamide	$[M+H]^+$	330.34	330.1699	0.17 (515)
(7) Tyrosyl-proline	$[M+H-H_2O]^+$	261.177	261.1233	0.05 (205)

Fonte: próprio autor.

Tabela 7 — Estruturas e espectros MS/MS das substâncias anotadas a partir do cultivo em placas de 6 poços. Espectros obtidos, coloridos de preto, e os da biblioteca, de verde.

Estrutura	Comparação dos espectros de massas	Pontuação de cosseno	Picos iguais
3,5-Dimethoxycinnamic acid 		0,84	6
4-methoxy-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one 		0,82	6
D-(+)-Cellobiose 		0,76	6
Kaempferol-7-O-hexoside 		0,80	6
Maltotetraose 		0,96	23
N-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]-3-(2-hydroxyphenyl)propenamide 		0,87	6
Tyrosyl-proline 		0,86	6

Fonte: próprio autor.

4.1.1.2 Análise das redes moleculares dos extratos

Cada nó (círculo) das redes representa uma molécula que está conectada com outras que possuem similaridade de espectros. As linhas que conectam os nós têm sua largura proporcional ao valor de cosseno (0,7–1,0) e o tamanho dos nós é proporcional a quantidade de espectros MS/MS agrupados para formá-los.

Na rede molecular mostrada na **Figura 21**, os nós estão coloridos conforme o tipo de modulador epigenético usado para obter o extrato em que tal molécula foi identificada. Os números destacados perto dos nós são referentes às substâncias anotadas, conforme a **Tabela 6**. Nessa figura foram excluídos a maioria dos nós que não possuem nenhuma conexão (*singleton*) para simplificar a visualização.

A primeira informação importante que pode ser obtida a partir dessa rede é a grande quantidade de moléculas obtidas devido ao uso dos moduladores em relação às moléculas do extrato fúngico sem nenhum modulador. O extrato sem modulador resultou em 311 nós (**Figura 22**), incluindo *singletons*, que representam somente 22,5 % do total de nós dessa rede (1379).

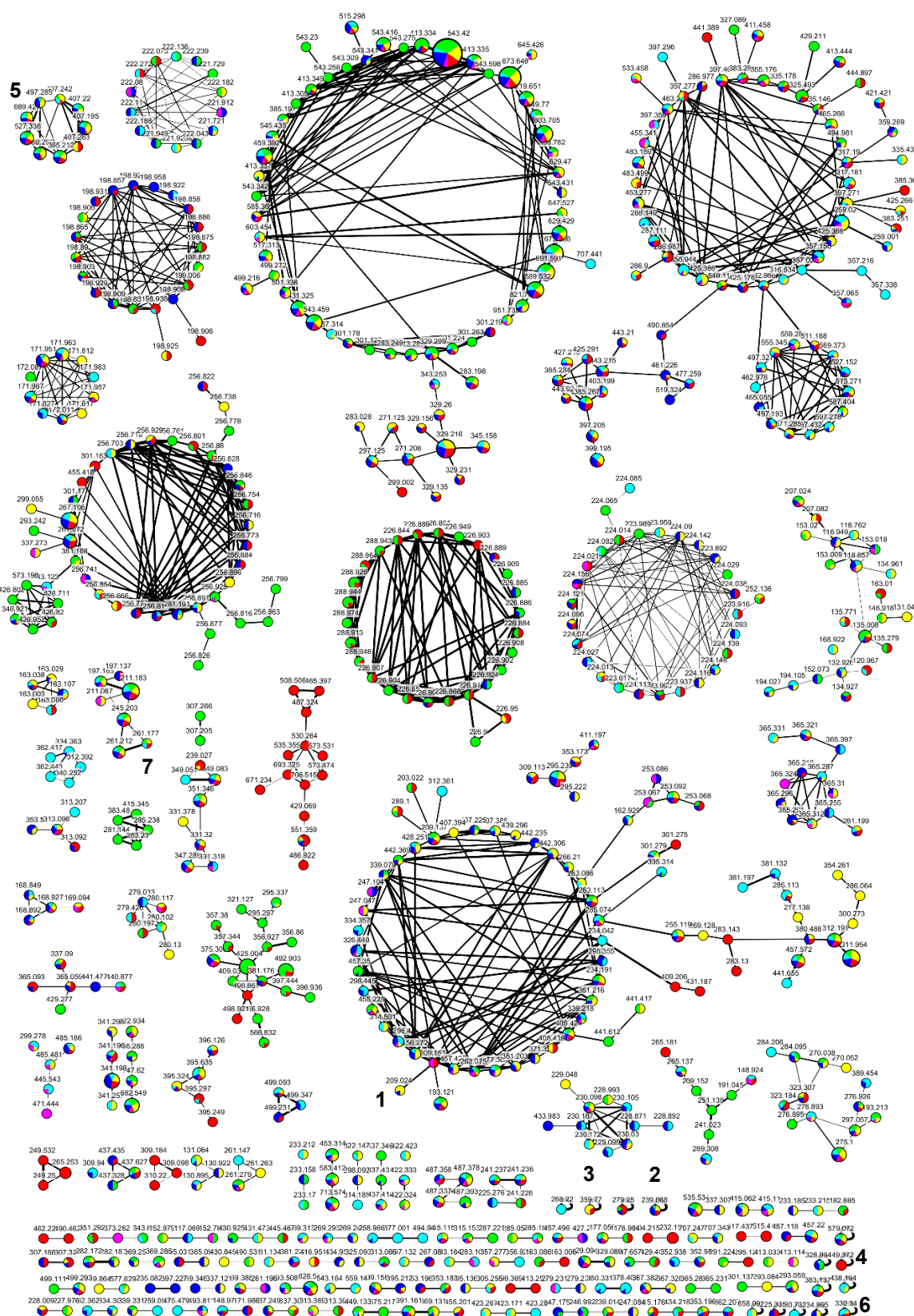


Figura 21 — *Molecular networking* “clássico” dos extratos do cultivo em placa de 6 poços (modo de ionização positivo). Vermelho: SAHA, amarelo: nicotinamida, verde: procaína, ciano: NaBut, azul: 5-Aza e magenta: sem modulador. Os nós estão rotulados com a massa do íon precursor e os números destacados são referentes às substâncias anotadas.
Fonte: próprio autor.

Tabela 8 — Quantidade de nós considerando diferentes concentrações de cada modulador, epigenético, excluindo aqueles presentes no extrato controle.

Poço	SAHA	5-Aza	Prc HCl	Nicotinamida	NaBut	Controle
1	202	153	96	139	-	
2	-	148	117	140	171	
3	153	148	147	156	156	
4	138	257	144	159	158	311
5	148	146	138	158	144	
Independente da concentração	451	464	387	457	393	

Fonte: próprio autor.

As **Figuras 23–7** mostram redes reorganizadas para analisar um modulador epigenético por vez e fazer a contagem dos nós mostrados na **Tabela 8**. Nessas figuras o brilho da cor indica a concentração e os números destacados são referentes às substâncias anotadas (**Tabela 6**).

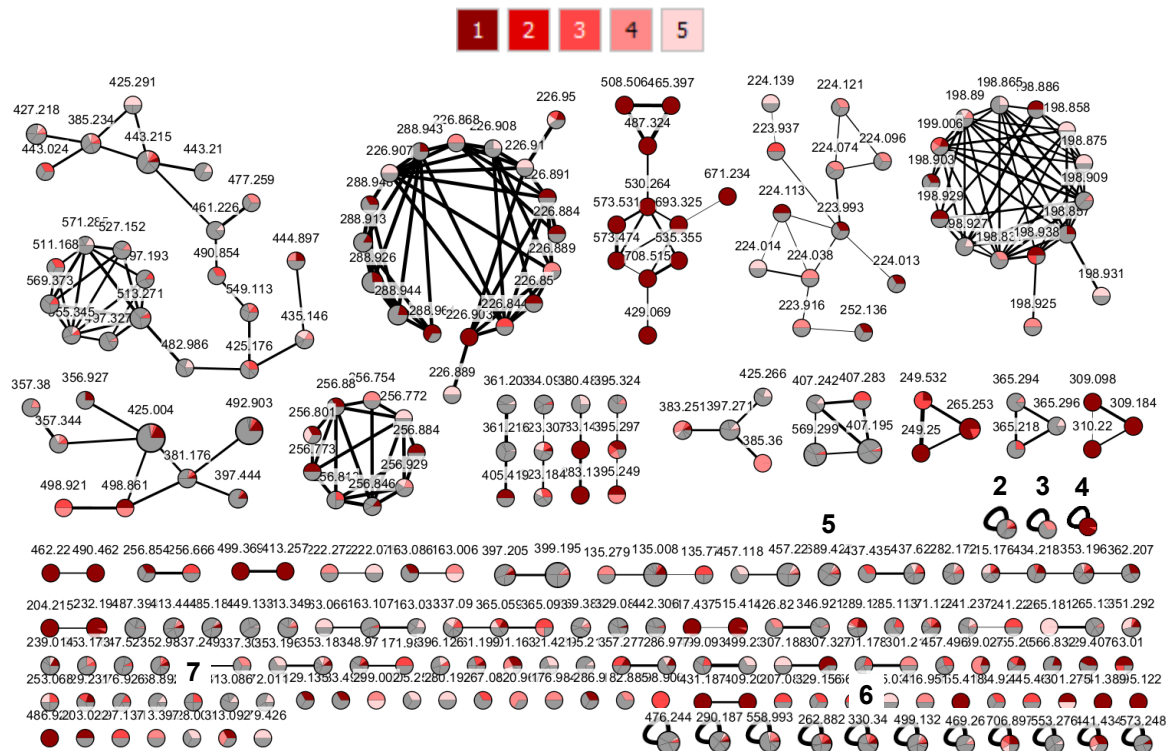


Figura 23 — Nós obtidos com uso de SAHA coloridos em vermelho. O brilho da cor é proporcional à concentração do modulador. Os nós dos outros moduladores estão coloridos em cinza.

Fonte: próprio autor.

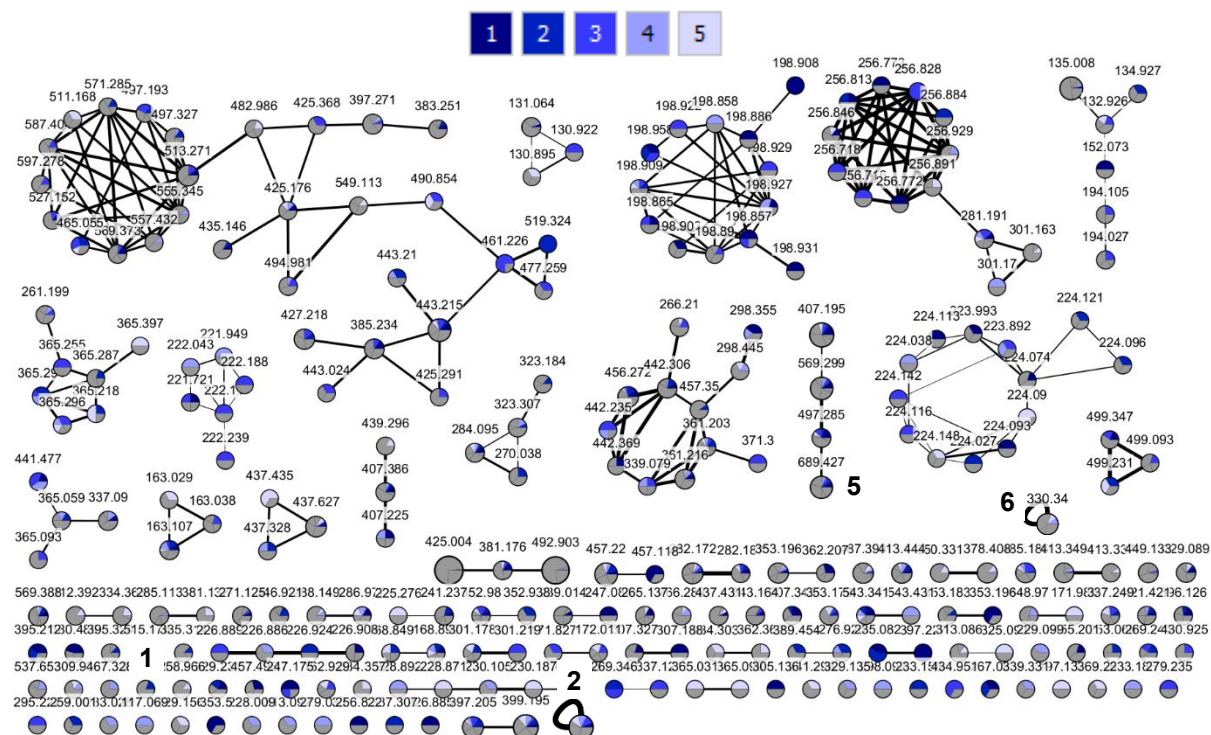


Figura 24 — Nós obtidos com uso de 5-azacitidina coloridos em azul. Os nós dos outros moduladores estão coloridos em cinza.

Fonte: próprio autor.

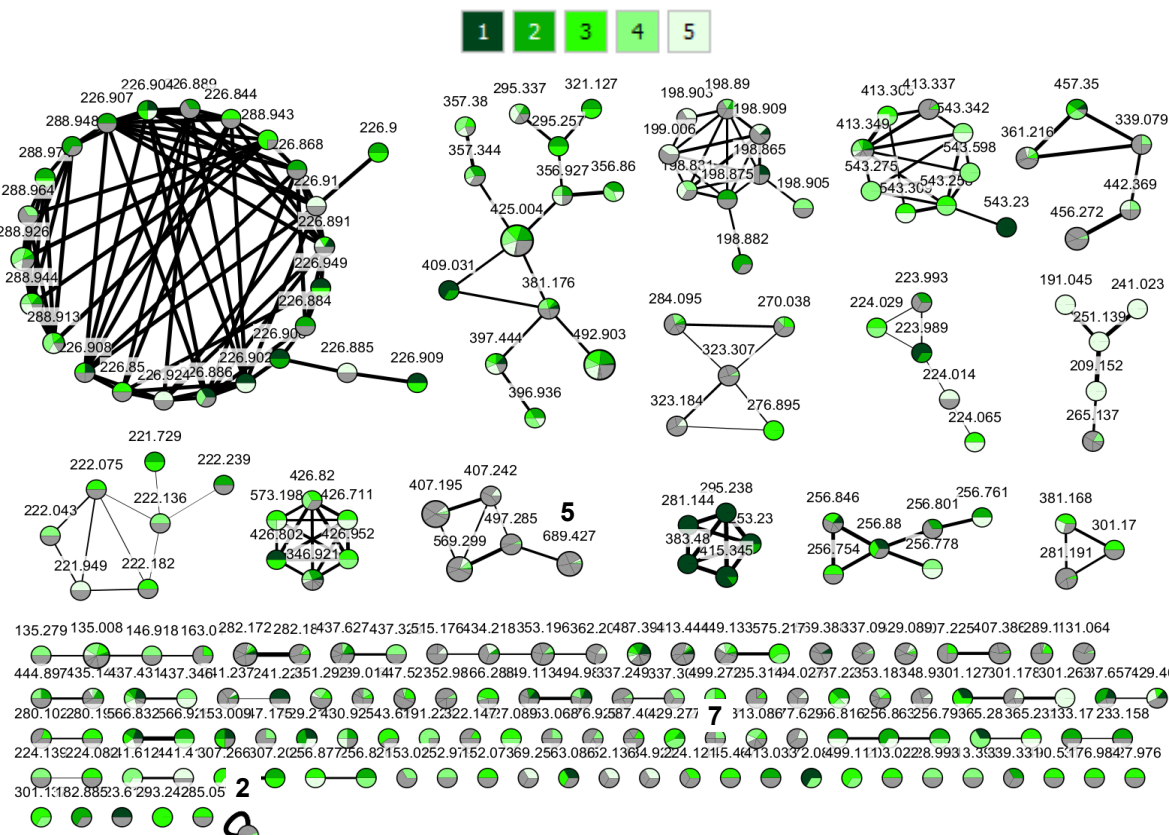


Figura 25 — Nós obtidos com uso de procaína coloridos em verde. Os nós dos outros moduladores estão coloridos em cinza.

Fonte: próprio autor.

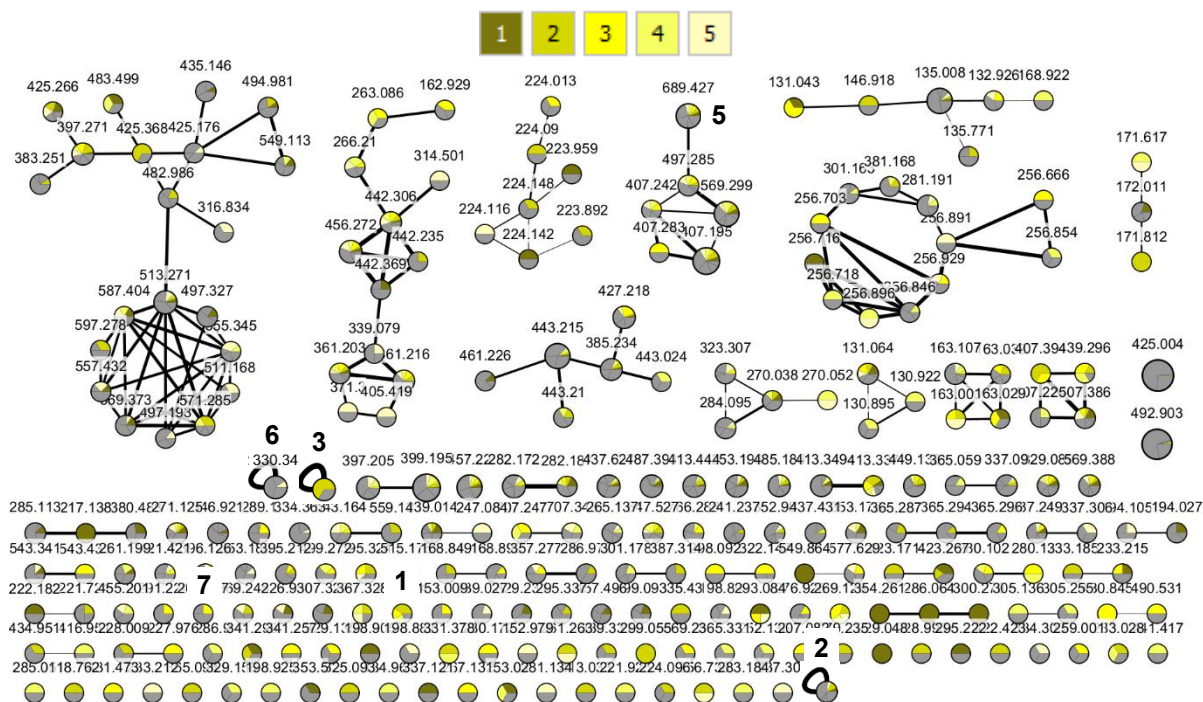


Figura 26 — Nós obtidos com uso de nicotinamida coloridos em amarelo. Os nós dos outros moduladores estão coloridos em cinza.

Fonte: próprio autor.

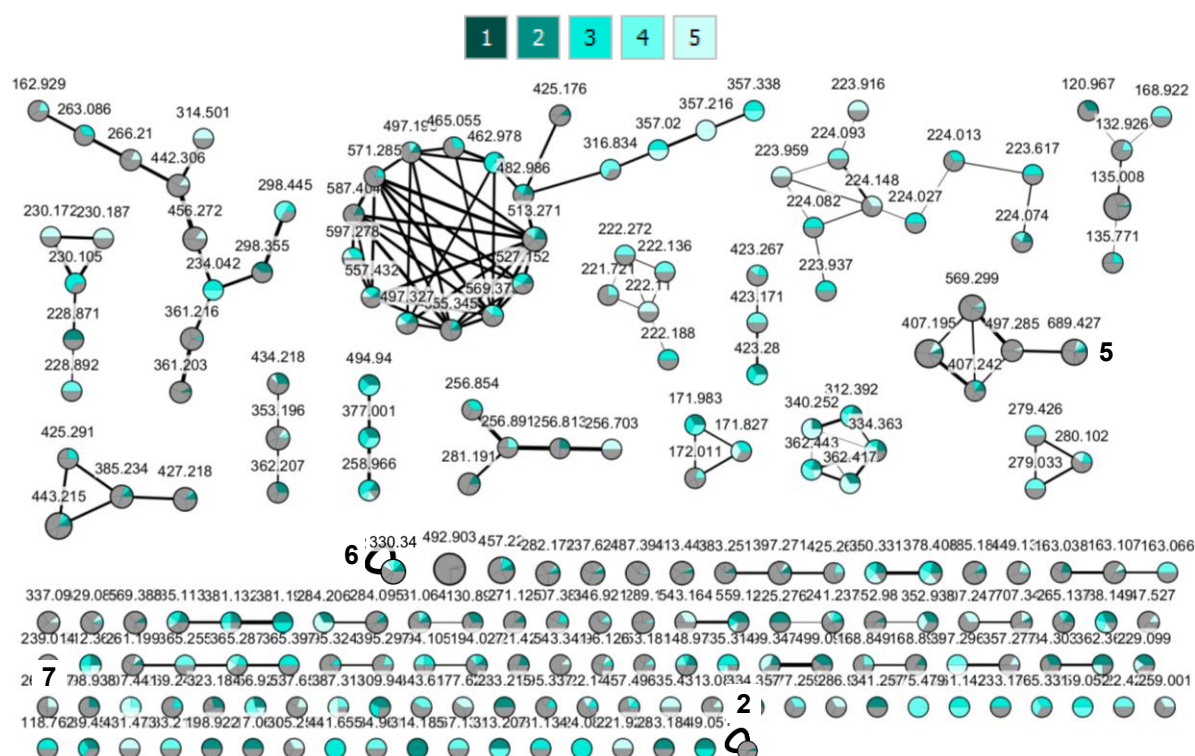


Figura 27 — Nós obtidos com uso de butirato de sódio coloridos em ciano. Os nós dos outros moduladores estão coloridos em cinza.

Fonte: próprio autor.

Como uma mesma molécula pode ser encontrada em diversos extratos é importante avaliar quais nós são exclusivos para uma concentração específica de um determinado modulador, dessa forma é possível avaliar se algum modulador induz uma produção metabólica mais específica no fungo. A quantidade de nós exclusivos estão mostrados na **Tabela 9**.

Tabela 9 — Quantidade de nós exclusivos nos extratos obtidos com cada modulador em diferentes concentrações.

Poço	SAHA	5-Aza	Prc HCl	Nicotinamida	NaBut	Controle
1	64	5	20	12	-	
2	-	3	4	2	9	
3	1	3	14	6	5	
4	4	1	5	1	4	6
5	2	1	12	3	2	
Independente da concentração	95	34	129	59	67	

Fonte: próprio autor.

Com essa análise foi observado que o uso dos moduladores epigenéticos SAHA e procaína resultaram em extratos com muitas moléculas exclusivas, sendo a procaína associada à produção de 129 delas. Houve uma produção de 64 nós exclusivos quando 1000 μ M (poço 1) de SAHA foram utilizados, sugerindo uma alta indução de produção de metabólitos do fungo com esse modulador. De forma complementar, pode-se explicar essa quantidade de estruturas exclusivas considerando que o fungo teria biotransformado o SAHA em diversas outras moléculas.

Por fim, foi notado uma inversão da quantidade de nós observada entre as tabelas com o uso da procaína e azacitidina. Enquanto a azacitidina foi o modulador que mais gerou um total de nós nas redes (464), ela foi a que menos produziu nós exclusivos (34). O oposto ocorreu com a procaína, ou seja, seu uso foi o que menos resultou em variedade de metabólitos (387), mas foi o que mais gerou moléculas exclusivas (129).

Independentemente do tipo de modulador e concentração utilizada, a adição dessas substâncias resultou em extratos com maior diversidade de metabólitos

quando comparados com o extrato obtido sem uso de moduladores. Devido aos indícios de que os moduladores epigenéticos podem levar a inibição do fungo quando aplicados em altas concentrações e também devido ao alto custo de alguns moduladores, os valores de 100 μ m (SAHA, procaína, nicotinamida e 5-Azacidina) e 5 mM (butirato de sódio) foram definidos para os experimentos com planejamento Plackett-Burman.

4.2 CULTIVO COM PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN

Os extratos obtidos nessa etapa (**Figura 28**) foram preparados para as análises de atividade biológica e análises com os dados de UHPLC-MS. A massa obtida para cada extrato está mostrada na **Tabela 10**.



Figura 28 — Extratos obtidos seguindo o planejamento Plackett-Burman.

Fonte: próprio autor.

Tabela 10 — Rendimento de massa de extrato do cultivo com planejamento Plackett-Burman.

Experimento	Temperatura	Agitação	Fotoperíodo	% Malte	% Água do mar	Tempo de cultivo	[SAHA]	[Nicotinamida]	[NaBut]	[5-Aza]	[Prc HCl]	Massa extrato (mg)
1	33	0	24	0	0	14	100	100	5	0	100	80,1
2	33	100	0	100	0	14	0	100	5	100	0	23,9
3	23	100	24	0	100	14	0	0	5	100	100	26
4	33	0	24	100	0	28	0	0	0	100	100	53,1
5	33	100	0	100	100	14	100	0	0	0	100	16
6	33	100	24	0	100	28	0	100	0	0	0	15,8
7	23	100	24	100	0	28	100	0	5	0	0	4,6
8	23	0	24	100	100	14	100	100	0	100	0	8,3
9	23	0	0	100	100	28	0	100	5	0	100	7,6
10	33	0	0	0	100	28	100	0	5	100	0	18,8
11	23	100	0	0	0	28	100	100	0	100	100	12,2
12	23	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0	7,5
13	28	50	12	50	50	21	50	50	2.5	50	50	12,5
14	28	50	12	50	50	21	50	50	2.5	50	50	6,2
15	28	50	12	50	50	21	50	50	2.5	50	50	9,8
16	28	50	12	50	50	21	50	50	2.5	50	50	15,1

Fonte: próprio autor.

4.2.1 Testes de atividades biológicas

Alíquotas de todos os 16 extratos (PB01–PB16) obtidos com o planejamento foram enviadas para realização de teste de atividade antifúngica e alguns extratos foram testados contra células da linhagem HCT-116 (carcinoma colorretal). Como

alguns experimentos renderam pouca massa de extrato, nem todos puderam ser avaliados no teste citotóxico.

4.2.1.1 Atividade antifúngica

Os extratos dos experimentos 3 e 12 (PB03 e PB12) apresentaram concentração inibitória mínima de 62,5 µg/mL (**Tabela 11**). Esse valor é superior ao dos compostos de referência, porém por se tratar de extratos brutos, foram considerados ativos para esse tipo de teste. Como os valores de concentração inibitória contra *Candida albicans* foram quase todos iguais, não foi possível usá-los como resposta no planejamento Plackett-Burman e realizar um estudo bio guiado.

Tabela 11 — Resultado da avaliação antifúngica dos extratos e de agentes antifúngicos comerciais para *Candida albicans*. MIC: concentração inibitória mínima 90%, MFC: concentração fungicida máxima.

Amostras	MIC (µg/mL)	MFC (µg/mL)
PB01	>250	>250
PB02	250	>250
PB03	62,5	>250
PB04	250	>250
PB05	>250	>250
PB06	>250	250
PB07	>250	>250
PB08	>250	>250
PB09	>250	>250
PB10	>250	>250
PB11	>250	>250
PB12	62,5	>250
PB13	>250	>250
PB14	>250	>250
PB15	>250	>250
PB16	>250	>250
Anfotericina B	0,125	0,5
Caspofungina	0,125	0,5
Itraconazol	0,25	0,5

Fonte: próprio autor.

4.2.1.2 Atividade citotóxica

Sete extratos foram analisados quanto à atividade citotóxica. Os extratos dos experimentos 1, 2 e 3 (PB01, PB02 e PB03) foram considerados ativos, pois a porcentagem de inibição foi superior a 75% na concentração de 50 µg/mL (**Tabela 12**).

Tabela 12 — Teste de inibição de HCT-116 (carcinoma colorretal) de extratos selecionados em duas concentrações (50 µg/mL e 5 µg/mL).

Amostras	Concentração					
	50 µg/mL			5 µg/mL		
	% Inibição	SD	N	% Inibição	SD	N
PB01	91,32	9,82	4	5,72	9,43	4
PB02	83,80	6,88	4	15,22	5,77	4
PB03	86,07	4,71	4	52,45	9,47	4
PB04	42,44	11,03	4	6,41	5,02	4
PB05	54,14	4,85	4	7,96	9,21	4
PB10	22,45	4,76	4	9,15	4,77	4
PB06	11,92	10,28	4	5,36	10,26	4

Fonte: próprio autor.

4.2.2 Análise do planejamento Plackett-Burman

Os dados de UHPLC-MS/MS dos extratos foram processados no software MZmine com o qual foi obtido uma lista de *features*. Nessa análise foram excluídos os *features* presentes nas amostras do branco de solvente e dos brancos de meio de cultivo. Foi realizada uma contagem das médias das intensidades dos *features* e um valor próximo da média foi escolhido (10000 UA) para filtrar *features* minoritários. Inicialmente os extratos continham entre 900 e 1700 *features*, com a remoção dos *features* minoritários os números reduziram para 150–350 *features* (**Tabela 13**).

Tabela 13 — Quantidade e média das intensidades dos *features* dos extratos obtidos com o planejamento Plackett-Burman.

Experimento	Quantidade total de <i>features</i>	Média das intensidades	Quantidade de <i>features</i> após filtragem
1	1228	46407	321
2	1036	13348	198
3	958	11457	189
4	915	11567	161
5	1082	11451	199
6	1024	9197	154
7	1497	13187	283
8	1272	16648	231
9	1684	29024	347
10	1187	13366	234
11	1376	10802	239
12	1092	8668	151
13	1333	10185	224
14	1375	9920	227
15	1434	14103	251
16	1325	11801	244

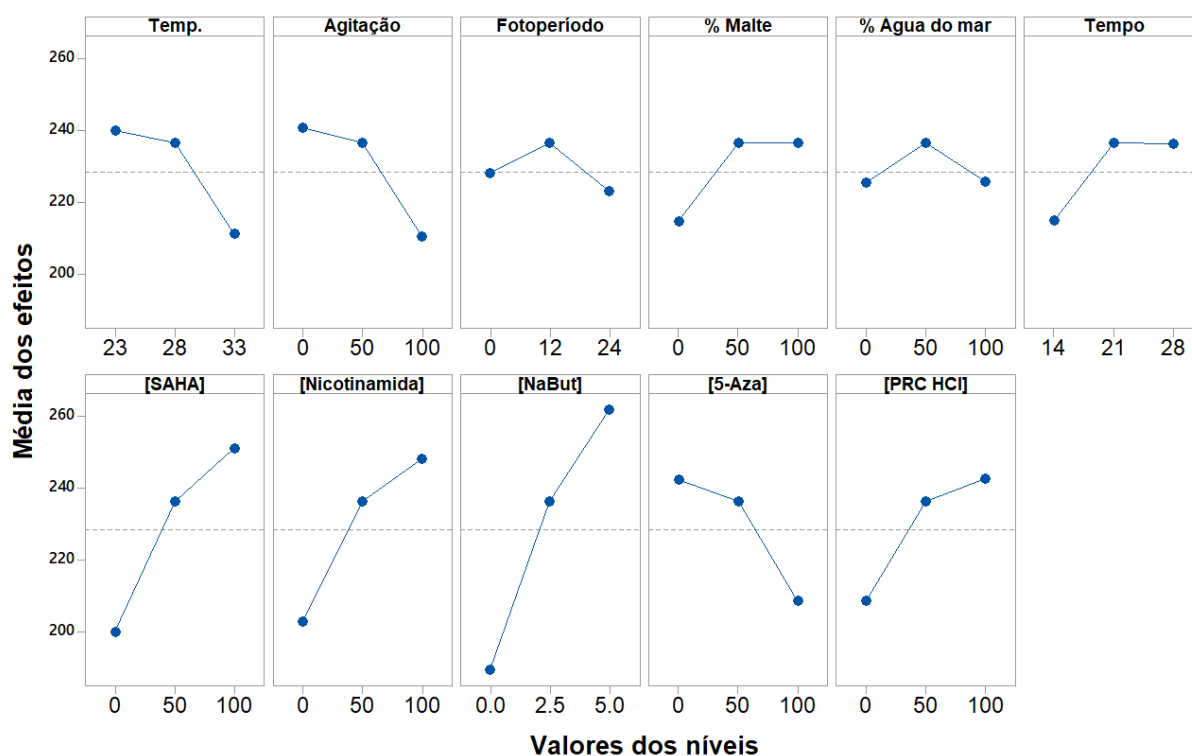
Fonte: próprio autor.

A quantidade dos *features* foi então usada como resposta no planejamento Plackett-Burman e foram realizados os cálculos de efeito principal de cada fator para essa resposta (**Tabela 14** e **Figura 29**). Com os valores dos efeitos foram obtidos os valores t e p, que testam a significância de um determinado fator. Se um fator tiver um valor p menor que o nível de significância escolhido, nesse caso 5% ($\alpha = 0,05$), quer dizer que ele tem significância estatística ao nível de confiança de 95%.

Tabela 14 — Valores dos efeitos principais para cada fator do planejamento Plackett-Burman.

Fator	Efeito	Valor t	Valor p
Temperatura	-28,83	-3,82	0,032
Agitação	-30,50	-4,04	0,027
Fotoperíodo	-4,83	-0,64	0,568
% Malte	21,83	2,89	0,063
% Água do mar	0,17	0,02	0,984
Tempo	21,50	2,85	0,065
[SAHA]	51,17	6,78	0,007
[Nicotinamida]	45,50	6,03	0,009
[NaBut]	72,83	9,65	0,002
[5-Aza]	-33,83	-4,48	0,021
[Prc HCl]	34,17	4,53	0,020

Fonte: próprio autor.

**Figura 29** — Gráficos de média de efeito principal para cada fator nos níveis -1, +1 e ponto central.

Fonte: próprio autor.

O gráfico de Pareto mostrado na **Figura 30** mostra quais fatores tiveram um efeito significativo no número de *features* obtidos, sendo eles: [NaBut], [SAHA], [Nicotinamida], [Prc HCl], [5-Aza], Agitação e Temperatura.

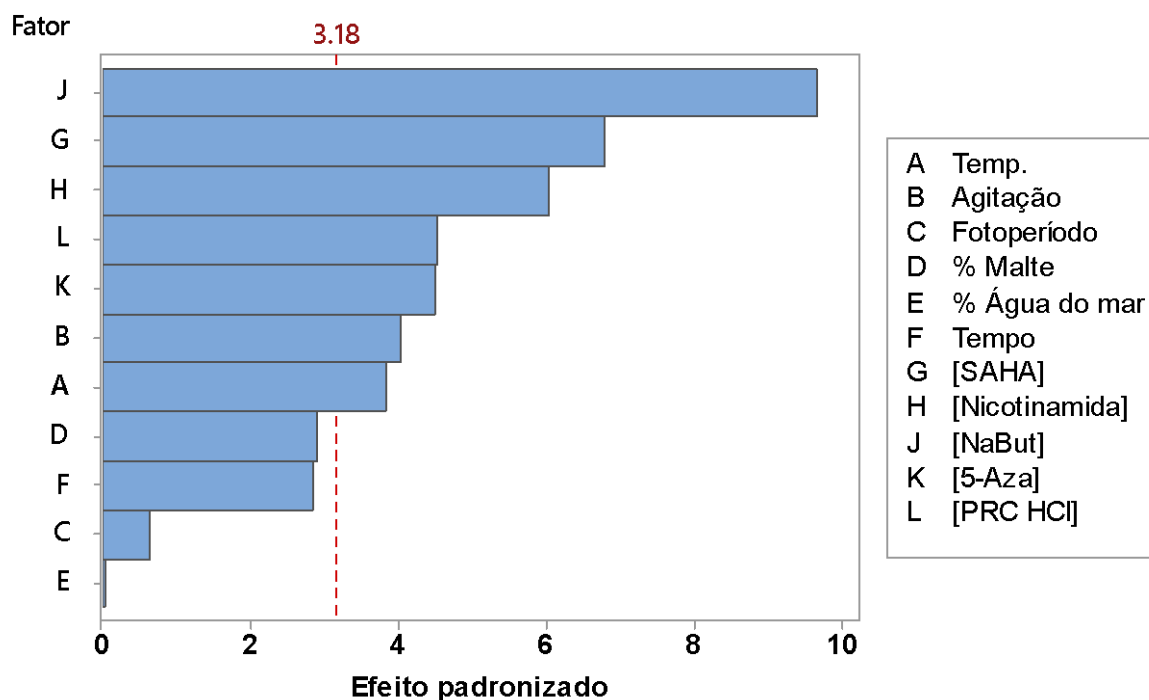


Figura 30 — Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados. As barras que ultrapassam a linha vermelha estão associadas aos fatores significativos ($\alpha = 0,05$).

Fonte: próprio autor.

Uma outra maneira de visualizar esses dados é através do gráfico normal (**Figura 31**), no qual os efeitos significativos estão destacados com um quadrado azul. Os fatores à direita da linha vermelha são aqueles que resultaram em um aumento da resposta no nível +1 ([NaBut], [SAHA], [Nicotinamida], [Prc HCl]) e os fatores a esquerda são os que aumentaram a resposta no nível -1, ou seja, o aumento da temperatura, agitação e [5-Aza] diminuiu a quantidade de *features*.

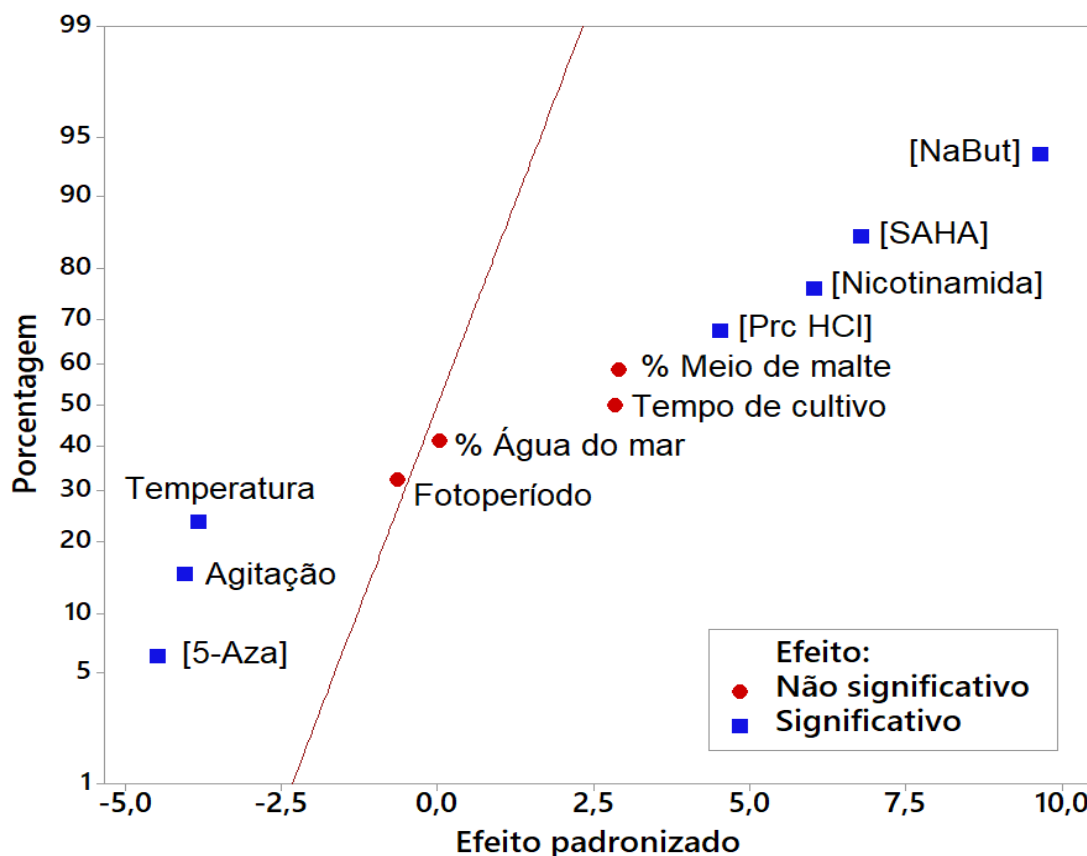


Figura 31 — Gráfico normal dos efeitos padronizados ($\alpha = 0,05$).

Fonte: próprio autor.

A análise do planejamento de experimento indicou que as melhores condições para maximizar o número de *features* são: temperatura = 23 °C, agitação = 0 RPM, fotoperíodo = 12 h, % malte = 100, % água do mar = 50, tempo = 21 dias, [SAHA] = 100 μ M, [Nicotinamida] = 100 μ M, [NaBut] = 5 mM, [5-Aza] = 0 μ M e [Prc HCl] = 100 μ M (**Figura 29**). Essas condições são muito próximas daquelas utilizadas no experimento 9 e por isso foi decidido realizar um cultivo em escala ampliada nas condições exatas desse experimento com o objetivo de obter extrato em quantidade suficiente para isolar substâncias.

4.2.3 Análises metabolômica com os dados de UHPLC-MS/MS

Todos os extratos obtidos nesse cultivo foram analisados por UHPLC-MS/MS gerando os cromatogramas mostrados na **Figura 32**. A maior diferença observada entre esses cromatogramas foram os sinais intensos na ordem de m/z 1000, com tempo de retenção próximos de 10,5 min, encontrado no extrato do experimento 1.

Com esses dados foram geradas redes moleculares com o método clássico e redes moleculares baseadas em *features* usando a plataforma GNPS.

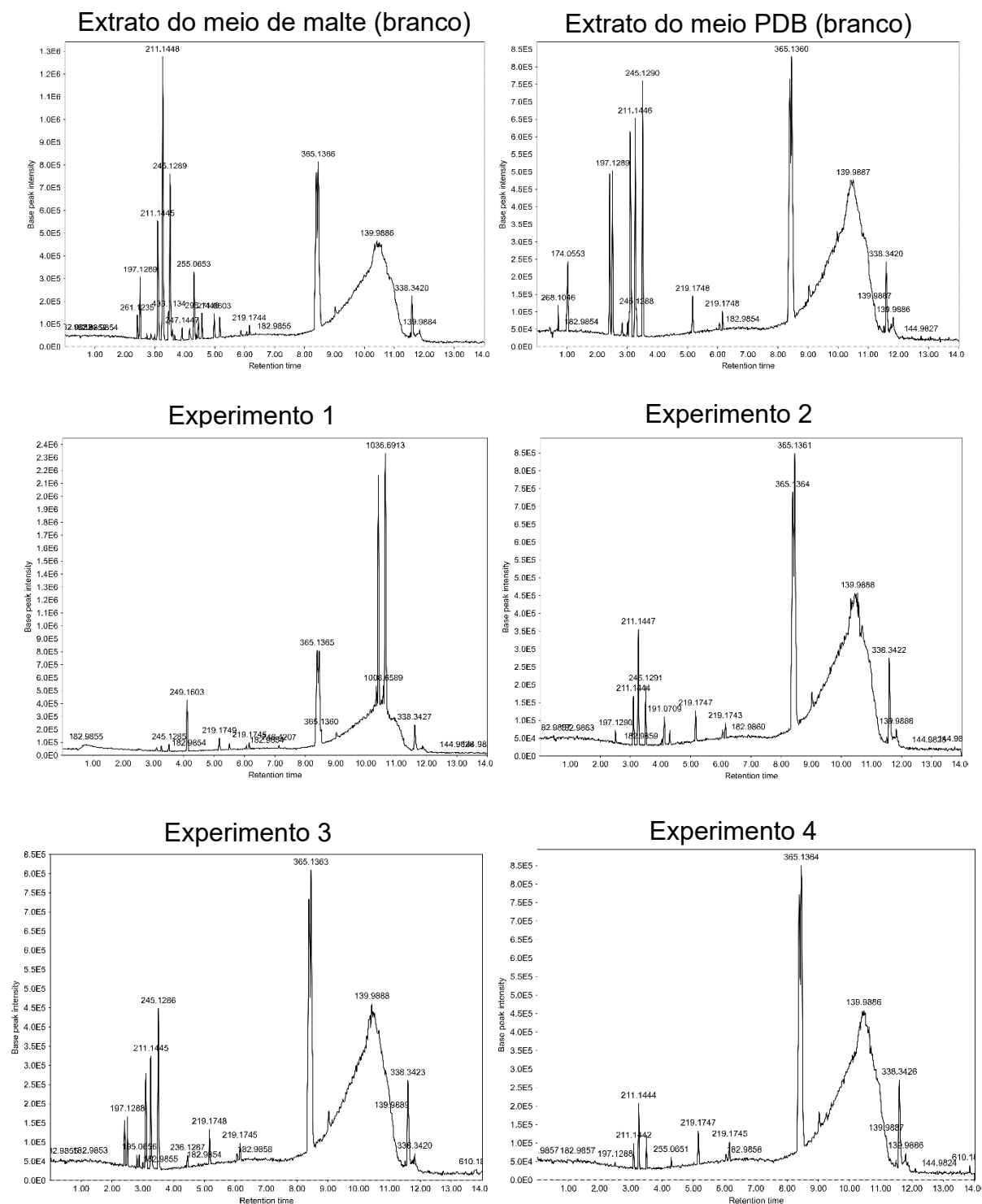


Figura 32 — Cromatogramas de pico base obtidos por UHPLC-MS/MS dos extratos PB01–PB16 e dos brancos, modo de ionização positiva. Acetonitrila e H₂O como fase móvel. Gradiente de 5-100% de Acetonitrila em 10 minutos.

Fonte: próprio autor.

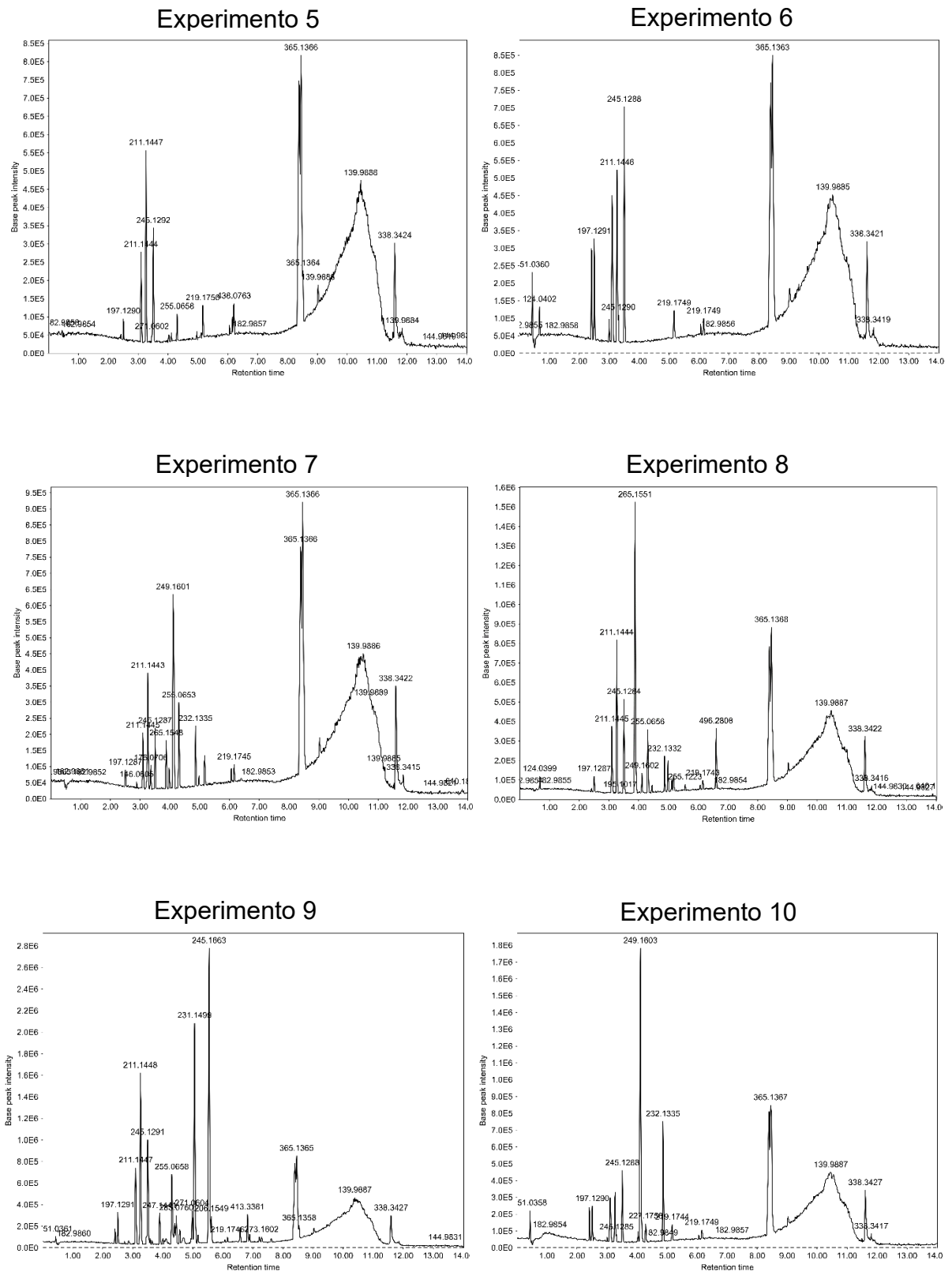
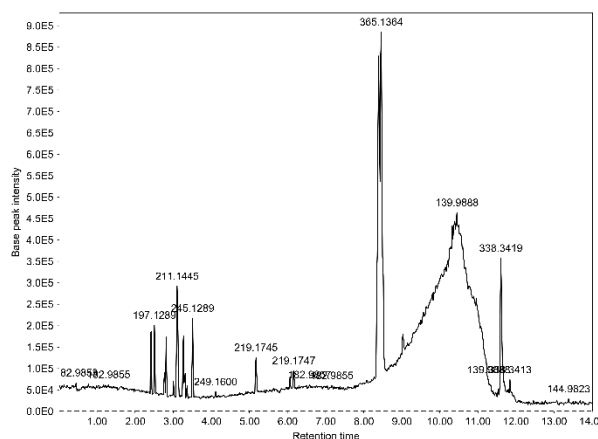
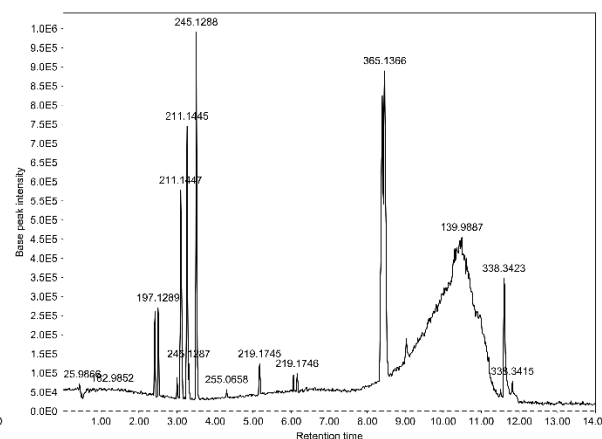


Figura 32 — Continuação.

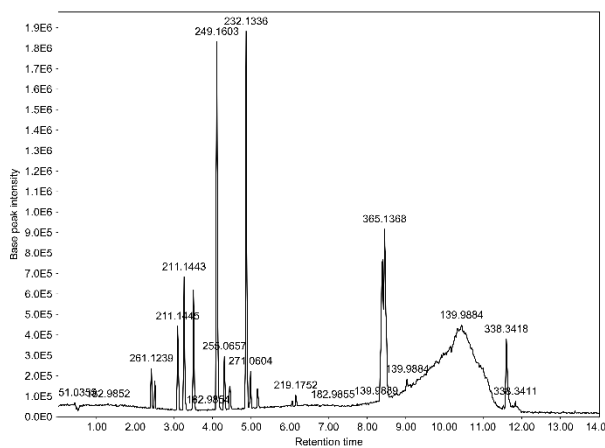
Experimento 11



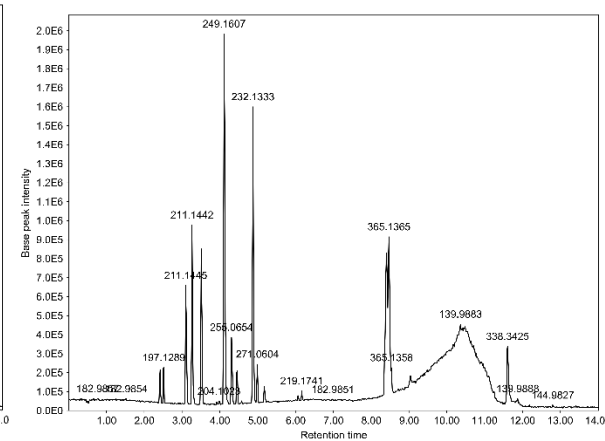
Experimento 12



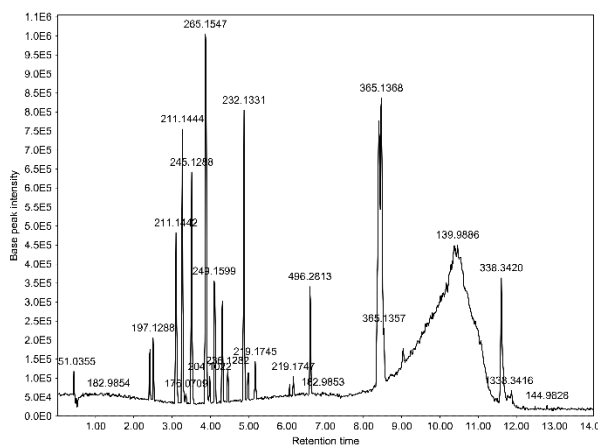
Experimento 13



Experimento 14



Experimento 15



Experimento 16

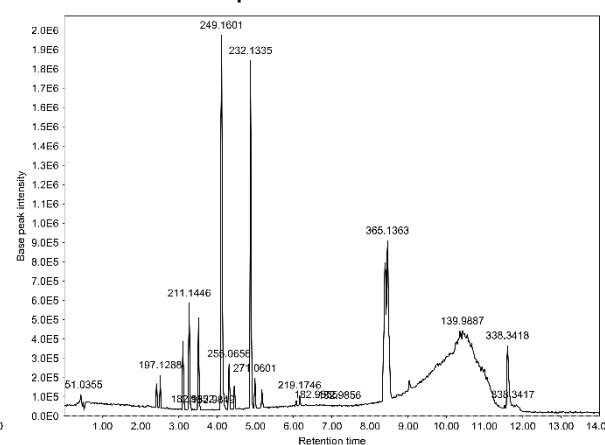


Figura 32 — Continuação.

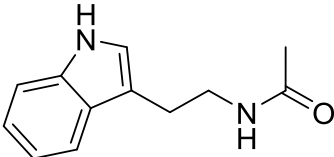
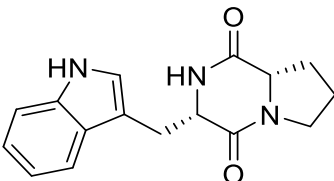
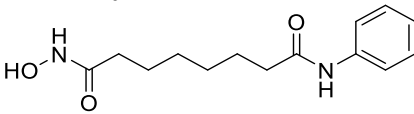
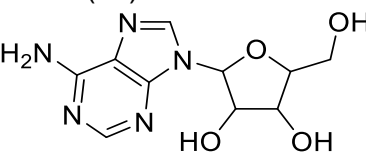
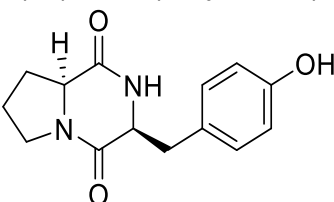
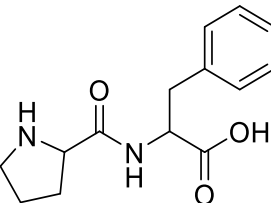
4.2.3.1 Redes moleculares baseadas em features (FBMN)

Os dados de UHPLC-MS/MS (alta resolução) e os arquivos gerados pelo MZmine foram inseridos na plataforma GNPS para geração da rede de *features* (**Figura 33**). Nessa rede, o tamanho do nó é proporcional à intensidade do *feature*, permitindo uma visualização mais confiável das concentrações desses íons no extrato, em comparação com as redes moleculares clássicas. Foi observado nas redes moleculares uma alta quantidade de nós referentes às substâncias encontradas no extrato do experimento 9, sugerindo uma maior produção metabólica nestas condições.

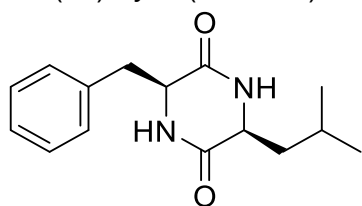
Considerando todos os extratos analisado, foi possível anotar 24 substâncias (**Tabela 15**), das quais 9 (**8, 10, 16, 18, 19, 20, 21, 28 e 29**) não foram detectadas nos extratos dos meios de cultivo (brancos), indicando que elas são metabólitos produzidos pelo fungo *H. investiens* ou são relacionadas com os moduladores epigenéticos adicionados. Os espectros de massas (MS/MS) dessas nove substâncias anotadas a partir dos extratos fúngicos foram comparados com os espectros da biblioteca e o resultado está mostrado na **Figura 34**.

Fonte: próprio autor.

Tabela 15 — Substâncias anotadas com FBMN (alta resolução) do cultivo com planejamento Plackett-Burman e respectivas relações massa/carga (m/z).

Substância	Tempo de retenção	Aduto	m/z do íon precursor	m/z teórica	Erro de m/z (ppm)
(8) <i>N</i>-acetyltryptamine 	4,03	$[M+H]^+$	203,1172	203,1179	3,4
(9) <i>Cyclo</i>(L-Trp-L-Pro) 	3,65	$[M+H]^+$	284,1386	284,1393	2,6
(10) Suberoylanilide hydroxamic acid 	3,88	$[M+H]^+$	265,1540	265,1546	2,5
(11) Adenosine 	0,71	$[M+H]^+$	268,1038	268,1040	0,8
(12) <i>Cyclo</i>(L-Tyr-L-Pro) 	2,41	$[M+H]^+$	261,1232	261,1233	0,6
(13) Prolylphenylalanine 	3,50	$[M-H_2O+H]^+$	245,1282	245,1284	1,0

(14) Cyclo(Leu-Phe)



4,32

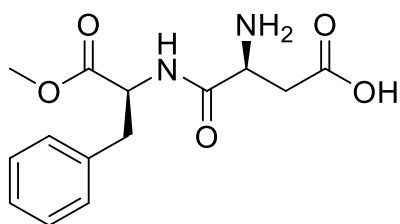
[M+H]⁺

261,1592

261,1597

2,1

(15) (S)-3-amino-4-(((S)-1-methoxy-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-4-oxobutanoic acid



4,57

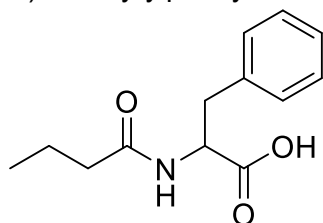
[M+H]⁺

295,1435

295,1288

49,6

(16) N-Butyrylphenylalanine



4,45

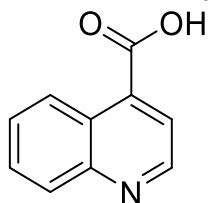
[M+H]⁺

236,1276

236,1281

2,2

(17) 4-quinolinecarboxylic acid



1,02

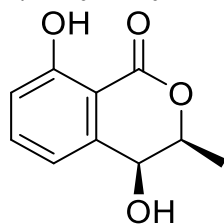
[M+H]⁺

174,0550

174,0549

0,2

(18) 4-hydroxymellein



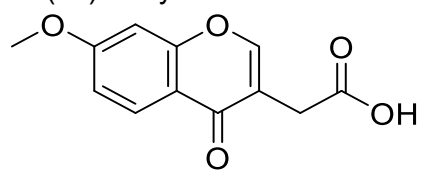
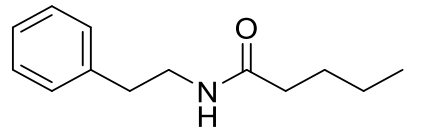
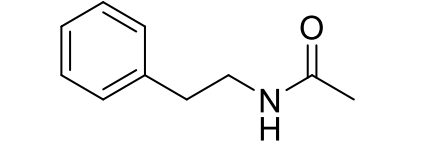
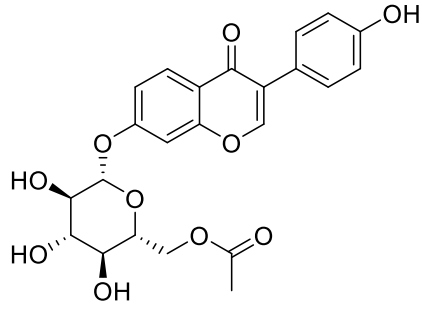
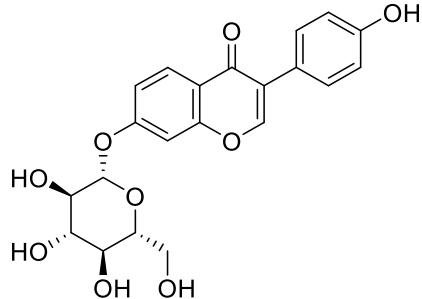
2,88

[M+H]⁺

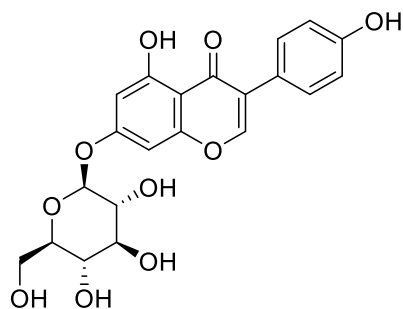
195,0647

195,0651

2,5

(19) Anhydrobrazilic acid 	3,27	[M+H] ⁺	235,0600	235,0601	0,4
(20) <i>N</i>-(2-Phenylethyl)pentanamide 	5,62	[M+H] ⁺	206,1541	206,1539	0,8
(21) <i>N</i>-(2-Phenylethyl)acetamide 	3,86	[M+H] ⁺	164,1065	164,1070	3,0
(22) 6''-O-Acetyldaidzin 	3,79	[M+H] ⁺	459,1275	459,1285	2,3
(23) Daidzin 	2,99	[M+H] ⁺	417,1177	417,1180	0,7

(24) Genistein 7-glucoside



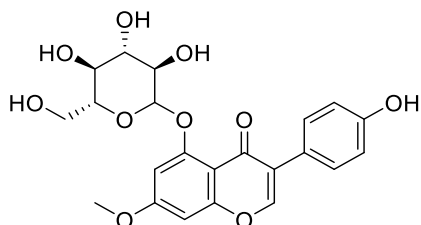
3,46

[M+H]⁺

433,1128

433,1129

0,3

(25) 3-(4-hydroxyphenyl)-7-methoxy-5-[(3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-4-one

3,06

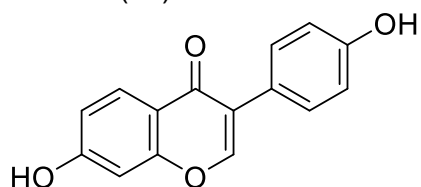
[M+H]⁺

447,1275

447,1285

2,4

(26) Daidzein



4,30

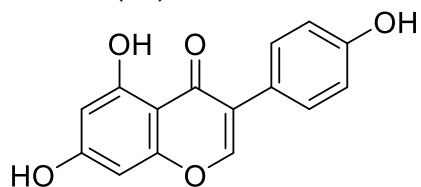
[M+H]⁺

255,0648

255,0651

1,5

(27) Genistein



4,98

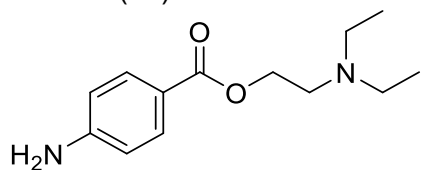
[M+H]⁺

271,0596

271,0601

1,8

(28) Procaine



2,19

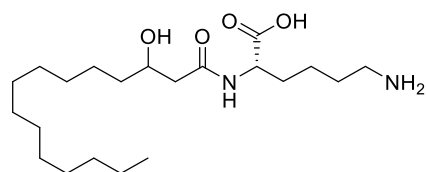
[M+H]⁺

237,1593

237,1597

1,9

(29) (3-hydroxypentadecanoyl)
lysine



6,57

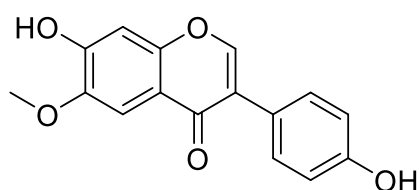
[M+H]⁺

387,3216

387,3217

0,3

(30) Glycitein



4,45

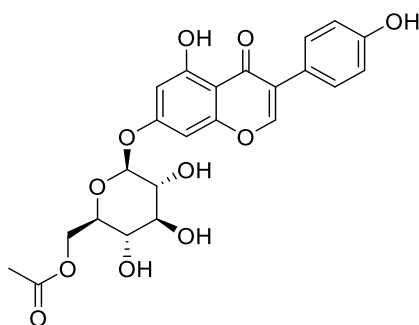
[M+H]⁺

285,0752

285,0757

1,9

(31) 6''-O-Acetylgenistin



4,30

[M+H]⁺

475,1230

475,1235

1,0

Fonte: próprio autor.

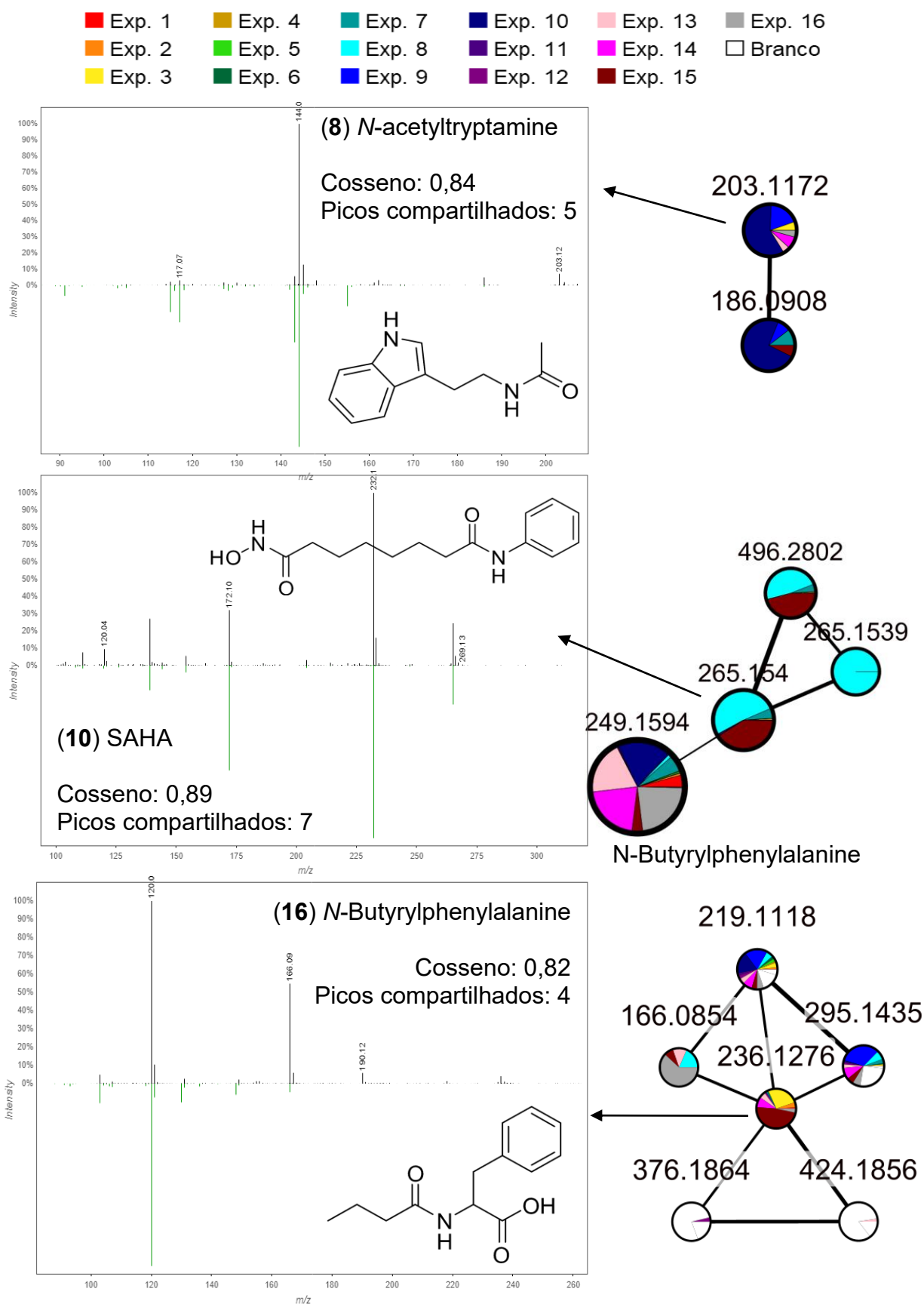


Figura 34 — Espectros MS/MS das estruturas exclusivas dos extratos fúngicos (PB01–PB16). Espectros obtidos, coloridos de preto, e os da biblioteca, de verde.
Fonte: próprio autor.

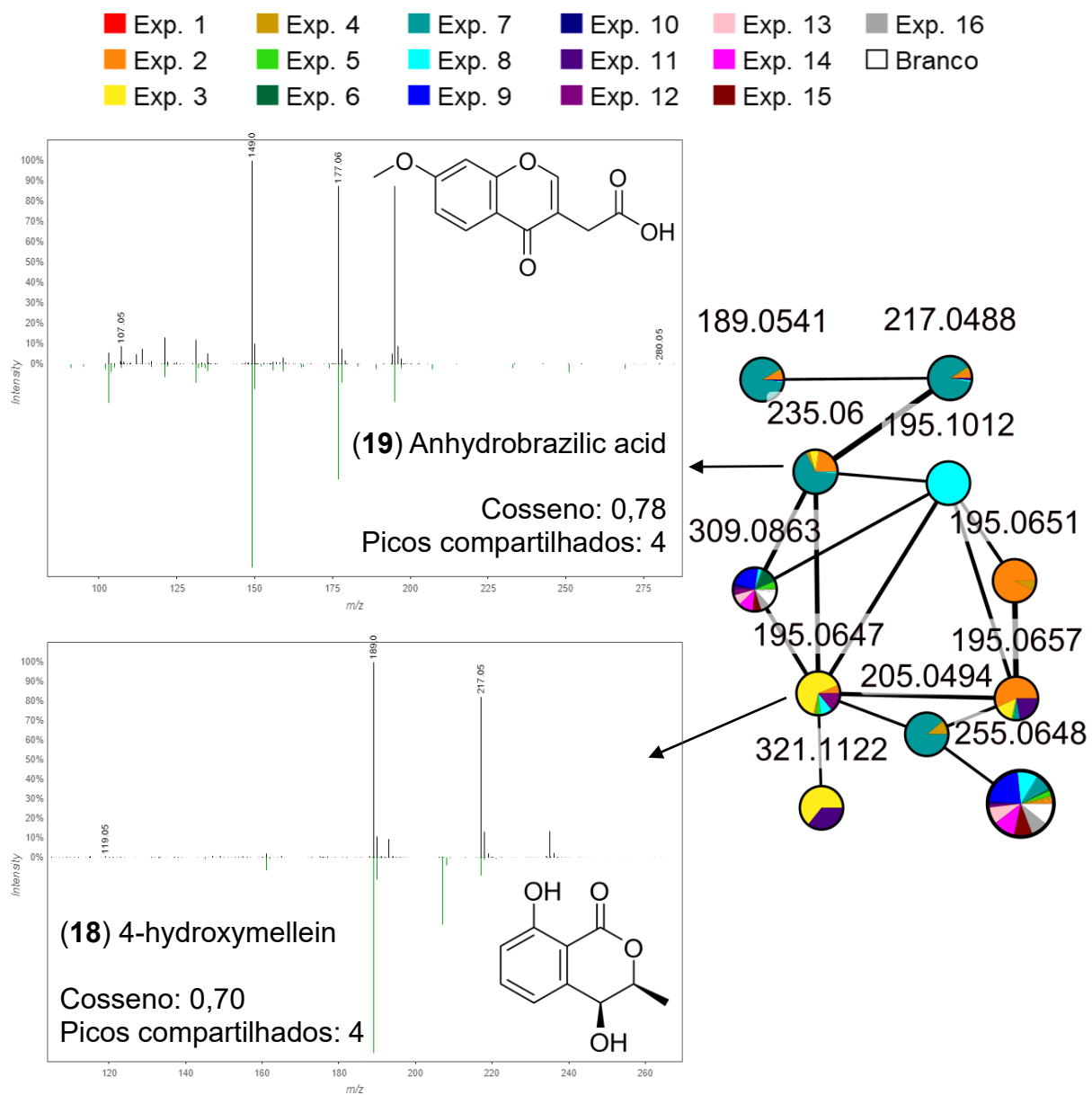


Figura 34 — Continuação.

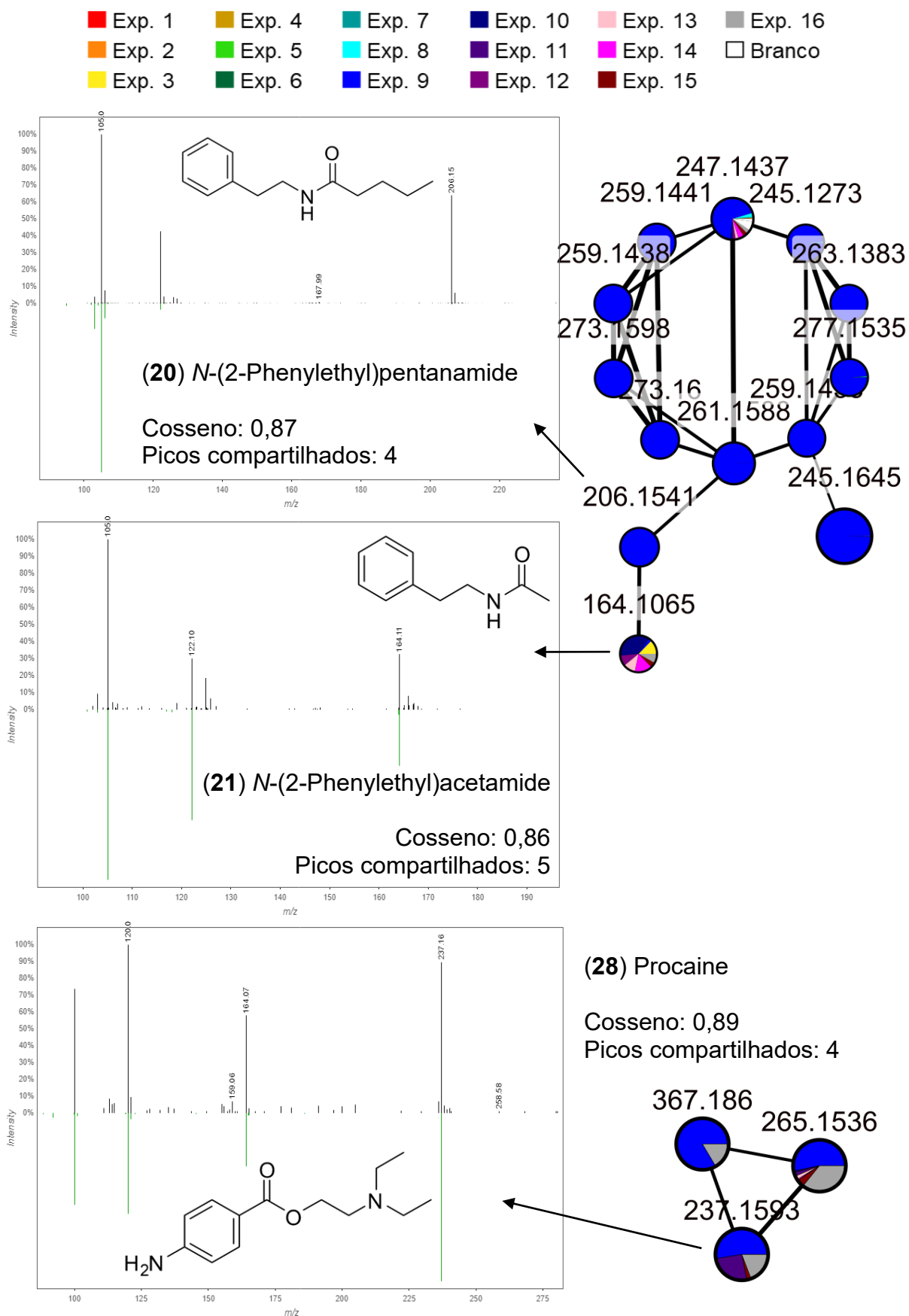


Figura 34 — Continuação.

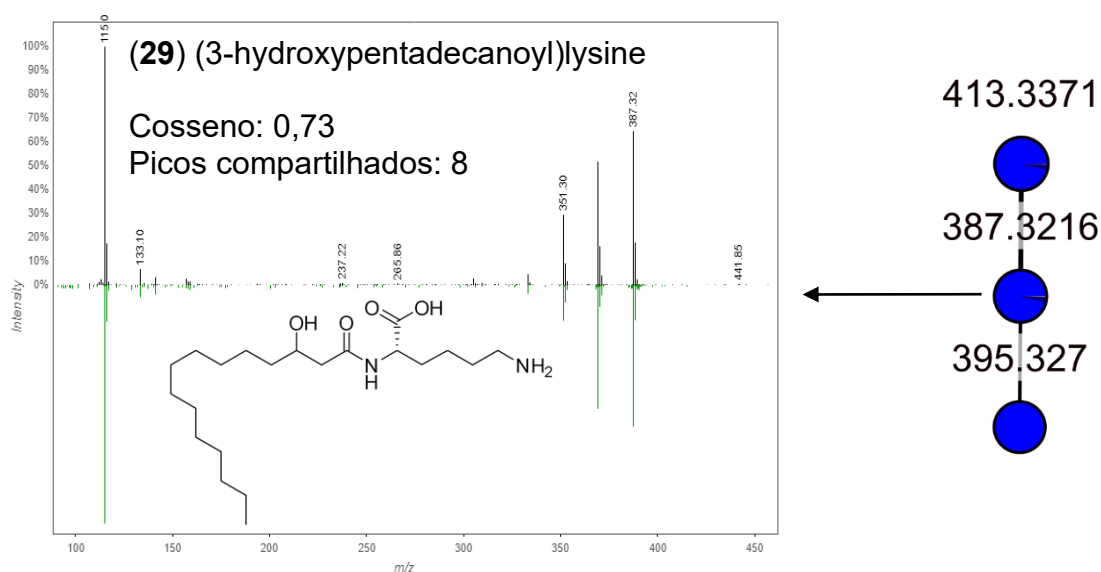


Figura 34 — Continuação.

Os moduladores epigenéticos ácido hidroxâmico suberoilânilda (SAHA) e procaína foram anotados nas redes de *features*. Provavelmente eles não foram diluídos completamente na água e ficaram parcialmente na fase orgânica que gerou o extrato. Os nós próximos dos moduladores podem ser de estruturas resultantes de biotransformação desses moduladores ou produtos de degradação.

N-acetil-triptamina (**8**) foi encontrada majoritariamente no extrato PB10 e, em menor quantidade, no extrato PB09. A *N*-butirilfenilalanina (**16**) foi anotada em diversos extratos, principalmente no extrato PB15 e no extrato PB03. O nó referente a essa estrutura está conectado em uma família de moléculas que contêm diversas substâncias encontradas nos extratos do meio de cultivo. Portanto, esse derivado de fenilalanina pode ter sido produzido pelo fungo, mas também pode ser só o resultado de biotransformação dos aminoácidos contidos nos meios de cultivo.

A isocumarina 4-hidroximeleína (**18**) foi encontrada em maior concentração no extrato PB03. As isocumarinas são compostos fenólicos encontrados em extratos do fungo *Hypoxylon investiens* e em outros fungos. O resultado desse experimento mostra que determinadas condições de cultivo podem estimular a produção de substâncias desta classe de produtos naturais.

De maneira semelhante a 4-hidroximeleína, o ácido 2-(7-metoxi-4-oxo-4*H*-cromen-3-il)acético (ácido anidrobrasílfico) (**19**) foi anotado em vários extratos, mas foi encontrado em maior concentração em um extrato específico (PB07). Essa

substância pertence à classe das cromen-4-onas que podem possuir atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana (GASPAR et al., 2024).

A *N*-(2-Feniletil)acetamida (**21**) foi identificada em vários extratos analisados, porém a *N*-(2-Feniletil)pentanamida (**20**) foi encontrada exclusivamente no extrato do experimento 9 (PB09). Os nós referentes a essas amidas pertencem a um grupo molecular constituído de nós praticamente exclusivos do extrato PB09. Por fim, uma outra amida (**29**) também foi anotada em um grupo molecular de nós quase exclusivos do experimento 9.

A análise dessa rede de *features* demonstrou que o experimento 9 foi o que mais resultou em estruturas exclusivas, o que pode ser um indício de que as condições aplicadas neste experimento ativaram alguma rota metabólica biossintética específica no fungo. Esse resultado, em conjunto com o resultado obtido na análise do planejamento Plackett-Burman, foi decisivo para a definição de realizar um cultivo em escala ampliada nas mesmas condições do experimento 9. O conjunto de dados utilizado para essa análise foi inserido no repositório MassIVE sob o identificador MSV000093521, podendo ser acessado publicamente.

4.2.3.2 Rede molecular “clássica”

Com o FBMN não foram gerados nós com *m/z* próximo de 1000, sendo que sinais de alta intensidade com essa massa foram observados no cromatograma do extrato PB01 (Seção 4.2.3). Por esse motivo decidiu-se gerar outra rede molecular (**Figura 35**), mas usando o método clássico e filtros mais permissivos para obter alguma sugestão de estrutura para esses sinais com relação massa/carga mais alta.

Nessa rede molecular clássica foram encontrados grupos de nós que possuíam *m/z* na faixa de 739–1058, sendo quase todos exclusivos do experimento 1. Foi possível anotar algumas estruturas dessa rede, destacando-se aquelas com *m/z* próximos de 1000 mostradas na **Tabela 16**. Essas estruturas foram anotadas como sendo derivados de surfactina, um biossurfactante produzido principalmente por bactérias do gênero *Bacillus*.

As surfactinas são constituídas por um heptapeptídeo ligado a uma cadeia lipídica formando um lipopeptídeo cíclico. Como a produção dessas substâncias só foi observada naturalmente em bactérias, foram consideradas três possíveis explicações

para sua anotação nesse extrato. A primeira é que as anotações estejam incorretas, já que o erro de m/z é alto (150 ppm), e esses *features* poderiam corresponder a outros peptídeos cíclicos. Um exemplo de peptídeo naturalmente produzido por fungos é a iturina, que também é constituída por um heptapeptídeo ligado a uma cadeia lipídica. Outra possibilidade seria a eventual contaminação por bactérias durante o crescimento fúngico, apesar de não ter sido observado crescimento bacteriano no frasco do experimento 1. Por fim, podemos considerar que o fungo tenha produzido a surfactina e/ou outros peptídeos cíclicos, devido à ação dos moduladores epigenéticos e às condições físico-químicas utilizadas no experimento 1.

Devido a obtenção desses sinais exclusivos do extrato PB01 e sua alta atividade citotóxica, decidiu-se realizar um cultivo em escala ampliada nas condições do experimento 1 com o objetivo de realizar o fracionamento do extrato e purificação visando isolar substâncias em quantidade suficiente para a realização de experimentos de RMN para determinação estrutural.

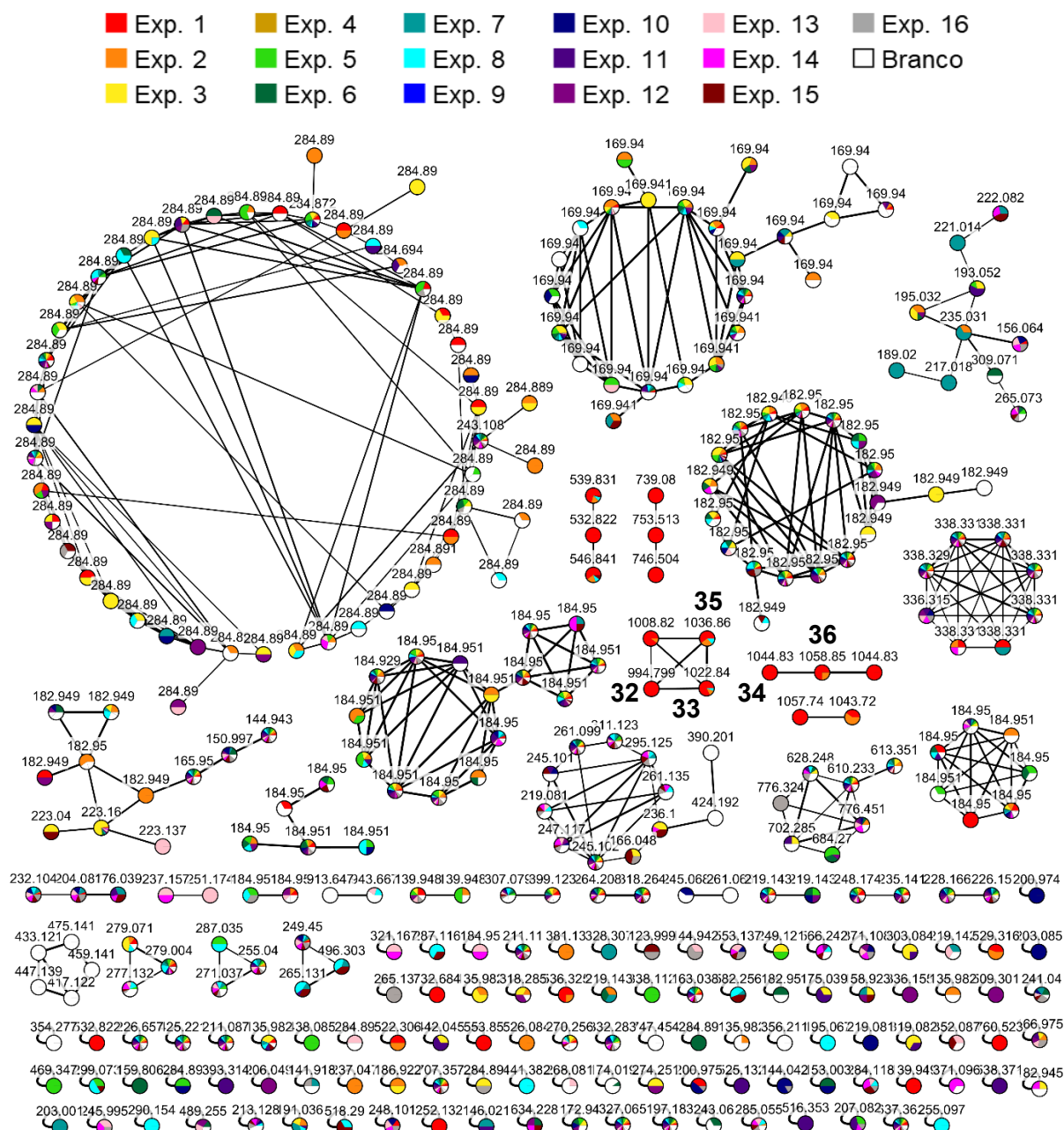
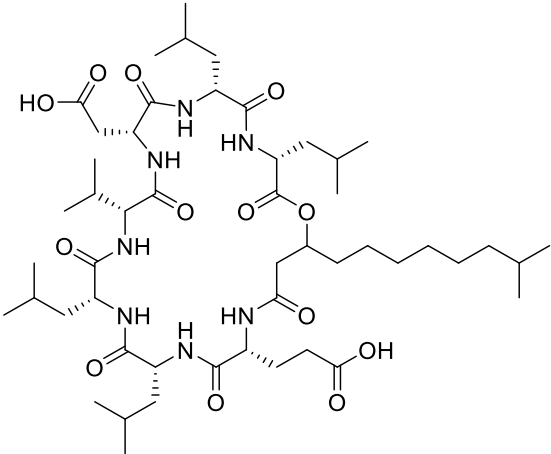
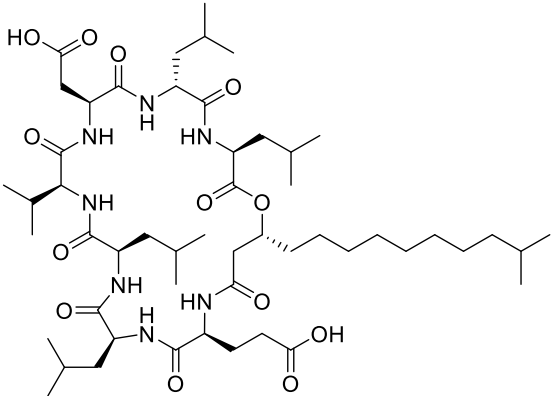
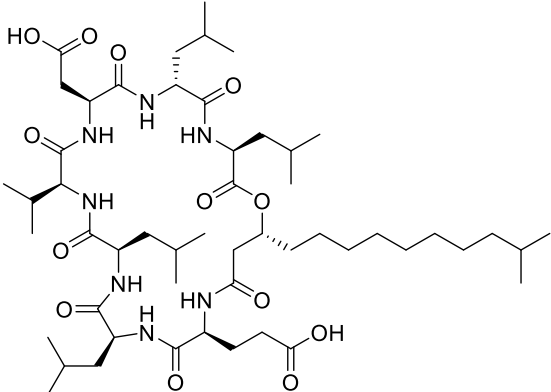
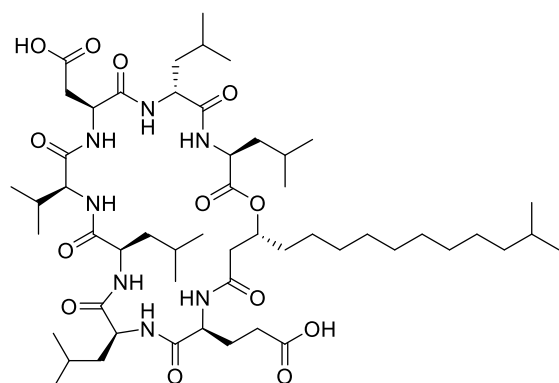


Tabela 16 — Substâncias anotadas com rede molecular clássica (alta resolução) do cultivo com planejamento Plackett-Burman e respectivas relações massa/carga (m/z).

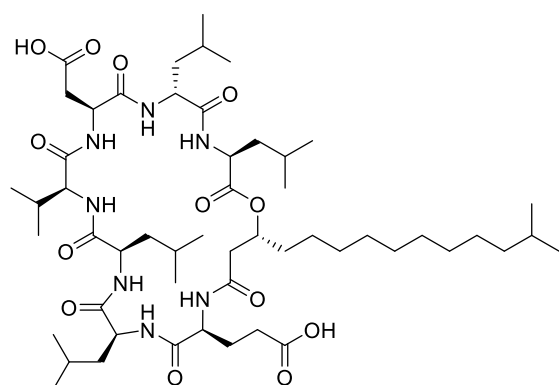
Substância	Aduto	m/z do íon precursor	m/z teórica	Erro de m/z (ppm)
(32) Surfactina C12				
	$[M+H]^+$	994,799	994,6434	156
(33) Surfactina B (C14)				
	$[M+H]^+$	1022,84	1022,6747	161
(34) Surfactina B (C14)				
	$[M+Na]^+$	1044,83	1044,6567	165

(35) Surfactina C (C15)



[M+H] ⁺	1036,86	1036,6904	163
--------------------	---------	-----------	-----

(36) Surfactina C (C15)



[M+Na] ⁺	1058,85	1058,6723	167
---------------------	---------	-----------	-----

Fonte: próprio autor.

4.3 CRESCIMENTO EM ESCALA AMPLIADA

Após análise dos dados obtidos, decidiu-se realizar um cultivo em escala ampliada (EA) sob as condições do experimento 1, bem como outro cultivo seguindo as condições do experimento 9. Dois frascos contendo apenas os meios de cultivo e os moduladores foram utilizados como controle. As massas obtidas desses extratos estão apresentadas na **Tabela 17**, juntamente com os rendimentos dos extratos do cultivo PB realizados anteriormente.

Tabela 17 — Extratos obtidos em escala ampliada do crescimento do fungo *H. investiens*.

Amostras	Frascos	Massa total (mg)	Massa por frasco EA (mg)	Massa por frasco PB (mg)
Experimento 1	12	713	59,4	80,1
Experimento 9	56	1674	29,9	7,6
Malte + moduladores	1	12,9	12,9	8,5
PDB + moduladores	1	7,0	7,0	14,2

Fonte: próprio autor.

4.3.1 Análise por HPLC-DAD

Os dois extratos fúngicos e os dois extratos brancos (controle, apenas meio de cultivo com moduladores) foram analisados por HPLC-DAD, em modo analítico, para avaliação do perfil cromatográfico por meio da absorção dos compostos na região do ultravioleta-visível (UV-Vis).

As corridas cromatográficas foram realizadas com eluição em gradiente exploratório de H₂O:MeOH (95:05 – 0:100, v/v) durante 30 minutos e com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. Foi utilizada uma coluna analítica preenchida com sílica C18 (fase reversa), e foram injetados 5,0 µL de cada amostra.

A **Figura 36** mostra os cromatogramas obtidos nessa análise com detecção em $\lambda = 254$ nm. Os cromatogramas das amostras de branco apresentaram maior parte dos picos cromatográficos na região de maior polaridade, com tempo de retenção (t_r) entre 2 e 10 minutos, provavelmente referentes às substâncias glicosiladas normalmente encontradas nos meios de cultura com malte e batata. Muitos desses picos encontrados nas amostras de branco foram detectados com menor intensidade nos extratos fúngicos ou até mesmo não apareceram nesses extratos, indicando que houve consumo dessas substâncias pelo fungo durante seu crescimento.

Os picos cromatográficos dos extratos fúngicos distribuíram-se em regiões menos polares, entre 7 e 26 minutos, em relação às amostras dos meios de cultivo. O extrato Exp9 apresentou uma maior quantidade de picos cromatográficos quando comparado ao extrato Exp1, indicando uma produção mais variada de metabólitos com grupos cromóforos, indicativa de maior quimiodiversidade. Os cromatogramas dos extratos fúngicos apresentaram alguns picos exclusivos, como o pico majoritário

do extrato Exp1 em $t_R = 17,0$ min e os picos do extrato Exp9 em $t_R = 9,5$ min, $t_R = 11,5$ min e $t_R = 25,5$ min.

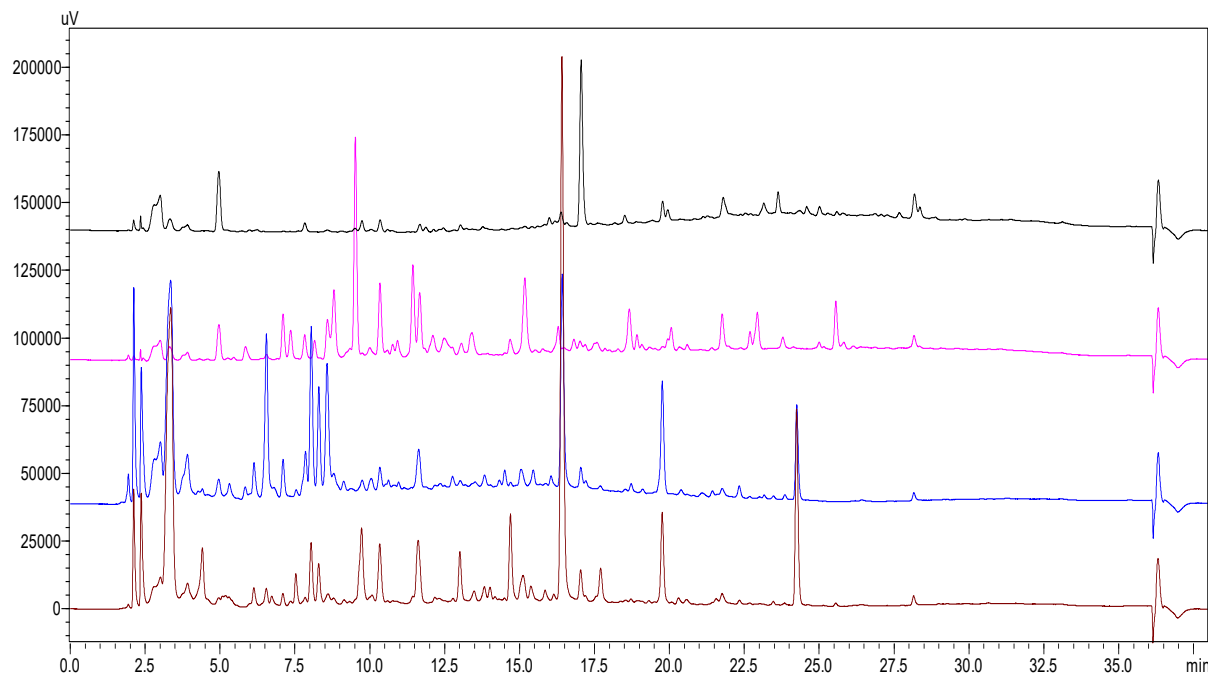


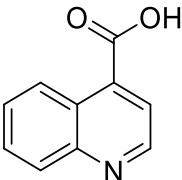
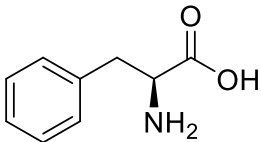
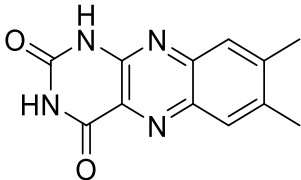
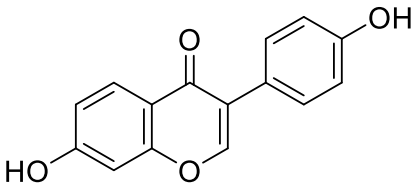
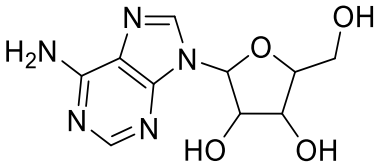
Figura 36 — Cromatograma em gradiente exploratório do extrato Exp1 (preto), Exp9 (rosa), branco do malte (azul) e branco do PDB (marrom). Eluição em gradiente de 5-100% MeOH em 30 min e detecção em $\lambda = 254$ nm.

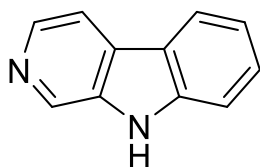
Fonte: próprio autor.

4.3.2 Análise por FBMN dos extratos Exp1 e Exp9

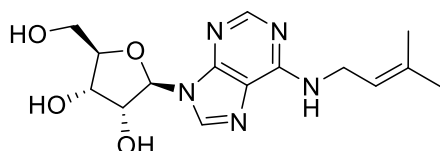
Os extratos obtidos foram analisados por UHPLC-MS para geração das redes de *features* e anotação de substâncias. No total foram anotadas 20 substâncias com erro de massa inferior a 5 ppm (**Tabela 18**), das quais 6 (**16**, **21**, **37**, **41**, **43** e **45**) podem ser consideradas metabólitos do fungo ou produtos de biotransformação dos compostos dos meios de cultivo. Os espectros MS/MS obtidos dessas 6 substâncias estão mostrados na **Figura 37**. A anotação das substâncias oriundas do meio de cultivo também é importante para evitar que uma substância isolada seja erroneamente atribuída como sendo um metabólito do fungo.

Tabela 18 — Substâncias anotadas com FBMN (MS de alta resolução) do cultivo em escala ampliada e respectivas relações massa/carga (m/z).

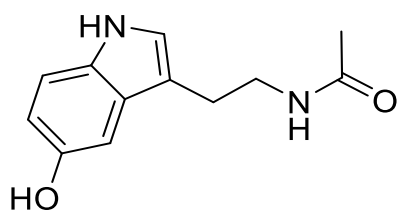
Substância	Tempo de retenção	Aduto	m/z do íon precursor	m/z teórica	Erro de m/z (ppm)
(17) 4-quinolinecarboxylic acid					
	1,45	$[M+H]^+$	174,0544	174,0549	2,8
(37) L-Phenylalanine					
	5,25	$[M+H]^+$	166,0860	166,0862	1,5
(38) 7,8-Dimethylalloxazine					
	4,56	$[M+H]^+$	243,0873	243,0876	1,4
(26) Daidzein					
	5,06	$[M+H]^+$	255,0646	255,0651	1,9
(11) Adenosine					
	1,24	$[M+H]^+$	268,1038	268,1040	0,8

(39) β -Carboline

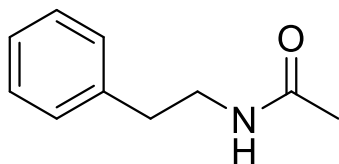
3,51	[M+H] ⁺	169,0757	169,0760	1,9
------	--------------------	----------	----------	-----

(40) Riboprime

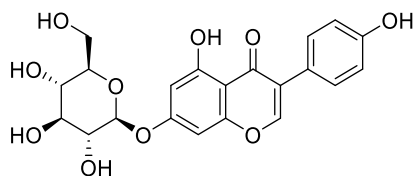
4,10	[M+H] ⁺	336,1664	336,1666	0,7
------	--------------------	----------	----------	-----

(41) *N*-Acetylserotonin

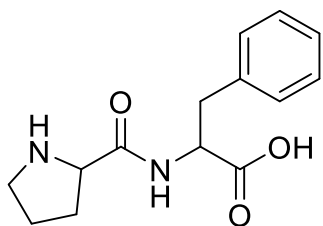
3,69	[M+H] ⁺	219,1125	219,1128	1,4
------	--------------------	----------	----------	-----

(21) *N*-(2-Phenylethyl)acetamide

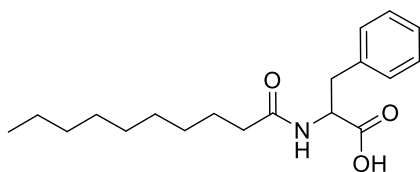
4,67	[M+H] ⁺	164,1068	164,1070	1,2
------	--------------------	----------	----------	-----

(24) Genistein 7-O-glucoside

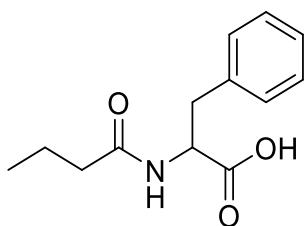
4,13	[M+H] ⁺	433,1125	433,1129	0,9
------	--------------------	----------	----------	-----

(13) Prolylphenylalanine

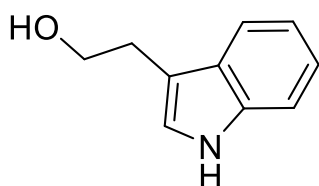
4,25	$[M-H_2O+H]^+$	245,1283	245,1284	0,8
------	----------------	----------	----------	-----

(42) *N*-(1-Oxodecyl)-phenylalanine

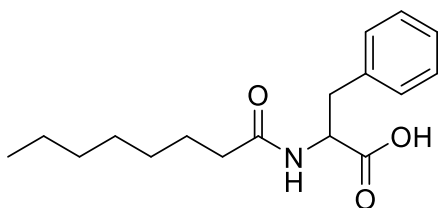
8,62	$[M+H]^+$	320,2220	320,2220	0,1
------	-----------	----------	----------	-----

(16) *N*-Butyrylphenylalanine

5,25	$[M+H]^+$	236,1275	236,1281	2,5
------	-----------	----------	----------	-----

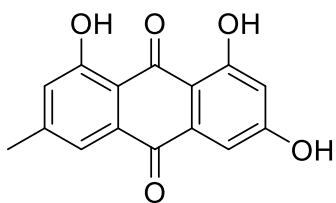
(43) Tryptophol

4,82	$[M-H_2O+H]^+$	144,0807	144,0807	0,5
------	----------------	----------	----------	-----

(44) *N*-(1-Oxoocetyl)-Phenylalanine

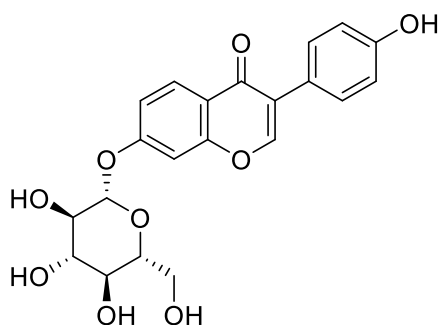
7,57	$[M+H]^+$	292,1905	292,1907	0,7
------	-----------	----------	----------	-----

(45) Emodin

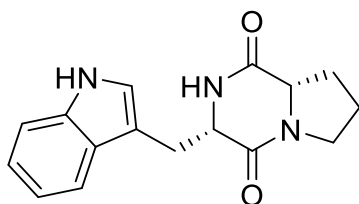


6,19 [M+H]⁺ 271,0593 271,0601 2,9

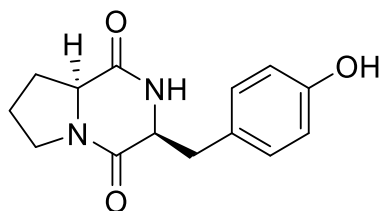
(23) Daidzin



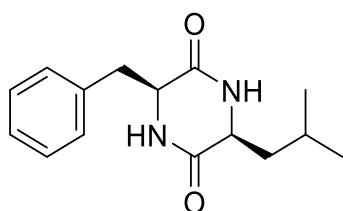
3,64 [M+H]⁺ 417,1177 417,1180 0,7

(9) *Cyclo*(L-Trp-L-Pro)

4,39 [M+H]⁺ 284,1386 284,1393 2,6

(12) *Cyclo*(L-Tyr-L-Pro)

2,41 [M+H]⁺ 261,1232 261,1233 0,6

(14) *Cyclo*(Leu-Phe)

5,06 [M+H]⁺ 261,1593 261,1597 1,5

As substâncias **41**, **43** e **45** foram encontradas exclusivamente nos extratos fúngicos, evidenciando que são produtos do metabolismo do fungo. A *N*-Acetilserotonina (**41**), um intermediário na biossíntese da melatonina, pode se tornar um agente terapêutico importante devido às suas propriedades neuroprotetoras. Essa proteção celular ocorre devido à inibição de processos inflamatórios e dos mecanismos relacionados ao estresse oxidativo (KANG et al., 2023).

O triptofol (**43**) é um álcool aromático derivado do triptofano que atua como molécula de sinalização *quorum sensing* em fungos e leveduras. Esta molécula influencia a morfogênese fúngica e pode provocar apoptose celular, atuando como um agente antifúngico contra diversas espécies (PALMIERI; PETRINI, 2019).

A emodina (**45**) é uma antraquinona presente em diversos organismos, incluindo fungos. Diversos estudos evidenciaram seu potencial terapêutico por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*, destacando suas atividades antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena e neuroprotetora (SHARIFI-RAD et al., 2022).

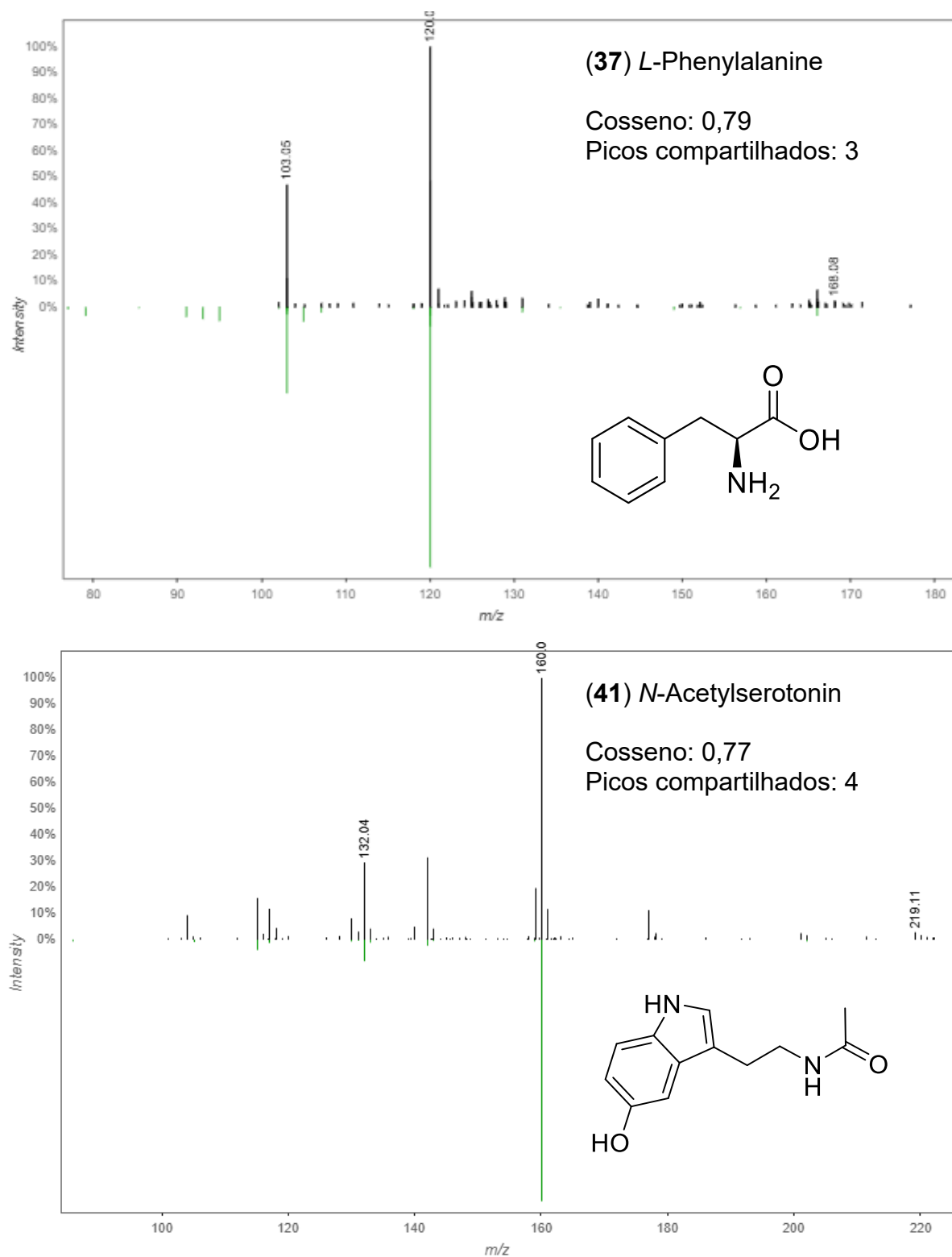


Figura 37 — Espectros MS/MS das estruturas anotadas nos extratos fúngicos Exp1 e Exp9, obtidos de cultivos em escala ampliada. Espectros obtidos, coloridos em preto, e os da biblioteca em verde.

Fonte: próprio autor.

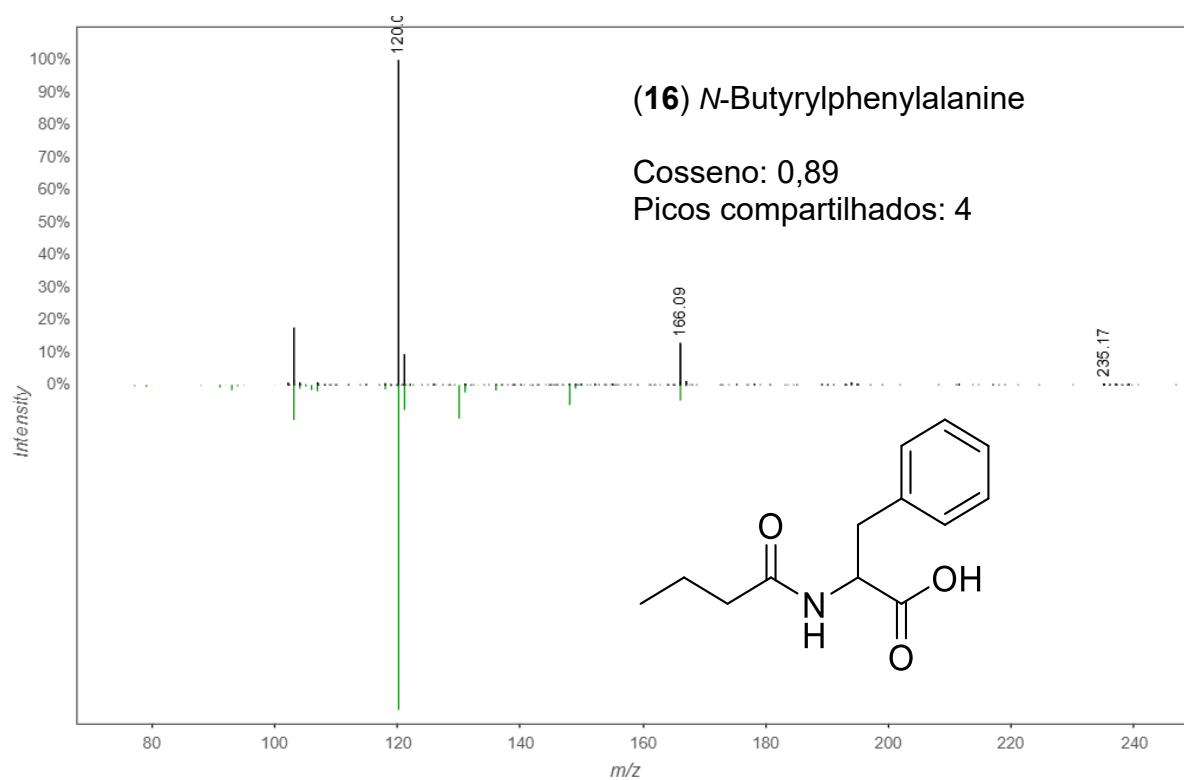
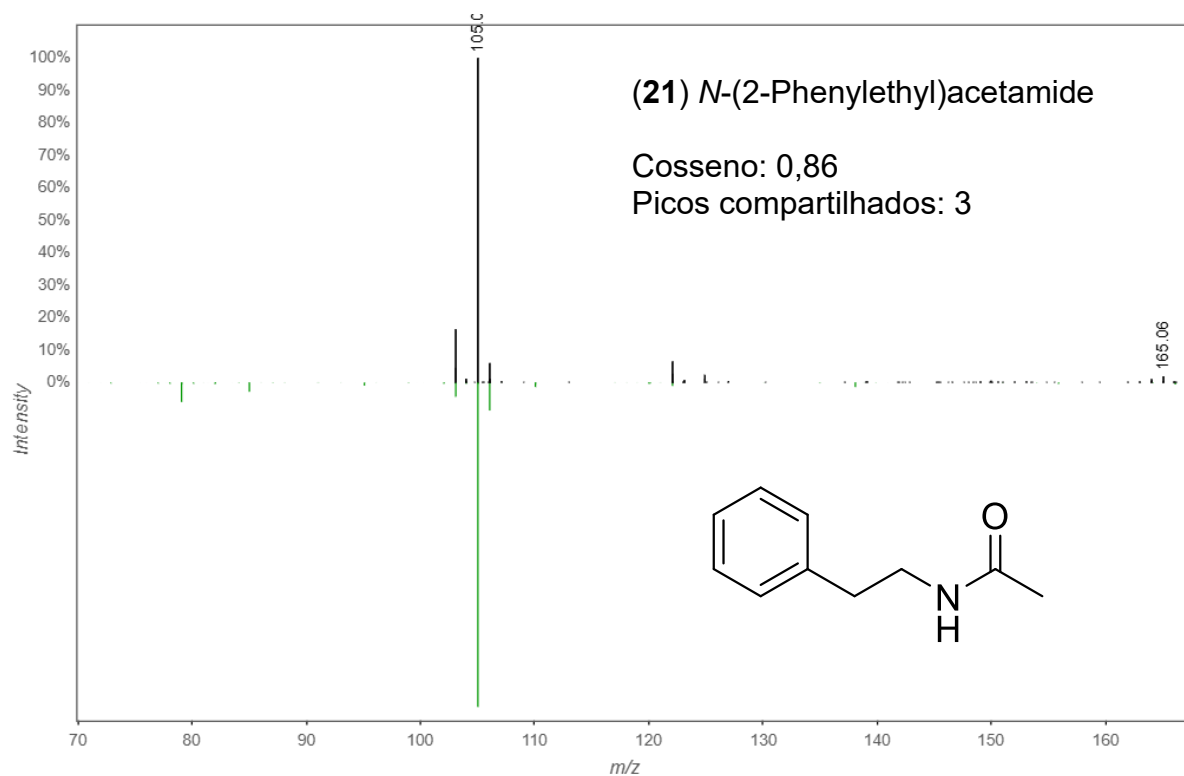


Figura 37 — Continuação.

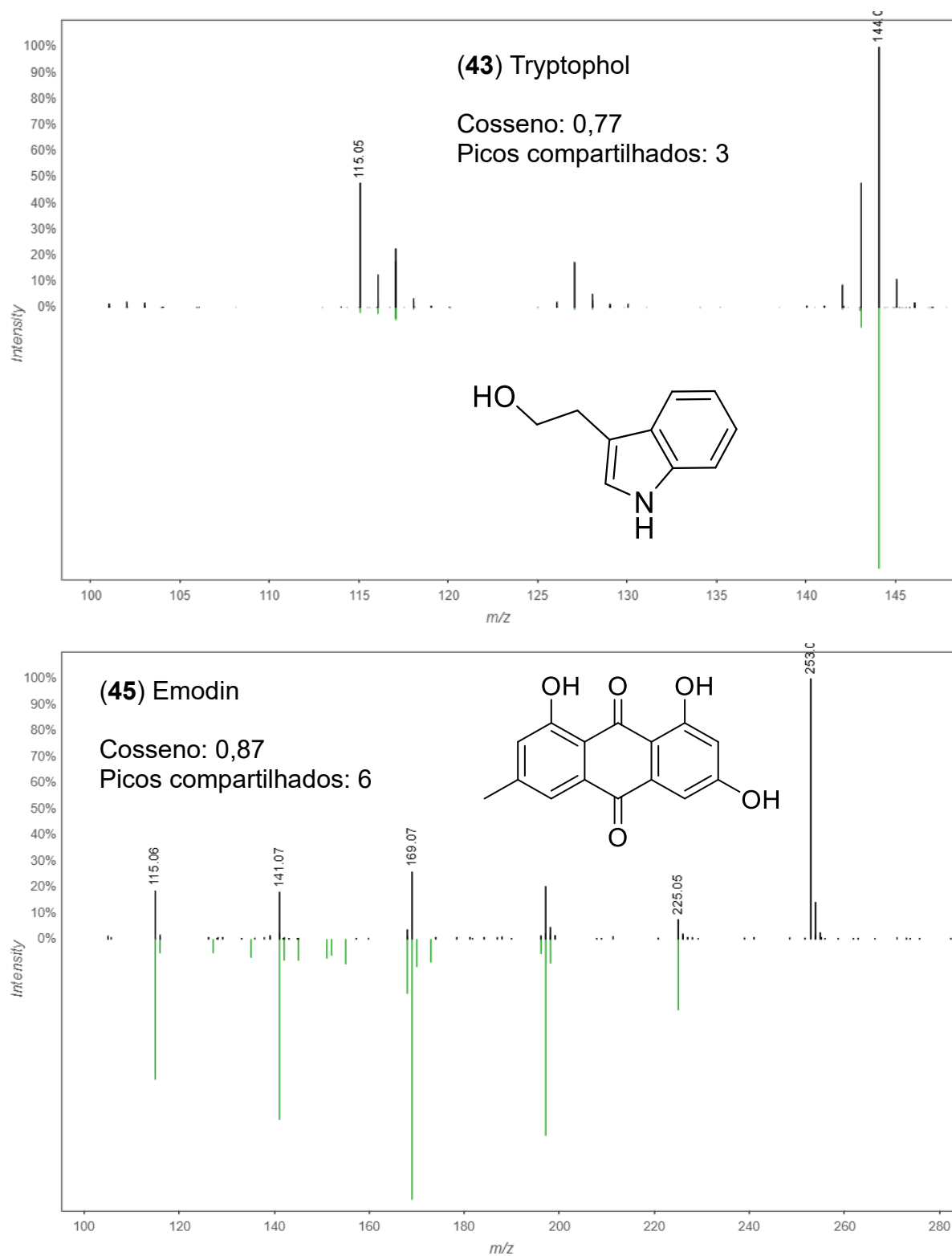


Figura 37 — Continuação.

A rede molecular obtida nessa análise está mostrada na **Figura 38**, sendo que essa rede foi filtrada para excluir os *features* que foram detectados exclusivamente nos extratos brancos (meio de cultivo mais moduladores). Em vermelho estão os *features* detectados no extrato Exp1, no qual PDB foi usado como meio de cultivo. Os nós coloridos em azul são referentes aos *features* do extrato Exp9, obtido com uso de malte como meio de cultivo.

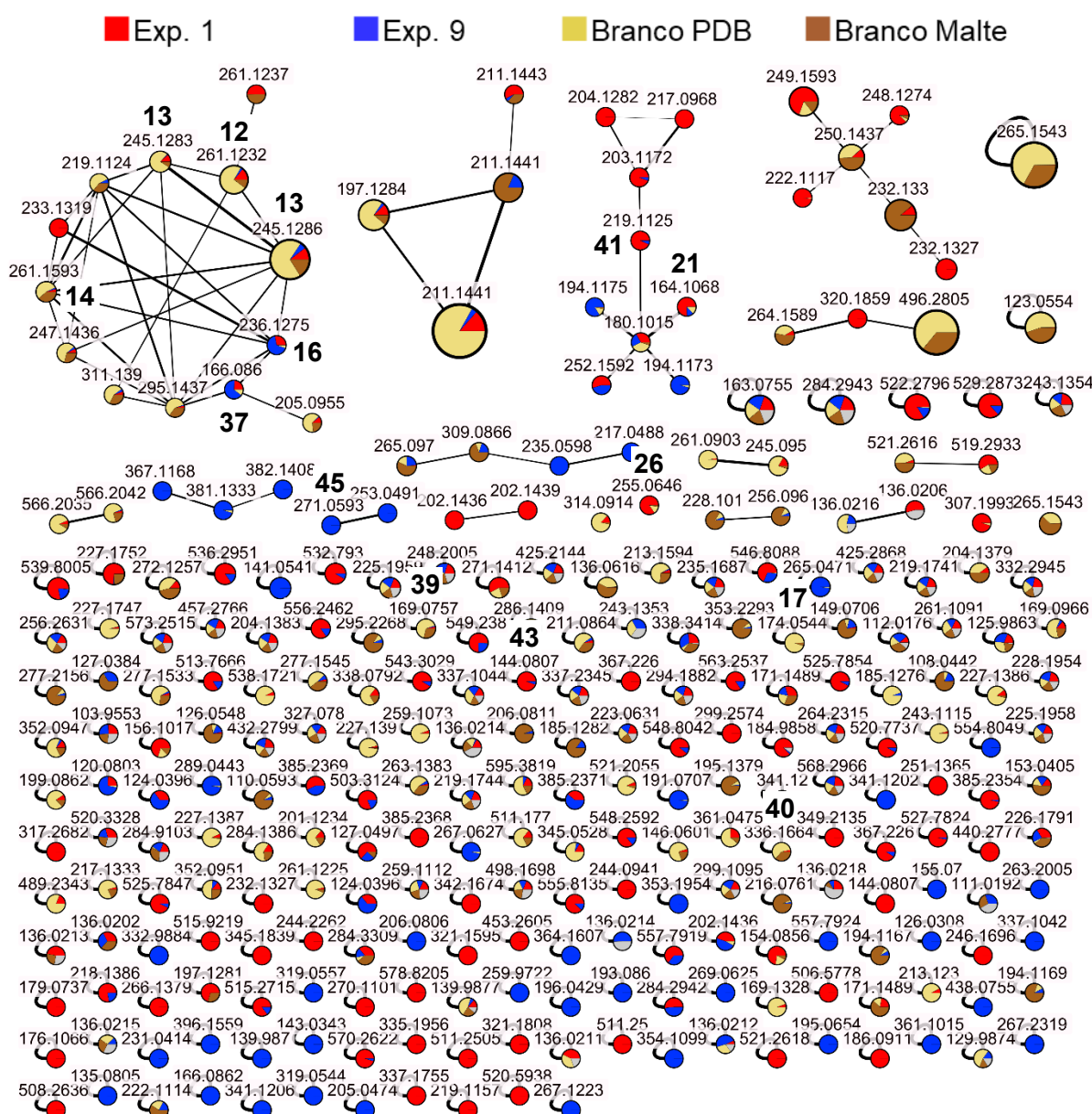


Figura 38 — *Feature-Based Molecular Networking* dos extratos do cultivo em escala ampliada (modo de ionização positivo). Cores diferentes para cada extrato. Os nós estão rotulados com a massa de íon precursor e os números destacados são referentes às substâncias anotadas. Fonte: próprio autor.

4.3.3 Fracionamento dos extratos

Após análise de perfil cromatográfico dos extratos, foi decidido fracionar o extrato **Exp1** por cromatografia em coluna com sílica C-18 e o extrato **Exp9** por cromatografia por exclusão de tamanho com Sephadex® LH-20. Os cromatogramas foram visualizados em diversos comprimentos de onda, sendo 220 nm o comprimento escolhido para prosseguir com as análises por HPLC-DAD, pois permitiu detectar um número maior de picos cromatográficos presentes no extrato. As frações foram purificadas em HPLC-DAD em modo semi-preparativo visando ao isolamento de substâncias.

4.3.3.1 Fracionamento e purificação do extrato Exp1

Aproximadamente 500 mg desse extrato foi fracionado por cromatografia em fase reversa em coluna aberta de vidro de bancada com sílica C-18. Como fase móvel foram usadas 3 soluções de MeOH e H₂O, resultando em 3 frações (**Tabela 19**) que foram analisadas por HPLC-DAD com coluna analítica (**Figura 39 e 40**).

Tabela 19 — Frações obtidas por cromatografia em coluna do extrato Exp1.

Amostras	% MeOH	Massa (mg)
Exp1 Fr1	35	271,6
Exp1 Fr2	60	67,4
Exp1 Fr3	100	127,5

Fonte: próprio autor.

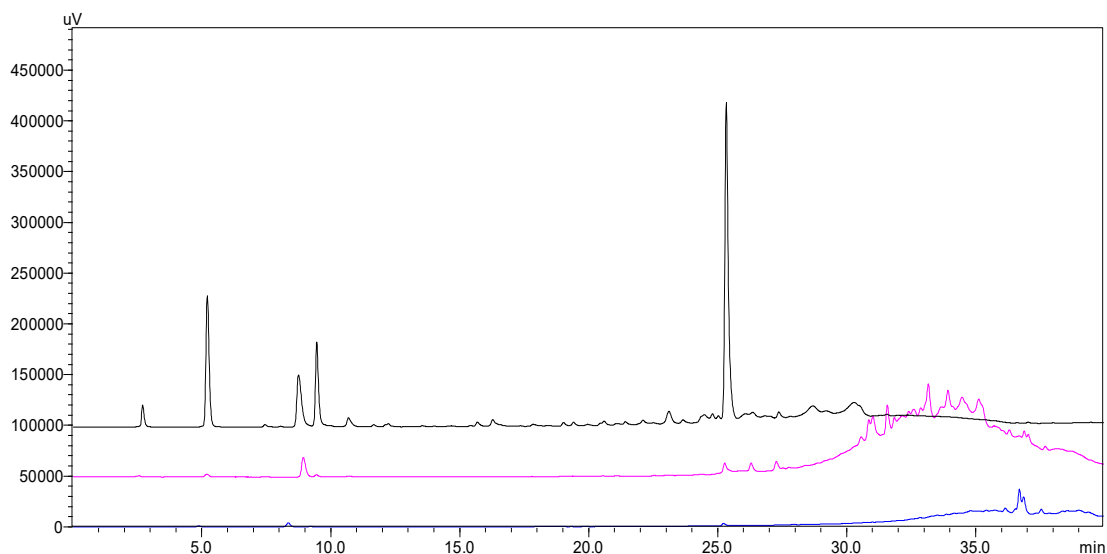


Figura 39 — Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD analítico das frações Exp1 Fr1 (preto), Fr2 (rosa) e Fr3 (azul). $\lambda = 254$ nm. 5–100 % de MeOH em 35 min.

Fonte: próprio autor.

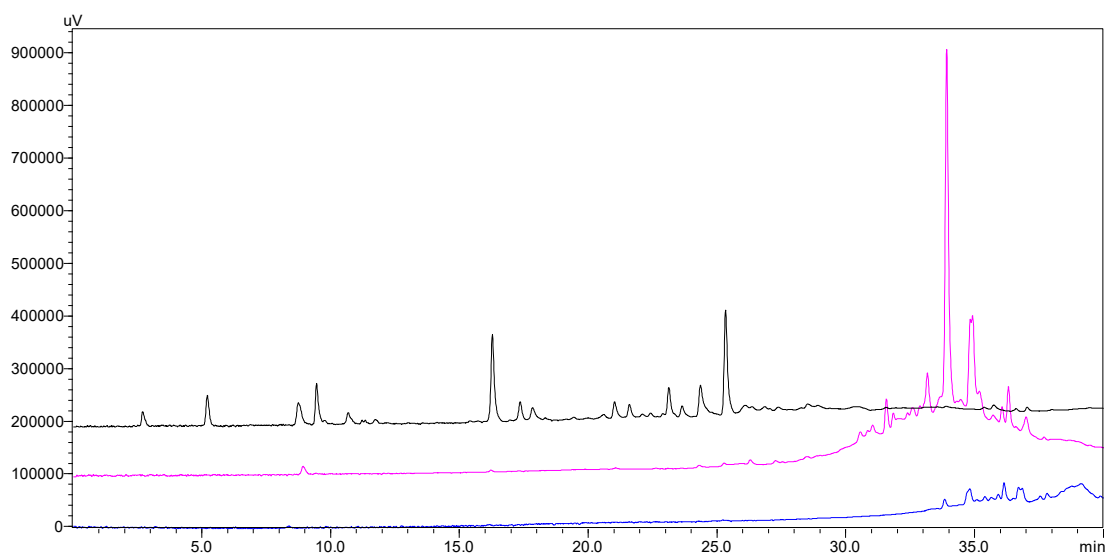


Figura 40 — Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD analítico das frações Exp1 Fr1 (preto), Fr2 (rosa) e Fr3 (azul). $\lambda = 220$ nm. 5–100 % de MeOH em 35 min.

Fonte: próprio autor.

Como maior parte da massa do Exp1 e dos picos cromatográficos ficaram na fração 1, foi decidido realizar o isolamento de substâncias com essa fração. Ela foi analisada por HPLC-DAD com coluna analítica, em que diversas proporções de fase móvel (MeOH e H₂O) foram testadas visando otimizar a separação e obter maior resolução possível entre os picos cromatográficos. Os cromatogramas dessas análises, com detecção em 220 nm, estão disponíveis na **Figura 41**. Essa fração

também foi analisada por UHPLC-MS nos modos de ionização positiva e negativa (Figura 42).

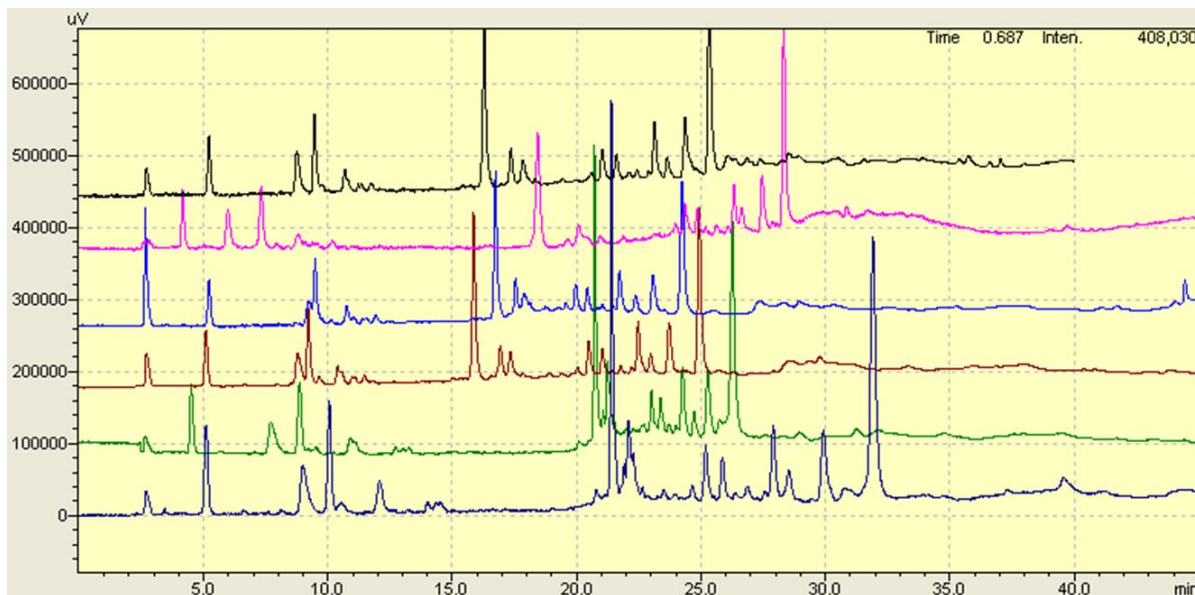


Figura 41 — Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD analítico da amostra Exp1 Fr1 ($\lambda = 220$ nm). Cromatograma de cima (preto): Gradiente exploratório 5–100 % de MeOH em 40 min. Cromatograma de baixo (azul escuro): 5–18–40–60–100 % de MeOH em 0–13–15–40–42 min, método escolhido para realizar o isolamento.

Fonte: próprio autor.

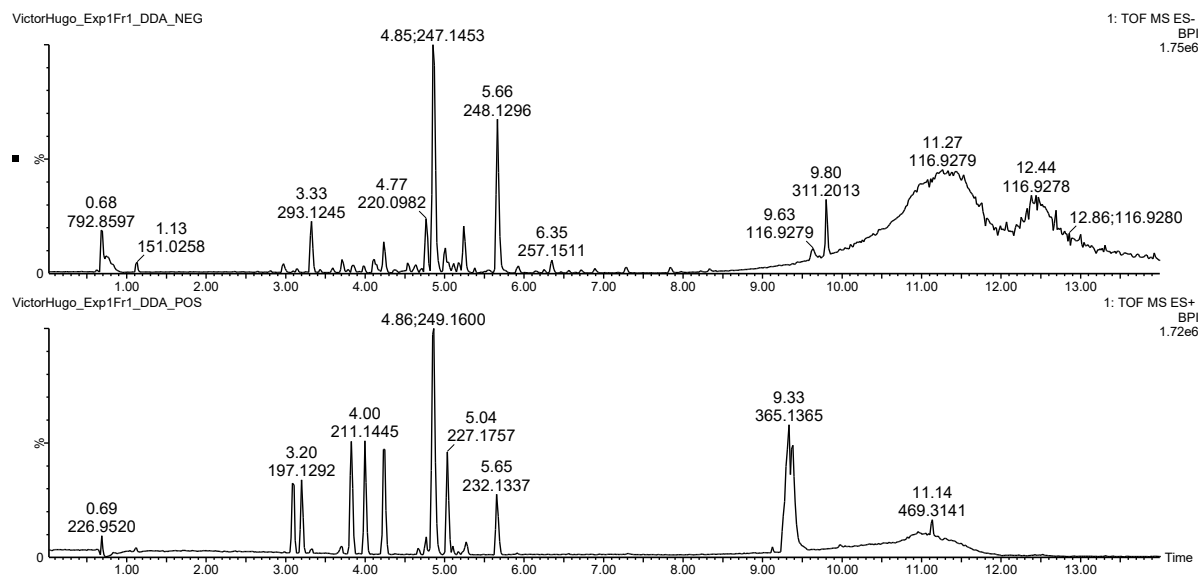


Figura 42 — Cromatograma de pico base de UHPLC-MS da fração Exp1 Fr1. Modo de ionização negativa na parte superior e modo positivo na inferior. Eluição com acetonitrila e H_2O como fase móvel. Gradiente de 5-100% de Acetonitrila em 10 minutos.

Fonte: próprio autor.

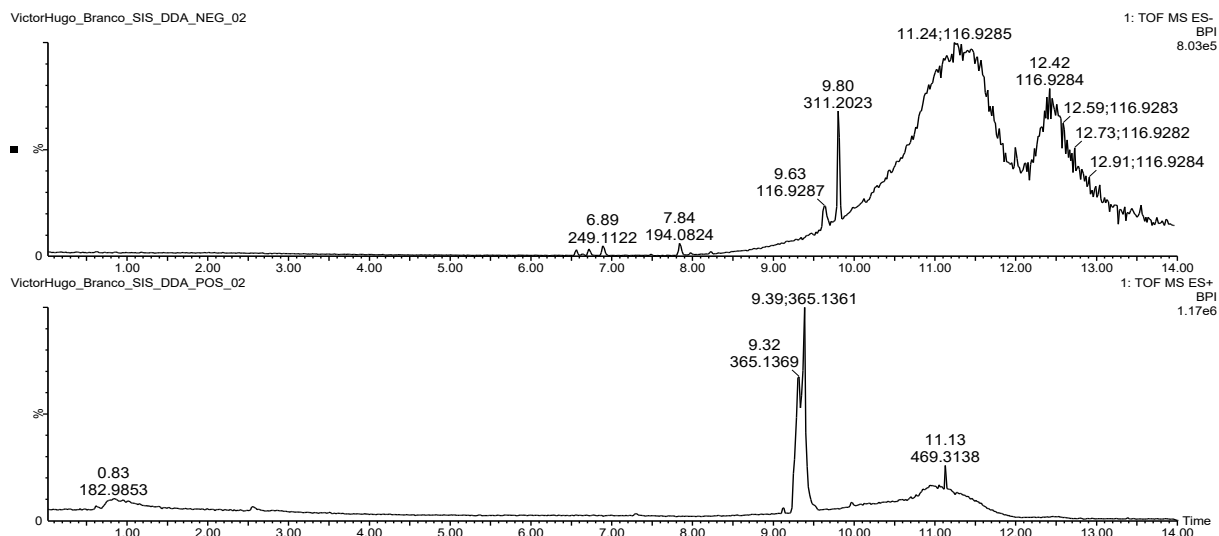


Figura 43 — Cromatograma de pico base de UHPLC-MS do branco do sistema (somente solvente). Modo de ionização negativa na parte superior e modo positivo na inferior.

Fonte: próprio autor.

Ao usar o método cromatográfico otimizado, foi possível coletar 12 picos cromatográficos da fração 1 do extrato Exp1 (**Figura 44**) com o uso do equipamento de HPLC-DAD com coluna semi-preparativa e detecção em 220 nm. O rendimento de cada pico está disponível na **Tabela 20**.

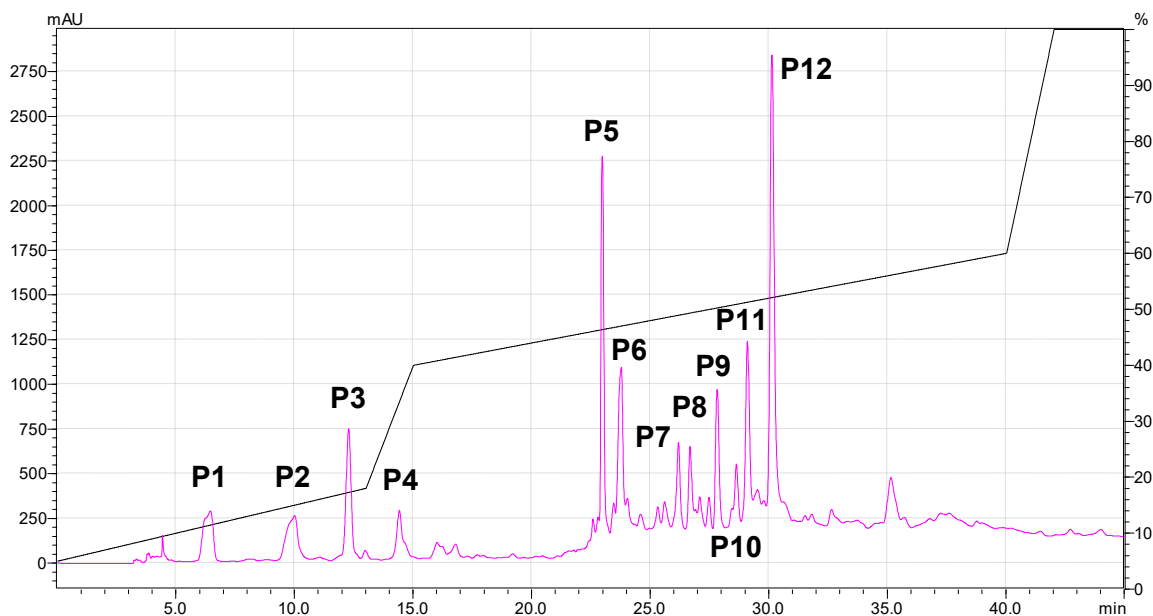


Figura 44 — Cromatograma de HPLC-DAD semipreparativo da fração Exp1 Fr1 ($\lambda = 220$ nm). Gradiente: 5–18–40–60–100 % de MeOH em 0–13–15–40–42 min. Injeção: 100 μ L.

Fonte: próprio autor.

Tabela 20 — Massas das subfrações referentes picos cromatográficos isolados da fração 1 do extrato Exp1.

Picos	Tempo de retenção (min)	Massa (mg)
P1	6,29	1,5
P2	9,69	1,1
P3	11,90	1,3
P4	14,43	0,9
P5	22,99	3,2
P6	23,78	2,3
P7	26,19	2,1
P8	26,68	1,4
P9	27,82	1,6
P10	28,64	0,9
P11	29,11	1,1
P12	30,13	5,7

Fonte: próprio autor.

4.3.3.2 Fracionamento e purificação do extrato Exp9

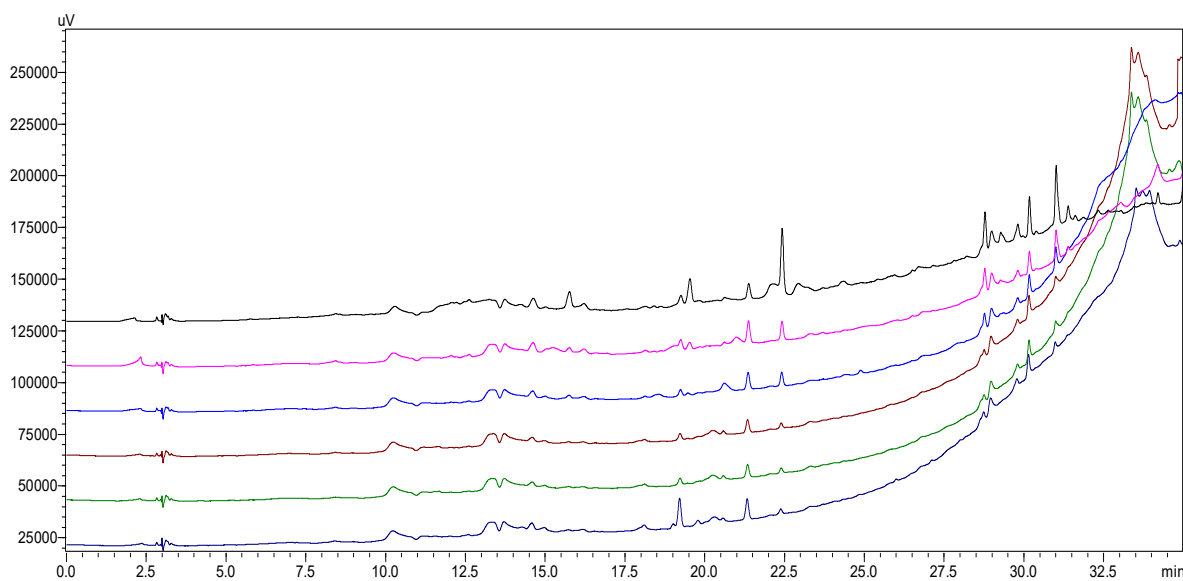
Aproximadamente 890 mg desse extrato foi fracionado por cromatografia por exclusão de tamanho em coluna preenchida com Sephadex LH-20 eluída com MeOH 100% como solvente. Foram feitas coletas a cada 13 mL passados pela coluna, resultando em 33 frações (**Tabela 21**).

Essas 33 amostras foram analisadas por HPLC-DAD analítica para visualização de seus perfis cromatográficos (**Figura 45, 47, 49, 51 e 52**). Misturas de MeOH e H₂O foram usadas como eluentes nesse sistema cromatográfico. As amostras Sx1–Sx6 apresentaram muita similaridade entre os cromatogramas, por isso elas foram agrupadas formando a amostra chamada Exp9 Fr1 (107,1 mg) (**Figura 46**). Da mesma forma, as amostras Sx7–Sx13 foram reunidas em Exp9 Fr2 (**Figura 48**) (395,6 mg), Sx14–Sx20, em Exp9 Fr3 (**Figura 50**) (214,6 mg), Sx21–Sx26, em Exp9 Fr4 (22,6 mg) e as subfrações Sx27–Sx33 foram reunidas em Exp9 Fr5 (13,3 mg).

Tabela 21 — Frações obtidas por cromatografia por exclusão de tamanho do extrato Exp9.

Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)
Sx1	5,0	Sx18	16,6
Sx2	9,1	Sx19	12,5
Sx3	11,4	Sx20	8,6
Sx4	13,8	Sx21	6,8
Sx5	34,1	Sx22	4,4
Sx6	33,7	Sx23	3,1
Sx7	21,2	Sx24	4,6
Sx8	30,0	Sx25	2,1
Sx9	47,0	Sx26	1,6
Sx10	75,3	Sx27	1,7
Sx11	96,1	Sx28	1,5
Sx12	116,9	Sx29	1,8
Sx13	98,4	Sx30	0,7
Sx14	70,0	Sx31	2,0
Sx15	52,5	Sx32	1,2
Sx16	31,8	Sx33	4,4
Sx17	23,1	Total	843

Fonte: próprio autor.

**Figura 45** — Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD analítico das amostras Sx1–Sx6 ($\lambda = 220$ nm). Gradiente de eluição: 5–100 % de MeOH em 30 min.

Fonte: próprio autor.

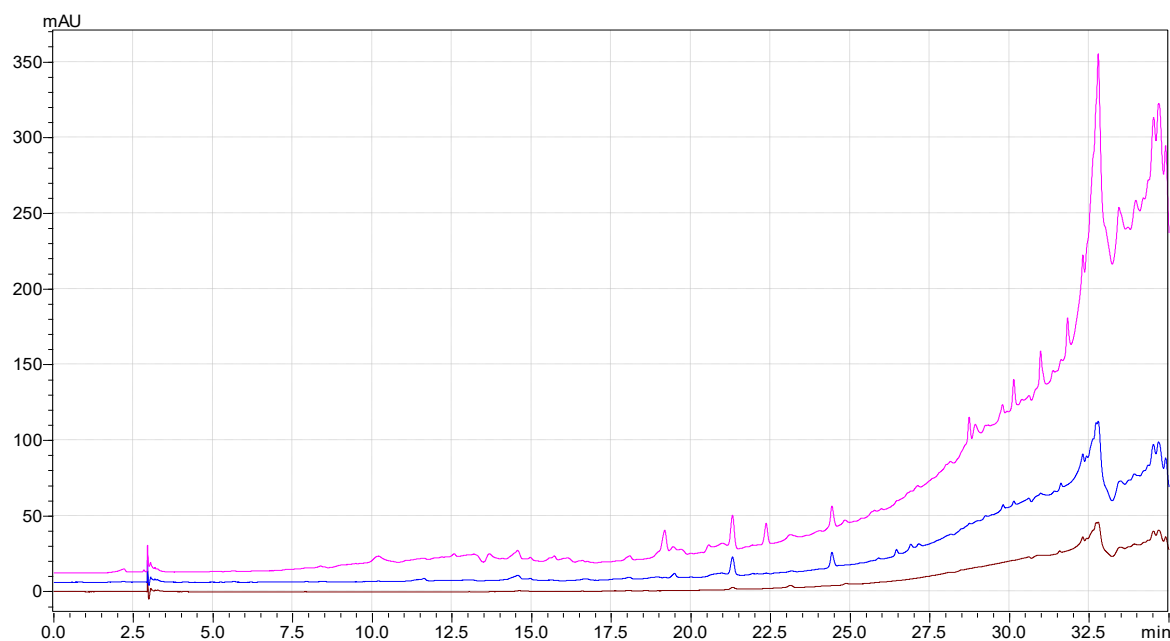


Figura 46 — Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD analítico da amostra Exp9 Fr1 (rosa: $\lambda = 220$ nm, azul: $\lambda = 254$ nm e marrom: $\lambda = 320$ nm). Gradiente de eluição: 5–100 % de MeOH em 30 min.

Fonte: próprio autor.

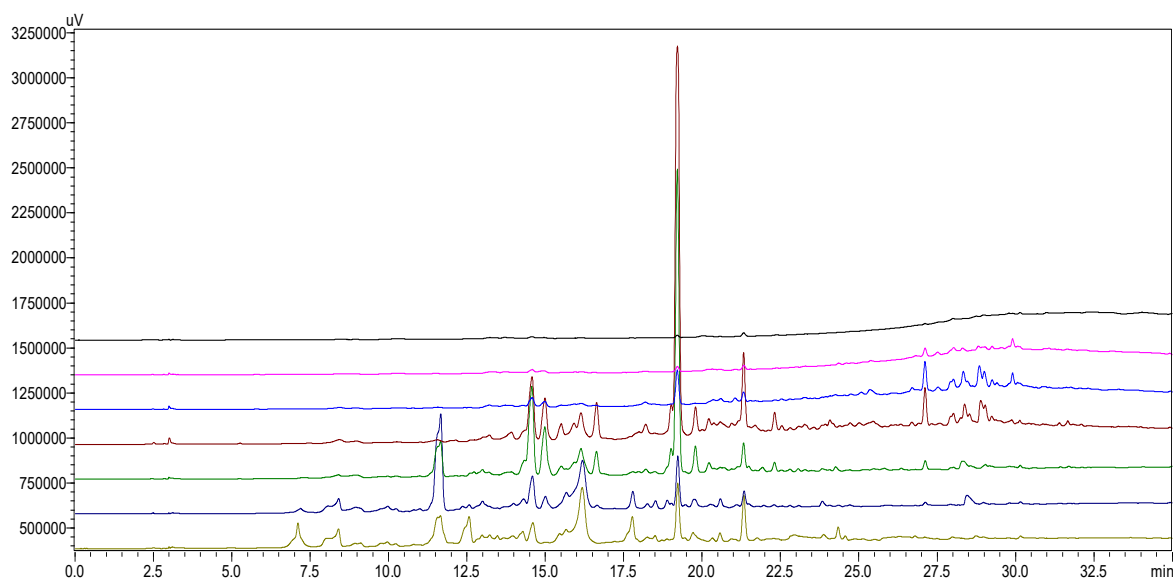


Figura 47 — Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD analítico das amostras Sx7–Sx13 ($\lambda = 220$ nm). Gradiente de eluição: 5–100 % de MeOH em 30 min.

Fonte: próprio autor.

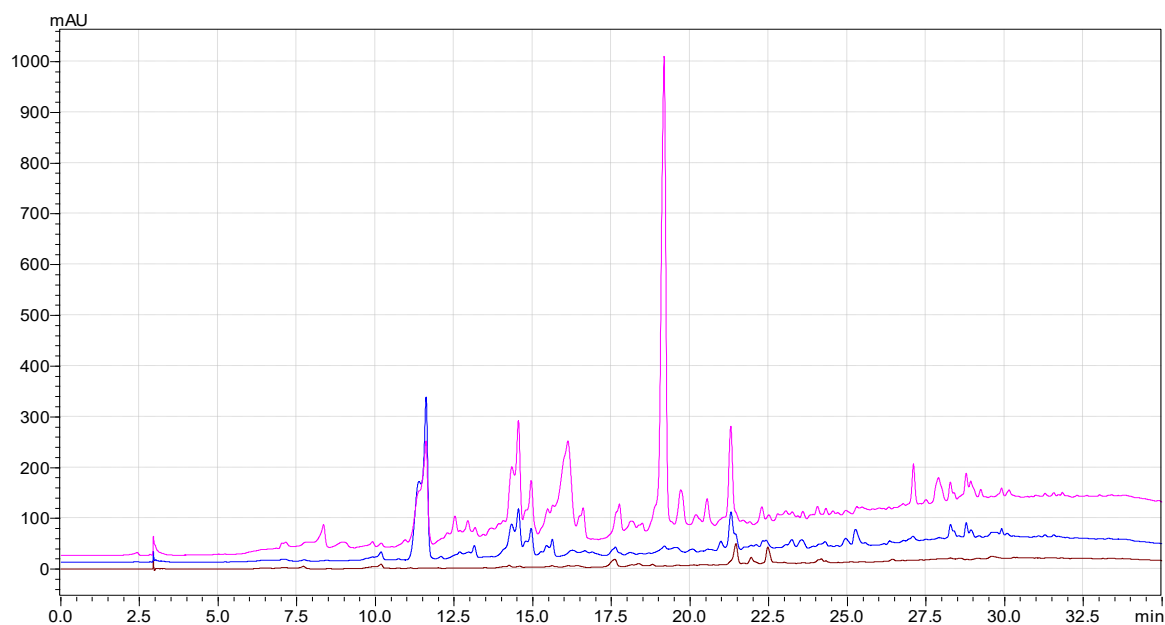


Figura 48 — Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD analítico da amostra Exp9 Fr2 (rosa: $\lambda = 220$ nm, azul: $\lambda = 254$ nm e marrom: $\lambda = 320$ nm). Gradiente de eluição: 5–100 % de MeOH em 30 min.

Fonte: próprio autor.

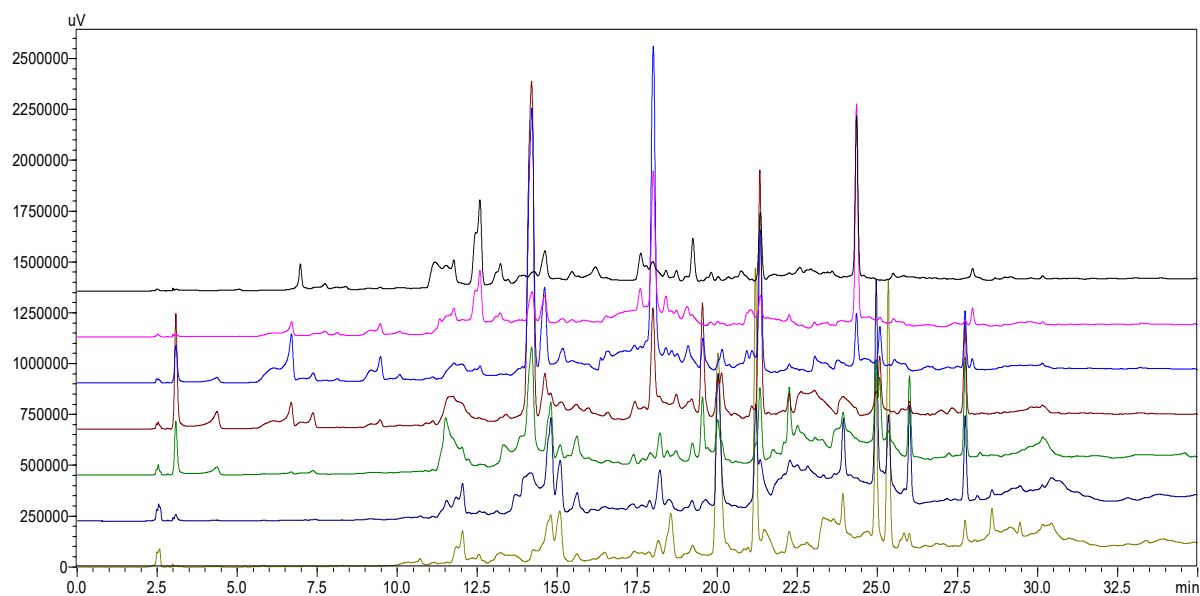


Figura 49 — Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD analítico das amostras Sx14–Sx20 ($\lambda = 220$ nm). Gradiente de eluição: 5–100 % de MeOH em 30 min.

Fonte: próprio autor.

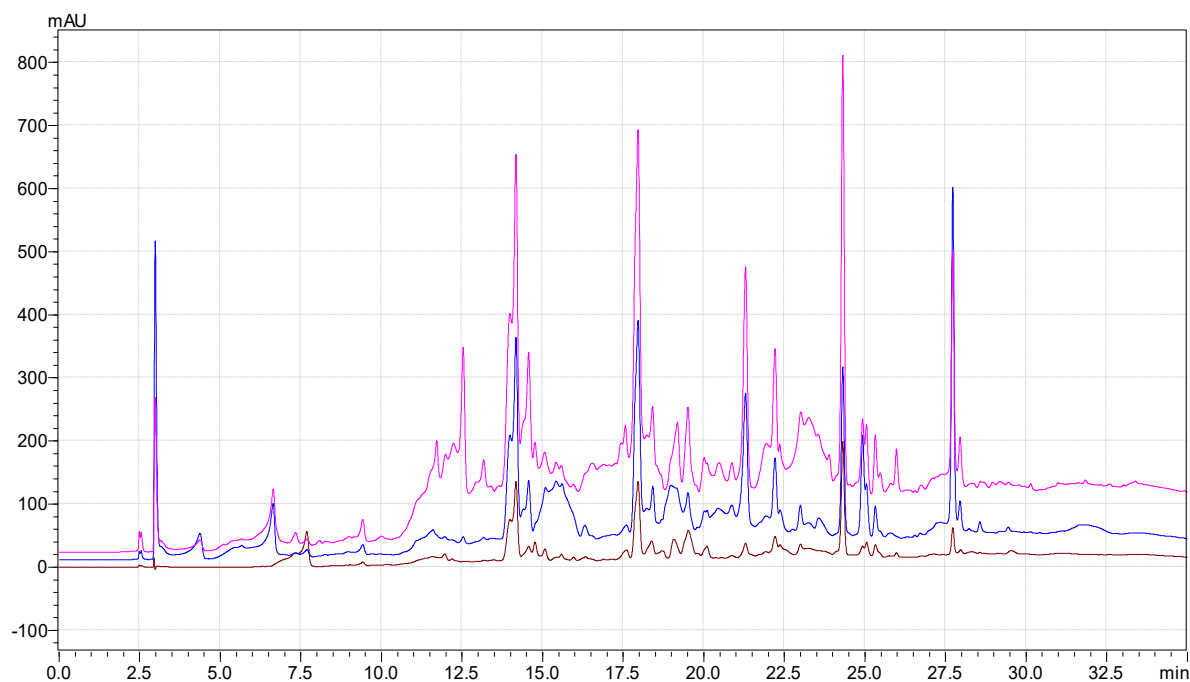


Figura 50 — Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD analítico da amostra Exp9 Fr3 (rosa: $\lambda = 220$ nm, azul: $\lambda = 254$ nm e marrom: $\lambda = 320$ nm). Gradiente de eluição: 5–100 % de MeOH em 30 min.

Fonte: próprio autor.

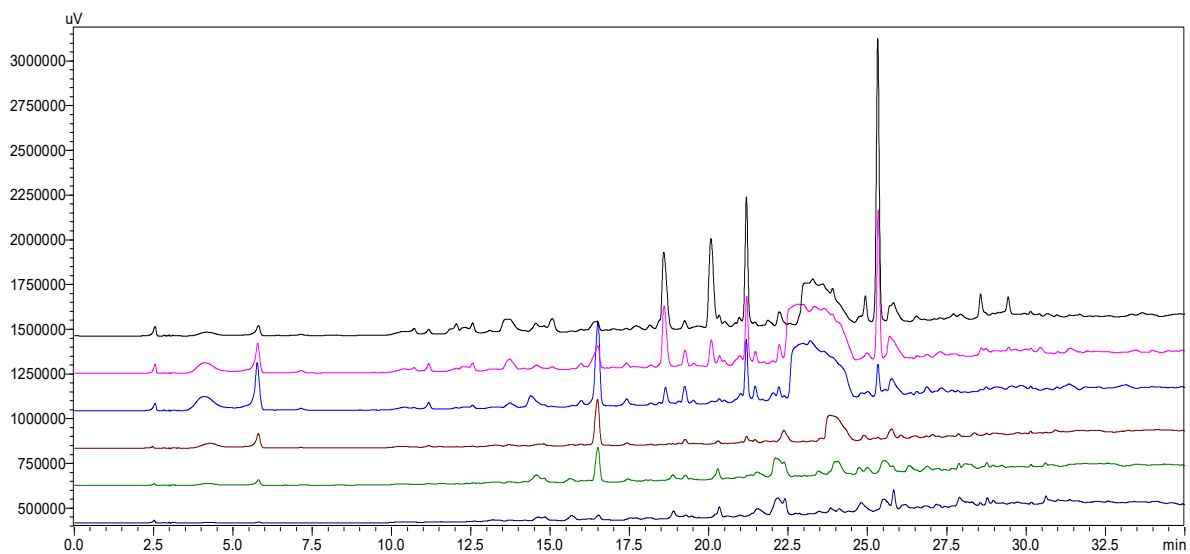


Figura 51 — Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD analítico das amostras Sx21–Sx26 ($\lambda = 220$ nm). Gradiente de eluição: 5–100 % de MeOH em 30 min.

Fonte: próprio autor.

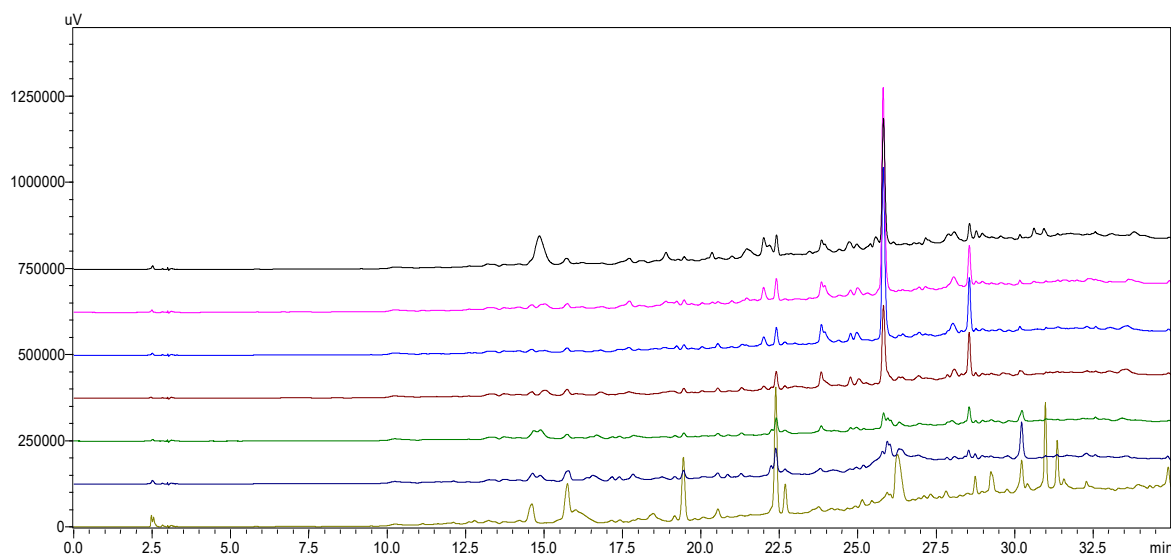


Figura 52 — Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD analítico das amostras Sx27–Sx33 ($\lambda = 220$ nm). Gradiente de eluição: 5–100 % de MeOH em 30 min.

Fonte: próprio autor.

A fração Exp9 Fr3 rendeu uma quantidade suficiente para isolamento de substâncias e foi a que apresentou uma maior variedade de picos cromatográficos, por isso foi escolhida para purificação e obtenção de substâncias isoladas. O método de eluição foi otimizado para fornecer a melhor resolução entre os picos, sendo utilizado um gradiente 5–10–35–75–100% de MeOH em 0–5–10–50–55 min.

A separação realizada por HPLC-DAD, no método semi-preparativo, permitiu a coleta de 16 subfrações associadas aos picos cromatográficos (**Figura 53**). O tempo de retenção e a massa obtida de cada subfração estão mostrados na **Tabela 22**.

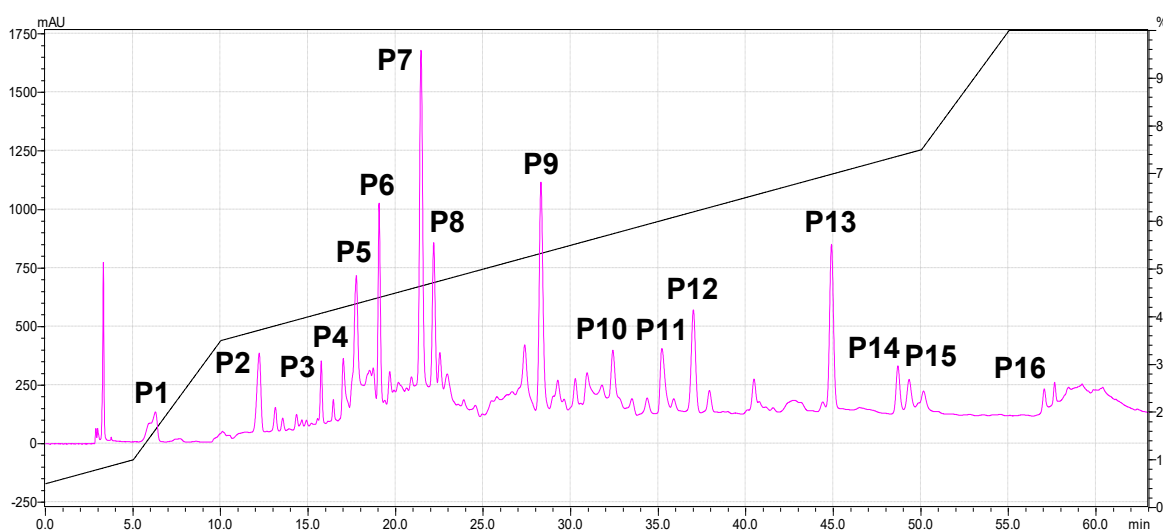


Figura 53 — Cromatograma de HPLC-DAD semipreparativo da fração Exp9 Fr3 ($\lambda = 220$ nm). Gradiente: 5–10–35–75–100 % de MeOH em 0–5–10–50–55 min. Injeção: 100 μ L.

Fonte: próprio autor.

Tabela 22 — Massas das subfrações relativas aos picos cromatográficos obtidas da fração 3 do extrato Exp9.

Picos	Tempo de retenção (min)	Massa (mg)
P1	6,28	1,1
P2	12,21	1,7
P3	15,75	1,3
P4	17,01	1,0
P5	17,76	1,5
P6	19,06	2,3
P7	21,45	2,7
P8	22,18	1,3
P9	28,30	2,0
P10	32,41	0,9
P11	35,21	1,5
P12	37,00	1,1
P13	44,89	0,7
P14	48,69	0,4
P15	49,32	0,8
P16	57,04	0,6

Fonte: próprio autor.

As análises espectrométricas e espectroscópicas visando à identificação das substâncias isoladas foram discutidas na seção 4.4 (pag. 141).

4.3.4 Testes de atividade citotóxica

No ensaio de atividade citotóxica frente às linhagens celulares HCT-116 (carcinoma de colorretal) e MCF7 (adenocarcinoma de mama), as frações **Exp9 Fr1** e **Exp9 Fr3** se destacaram, especialmente na concentração de 50 µg/mL. Para HCT-116, **Exp9 Fr3** e **Exp9 Fr1** apresentaram as maiores inibições médias, de 91,39% (SEM = 2,36) e 86,90% (SEM = 1,86), respectivamente. Em geral, as frações apresentaram uma redução acentuada da atividade em menor concentração (5 µg/mL), com destaque para **Exp9 Fr3**, que manteve 35,99% (SEM = 9,72) de inibição (**Tabela 23**).

Nos testes com a linhagem MCF7 (**Tabela 24**), a fração com melhor atividade foi a **Exp9 Fr1** com 62,34% (SD = 6,15) de inibição. Nas demais amostras os percentuais de inibição foram inferiores, indicando uma seletividade das frações para células de carcinoma de colorretal. Esses resultados indicam que as frações **Exp9 Fr1** e **Exp9 Fr3** exibem potencial atividade citotóxica principalmente contra a linhagem HCT-116.

Tabela 23 — Teste de inibição da linhagem HCT-116 (carcinoma colorretal) de algumas frações em duas concentrações (50 µg/mL e 5 µg/mL).

Amostras	50 µg/mL			5 µg/mL		
	% Inibição	SD	N	% Inibição	SD	N
Exp1 Fr1	22.13	17.08	4	22.03	12.32	4
Exp9 Fr1	86.90	1.86	4	18.51	8.09	4
Exp9 Fr2	69.30	5.51	4	26.80	8.05	4
Exp9 Fr3	91.39	2.36	4	35.99	9.72	4

Fonte: próprio autor.

Tabela 24 — Teste de inibição da linhagem MCF7 (adenocarcinoma de mama) de algumas frações em duas concentrações (50 µg/mL e 5 µg/mL).

Amostras	50 µg/mL			5 µg/mL		
	% Inibição	SD	N	% Inibição	SD	N
Exp1 Fr1	17.81	8.77	4	0	-	4
Exp9 Fr1	62.34	6.15	4	10.49	10.58	4
Exp9 Fr2	31.89	13.52	4	16.56	8.13	4
Exp9 Fr3	46.55	8.70	4	11.53	6.98	4

Fonte: próprio autor.

4.4 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Os picos isolados da fração Exp1 Fr1 foram solubilizados em CD₃OD e analisados por RMN de ¹H, enquanto os isolados da fração Exp9 Fr3 foram solubilizados em DMSO-*d*₆. Todos os isolados também foram solubilizados em MeOH e analisados por UHPLC-MS para determinação da razão massa/carga dos íons das substâncias. As amostras com boa resolução dos sinais nos espectros, e que indicavam alta pureza de substância, foram submetidas aos experimentos bidimensionais de RMN.

As substâncias isoladas da fração Exp1 Fr1 foram identificadas como dicetopiperazinas. Alguns desses peptídeos cíclicos foram anotados, pelo GNPS, nos extratos dos meios dos meios de cultivo (batata e malte), indicando que eles não são produtos do cultivo fúngico.

4.4.1 Exp1 Fr1 P5

A substância **Fr1 P5** (3,2 mg) foi identificada como ciclo(Pro-Tir), uma 2,5-dicetopiperazina, a partir da análise se seus dados espectroscópicos, espectrométricos e comparação com dados da literatura. Seu espectro de UV-Vis (**Figura 54**) apresentou uma banda de absorção em $\lambda_{\text{max}} = 274$ nm, que é esperada para uma estrutura com grupo fenólico e condizente com os espectros encontrados na literatura para essa substância (SUGIYAMA et al., 2009).

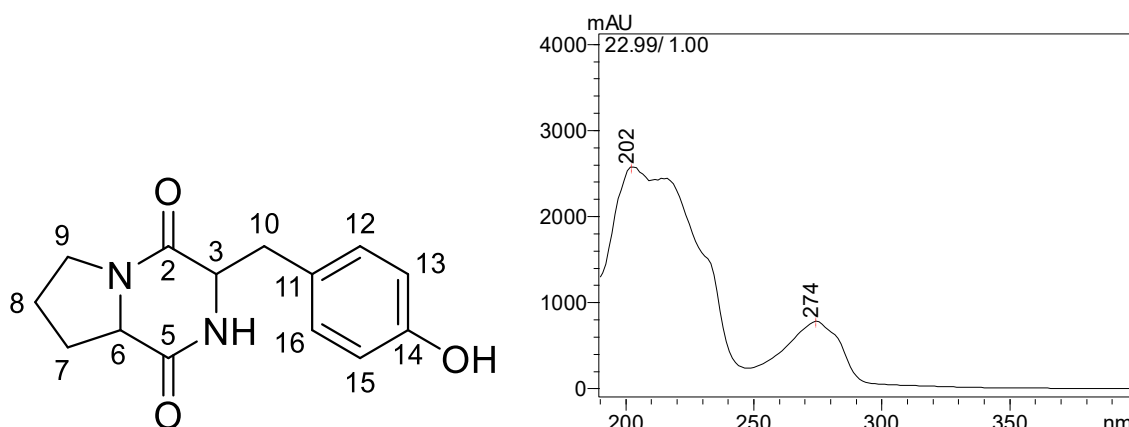


Figura 54 — Estrutura e espectro UV-Vis da substância Fr1 P5.

Fonte: próprio autor.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 55**) apresentou um singleto em δ_{H} 7,85 (4-NH, 1H), um multiplete em δ_{H} 7,04 (AA'BB'; H-12 e H-16, 2H), outro multiplete em δ_{H} 6,63 (AA'BB'; H-13 e H-15, 2H), um duplo dubleto em δ_{H} 4,24 (J_{3-10a} 5,0 Hz; J_{3-10b} 5,0 Hz; H-3, 1H), um duplo dubleto em δ_{H} 2,90 ($J_{10a-10b}$ 14,2 Hz; J_{10a-3} 5,0 Hz; H-10_a, 1H) e outro duplo dubleto em δ_{H} 2,93 ($J_{10b-10a}$ 14,2 Hz; J_{10b-3} 5,0 Hz; H-10_b, 1H); todos esses sinais são referentes aos hidrogênios do aminoácido tirosina que possui um anel aromático *para*-dissubstituído.

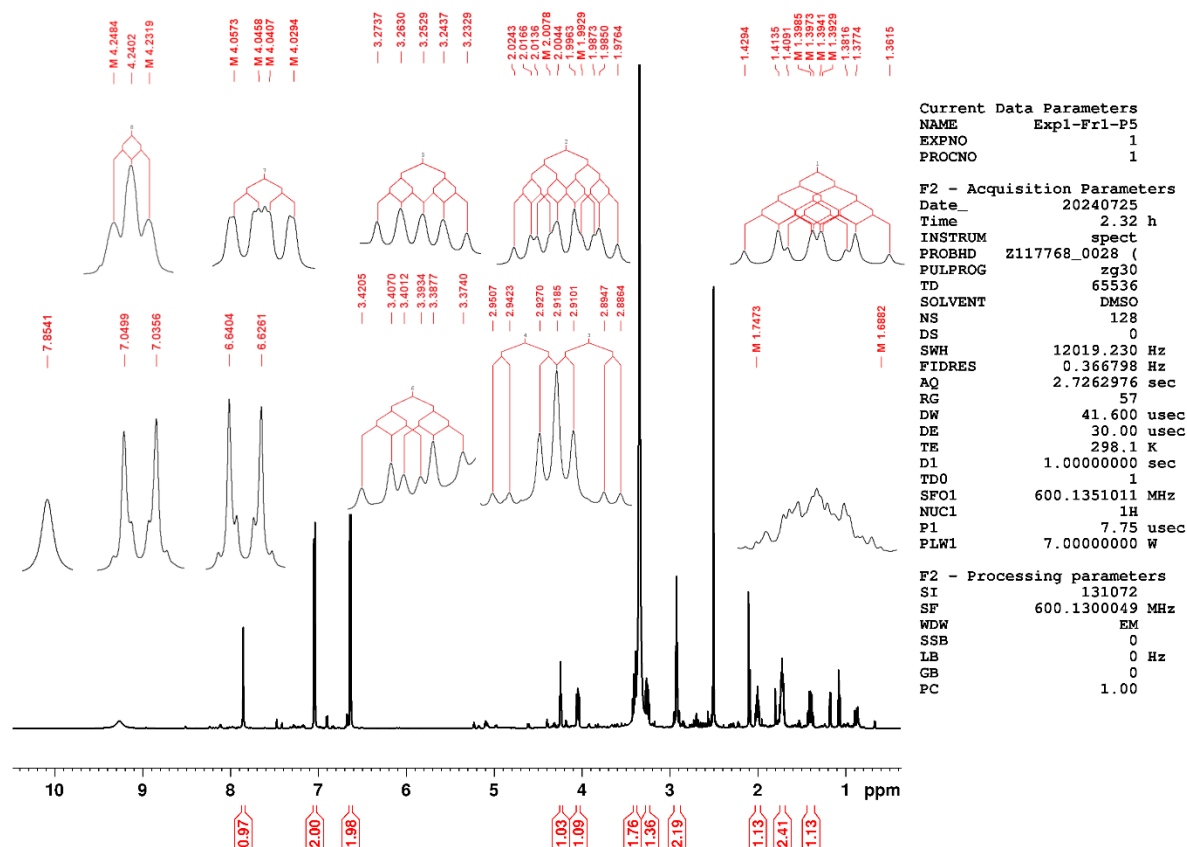


Figura 55 — Espectro de RMN de ^1H da substância Fr1 P5 (CD_3OD , 600 MHz).
Fonte: próprio autor.

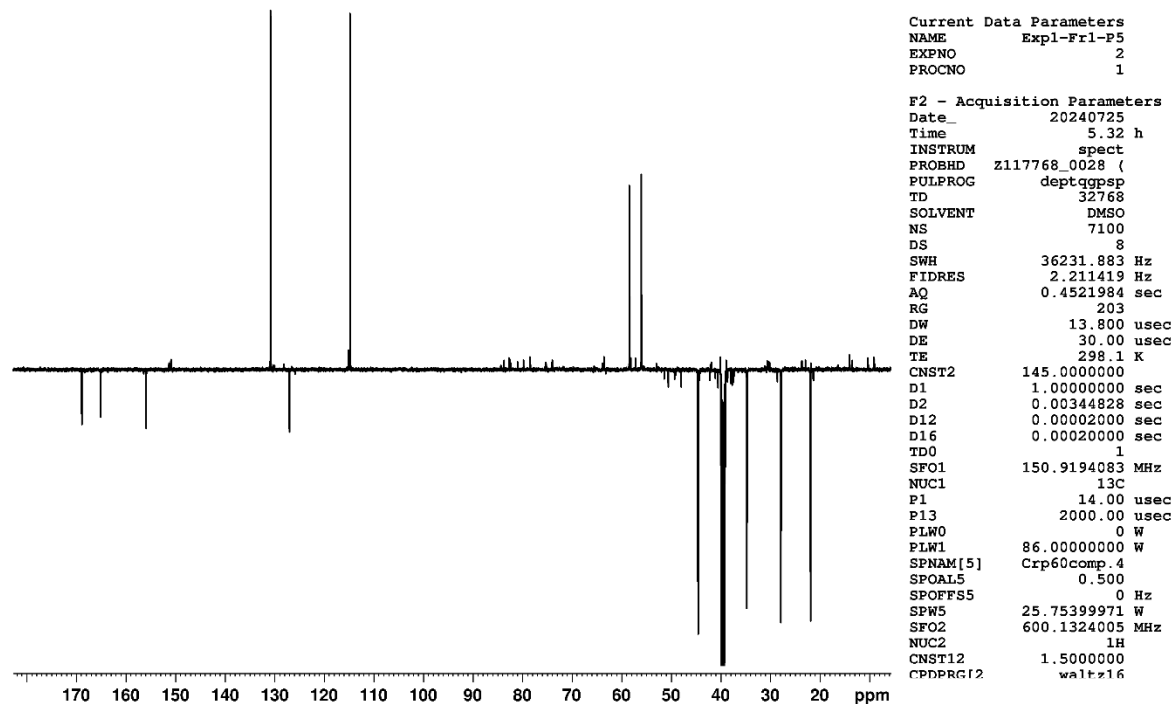


Figura 56 — Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) da substância Fr1 P5 (CD_3OD , 150 MHz).
Sinais negativos referentes aos carbonos quaternários e metilênicos.
Fonte: próprio autor.

No espectro 2D de COSY (**Figura 57**) foram observadas praticamente todas as correlações $^3J_{H-H}$ possíveis, o que permitiu a atribuição do duplo dubleto em δ_H 4,04 (J_{6-7a} 10,0 Hz; J_{6-7b} 6,8 Hz; H-6, 1H), do duplo duplo duplo dubleto em δ_H 2,00 (J_{7a-7b} 11,9 Hz; J_{7a-6} 6,8 Hz; J_{7a-8a} 5,1 Hz; J_{7a-8b} 5,1 Hz; H-7_a, 1H), do *dddd* em δ_H 1,39 (J_{7b-7a} 12,0 Hz; J_{7b-6} 9,8 Hz; J_{7b-8a} 9,4 Hz; J_{7b-8b} 9,4 Hz; H-7_b, 1H), do multipletto em δ_H 1,74–1.68 (H-8, 2H), do duplo duplo dubleto em δ_H 3,25 (J_{9a-9b} 11,9 Hz; J_{9a-8a} 6,1 Hz; J_{9a-8b} 6,1 Hz; H-9_a, 1H) e outro *ddd* em δ_H 3,39 (J_{9b-9a} 11,6 Hz; J_{9b-8a} 8,1 Hz; J_{9b-8b} 8,1 Hz; H-9_b, 1H), como sinais referentes ao aminoácido prolina.

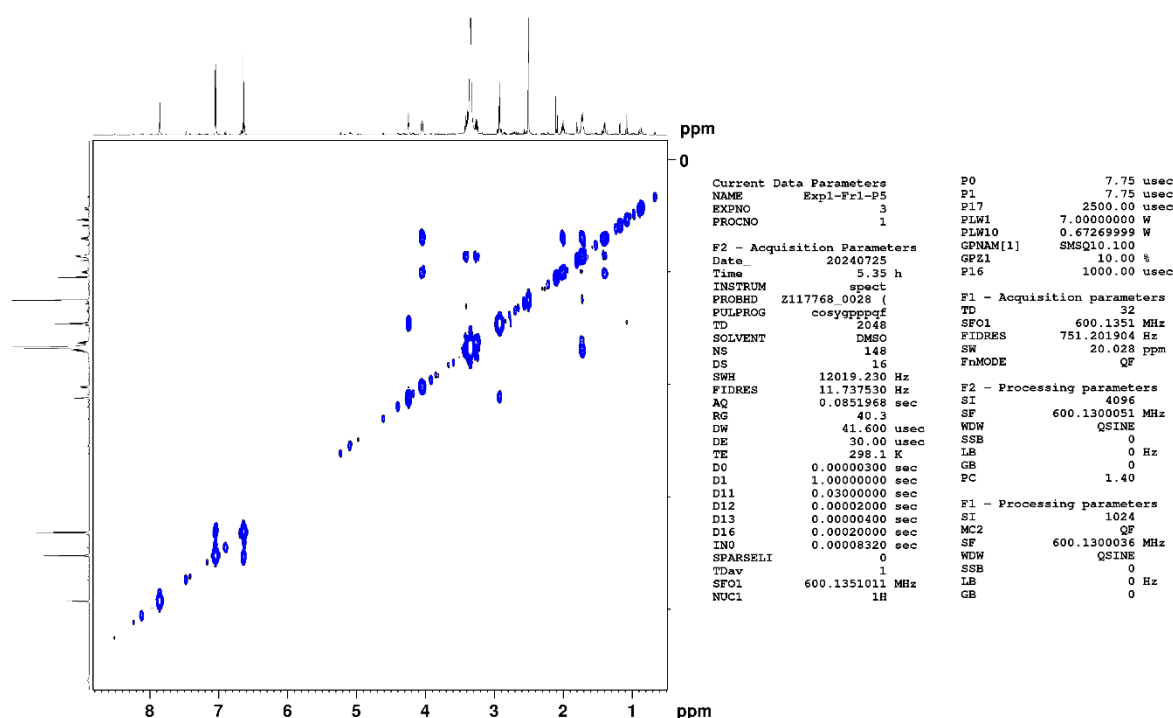


Figura 57 — Mapa de contorno de COSY da substância Fr1 P5.

Fonte: próprio autor.

No espectro HSQC (**Figura 58**) foram observadas todas as correlações $^1J_{C-H}$ e também foi possível identificar os quatro carbonos metilênicos em δ_C 44,5 (C-9), δ_C 34,7 (C-10), δ_C 27,8 (C-7) e δ_C 21,8 (C-8) (sinais negativos, em vermelho).

O espectro HMBC (**Figura 59**) mostrou as correlações $^2J_{C-H}$ e $^3J_{C-H}$ do hidrogênio 4-NH com o carbono quaternário em δ_C 165,0 (C-2) e com os carbonos α -amídicos em δ_C 56,0 e δ_C 58,4. Foi possível observar praticamente todas as correlações $^3J_{C-H}$ e $^2J_{C-H}$, permitindo atribuir corretamente os sinais para as carbonilas amídicas e confirmando a estrutura proposta.

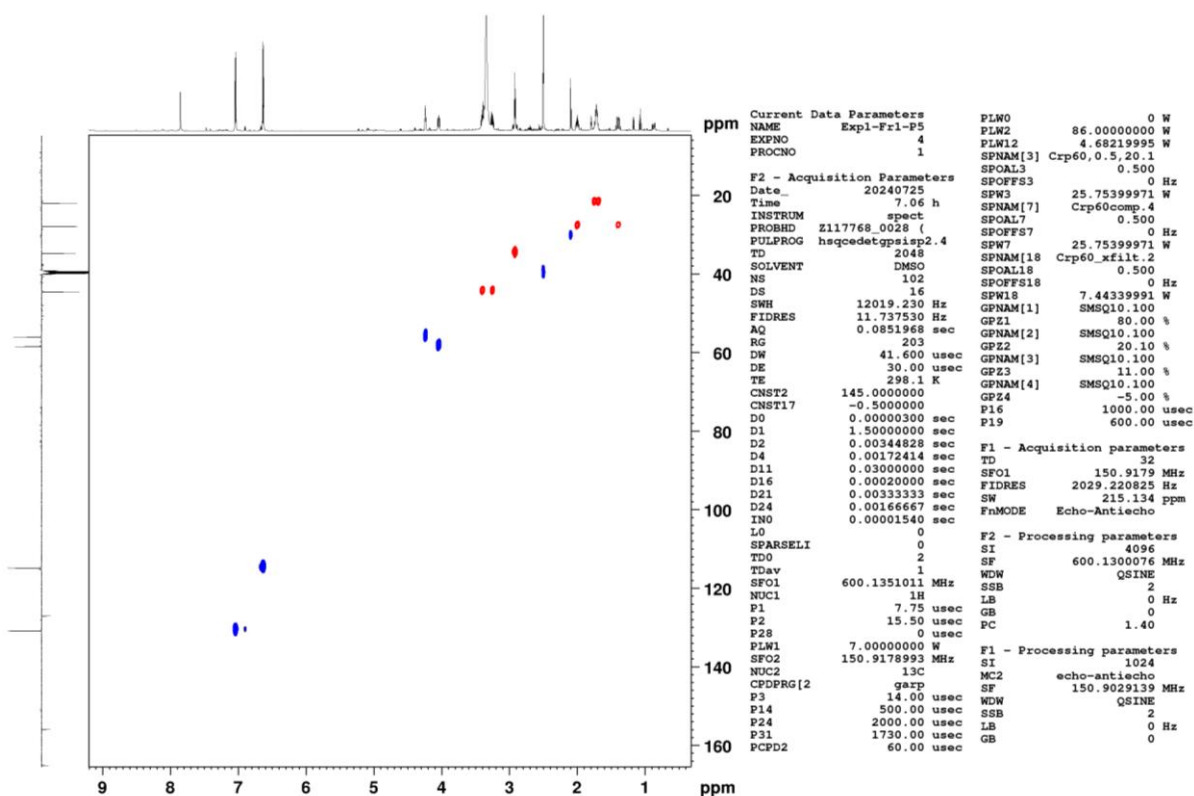


Figura 58 — Mapa de contorno de HSQC da substância Fr1 P5. Carbonos metilênicos nas correlações em vermelho.

Fonte: próprio autor.

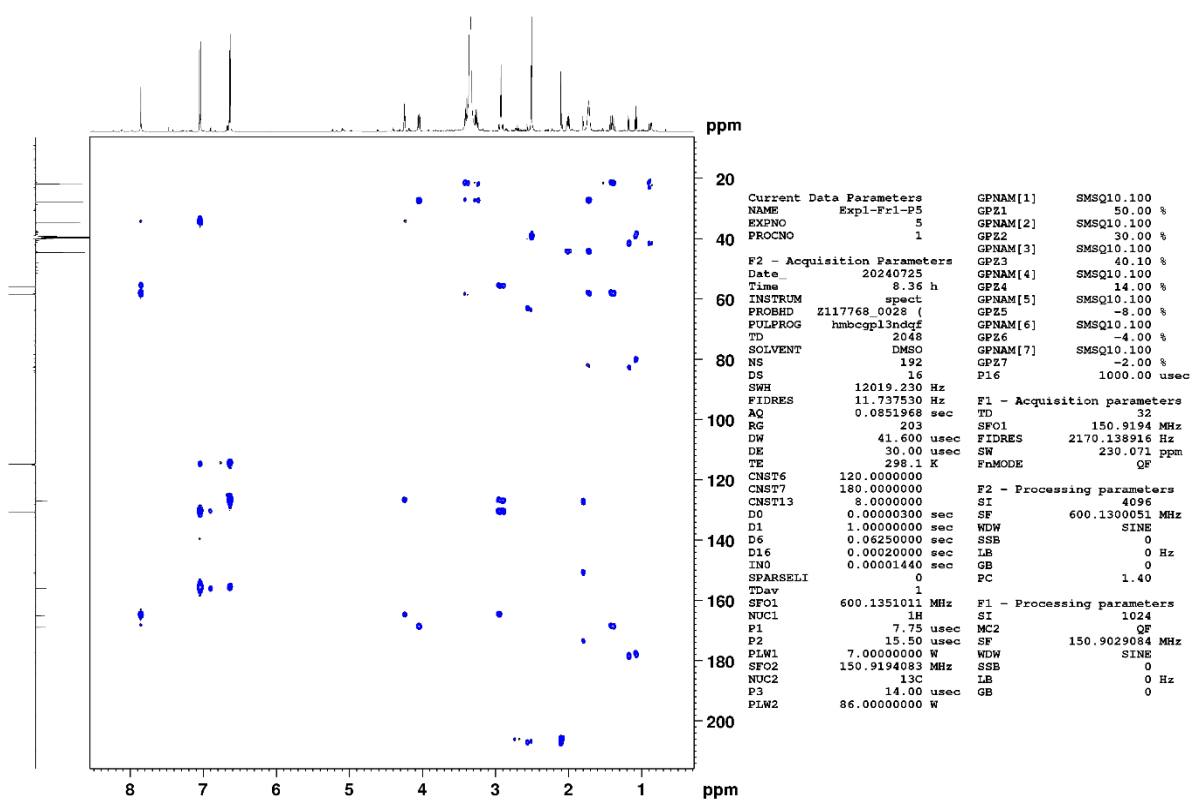


Figura 59 — Mapa de contorno de HMBC da substância Fr1 P5.

Fonte: próprio autor.

Tabela 25 — Sinais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância Fr1 P5 e correlações observadas nos experimentos 2D de RMN.

δ_{H} (ppm), multiplicidade e J (Hz)	J	COSY			δ_{C} (ppm)	HMBC		
1.39 <i>dddd</i> (12.0, 9.8, 9.4, 9.4)	1	2.00	1.72	4.04	27.8	21.8	58.4	168.8
1.74–1.68 <i>m</i>	2	1.39	3.25	3.39	21.8	27.8	44.5	58.4
2.00 <i>dddd</i> (11.9, 6.8, 5.1, 5.1)	1	1.39	4.04		27.8		44.5	
2.90 <i>dd</i> (14.2, 5.0)	1	4.24			34.7	127.0	130.8	165.0
2.93 <i>dd</i> (14.2, 5.0)	1	4.24			34.7	127.0	130.8	165.0
3.25 <i>ddd</i> (11.9, 6.1, 6.1)	1	1.72			44.5		27.8	
3.39 <i>ddd</i> (11.6, 8.1, 8.1)	1	1.72			44.5		21.8	
4.04 <i>dd</i> (10.0, 6.8)	1	1.39	2.00		58.4	27.8	168.8	
4.24 <i>dd</i> (5.0, 5.0)	1	2.91			56.0	127.0	165.0	
6.63 <i>m</i> (AA'BB')	2	7.04			114.7	114.7	127.0	155.9
7.04 <i>m</i> (AA'BB')	2	6.63			130.8	34.7	114.7	130.8
							155.9	
7.85 <i>s</i>	1	-			-	56.0	58.4	165.0

Fonte: próprio autor.

Tabela 26 — Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr1 P5 (600 e 150 MHz, CD_3OD) e para ciclo(L-Pro-L-Tir).

Posição	Fr1 P5		Ciclo(L-Pro-L-Tir)*	
	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)
2	165,0	-	166,9	-
3	56,3	4,24 (<i>dd</i> ; 5,0; 5,0)	57,9	4,36 (<i>m</i>)
4	-	7,85 (<i>s</i> ; NH)	-	-
5	168,8	-	168,8	-
6	58,4	4,04 (<i>dd</i> ; 10,0 e 6,8)	60,0	4,04 (<i>m</i>)
7	27,8	2,00 (<i>dddd</i> ; 11,9; 6,8; 5,1; 5,1) 1,39 (<i>dddd</i> ; 12,0; 9,8; 9,4; 9,4)	29,4	2,09 (<i>m</i>) 1,21 (<i>m</i>)
8	21,8	1,74–1,68 (<i>m</i>)	22,7	1,80 (<i>m</i>)
9	44,5	3,39 (<i>ddd</i> ; 11,6; 8,1; 8,1) 3,25 (<i>ddd</i> ; 11,9; 6,1; 6,1)	45,9	3,54 (<i>m</i>) 3,35 (<i>m</i>)
10	34,7	2,90 (<i>dd</i> ; 14,2; 5,0) 2,93 (<i>dd</i> ; 14,2; 5,0)	37,6	3,08 (<i>dd</i> ; 4,6; 9,8) 3,02 (<i>dd</i> ; 4,6; 9,8)
11	127,0	-	127,6	-
12 e 16	130,8	7,04 <i>m</i> (AA'BB')	132,1	7,04 (<i>d</i> ; 8,0)
13 e 15	114,7	6,63 <i>m</i> (AA'BB')	116,2	6,70 (<i>d</i> ; 8,0)
14	155,9	-	157,7	-

*500 e 125 MHz, CD_3OD .

Fonte: adaptado de Sugiyama et al., 2009.

Os cromatogramas de pico base, obtido por UHPLC-MS/MS (**Figura 60**), apresentaram um pico majoritário no tempo de retenção de 3,09 minutos com m/z 259,1083 $[M-H]^-$ e 261,1242 $[M+H]^+$. Esse valor obtido tem um erro de 3,4 ppm em relação a massa teórica da Ciclo(Pro-Tir) protonada (261,1233).

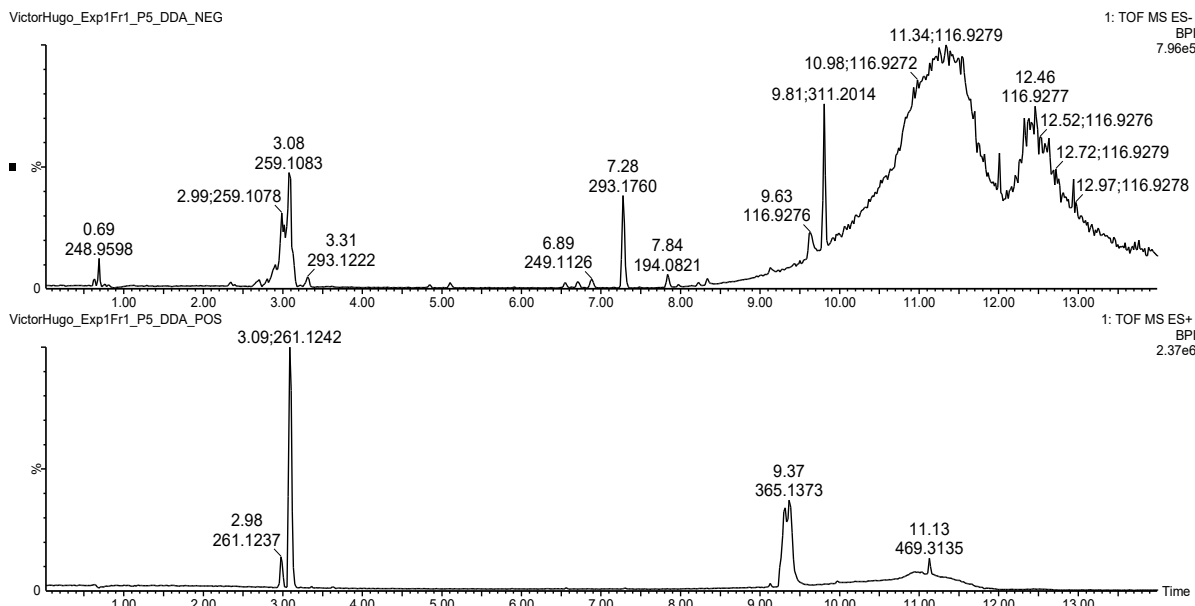


Figura 60 — Cromatograma de pico base de UHPLC-MS da amostra Fr1 P5. Modo de ionização negativa na parte superior e modo positivo na inferior. Eluição com acetonitrila e H_2O como fase móvel. Gradiente de 5-100% de Acetonitrila em 10 minutos.

Fonte: próprio autor.

4.4.2 Exp1 Fr1 P9

A substância **Fr1 P9** (1,6 mg) (**Figura 61**) foi identificada como ciclo(Phe-Pro), uma dicetopiperazina que difere da ciclo(Pro-Tir) (Fr1 P5) somente pela ausência da hidroxila fenólica.

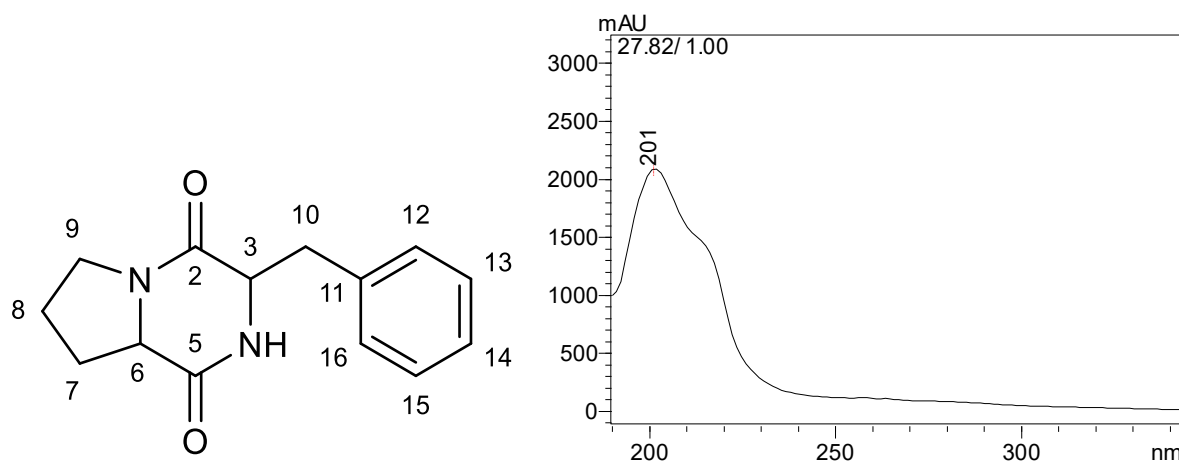


Figura 61 — Estrutura e espectro UV-Vis da substância Fr1 P9.
Fonte: próprio autor.

Os dados de RMN de ^1H (Figura 62) e de ^{13}C (Figura 63) para Fr1 P9 foram quase idênticos aos da substância ciclo(Pro-Tir) (Fr1 P5), com exceção da presença de hidrogênio aromático em δ_{H} 7,22–7,24 (AA'BB'C; H-14, 1H), do leve aumento no deslocamento químico dos outros hidrogênios aromáticos e da ausência do sinal do hidrogênio amídico.

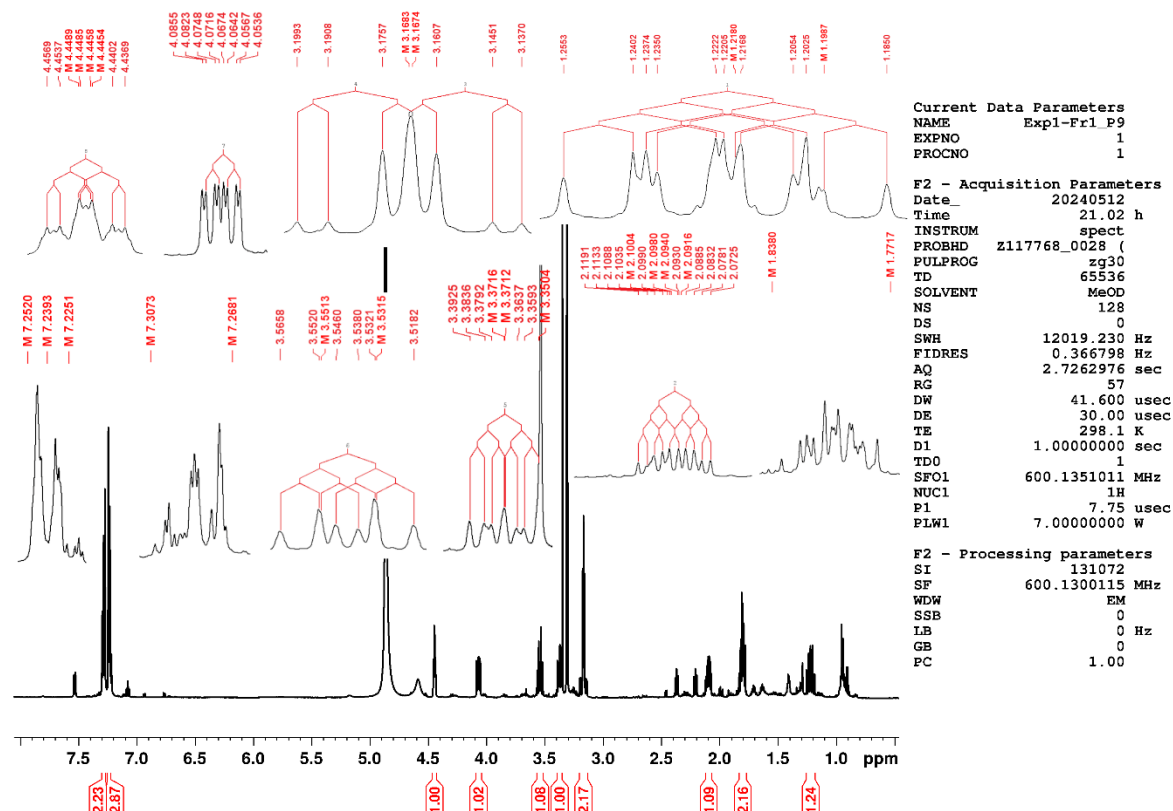


Figura 62 — Espectro de RMN de ^1H da substância Fr1 P9 (CD_3OD , 600 MHz).
Fonte: próprio autor.

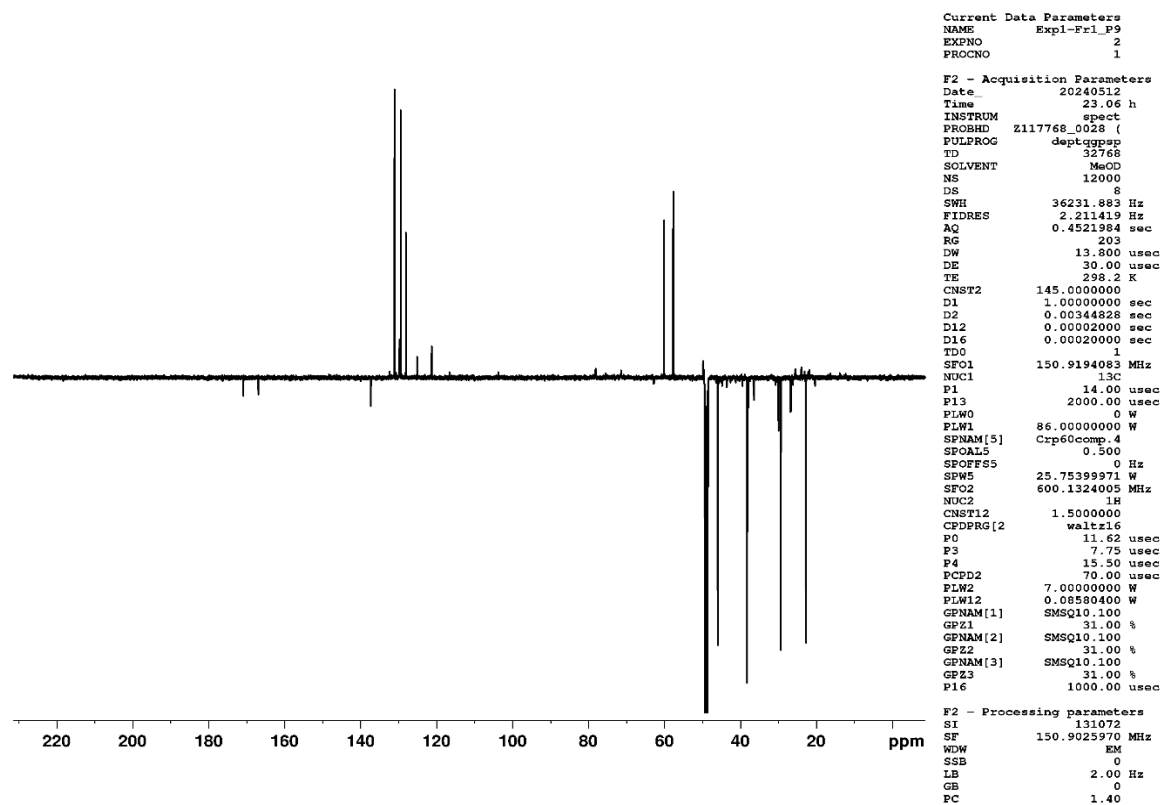


Figura 63 — Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) da substância Fr1 P9 (CD_3OD , 150 MHz). Sinais negativos referentes aos carbonos quaternários e metilênicos.
Fonte: próprio autor.

Foram observadas correlações $J_{\text{H-H}}$ e $J_{\text{C-H}}$ nos espectros 2D de COSY (**Figura 64**), HSQC (**Figura 65**) e HMBC (**Figura 66**), que permitiram confirmar os sinais referentes aos aminoácidos prolina e fenilalanina.

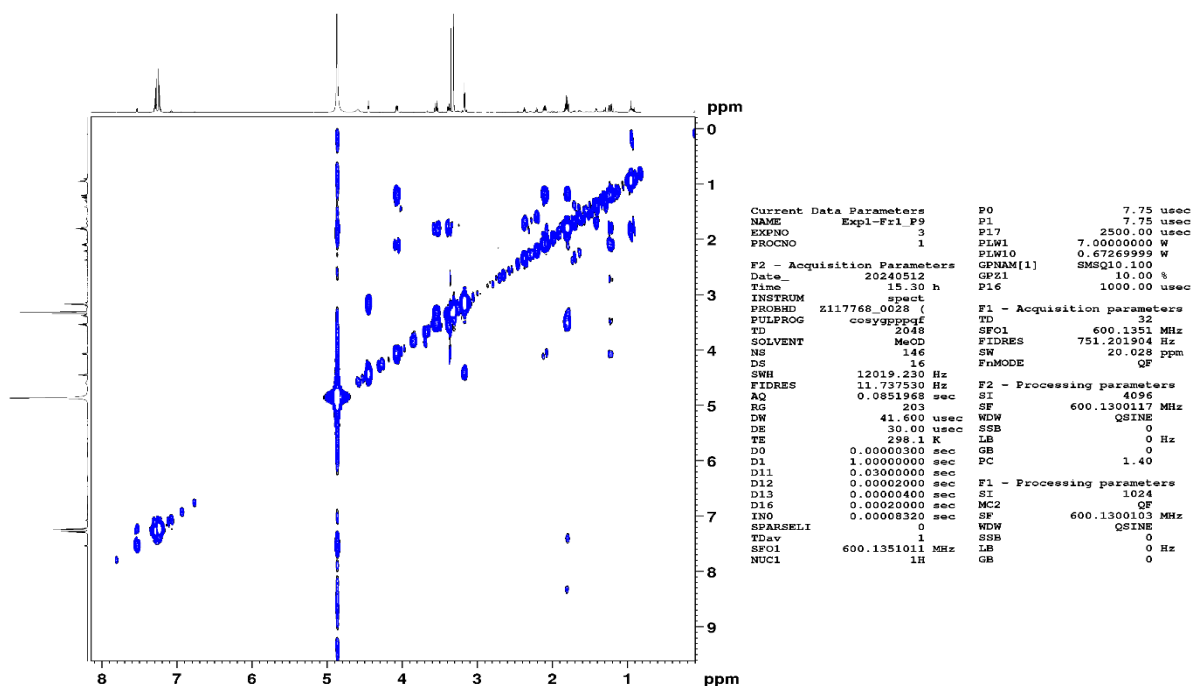


Figura 64 — Mapa de contorno de COSY da substância Fr1 P9.
Fonte: próprio autor.

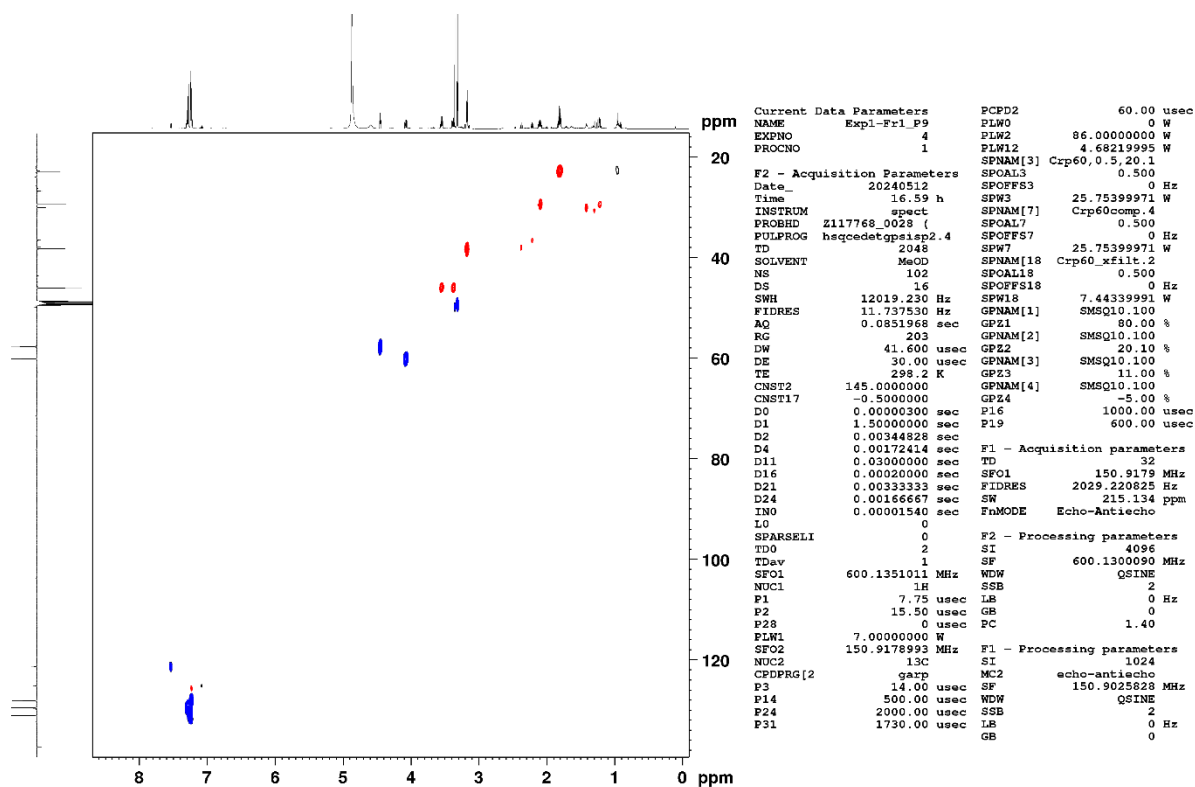


Figura 65 — Mapa de contorno de HSQC da substância Fr1 P9. Carbonos metilênicos nas correlações em vermelho.
Fonte: próprio autor.

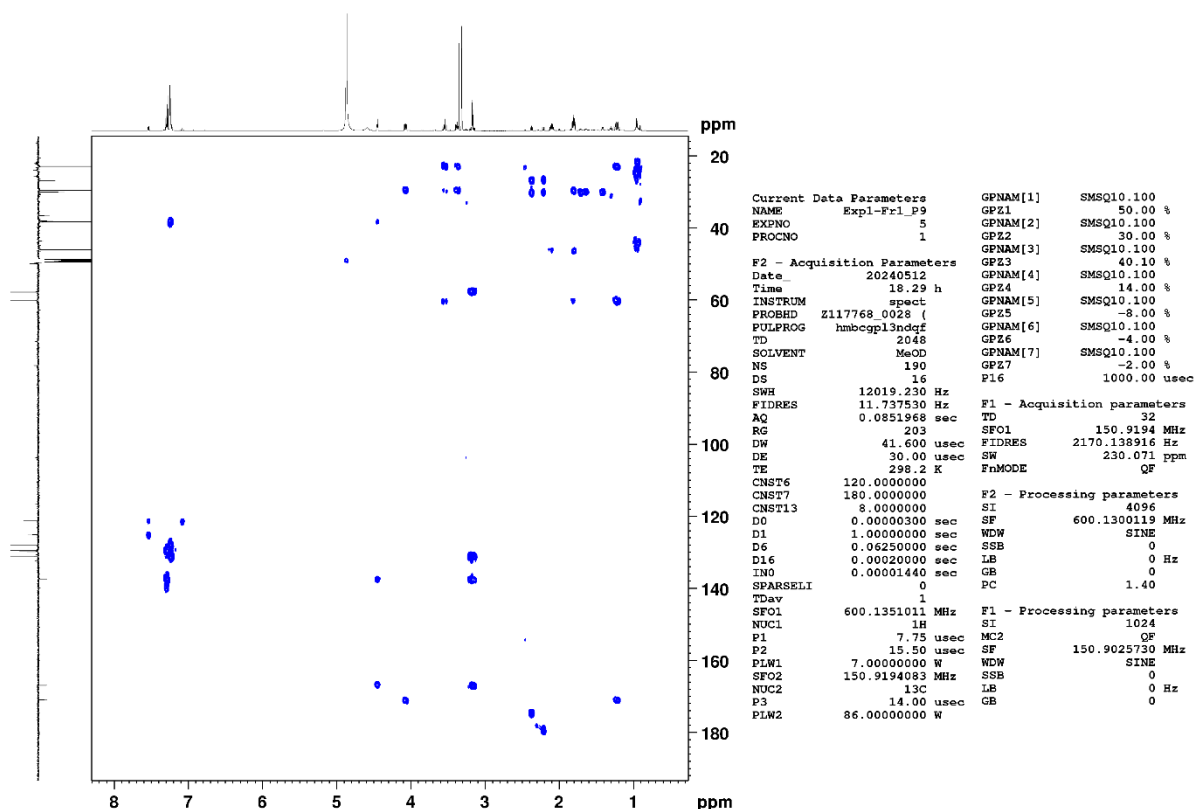


Figura 66 — Mapa de contorno de HMBC da substância Fr1 P9.

Fonte: próprio autor.

Tabela 27 — Sinais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância Fr1 P9 e correlações observadas nos experimentos 2D de RMN.

δ_{H} (ppm), multiplicidade e J (Hz)	J	COSY	δ_{C} (ppm)	HMBC
1.22 <i>dddd</i> (12.0, 10.8, 10.8, 8.6)	1	2.09 4.07	29.3	22.7 60.0 170.9
1.77–1.83 <i>m</i>	2	1.22 3.54	22.7	29.3 45.9 60.0
2.09 <i>dddd</i> (12.2, 6.1, 6.1, 3.3)	1	1.22 4.07	29.3	45.9
3.15 <i>dd</i> (14.0, 4.7)	1	4.45	38.2	57.6 131.0 137.3 166.9
3.18 <i>dd</i> (14.1, 5.0)	1	4.45	38.2	57.6 131.0 137.3 166.9
3.37 <i>ddd</i> (12.2, 7.7, 5.0)	1	1.80	45.9	22.7 29.3
3.54 <i>ddd</i> (11.9, 8.5, 8.1)	1	1.80	45.9	22.7 29.3
4.07 <i>dd</i> (10.8, 6.4)	1	1.22 2.09	60.0	29.3 170.9
4.44 <i>ddd</i> (4.8, 5.2, 1.9)	1	3.16	57.6	38.2 137.3 166.9
7.22–7.24 (AA'BB'C)	1	-	128.1	131.0
7.24–7.25 (AA'BB'C)	2	-	131.0	38.2 128.1
7.26–7.30 (AA'BB'C)	2	-	129.4	129.4 137.3

Fonte: próprio autor.

Tabela 28 — Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr1 P9 (600 e 150 MHz, CD_3OD) e para ciclo(Phe-Pro).

Posição	Fr1 P9		Ciclo(Phe-Pro)*	
	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)
2	166,9	-	170,9	-
3	57,6	4,44 (<i>ddd</i> ; 5,2; 4,8; 1,9)	57,6	4,41 (<i>t</i> ; 5,5)
4	-	-	-	-
5	170,9	-	166,8	-
6	60,0	4,07 (<i>dd</i> ; 10,8 e 6,4)	60,0	4,00–4,08 (<i>m</i>)
7	29,3	2,09 (<i>dddd</i> ; 12,2; 6,1; 6,1; 3,3)	29,3	2,04–2,11 (<i>m</i>)
		1,22 (<i>dddd</i> ; 12,0; 10,8; 10,8; 8,6)		1,18–1,27 (<i>m</i>)
8	22,7	1,77–1,83 (<i>m</i>)	22,7	1,72–1,80 (<i>m</i>)
9	45,9	3,37 (<i>ddd</i> ; 12,2; 7,7; 5,0)	45,9	3,48–3,54 (<i>m</i>)
		3,54 (<i>ddd</i> ; 11,9; 8,5; 8,1)		3,31–3,37 (<i>m</i>)
10	38,2	3,15 (<i>dd</i> ; 14,0; 4,7)	38,0	3,15 (<i>d</i> ; 5,5)
		3,18 (<i>dd</i> ; 14,1; 5,0)		
11	137,3	-	129,4	-
12 e 16	131,0	7,24–7,25 <i>m</i> (AA'BB'C)	130,9	7,19–7,29 <i>m</i>
13 e 15	129,4	7,26–7,30 <i>m</i> (AA'BB'C)	128,0	7,19–7,29 <i>m</i>
14	128,1	7,22–7,24 <i>m</i> (AA'BB'C)	137,4	7,19–7,29 <i>m</i>

*500 e 125 MHz, CD_3OD .

Fonte: adaptado de GAIDUKEVICH et al., 2018.

O cromatograma de pico base do modo positivo (**Figura 67**) apresentou um pico majoritário no tempo de retenção de 4,24 minutos em m/z 245,1289 $[\text{M}+\text{H}]^+$, um erro de 1,4 ppm em relação a massa teórica da ciclo(Phe-Pro) protonada (245,1285).

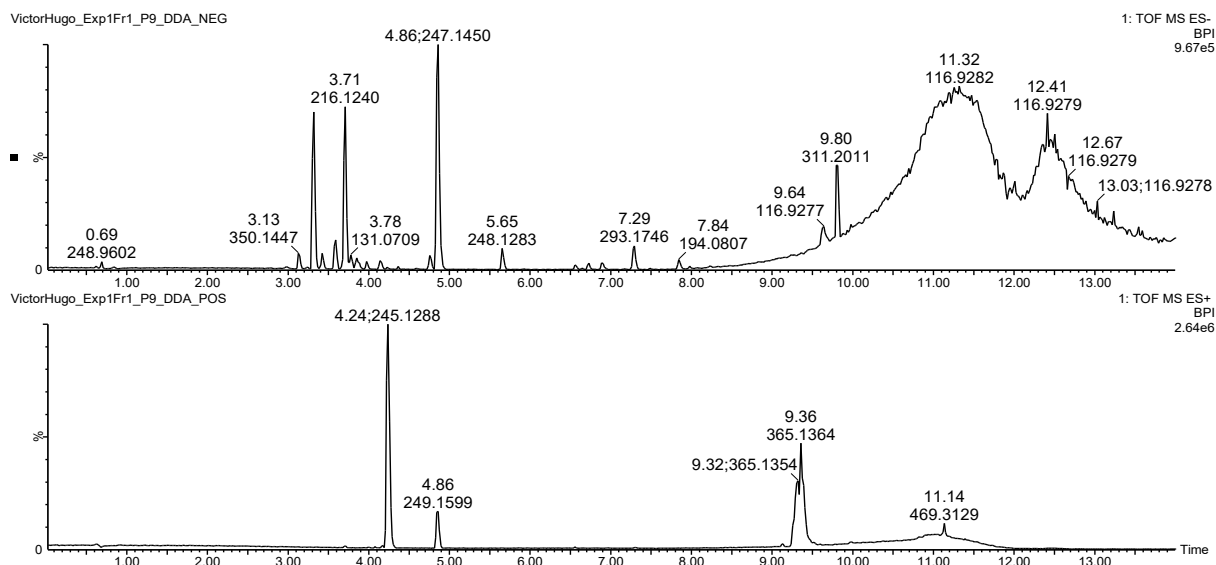


Figura 67 — Cromatograma de pico base de UHPLC-MS da amostra Fr1 P9. Modo de ionização negativa na parte superior e modo positivo na inferior. Eluição com acetonitrila e H₂O como fase móvel. Gradiente de 5-100% de Acetonitrila em 10 minutos.

Fonte: próprio autor.

4.4.3 Exp1 Fr1 P6

A substância **Fr1 P6** (2,3 mg) foi identificada como ciclo(Pro-Val), um peptídeo cíclico constituído pelo aminoácido prolina e valina. Sua estrutura e espectro de UV-Vis estão disponíveis na **Figura 69**.

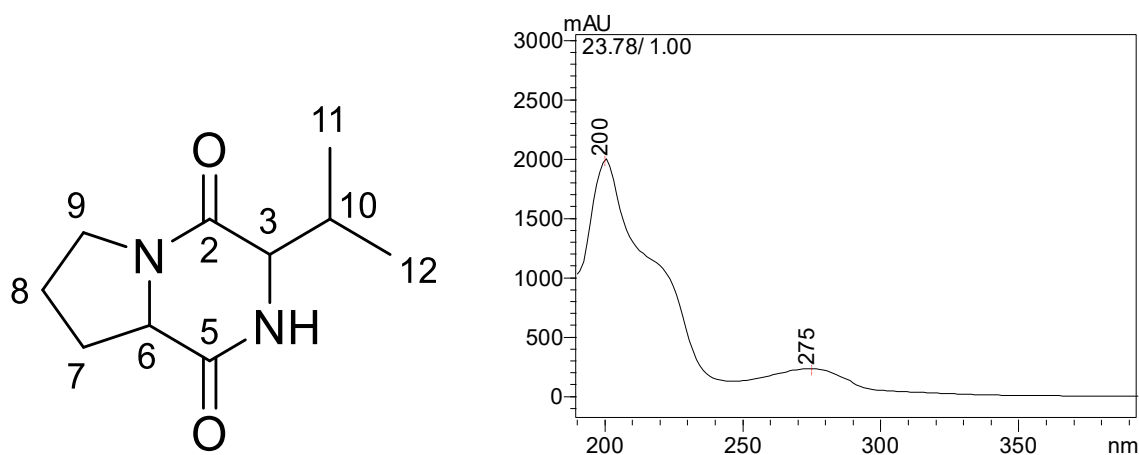


Figura 68 — Estrutura e espectro UV-Vis da substância Fr1 P6.

Fonte: próprio autor.

Os hidrogênios metílicos e metínicos, referentes à valina, foram identificados pelo dubleto em δ_H 0,93 (J_{11-10} 6,9 Hz; H-11, 3H), o dubleto em δ_H 1,09 (J_{12-10} 7,2 Hz; H-12, 3H), o *qqd* em δ_H 2,49 (J_{10-11} 7,0 Hz; J_{10-12} 7,0 Hz; J_{10-3} 2,5 Hz; H-10, 1H) e o *dd*

em δ_H 4,03 (J_{3-10} 2,4 Hz; J_{3-NH} 2,0 Hz; H-3, 1H) (Figura 70). Os carbonos amídicos e outros sinais referentes aos aminoácidos prolina e valina foram confirmados com os experimentos 2D (Figura 71–73).

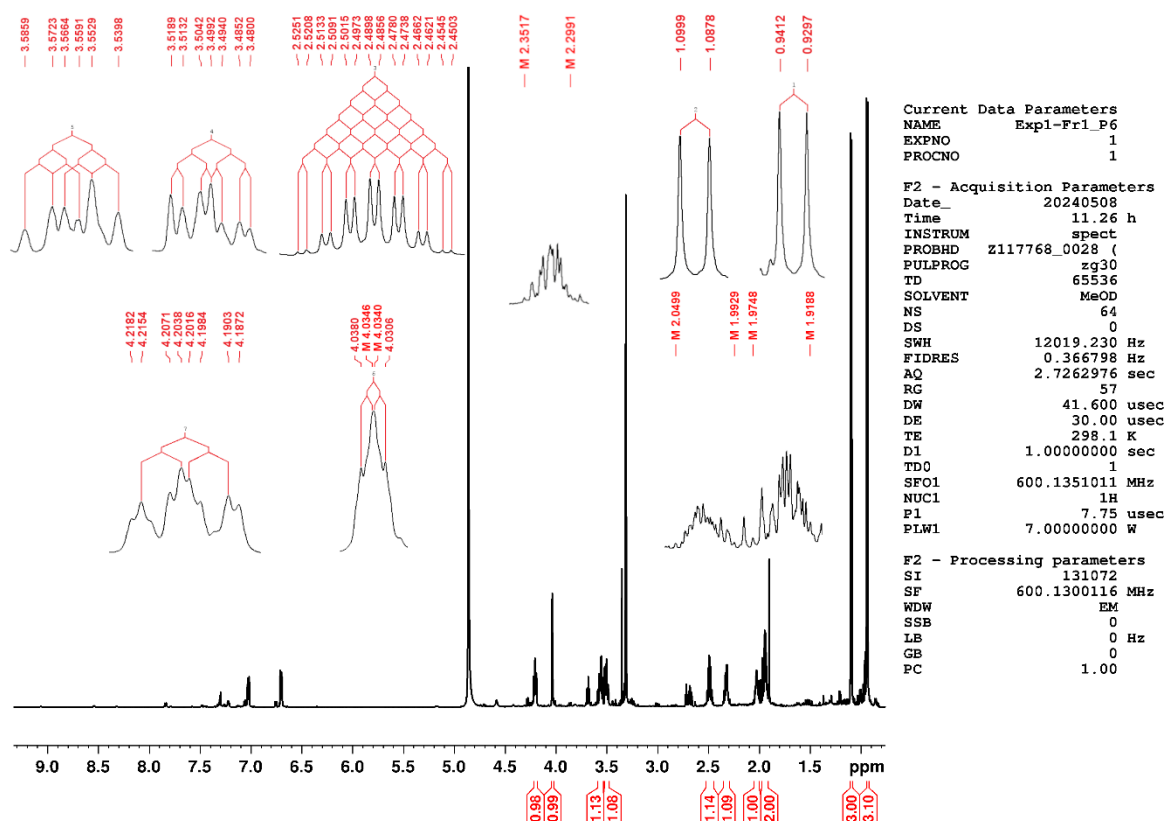


Figura 69 — Espectro de RMN de 1H da substância Fr1 P6 (CD_3OD , 600 MHz).
Fonte: próprio autor.

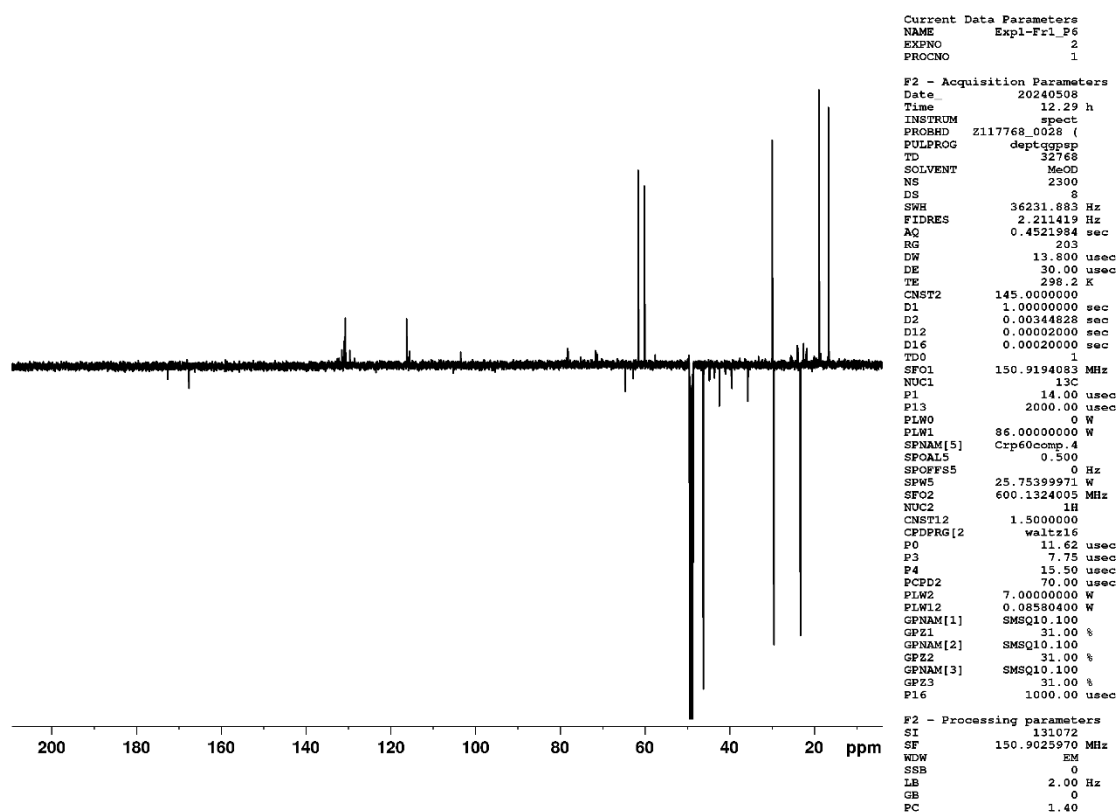


Figura 70 — Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) da substância Fr1 P6 (CD_3OD , 150 MHz). Sinais negativos referentes aos carbonos quaternários e metilênicos.
Fonte: próprio autor.

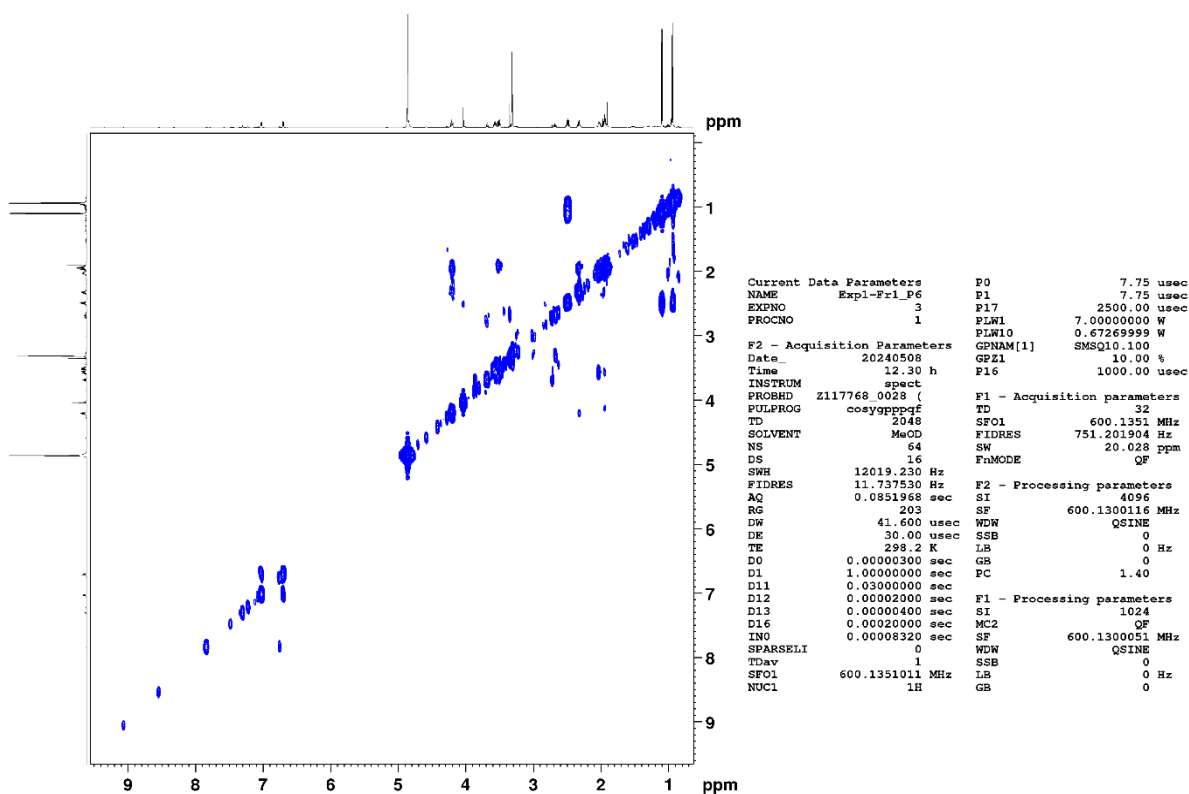


Figura 71 — Mapa de contorno de COSY da substância Fr1 P6.
Fonte: próprio autor.

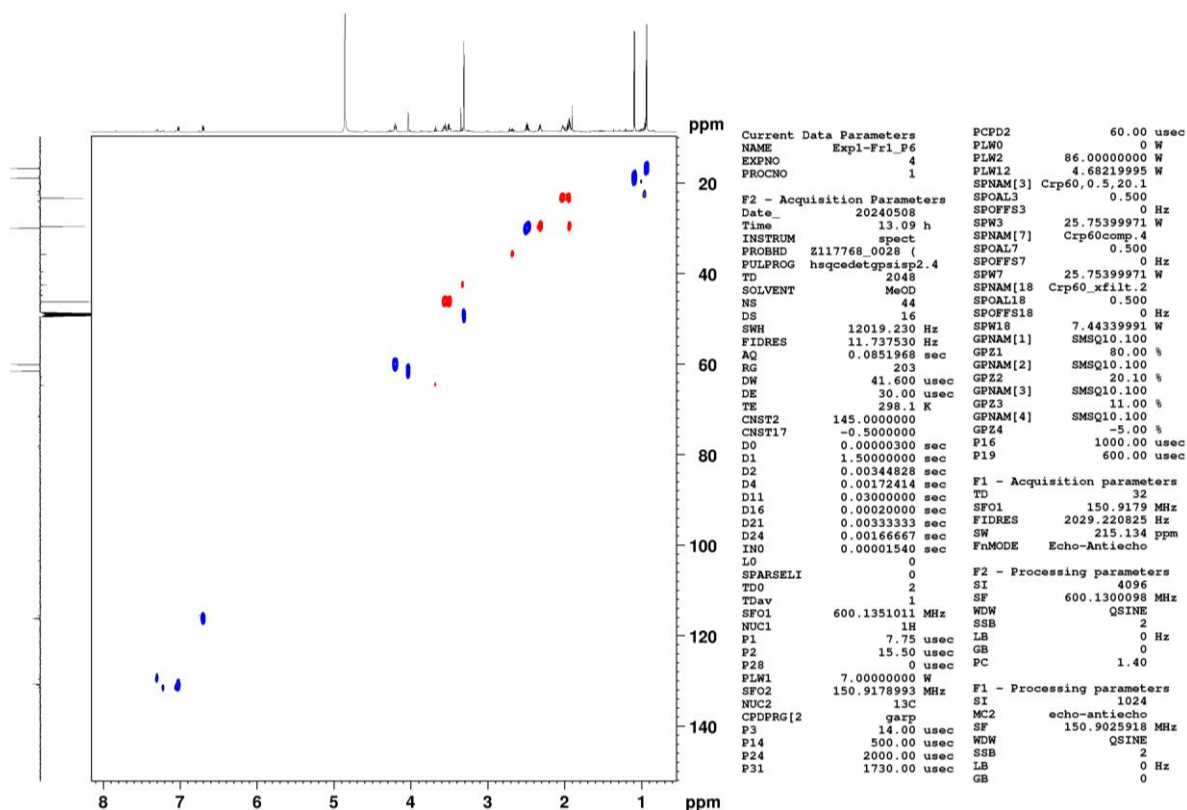


Figura 72 — Mapa de contorno de HSQC da substância Fr1 P6. Carbonos metilênicos nas correlações em vermelho.

Fonte: próprio autor.

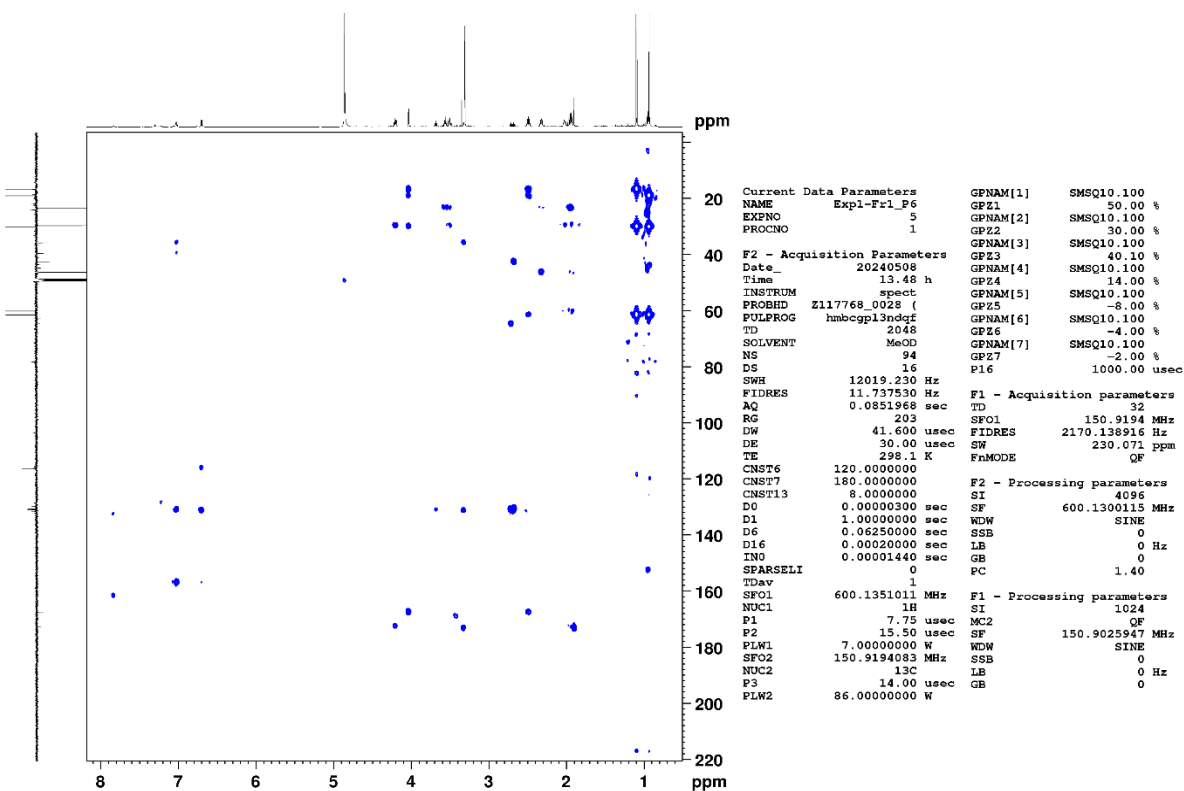


Figura 73 — Mapa de contorno de HMBC da substância Fr1 P6.

Fonte: próprio autor.

Tabela 29 — Sinais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância Fr1 P6 e correlações observadas nos experimentos 2D de RMN.

δ_{H} (ppm), multiplicidade e J (Hz)	J	COSY	δ_{C} (ppm)	HMBC
0.93 <i>d</i> (6.9)	3	2.48	16.6	18.8 29.8 61.5
1.09 <i>d</i> (7.2)	3	2.48	18.8	16.6 29.8 61.5
1.91–1.97 <i>m</i>	1	4.20	29.5	172.6
1.91–1.97 <i>m</i>	1	3.55 2.32	23.2	29.5
1.99–2.04 <i>m</i>	1	3.55	23.2	29.5
2.29–2.35 <i>m</i>	1	1.94 4.20	29.5	46.1
2.49 <i>qqd</i> (7.0, 7.0, 2.5)	1	0.93 1.09 4.03	29.8	16.6 18.8 61.5 167.5
3.50 <i>ddd</i> (11.5, 8.5, 3.1)	1	1.94	46.1	23.2 29.5
3.55 <i>ddd</i> (11.6, 8.0, 8.0)	1	2.03 1.94	46.1	23.2
4.03 <i>dd</i> (2.4, 2.0)	1	2.48	61.5	16.6 18.8 29.8 167.5
4.20 <i>dd</i> (8.2, 6.9)	1	1.93	60.0	29.5 172.6

Fonte: próprio autor.

Tabela 30 — Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr1 P6 (600 e 150 MHz, CD_3OD) e para ciclo(Pro-Val).

Posição	Fr1 P6		Ciclo(Pro-Val)*	
	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)
2	167,5	-	170,1	-
3	61,5	4,03 (<i>dd</i> ; 2,4; 2,0)	60,4	3,96 (<i>sl</i>)
4	-	-	-	5,99 (<i>sl</i>)
5	172,6	-	165,0	-
6	60,0	4,20 (<i>dd</i> ; 8,2; 6,9)	58,9	4,07 (<i>t</i>)
7	29,5	1,91–1,97 (<i>m</i>) 2,29–2,35 (<i>m</i>)	28,3	2,11–2,02 (<i>m</i>) 2,31–2,22 (<i>m</i>)
8	23,2	1,91–1,97 (<i>m</i>) 1,99–2,04 (<i>m</i>)	22,7	1,90–1,81 (<i>m</i>) 2,01–1,90 (<i>m</i>)
9	46,1	3,50 (<i>ddd</i> ; 11,5; 8,5; 3,1) 3,55 (<i>ddd</i> ; 11,6; 8,0; 8,0)	45,4	3,61–3,48 (<i>m</i>)
10	29,8	2,49 (<i>qqd</i> ; 7,0; 7,0; 2,5)	35,3	2,42–2,31 (<i>m</i>)
11	16,6	0,93 (<i>d</i> ; 6,9)	12,0	0,92 (<i>t</i>)
12	18,8	1,09 (<i>d</i> ; 7,2)	15,7	1,05 (<i>d</i>)

*300 e 75 MHz, CDCl_3 .

Fonte: adaptado de FDHILA et al., 2001.

O cromatograma de pico base do modo positivo (**Figura 74**) apresentou um pico majoritário em $t_R = 3,21$ min e m/z 197,1292 $[M+H]^+$. O valor é próximo da massa teórica da ciclo(Pro-Val) protonada (197,1285), com erro de 3,8 ppm.

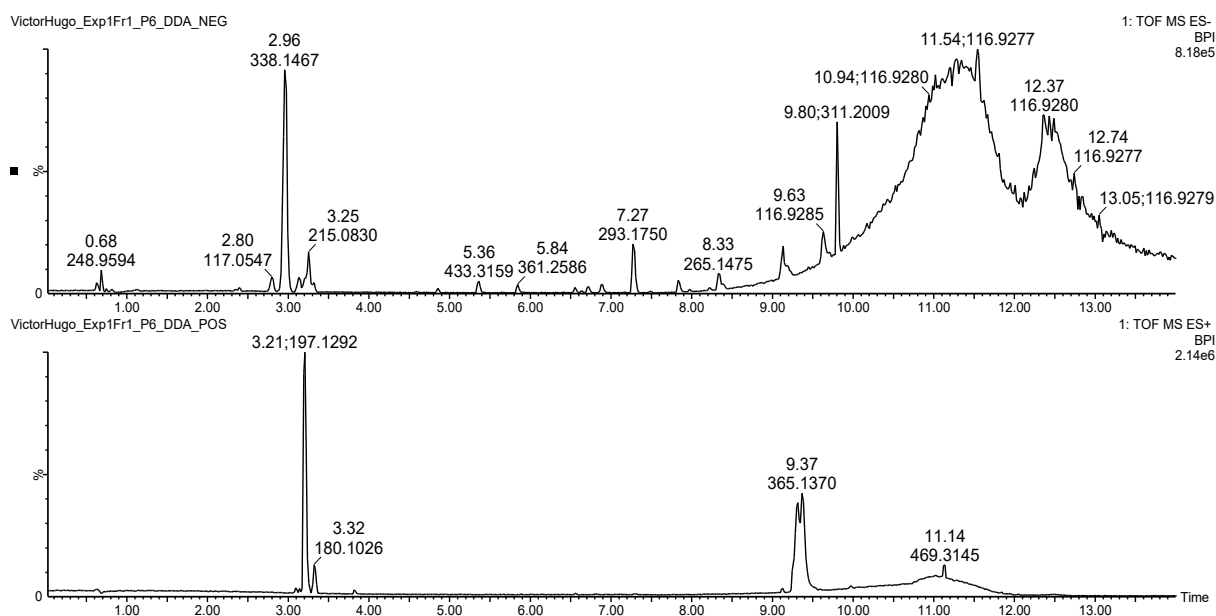


Figura 74 — Cromatograma de pico base de UHPLC-MS da amostra Fr1 P6. Modo de ionização negativa na parte superior e modo positivo na inferior. Eluição com acetonitrila e H_2O como fase móvel. Gradiente de 5-100% de Acetonitrila em 10 minutos.

Fonte: próprio autor.

4.4.3 Exp1 Fr1 P7 e P8

As substâncias Fr1 P7 (**Figura 75**) e Fr1 P8 (**Figura 76**) são isômeros constitucionais e foram identificadas como ciclo(Pro-Ile) e ciclo(Pro-Leu), respectivamente. Ambas possuem um derivado de prolina e se diferenciam somente pela posição de uma metila no outro resíduo de aminoácido, leucina e isoleucina. Seus dados de RMN e espectrometria de massas são quase idênticos e estão mostrados a seguir.

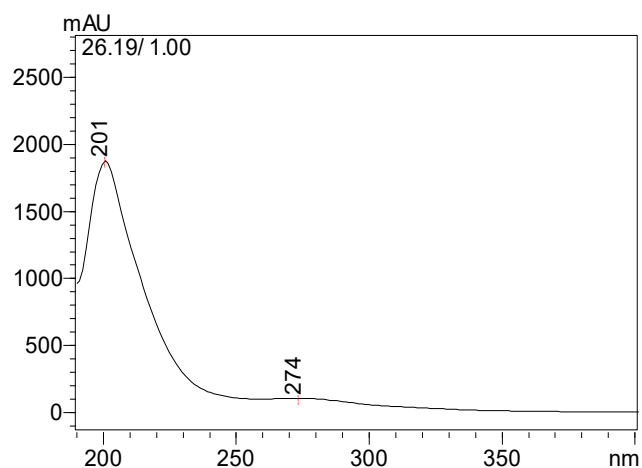
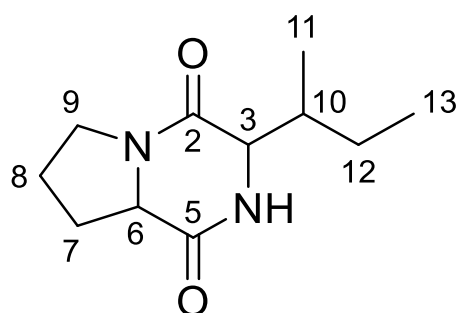


Figura 75 — Estrutura e espectro UV-Vis da substância Fr1 P7.
Fonte: próprio autor.

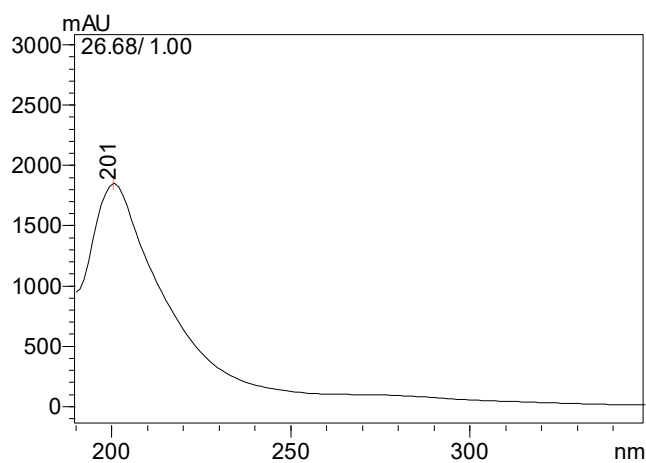
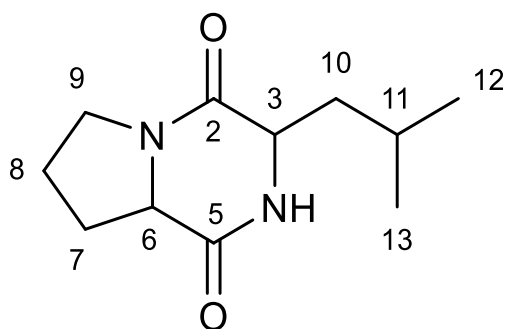


Figura 76 — Estrutura e espectro UV-Vis da substância Fr1 P8.
Fonte: próprio autor.

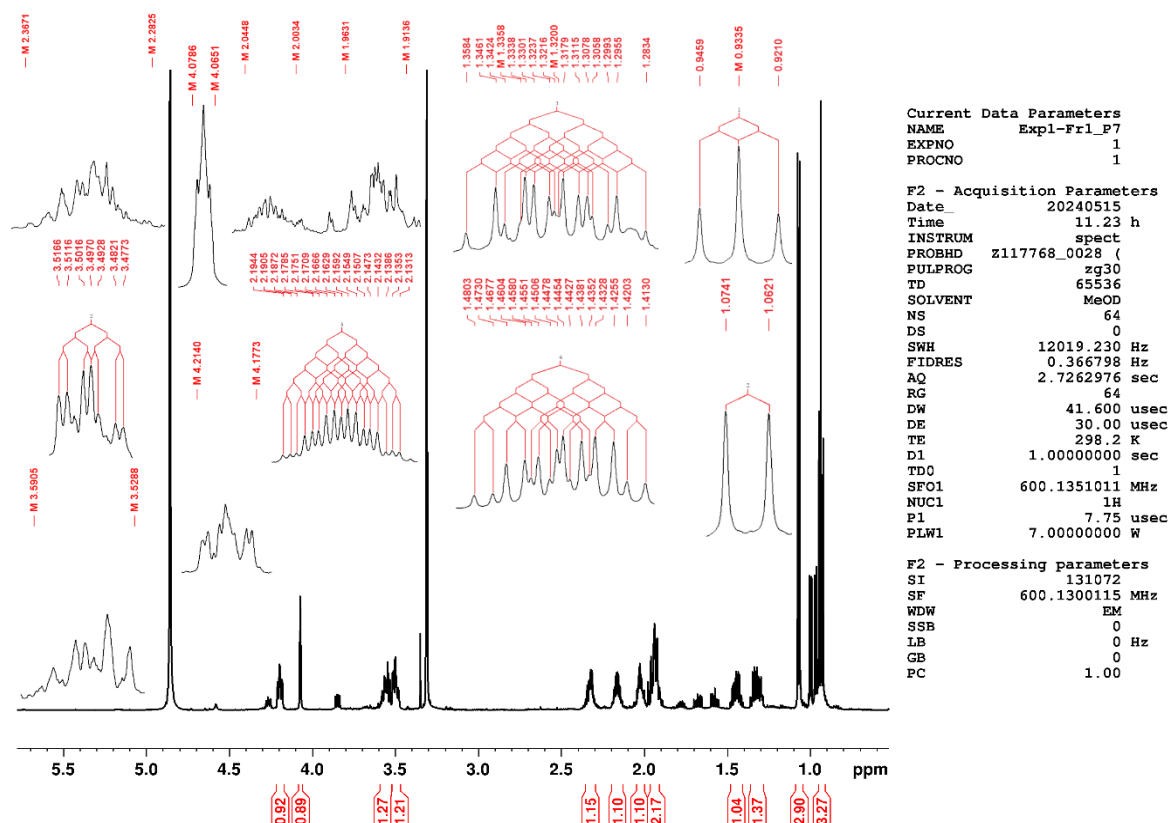


Figura 77 — Espectro de RMN de ^1H da substância Fr1 P7 (CD_3OD , 600 MHz).
Fonte: próprio autor.

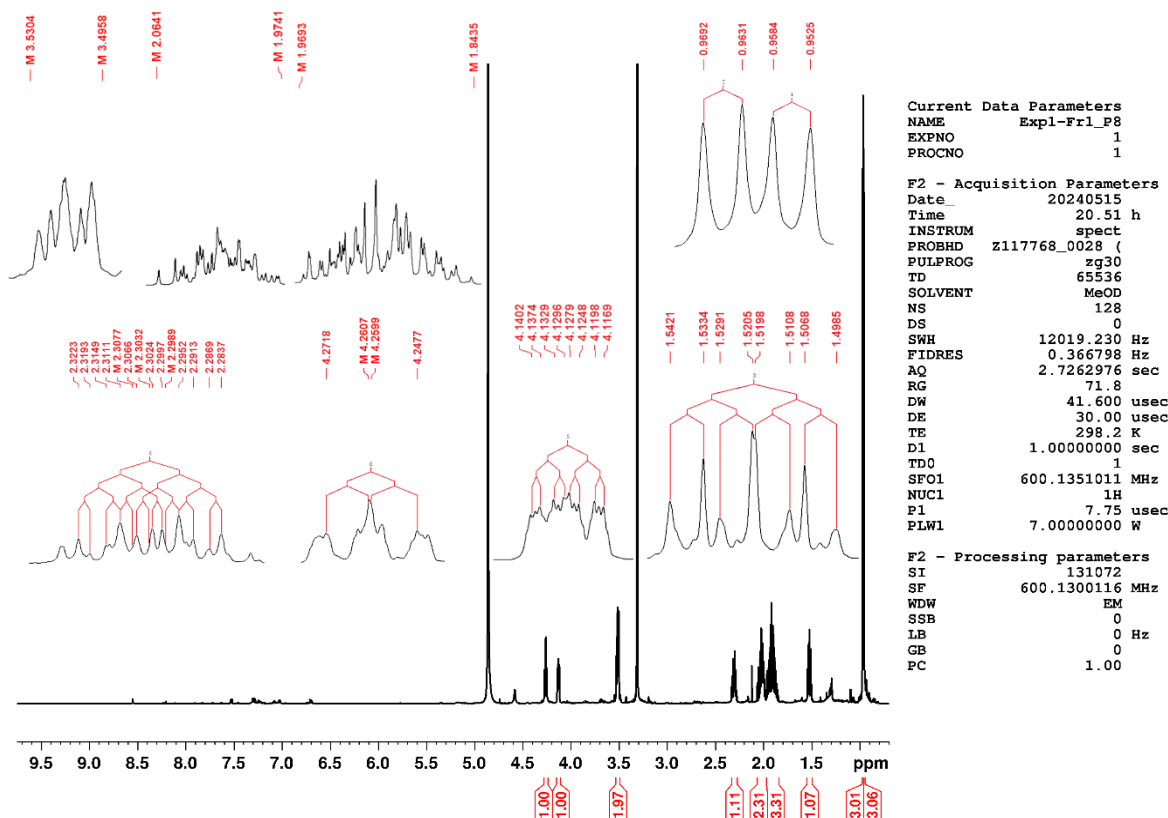


Figura 78 — Espectro de RMN de ^1H da substância Fr1 P8 (CD_3OD , 600 MHz).
Fonte: próprio autor.

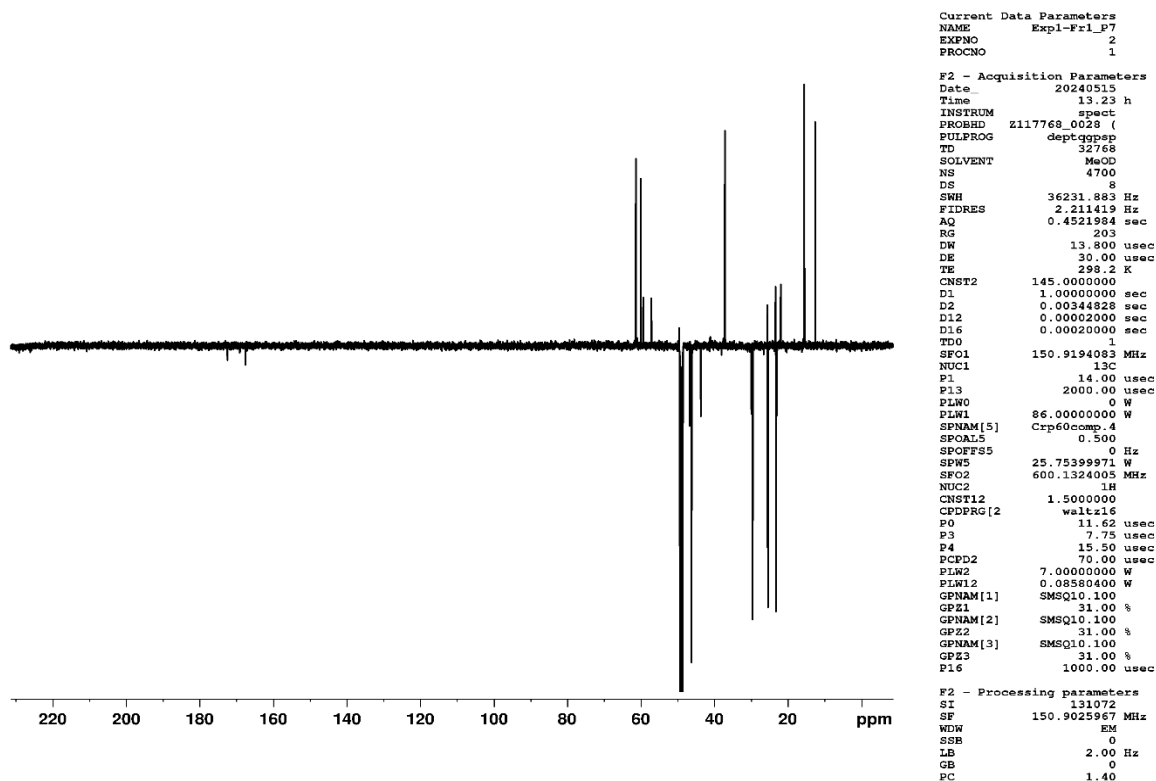


Figura 79 — Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) da substância Fr1 P7 (CD_3OD , 150 MHz). Sinais negativos referentes aos carbonos quaternários e metilênicos.
Fonte: próprio autor.

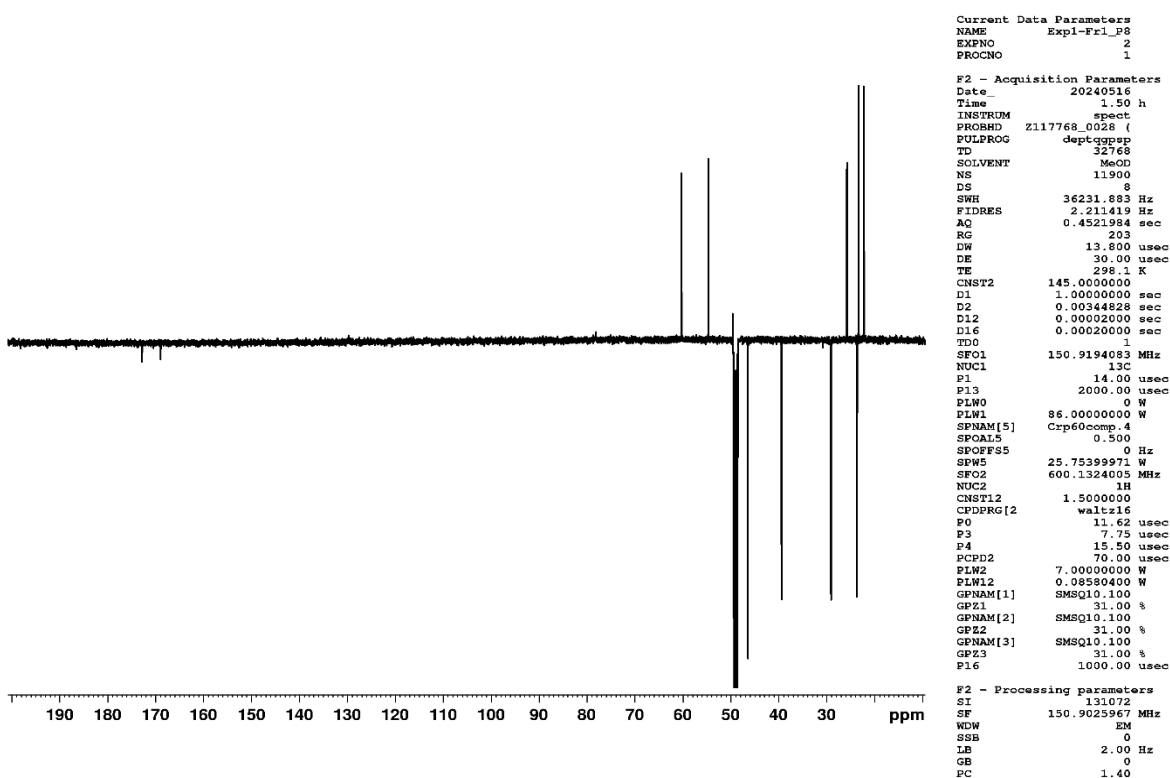


Figura 80 — Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) da substância Fr1 P8 (CD_3OD , 150 MHz). Sinais negativos referentes aos carbonos quaternários e metilênicos.
Fonte: próprio autor.

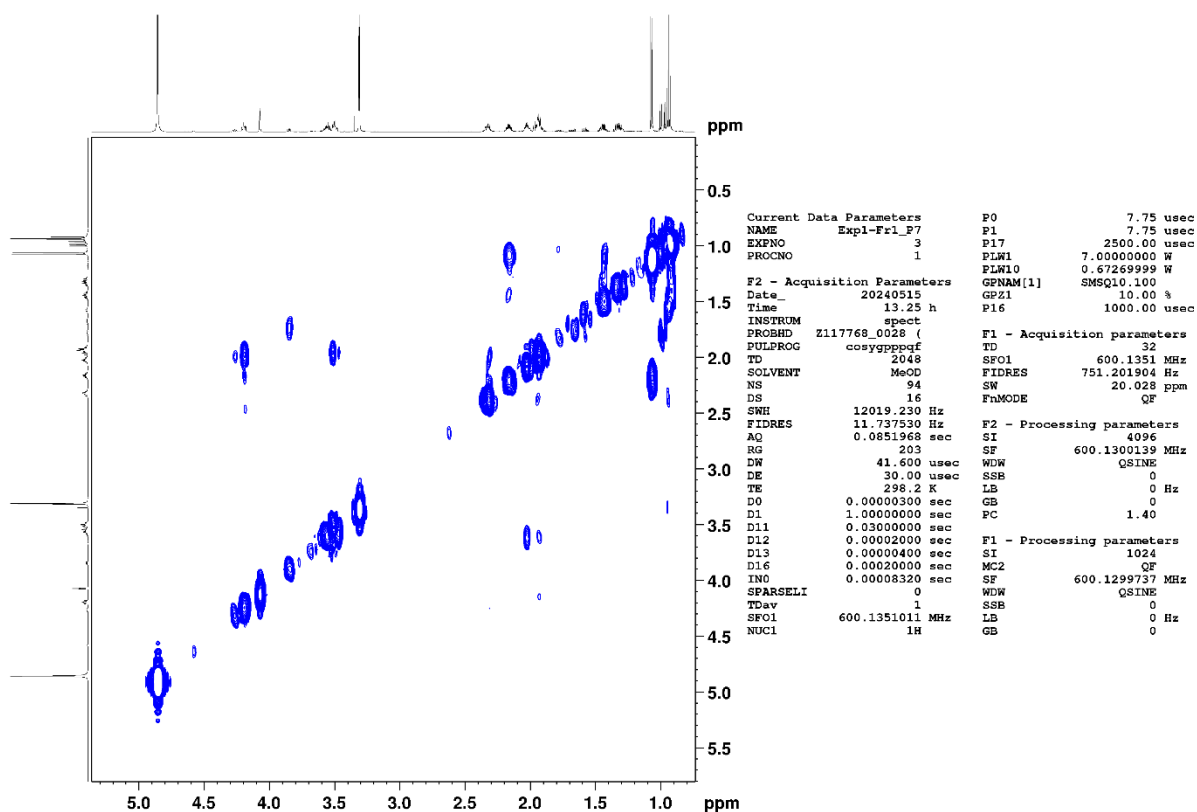


Figura 81 — Mapa de contorno de COSY da substância Fr1 P7.
Fonte: próprio autor.

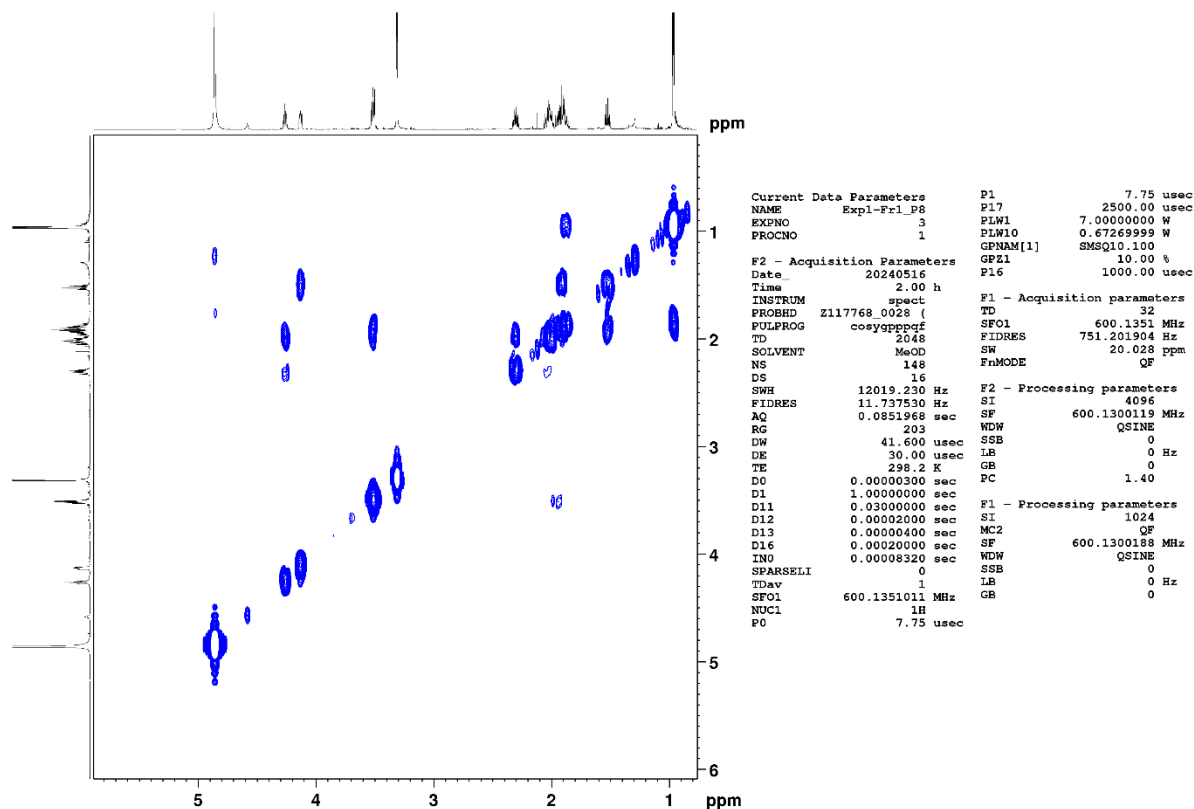


Figura 82 — Mapa de contorno de COSY da substância Fr1 P8.
Fonte: próprio autor.

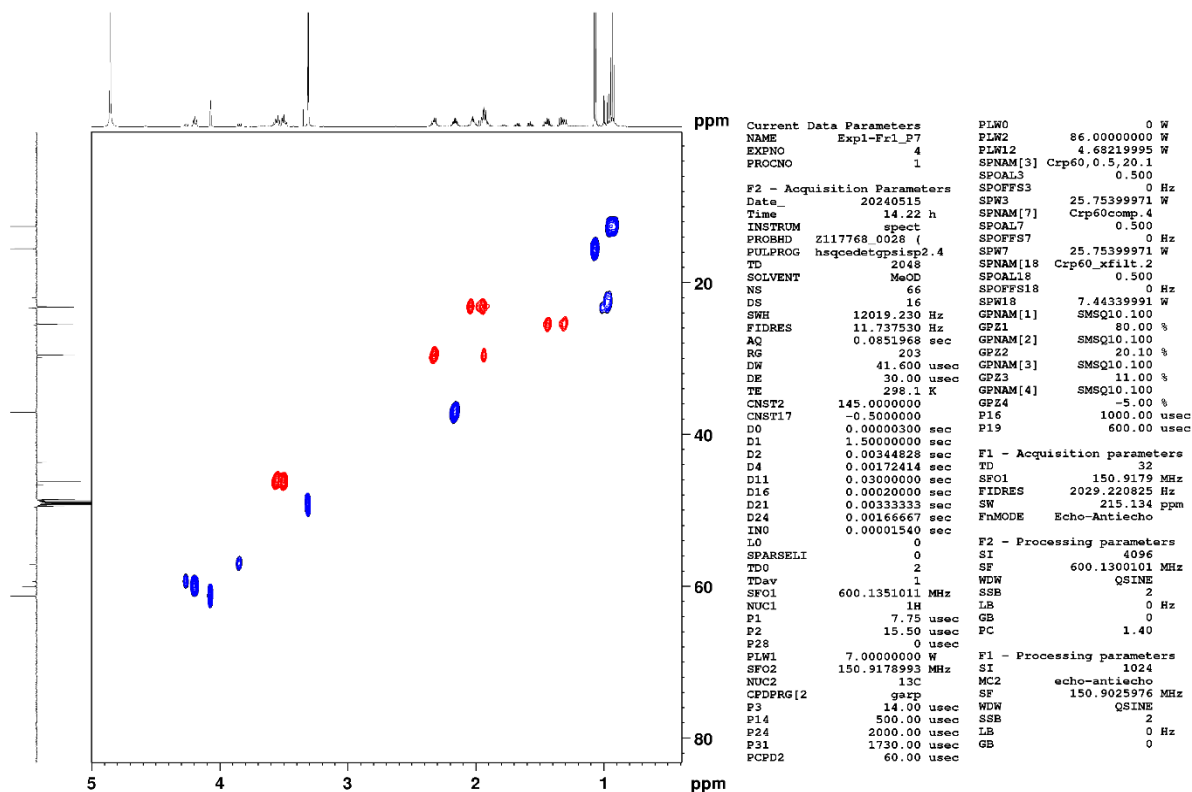


Figura 83 — Mapa de contorno de HSQC da substância Fr1 P7. Carbonos metilênicos nas correlações em vermelho.

Fonte: próprio autor.

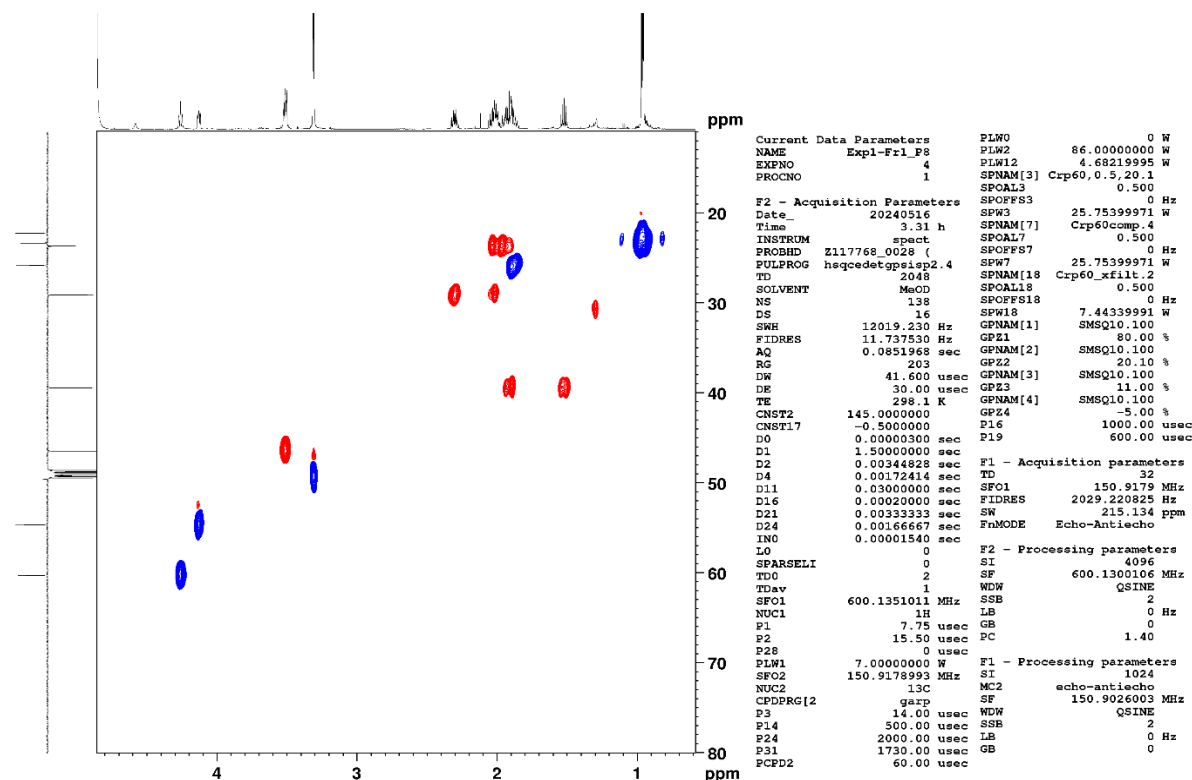


Figura 84 — Mapa de contorno de HSQC da substância Fr1 P8. Carbonos metilênicos nas correlações em vermelho.

Fonte: próprio autor.

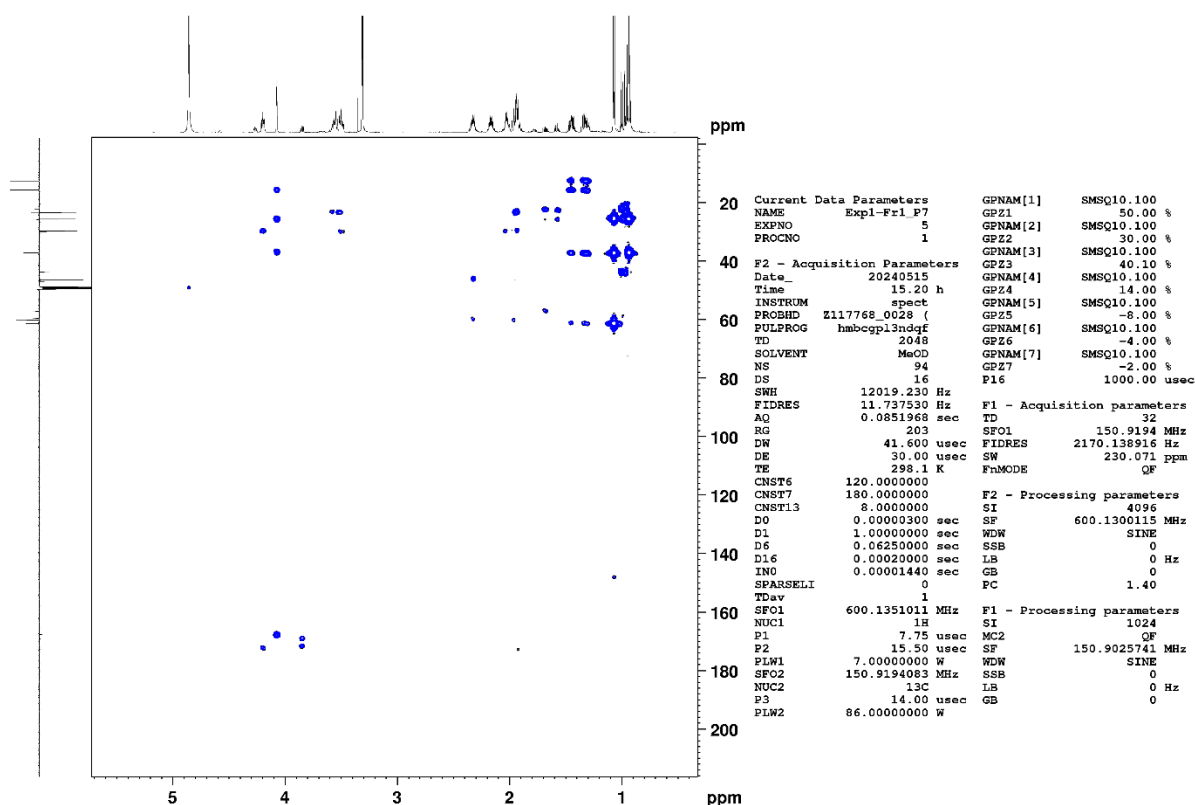


Figura 85 — Mapa de contorno de HMBC da substância Fr1 P7.
Fonte: próprio autor.

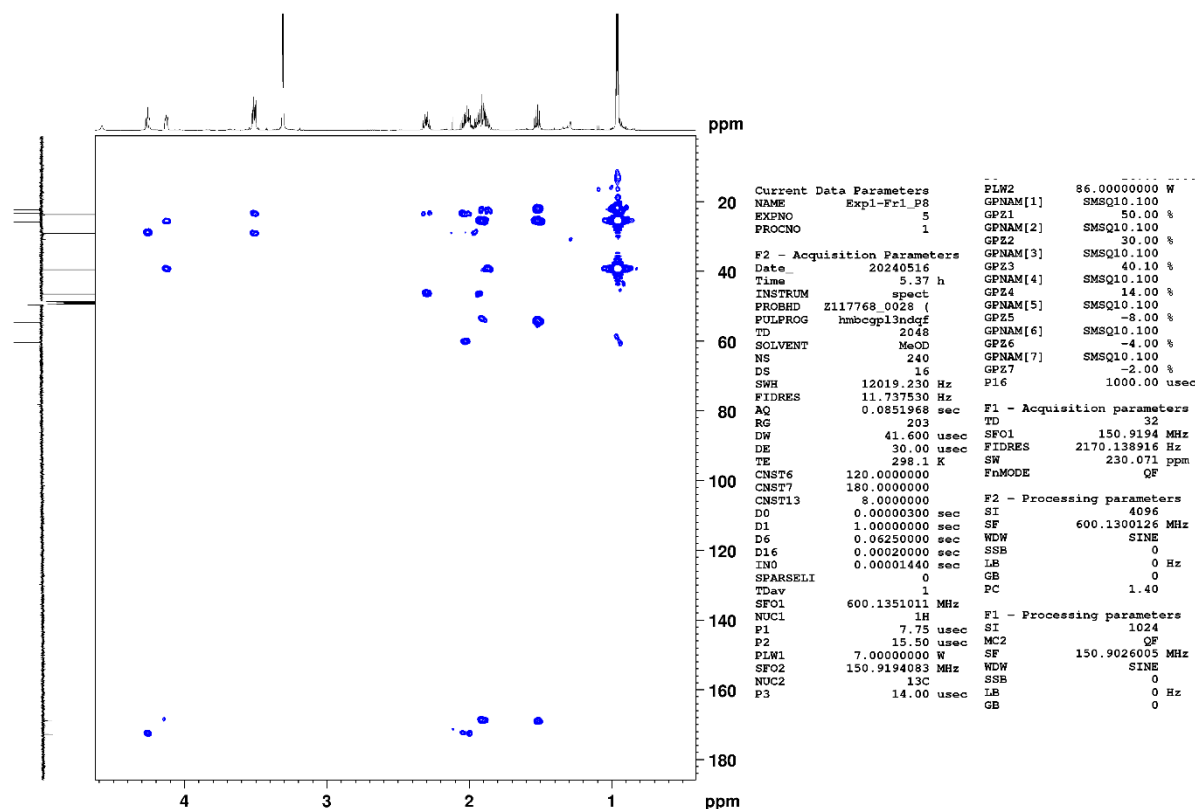


Figura 86 — Mapa de contorno de HMBC da substância Fr1 P8.
Fonte: próprio autor.

Tabela 31 — Sinais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância Fr1 P7 e correlações observadas nos experimentos 2D de RMN.

δ_{H} (ppm), multiplicidade e J (Hz)	$\int$	COSY	δ_{C} (ppm)	HMBC
0.93 <i>dd</i> (7.4, 7.4)	3	1.44 1.32	12.5	25.4 37.0
1.06 <i>d</i> (7.2)	3	2.16	15.5	25.4 37.0 61.3
1.32 <i>ddq</i> (13.4, 9.5, 7.3)	1	0.93	25.4	12.5 15.5 37.0 61.3
1.44 <i>dqd</i> (13.4, 7.5, 4.4)	1	0.93 2.16	25.4	12.5 15.5 37.0 61.3
1.91–1.96 <i>m</i>	1	-	29.5	23.0
1.91–1.96 <i>m</i>	1	2.32	23.0	-
2.00–2.04 <i>m</i>	1	2.32 3.55	23.0	29.5
2.16 <i>dqdd</i> (9.5, 7.1, 4.6, 2.4)	1	1.44	37.0	25.4
2.28–2.36 <i>m</i>	1	2.03	29.5	46.1 60.0
3.50 <i>ddd</i> (11.6, 8.9, 2.8)	1	1.94	46.1	29.5 23.0
3.52–3.59 <i>m</i>	1	2.03	46.1	23.0
4.06–4.08 <i>m</i>	1	-	61.3	15.5 25.4 37.0 167.6
4.17–4.21 <i>m</i>	1	1.91 – 1.96	60.0	29.5 172.4

Fonte: próprio autor.**Tabela 32** — Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr1 P7 (600 e 150 MHz, CD_3OD) e para ciclo(Pro-Ile).

Posição	Fr1 P7		Ciclo(D-Pro-L-Ile)*	
	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)
2	167,6	-	167,9	-
3	61,3	4,06–4,08 (<i>m</i>)	63,5	3,71 (<i>d</i> ; 6,3)
4	-	-	-	-
5	172,4	-	171,6	-
6	60,0	4,17–4,21 (<i>m</i>)	59,8	4,27 (<i>dd</i> ; 9,9; 6,4)
7	29,5	1,91–1,96 (<i>m</i>)	30,3	2,38 (<i>m</i>)
		2,28–2,36 (<i>m</i>)		2,05 (<i>m</i>)
8	23,0	1,91–1,96 (<i>m</i>)	22,9	1,93 (<i>m</i>)
		2,00–2,04 (<i>m</i>)		
9	46,1	3,50 (<i>ddd</i> ; 11,6; 8,9; 2,8)	46,8	3,63 (<i>m</i>)
		3,52–3,59 (<i>m</i>)		3,52 (<i>m</i>)
10	37,0	2,16 (<i>dqdd</i> ; 9,5; 7,1; 4,6; 2,4)	41,0	1,93 (<i>m</i>)
11	15,5	1,06 (<i>d</i> ; 7,2)	15,7	1,03 (<i>d</i> ; 6,9)
12	25,4	1,32 (<i>ddq</i> ; 13,4; 9,5; 7,3)	26,1	1,63 (<i>m</i>)
		1,44 (<i>dqd</i> ; 13,4; 7,5; 4,4)		1,26 (<i>m</i>)
13	12,5	0,93 (<i>dd</i> ; 7,4; 7,4)	11,6	0,98 (<i>t</i> ; 7,4)

*500 e 125 MHz, CD_3OD .**Fonte:** adaptado de DING et al., 2023.

Tabela 33 — Sinais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância Fr1 P8 e correlações observadas nos experimentos 2D de RMN.

δ_{H} (ppm), multiplicidade e J (Hz)	J	COSY	δ_{C} (ppm)	HMBC
0.95 <i>d</i> (3.5)	3	1.80–1.90	22.2	25.8 39.5
0.96 <i>d</i> (3.6)	3	1.80–1.90	23.2	22.2 25.8 39.5
1.52 <i>ddd</i> (13.4, 7.7, 5.2)	1	1.91 4.12	39.5	22.2 25.8 54.6 168.9
1.85–1.92 <i>m</i>	1	-	25.8	22.2 39.5
1.88–1.91 <i>m</i>	1	-	39.5	22.2 25.8 54.6 168.9
1.94–1.99 <i>m</i>	1	-	23.6	46.4
1.99–2.04 <i>m</i>	1	-	29.0	172.8
2.01–2.06 <i>m</i>	1	-	23.6	60.3 23.3 – 23.6
2.30 <i>dddd</i> (9.6, 7.0, 4.8, 2.0)	1	1.91–2.04	29.0	46.4
3.49–3.53 <i>m</i>	2	1.8–2.0	46.4	23.6 29.0
4.12 <i>ddd</i> (7.6, 4.6, 1.8)	1	1.52	54.6	25.8 39.5 168.9
4.26 <i>dd</i> (7.4, 7.0)	1	2.0 2.30	60.3	29.0 172.8

Fonte: próprio autor.

Tabela 34 — Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr1 P8 (600 e 150 MHz, CD_3OD) e para ciclo(L-Pro-L-Leu).

Posição	Fr1 P8		Ciclo(L-Pro-L-Leu)*	
	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)
2	168,9	-	168,9	-
3	54,6	4,12 (<i>ddd</i> ; 7,6; 4,6; 1,8)	54,6	4,16 (<i>m</i>)
4	-	-	-	-
5	172,8	-	172,8	-
6	60,3	4,26 (<i>dd</i> ; 7,4; 7,0)	60,3	4,30 (<i>ddd</i> ; 9,3; 7,0; 1,8)
7	29,0	1,99–2,04 (<i>m</i>) 2,30 (<i>dddd</i> ; 9,6; 7,0; 4,8; 2,0)	29,1	2,33 (<i>m</i>) 1,92–2,09 (<i>m</i>)
8	23,6	2,01–2,06 (<i>m</i>) 1,94–1,99 (<i>m</i>)	23,7	1,92–2,09 (<i>m</i>)
9	46,4	3,49–3,53 (<i>m</i>)	46,5	3,55 (<i>m</i>)
10	39,5	1,88–1,91 (<i>m</i>) 1,52 (<i>ddd</i> ; 13,4; 7,7; 5,2)	39,4	1,92–2,09 (<i>m</i>) 1,55 (<i>m</i>)
11	25,8	1,85–1,92 (<i>m</i>)	25,8	1,92–2,09 (<i>m</i>)
12	23,2	0,96 (<i>d</i> ; 3,6)	23,4	1,00 (<i>d</i> ; 6,3)
13	22,2	0,95 (<i>d</i> ; 3,5)	22,3	0,99 (<i>d</i> ; 6,2)

*500 e 150 MHz, CD_3OD .

Fonte: adaptado de DING et al., 2023.

Essas duas estruturas propostas com base nos dados de RMN são consistentes com os valores de massas observados no experimento UHPLC-MS/MS. O pico em $t_{\text{R}} = 3,83$ min (**Figura 87**) gerou um íon precursor em m/z 211,1451 $[\text{M}+\text{H}]^+$, um valor com 4,7 ppm de erro em relação à ciclo(Pro-Ile) protonada (211,1441). O cromatograma de Fr1 P8 (**Figura 88**) apresentou um pico em $t_{\text{R}} = 4,00$ min e m/z 211,1454 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Essa massa representa 6,1 ppm de erro em relação à ciclo(Pro-Leu).

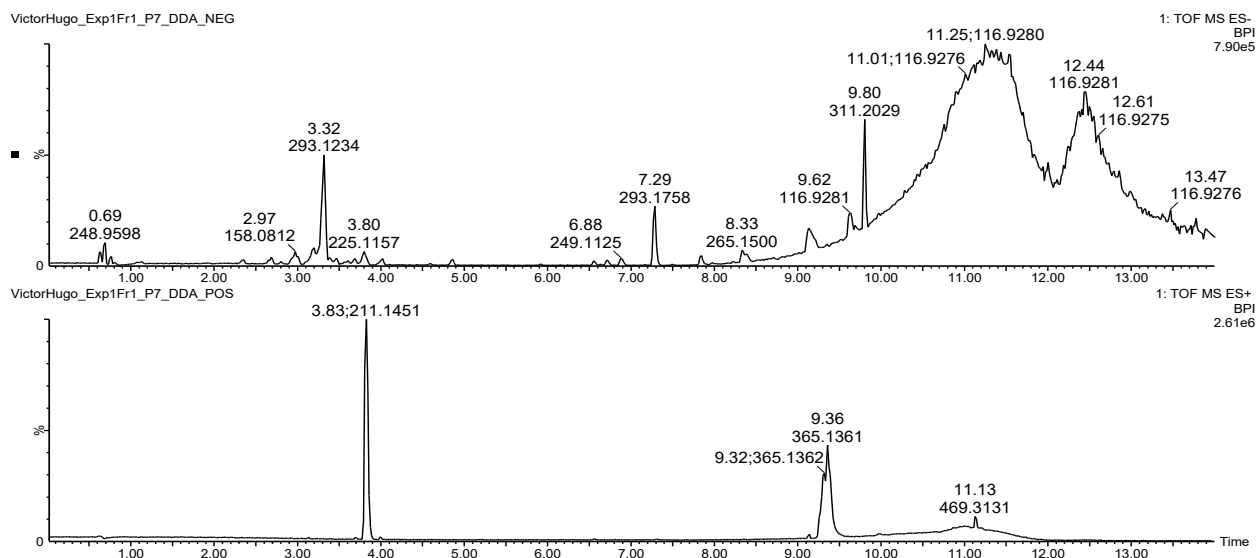


Figura 87 — Cromatogramas de pico base de UHPLC-MS/MS da amostra Fr1 P7. Modo de ionização negativa na parte superior e modo positivo na inferior.

Fonte: próprio autor.

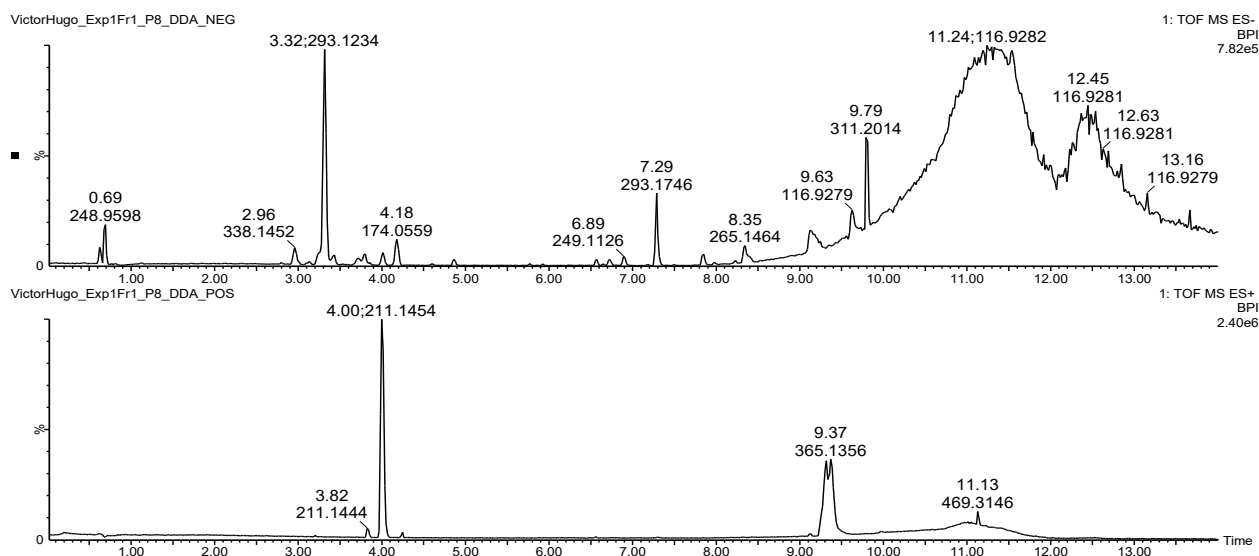


Figura 88 — Cromatogramas de pico base de UHPLC-MS/MS da amostra Fr1 P8. Modo de ionização negativa na parte superior e modo positivo na inferior.

Fonte: próprio autor.

4.4.4 Exp9 Fr3 P6

Essa substância foi identificada como 4-(2-hidroxietil)fenol (2,3 mg) (**Figura 89**). Seu espectro de RMN de ^1H (**Figura 90**) apresentou um tripleto em δ_{H} 2,59 (J_{7-8} 7,2 Hz; H-7, 2H) e outro tripleto em δ_{H} 3,51 (J_{8-7} 7,2 Hz; H-8, 2H). Além disso, foram detectados hidrogênios aromáticos em δ_{H} 6,65 (d ; 8,4 Hz; H-2/6, 2H) e em δ_{H} 6,97 (d ;

8,4 Hz; H-3/5, 2H). Com as correlações observadas no experimento HMBC (**Figura 93**) foi possível confirmar essas atribuições e as posições dos carbonos quaternários aromáticos.

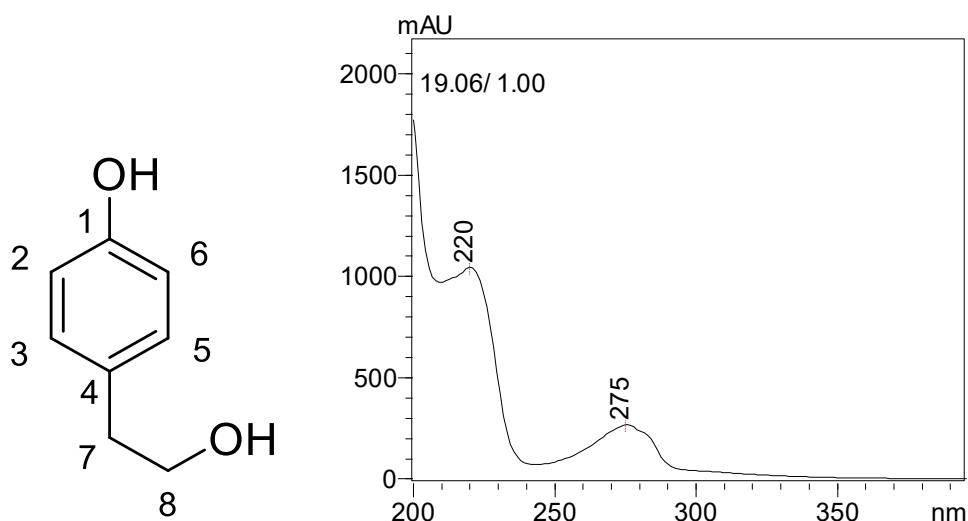


Figura 89 — Estrutura e espectro UV-Vis da substância Fr3 P6.
Fonte: próprio autor.

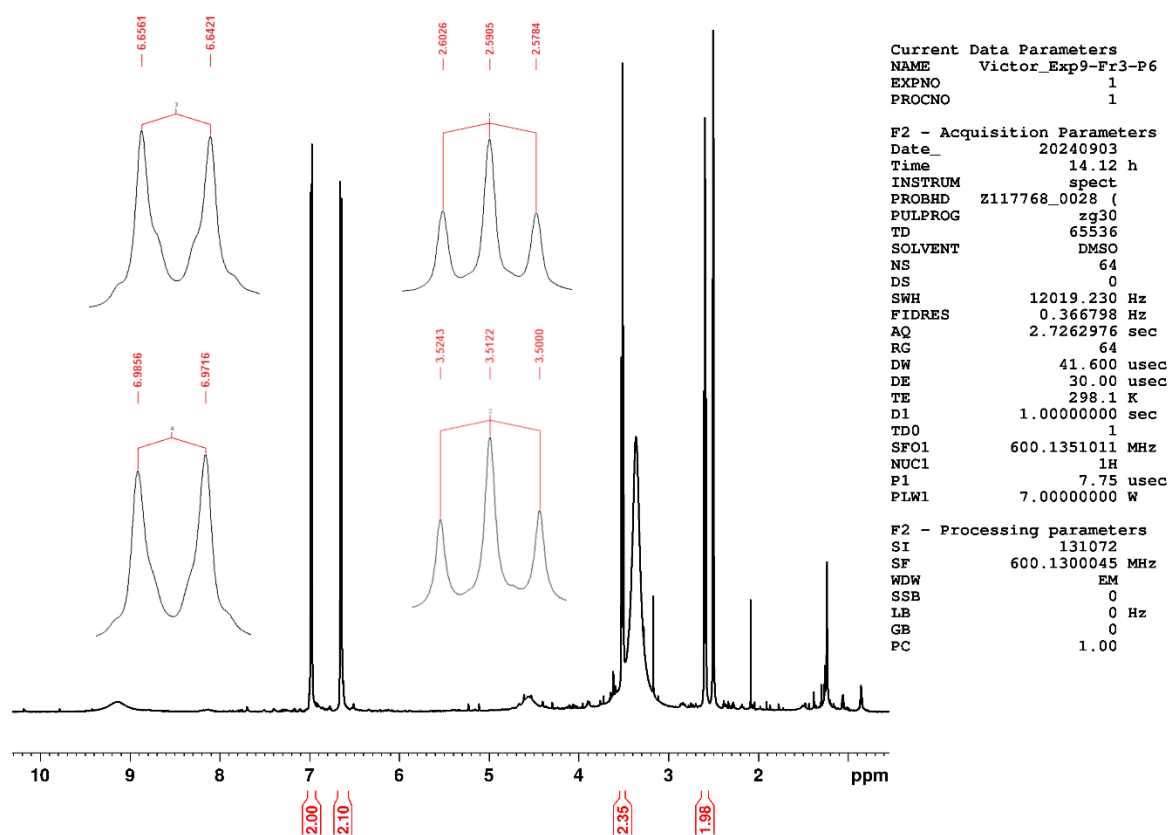


Figura 90 — Espectro de RMN de ¹H da substância Fr3 P6 (DMSO-d₆, 600 MHz).
Fonte: próprio autor.

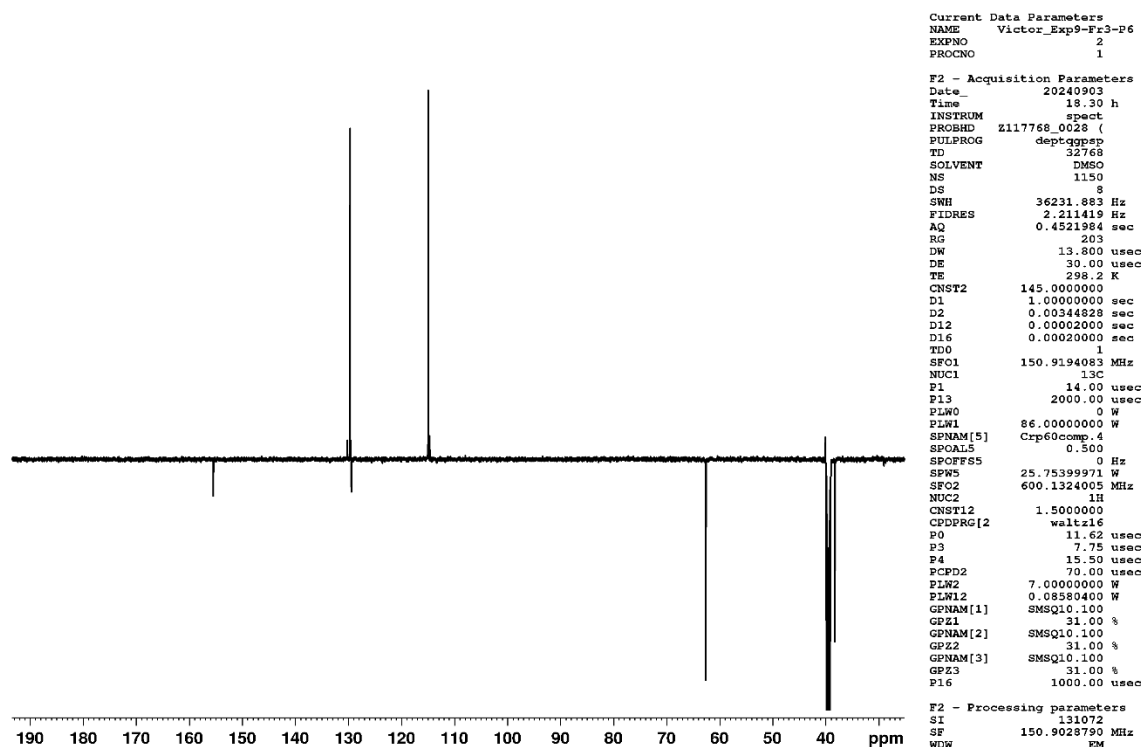


Figura 91 — Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) da substância Fr3 P6 (DMSO- d_6 , 150 MHz). Sinais negativos referentes aos carbonos quaternários e metilênicos.

Fonte: próprio autor.

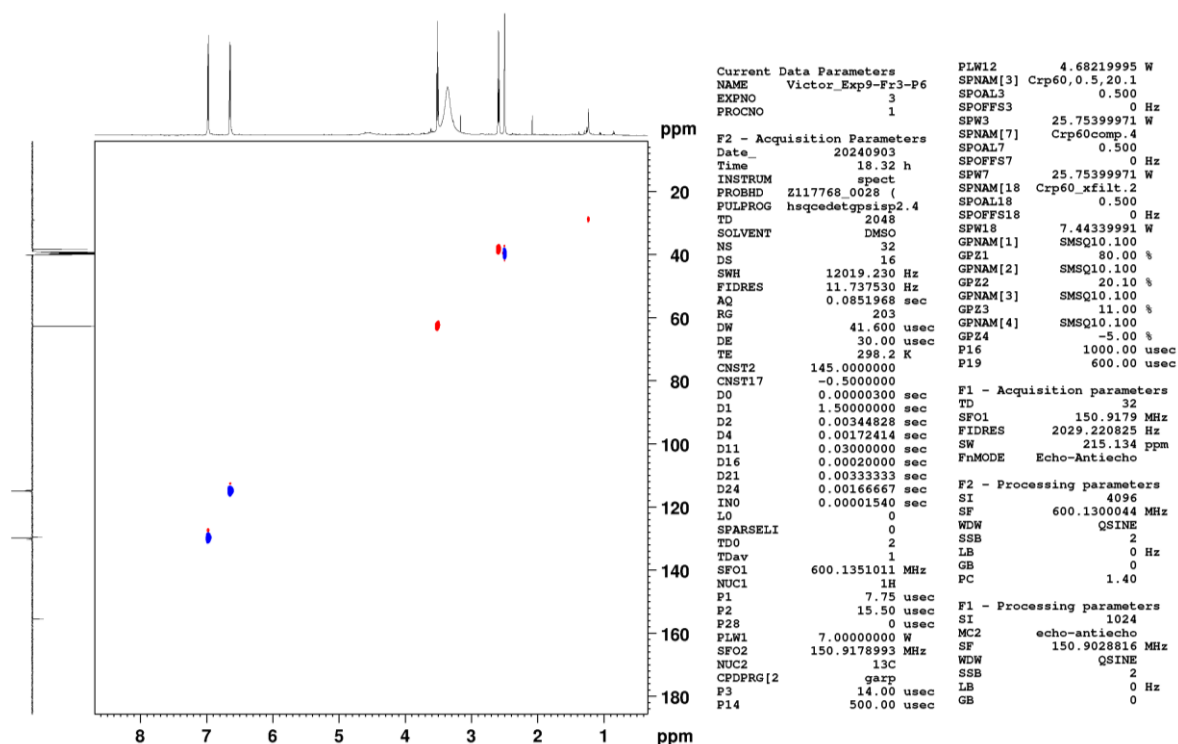


Figura 92 — Mapa de contorno de HSQC da substância Fr3 P6. Carbonos metilênicos nas correlações em vermelho.

Fonte: próprio autor.

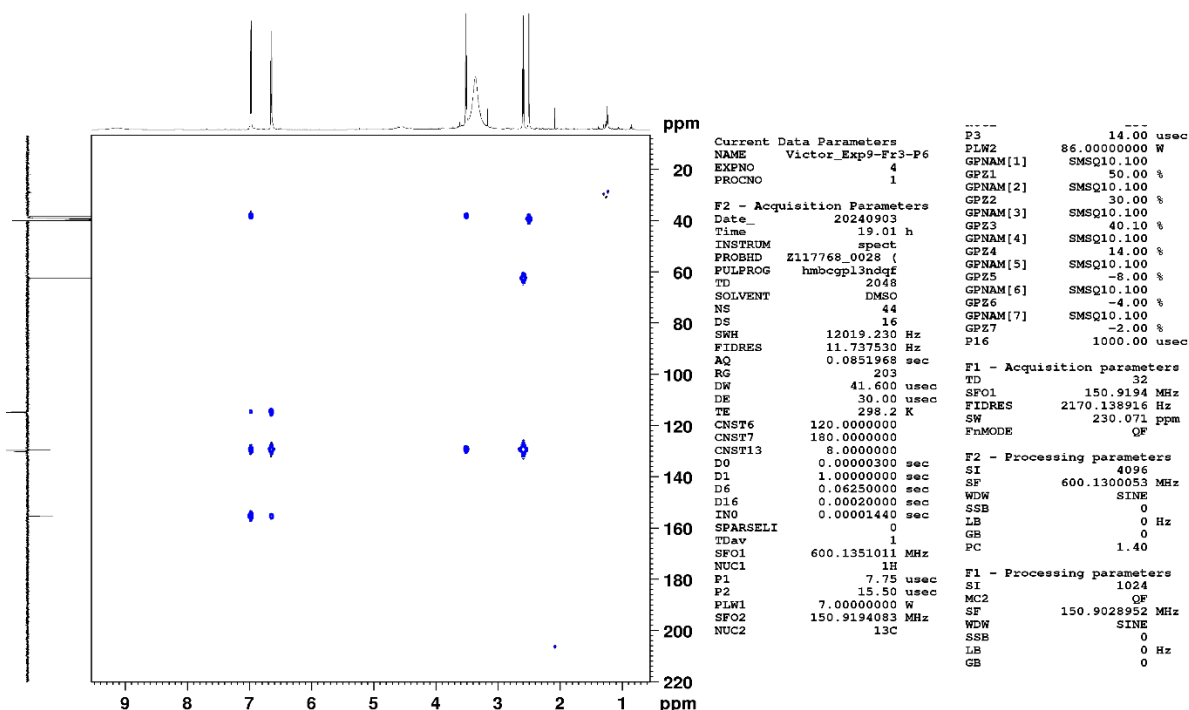


Figura 93 — Mapa de contorno de HMBC da substância Fr3 P6.
Fonte: próprio autor.

Tabela 35 — Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância Fr3 P6 e correlações observadas nos experimentos 2D de RMN.

δ_{H}	$\int$	δ_{C}	HMBC
2.59 <i>t</i> (7.2)	2	38.3	62.6 129.4
3.51 <i>t</i> (7.2)	2	61.6	38.2 129.4
6.65 <i>d</i> (8.4)	2	114.9	114.9 129.6 155.4
6.97 <i>d</i> (8.4)	2	129.6	38.2 129.6 155.4

Fonte: próprio autor.

Tabela 36 — Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr3 P6 (600 e 150 MHz, DMSO- d_6) e comparação com dados da literatura para o 4-(2-hidroxietil)fenol*.

Posição	Fr3 P6		4-(2-hidroxietil)fenol*	
	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)
1	155,4	-	156,0	-
2 e 6	114,9	6,65 (<i>d</i> ; 8,4)	115,4	6,68 (<i>d</i> ; 7,5)
3 e 5	129,6	6,97 (<i>d</i> ; 8,4)	129,9	7,01 (<i>d</i> ; 7,5)
4	129,4	-	130,2	-
7	38,3	2,59 (<i>t</i> ; 7,2)	38,8	2,62 (<i>t</i> ; 7,2)
8	61,6	3,51 (<i>t</i> ; 7,2)	63,1	3,54 (<i>t</i> ; 7,8)

*400 e 100 MHz, DMSO- d_6 .

Fonte: adaptado de SYSOLYATIN et al., 2015.

O sinal mais intenso observado no cromatograma de pico de base dessa amostra foi o pico em $t_R = 2,48$ min (**Figura 94**), com um íon precursor em m/z 181,0494 no modo de ionização negativo. Esse valor de massa é maior do que o 4-(2-hidroxietil)fenol (138,166 g/mol) e não confirma a estrutura proposta. Como esses experimentos de UHPLC-MS/MS foram feitos antes dos experimentos de RMN, provavelmente a estrutura identificada por RMN é um produto de degradação da amostra analisada por LC-MS.

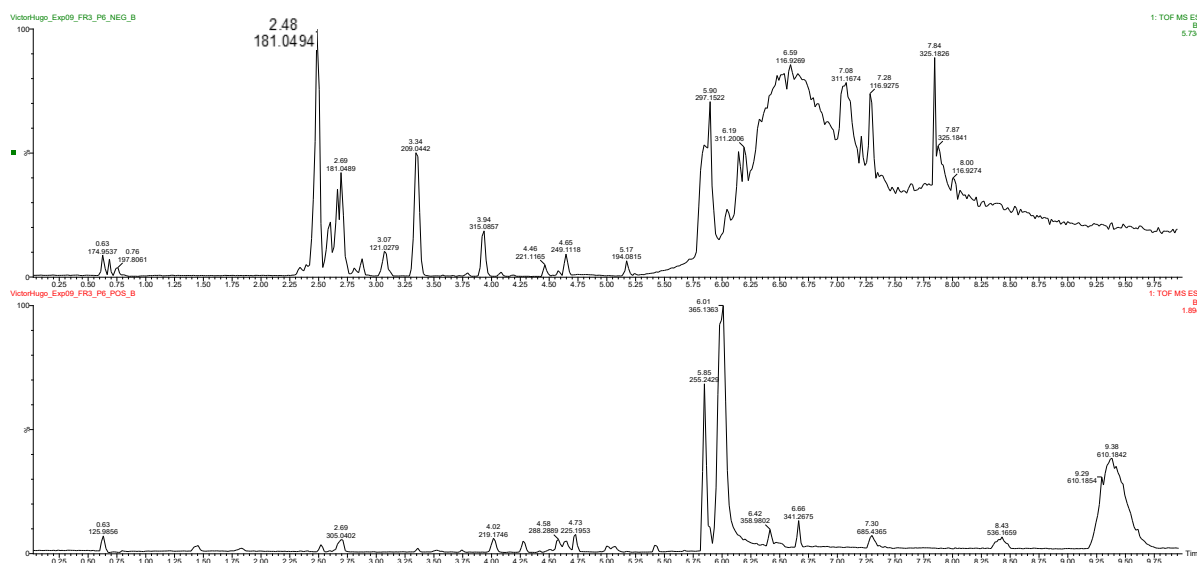


Figura 94 — Cromatogramas de pico base de UHPLC-MS/MS da amostra Fr3 P6. Modo de ionização negativa na parte superior e modo positivo na inferior. Acetonitrila e H_2O como fase móvel. Gradiente de 5-100% de Acetonitrila em 10 minutos.

Fonte: próprio autor.

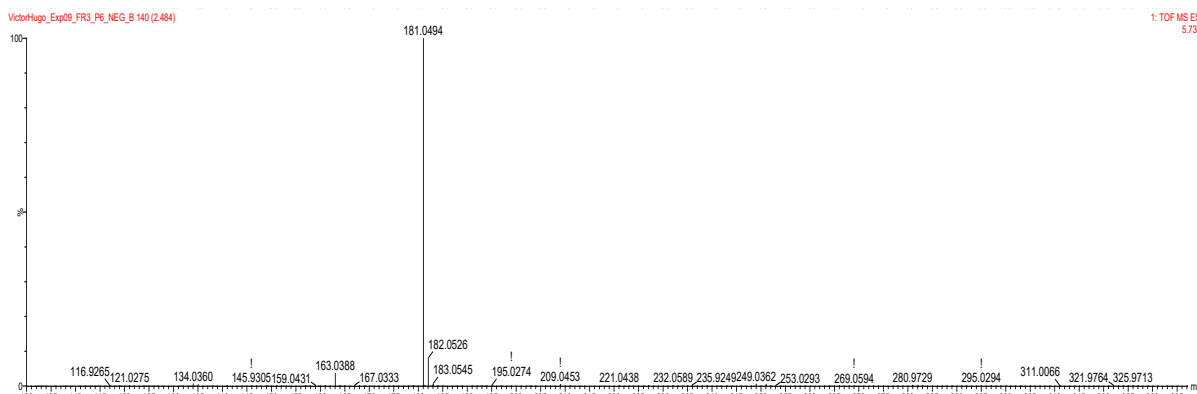


Figura 95 — Espectro de massas MS/MS da substância Fr3 P6. $t_R = 2,48$ min, *full scan*, modo negativo.

Fonte: próprio autor.

4.4.5 Exp9 Fr3 P7

A amostra Fr3 P7 é um derivado de tetralona identificada como (3*S*,4*S*)-3,4,8-trihidroxi-3,4-diidronaftalen-1(2*H*)-ona, biossintetizada pela via policetílica do acetato (IBRAHIM et al., 2022). Seu espectro de UV-Vis (**Figura 96**) apresentou bandas de absorção em $\lambda_{\text{max}} = 258 \text{ nm}$ e 333 nm , consistente com os valores esperados para um fenol conjugado com uma carbonila.

No espectro de RMN de ^1H (**Figura 97**) foram observados sinais em δ_{H} 3,99 (*ddd*; 7,1; 6,3; 3,8; H-3, 1H) e 4,49 (*d*; 6,2; H-4, 1H), sendo que a constante de acoplamento de $J_{\text{H3-H4}} = 6,2 \text{ Hz}$ indica uma configuração *trans* entre os hidrogênios H-3 e H-4, consistente com as configurações 3*S*,4*S* ou 3*R*,4*R*.

O hidrogênio em δ_{H} 3,99 (H-3) foi selecionado para ser irradiado no experimento NOESY (**Figura 98**) visando observar seu efeito sobre H-4, H-2a e H-2b. O espectro gerado evidenciou uma diferença de intensidade dos sinais referentes aos hidrogênios metilênicos na posição 2 (H-2a e H-2b). Essa observação sugere que a distância entre o núcleo H-3 e os núcleos H-2a e H-2b devem ser diferentes. O *software* ChemDraw foi utilizado para um cálculo qualitativo dessas distâncias, considerando os 4 estereoisômeros possíveis (**Figura 99**). Essa análise mostrou que o hidrogênio H-3 deve estar em posição axial (3*S*) para que as distâncias entre os núcleos sejam distintas. Apesar de ser necessário realizar outros experimentos para confirmar a configuração absoluta, as informações combinadas sugerem que a estrutura isolada tem configuração (3*S*,4*S*). A comparação com dados da literatura (**Tabela 38**) são consistentes com esta proposta estrutural.

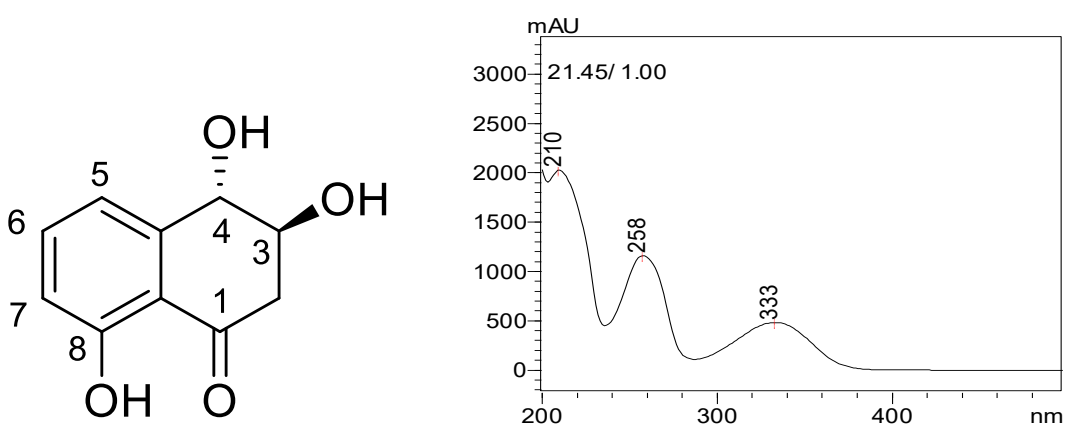


Figura 96 — Estrutura e espectro UV-Vis da substância Fr3 P7.
Fonte: próprio autor.

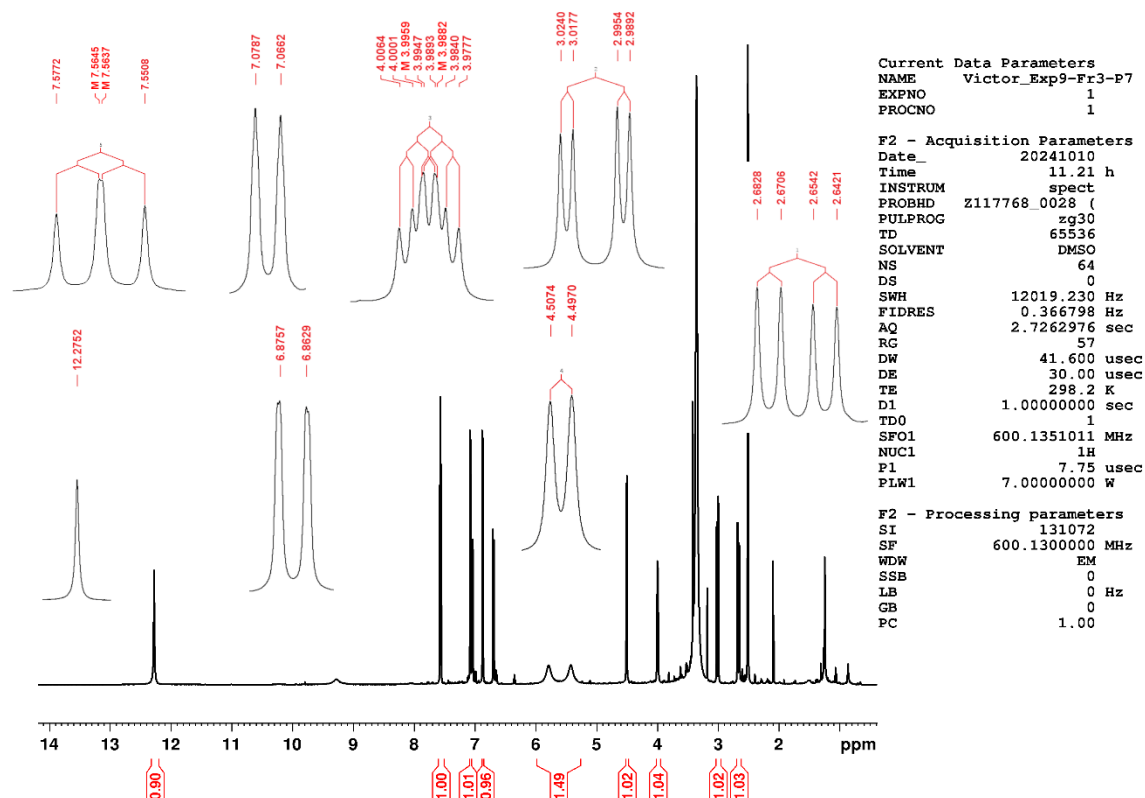


Figura 97 — Espectro de RMN de ^1H da substância Fr3 P7 (DMSO- d_6 , 600 MHz).
Fonte: próprio autor.

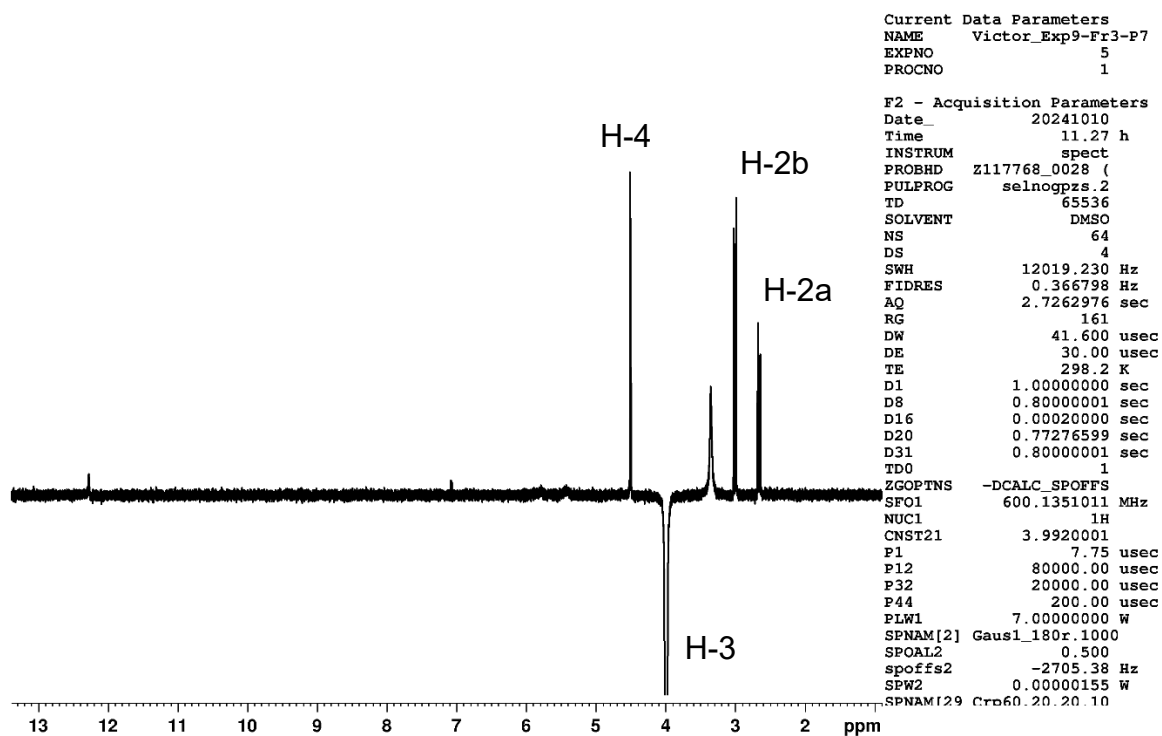


Figura 98 — Espectro NOESY da substância Fr3 P7. Sinal de referência irradiado: δ_{H} 3,99 ppm, H-3 (DMSO- d_6 , 600 MHz).
Fonte: próprio autor.

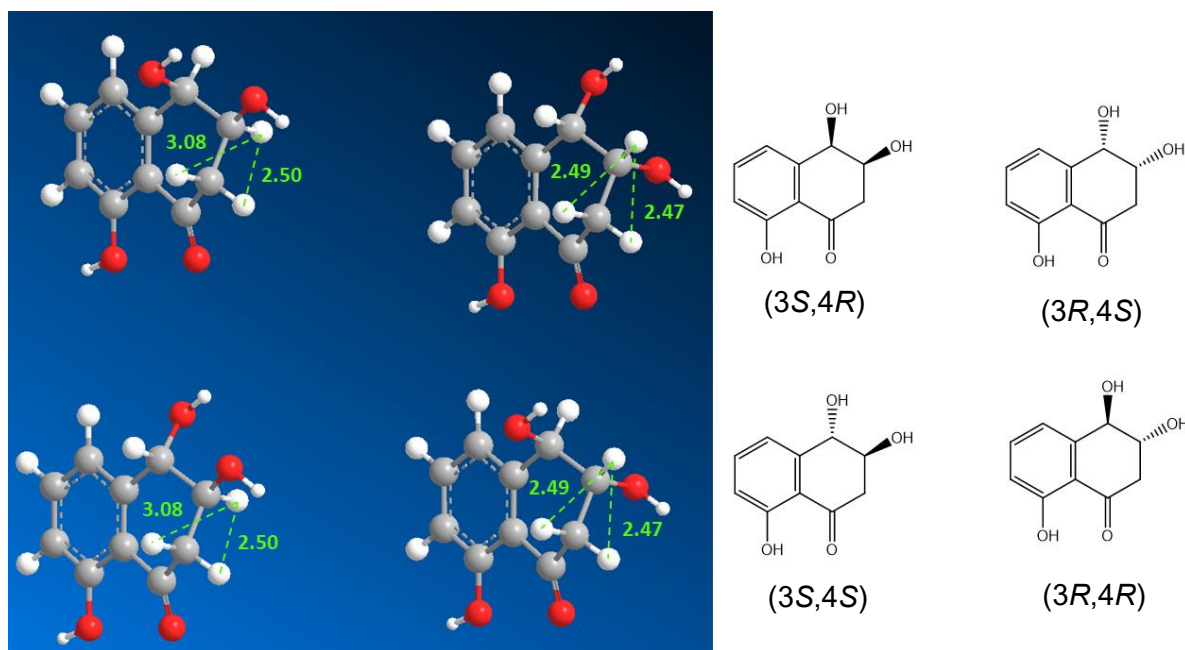


Figura 99 — Estruturas dos quatro possíveis estereoisômeros da 3,4,8-trihidroxi-3,4-diidronaftalen-1(2H)-ona. As linhas e números em verde mostram a distância, em ângstroms, entre o núcleo irradiado H-3 e os H-2a e H-2b, conforme cálculos preliminares realizados pelo ChemDraw.

Fonte: próprio autor.

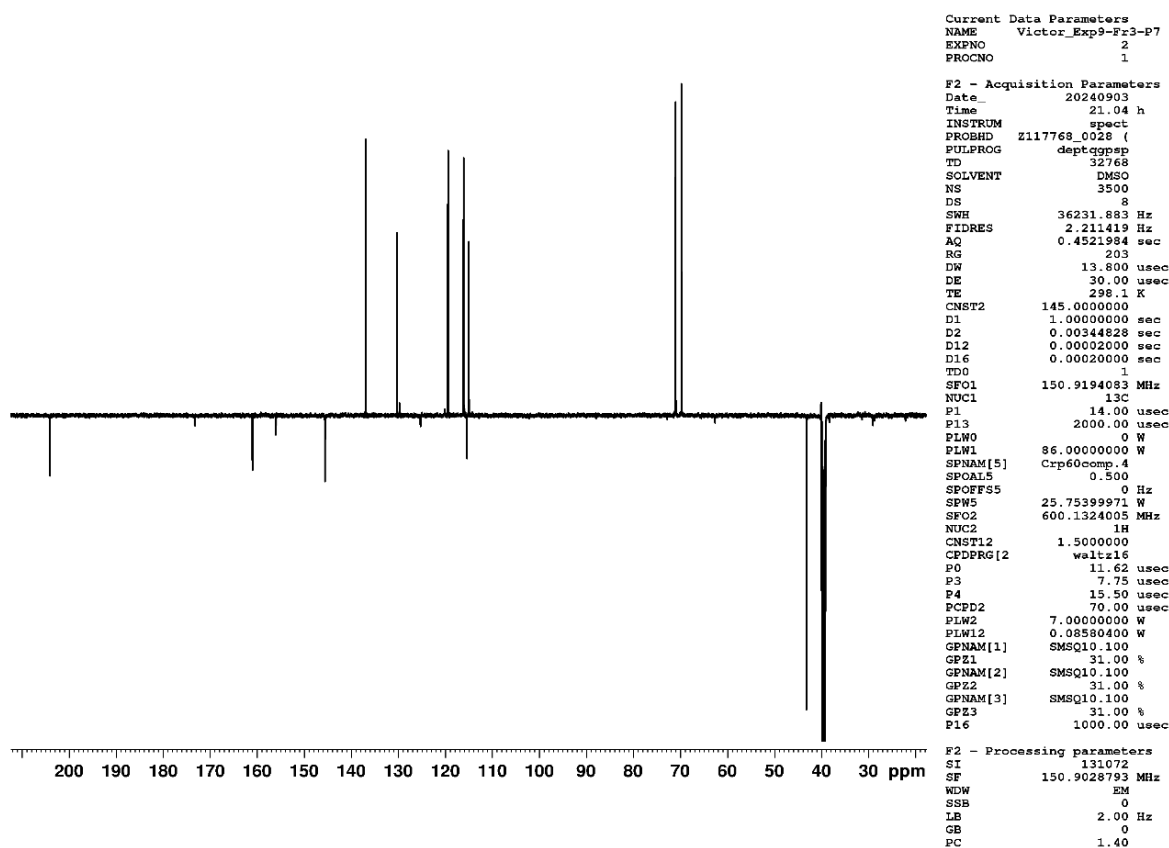


Figura 100 — Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) da substância Fr3 P7 (DMSO- d_6 , 150 MHz). Sinais negativos referentes aos carbonos quaternários e metilênicos.

Fonte: próprio autor.

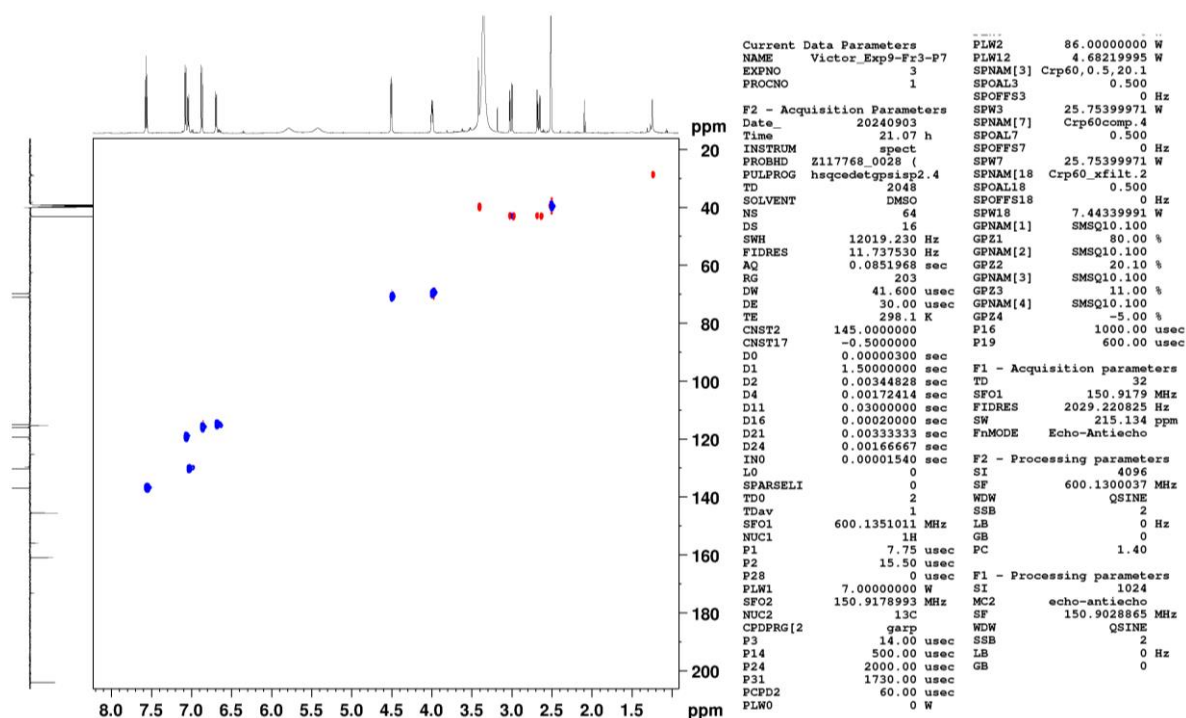


Figura 101 — Mapa de contorno de HSQC da substância Fr3 P7. Carbonos metilênicos nas correlações em vermelho.

Fonte: próprio autor.

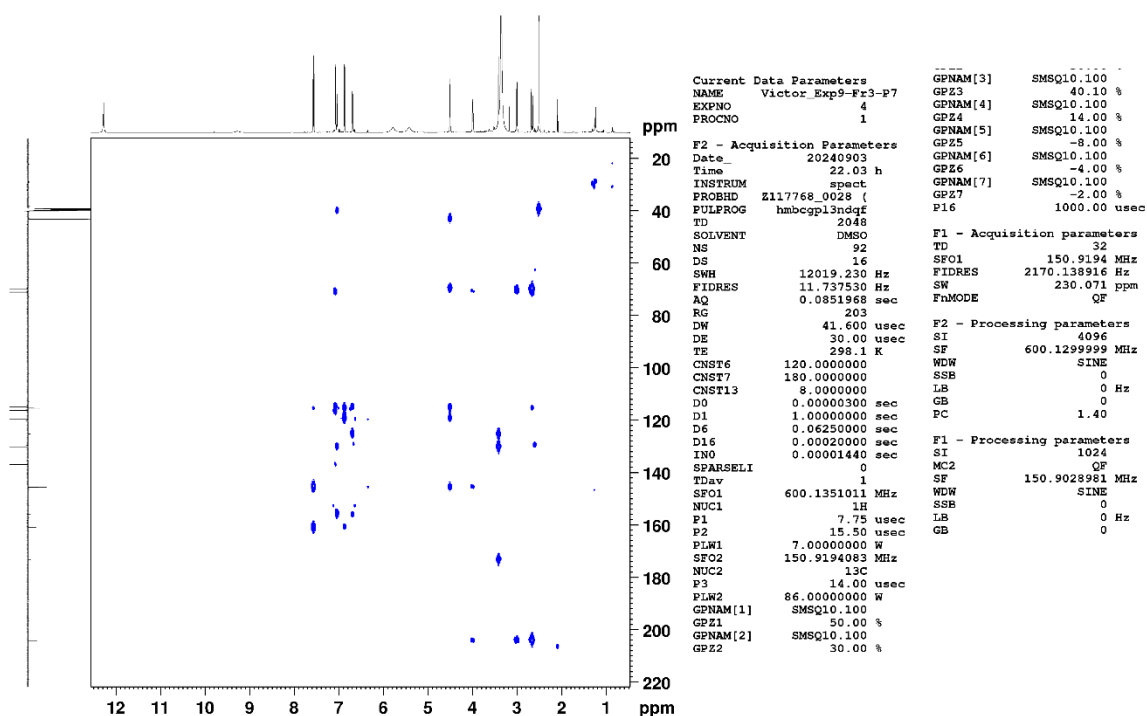


Figura 102 — Mapa de contorno de HMBC da substância Fr3 P7.

Fonte: próprio autor.

Tabela 37 — Sinais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância Fr3 P7 e correlações observadas nos experimentos 2D de RMN.

δ_{H}	J	δ_{C}	HMBC
2.65 <i>dd</i> (17.1, 7.3)	1	43.1	69.7 71.0 115.3 204.0
2.99 <i>dd</i> (17.1, 3.7)	1	43.1	69.7 71.0 204.0
3.99 <i>ddd</i> (7.1, 6.3, 3.8)	1	69.7	71.0 145.5 204.0
4.49 <i>d</i> (6.2)	1	71.0	43.1 69.7 115.3 119.4 145.5
6.86 <i>m</i>	1	116.0	115.3 119.4 161.0
7.06 <i>m</i>	1	119.4	71.0 115.0 116.0 136.8
7.55 <i>dd</i> (8.2, 7.5)	1	136.8	115.3 145.5 161.0
12.27 <i>s</i>	1	-	-

Fonte: próprio autor.

Tabela 38 — Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr3 P7 (600 e 150 MHz, DMSO- d_6) e comparação com dados da literatura para a (3S,4S)-3,4,8-trihidroxi-3,4-diidronaftalen-1(2H)-ona*.

Posição	Fr3 P7		(3S,4S)-3,4,8-trihidroxi-3,4-diidronaftalen-1(2H)-ona*	
	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)
1	204,0	-	203,7	-
2	43,1	2,65 (<i>dd</i> ; 17,1; 7,3) 2,99 (<i>dd</i> ; 17,1; 3,7)	42,9	2,72 (<i>dd</i> ; 17,2; 8,0) 3,11 (<i>dd</i> ; 17,2; 4,0)
3	69,7	3,99 (<i>ddd</i> ; 7,1; 6,3; 3,8)	69,4	4,05–4,11 <i>m</i>
4	71,0	4,49 (<i>d</i> ; 6,2)	70,2	4,63 (<i>d</i> ; 7,0)
4a	145,4	-	144,6	-
5	116,0	6,86 <i>m</i>	162,2	6,88 (<i>dd</i> ; 8,6; 0,6)
6	136,8	7,55 (<i>dd</i> ; 8,2; 7,5)	136,9	7,56 (<i>dd</i> ; 8,4; 7,4)
7	119,4	7,06 <i>m</i>	119,0	7,14 (<i>dt</i> ; 7,4; 0,6)
8	161,1	-	-	-
8a	115,3	-	115,6	-

*400 e 100 MHz, CD₃OD.

Fonte: adaptado de COUCHÉ et al., 2009.

O sinal mais intenso observado no cromatograma de pico de base foi o pico em $t_{\text{R}} = 2,88$ min (**Figura 103**), com um íon precursor em m/z 175,0388 no modo de ionização negativo. Esse valor representa uma diferença de 18 unidades de massa em relação à massa da substância identificada por RMN (194,0584), indicando que ela é produto de hidratação da amostra obtida inicialmente.

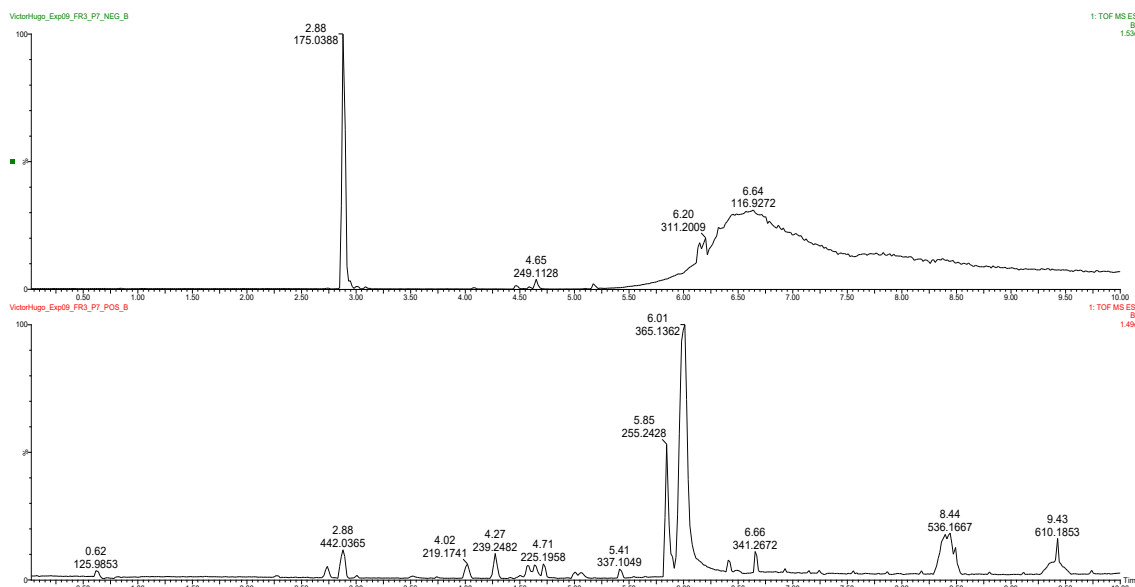


Figura 103 — Cromatogramas de pico base de UHPLC-MS/MS da amostra Fr3 P7. Modo de ionização negativa na parte superior e modo positivo na inferior.
Fonte: próprio autor.

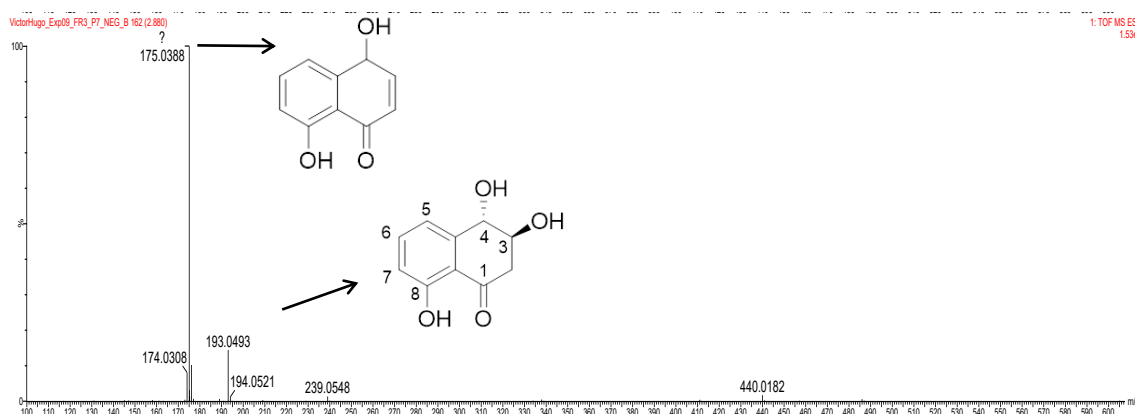


Figura 104 — Espectro de massas MS/MS da substância Fr3 P7. $t_R = 2,88$ min, *full scan*, modo negativo.
Fonte: próprio autor.

4.4.6 Exp9 Fr3 P10 e Exp9 Fr3 P13

Os experimentos de RMN, UHPLC-MS/MS e HPLC-DAD levaram à identificação da substância Fr3 P10 como a 6,8-diidroxi-3-metilisocroman-1-ona ou 6-hidroximeleína (**Figura 105**). Os espectros de RMN mostraram sinais diagnósticos como um duplo duplo quadrupletto para o H oximetínico H-3, dois dubletos para H aromáticos em acoplamento *meta*, e um sinal para carbonila de lactona conjugada com o anel aromático, consistentes com a estrutura de um derivado da isocumarina.

As isocumarinas apresentam ampla ocorrência como metabólitos secundários fúngicos e são derivadas da rota biossintética do acetato. A substância Fr3 P13 foi também identificada como uma isocumarina, a 5-metilmeleína (**Figura 106**), com base na análise de seus dados de RMN (**Tabelas 40 e 42**), e apresentou dados espectrométricos e espectroscópicos muito semelhantes aos da substância Fr3 P10.

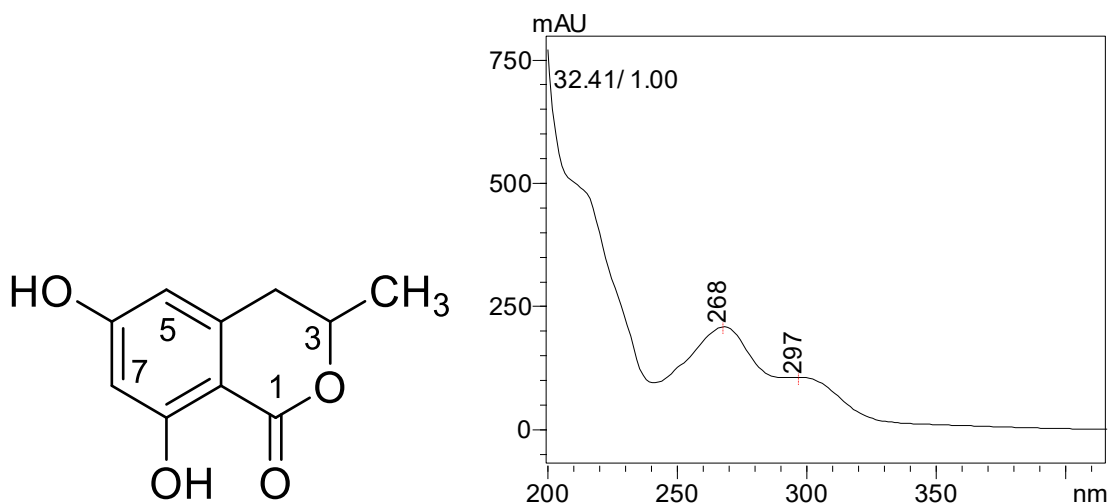


Figura 105 — Estrutura e espectro UV-Vis da substância Fr3 P10.

Fonte: próprio autor.

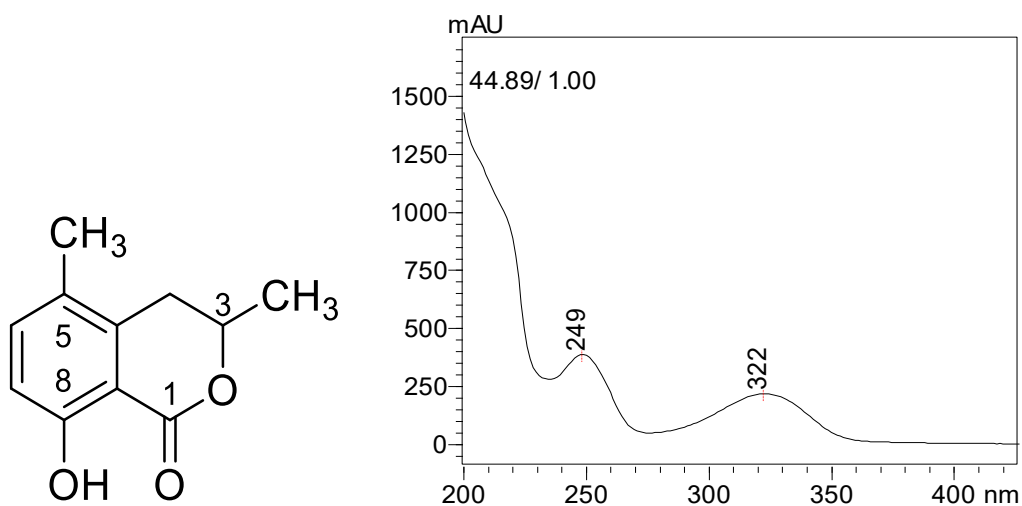


Figura 106 — Estrutura e espectro UV-Vis da substância Fr3 P13.

Fonte: próprio autor.

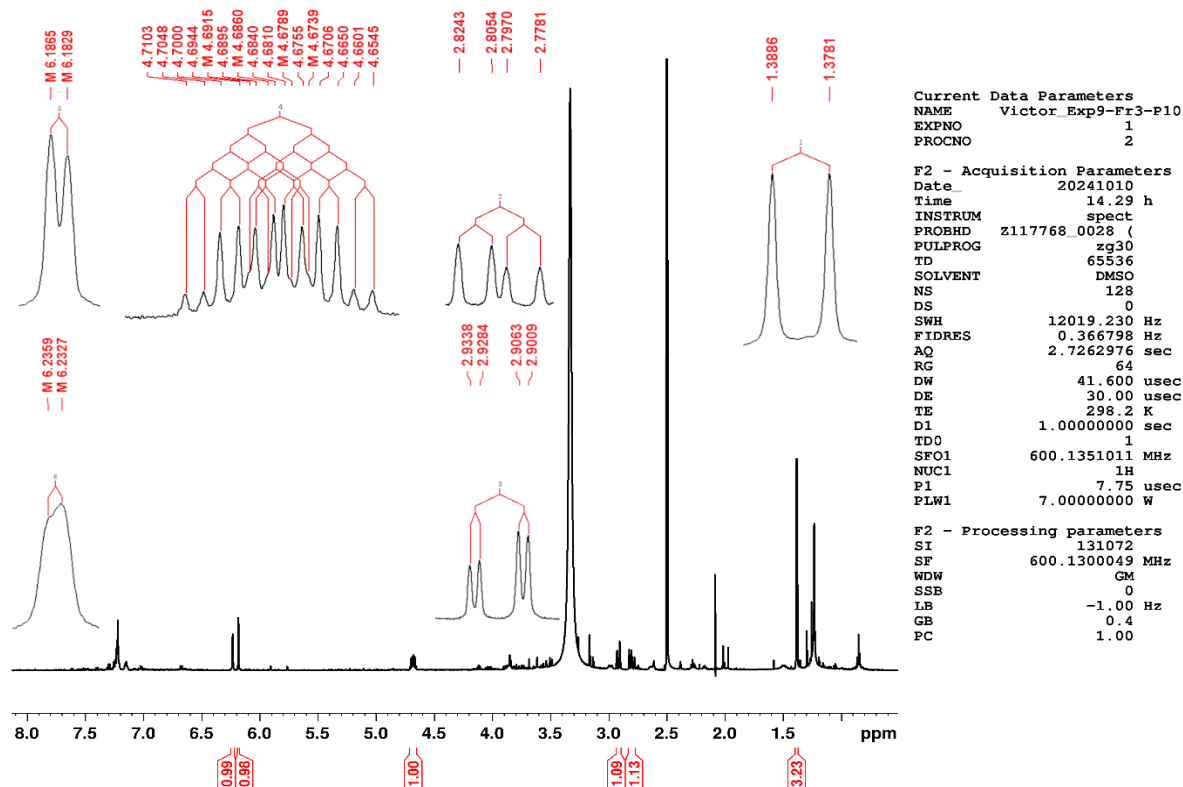


Figura 107 — Espectro de RMN de ^1H da substância Fr3 P10 (DMSO- d_6 , 600 MHz).
Fonte: próprio autor.

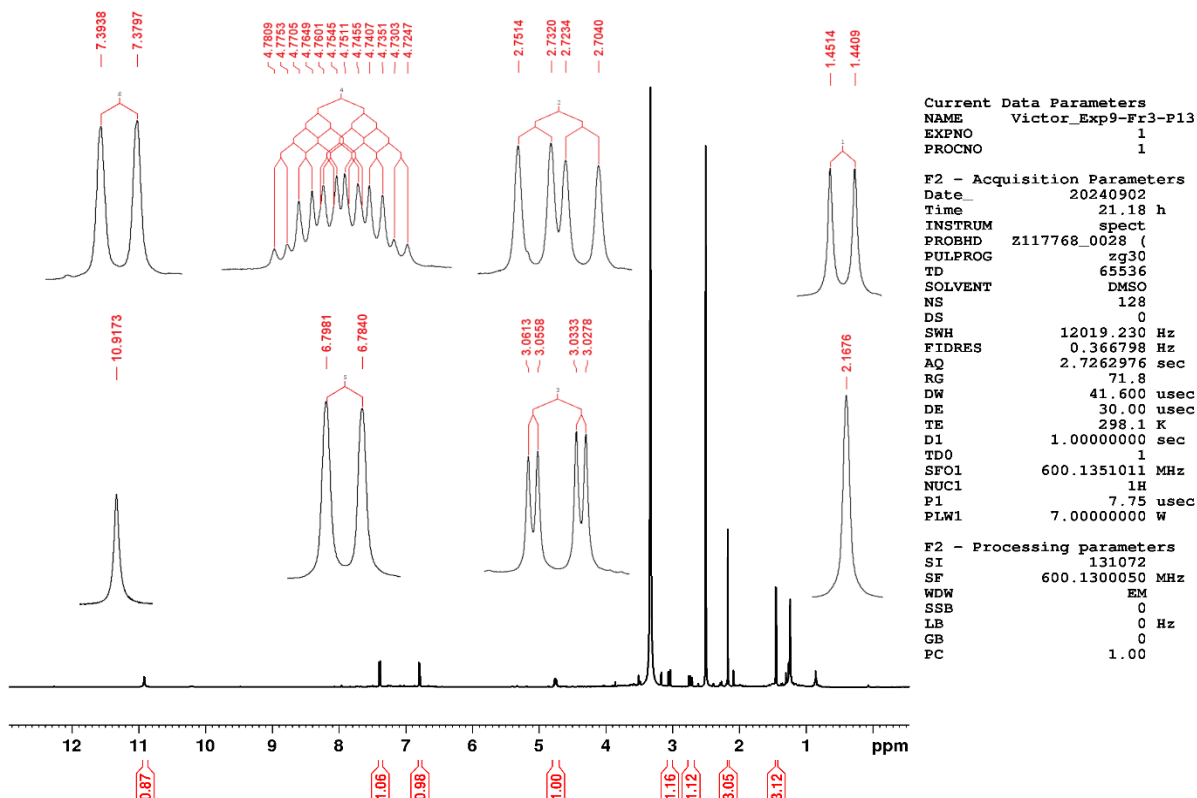


Figura 108 — Espectro de RMN de ^1H da substância Fr3 P13 (DMSO- d_6 , 600 MHz).
Fonte: próprio autor.

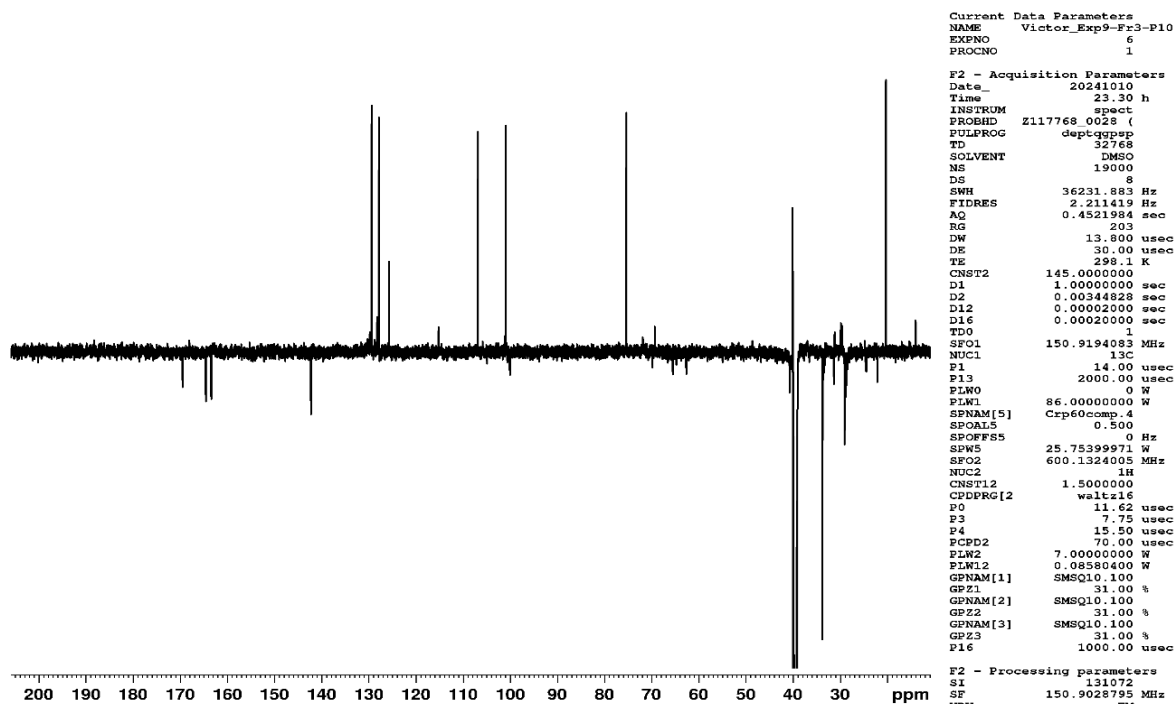


Figura 109 — Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) da substância Fr3 P10 (DMSO- d_6 , 150 MHz). Sinais negativos referentes aos carbonos quaternários e metilênicos.
Fonte: próprio autor.

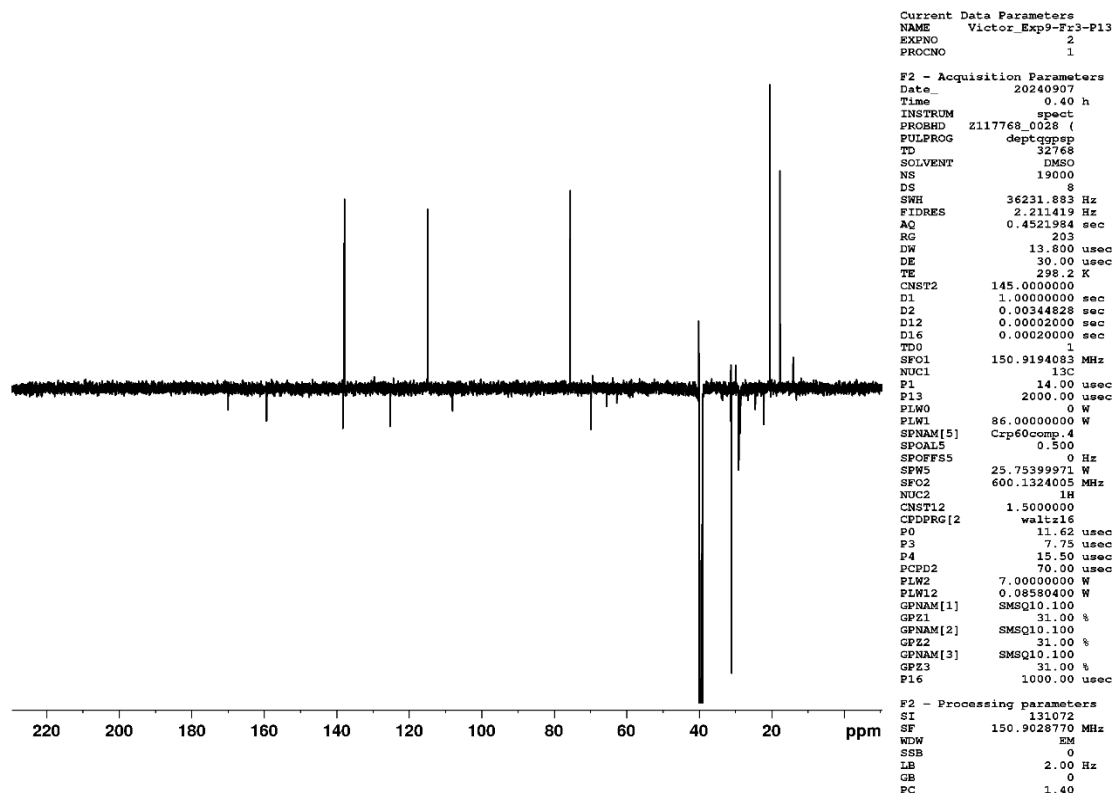
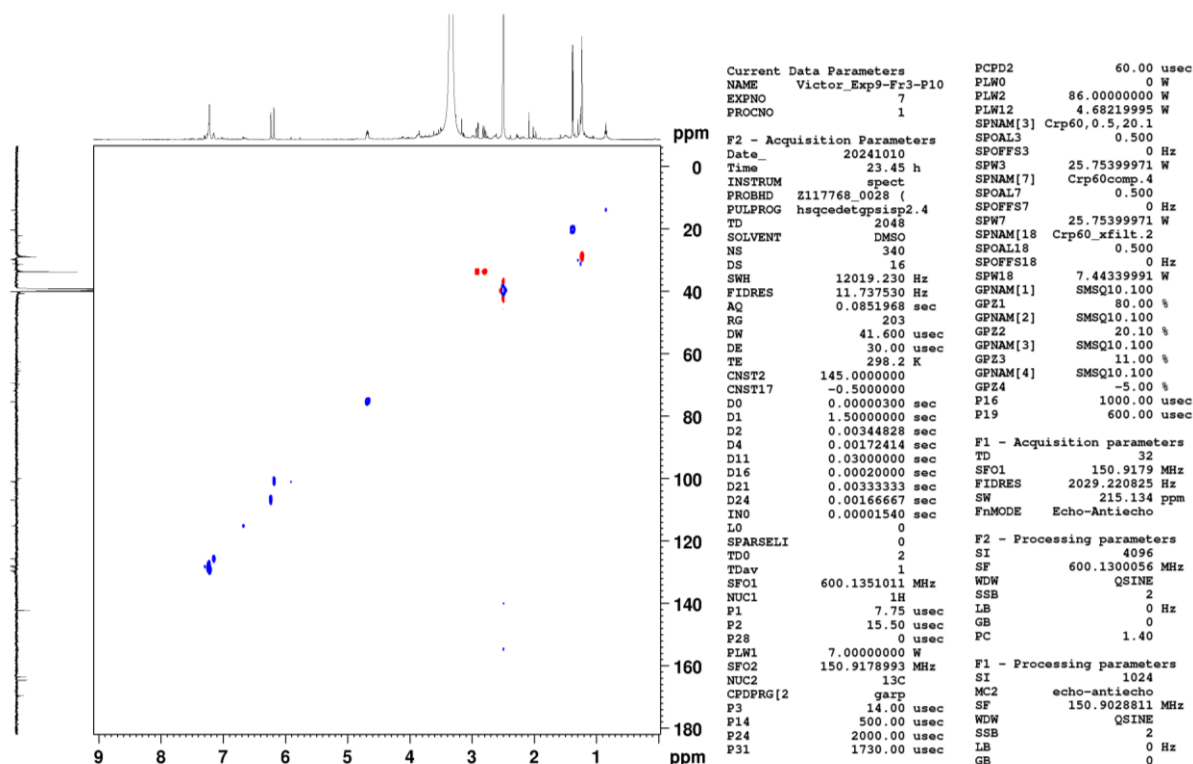


Figura 110 — Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) da substância Fr3 P13 (DMSO- d_6 , 150 MHz). Sinais negativos referentes aos carbonos quaternários e metilênicos.
Fonte: próprio autor.



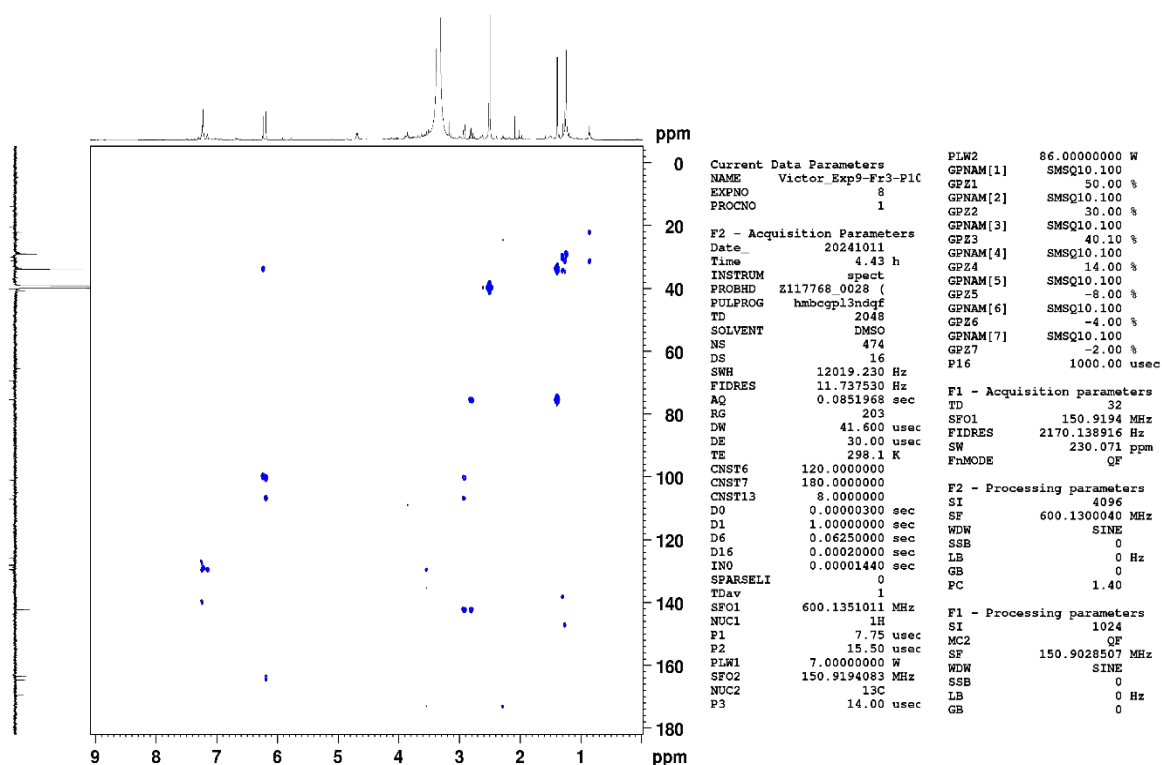


Figura 113 — Mapa de contorno de HMBC da substância Fr3 P10.

Fonte: próprio autor.

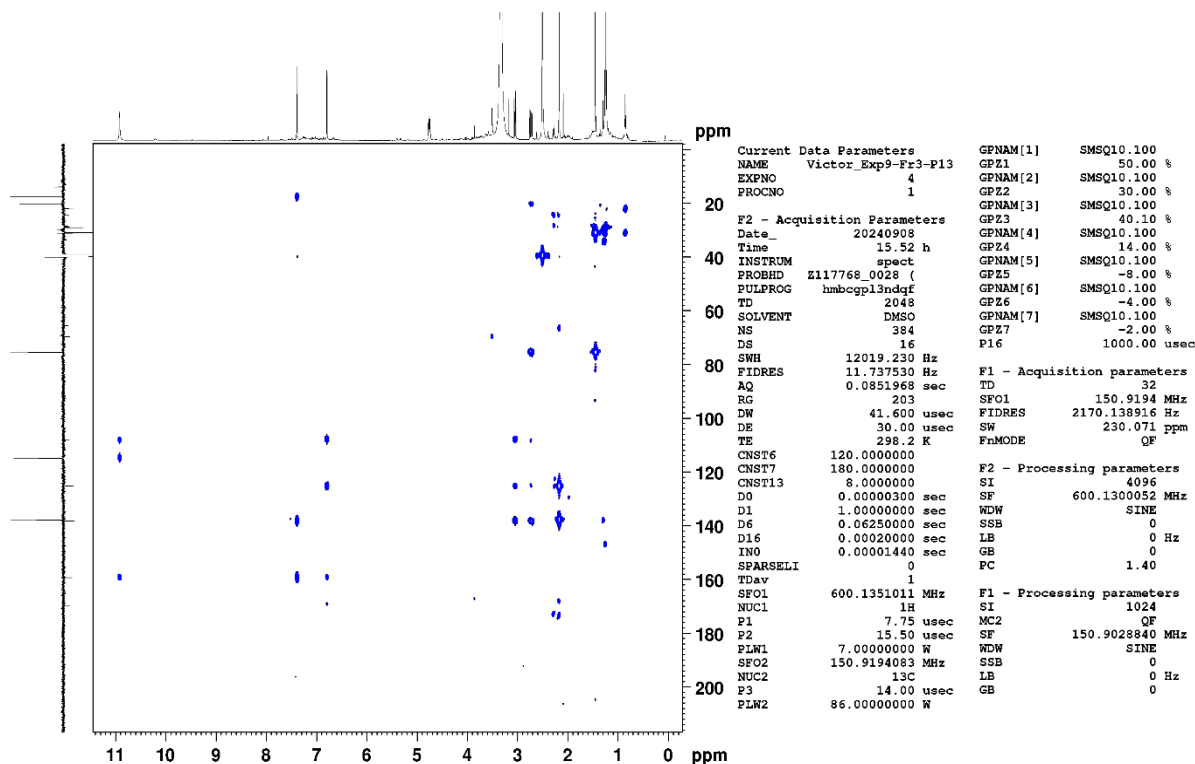


Figura 114 — Mapa de contorno de HMBC da substância Fr3 P13.

Fonte: próprio autor.

Tabela 39 — Sinais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância Fr3 P10 e correlações observadas nos experimentos 2D de RMN.

δ_{H}	J	δ_{C}	HMBC
1.38 <i>d</i> (6.3)	3	20.3	33.7 75.3
2.80 <i>dd</i> (16.3, 11.3)	1	33.7	20.3 75.3 106.8 142.2
2.91 <i>dd</i> (16.5, 3.2)	1	33.7	100.0 106.8 142.2
4.68 <i>dqd</i> (11.3, 6.2, 3.3)	1	75.3	
6.18 <i>d</i> (2.1)	1	100.8	100.0 106.8 163.4
6.23 <i>d</i> (1.9)	1	106.8	33.7 100.0 100.8 164.5

Fonte: próprio autor.

Tabela 40 — Sinais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância Fr3 P13 e correlações observadas nos experimentos 2D de RMN.

δ_{H}	J	δ_{C}	HMBC
1.44 <i>d</i> (6.3)	3	20.4	31.0 75.5
2.16 <i>s</i>	3	17.6	125.3 137.8 138.2
2.72 <i>dd</i> (16.8, 11.6)	1	30.9	20.4 75.6 108.0 125.3 138.2
2.91 <i>dd</i> (16.5, 3.2)	1	33.7	108.0 125.3 138.2
4.75 <i>dqd</i> (11.6, 6.3, 3.3)	1	75.5	
6.79 <i>d</i> (8.3)	1	114.9	108.0 125.3 159.3
7.38 <i>d</i> (8.4)	1	137.8	17.6 138.2 159.3
10.9 <i>s</i>	1	-	108.0 114.9 159.3

Fonte: próprio autor.

Tabela 41 — Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr3 P10 (600 e 150 MHz, DMSO- d_6) e comparação com dados da literatura para a 6-Hidroximeleína*.

Posição	Fr3 P10		6-Hidroximeleína*	
	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)
1	169,5	-	170,5	-
3	75,3	4,68 (<i>dqd</i> ; 11,3; 6,2; 3,3)	76,2	4,66 (<i>dq</i> ; 6,2; 5,5)
3-CH ₃	20,3	1,38 (<i>d</i> ; 6,3)	20,6	1,51 (<i>d</i> ; 6,2)
4	33,7	2,91 (<i>dd</i> ; 16,5; 3,2) 2,80 (<i>dd</i> ; 16,3; 11,3)	34,9	2,84 (<i>sl</i>) 2,85 (<i>d</i> ; 5,5)
4a	142,2	-	143,0	-
5	106,8	6,23 (<i>d</i> ; 1,9)	107,3	6,31 (<i>d</i> ; 2,3)
6	164,5	-	165,1	-
7	100,8	6,18 (<i>d</i> ; 2,1)	101,8	6,20 (<i>d</i> ; 2,3)
8	163,4	-	165,0	-
8a	100,0	-	101,5	-

*500 e 125 MHz, acetona- d_6 .

Fonte: adaptado de SHIMADA et al., 2002.

Tabela 42 — Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr3 P13 (600 e 150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) e comparação com dados da literatura para a 5-Metilmeleína*.

Posição	Fr3 P13		5-Metilmeleína*	
	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)
1	169,5	-	169,9	-
3	75,3	4,75 (<i>dqd</i> ; 11,6; 6,3; 3,3)	75,5	4,75 <i>m</i>
3-CH ₃	20,3	1,44 (<i>d</i> ; 6,3)	20,4	1,45 (<i>d</i> ; 6,3)
4	30,9	3,04 (<i>dd</i> ; 16,8; 3,3) 2,72 (<i>dd</i> ; 16,8; 11,6)	31,0	3,05 (<i>dd</i> ; 16,8; 3,4) 2,73 (<i>dd</i> ; 16,8; 11,6)
4a	138,2	-	138,2	-
5	125,3	-	125,2	-
3-CH ₃	17,6	2,16 (<i>s</i>)	17,6	2,17 (<i>s</i>)
6	137,8	7,38 (<i>d</i> ; 8,4)	137,8	7,38 (<i>d</i> ; 8,6)
7	114,9	6,79 (<i>d</i> ; 8,3)	114,9	6,79 (<i>d</i> ; 8,6)
8	159,3	-	159,4	-
8a	108,0	-	108,1	-
8-OH	-	10,9 (<i>s</i>)	-	10,9 (<i>s</i>)

*600 e 150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$.

Fonte: adaptado de SHIGEMOTO et al., 2018.

Foi observado um sinal intenso, em $t_{\text{R}} = 3,84$ min, no cromatograma de cada modo de ionização da isocumarina Fr3 P10 (**Figura 115**), com íons precursores em m/z 195,0650 $[\text{M}+\text{H}]^+$ e m/z 193,0495 $[\text{M}-\text{H}]^-$. O valor de massa encontrado representa um erro de $-5,8$ ppm em relação à massa teórica da 6-Hidroximeleína $[\text{M}-\text{H}]^-$ (193,0506), valor próximo da estrutura proposta.

Os dados obtidos por HPLC-MS/MS da substância Fr3 P13 mostraram um Íon precursor em m/z 193,0858 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($t_{\text{R}} = 4,89$ min) (**Figura 117**). Esse valor de massa representa um erro de 0,6 ppm em relação à massa teórica da 5-Metilmeleína (193,0859). Nos espectros MS/MS, de ambas as substâncias, foram detectadas fragmentações com perda de H_2O (18 Da) e CO (28 Da) (**Figuras 116 e 118**).

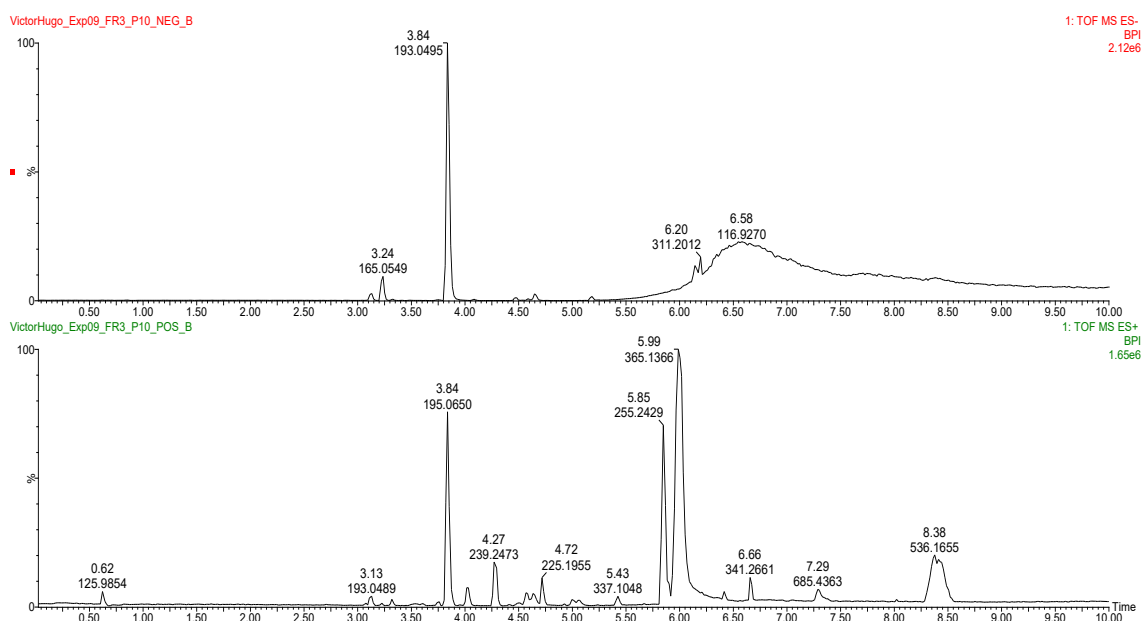


Figura 115 — Cromatogramas de pico base de UHPLC-MS/MS da amostra Fr3 P10. Modo de ionização negativa na parte superior e modo positivo na inferior.
Fonte: próprio autor.

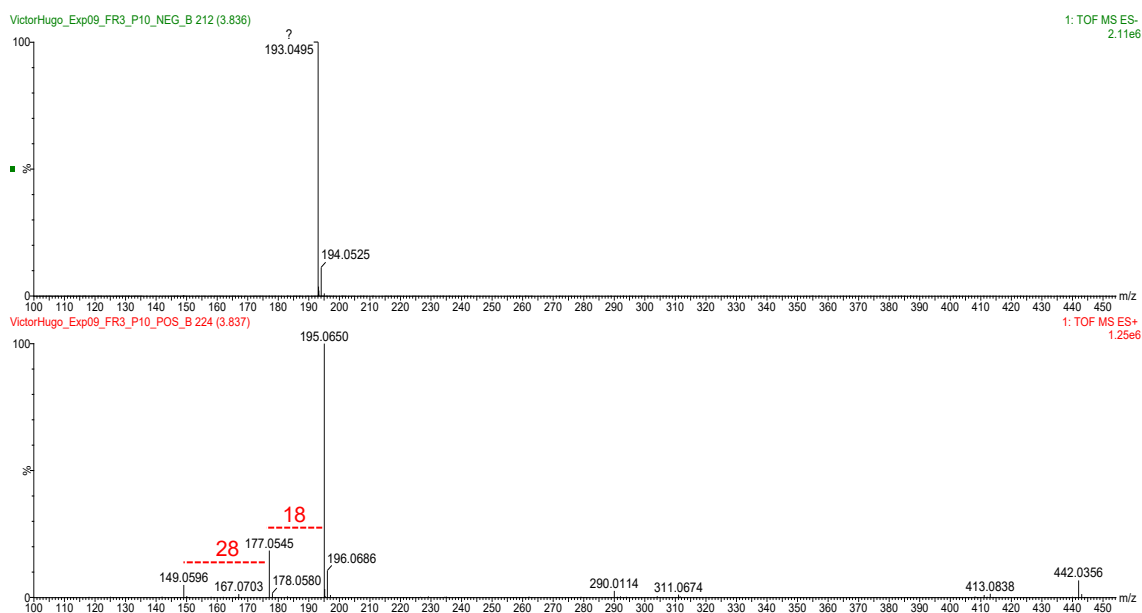


Figura 116 — Espectro de massas MS/MS da substância Fr3 P10. $t_R = 3,84$ min, *full scan*, modo negativo e positivo.
Fonte: próprio autor.

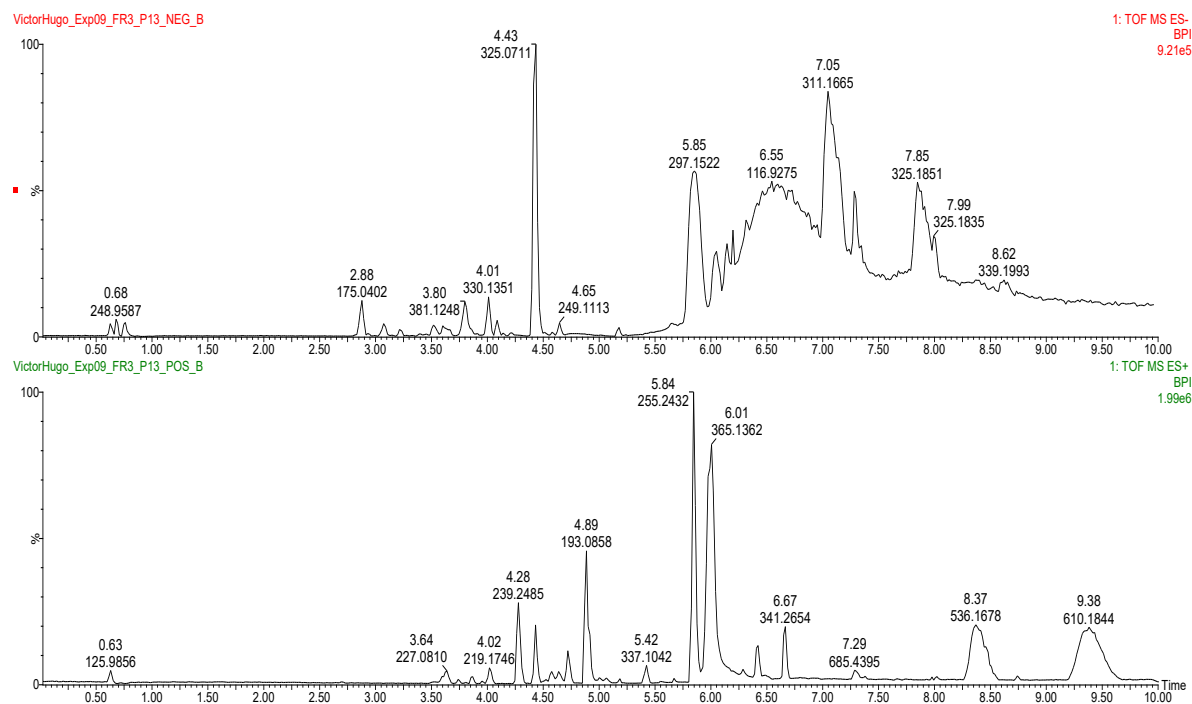


Figura 117 — Cromatogramas de pico base de UHPLC-MS/MS da amostra Fr3 P13. Modo de ionização negativa na parte superior e modo positivo na inferior.

Fonte: próprio autor.

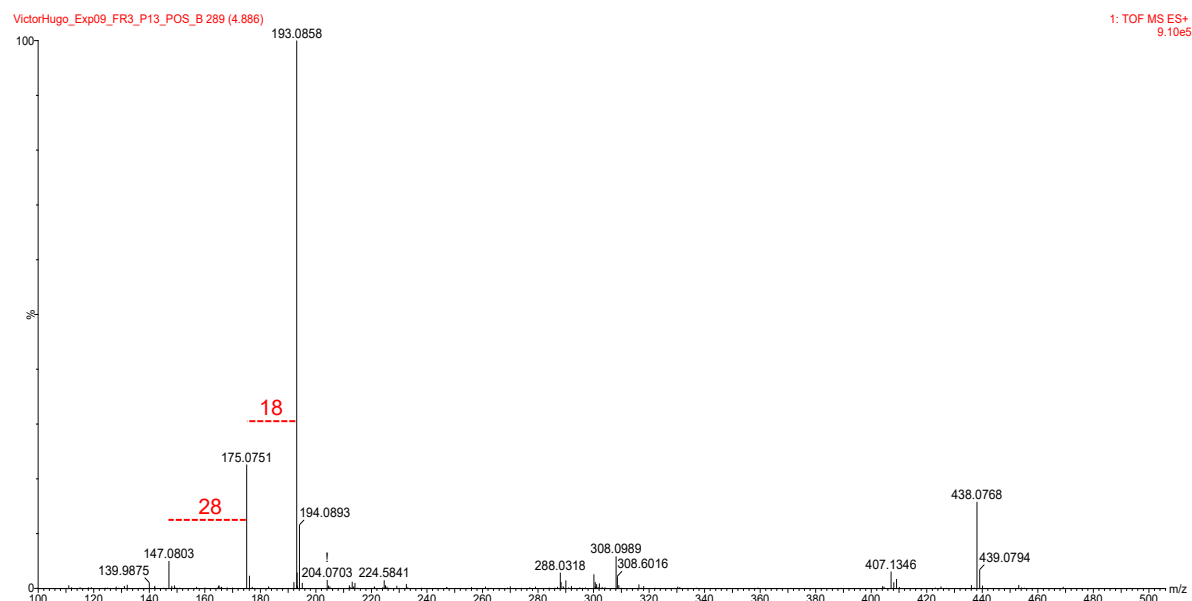


Figura 118 — Espectro de massas MS/MS da substância Fr3 P13. $t_R = 4,89$ min, *full scan*, modo positivo.

Fonte: próprio autor.

4.4.7 Exp9 Fr3 P14

A análise dos dados espectroscópicos e espectrométricos da substância Fr3 P14 permitiu sua determinação estrutural como a 4-hidroxi-3',4'',6'-trimetoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-2',5'-diona (0,4 mg). Sua estrutura é um derivado de *p*-terfenilquinona, uma classe de metabólitos predominantemente sintetizada por fungos (XU et al., 2018). Diversos derivados dessa classe já foram identificados na literatura, mas nenhuma com o padrão de substituição de metoxilas e hidroxilas da estrutura proposta.

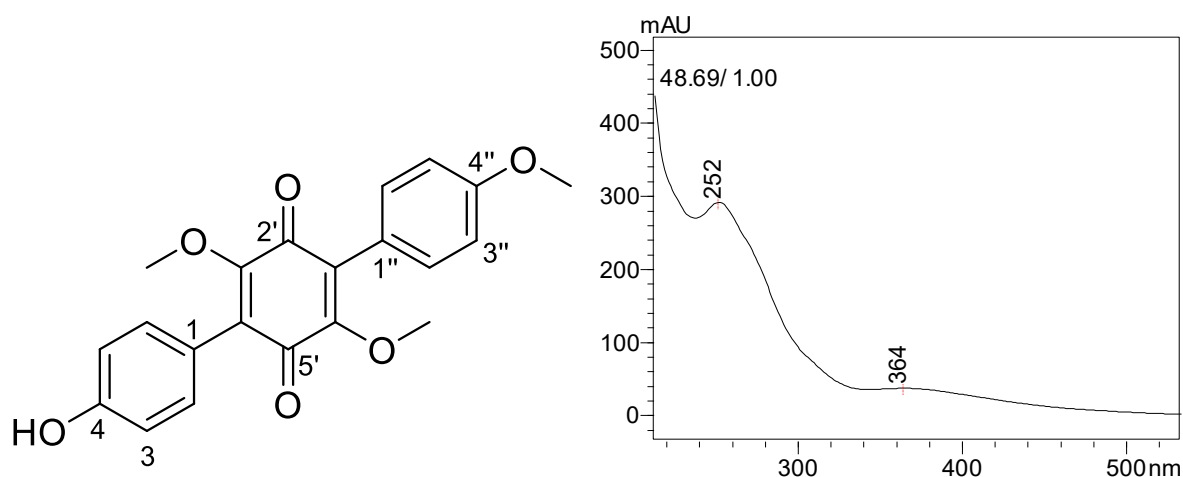


Figura 119 — Estrutura e espectro UV-Vis da substância Fr3 P14.
Fonte: próprio autor.

Seu espectro de ^1H RMN é relativamente simples (**Figura 120**), apresentando 4 multipletos característicos de hidrogênios aromáticos em anéis *para*-disubstituídos e 3 singletos característicos de metoxilas. O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 121**) foi também essencial para a elucidação estrutural, principalmente por permitir identificar os sinais para duas carbonilas e outros 8 carbonos quaternários dos anéis.

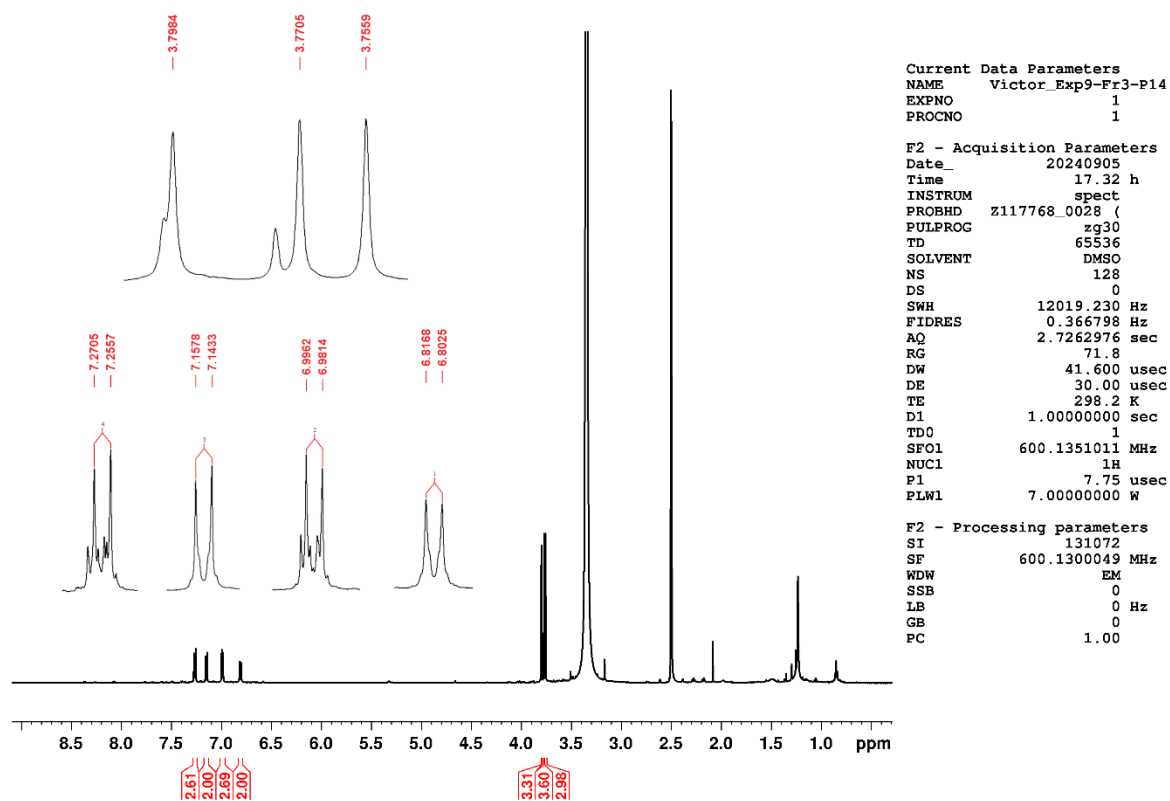


Figura 120 — Espectro de RMN de ^1H da substância Fr3 P14 (DMSO- d_6 , 600 MHz).
Fonte: próprio autor.

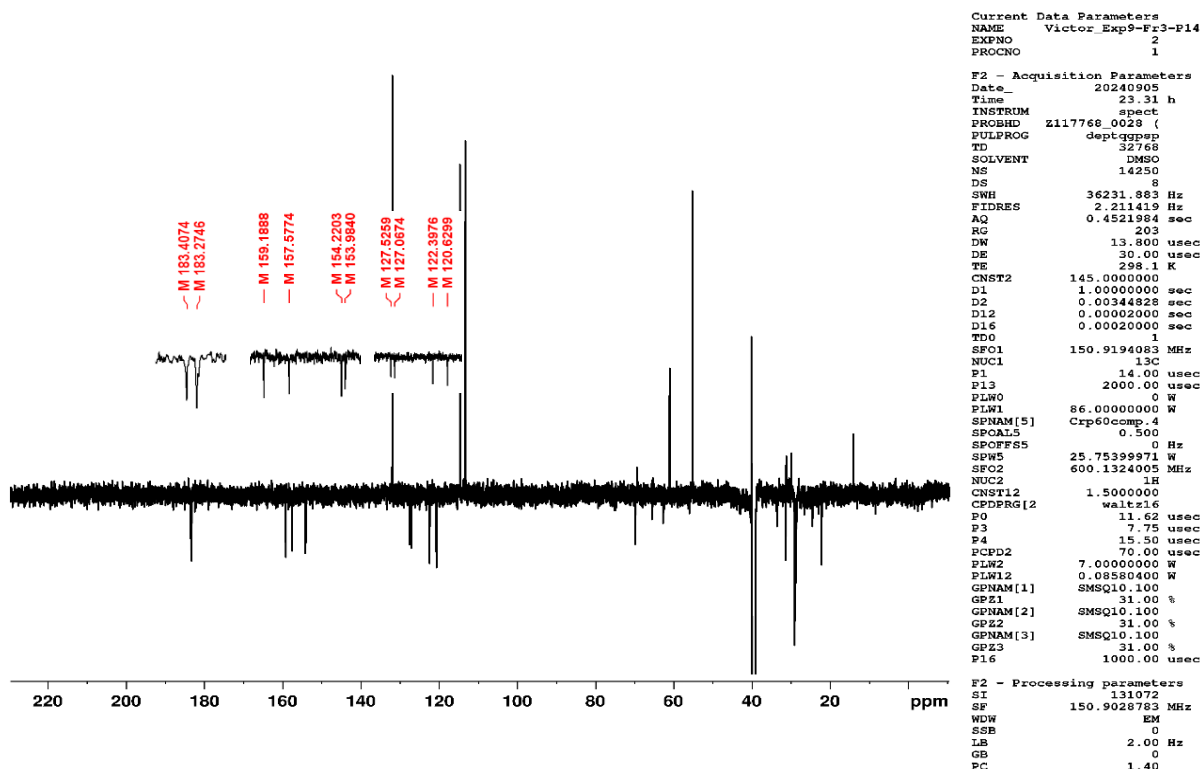


Figura 121 — Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) da substância Fr3 P14 (DMSO- d_6 , 150 MHz).
Sinais negativos referentes aos carbonos quaternários e metilênicos.
Fonte: próprio autor.

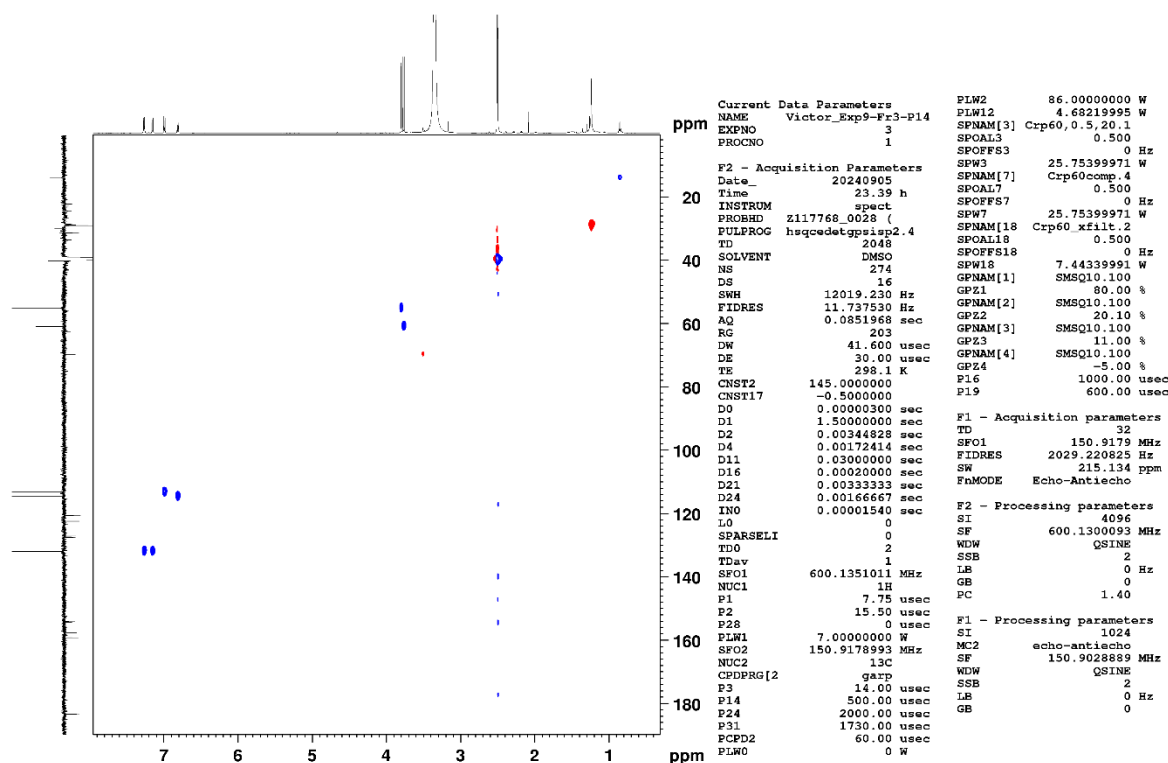


Figura 122 — Mapa de contorno de HSQC da substância Fr3 P14. Carbonos metilênicos nas correlações em vermelho.

Fonte: próprio autor.

Os dados do experimento de HMBC (**Figura 123**) foi especialmente importante para determinar corretamente a posição dos carbonos quaternários e aromáticos da estrutura. Por fim, foi feita a busca dos dados de RMN de terfenilquinonas similares para comparação com os dados obtidos. A terfenilquinona Floricolin O (**Figura 124**), isolada anteriormente do fungo *Floricola striata*, apresenta estrutura similar à da substância Fr3 P14, com um grupo fenil metoxilado conectado ao anel central, e foi usada para comparação (**Tabela 44**) e confirmação da estrutura proposta para Fr3 P14.

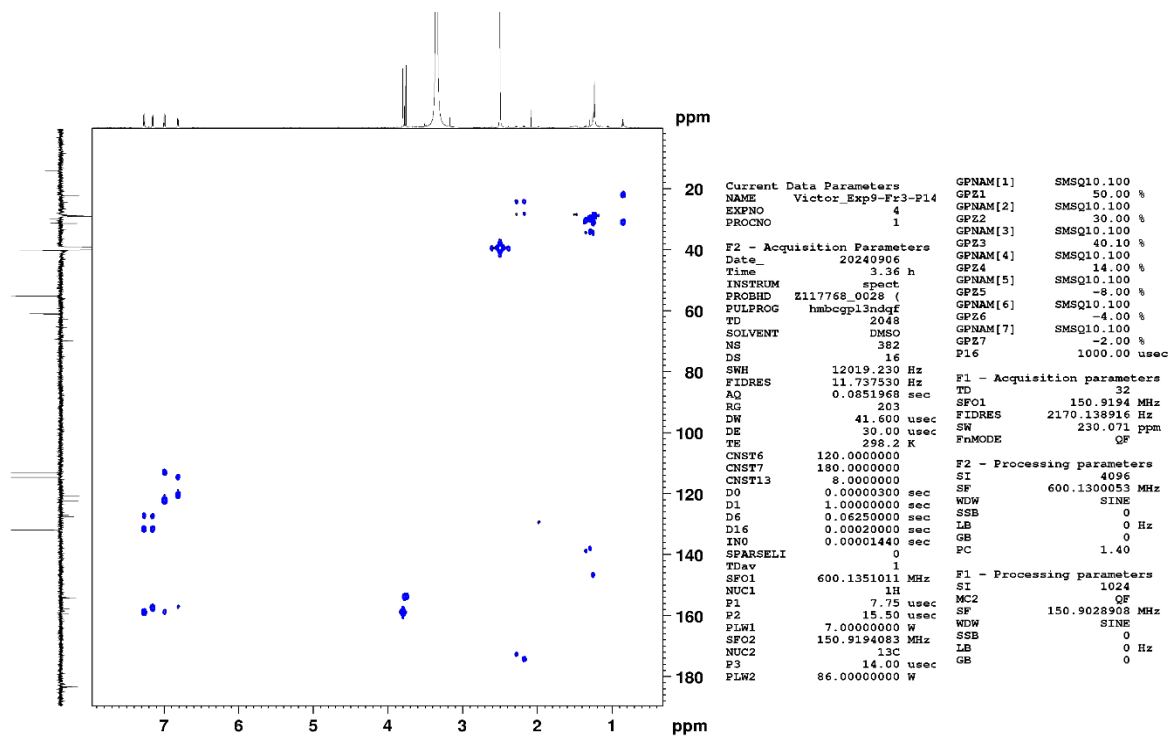


Figura 123 — Mapa de contorno de HMBC da substância Fr3 P14.
Fonte: próprio autor.

Tabela 43 — Sinais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância Fr3 P14 e correlações observadas nos experimentos 2D de RMN.

δ_{H}	$\int$	δ_{C}	HMBC
3.75 s	3	60.9	154.0
3.77 s	3	61.0	154.2
3.79 s	3	55.1	159.2
6.81 m (AA'BB')	2	114.6	114.6 120.6 157.5
6.99 m (AA'BB')	2	113.2	113.2 122.4 159.2
7.15 m (AA'BB')	2	131.9	127.5 131.9 157.5
7.26 m (AA'BB')	2	131.8	127.0 131.8 159.2

Fonte: próprio autor.

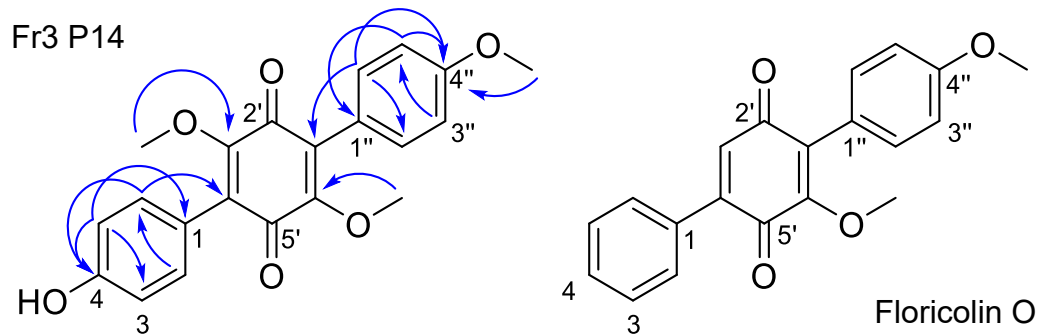


Figura 124 — Correlações $J_{\text{H-C}}$ observadas no experimento HMBC (setas azuis) para Fr3 P14 e estrutura da Floricolin O.
Fonte: próprio autor.

Tabela 44 — Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para Fr3 P14 (600 e 150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) e comparação com dados da literatura para a Floricolin O*.

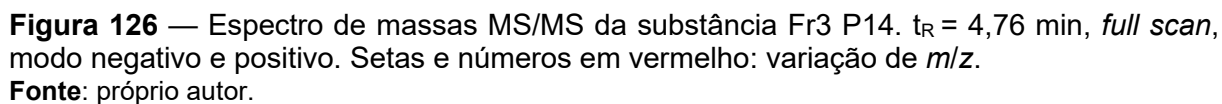
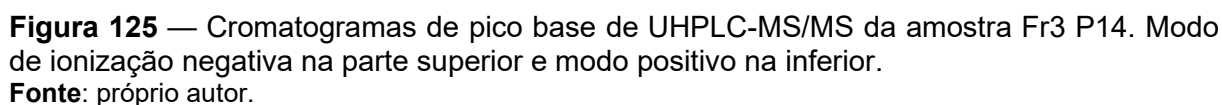
Posição	Fr3 P14		Floricolin O*	
	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm) e J (mult. e Hz)
1	120,6	-	132,7	-
2/6	131,9	7,15 <i>m</i> (AA'BB')	129,4	7,59 <i>m</i>
3/5	114,6	6,81 <i>m</i> (AA'BB')	128,3	7,49 <i>m</i>
4	157,5	-	129,7	7,49 <i>m</i>
1'	127,0	-	128,2	-
2'	183,2	-	187,0	-
3'	154,2	-	131,8	6,94 <i>s</i>
4'	127,5	-	144,2	-
5'	183,4	-	182,6	-
3'-CH ₃	61,0	3,79 <i>s</i>	-	-
6'	154,0	-	155,2	-
6'-CH ₃	60,9	3,75 <i>s</i>	60,8	3,84 <i>s</i>
1''	122,4	-	122,3	-
2''/6''	131,8	7,26 <i>m</i> (AA'BB')	131,9	7,27 (<i>d</i> ; 8,8)
3''/5''	113,2	6,99 <i>m</i> (AA'BB')	113,2	7,01 (<i>d</i> ; 8,8)
4''	159,2	-	159,2	-
4''-CH ₃	55,1	3,79 <i>s</i>	55,1	3,80 <i>s</i>

*400 e 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$.

Fonte: adaptado de XU et al., 2018.

Os cromatogramas de pico base apresentaram sinais intensos em $t_{\text{R}} = 4,76$ min nos dois modos de ionização (**Figura 125**). O Íon precursor em $m/z = 367,1190$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ representa um erro de 3,5 ppm em relação à massa teórica da 4-hidroxi-3',4'',6'-trimetoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-2',5'-diona (367,1176) $[\text{M}+\text{H}]^+$. No modo negativo foi detectado um íon em $m/z = 365,1033$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ com um erro de 0,6 ppm em relação à massa teórica.

No espectro de segunda ordem (MS/MS) de modo negativo de ionização (ESI⁻), mostrado na **Figura 126**, foram observadas perdas de massas referentes às



5 CONCLUSÃO

A abordagem de cultivo em placas de 6 poços revelou que o uso de moduladores epigenéticos influenciou significativamente a produção metabólica do fungo *Hypoxylon investiens*. Altas concentrações de butirato de sódio (500 mM) e SAHA (1000 μ M) resultaram em inibição completa ou parcial do crescimento fúngico, indicando uma necessidade de controle das concentrações desses compostos visando ao efeito indutor de atividade metabólica dos moduladores epigenéticos selecionados para uso neste trabalho.

As análises dos extratos obtidos em meios de cultivo contendo moduladores epigenéticos, realizadas com a plataforma GNPS demonstraram que a diversidade química aumentou com o uso dos moduladores. Dentre eles, SAHA, 5-Azacitidina e Nicotinamida foram os mais eficazes em gerar um maior número total de nós nas redes moleculares, destacando-se SAHA (451 nós), 5-Azacitidina (464 nós) e Nicotinamida (457 nós). Por outro lado, em termos de metabólitos exclusivos, a Procaína (129 nós exclusivos) e SAHA, na concentração de 1000 μ M (64 nós exclusivos), foram os moduladores mais eficazes.

Os experimentos com planejamento Plackett-Burman reforçaram esses resultados, além de permitir identificar variáveis físico-químicas significativas para o aumento da diversidade química. As melhores condições identificadas foram temperaturas mais baixas (23°C), ausência de agitação e o uso de moduladores específicos: SAHA, Nicotinamida, Butirato de sódio (NaBut) e Procaína.

O uso da metodologia de *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN) foi essencial nessa etapa, permitindo quantificar os *features* para serem usados como resposta no planejamento experimental. Nessa etapa, foi possível anotar substâncias produzidas pela ação do fungo, destacando-se a 4-hidróximeleina, a *N*-(2-Feniletil)pentanamida e o ácido anidrobrasílico, que pode possuir atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana.

Os extratos selecionados para cultivo ampliado (Exp1 e Exp9) permitiram o isolamento de diversas substâncias, cuja caracterização estrutural foi realizada por análise dos dados de RMN e espectrometria de massas. Do extrato Exp1 Fr1 foram isoladas e identificadas as dicetopiperazinas ciclo(Pro-Tir), ciclo(Pro-Phe), ciclo(Pro-Val), ciclo(Pro-Ile) e ciclo(Pro-Leu). O extrato Exp9 Fr3 destacou-se especialmente

pelo isolamento de uma terfenilquinona, possivelmente inédita, identificada como 4-hidroxi-3',4'',6'-trimetoxi-[1,1':4',1''-terfenil]-2',5'-diona. Também foram isolados derivados fenólicos, como o 4-(2-hidroxietil)fenol, 6-hidroximeleína, 5-metilmeleína e (3S,4S)-3,4,8-trihidroxi-3,4-diidronaftalen-1(2H)-ona.

Nos ensaios de atividade biológica, diversos extratos e frações apresentaram potencial significativo. As amostras PB01, PB02, PB03, Exp9 Fr1 e Exp9 Fr3 demonstraram atividade citotóxica, especialmente contra a linhagem HCT-116, indicando seletividade relevante frente a células tumorais. Além disso, os extratos PB03 e PB12 demonstraram atividade antifúngica moderada contra *Candida albicans*, sugerindo potencial terapêutico dos metabólitos do fungo.

Os resultados obtidos reforçam a relevância dos fungos endofíticos marinhos como fontes promissoras de novos compostos bioativos. De forma complementar, os resultados corroboram a premissa de interferência no metabolismo fúngico, reativando vias biossintéticas silenciadas, por exemplo, por meio de moduladores epigenéticos, para incremento na quimiodiversidade. A abordagem multidisciplinar, com destaque para a quimiometria e ferramentas metabolômicas, adotada neste estudo não só ampliou o conhecimento sobre o metabolismo especializado de *H. investiens*, como também estabeleceu metodologia eficaz para futuros estudos de bioprospecção, que podem contribuir significativamente para o desenvolvimento de novos fármacos e produtos biotecnológicos.

Assim, ressaltamos também a importância do ambiente marinho brasileiro como um local de grande potencial químico e biotecnológico, que pode providenciar descobertas inovadoras com impactos socioeconômicos e ambientais. Merece destaque ainda, o alinhamento deste estudo aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da ONU, especialmente o ODS 3, associado ao bem estar e melhoria da saúde, ODS 14, direcionado à conservação e uso sustentável dos oceanos, dos mares e dos recursos marinhos para o desenvolvimento sustentável, e também o ODS 13, que propõe ações voltadas ao enfrentamento das mudanças climáticas e seus efeitos, considerando que os achados deste trabalho fornecem informações importantes para aprofundar o conhecimento sobre o metabolismo de fungos e suas interações ecológicas que podem contribuir para a conservação dos ambientes marinhos.

REFERÊNCIAS

- AGHCHEH, R. K.; KUBICEK, C. P. Epigenetics as an emerging tool for improvement of fungal strains used in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 15, p. 6167–6181, 2015.
- ANTONY, J. Fractional Factorial Designs. **Design of Experiments for Engineers and Scientists**, p. 87–112, 2014.
- ASHOK, A. et al. Epigenetic Regulation of Optic Nerve Development, Protection, and Repair. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 16, 2022.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Editora da Unicamp. Campinas, SP. 2001.
- BECKER, K. et al. Phylogenetic assignment of the fungicolous *Hypoxylon invadens* (Ascomycota, xylariales) and investigation of its secondary metabolites. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1–14, 2020.
- BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 382–431, 2016.
- CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de experimentos usando o Statistica**. E-Papers Serviços Editoriais. Rio de Janeiro. 2003.
- CHANG, H. et al. Inhibitory Effects of Constituents of an Endophytic Fungus *Hypoxylon investiens* on Nitric Oxide and Interleukin-6 Production in RAW264.7 Macrophages. **Chemistry & Biodiversity**, v. 11, p. 949–961, 2014.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M27-A3**: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, v. 28, n.14, 2008.
- COUCHÉ, E. et al. Stereoselective Synthesis of cis- and trans-3,4-Dihydro-3,4,8-,” **Helv. Chim. Acta**, v. 92, p. 903–917, 2009.
- DA SILVA, R. R.; DORRESTEIN, P. C.; QUINN, R. A. Illuminating the dark matter in metabolomics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 41, p. 12549–12550, 2015.
- DAFERNER, M. et al. Hypoxysordarin, a new sordarin derivative from *Hypoxylon croceum*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 54, n. 7/8, p. 474-480, 1999.
- DAI, J. et al. New Naphthalene-Chroman Coupling Products from the Endophytic Fungus, *Nodulisporium* sp. from *Erica arborea*. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 10, p. 1564–1569, 2009.

DING, W. et al. Investigation on Metabolites in Structure and Biosynthesis from the Deep-Sea Sediment-Derived Actinomycete *Janibacter* sp. SCSIO 52865. **Molecules**, v. 28, n. 5, 2023.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 1–49, 2001.

FRISVAD, J. C. Fungal Secondary Metabolism. **Fungal Secondary Metabolism: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, v. 944, p. 47–58, 2012.

FUKAI, M. et al. Antiangiogenic activity of hypoxylonol C. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 4, p. 1065-1068, abr. 2014.

FDHILA, F. et al. DD-Diketopiperazines: Antibiotics Active against *Vibrio anguillarum* Isolated from Marine Bacteria Associated with Cultures of *Pecten maximus*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 10, p. 1299-1301, 2003.

FUKAI, M. et al. Hypoxylonols C-F, Benzo[j]fluoranthenes from *Hypoxylon truncatum*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 1, p. 22-25, jan. 2012.

GASPAR, A. et al. Biological and Medicinal Properties of Natural Chromones and Chromanones. **ACS Omega**, v. 9, n. 20, p. 21706–21726, 2024.

GAIDUKEVICH, V. A. et al. Synthesis of 3-Benzylhexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-1,4-dione. **Russian Journal of Organic Chemistry**, v. 54, n. 10, p. 1562–1564, 2018.

GENOVESE, G. et al. The Mediterranean red alga *Asparagopsis taxiformis* has antifungal activity against *Aspergillus* species. **Mycoses**, v. 56, n. 5, p. 516–519, 2013.

GERWICK, W. H.; MOORE, B. S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 1, p. 85–98, Jan 2012.

GREFF, S. et al. Mahorones, highly brominated cyclopentenones from the red alga *Asparagopsis taxiformis*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 5, p. 1150–1155, abr. 2014.

GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M. 2021. **AlgaeBase**. National University of Ireland, Galway. Disponível em: <<https://www.algaebase.org>>. Acesso em 5 julho 2020.

HU, Y. et al. Statistical Research on the Bioactivity of New Marine Natural Products Discovered during the 28 Years from 1985 to 2012. **Marine Drugs**, v. 13, p. 202–221, 2015.

HYDE, K. Refined families of Sordariomycetes. **Mycosphere**, v. 11, n. 1, p. 305–1059, 2020.

IBRAHIM, S. R. M. et al. Fungal Naphthalenones; Promising Metabolites for Drug Discovery: Structures, Biosynthesis, Sources, and Pharmacological Potential. **Toxins**, v. 14, n. 2, p. 154, 2022.

INTARAUDOM, C. et al. Terphenyl derivatives and drimane–Phthalide/isoindolinones from *Hypoxylon fendleri* BCC32408. **Phytochemistry**, v. 139, p. 8–17, 2017.

JIA, M. et al. A Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants: A Systematic Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–14, Jun. 2016.

JOOSTEN, S. C. et al. Epigenetics in renal cell cancer: mechanisms and clinical applications. **Nature Reviews Urology**, v. 15, n. 7, p. 430–451, 2018.

KANG, J. H. et al. Neuroprotective Effects of N-acetylserotonin and Its Derivative. **Neuroscience**, v. 517, p. 18–25, 2023.

KUHNERT, E. et al. Rickenyls A–E, antioxidativeterphenyls from the fungus *Hypoxylon rickii* (Xylariaceae, Ascomycota). **Phytochemistry**, v. 118, p. 68–73, 2015.

LAHLOU, M. The Success of Natural Products in Drug Discovery. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 4, p. 17–31, jun. 2013.

LI, C. Y. et al. Natural products development under epigenetic modulation in fungi. **Phytochemistry Reviews**, v. 19, n. 6, p. 1323–1340, 2020.

LIANG, X.; LUO D.; LUESCH H. Advances in exploring the therapeutic potential of marine natural products. **Pharmacological Research**, v. 147, p. 104373, jul. 2019.

MAIMONE, N. M. et al. Análise de Dados de Metabolômica em Produtos Naturais: uma Revisão-Tutorial. **Revista Virtual de Química**, v. 16, n. 2, p. 248–270, 2024

MARMANN, A. et al. Co-cultivation - A powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. **Marine Drugs**, v. 12, n. 2, p. 1043–1065, 2014.

MAYER, A. M. S. Clinical Pipeline Marine Pharmacology. **Midwestern University**. Disponível em: < <https://www.marinepharmacology.org/approved> >. Acesso em: 2021.

MEDINA, R. P. **Prospecção química e biológica das algas vermelhas *Asparagopsis taxiformis* e *Pyropia spiralis* e seus fungos endofíticos**. 2016. 430 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

NASINI, G. et al. Secondary mould metabolites of *Cladosporium tenuissimum*, a hyperparasite of rust fungi. **Phytochemistry**, v. 65, n. 14, p. 2107–2111, 2004.

NEETHU, P. V.; SUTHINDHIRAN, K, JAYASRI, M. A. Antioxidant and antiproliferative activity of *Asparagopsis taxiformis*. **Pharmacognosy Research**, v. 9, n. 3, p. 238-246. 2017.

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**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

NOTHIAS, L. F. et al. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. **Nature Methods**, v. 17, n. 9, p. 905–908, 2020.

OLIVEIRA, A. L. L. de; FELÍCIO, R. de; DEBONSI, H. M. Marine natural products: chemical and biological potential of seaweeds and their endophytic fungi. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 4, p. 906-920, jul./ago. 2012.

PALMIERI, A.; PETRINI, M. Tryptophol and derivatives: Natural occurrence and applications to the synthesis of bioactive compounds. **Natural Product Reports**, v. 36, n. 3, p. 490–530, 2019.

PARTHASARATHY, R. et al. Molecular profiling of marine endophytic fungi from green algae: Assessment of antibacterial and anticancer activities. **Process Biochemistry**, v. 96, p. 11–20, 2020.

PATRIDGE, E. et al. An analysis of FDA-approved drugs: Natural products and their derivatives. *Drug Discovery Today*, v. 21, n. 2, p. 204–207, 2016.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L. DE; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 106–110, 2005.

PETER, S. et al. Artemisinin and derivatives-based hybrid compounds: Promising therapeutics for the treatment of cancer and Malaria. *Molecules*, v. 26, n. 24, 2021.

PFANNENSTIEL, B. T.; KELLER, N. P. On top of biosynthetic gene clusters: How epigenetic machinery influences secondary metabolism in fungi. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 6, 2019.

PIMENTA, E. F. et al. Use of experimental design for the optimization of the production of new secondary metabolites by two penicillium species. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 11, p. 1821–1832, 2010.

PINTEUS, S. et al. *Asparagopsis armata* and *Sphaerococcus coronopifolius* as a natural source of antimicrobial compounds. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 445–451, 2015.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v. 33, n. 4, p. 305–325, 1946.

POÇAS-FONSECA, M. J.; CABRAL, C. G.; MANFRÃO-NETTO, J. H. C. Epigenetic manipulation of filamentous fungi for biotechnological applications: a systematic review. **Biotechnology Letters**, v. 42, n. 6, p. 885–904, 2020.

QUINN, R. A. et al. Molecular Networking As a Drug Discovery, Drug Metabolism, and Precision Medicine Strategy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 2, p. 143–154, 2017.

SARANG, H. et al. An endophytic fungus, *Gibberella moniliformis* from *Lawsonia inermis* L. produces lawsone, an orange-red pigment. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, n. 7, p. 853–862, 2017.

SCARPATO, S. et al. New Tricks with an Old Sponge: Feature-Based Molecular Networking Led to Fast Identification of New Stylistamide L from *Stylissa Caribica*. **Marine Drugs**, v. 18, n. 9, 2020.

SCHORN, M. A. et al. Sequencing rare marine actinomycete genomes reveals high density of unique natural product biosynthetic gene clusters. **Microbiology**, v. 162, n. 12, p. 2075–2086, 2016.

SHANG, J. et al. A cheminformatic insight into the differences between terrestrial and marine originated natural products. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 58, p. 1182–1193, 2018.

SHARIFI-RAD, J. et al. Recent advances in the therapeutic potential of emodin for human health. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 154, p. 113555, ago. 2022.

SHIGEMOTO, R. et al. 5-Methylmellein is a novel inhibitor of fungal sirtuin and modulates fungal secondary metabolite production. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 240–247, 2018.

SHIMADA, A. et al. Aspterric acid and 6-hydroxymellein, inhibitors of pollen development in *Arabidopsis thaliana*, produced by *Aspergillus terreus*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 57, n. 5–6, p. 459–464, 2002.

SILVA, A. D. **Bioprospecção do fungo endofítico *Hypoxylon investiens* associado à alga marinha *Asparagopsis taxiformis*: potencial antifúngico, anticolinesterásico e antitumoral**. 2016. 150 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

SU, X. Z.; MILLER, L. H. The discovery of artemisinin and the Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Science China Life Sciences*, v. 58, n. 11, p. 1175–1179, 2015.

SYSOLYATIN, S. V. et al. p-Tyrosol: a new synthetic method and new types of pharmacological activity. *Russian Chemical Bulletin*, v. 64, n. 9, p. 2210–2214, 2015.

TOGHUEO, R. M. K.; SAHAL, D.; BOYOM, F. F. Recent advances in inducing endophytic fungal specialized metabolites using small molecule elicitors including epigenetic modifiers. **Phytochemistry**, v. 174, n. Mar, 2020.

TORRES-MENDOZA, D.; ORTEGA, H. E.; CUBILLA-RIOS, L. Patents on endophytic fungi related to secondary metabolites and biotransformation applications. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 2, 2020.

ÜHLBAUER, A. et al. Macrocarpones, novel metabolites from stromata of *Hypoxylon macrocarpum*, and new evidence on the chemotaxonomy of *Hypoxylon* species. **Mycological Progress**, v. 1, n. 3, p. 235–248, 2002.

VITALE, F. et al. Effectiveness of red alga *Asparagopsis taxiformis* extracts against *Leishmania infantum*. **Open Life Sciences**, v. 10, p. 490–496, 2015.

VOSER, T. M. et al. How different are marine microbial natural products compared to their terrestrial counterparts? **Natural Product Reports**, v. 39, n. 1, p. 7–19, 2022.

XU, K. et al. Cytotoxic *p*-terphenyls from the endolichenic fungus *Floricola striata*. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 9, p. 2041–2049, 2018.

WAN, K. X.; VIDAUSKY, I.; GROSS, M. L. Comparing similar spectra: From similarity index to spectral contrast angle. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 13, n. 1, p. 85–88, 2002.

WANG, M. et al. 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.

WATROUS, J. et al. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 26, p. 1743–1752, 2012.

WENDT, L. et al. Resurrection and emendation of the Hypoxylaceae, recognised from a multigene phylogeny of the Xylariales. **Mycological Progress**, v. 17, n. 1, p. 115–154, 2018.