

LUCAS HENRIQUE SILVA MOURA

Ferramentas quimiométricas para avaliação do perfil químico e biológico do
fungo endofítico *Hypomontagnella monticulosa* isolado da alga vermelha
Dichotomaria marginata

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação em Química para
obtenção do título de Mestre em
Química.

Orientadora: Dulce Helena Siqueira Silva

Araraquara

2023

M929f	Moura, Lucas Henrique Silva Ferramentas quimiométricas para avaliação do perfil químico e biológico do fungo endofítico <i>Hypomontagnella monticulosa</i> isolado da alga vermelha <i>Dichotomaria marginata</i> / Lucas Henrique Silva Moura. -- Araraquara, 2023 169 f. : il. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara Orientadora: Dulce Helena Siqueira Silva 1. Citotoxicidade. 2. Microorganismos. 3. Fungos endofíticos. 4. Produtos naturais. 5. Quimiometria. I. Título.
-------	---

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

"Ferramentas quimiométricas para avaliação do perfil químico e biológico do fungo endofítico *Hypomontagnella monticulosa* isolado da alga vermelha *Dichotomaria marginata*"

AUTOR: LUCAS HENRIQUE SILVA MOURA

ORIENTADORA: DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre 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.^a Dr.^a CLAUDIA QUINTINO DA ROCHA (Participação Virtual)
Departamento de Química / Universidade Federal do Maranhão - UFMA - São Luís



Prof.^a Dr.^a VANDERLAN DA SILVA BOLZANI (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 13 de janeiro de 2023

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome: Lucas Henrique Silva Moura

Endereço Profissional: NuBBE - Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica e Química Orgânica (DBQO), Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
Rua Prof. Francisco Degni, 55 - Araraquara - SP, CEP: 14081-970, SP - Brasil.

Endereço Eletrônico: lucas.h.moura@unesp.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2015 - 2019

Graduação: Bacharel em Química

Instituição: Universidade Federal de Viçosa - campus Rio Paranaíba, Rio Paranaíba - MG

Título da Monografia: Caracterização química e análise do perfil de *Cinnamomum verum* e atividade biológica de plantas frente à *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)

Orientador: Prof. Dr. Márcio Santos Soares

2020 - 2023

Mestrado: Química. Área de Concentração - Química Orgânica

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara - SP.

Dissertação: Ferramentas quimiométricas para avaliação do perfil químico e biológico do fungo endofítico *Hypomontagnella monticulosa* isolado da alga vermelha *Dichotomaria marginata*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Siqueira Silva

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalhos ou resumos em eventos científicos

MOURA, L. H. S.; SANTOS, A. L. P.; SILVA, G. S.; DIAS, E. J. S.; HONORIO, A. E.; SILVA, D. H. S. Secondary metabolites from the endophytic fungus *Hypomontagnella monticulosa* using factorial design and GNPS molecular networking. In: 45^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2022, Maceió, AL. Anais da 45^a Reunião Anual da SBQ. São Paulo: Câmara Brasileira do Livro, 2022. p. 788-788.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS E CONGRESSOS

XXXIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp Araraquara. Participação na qualidade como avaliador na modalidade: Engenharias - Engenharia Química, 2021

45^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Maceió - AL, 2022.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família que sempre esteve comigo me dando apoio e todo suporte necessário para com meus estudos, desde que decidi sair de casa para fazer graduação, até a realização deste mestrado.

Aos amigos, que mesmo longe, transmitem muito carinho e amizade.

Aos queridos amigos que fiz no NuBBE, por todos os momentos juntos de risadas, cafezinhos, conselhos e perrengues. Em especial ao grupo de pesquisa, por todo suporte e amizade.

À minha orientadora, professora Dulce, por todo apoio e encorajamento durante esses anos de pesquisa, principalmente pelo carinho que tem com seus alunos, um grande exemplo de pesquisadora e educadora.

Aos técnicos João e Juliana. Não só por sempre estarem presentes para auxiliar no meu dia a dia, como também pela amizade e carinho que construímos neste período.

Aos amigos que fiz em Araraquara, agradeço por todos os momentos que passamos juntos, grandes vivências e experiências de muitas risadas, vocês são incríveis.

No fim, consegui passar por tudo isso graças a cada um que esteve comigo, por um período mínimo que seja, cada um desempenhou um papel importante para a minha formação final. Carregarei sempre em minhas lembranças.

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

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da realidade continua misterioso diante de meus olhos.”

(Isaac Newton)

“Não é na ciência que está a felicidade, mas na aquisição da ciência.”

(Edgar Allan Poe)

RESUMO

Estudos relacionados ao bioma marinho, evidenciam uma rica fonte de substâncias bioativas provenientes de esponjas, moluscos e macroalgas, onde as algas vermelhas (Rhodophyceae) são consideradas uma das principais fontes produtoras de substâncias bioativas dentre as macroalgas. Fungos endofíticos de origem marinha, tornaram-se uma alternativa para a bioprospecção de novos metabólitos durante os últimos anos. Estudos anteriores, realizados em nosso grupo de pesquisa com a alga vermelha *Dichotomaria marginata*, permitiram isolar a linhagem de *Hypomontagnella monticulosa*, cujo extrato de sua incubação apresentou atividade contra inibição de crescimento bacteriano e atividade inibitória de protease. A fim de se aprofundar mais sobre o fungo, utilizou-se da quimiometria e redes moleculares (GNPS), no intuito de se observar a variação metabólica durante seu crescimento fúngico e, principalmente a variação do perfil químico quando inserido diferentes parâmetros durante seu cultivo, utilizando-se das técnicas de HPLC-DAD, LC-MS, GC-MS e UPLC-ESI-QqTOF-MS/MS, para análise do perfil químico e elucidação estrutural pelas técnicas de Infravermelho e RMN de ^1H e ^{13}C . Foi possível isolar uma lactona tetracíclica tetraidroxilada 2,8,10,10-tetraidroxi-6,10-diidro-5*H*-fluoreno[4,5-*bcd*]oxepin-5-ona, também denominada como Hypoxepinona A, uma substância ainda não relatada na literatura. Verificou-se a atividade antibacteriana, anticolinesterásica, fungicida e larvicida frente ao *Aedes aegypti*, onde os extratos e substância isolada não apresentaram atividade significativa. Em contrapartida, os extratos apresentaram alta citotoxicidade contra linhagem de carcinoma colorretal humano (HCT116) e câncer de mama humano (MCF7), a uma concentração de $50\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. A utilização de ferramentas quimiométrias auxiliou na observação da variação metabólica do fungo nos diferentes períodos de crescimento, bem como a variação quando inseridas variáveis externas durante seu crescimento promovendo uma maior quimiodiversidade, contribuindo para estudos de bioprospecção do ambiente marinho, bem como para uma melhor compreensão do metabolismo do fungo *H. monticulosa*.

Palavras-chaves: Citotoxicidade, Microorganismos, Fungos Endofíticos, Produtos Naturais, Quimiometria.

ABSTRACT

Studies related to the marine biome show a rich source of bioactive substances from sponges, mollusks and macroalgae, where red algae (Rhodophyceae) are considered one of the main sources of bioactive substances among macroalgae. Endophytic fungi of marine origin have become an alternative for the bioprospection of new metabolites during the last years. Previous studies, carried out in our research group with the red alga *Dichotomaria marginata*, allowed the isolation of the *Hypomontagnella monticulosa* strain, whose incubation extract showed activity against bacterial growth inhibition and protease inhibitory activity. In order to go deeper into the fungus, chemometrics and molecular networks (GNPS) were used, in order to observe the metabolic variation during its fungal growth and, mainly, the variation of the chemical profile when different parameters were inserted during its cultivation, using the techniques of HPLC-DAD, LC-MS, GC-MS and UPLC-ESI-QqTOF-MS/MS, for chemical profile analysis and structural elucidation by Infrared and ^1H and ^{13}C NMR techniques. It was possible to isolate a tetrahydroxylated tetracyclic lactone 2,8,10,10-tetrahydroxy-6,10-dihydro-5*H*-fluoreno[4,5-*bcd*]oxepin-5-one, also known as Hypoxepinone A, a substance not yet reported in the literature. The antibacterial, anticholinesterase, fungicidal and larvicidal activity against *Aedes aegypti* was verified, where the extracts and isolated substance did not show significant activity. In contrast, the extracts showed high cytotoxicity against human colorectal carcinoma (HCT116) and human breast cancer (MCF7) cell lines, at a concentration of $50\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. The use of chemometric tools helped to observe the metabolic variation of the fungus in different periods of growth, as well as the variation when external variables were inserted during its growth, promoting greater chemodiversity, contributing to bioprospecting studies of the marine environment, as well as to a better understanding of the metabolism of the fungus *H. monticulosa*.

Keywords: Cytotoxicity, Microorganisms, Endophytic Fungi, Natural Products, Chemometrics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas químicas de fármacos de origem natural taxol (1), quinina (2) e morfina (3).....	23
Figura 2: Estrutura química geral da penicilina (4)	23
Figura 3: Fármacos isolados de organismos marinhos, peptídeo ziconotídeo (5); alcaloide tetraidroquinolínico trabectedina (6) e a ciclosporina (7)	25
Figura 4: Estrutura química do ácido cáínico (8) e ácido domóico (9) isolados da <i>Digenea simplex</i>	28
Figura 5: Esteróides oxigenados derivados do desmosterol isolados da <i>Dichotomaria marginata</i>	28
Figura 6: Estruturas do esporotriolídeo (12), ácido diidroisoporótrico (13), ácido esporótrico (14), ácido isoporótrico (15) e esporochartina A (16) isolados do fungo <i>Hypoxylon monticulosum</i>	31
Figura 7: Teleomorfo de <i>Hypomontagnella monticulosa</i> (Sir & Hladki 261)	32
Figura 8: Anamorfo de <i>Hypomontagnella monticulosa</i> (Sir & Hladki 261)	33
Figura 9: Compostos isolados do fungo <i>Hypomontagnella monticulosa</i> , 3,4,5-trimetoxibenzaldeído (17), estigmastano-3 β ,6 α -diol (18); eudesmo-4(15)-eno-1 β ,6 α -diol (19); ácido ursólico (20); <i>p</i> -hidroxibenzaldeído (21); metil parabeno (22); vanilina (23); <i>N</i> -trans-feruloilmetoxitiramina (24) e <i>N</i> -trans-feruloiltiramina (25).....	35
Figura 10: Região de coleta da <i>Dichotomaria marginata</i>	38
Figura 11: Metodologia de esterilização, isolamento e purificação dos endófitos	39
Figura 12: Série homóloga de hidrocarbonetos (C10-C40).....	45
Figura 13: Curva de crescimento da linhagem DM01M1 com relação ao tempo de crescimento versus A) massa de extrato e B) massa de micélio	60
Figura 14: Comparação do perfil químico nos diferentes tempos de crescimento em gradiente exploratório por UPLC-ESI-QqTOF-MS/MS em modo positivo ..	62
Figura 15: Comparação do perfil químico nos diferentes tempos de crescimento em gradiente exploratório por UPLC-ESI-QqTOF-MS/MS em modo positivo ..	63
Figura 16: A) análise de componentes principais (PCA) e B) análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA)	64

Figura 17: Heatmap da intensidade de pico em escala com base na análise de características moleculares significativas.....	65
Figura 18: Perfil químico dos extratos obtidos no planejamento fatorial 2^3 por LC-MS em modo gradiente exploratório 5-100% (MeOH/H ₂ O) em 50 min	67
Figura 19: Diagrama de Pareto com efeito entre as variáveis durante o planejamento fatorial 2^3	68
Figura 20: Gráfico de superfície da interação entre A) temperatura e pH e B) período de crescimento e pH, em relação ao número de picos observados	69
Figura 21: Redes moleculares geradas na plataforma GNPS, anotações observadas em pH 5 para a substância (26) e todos os valores de pH para a substância (27).....	70
Figura 22: Comparação entre os espectros de massa experimental (preto) da substância (26) com o banco de dados (verde) da plataforma GNPS	72
Figura 23: Comparação entre os espectros de massa experimental (preto) da substância (27) com o banco de dados (verde) da plataforma GNPS	72
Figura 24: Redes moleculares geradas na plataforma GNPS, anotações observadas em pH 5 para a substância (28), todos os valores de pH para a substância (29) e pH 6,5 para a substância (30).....	73
Figura 25: Comparação entre os espectros de massa experimental (preto) da substância (28) com o banco de dados (verde) da plataforma GNPS	74
Figura 26: Comparação entre os espectros de massa experimental (preto) da substância (29) com o banco de dados (verde) da plataforma GNPS	75
Figura 27: Comparação entre os espectros de massa experimental (preto) da substância (30) com o banco de dados (verde) da plataforma GNPS	75
Figura 28: Redes moleculares geradas na plataforma GNPS, anotações observadas em pH 5 para a substância (31) e pH 8 para as substâncias (32) e (33).....	76
Figura 29: Comparação entre os espectros de massa experimental (preto) da substância (31) com o banco de dados (verde) da plataforma GNPS	77
Figura 30: Comparação entre os espectros de massa experimental (preto) da substância (32) com o banco de dados (verde) da plataforma GNPS	77
Figura 31: Comparação entre os espectros de massa experimental (preto) da substância (33) com o banco de dados (verde) da plataforma GNPS	78

Figura 32: Espectros de GC-MS dos extratos Ext.pl.01 - 04 obtidos da linhagem DM01M1.....	79
Figura 33: Estrutura química dos compostos caracterizados por GC-MS da linhagem DM01M1	83
Figura 34: Espectros de GC-MS dos extratos Ext.pl.05 - 08 obtidos da linhagem DM01M1.....	84
Figura 35: Estrutura química dos compostos caracterizados por GC-MS da linhagem DM01M1	87
Figura 36: Espectro de GC-MS do extrato Ext.pl.09 obtido da linhagem DM01M1	88
Figura 37: Perfil químico do extrato Ext.pl.10 por HPLC-DAD em modo gradiente 44-100% (MeOH/H ₂ O) em 45 min.....	90
Figura 38: Cromatograma da fração Frc12 obtido em coluna analítica de C-18 por HPLC-DAD em modo gradiente 44-100% (MeOH/H ₂ O) em 45 min.....	91
Figura 39: Cristais formados da substância isolada na fração Frc12	92
Figura 40: Espectro no infravermelho da substância Frc12 isolada	92
Figura 41: Cromatograma de MSMS da substância Frc12 por infusão direta no MS.....	93
Figura 42: Perfil químico obtido em coluna analítica de C-18 das frações A) F4, B) F5, C) F6 e D) F7 por HPLC-DAD em modo gradiente 5-100% (MeOH/H ₂ O) em 45 min.....	97
Figura 43: Perfil químico obtido em coluna analítica de C-18 das frações A) F10 e B) F11 por HPLC-DAD em modo gradiente 5-100% (MeOH/H ₂ O) em 45 min	98
Figura 44: Cromatogramas das frações A) F10 e B) F11 por HPLC-DAD utilizando uma coluna de C-18 preparativa em modo gradiente 5-100% (MeOH/H ₂ O) em 45 min	99
Figura 45: Cromatogramas referentes às sub frações A) F10.7 e B) F11.2 por HPLC-DAD utilizando uma coluna de C-18 preparativa em modo gradiente 5-100% (MeOH/H ₂ O) em 45 min	101
Figura 46: Cromatograma das substâncias F10.7.1, F10.7.2, F11.2.1 e F11.2.2 em modo negativo por UPLC-ESI-QqTOF-MS/MS	103
Figura 47: Proposta estrutural para a substância F10.7.2.....	105

Figura 48: Espectro de RMN de ^1H da substância F10.7.2 (MeOH- <i>d</i> 4, 600 MHz)	106
Figura 49: Espectro de DEPTQ da substância F10.7.2 (MeOH- <i>d</i> 4, 150 MHz)	107
Figura 50: Mapa de contorno HSQC da substância F10.7.2 (MeOH- <i>d</i> 4, 600 MHz)	108
Figura 51: Mapa de contorno COSY da substância F10.7.2 (MeOH- <i>d</i> 4, 600 MHz)	110
Figura 52: Mapa de contorno HMBC da substância F10.7.2 (MeOH- <i>d</i> 4, 600 MHz)	111
Figura 53: Estrutura 3D da substância F10.7.2 em diferentes ângulos evidenciando a coplanaridade dos dois anéis aromáticos	112
Figura 54: Espectro de fragmentação da substância F10.7.2 por UPLC-ESI-QqTOF-MS/MS	113
Figura 55: Estruturas de fragmentação da substância F10.7.2 considerando dois sítios de desprotonação propostas a partir do espectro de MSMS	114
Figura 56: Picos característicos dos dois fragmentos com relação aos diferentes sítios de desprotonação da substância F10.7.2	115
Figura 57: Espectro de MSMS para a primeira série de fragmentação	116
Figura 58: Proposta das estruturas de fragmentação referente à estrutura 1a (Série 1) do espectro de MSMS	117
Figura 59: Espectro de MSMS para a segunda série de fragmentação	118
Figura 60: Proposta das estruturas de fragmentação referente à estrutura 2a (Série 2) do espectro de MSMS	119
Figura 61: Espectro de MSMS para a terceira série de fragmentação	120
Figura 62: Proposta das estruturas de fragmentação referente à estrutura 3b (Série 3) do espectro de MSMS	121
Figura 63: Regressão não linear do controle positivo doxorrubicina com concentrações de 0,0032 a 10 μM em linhagem de A) carcinoma colorretal humano (HCT116, n=02) e B) câncer de mama humano (MCF7, n=02)	125
Figura 64: Regressão não linear do controle positivo doxorrubicina com concentrações de 0,0032 a 10 μM em linhagem de A) carcinoma colorretal humano (HCT116, n=02) e B) câncer de mama humano (MCF7, n=02)	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variáveis e níveis do planejamento fatorial completo 2^3	49
Tabela 2: Matriz do planejamento fatorial completo 2^3	49
Tabela 3: Massas obtidas da linhagem DM01M1 em escala reduzida	59
Tabela 4: Resultados obtidos a partir do planejamento fatorial completo 2^3 ...	66
Tabela 5: Constituintes químicos presentes no extrato Ext.pl.01 obtido da linhagem DM01M1	80
Tabela 6: Constituintes químicos presentes no extrato Ext.pl.02 obtido da linhagem DM01M1	81
Tabela 7: Constituintes químicos presentes no extrato Ext.pl.03 obtido da linhagem DM01M1	81
Tabela 8: Constituintes químicos presentes no extrato Ext.pl.04 obtido da linhagem DM01M1	82
Tabela 9: Constituintes químicos presentes no extrato Ext.pl.05 obtido da linhagem DM01M1	85
Tabela 10: Constituintes químicos presentes no extrato Ext.pl.06 obtido da linhagem DM01M1	86
Tabela 11: Constituintes químicos presentes no extrato Ext.pl.07 obtido da linhagem DM01M1	86
Tabela 12: Constituintes químicos presentes no extrato Ext.pl.08 obtido da linhagem DM01M1	87
Tabela 13: Constituintes químicos presentes no extrato Ext.pl.09 obtido da linhagem DM01M1	88
Tabela 14: Fracionamento em CC com fase estacionária C-18 do extrato Ext.pl.10	90
Tabela 15: Deslocamento químico dos espectros de RMN de ^1H (600 MHz) e DEPTQ (150 MHz) em MeOH- <i>d</i> 4	95
Tabela 16: Crescimento em larga escala da linhagem DM01M1	96
Tabela 17: Fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do extrato OTM eluída com MeOH 100%	96
Tabela 18: Fracionamento em coluna preparativa de C-18 da fração F10	100
Tabela 19: Fracionamento em coluna preparativa de C-18 da fração F11	100

Tabela 20: Isolamento das substâncias presentes nas subfrações F10.7 e F11.2	101
Tabela 21: Deslocamentos de RMN de ^1H (600 MHz) e DEPTQ (150 MHz) em MeOH- d_4	105
Tabela 22: Triagem inicial dos extratos do planejamento experimental a 512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	122
Tabela 23: Triagem inicial dos extratos da curva de crescimento e substância isolada a 512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	123
Tabela 24: Inibição do crescimento celular (%) das amostras testadas em linhagem de HCT116, com as concentrações de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (média $\pm$ EPM; n=2).	124
Tabela 25: Inibição do crescimento celular (%) das amostras testadas em linhagem de MCF7, com as concentrações de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (média $\pm$ EPM; n=02).	124
Tabela 26: Inibição do crescimento celular (%) das amostras testadas em linhagem de HCT116, com as concentrações de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (média $\pm$ EPM; n=2).	126
Tabela 27: Inibição do crescimento celular (%) das amostras testadas em linhagem de MCF7, com as concentrações de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (média $\pm$ EPM; n=02).	127
Tabela 28: Mortalidade de larvas e pupas do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	128
Tabela 29: Concentração mínima inibitória (MIC $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e concentração fungicida mínima (MFC $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de extratos da curva de crescimento frente a linhagem de <i>Candida albicans</i>	129
Tabela 30: Concentração mínima inibitória (MIC $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e concentração fungicida mínima (MFC $\mu\text{g.mL}^{-1}$) do planejamento experimental frente a linhagem de <i>Candida albicans</i>	130
Tabela 31: Concentração mínima inibitória (MIC $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e concentração fungicida mínima (MFC $\mu\text{g.mL}^{-1}$) da substância Fcr12 e extrato MAR frente a linhagem de <i>Candida albicans</i>	130
Tabela 32: Resultados dos ensaios de triagem pontual para as enzimas acetilcolinesterase de peixe elétrico (AChEee) e butirilcolinesterase humana (BChEhu).....	131

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
δ_H	Deslocamento químico de ^1H (em ppm) em RMN
δ_C	Deslocamento químico de ^{13}C (em ppm) em RMN
ν	Frequência
Å	Angstrom
AChE _{ee}	Enzima acetilcolinesterase de peixe elétrico
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
BChE _{hu}	Enzima butirilcolinesterase humana
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>dt</i>	Duplo tripleto
DM01M1	Linhagem fúngica de <i>Hypomontagnella monticulosa</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
EtOH	Etanol
eV	Elétron-Volt
GC	Cromatografia Gasosa
HCT-116	Linhagem de célula tumoral de Cólon Humano
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentração Inibitória Média
IV	Espectroscopia de Infravermelho
kPa	Quilopascal
LC	Cromatografia Líquida

<i>m</i>	Multiplete
MCF7	Linhagem de célula tumoral de Mama Humano
MeOH	Metanol
MeOH- <i>d</i> ₄	Metanol deuterado
MHCA-BD	Caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado
MS	Espectrometria de Massas
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
NaOCl	Hipoclorito de sódio
<i>p</i>	Quinteto
PCA	Análise de Componentes Principais
PNM	Produtos Naturais Marinhos
PLS-DA	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais
<i>q</i>	Quarteto
QPN	Química de Produtos Naturais
QPNM	Química de Produtos Naturais Marinhos
RI	Índice de Retenção
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1
<i>s</i>	Singleto
<i>t</i>	Tripleto
TMS	Trimetilsilano
UPLC-ESI-QqTOF-MS/MS	Espectrometria de Massas de Alta Resolução

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Química de Produtos Naturais (QPN)	22
1.2 Química de Produtos Naturais Marinhos (QPNM)	24
1.2.1 Algas marinhas	26
1.2.2 Algas vermelhas	26
1.2.3 Alga <i>Dichotomaria marginata</i>	28
1.3 Fungos endofíticos isolados de organismos marinhos.....	28
1.3.1 Gênero <i>Hypomontagnella</i>	30
1.3.2 <i>Hypomontagnella monticulosa</i> (sin. <i>Hypoxylon monticulosum</i>)	34
1.4 Quimiometria.....	36
2 OBJETIVOS.....	37
2.1 Objetivo geral	37
2.2 Objetivos específicos	37
3 METODOLOGIA	38
3.1 Coleta do material estudado	38
3.2 Obtenção e cultivo do endófito.....	38
3.2.1 Identificação do fungo <i>Hypomontagnella monticulosa</i>	40
3.3 Curva de crescimento da linhagem em pequena escala.....	40
3.3.1 Obtenção do extrato de incubação do endófito em pequena escala	41
3.4 Técnicas para análise do perfil químico	41
3.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (HPLC-DAD).....	41
3.4.2 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS)	42
3.4.3 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)	43

3.4.4 Espectroscopia de infravermelho (IV)	45
3.4.5 Espectrometria de Massas de Alta Resolução (UPLC-ESI-QqTOF-MS/MS)	45
3.4.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	46
3.5 Ferramentas quimiométricas	47
3.5.1 Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)	47
3.5.2 Planejamento experimental	48
3.5.2.1 Fracionamento do extrato Ext.pl.10 obtido no planejamento experimental	50
3.6 Redes Moleculares (GNPS)	50
3.7 Crescimento do endófito em larga escala e obtenção do extrato	52
3.7.1 Pré-fracionamento do extrato obtido em larga escala	52
3.8 Bioensaios	53
3.8.1 Atividade antibacteriana	53
3.8.2 Potencial Citotóxico	54
3.8.3 Atividade larvicida frente ao mosquito do <i>Aedes aegypti</i>	54
3.8.3.1 Teste larvicida em placas e cálculo de IC ₅₀	54
3.8.3.2 Teste pupicida	55
3.8.4 Atividade antifúngica	55
3.8.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC ₉₀)	55
4.8.5 Atividade anticolinesterásica	56
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	59
4.1 Curva de crescimento do fungo <i>H. monticulosa</i> e análise do perfil químico	59
4.1.1 Análise do perfil químico em água do mar	62
4.2 Análise multivariada da curva de crescimento fúngica (PCA e PLS-DA)	63
4.3 Planejamento fatorial completo 2 ³	66

4.4 Anotações de substâncias a partir das redes moleculares geradas (GNPS)	69
4.5 Perfil químico dos extratos por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de massas (GC-MS)	78
4.6 Fracionamento do extrato Ext.pl.10 e isolamento da substância Frc12	89
4.6.1 Análise de infravermelho (IV)	92
4.6.2 Análise de MSMS da substância Frc12 por injeção direta no MS	93
4.6.3 Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) da substância Frc12	93
4.7 Crescimento em larga escala e obtenção do extrato	95
4.7.1 Fracionamento do extrato OTM em coluna de Sephadex LH-20	96
4.7.2 Fracionamento das frações F10 e F11 e isolamento das substâncias F10.7.1, F10.7.2, F11.2.1 e F11.2.2	98
4.7.3 Elucidação estrutural das substâncias F10.7.1, F10.7.2, F11.2.1 e F11.2.2	102
4.7.3.1 Análise das substâncias por UPLC-ESI-QqTOF-MS/MS	102
4.7.3.2 Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	103
4.7.3.3 Fragmentação da substância F10.7.2 por UPLC-ESI-QqTOF-MS/MS	112
4.8 Bioensaios	122
4.8.1 Atividade antibacteriana	122
4.8.1.2 Avaliação da atividade de extratos do planejamento experimental	122
4.8.1.3 Avaliação da atividade de extratos da curva de crescimento e substância isolada	123
4.8.2 Ensaio de citotoxicidade	123
4.8.3 Atividade larvicida e pupicida contra <i>Aedes aegypti</i>	128
4.8.4 Ensaio antifúngico	129
4.8.4.1 Suscetibilidade de fungos a drogas extratoras e antifúngicas	129

4.8.5 Ensaio anticolinesterástico.....	130
5 CONCLUSÃO	132
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	134
APÊNDICES	143
APÊNDICE A – Cromatogramas dos extratos da curva de crescimento em gradiente exploratório por UPLC-ESI-QqTOF-MS/MS em modo negativo .	143
APÊNDICE B – Cromatogramas dos extratos do planejamento experimental em gradiente exploratório por UPLC-ESI-QqTOF-MS/MS em modo positivo	144
APÊNDICE C – Cromatogramas dos extratos do planejamento experimental em gradiente exploratório por UPLC-ESI-QqTOF-MS/MS em modo negativo	146
APÊNDICE D – Cromatogramas das frações obtidas a partir do extrato Ext.pl.10 por HPLC-DAD em modo gradiente 44-100% (MeOH/H ₂ O) em 45 min	148
APÊNDICE E - Espectro de UV da substância Frc12 isolada.....	151
APÊNDICE F – Espectros de RMN da substância Frc12 isolada	152
APÊNDICE G – Cromatogramas das frações obtidas a partir do extrato OTM por HPLC-DAD em modo gradiente 5-100% (MeOH/H ₂ O) em 45 min	159
APÊNDICE H – Cromatogramas das subfrações obtidas a partir da fração F10 por HPLC-DAD em modo gradiente 5-100% (MeOH/H ₂ O) em 45 min	163
APÊNDICE I – Cromatogramas das subfrações obtidas a partir da fração F11 por HPLC-DAD em modo gradiente 5-500% (MeOH/H ₂ O) em 45 min	165
APÊNDICE J - Espectro de UV das substâncias isoladas F10.7.1; F10.7.2; F11.2.1 e F11.2.2.....	167

1 INTRODUÇÃO

1.1 Química de Produtos Naturais (QPN)

Dentre as áreas de estudo das ciências exatas, a química de produtos naturais (QPN) ganhou maior destaque a partir da década de 60, com o desenvolvimento de técnicas espectroscópicas/espectrométricas que permitiram o conhecimento dos metabólitos produzidos por organismos como plantas, fungos, bactérias dentre outros (BERLINCK et al., 2017).

A QPN têm ganhado bastante destaque nos últimos anos, não só pelo seu impacto no conhecimento científico e potencial econômico, mas também por sua utilização no desenvolvimento de agentes terapêuticos para o combate a diversas doenças, por exemplo, com a descoberta de metabólitos naturais bioativos apresentando atividade anticâncer e antimicrobianos, dentre diversas outras (BLUNT et al., 2018; THOMFORD et al., 2018). Estudos amplos de bioprospecção têm sido realizados no Brasil devido à grande riqueza de sua biodiversidade (BERLINCK, 2012; BERLINCK et al., 2017). Tais estudos, incluindo a utilização de PN pela indústria farmacêutica, vêm gerando desenvolvimento científico relevante e proporcionando avanços significativos para a área (EMERY et al, 2010).

Existe uma variedade de fármacos provenientes de fontes naturais, desenvolvidos a partir de metabólitos produzidos por plantas, fungos, bactérias e outros organismos. Um exemplo é o taxol (**1**), isolado a partir da casca do *Taxus brevifolia* (Teixo do pacífico) e posteriormente, do fungo endofítico *Taxomyces andreanae* também associado a *T. brevifolia* (PAMPHILE et al., 2017; STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D, 1993). O taxol é um fármaco utilizado no tratamento de diferentes tipos de câncer (KURIAKOSE et al., 2020), tendo sido aprovado pela FDA em 1992 (CRAGG, 1998). Pode-se citar também o alcaloide quinina (**2**), que foi obtida através da *Cinchona* spp sendo bastante utilizada no tratamento da malária. Outros exemplos incluem a descoberta de analgésicos como a morfina (**3**), que foi isolada da papoula (*Papaver somniferum*), bastante utilizada em procedimentos cirúrgicos (EMERY et al, 2010) (**Figura 1**).

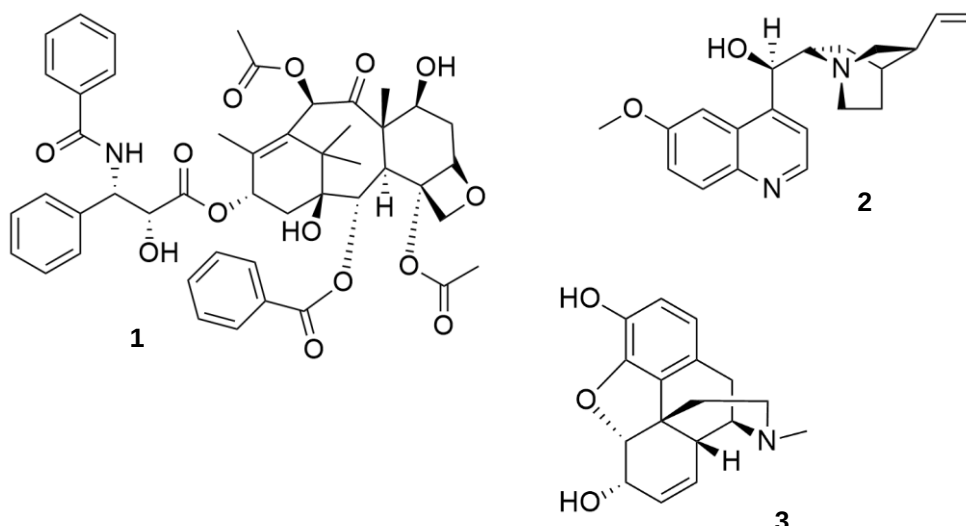


Figura 1: Estruturas químicas de fármacos de origem natural taxol (1), quinina (2) e morfina (3). Fonte: Autor

Uma das mais importantes descobertas de compostos bioativos foi a penicilina (4) (**Figura 2**). Isolada do fungo *Penicillium notatum* em 1928, trata-se de um importante agente terapêutico desenvolvido a partir de PN. Com essa descoberta, abriram-se novos caminhos científicos para a antibioterapia e a descoberta de novos antimicrobianos. Houve um grande estímulo científico na realização de novos estudos clínicos, promovendo investimento científico e tecnológico para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (MIRANDA; COSTA ALMEIDA, 2020). Estes estudos permitiram não só o desenvolvimento de novos fármacos a partir de fontes naturais, como também a síntese ou semi-síntese de compostos bioativos para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (EMERY et al, 2010).

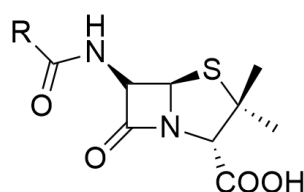


Figura 2: Estrutura química geral da penicilina (4). Fonte: Autor.

Apesar dos estudos de bioprospecção terem privilegiado organismos terrestres na busca por compostos bioativos, nas últimas décadas, atenção especial tem sido direcionada também ao ambiente marinho. Sabe-se que mais de 70% da superfície do planeta é coberta por oceanos, existindo uma grande diversidade de organismos marinhos, sendo assim considerados uma fonte rica em compostos bioativos incluindo ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), polissacarídeos, alcaloides, terpenos, polifenóis, além de vitaminas e minerais essenciais, antioxidantes, enzimas e peptídeos bioativos (ANAND et al., 2018; KIM; WIJESEKARA, 2010; POMPONI, 1999).

1.2 Química de Produtos Naturais Marinhos (QPNM)

O avanço nas técnicas de mergulho e o desenvolvimento tecnológico, contribuíram muito para o aumento de interesse no estudo de produtos naturais marinhos (PNM). Atualmente o ecossistema marinho é ainda subexplorado na procura de novos compostos bioativos com estruturas químicas diferenciadas como potencial fonte de novos fármacos (RUIZ-TORRES et al., 2017).

A utilização de PNM tem avançado muito nos últimos anos, principalmente ao longo das duas primeiras décadas do século XXI no Brasil. Apesar das plantas se manterem como as mais utilizadas em pesquisas visando fontes de novos metabólitos, os microrganismos, em especial os fungos, despontam como a segunda fonte mais explorada na busca de novos compostos bioativos. Mesmo com o crescente estudo com organismos marinhos, ainda há certas barreiras a serem vencidas devido à dificuldade e custo elevado das coletas no ambiente marinho e o acesso restrito a esse bioma dependendo da região e profundidade (BERLINCK et al., 2017).

Alguns estudos citam a utilização de organismos marinhos como fonte de agentes terapêuticos voltados para a medicina popular. Após a década de 50 os estudos envolvendo esses organismos tornaram-se mais frequentes, na procura de organismos como fonte de novas moléculas bioativas (BLUNT et al., 2016).

Como exemplos de fármacos que foram isolados e produzidos a partir de organismos marinhos, destaca-se o peptídeo ziconotídeo (**5**), isolado do molusco

Conus magnus, utilizado para o tratamento de dores crônicas. Pouco tempo depois foi descoberto um alcaloide tetraidroquinolínico, a trabectedina (**6**), isolado a partir da ascídia *Ecteinascidia turbinata*, com atividade antitumoral (MOLINSKI, 2010).

Outro exemplo de fármaco desenvolvido a partir de PNM é a ciclosporina (**7**), um peptídeo cíclico lipofílico com atividade imunossupressora e imunomoduladora. A ciclosporina foi isolada do fungo *Beauveria nivea* (anteriormente *Tolypocladium inflatum* Gams), sendo utilizada inicialmente na medicina como uma forma de não rejeição de órgãos transplantados e, anos depois começou a ser utilizado no tratamento de dermatite atópica e psoríase (FORSYTHE; PATERSON, 2014) (**Figura 3**).

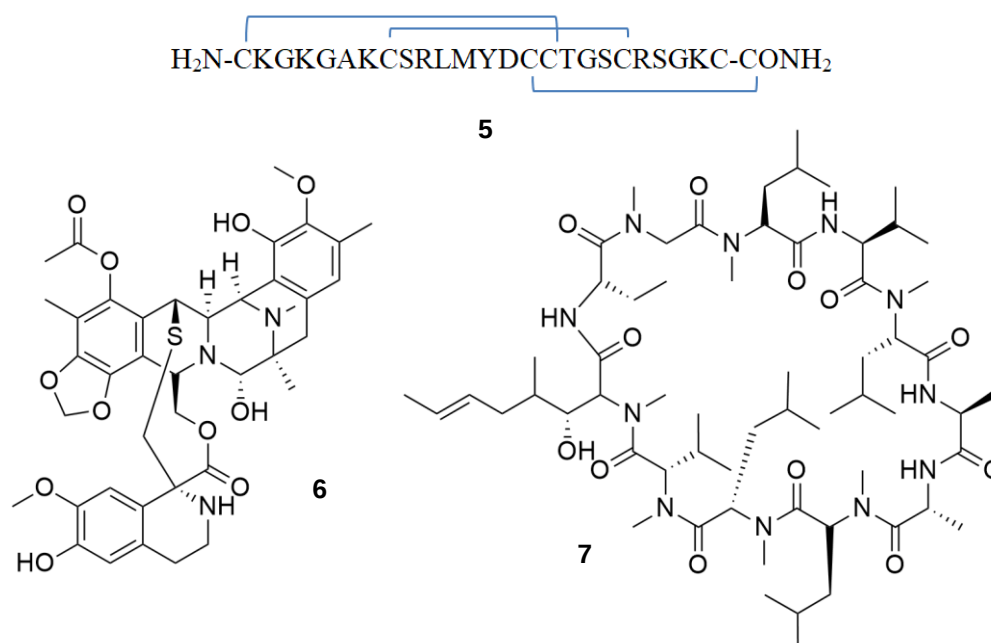


Figura 3: Fármacos isolados de organismos marinhos, peptídeo ziconotídeo (**5**); alcaloide tetraidroquinolínico trabectedina (**6**) e a ciclosporina (**7**). Fonte: Autor

No ambiente marinho, existe uma grande variedade de organismos que produzem metabólitos secundários diversificados, como algas, esponjas, corais e outros organismos, que apresentam, na maioria das vezes, produção

metabólica diferente da encontrada em organismos terrestres (BLUNT et al., 2009).

1.2.1 Algas marinhas

Dentro desse universo dos organismos marinhos, as algas se destacam pela produção de metabólitos secundários bioativos, estimulando os estudos relacionados às algas marinhas e seus endófitos (BLUNT et al., 2016).

As algas marinhas foram um dos primeiros organismos marinhos a serem estudados pelos químicos na procura de metabólitos secundários bioativos com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos (FENICAL & PAUL, 1984; FOLMER et al., 2010), havendo relatos de seu uso para fins terapêuticos há mais de 2000 a.C., no Antigo Egito (FOLMER et al., 2010). Possuem um papel fundamental como indicadoras de qualidade de sistemas aquáticos, devido a sua capacidade de atuarem como bioabsorventes de metais pesados no meio (BUGD, L., CUPERTINI, P., WOLF, T., TREICHEL, 2018). São produtoras de diversos metabólitos secundários que possuem propriedades únicas, e bastante utilizadas como matéria-prima na produção de medicamentos, cosméticos, espessantes e estabilizantes (ANTONIO et al., 2014; RAMAKRITINAN et al., 2017). Dentre os metabólitos secundários isolados de algas, destacam-se os sesquiterpenos, policetídeos, esteróis, terpenoides, ácidos graxos, carotenoides, polissacarídeos, aminoácidos, peptídeos e proteínas (OLIVEIRA, A. L., 2013).

As macroalgas são subdivididas em três principais filos: algas pardas (Phaeophyta), verdes (Chlorophyta) e vermelhas (Rhodophyta) (GUIRY, 2012), diferenciadas em função dos pigmentos encontrados em sua constituição química.

1.2.2 Algas vermelhas

As algas vermelhas são consideradas umas das principais produtoras de metabólitos secundários entre as macroalgas, sendo classificadas como vermelhas devido à ficoeritrina, um pigmento presente em sua estrutura, sendo a principal característica do filo Rhodophyta, que constitui o grupo com maior

número de espécies na costa brasileira. A ficoeritrina é o pigmento principal e em maior quantidade na alga, que também pode apresentar coloração rósea, violeta, roxa ou ainda esbranquiçada, devido a impregnação de carbonato de cálcio, além de preta, e até mesmo esverdeada, quando presente em águas superficiais e em sistemas continentais de água doce (TEIXEIRA, 2013).

São encontradas presas em rochas, conchas de moluscos e até mesmo sobre outras algas, próximo à região do equador e em regiões tropicais (TEIXEIRA, 2013) e produzem principalmente polissacarídeos sulfatados (carragena e ágar) e derivados do ácido chiquímico e ácidos nucleicos (GÜVEN; PERCOT; SEZIK, 2010; WIJESEKARA; PANGESTUTI; KIM, 2011), além de substâncias halogenadas com estruturas químicas diversificadas, tais como, terpenos, policetídeos, fenóis e hidrocarbonetos voláteis (CABRITA; VALE; RAUTER, 2010), monoterpenos sesquiterpenos, triterpenos e acetogeninas (ANAND et al., 2018).

Com relação aos metabólitos secundários produzidos pelas algas vermelhas, há diversas substâncias bioativas relacionadas, por exemplo, presentes na *Digenea simplex*, cujo extrato aquoso foi bastante utilizado na medicina como vermífugo durante séculos na China. Estudos sobre o seu extrato levou à descoberta do ácido caínico (8) e o ácido domóico (9) (**Figura 4**), sendo o ácido caínico considerado o principal metabólito produzido pela *D. simplex*. Este aminoácido apresenta bioatividade destacada no nosso organismo, sendo bastante utilizado como reagente padrão em estudos sobre distúrbios neurofisiológicos como a doença de Alzheimer, Parkinson e epilepsia devido às suas propriedades neuroativas e o ácido domóico foi bastante utilizado no Japão como agente anti-helmíntico (SAKAI et al., 2005; SMIT, 2004; PEI-GEN e SHAN-LIN, 1986)

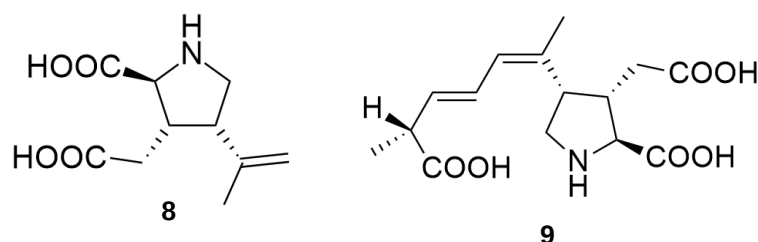


Figura 4: Estrutura química do ácido caïnico (8) e ácido domóico (9) isolados da *Digenea simplex*. Fonte: Autor

1.2.3 Alga *Dichotomaria marginata*

A *Dichotomaria marginata* é uma alga vermelha pertencente à família Galaxauraceae, com poucos estudos químicos e biológicos para esta espécie, geralmente limitados a estudos taxonômicos (HONÓRIO, 2018). Alguns estudos relatam a presença de derivados oxigenados do desmosterol (10 e 11) (Figura 5), que apresentaram atividade antitumoral e anti-inflamatória (SHEU et al., 1997).

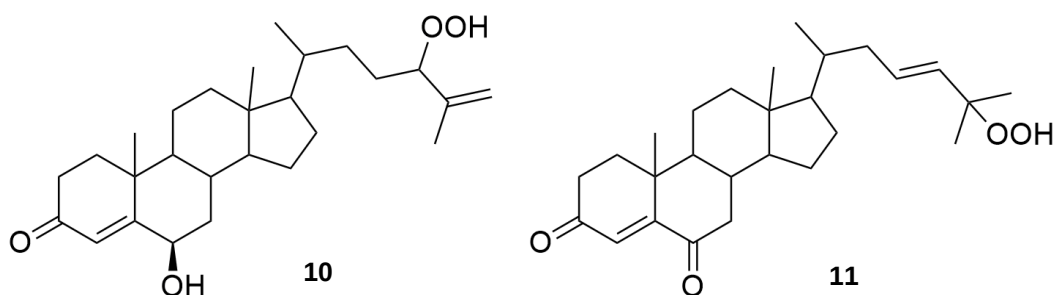


Figura 5: Esteróides oxigenados derivados do desmosterol isolados da *Dichotomaria marginata*. Fonte: Autor

1.3 Fungos endofíticos isolados de organismos marinhos

O nome “endofítico” que acompanha alguns tipos de microrganismos (fungos ou bactérias) está relacionado com o fato de serem capazes de colonizar o interior de plantas e/ou algas durante toda sua vida. Essa relação entre o endófito com a planta e/ou alga se dá de maneira simbiótica do tipo mutualística, onde o microrganismo coloniza o tecido interno do hospedeiro durante sua vida,

sendo fornecido abrigo e nutrientes para o crescimento e desenvolvimento do fungo, em troca de proteção contra agentes patógenos, além de fornecer resistência a estresse abiótico e toxicidade (MANGANYI et al., 2018).

Essa relação não se limita apenas ao fornecimento de nutrientes e proteção, podendo induzir a seleção e/ou ativação de certas vias biossintéticas do microrganismo, associados à produção de moléculas bioativas (ZHANG; LI; WANG, 2016), incluindo metabólitos secundários similares aos do hospedeiro para melhor adaptação (TOGHUEO; SAHAL; BOYOM, 2020). Estes mecanismos são ainda pouco elucidados, mas alguns exemplos emblemáticos, como a produção do taxol (**1**), tanto pela espécie vegetal *T. brevifolia*, como pelo fungo endofítico (*T. andreanae*) a ela associado, representam um estímulo importante para o melhor entendimento destes processos (PAMPHILE et al., 2017; STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D, 1993).

Fungos de origem marinha são responsáveis pela produção de diversos metabólitos secundários biologicamente ativos gerando uma gama de protótipos para novos fármacos no combate a diversas doenças (GOGINENI et al., 2020; HASAN et al., 2015). Um número crescente de estudos com fungos endofíticos como fonte de novos metabólitos bioativos tem sido realizados (BRAMHACHARI et al., 2019), devido às suas propriedades antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas e de natureza imunossupressora, dentre outras atividades biológicas (MISHRA et al., 2017; ZHANG; SONG; TAN, 2006).

Estudos envolvendo fungos endofíticos associados a algas vermelhas revelam macrolídeos do tipo curvularina, com atividade antimicrobiana e algicida (DAI et al., 2010), além de substâncias antifúngicas polioxigenadas, esteróis e policetídeos citotóxicos (WANG et al., 2006; GAO et al., 2011b; GAO et al., 2011c), e ainda, terpenos com atividade antimicrobiana (QIAO et al., 2010; GAO et al., 2011a; GAO et al., 2011b).

No oceano, o ecossistema marinho está sob constante estresse, devido a fatores como salinidade, pressão, temperatura e dentre outros, o que pode ser determinante para a produção ou não de metabólitos específicos. As algas marinhas, dependendo da sazonalidade, podem apresentar alguma via metabólica mais favorecida que outra, assim como seus endófitos associados.

Estas condições, aliadas ao ambiente eventualmente competitivo, podem ser determinantes para a alta quimiodiversidade frequentemente observada em linhagens de fungos endofíticos associados a algas marinhas (CARROLL et al., 2020; SARASAN et al., 2017).

1.3.1 Gênero *Hypomontagnella*

Estudos recentes identificaram que o fungo *Hypoxylon monticulosum*, pertencente ao gênero *Hypoxylon*, apresentava raros policetídeos como componentes predominantes, independente da área geográfica em que foi coletado (SURUP et al., 2014). Entretanto, estudos mostraram que essa produção de metabólitos é, na realidade, específica de um novo gênero em questão, apresentando resultados com o estudo filogenético concorrente (LAMBERT et al., 2019). Um cepa derivada do mar, estudada por Leman-Loubière e colaboradores (2017a,b) produziu derivados esporotriolídeos (**Figura 6**), bem como as esporochartinas, o que acabou evidenciando a produção desses derivados esporotriolídeos serem característicos de um novo gênero desse gênero em questão.

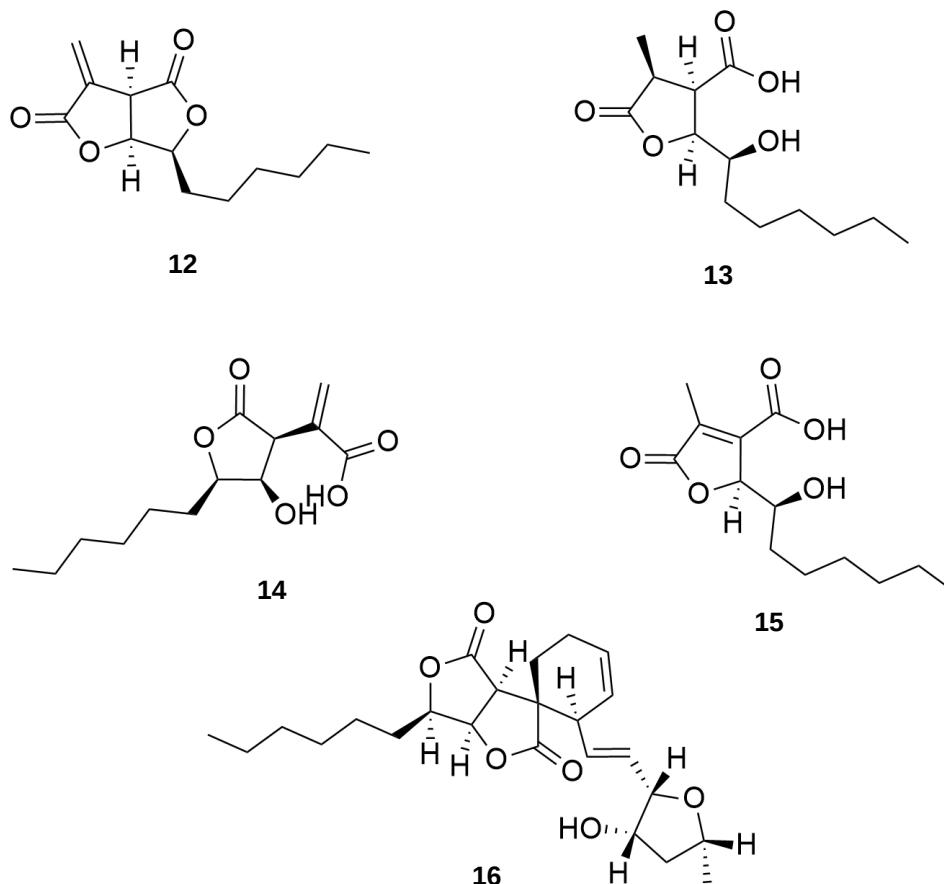


Figura 6: Estruturas do esporotriolídeo (**12**), ácido diidroisoporsítrico (**13**), ácido esporótrico (**14**), ácido isoporsítrico (**15**) e esporochartina A (**16**) isolados do fungo *Hypoxylon monticulosum*. Fonte: Autor

Com base na combinação de características morfológicas, quimiotaxonômicas e filogenéticas moleculares, Lambert e Wendt (2019), juntamente com seus colaboradores, propuseram a criação do gênero *Hypomontagnella*, pertencente à mesma família que o gênero *Hypoxylon* (Hypoxylaceae), para então acomodar o *H. monticulosum* e táxons aliados, consequentemente o fungo passa a ser nomeado como *Hypomontagnella monticulosa*. A partir da criação do novo gênero, foram definidas características morfológicas para distinguir este novo gênero de outros gêneros relacionados (Figuras 7 e 8).

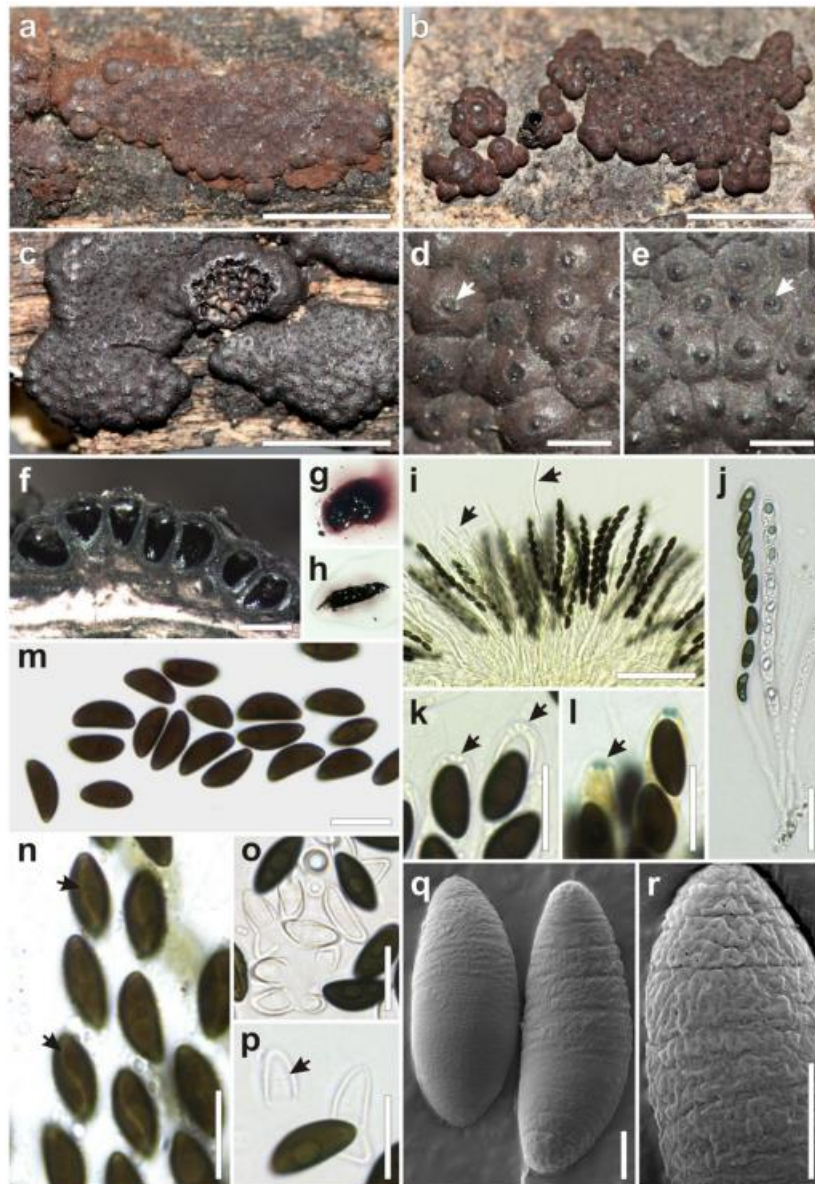


Figura 7: Teleomorfo de *Hypomontagnella monticulosa* (Sir & Hladki 261).

Fonte: Lambert et al., 2019

a) Estroma jovem no substrato; **b)** Estromas maduros na casca; **c)** Estromas maduros em madeira decorticada; **d)** Superfície estromática mostrando papila e disco ostiolar (seta); **e)** Superfície estromatal de estromas muito maduros mostrando papilas ostiulares e disco ostiolar (seta); **f)** Estromas em corte vertical mostrando os peritécios e o tecido subperitecial; **g)** Pigmentos extraíveis com KOH de estromas jovens; **h)** Porção de estromas maduros em solução de KOH apresentando pigmentos muito diluídos; **i)** Ascó e parafisados (setas); **j)** Ascó

maduros e imaturos; **k)** Pontas Ascus em 5% KOH (setas); **l)** Pontas Ascus no reagente de Melzer; **m)** Ascósporos na água; **n)** Ascósporos em KOH 5% mostrando fenda germinativa sigmoide (setas); **o)** Perisporos deiscentes em KOH 10%; **p)** Detalhes dos ascósporos com perisporo deiscente (seta); **q/r)** Microfotografias SEM dos ascósporos mostrando perisporos ornamentados.

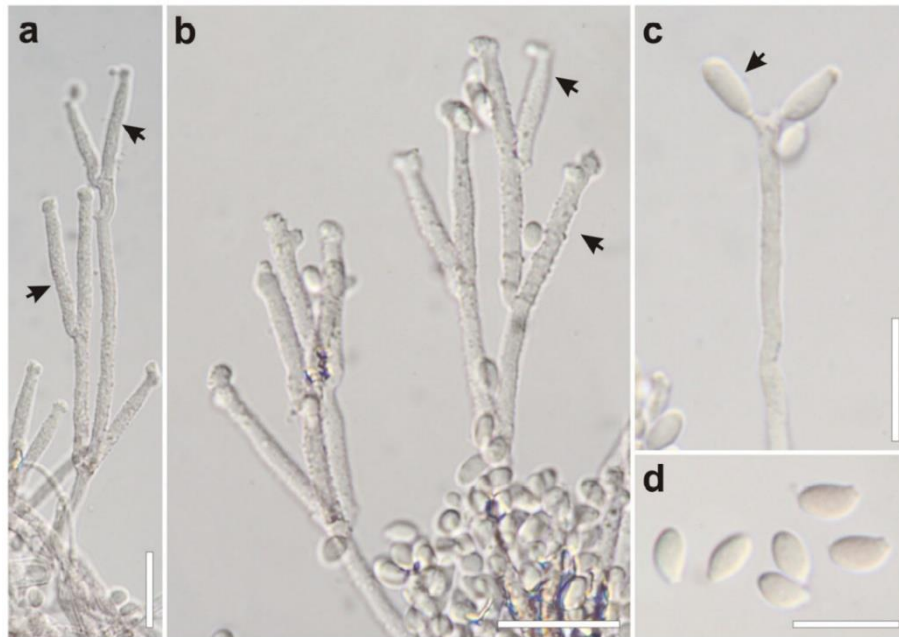


Figura 8: Anamorfo de *Hypomontagnella monticulosa* (Sir & Hladki 261).

Fonte: Lambert et al., 2019

a/b) Anamorfo com padrões de ramificação do tipo virgariella (setas); **c)** Detalhes das células conidiogênicas com conídios (seta) e **d)** Conídios.

O gênero *Hypomontagnella* possui também uma morfologia semelhante ao gênero *Annulohypoxylon* por apresentar estromas com consistência carbonácea e, às vezes, com discos imperceptíveis ao redor dos ostíolos papilíferos, mas pode ser facilmente diferenciado (LAMBERT et al., 2019)

1.3.2 *Hypomontagnella monticulosa* (sin. *Hypoxylon monticulosum*)

Hypomontagnella monticulosa (sin. *Hypoxylon monticulosum*) é um fungo endofítico ascomiceto que pode ser isolado de diferentes organismos. Pertence à família Hypoxylaceae, sendo uma das famílias de fungos mais prolíficas em metabólitos secundários, apresentando também alta diversidade morfológica. Pode ser encontrado tanto em ambientes terrestres como em ambientes marinhos, apresentando atividade citotóxica, antimicrobiana e antifúngica dentre seus compostos bioativos (SURUP et al., 2014).

Pode ser isolado de diferentes organismos marinhos como esponjas e algas, por exemplo, a partir da alga *D. marginata*. A literatura relata atividade antitumoral e anti-inflamatória associada aos seus metabólitos secundários, como é o caso dos esteroides oxigenados derivados do desmosterol (SHEU et al., 1997). Há estudos mostrando que o *H. monticulosa* também foi isolado da esponja *Sphaerocladina* e de outras algas (LEMAN-LOUBIÈRE et al., 2017).

Até o presente momento existem ainda lacunas a serem investigadas sobre a natureza química dos metabólitos produzidos por este fungo, mas o trabalho de Cheng e colaboradores (2020), sobre a composição química do *H. monticulosa* na tentativa de se descobrir mais sobre seu metabolismo, forneceu nove compostos que ainda não haviam sido relatados para este fungo (**Figura 9**).

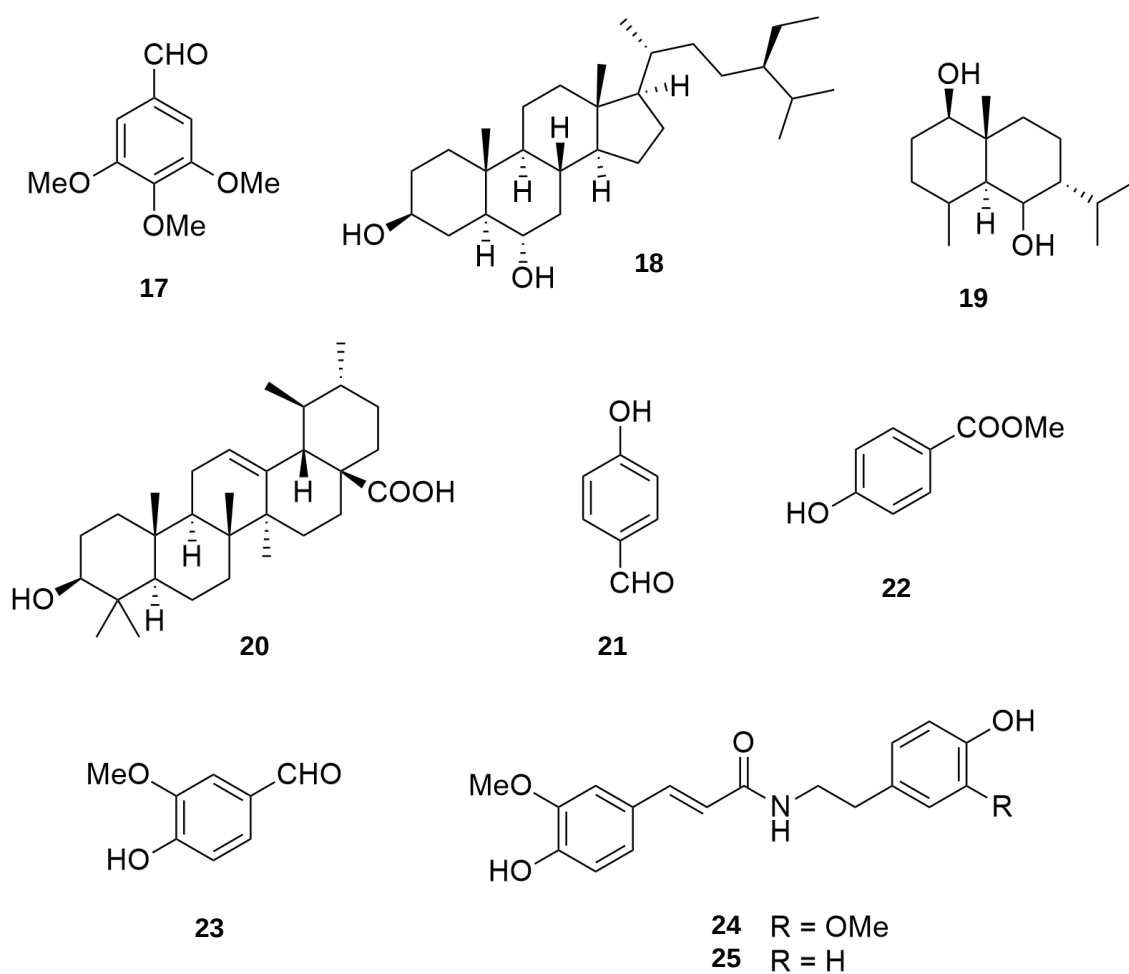


Figura 9: Compostos isolados do fungo *Hypomontagnella monticulosa*, 3,4,5-trimetoxibenzaldeído (**17**), estigmastano-3 β ,6 α -diol (**18**); eudesmo-4(15)-eno-1 β ,6 α -diol (**19**); ácido ursólico (**20**); *p*-hidroxibenzaldeído (**21**); metil parabeno (**22**); vanilina (**23**); *N*-trans-feruloilmetoxitiramina (**24**) e *N*-trans-feruloiltiramina (**25**). Fonte: Autor

1.4 Quimiometria

Uma das áreas da química que tem sido bastante explorada nos últimos anos é a quimiometria, que inclui a utilização de ferramentas matemáticas e estatísticas durante a elaboração de um experimento, com o intuito de planejar e promover uma melhor resposta e coleta de informações para um problema específico em estudo (PEREIRA; PEREIRA-FILHO, 2018).

Durante a realização de experimentos laboratoriais, pode-se obter um grande acúmulo de dados e, muitas das vezes, a maior parte das informações podem passar despercebidas devido ao fato de o próprio analista não conseguir interpretar uma quantidade elevada de informações. Como estratégia para enfrentar estes desafios, a quimiometria utiliza-se da computação para tratamento mais eficiente e rápido de um número grande de dados com intuito de obter melhores resultados, incluindo condições otimizadas, por exemplo, para cultivo de linhagens fúngicas (PEREIRA-FILHO, 2015).

Existem diferentes tipos de ferramentas quimiométricas, como por exemplo a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) onde, a análise de PCA funciona de forma não supervisionada em que cada um dos componentes principais detecta direções com maior variância na matriz de dados, enquanto a análise PLS-DA é supervisionada, no qual é feita uma otimização na separação entre os dados a partir de parâmetros das amostras, obtendo assim uma melhor separação entre os dados. Com relação ao planejamento de experimentos, no que se trata no desenvolvimento da quimiometria, existem dois tipos: o planejamento experimental completo ou fracionário (PEREIRA-FILHO, 2015). Neste trabalho, utilizou-se das análises de PCA e PLS-DA e fez-se abordagem do planejamento experimental completo 2^3 para otimização do crescimento fúngico e consequentemente, sua quimiodiversidade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar o estudo sobre o fungo endofítico *Hypomontagnella monticulosa* isolado a partir da alga vermelha *Dichotomaria marginata*, utilizando ferramentas quimiométricas com o intuito de maximizar a quimiodiversidade durante seu crescimento, caracterizando o perfil químico dos extratos obtidos, bem como avaliar a bioatividade dos extratos e substâncias isoladas.

2.2 Objetivos específicos

- i. Cultivar o fungo *H. monticulosa* isolado a partir da *D. marginata* variando a água utilizada no meio de cultivo (água ultrapura e água do mar) para obtenção dos extratos;
- ii. Obtenção do perfil químico através das análises por HPLC-DAD, GC-MS, LC-MS e UPLC-ESI-QqTOF-MS/MS,
- iii. Com o auxílio da plataforma GNPS, gerar as redes moleculares através dos dados de MSMS obtidos com a análise de LC-MS, visando contribuir para a anotação de constituintes químicos presentes nos extratos;
- iv. Realizar análises multivariadas (PCA e PLS-DA) para comparar e avaliar a diferença na produção metabólica do fungo em diferentes períodos de crescimento;
- v. Utilizar o planejamento fatorial visando a otimização da produção metabólica e crescimento do endófito *H. monticulosa*;
- vi. Realizar bioensaios *in vitro* dos extratos obtidos do fungo *H. monticulosa* a fim de verificar potencial atividade antifúngica, citotóxica, antibacteriana, larvícida e anticolinesterásica, bem como de substâncias isoladas;
- vii. Isolar, identificar e determinar as estruturas dos metabólitos secundários produzidos pela linhagem fúngica em estudo através de técnicas cromatográficas e espectrométricas (HPLC-DAD, IV, RMN de ^1H e ^{13}C bidimensionais, GC-MS e UPLC-ESI-QqTOF-MS/MS).

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta do material estudado

Partes saudáveis da alga vermelha *D. marginata* foram coletadas em abril de 2015, no costão direito da Praia da Fortaleza, Ubatuba - SP (**Figura 10**). O material coletado foi lavado, cuidadosamente, em água do mar e armazenado em frascos contendo água do mar esterilizada e gentamicina, acondicionado em caixas térmicas, e transportado ao Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP/Araraquara). A macroalga foi identificada pela Dr^a. Nair Yokoya e depositado no herbário do Instituto de Botânica de São Paulo.

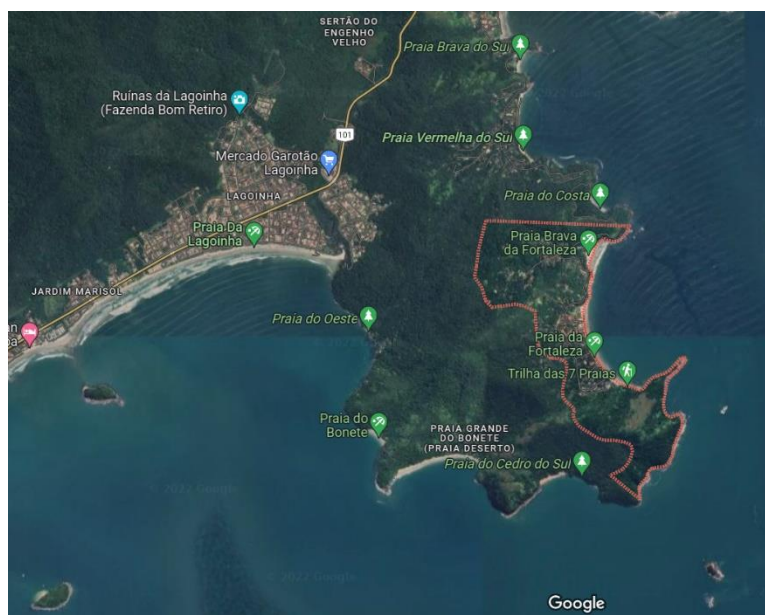


Figura 10: Região de coleta da *Dichotomaria marginata*. Fonte: Google Maps

3.2 Obtenção e cultivo do endófito

O isolamento dos endófitos associados à *D. marginata* foi realizado, anteriormente, a partir do trabalho de Honório (2018), como descrito abaixo:

Método 1: A superfície do material vegetal foi esterilizada por imersão em EtOH 70% por 10 segundos.

Método 2: Imersão em solução de NaOCl 1% por 6 segundos e em EtOH 70% por 2 segundos.

Ambos os procedimentos foram seguidos de dupla lavagem em água esteril por 10 minutos. As algas foram seccionadas com ajuda de bisturi e inseridas em meio de cultura sólido batata-dextrose-ágar (BDA), ao qual foi adicionado, após ser autoclavado, antibiótico (Gentamicina $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para evitar o crescimento bacteriano. Para cada método foram usadas duas placas preparadas com água ultrapura e duas placas com água do mar. Para controle da eficácia do método de assepsia, uma alíquota de água de lavagem foi inoculada em BDA/água ultra pura e BDA/água do mar.

O crescimento dos fungos foi monitorado e repiques sucessivos foram realizados até a obtenção das linhagens puras, sendo preservadas em frascos com água esterilizada (água do mar ou ultrapura) e o fungo preservado em meio sólido BDA. Após a preservação, os frascos foram lacrados, mantidos a temperatura ambiente e depositados na micoteca do Departamento de Bioquímica e Química Orgânica (DBQO), IQ-UNESP (**Figura 11**). A avaliação da pureza das linhagens foi realizada por morfologia através da aparência uniforme das placas, sendo posteriormente preservadas em frascos com água esterilizada “slants”.

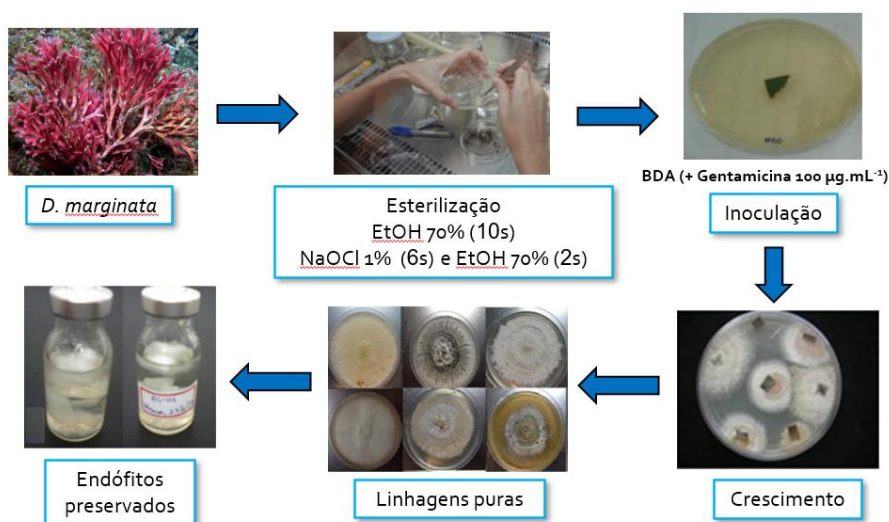


Figura 11: Metodologia de esterilização, isolamento e purificação dos endófitos.

Fonte: Honório, 2018

3.2.1 Identificação do fungo *Hypomontagnella monticulosa*

A identificação do fungo endofítico *H. monticulosa* (linhagem DM01M1), isolado de *D. marginata* foi realizado em parceria com o Prof. Dr. Marcos Antônio Soares da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). As cepas fúngicas foram agrupadas morfológicamente, com confirmação pela análise de traços em microscópio utilizando lâminas de microcultura e, posteriormente, comparados com dados taxonômicos.

A identificação seguiu através do sequenciamento Sanger de regiões específicas do DNA (ITS) do microorganismo. 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).

3.3 Curva de crescimento da linhagem em pequena escala

Os meios de cultivo foram preparados dissolvendo 9,75g de BDA em 250 mL de água ultra pura, já o meio líquido de malte foi prosperado dissolvendo 6g do meio e dissolvido em 300 mL de água ultra pura.

A linhagem fúngica foi cultivada em placas de petri contendo meio de BDA, por um período de 12 dias. Após o tempo de crescimento, realizou-se a replicação do endófito em 21 frascos Erlenmeyer de boca larga contendo meio líquido de malte, por um período de 35 dias a 25 °C, em modo estático. O repique foi realizado com o auxílio de uma ponteira de 1000 µL, previamente esterilizada em autoclave por 20 minutos, onde foram adicionados 5 discos do micélio em cada frasco Erlenmeyer, tendo assim um maior controle na massa micelar inoculada no meio líquido.

A curva de crescimento foi construída utilizando 7 pontos que representam os períodos de 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 dias de crescimento. Após o período de crescimento de cada um dos pontos da curva, o micélio foi

separado do caldo por filtração a vácuo, seco por um período de 24 horas a temperatura de 100 °C. Com a massa micelar (g.mL^{-1}) obtida, elaborou-se a curva de crescimento do endófito com relação ao período de crescimento, sendo cada ponto realizado em triplicata.

3.3.1 Obtenção do extrato de incubação do endófito em pequena escala

Após o crescimento do fungo em modo estático, realizou-se sua inativação com AcOEt, permanecendo por um período de 24 horas submerso no solvente. Em seguida o micélio foi filtrado a vácuo utilizando um funil de Buchner e o caldo obtido passou por uma partição líquido-líquido com 3x AcOEt (1:1) com relação ao volume utilizado no crescimento em meio líquido. Posteriormente, a fase orgânica também passou por uma partição líquido-líquido utilizando água, a fim de se retirar os açúcares presentes no meio de malte. Por fim, o solvente foi evaporado utilizando um rotaevaporador R-114 da Büchi, fornecendo assim o extrato de incubação fúngica em AcOEt.

Os extratos obtidos foram submetidos às análises de HPLC-DAD, GC-MS, LC-MS e espectrometria de massas de alta resolução, para a obtenção do perfil químico, e enviados para ensaios antibacterianos, citotóxico, antifúngico e anticolinesterásico.

3.4 Técnicas para análise do perfil químico

3.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (HPLC-DAD)

Os extratos e frações obtidas foram analisados em modo analítico por HPLC-DAD equipado com duas bombas (LC-20AT), degaseificador (DGU-20A₃), injetor automático (SIL-20A) e detector do tipo arranjo de diodos (SPD-M20A). O sistema utilizado inicialmente nas análises é composto por uma coluna analítica Luna Phenomenex de octadecil silano (C-18) 100Å, com dimensão 250 x 4,6 mm, 5 μm . A eluição foi realizada em modo gradiente de H₂O/MeOH (95:05 -

0:100) em 45 minutos, permanecendo nesta condição por mais 10 minutos, com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e comparado em 231 e 256 nm.

As análises por HPLC-DAD no modo preparativo, foi realizado em um equipamento Shimadzu® equipado com duas bombas (LC-6AD), uma comunicadora (CBM-20A), degaseificador (DGU-20A_{5R}) e detector de arranjos de diodos (SPD-M20A). Fez-se a utilização de uma coluna preparativa Luna Phenomenex de octadecil silano (C-18) 100Å, com dimensão 150 x 21,2 mm, 5µm. A corrida cromatográfica foi realizada em modo gradiente de H₂O/MeOH (56:44 - 0:100) em 45 minutos, permanecendo nesta condição por mais 10 minutos, com fluxo de 10,0 mL.min⁻¹ e comparado em 231 e 256 nm.

Ambas as colunas eram equipadas de uma pré-coluna. Para a coluna analítica, a pré-coluna era da SecurityGuard Cartridg de octadecil silano (C-18) com dimensão de 4 x 3,0 mm. Já a pré-coluna utilizado no modo preparativo é do tipo SecurityGuard Cartridg de octadecil silano (C-18) com dimensão de 15 x 21,2 mm, com um diâmetro de partícula de 5µm.

3.4.2 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS)

Os extratos analisados por LC-MS foram realizados em um cromatógrafo Shimadzu® acoplado a um espectrômetro de massas Amazon-SL (Bruker Daltonics). O cromatógrafo era composto pelos seguintes módulos: duas bombas (LC20AD), forno (CTO-20A), degaseificador (DGU-20A_{3R}), módulo de comunicação (CBM-20A) e detector de arranjo de diodos (SPD-M20A). A injeção (5 µL) foi feita utilizando um injetor automático (SIL-20A HT).

Os espectros foram obtidos em modo positivo na faixa de aquisição de m/z 400-2000. Os parâmetros da fonte de ionização por *electrospray* (ESI) do espectrômetro de massas foram: voltagem capilar 140 V, voltagem do capilar de -3,5 kV e temperatura de dessolvatação de 300 °C. Utilizou-se nitrogênio como gás de secagem e dessolvatação. Os dados foram processados com o auxílio do software *Data-Analysis* versão 4.3.

3.4.3 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)

Realizou-se inicialmente o processo de derivação das amostras no intuito de aumentar sua volatilidade e obter uma melhor separação dos metabólitos com base na diferença de polaridade. O processo de derivação consistiu em duas etapas, sendo realizado a metoximação seguido de uma sililação.

Metoximação:

- i. Preparou-se uma solução de 20 mg.mL⁻¹ de cloridrato de metoxiamina em piridina,
- ii. Pesou-se 5 mg da amostra,
- iii. Adicionou-se 80 µL da solução de cloridrato na amostra,
- iv. Em seguida, foi adicionado 100 µL de piridina para a solubilização da amostra,
- v. A amostra foi aquecida a 30 °C por 90 minutos.

Sililação:

- i. Foi adicionado 200 µL de MSTFA [*N*-metil-*N*-(trimetilsilil)trifluoroacetamida] a amostra,
- ii. Realizou a homogeneização da amostra até total solubilização,
- iii. Aqueceu-se a amostra a 37 °C por 30 minutos,
- iv. A amostra foi acondicionada em geladeira por um período de 24 horas
- v. Filtrou-se a amostra com auxílio de um microfiltro de 0,22 µm,
- vi. A amostra foi transferida para um *vial* contendo um *insert* de 350 µL.

As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo a gás modelo Shimadzu CGMS-QP2020 equipado com um injetor automático AOC-20i, coluna capilar Restek® SH-RTx-5MS (5% difenil/95% dimetil polisiloxano) de 30m x 0,25 mm x 0,25 µm, GCMS solution version 4.41.

A temperatura do forno iniciou-se em 60 °C e permaneceu nessa temperatura por 1 min, após este período a temperatura começou a subir 5 °C por min até atingir 320 °C, permanecendo nesta temperatura por um período de 10 min.

A temperatura do injetor foi mantida a 270 °C em modo split 1/10. Utilizou-se hélio (99,999 %) como gás de arraste em um fluxo constante de 1,0 mL.min⁻¹

com volume de amostra de 1 µL. A pressão foi de 57,4 KPa, velocidade linear de 36,5 cm.seg⁻¹ e fluxo total de 14 mL.min⁻¹. Para as condições de detecção por EM, foi utilizada temperatura da fonte de íons de 270 °C, temperatura de interface de 280 °C, modo de impacto de elétrons a 70 eV e faixa da massa de aquisição de *m/z* 35-700 Da. A aquisição dos dados foi obtida e analisada pelo software CG-MS Analysis.

Os dados brutos de GC-MS foram analisados usando a solução Shimadzu GCMS View software v. 2.61, e a identificação das substâncias presentes foram utilizadas duas metodologias para maior confiabilidade dos resultados. O primeiro foi realizado através do Índice de Retenção (RI) foi calculado com base na equação de Van den Dool e Kratz (**Equação 1**), através da interpolação do tempo de retenção das bandas cromatográficas de interesse com as bandas imediatamente anterior e posterior da série homóloga de alcanos (C10-C40) (**Figura 12**). A segunda metodologia foi com base na comparação desses RIs com o banco de dados do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST 14[®] Library), sendo considerado apenas valores acima de 80% de similaridade com o banco de dados.

$$IR = 100 n + 100 \frac{tRx - tRn}{(tRn+1) - tRn} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde;

- i. *n* é o número de carbonos do hidrocarboneto anterior ao pico de interesse;
- ii. *tRx* é o tempo de retenção da substância de interesse;
- iii. *tRn* é o tempo de retenção do *n*-alcanos eluídos antes do analito e;
- iv. *tRn+1* o tempo de retenção de *n*-alcano posterior ao pico de interesse.

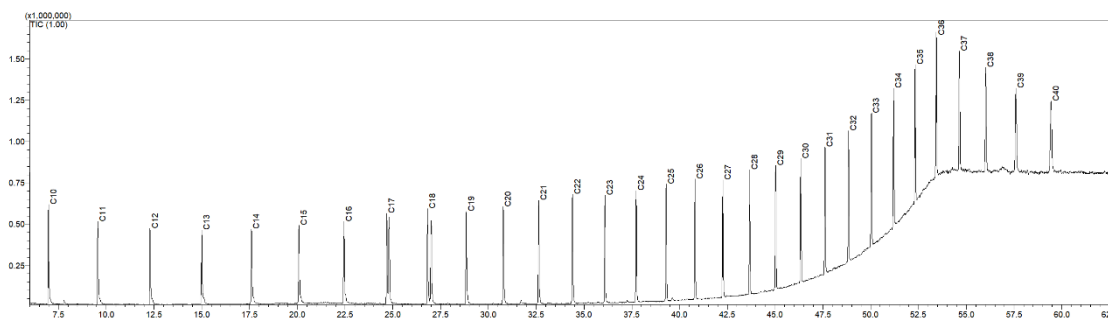


Figura 12: Série homóloga de hidrocarbonetos (C10-C40). Fonte: Autor

3.4.4 Espectroscopia de infravermelho (IV)

A análise de IV foi realizada em parceria com o aluno de mestrado Eder Luiz Menezes da Silva Júnior, do departamento de química analítica, físico-química e química inorgânica do Instituto de Química de Araraquara. Utilizou-se de um equipamento Frontier FT-IR da PerkinElmer, equipado do software PerkinElmer FT-IR 10.6.1. Durante a análise, realizou-se 128 varreduras no espectro em um intervalo de 4000 a 550 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

A detecção foi realizada por um detector do tipo LiTaO_3 , com fonte Mir e separador de feixe do tipo OptKbr. A velocidade de varredura foi feita em 0,5 cm^{-1} , tipo de IGram duplo e a direção de varredura combinada.

A análise e plotagem do espectro foi realizada com auxílio do programa OriginPro 9.0.

3.4.5 Espectrometria de Massas de Alta Resolução (UPLC-ESI-QqTOF-MS/MS)

As análises por massas de alta resolução foram realizadas em um cromatógrafo Waters contendo uma coluna de C18 Acquity UPLC[®]HSST3, com dimensões de 100 x 2,1mm, com partículas de 1,8 μm de diâmetro e 100 Å de diâmetro do poro. Para eluição, utilizou-se H_2O e ACN, ambos acidificados com ácido fórmico 0,1% v/v. A análise ocorreu em gradiente exploratório 5 - 100% ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$) em 25 min., finalizando com 100% de ACN para a limpeza da coluna.

por um período de 5 minutos. A vazão foi de 500 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e o forno da coluna manteve-se a uma temperatura de 40 °C. Para a detecção no DAD, operou-se em uma faixa de 210 - 800 nm, com 20 Hz na frequência de aquisição.

A aquisição foi realizada em modo positivo e negativo no espectrômetro de massas com uma faixa de m/z 100 - 1500. Foram feitos os ajustes na fonte de ionização mantendo a temperatura a 100 °C e, no capilar de eletrospray, foi aplicado um potencial de 2,5 kV. No cone de transferência, foi aplicado um potencial de 40 V. Utilizou-se o N_2 como gás de dessolvatação, com um fluxo de 800 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ e a temperatura mantida em 350 °C.

Os experimentos de MS/MS foram realizados em duas condições de energia aplicadas à célula de colisão, sendo obtidos os espectros de massas baixas utilizando uma rampa de potencial de 20 - 40 eV e para obtenção dos espectros de massas altas, fez-se uso de uma rampa de potencial de 60 - 80 eV. Como referência de massa, utilizou-se a leucina-encefalina, sendo promovida uma correção dos valores experimentais de m/z . Sendo assim, preparou-se uma solução deste composto a uma concentração de 200 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, que foi infundida de modo contínuo através do capilar secundário de eletrospray do espectrômetro. A vazão de infusão foi de 5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e o capilar secundário de ESI foi mantido com um potencial de 0,5 kV. Para o monitoramento da razão m/z do calibrante, foi realizado a uma energia de colisão de 4 eV a cada 10 segundos e os dados de MS foram corrigidos durante a aquisição.

Os dados obtidos a partir das análises realizadas, foram tratados no software UNIFI® 1.8 (Waters, Millford, USA).

3.4.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As amostras foram solubilizadas em metanol- d_4 e posteriormente submetidas à análise de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (COSY, TOCSY, HSQC e HMBC) no equipamento Bruker Ascend III 600 com campo magnético de 14,1 T e criosonda TCI (Triple Channel Inverse) de 5 mm. O TMS foi utilizado como referência interna.

3.5 Ferramentas quimiométricas

3.5.1 Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)

Os dados da análise de espectrometria de massas de alta resolução obtidos após a realização da curva de crescimento do fungo, passaram por uma conversão utilizando o MSConvert onde foram convertidos do formato .raw diretamente para .mzML, e após a conversão, os dados foram submetidos a um pré-processamento com o auxílio do programa MZmine 2.54. Para o processamento no MZmine foram utilizados os seguintes parâmetros:

- i. Detecção de massa (MS1): 1,0E3 (Nível de ruído), 5 (Nível de escala) e 30% (Tamanho de janela Wavelet);
- ii. Detecção de massa (MS2): 1,0E2 (Nível de ruído), 5 (Nível de escala) e 30% (Tamanho de janela Wavelet);
- iii. Construtor de cromatograma ADAP: 2 (Tamanho mínimo do grupo em # de varreduras), 1,0E3 (limite de intensidade do grupo), 1,0E3 (Máxima intensidade) e 0,2 (Tolerância m/z);
- iv. Deconvolução do cromatograma: deconvoluted_Wavelets (Sufixo), Wavelets (Algoritmo), 10 (Limite S/N), intensidade de janela SN (S/N estimador), 1,000 (Altura mínima do recurso), 100 (Coeficiente/limite de área), 0,01 - 1,00 (Faixa de duração do pico), 0,00 - 0,05 (Faixa de RT wavelet), MEDIANA (Cálculo de centro m/z), 0,2 [Intervalo de m/z para emparelhamento de varredura MS2 (Da)];
- v. Grupo de picos isotópicos: deisotópico (Sufixo do nome), 20,0 ppm (Tolerância de m/z , 0,1 absoluto/min (Tolerância do tempo de retenção), 2 (Carga máxima) e mais intenso (Isótopo representativo);
- vi. Alinhamento: lista de recursos alinhados (Nome da lista de recursos), 20,0 ppm (tolerância m/z , 75 (Peso por m/z), 0,1 absoluto.min⁻¹ (Tolerância do tempo de retenção), 25 (Peso para RT);
- vii. Filtro: filtered_MSMSonly (Sufixo de nome), 3 (Picos mínimos em uma linha), 2 (Picos mínimos em um padrão de isótopos), 0,01 0 15,50 (Tempo de retenção), 0,00 – 10,00 (Intervalo de duração de picos) e 0,00 – 1,00 (Chromatographic FWHM).

Após o tratamento dos dados, os cromatogramas foram separados em grupos de 1 a 7, sendo cada grupo contido com uma triplicata referente a um determinado ponto de crescimento da curva. Em ambas as análises multivariadas, fez-se a subtração do branco em todos os pontos da curva, melhorando a visualização da resposta, sendo então apresentadas apenas as substâncias que o próprio fungo conseguiu produzir nos diferentes períodos de incubação.

Os dados foram então adicionados à plataforma do MetaboAnalyst 5.0 para as análises de PCA e PLS-DA, sendo feito o uso dos seguintes parâmetros:

- i. Filtragem de Dados: Desvio padrão (SD);
- ii. Visão geral de normalização

Normalização da amostra: normalização por mediana;

Transformação de dados: nenhum;

Escala de dados: escala de Pareto.

3.5.2 Planejamento experimental

Para melhorar as condições experimentais de crescimento e produção metabólica do fungo, utilizou-se do planejamento experimental visando estabelecer melhores condições de cultivo para maximizar a diversidade química e produção de compostos pelo fungo. Esse tipo de estratégia experimental é uma etapa de suma importância quando se deseja identificar, num universo de variáveis, aquelas que são mais significativas sobre uma dada resposta.

Para tanto, nesta estratégia, foram selecionados três variáveis para serem testadas em dois níveis, assumindo um desenho fatorial de 2^3 . Foi então selecionado as variáveis temperatura (x'), tempo de crescimento (x'') e pH (x'''), cada uma em três níveis (-1, 0, +1) com dois pontos axiais e um ponto central (**Tabela 1**).

Tabela 1: Variáveis e níveis do planejamento fatorial completo 2³

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	20	25	30
Tempo (dias)	20	25	30
pH*	5,0	6,5	8,0

*para controle do pH, o meio de malte foi diluído em solução tampão KH₂PO₄/NaOH preparado no pH desejado.

Ao todo, realizou-se 11 experimentos, sendo 8 ensaios sob níveis e variáveis distintas e 3 réplicas em torno do ponto central (**Tabela 2**). Os experimentos no ponto central garantem maior eficiência no processo de modelagem (equação de regressão) e aumentam o espaço amostral avaliado.

Tabela 2: Matriz do planejamento fatorial completo 2³

Ensaio	Código	Níveis Codificados			Níveis Decodificados		
		X'	X''	X'''	Temperatura (°C)	Tempo (dias)	pH
1	Ext.pl.01	-1	-1	-1	20	20	5,0
2	Ext.pl.02	+1	-1	-1	30	20	5,0
3	Ext.pl.03	-1	+1	-1	20	30	5,0
4	Ext.pl.04	+1	+1	-1	30	30	5,0
5	Ext.pl.05	-1	-1	+1	20	20	8,0
6	Ext.pl.06	+1	-1	+1	30	20	8,0
7	Ext.pl.07	-1	+1	+1	20	30	8,0
8	Ext.pl.08	+1	+1	+1	30	30	8,0
9	Ext.pl.09	0	0	0	25	25	6,5
10	Ext.pl.10	0	0	0	25	25	6,5
11	Ext.pl.11	0	0	0	25	25	6,5

Com auxílio do software Statistica 10.0, os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, a fim de se ter uma melhor resposta e compreensão das variáveis utilizadas durante o seu crescimento, tendo como fator principal a observação de cada variável de forma independente e a interação entre elas. Como resposta à análise, foi considerado o número de picos observados em cada um dos cromatogramas obtidos nos 11 experimentos realizados, onde foi considerado, com melhor resultado, o experimento em que as variáveis inseridas auxiliassem de forma positiva uma maior quimiodiversidade produzida pelo endófito.

3.5.2.1 Fracionamento do extrato Ext.pl.10 obtido no planejamento experimental

Com a realização do planejamento experimental, observou-se que os experimentos realizados em torno do ponto central, obtiveram maiores rendimentos com relação à massa de extrato. Com auxílio do HPLC-DAD, fez-se então o fracionamento do extrato obtido no experimento 10 (Ext.pl.10), utilizando uma coluna preparativa contendo fase estacionária de C-18, obtendo assim 18 frações.

As frações obtidas foram submetidas a análise em HPLC-DAD, para observar o perfil químico. A partir dos cromatogramas obtidos, foi observado que na fração Frc12 apresentou apenas um único pico absorvendo na região de 231 nm, sendo então realizado o isolamento da substância Frc12, posteriormente foi submetida a análise de RMN de ^1H e ^{13}C (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC) e espectrometria de massas de alta resolução para a elucidação de sua estrutura. A substância foi enviada para testes de atividade antibacteriana, citotóxica e antifúngica, a fim de se verificar se possui bioatividade.

3.6 Redes Moleculares (GNPS)

Realizou-se a análise utilizando a plataforma do GNPS, sendo que inicialmente fez-se a conversão dos dados utilizando o MSConvert onde foram convertidos do formato .raw diretamente para .mzML, mesmo procedimento

utilizado para as análises de PCA e PLS-DA. Após conversão, os dados foram inseridos na plataforma do molecular networking com auxílio do programa WinSCP.

Após a inserção dos dados na plataforma, utilizou-se dos seguintes parâmetros para a construção das redes moleculares:

Opções básicas

- i. Tolerância de massa do íon precursor: 2,0 Da;
- ii. Tolerância de massa de íons fragmentos: 0,5 Da.

Opções avançadas de rede

- i. Mínimo de pares de cosseno: 0,4;
- ii. Mínimo de íons de fragmentos correspondentes: 4;
- iii. Topo de rede K: 10;
- iv. Tamanho mínimo do cluster: 1
- v. Tamanho máximo dos componentes conectados: 100.

Opções avançadas de pesquisa de biblioteca

- i. Picos de correspondência mínima da pesquisa de biblioteca: 6;
- ii. Limite de pontuação: 0,7;
- iii. Diferença máxima de massa de pesquisa analógica: 100.

Opções avançadas de filtragem

- i. Janela do precursor do filtro: filtrar;
- ii. Filtrar picos na janela 50 Da: filtrar;
- iii. Filtrar os espectros do G6 como espaços em branco antes da rede: filtrar.

Opções de saída avançada

- i. Criar buckets de cluster e saídas de gráficos qiime2/Biom/PCoA: criar.

Após a inserção dos parâmetros, foram então geradas as redes moleculares, sendo então exportadas e visualizadas utilizando o programa Cytoscape 3.8.2.

3.7 Crescimento do endófito em larga escala e obtenção do extrato

O crescimento em escala ampliada seguiu-se com a otimização feita através dos resultados obtidos com a realização do planejamento fatorial completo 2³. Realizou-se um novo crescimento da linhagem fúngica utilizando os mesmos parâmetros do cultivo em pequena escala. Após os 12 dias de crescimento em placas de BDA, o fungo foi inoculado em 60 frascos Erlenmeyer, de boca larga, contendo 300 mL de meio líquido de malte em pH 8,0.

O crescimento foi realizado em modo estático, a uma temperatura de 30 °C, por um período de 30 dias.

Após o crescimento em modo estático, realizou-se sua inativação com AcOEt, permanecendo por um período de 24 horas submerso no solvente. Em seguida o micélio foi filtrado a vácuo utilizando um funil de Buchner. O caldo obtido passou por uma partição líquido-líquido com 3x AcOEt (1:1) com relação ao volume utilizado no crescimento em meio líquido. Posteriormente, a fase orgânica também passou por uma partição líquido-líquido utilizando água, a fim de se retirar os açúcares que estão presentes no meio de malte. Por fim, o solvente foi evaporado utilizando um rotaevaporador R-114 da Büchi, obtendo assim o extrato da incubação fúngica em AcOEt.

Os extratos obtidos foram submetidos às análises de HPLC-DAD, GC-MS e LC-MS, para a obtenção do perfil químico, e enviados para ensaios antibacterianos, citotóxico, antifúngico e larvicida.

3.7.1 Pré-fracionamento do extrato obtido em larga escala

Inicialmente, o extrato obtido após o crescimento em larga escala foi pré-fracionado em uma coluna de Sephadex LH-20 utilizando MeOH 100% como eluente. A coluna foi preparada utilizando uma razão v/v entre a fase estacionária e o extrato. O empacotamento da coluna foi feito com um volume de 42 mL referente à fase estacionária e o extrato foi solubilizado em 6 mL de MeOH. Realizou-se a eluição do extrato com um volume de 42 mL de MeOH em cada eluição, repetindo este procedimento por seis vezes, totalizando 252 mL de MeOH, obtendo ao final 28 frações.

As frações obtidas foram analisadas em HPLC-DAD, para observação do perfil químico. Após o pré-fracionamento, as frações F10 e F11 foram submetidas a um novo fracionamento utilizando HPLC-DAD com uma coluna preparativa contendo C-18, para isolamento das substâncias presentes. As substâncias isoladas foram então submetidas às análises de RMN de ^1H e ^{13}C (COSY, HSQC e HMBC) e espectrometria de massas de alta resolução para a elucidação estrutural.

3.8 Bioensaios

3.8.1 Atividade antibacteriana

Os extratos e substâncias isoladas foram enviadas ao Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular (LEMiMo) do Instituto de Física da Universidade de São Paulo - USP, São Carlos, sob coordenação da Profa. Dr^a. Ilana L. B. C. Camargo. Os ensaios foram realizados frente a linhagens bacterianas Gram positivas (*S. epidemidis* ATCC35984, *S. aureus* ATCC25923, *S. aureus* ATCC8095, *E. fecalis* ATCC29212 e *E. faecium* ATCC700221) e Gram negativas (*K. pneumoniae* ATCC700603, *E. coli* ATCC25922, *A. baumannii* ATCC19606 e *P. aeruginosa* ATCC27853).

Na triagem inicial todas as amostras foram diluídas em DMSO para a preparação de uma solução estoque 100x concentrada. Posteriormente, a solução estoque foi diluída 1:100 em Caldo Mueller Hinton Cátion ajustado (MHCA-BD). A partir disso, cada amostra foi testada a $512\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ e a adição do inóculo foi realizada de acordo com o protocolo do CLSI (2015) para o método de microdiluição em caldo. No controle positivo foi adicionado a bactéria sem o composto para observação do seu crescimento no meio de cultura MHCA-BD. Para o controle negativo, há apenas o meio de cultura, sem a bactéria, para que não haja contaminação. A incubação foi realizada a $35\ ^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ e a leitura visual dos resultados foi realizada após um período de 24 horas. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.8.2 Potencial Citotóxico

Os extratos e substâncias isoladas foram enviadas para o laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais Marinhos no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, sob a coordenação da Prof^a. Dr^a. Leticia Veras Costa Lotufo. Para as amostras enviadas, foram realizados testes em linhagem de células de carcinoma colorretal humano (HCT116) e linhagem de câncer de mama humano (MCF7).

As amostras foram diluídas em DMSO na concentração de 10 mg.mL⁻¹ e 1 mg.mL⁻¹. Para a linhagem de HCT116, Foram plaqueadas 6×10^3 células por poço, em placas de 96 poços (3×10^4 células.mL⁻¹ em 200 µL de meio) e para a linhagem de MCF7, foram plaqueadas 10×10^3 células por poço, em placas de 96 poços (5×10^4 células.mL⁻¹ em 200 µL de meio). Após 24 horas, as amostras foram adicionadas em concentrações de 5 µg.mL⁻¹ e 50 µg.mL⁻¹ para ambas as linhagens, sendo cada concentração em duplicata, e incubadas por um período de 72 horas. Para o controle positivo, foi utilizada a doxorubicina nas concentrações de 0,0032 a 10 µM e DMSO como controle negativo.

Após 72 horas de incubação, o sobrenadante foi substituído por meio de cultura contendo MTT (0,5 mg.mL⁻¹). 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 µL de DMSO, e a absorbância foi medida a 570 nm (MOSMANN, 1983).

Os valores de concentração inibitória média (IC₅₀) juntamente com os intervalos de confiança de 95% foram calculados por regressão não linear com relação ao controle positivo de doxorubicina usando GraphPad Prism 8.

3.8.3 Atividade larvicida frente ao mosquito do *Aedes aegypti*

3.8.3.1 Teste larvicida em placas e cálculo de IC₅₀

Os extratos foram enviados para o laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - UnB, sob coordenação das professoras Dr^a. Laila Salmen Espindola e Dr^a. Lorena Carneiro Albernaz. Realizou-se teste rápido com as amostras em quadruplicata

e em placas de 12 poços. As amostras foram transferidas para os poços, contendo 3 mL de água desclorada com 10 larvas do terceiro estágio (L3). Larvas pequenas ou danificadas foram removidas e substituídas. Em cada amostra foi adicionado um volume apropriado para atingir a concentração desejada. Para o controle positivo, utilizou-se temefós e para o controle negativo foi utilizado DMSO e água desclorada.

A mortalidade das larvas foi observado nos períodos após 24, 48 e 72 horas de exposição, sendo considerado ativo somente as amostras causarem mortalidade superior a 80% de mortalidade nas concentrações de 250 µg.mL⁻¹ respectivamente. As avaliações do EC₅₀ seguiram o protocolo 00011 (POP) do laboratório de Farmacognosia.

3.8.3.2 Teste pupicida

O ensaio rápido foi realizado em placas de 12 poços contendo 3 mL de água desclorada e 10 pupas. Utilizou-se como controle negativo o DMSO. Foram consideradas ativas somente as amostras que a 250 µg.mL⁻¹, causarem mortalidade superior a 80%. O teste foi realizado em quadruplicata. A mortalidade das pupas foi avaliada após 24 e 48 horas de exposição.

3.8.4 Atividade antifúngica

3.8.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC₉₀)

Para o ensaio antifúngico, foi realizado em parceria com o Núcleo de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista (FCF-UNESP), sob coordenação da Prof^a. Dr. Ana Marisa e Prof^a. Dr^a. Maria José.

O teste de sensibilidade para *Candida albicans*, foi realizado de acordo com as diretrizes estipuladas pelo protocolo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 (2008). *Candida* spp. Para o estabelecimento da MIC, preparou-se um inóculo inicial em solução salina 0,85% NaCl contendo 1 a 5x10⁶ células.mL⁻¹, a partir deste inóculo foram feitas posteriormente duas diluições de

1:100 e 1:20 em RPMI 1640, para que a concentração final de células foi de 5×10^2 a $2,5 \times 10^3$ células.mL⁻¹.

Os extratos foram preparados a partir de uma concentração de estoque de 500 µg.mL⁻¹ e 100 µL do inóculo foram pipetados em placas de 96 poços, então 100 µL do inóculo foram adicionados em RPMI 1640 de modo que a concentração inicial do extrato variou de 0,48 a 250 µg.mL⁻¹.

Como controles, foram usadas a esterilidade do meio, o controle de crescimento negativo e como controles positivos foram utilizados os fármacos Anfotericina B, Caspofungina e Itraconazol (0,0624 a 32 µg.mL⁻¹).

Para obtenção dos resultados, foi realizada leitura visual do crescimento com e sem adição de 30 µL do corante de viabilidade celular resazurina 0,01%, com posterior leitura em espectrofotômetro a 570 e 600 nm.

4.8.5 Atividade anticolinesterásica

Os ensaios de inibição foram realizados em enzimas acetilcolinesterase de peixe elétrico (AChE_{ee}) e butirilcolinesterase humana (BChE_{hu}), em parceria com o Grupo de Cromatografia de Bioafinidade e Produtos Naturais (GCBPN), da USP de Ribeirão Preto. Os ensaios foram realizados pela professora Dr^a. Carmen Lúcia Cardoso e a técnica Olímpia Paschoal Martins.

Para este ensaio foram utilizadas as enzimas AChE_{ee}(peixe elétrico) e BChE_{hu} (soro humano) imobilizadas covalentemente em capilar de sílica fundida (30 cm x 0,375mm x 100 µmd.i.) sendo nominadas ICER (*ImmobilizedCapillaryEnzymeReactor*) ICER-AChE_{ee} e ICER-BChE_{hu}, respectivamente (SEIDL et al., 2019; VILELA et al., 2018; VANZOLINI et al., 2013).

Os ICER-AChE_{ee} e ICER-BChE_{hu} foram utilizados como biorreatores enzimáticos acoplados individualmente entre um instrumento de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e um espectrômetro de massas (MS) formando um sistema *on-flow* para a realização de ensaios de *screening* de inibidores enzimáticos. Neste sistema a reação enzimática é monitorada pela

quantificação direta do produto de hidrólise enzimática m/z 104, utilizando a galantamina como inibidor padrão.

A triagem de inibição pontual foi conduzida da seguinte forma:

- i. Fase móvel: solução de acetato de amônio 15 mM, pH 8,0
- ii. Vazão de 0,05 mL.min⁻¹
- iii. Volume de injeção: 10 µL da solução contendo 70 µM de acetilcolina (ACh) e 200 µg.mL⁻¹ da amostra candidata a inibidor
- iv. Volume de injeção: 10 µL da solução contendo 70 µM de butirilcolina (BChE_{hu}) e 200 µg.mL⁻¹ da amostra candidata a inibidor
- v. Inibidor padrão utilizado: Galantamina (100 µM) para AChE_{ee} e BChE_{hu}

A partir de cada solução estoque de cada um dos compostos (2 mg.mL⁻¹) foram aliquoteados 10 µL (200 µg.mL⁻¹ concentração final) e adicionados 20 µL da solução estoque de ACh 350 µM (70 µM concentração final) e 70 µL da solução de acetato de amônio 15 mM, pH 8,0. O volume final do meio reacional foi de 100 µL. As soluções foram preparadas em triplicatas e alíquotas de 10 µL foram injetadas no sistema CLAE-EM contendo separadamente os ICER-AChE_{ee} e ICER-BChE_{hu}.

Entre a análise de cada amostra foi realizado um controle positivo, que consiste na avaliação da atividade enzimática sem o composto candidato a inibidor, sendo o meio reacional constituído por 70 µL da solução de acetato de amônio 15 mM, pH 8,0, 20 µL da solução de ACh e 10 µL do solvente de solubilização dos compostos (metanol).

Também foi realizado um controle negativo, que consiste na avaliação de um branco de cada composto na presença do substrato da enzima, porém utilizando um reator sem a enzima imobilizada (capilar vazio). Esse ensaio é realizado para avaliar a interferência do composto na auto-hidrólise do substrato.

Os percentuais de inibição foram obtidos comparando-se a área da atividade da enzima na presença do inibidor (P_i) com a área da atividade da enzima na ausência de inibidor (P_o), de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ de inibição} = 100 - \left[\left(\frac{P_i - S_b}{P_0 - S_b} \right) \times 100 \right] \quad \text{(Equação 2)}$$

onde S_b representa a área da colina resultante espontânea do substrato, para esse controle um capilar vazio foi utilizado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Curva de crescimento do fungo *H. monticulosa* e análise do perfil químico

Após a obtenção dos valores de massa de micélio e massa de extrato produzido (**Tabela 3**), foram gerados dois gráficos para curva de crescimento. O primeiro (**Figura 13A**) foi construído com base na massa de extrato produzida para cada período de crescimento. Já o segundo gráfico (**Figura 13B**), foi construído comparando a massa de micélio seco referente à cada período de crescimento do endófito. Após obtenção dos extratos, os dados foram então submetidos às análises no espectrômetro de massas de alta resolução em modo positivo (**Figura 14**) para a obtenção do perfil químico, também foram feitas as análises em modo negativo (**APÊNDICE A**).

Tabela 3: Massas obtidas da linhagem DM01M1 em escala reduzida

Extrato	Crescimento (dias)	Massa de extrato (mg)	Massa de micélio (g)
Ext.01	5	7,5	0,5355
Ext.02	10	59,9	0,9125
Ext.03	15	124,4	0,9182
Ext.04	20	152,5	1,2746
Ext.05	25	160,8	1,0435
Ext.06	30	131,3	1,3380
Ext.07	35	139,6	1,5122

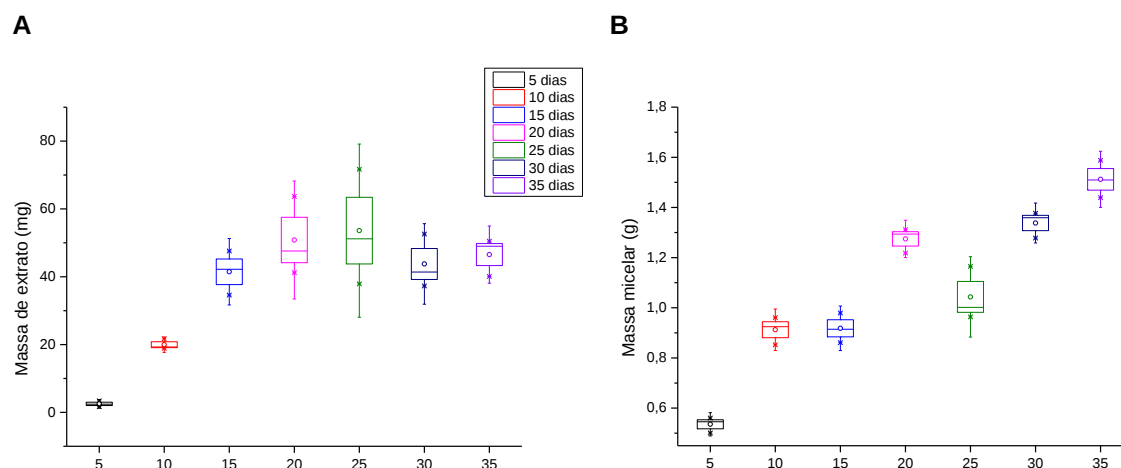
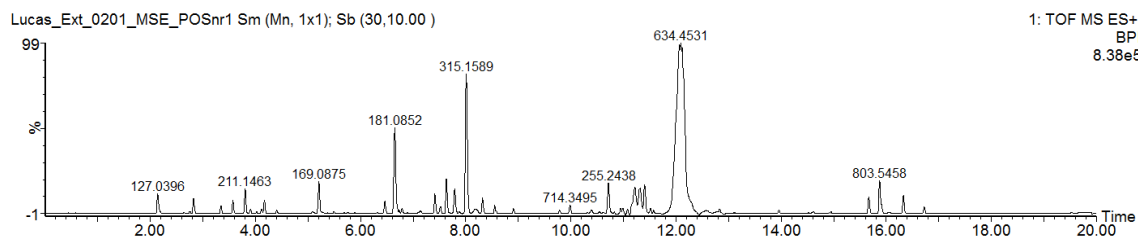
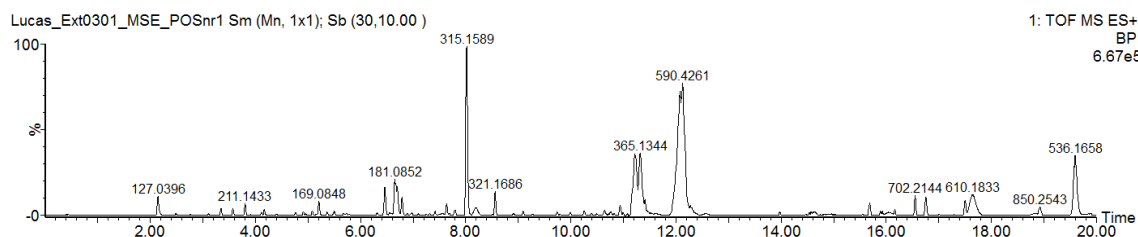
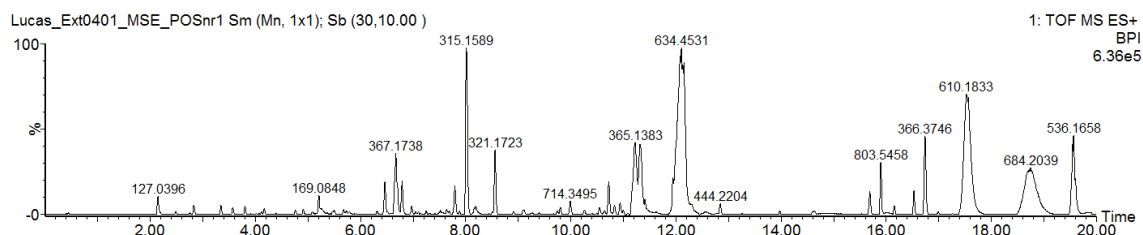
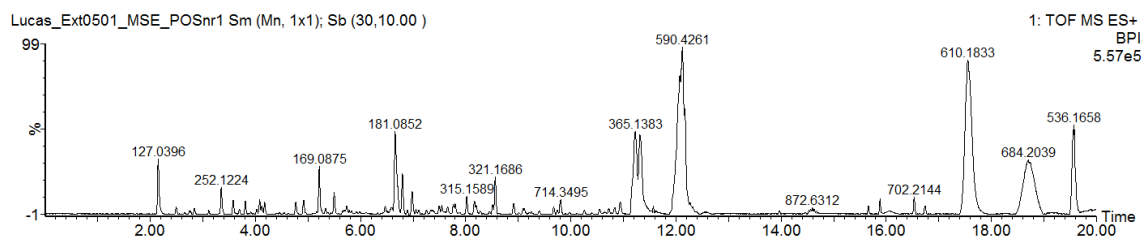
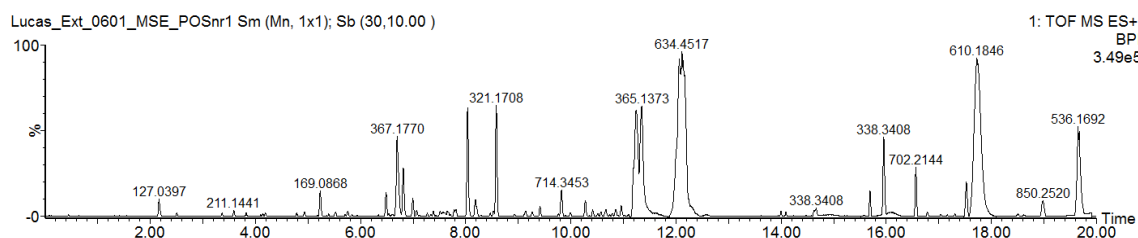
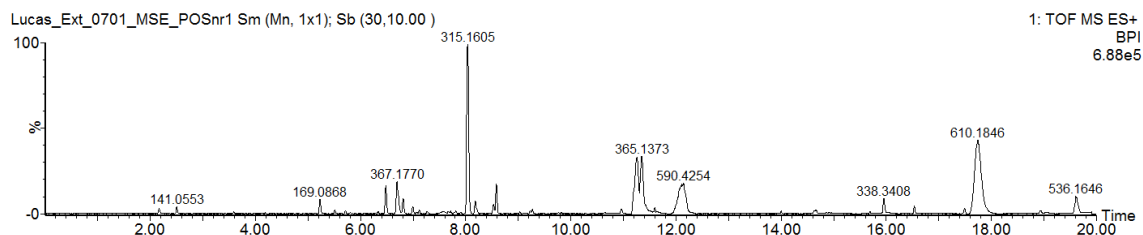


Figura 13: Curva de crescimento da linhagem DM01M1 com relação ao tempo de crescimento versus **A)** massa de extrato e **B)** massa de micélio. Fonte: Autor

A partir da curva de crescimento fúngico com relação entre a massa de extrato obtida com o período de crescimento (**Figura 13A**), tem-se que, em 25 dias o fungo produziu mais massa do que os demais e, após este período o fungo tem um decaimento em seu rendimento de extrato, evidenciando sua morte devido à falta de nutrientes presentes no meio de cultivo. Entretanto, após o decaimento, há novamente um crescimento de sua massa após os 30 dias. O mesmo é observado para a massa de micélio (**Figura 13B**), onde a massa atinge seu valor máximo em 20 dias e depois sofre um decaimento, indicando a morte do fungo e, após esse período de 20 dias, o fungo voltou a crescer em massa novamente. Isto ocorreu pois, na falta de nutrientes do meio, o fungo começou a consumir as substâncias que ele mesmo produziu, sendo possível observar, através dos cromatogramas para cada um dos extratos (**Figura 14**), uma diminuição da intensidade e do número de picos após o período de 25 dias de crescimento.



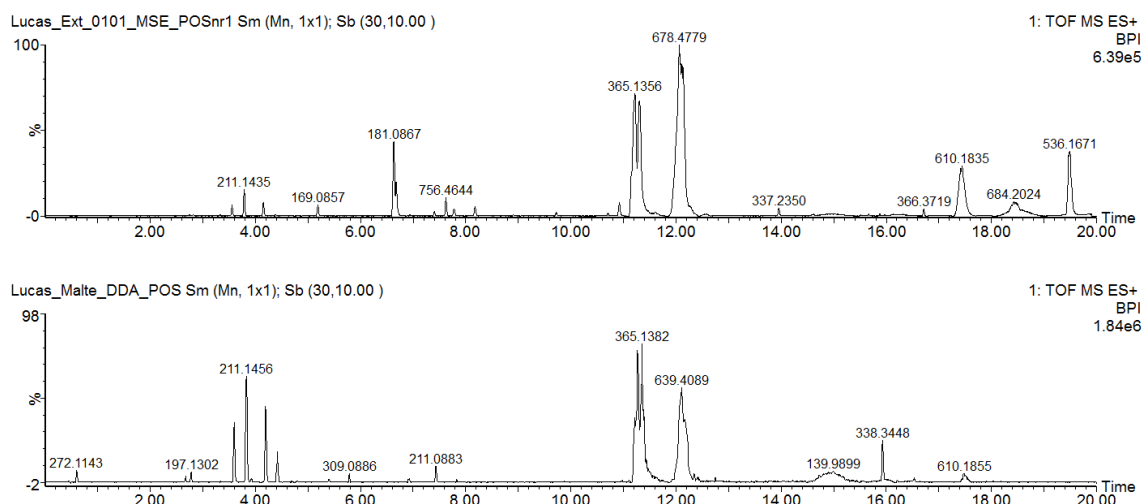


Figura 14: Comparação do perfil químico nos diferentes tempos de crescimento em gradiente exploratório por UPLC-ESI-QqTOF-MS/MS em modo positivo. Fonte: Autor

4.1.1 Análise do perfil químico em água do mar

Com os resultados a partir da curva de crescimento, observou-se que o perfil químico do fungo apresentou um melhor resultado em 25 dias de crescimento, levando em consideração o número de picos presentes no cromatograma e, tendo isso como base, optou-se por crescer o fungo novamente nesse mesmo período, alterando apenas a água de cultivo para água do mar, com o intuito de observar se ocorreria variação metabólica durante seu crescimento.

Após o crescimento e obtenção do extrato, fez-se a análise do perfil químico no massas de alta resolução e LC-MS. Realizou-se então a comparação dos perfis (**Figura 15**) com o do extrato preparado em água ultrapura, notando uma diferença no rendimento final do extrato, onde quando crescido em água ultrapura, obteve-se 160,8 mg de extrato e, quando crescido em água do mar, o rendimento foi de 102,5 mg.

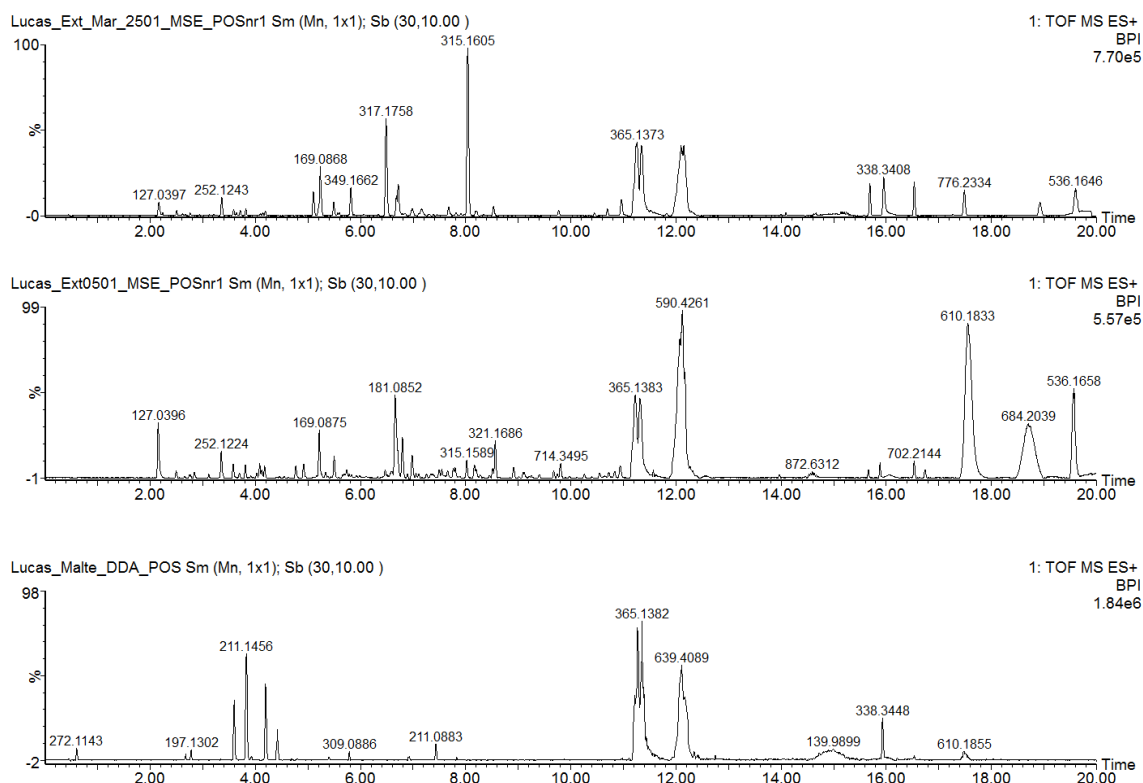


Figura 15: Comparação do perfil químico nos diferentes tempos de crescimento em gradiente exploratório por UPLC-ESI-QqTOF-MS/MS em modo positivo. Fonte: Autor

Quando comparados os perfis químicos, a diferença não é tão grande como a massa de rendimento do extrato, mas nota-se diferença na intensidade dos picos, como também a não presença de alguns picos no extrato em água do mar. Sendo assim, optou-se por continuar o crescimento do fungo em água ultrapura apenas.

4.2 Análise multivariada da curva de crescimento fúngica (PCA e PLS-DA)

Após as análises de espectrometria de massas de alta resolução dos extratos obtidos com a curva de crescimento, os dados foram convertidos e processados utilizando o MSConvert e MZmine 2.54. Os dados foram separados em 7 grupos, onde cada grupo foi ocupado por um ponto da curva de crescimento realizado em triplicata. Após o tratamento dos dados, foram então

inseridos na plataforma do MetaboAnalyst 5.0 e realizado as análises de PCA e PLS-DA.

Para ambas as análises, foram gerados os gráficos de Scores Plot (**Figura 16A e B**), representando a correlação entre os perfis químicos dos extratos, mostrando assim a diferença na produção metabólica feita pelo fungo com o passar dos dias de crescimento, exibindo regiões com 95% de confiança. Percebe-se uma mudança do comportamento nos gráficos quando comparado nas diferentes análises, isso acontece, pois, a análise de PLS-DA ocorre pelo método de classificação supervisionada, onde é feita a discriminação entre os dados de forma para cada período de crescimento, havendo uma melhor separação entre os extratos. Ambos os gráficos mostram que apenas um único extrato (Ext.01) apresentou uma maior variação no seu perfil químico quando comparado com os demais, podendo então sugerir que, o metabolismo do fungo se diferencia apenas nos primeiros 5 dias de crescimento. Após esse período, não se percebe diferenciação significativa do metabolismo do fungo nos demais dias de crescimento, podendo ser notado uma melhor separação entre eles quando observado o gráfico de PLS-DA.

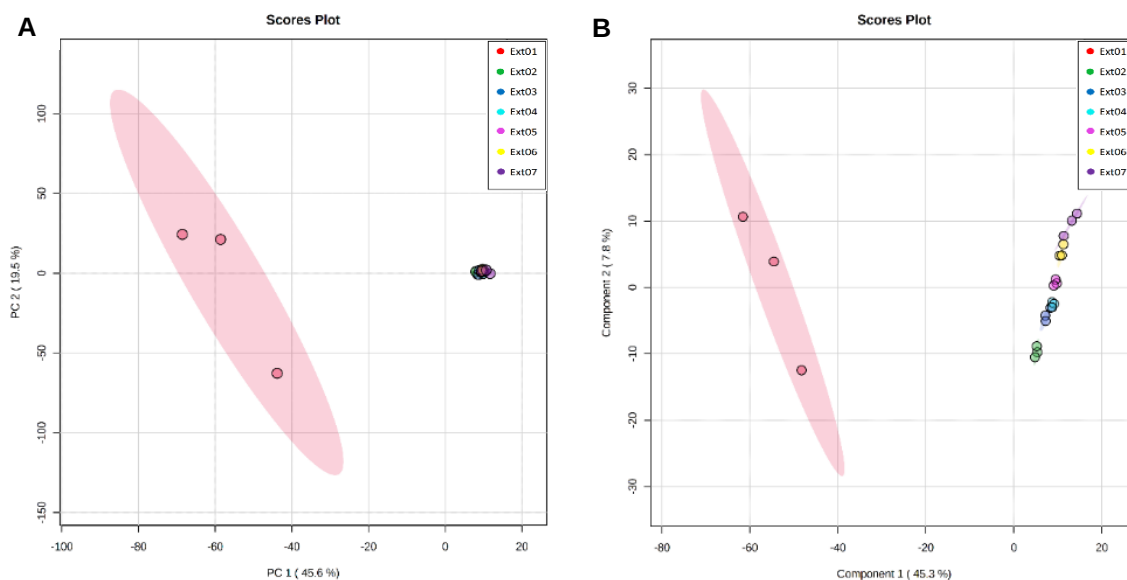


Figura 16: **A)** análise de componentes principais (PCA) e **B)** análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Fonte: Autor

Uma outra forma de olhar essa relação entre as substâncias produzidas nos diferentes tempos de crescimento é através do heatmap (**Figura 17**), representando a correlação entre os picos observados nos cromatogramas em cada um dos extratos, evidenciando o grau de influência de uma determinada substância se encontra nos diferentes extratos. Como observado a partir das análises de PCA e PLS-DA, a maior parte das substâncias apresentam maior incidência no extrato obtido com 5 dias de crescimento (Ext.01), evidenciando mais uma vez que o metabolismo do fungo se diferencia apenas nos primeiros dias de crescimento. Após os cinco dias, não há diferença significativa na produção metabólica. Vale ressaltar também que, ao comparar o cromatograma do Ext.01 obtido na análise por espectrometria de massas de alta resolução com o do padrão de malte, há certa semelhança entre eles, isso ocorre porque o fungo está nos primeiros dias de crescimento e, os nutrientes presentes no meio ainda não foram consumidos totalmente.

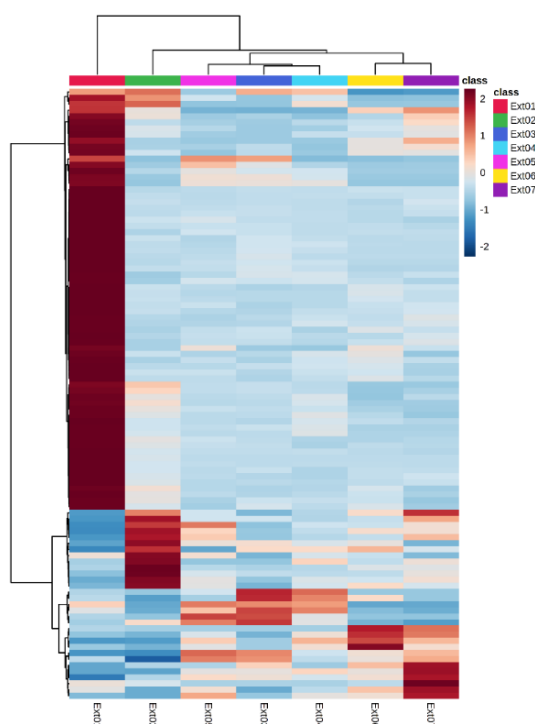


Figura 17: Heatmap da intensidade de pico em escala com base na análise de características moleculares significativas. Fonte: Autor

4.3 Planejamento fatorial completo 2³

Após obtenção dos resultados a partir da curva de crescimento fúngica, fez-se a utilização do planejamento fatorial 2³, inserindo variáveis distintas durante o crescimento do fungo a fim de se otimizar seu crescimento e observar como o seu metabolismo se comporta em diferentes condições, visando aumentar sua quimiodiversidade. Os extratos resultantes foram submetidos às análises de LC-MS e massas de alta resolução (**APÊNDICE B e C**), para obtenção do perfil químico, onde foi observado uma mudança nos perfis químicos, principalmente quando comparado o número de picos e intensidade em cada um (**Tabela 4**), além de observar uma mudança no rendimento de extrato para cada um dos ensaios realizados.

Tabela 4: Resultados obtidos a partir do planejamento fatorial completo 2³

Extrato	Temperatura (°C)	Tempo (dias)	pH	Massa de extrato (mg)	Nº de picos
Ext.pl.01	20	20	5,0	138,1	48
Ext.pl.02	30	20	5,0	72,9	43
Ext.pl.03	20	30	5,0	231,7	42
Ext.pl.04	30	30	5,0	183,0	30
Ext.pl.05	20	20	8,0	63,1	33
Ext.pl.06	30	20	8,0	56,7	45
Ext.pl.07	20	30	8,0	99,4	30
Ext.pl.08	30	30	8,0	96,3	51
Ext.pl.09	25	25	6,5	248,3	36
Ext.pl.10	25	25	6,5	224,4	35
Ext.pl.11	25	25	6,5	188,3	34

Ao analisar a **Tabela 4**, percebe-se que os extratos que apresentaram maior número de picos nos cromatogramas, não necessariamente apresentaram altos rendimentos em relação a massa final, como visto para a curva de

crescimento, neste caso, a massa é algo relativo, pois um valor alto de massa não significa necessariamente um alta quimiodiversidade.

Os extratos que foram obtidos a partir de condições de cultivo semelhantes, não apresentaram muita variação entre si com relação ao rendimento da massa de extrato e o número de picos observados e, quando feito a comparação entre os perfis químicos obtidos por HPLC-DAD (**Figura 18**) em diferentes condições de cultivo, percebe-se que há variação no perfil químico. A diferença no número de picos é importante, pois com ela, pode-se tirar como resposta as melhores condições de cultivo do fungo, observando que o emprego do planejamento fatorial 2^3 é a obtenção de melhores condições de crescimento no intuito de se obter uma maior produção metabólica.

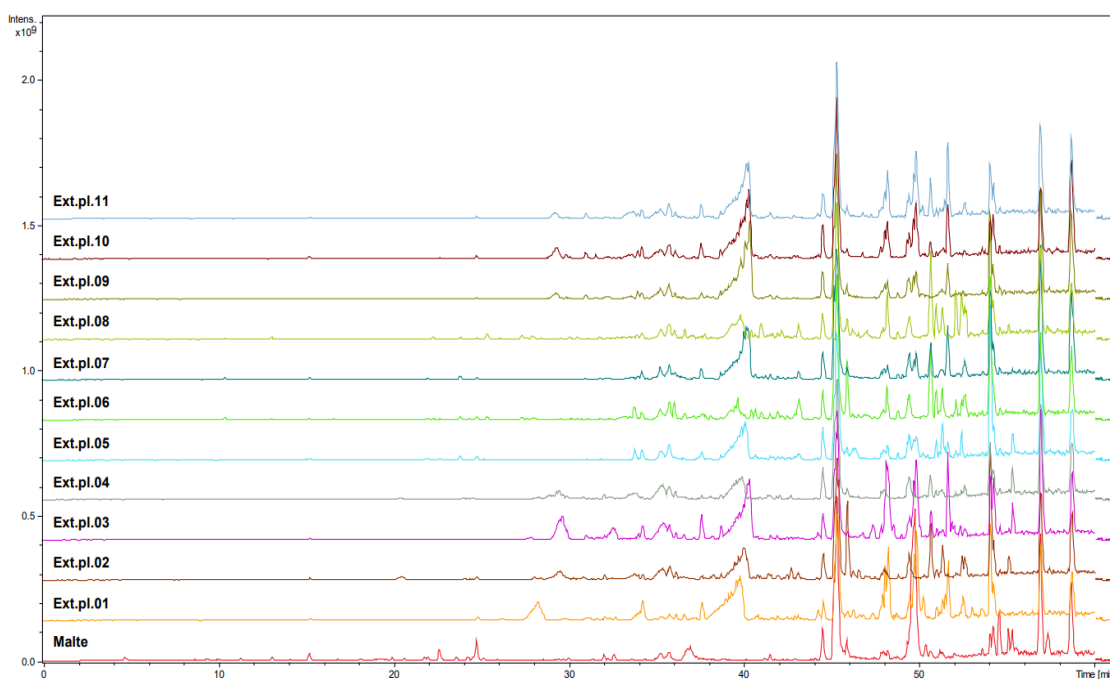


Figura 18: Perfil químico dos extratos obtidos no planejamento fatorial 2^3 por LC-MS em modo gradiente exploratório 5-100% (MeOH/H₂O) em 50 min. Fonte: Autor

Quando observado os diferentes perfis, nota-se que, na região de 30 a 40 min do espectro, há a presença de picos semelhantes em todos os extratos, havendo uma pequena diferença no número e intensidade deles. Essa região mostra a presença de substâncias produzidas pelo fungo, e que estão presentes

em todos os extratos analisados, independente da condição empregada, e quando comparado com o meio de cultivo, onde o mesmo não apresenta picos nessa região.

Com a obtenção dos dados referente à cada ensaio, o emprego de análise estatística para foi de suma importância para melhor observar os resultados. A partir da análise estatística, gerou-se o diagrama de Pareto (**Figura 19**), observando que a utilização das variáveis fora de suma importância para o experimento, pois houve influência significativa nos resultados. Observando o diagrama de Pareto, têm-se que o pH do meio não foi significativo quando analisado individualmente, mas mostrou ser mais influente quando comparado a interação entre o pH e temperatura, bem como sua interação com o período de crescimento.

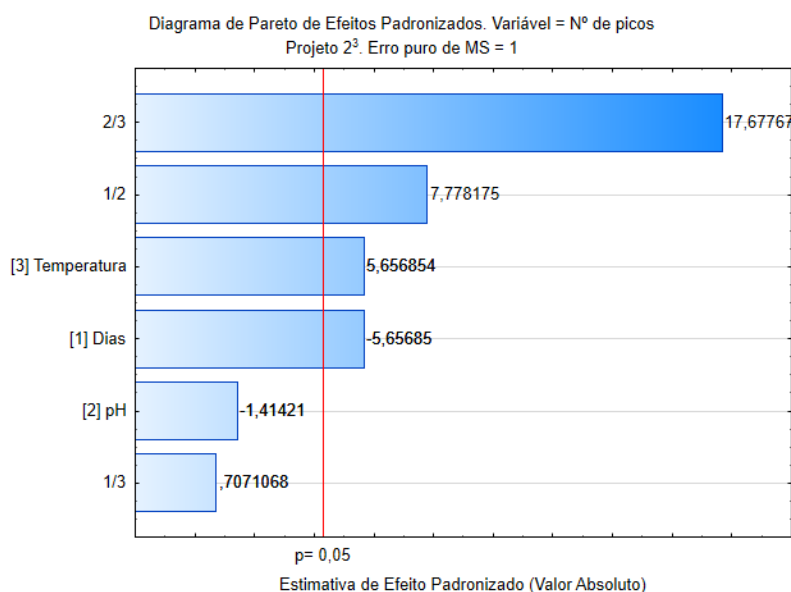


Figura 19: Diagrama de Pareto com efeito entre as variáveis durante o planejamento fatorial 2³. Fonte: Autor

Para melhor visualização da interação entre a temperatura/pH e dias/pH durante o crescimento do endófito, como sendo as variáveis mais significantes de acordo com a análise estatística, foram gerados os gráficos de superfície

(Figura 20A e B), onde é possível observar a relação entre as variáveis com o número de picos nos cromatogramas.

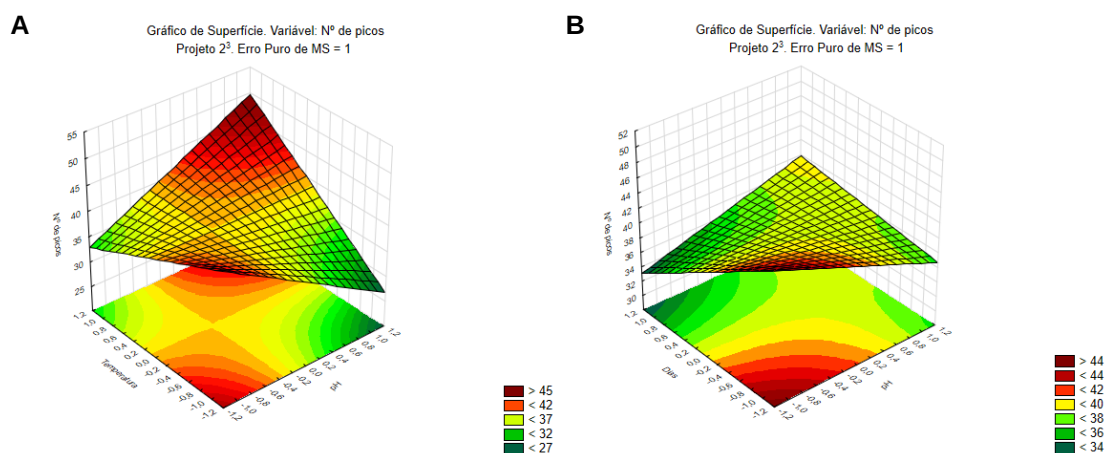


Figura 20: Gráfico de superfície da interação entre **A)** temperatura e pH e **B)** período de crescimento e pH, em relação ao número de picos observados. Fonte: Autor

Têm-se que, valores de pH e temperatura mais altos, observou-se melhores resultados, observando um maior número de picos no cromatograma quando comparado com os demais ensaios realizados. Tem-se também que, para valores mínimos de temperatura e pH, houve um alto índice de picos, não tanto quanto valores mais altos. Já quando analisado o período de crescimento com o pH, observou que um menor período de crescimento e pH mais ácidos, obteve melhor resultado e a partir disso, foi possível realizar a otimização do crescimento do fungo.

4.4 Anotações de substâncias a partir das redes moleculares geradas (GNPS)

Os dados obtidos a partir da análise de LC-MS, em modo positivo, dos extratos provenientes de cada ensaio realizado durante o planejamento experimental, foram inseridos na plataforma do GNPS e gerado as redes moleculares em função do pH de crescimento fúngico (**Figura 21**).

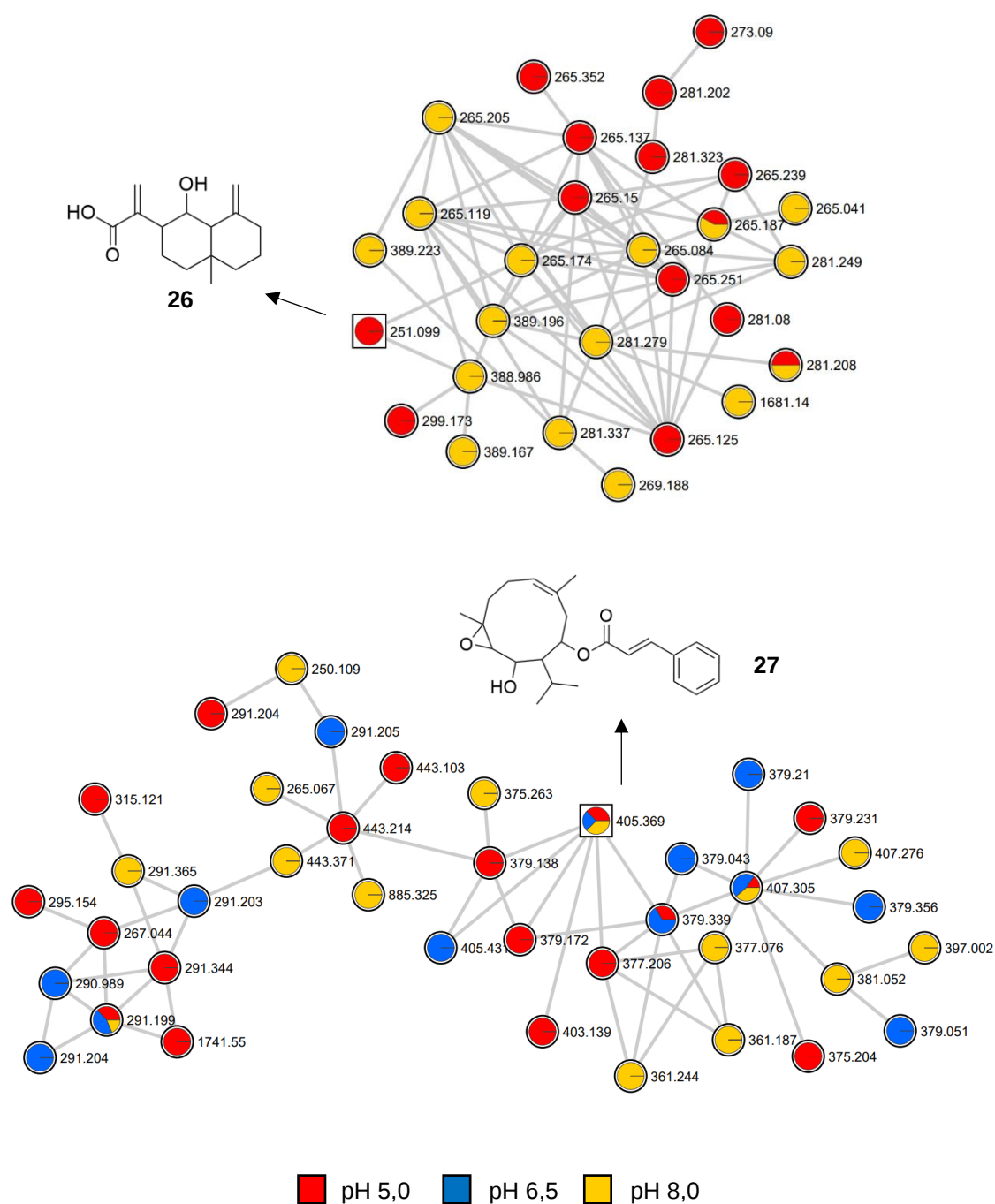


Figura 21: Redes moleculares geradas na plataforma GNPS, anotações observadas em pH 5 para a substância (26) e todos os valores de pH para a substância (27). Fonte: Autor

Após gerar as redes moleculares, foram feitos cerca de 123 hits com substâncias presentes no banco de dados da plataforma, muitas dessas anotações foram de açúcares, o que não é tão interessante, pois são substância

que não foram produzidas pelo fungo e sim, açúcares presentes no meio de cultivo, e, mesmo realizando partição com H₂O para maior remoção desses açúcares durante a obtenção do extrato, ainda assim, não houve remoção total.

Com a geração das redes moleculares, pode-se observar algumas substâncias que foram anotadas durante a análise, observando uma maior ocorrência de terpenos e alcaloides nos extratos. A partir das anotações, percebe-se que o pH influenciou a formação de determinados metabólitos secundários, como mostrado após a análise estatística, bem como a influência conjunta com a temperatura do meio, podendo observar determinados metabólitos em apenas um valor de pH.

Contudo, também observou a produção de metabólitos em todos os valores de pH empregados, como no caso dos terpenoides ácido 2-(1-hidroxi-4a-metil-8-metilenodecahidronaftalen-2-il)acrílico (**26**) e o 2-hidroxi-3-isopropil-6,10-dimetil-11-oxabicyclo[8.1.0]undec-6-en-4-il cinamato (**27**). Foram então comparados os espectros de massas da substância com os existentes no banco de dados da plataforma, observando-se para a substância **26** a similaridade entre 6 picos e um cosseno de 0,82 (**Figura 22**), enquanto a substância **27** apresentou similaridade entre 7 picos e cosseno de 0,77 (**Figura 23**), sendo realizada uma comparação entre o espectro existente no banco de dados (verde) com o espectro obtido experimentalmente (preto).

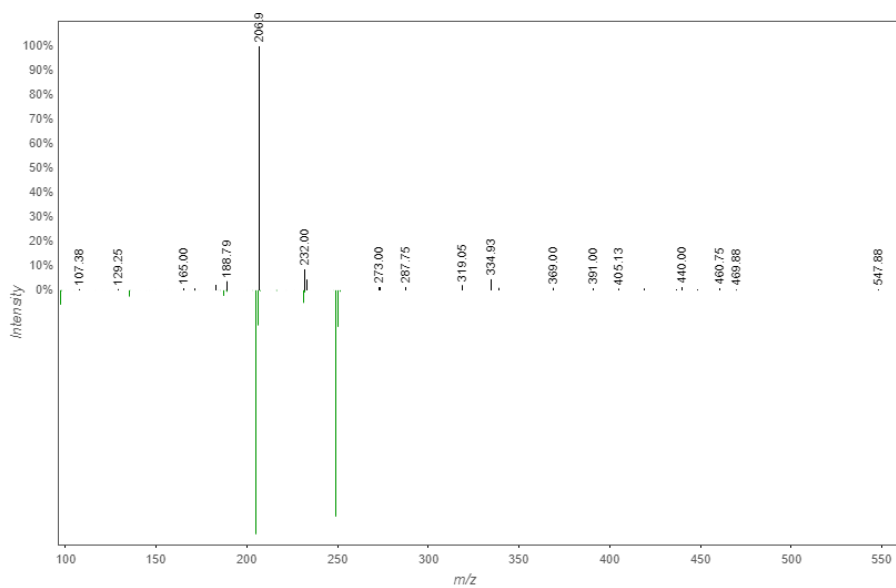


Figura 22: Comparação entre os espectros de massa experimental (preto) da substância (26) com o banco de dados (verde) da plataforma GNPS. Fonte: Autor

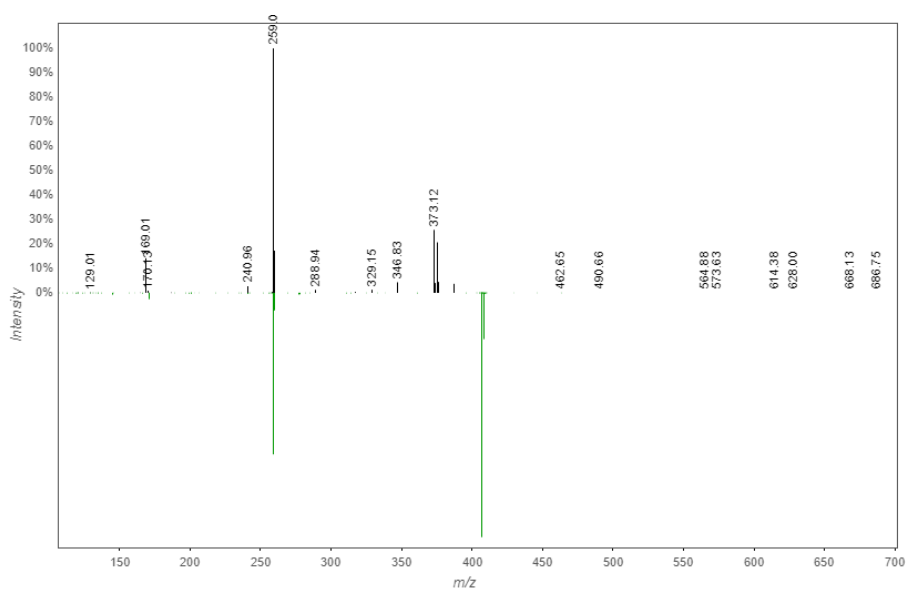


Figura 23: Comparação entre os espectros de massa experimental (preto) da substância (27) com o banco de dados (verde) da plataforma GNPS. Fonte: Autor

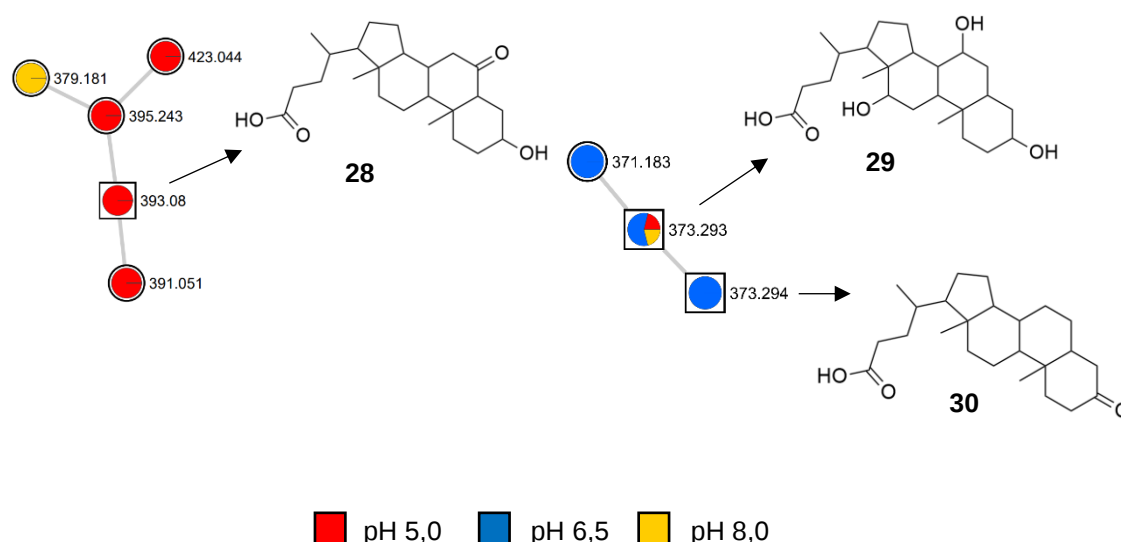


Figura 24: Redes moleculares geradas na plataforma GNPS, anotações observadas em pH 5 para a substância (**28**), todos os valores de pH para a substância (**29**) e pH 6,5 para a substância (**30**). Fonte: Autor

Os terpenoides ácido 4-(3-hidroxi-10,13-dimetil-6-oxohexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)pentanóico (**28**), ácido cólico (**29**) e o ácido 4-(10,13-dimetil-3-oxohexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)pentanóico (**30**) também foram anotados. Ao serem comparados, os três apresentam estruturas muito semelhantes, principalmente as substâncias **28** e **30**, cuja semelhança é ainda maior, diferindo-se apenas na posição dos grupos carbonila e a presença de um grupo hidroxila em **28**, que aparece oxidado a C=O na substância **30**.

Devido à semelhança estrutural, os nodos referentes às substâncias **29** e **30** estão presentes na mesma rede molecular, visto que, as redes são geradas de acordo com o padrão de fragmentação de cada substância. Porém, a substância **28** não apareceu na mesma rede que as demais, o que em teoria deveria acontecer, já que estruturalmente são semelhantes. Ainda não foi

possível esclarecer esta diferença, já que se esperaria padrão de fragmentação parecido para estes três terpenoides.

Foi então comparado os espectros de massas dessas substâncias com o banco de dados da plataforma, observando que a substância **28 (Figura 25)** mostrou similaridade entre 6 picos e valor de cosseno de 0,73. Já a substância **29 (Figura 26)**, mostrou similaridade entre 6 picos em ambos os espectros e um valor de cosseno de 0,81. A substância **30 (Figura 27)**, apresentou similaridade entre 7 picos e cosseno de 0,86.

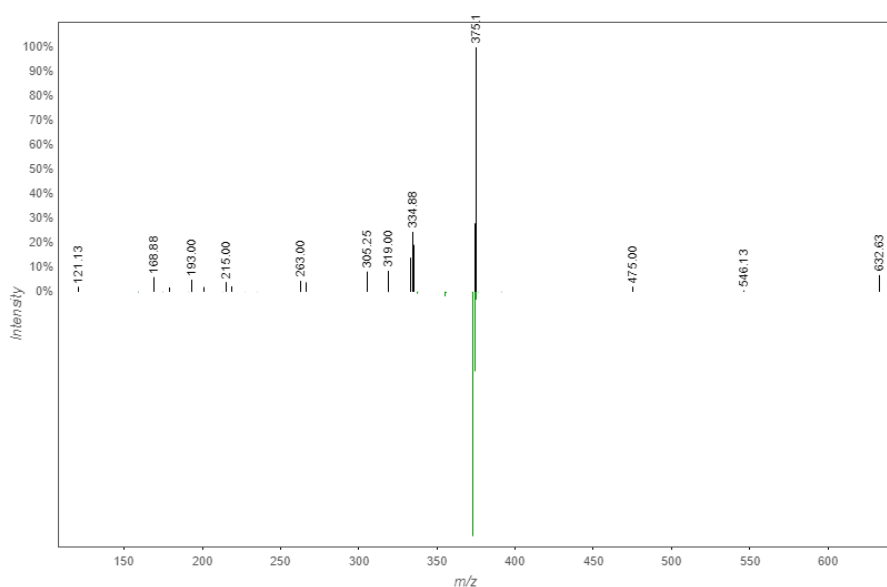


Figura 25: Comparação entre os espectros de massa experimental (preto) da substância (**28**) com o banco de dados (verde) da plataforma GNPS. Fonte: Autor

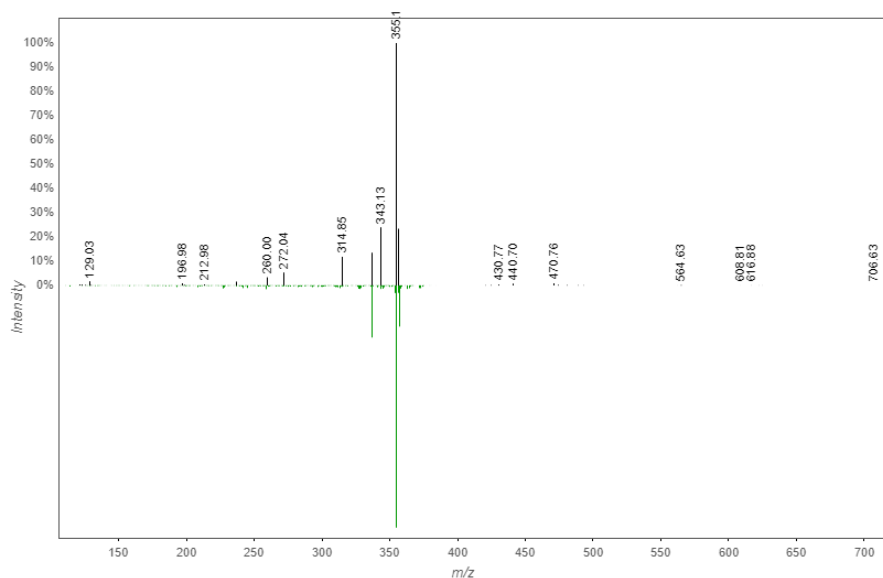


Figura 26: Comparação entre os espectros de massa experimental (preto) da substância (29) com o banco de dados (verde) da plataforma GNPS. Fonte: Autor

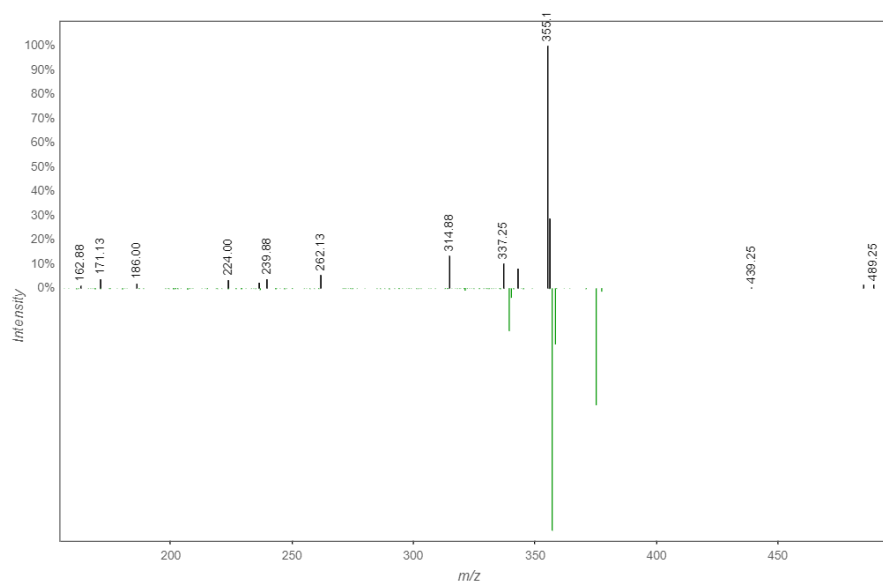


Figura 27: Comparação entre os espectros de massa experimental (preto) da substância (30) com o banco de dados (verde) da plataforma GNPS. Fonte: Autor

Já os alcaloides, foram observados majoritariamente em pH mais elevado. Isso se justifica pelo fato de a estrutura apresentar certa basicidade, evidenciando sua produção mais elevada quando o crescimento fúngico foi

realizado em pH 8, também observou-se a presença dessa classe em pH mais ácido, como no caso do alcaloide/peptídeo 3-(4-hidroxibenzil)-6-isopropilpiperazina-2,5-diona (**31**), que foi encontrado em pH 5, já o alcaloide/terpenoide napelina (**32**) foi encontrado em pH mais básico, também foi anotado um ácido graxo, ácido octadeca-9,12-dienóico (**33**) (**Figura 28**).

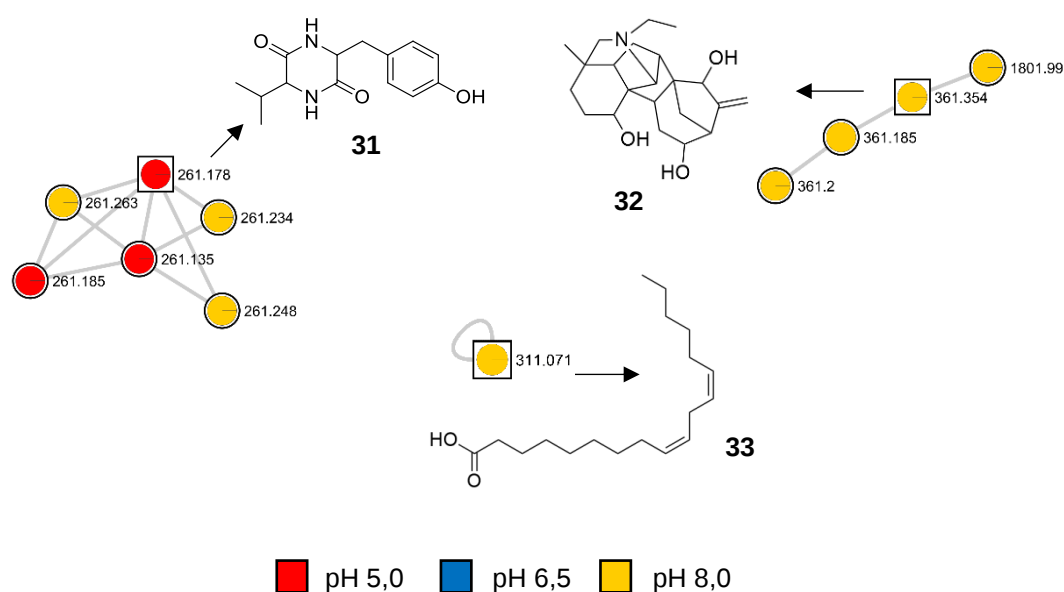


Figura 28: Redes moleculares geradas na plataforma GNPS, anotações observadas em pH 5 para a substância (**31**) e pH 8 para as substâncias (**32**) e (**33**). Fonte: Autor

Comparando os espectros de massa da substância **31**, tem-se uma similaridade com 6 picos e um cosseno de 0,80 (**Figura 29**), para a substância **32** também apresentou uma similaridade com 6 picos e cosseno de 0,78 (**Figura 30**), já a substância **33** mostrou similaridade entre 6 picos e cosseno de 0,71 (**Figura 31**).

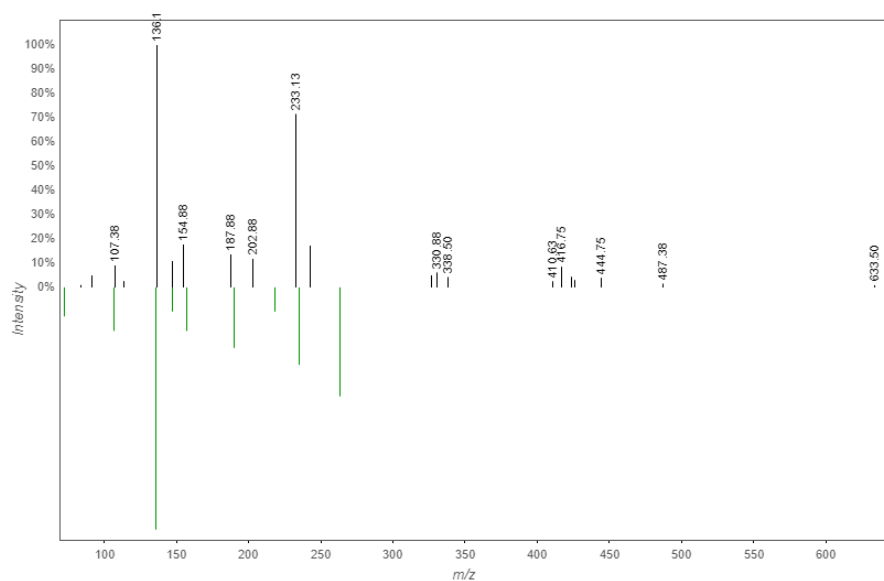


Figura 29: Comparação entre os espectros de massa experimental (preto) da substância **(31)** com o banco de dados (verde) da plataforma GNPS. Fonte: Autor

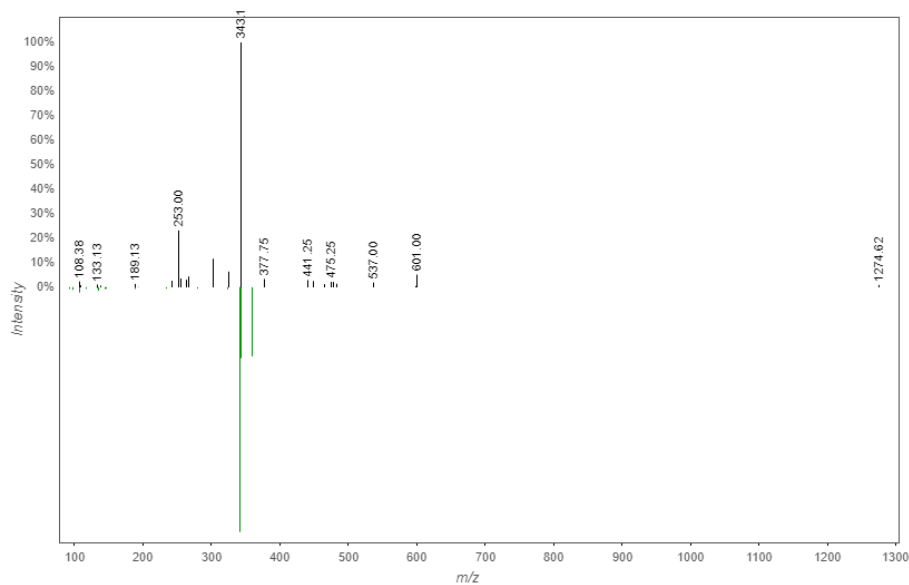


Figura 30: Comparação entre os espectros de massa experimental (preto) da substância **(32)** com o banco de dados (verde) da plataforma GNPS. Fonte: Autor

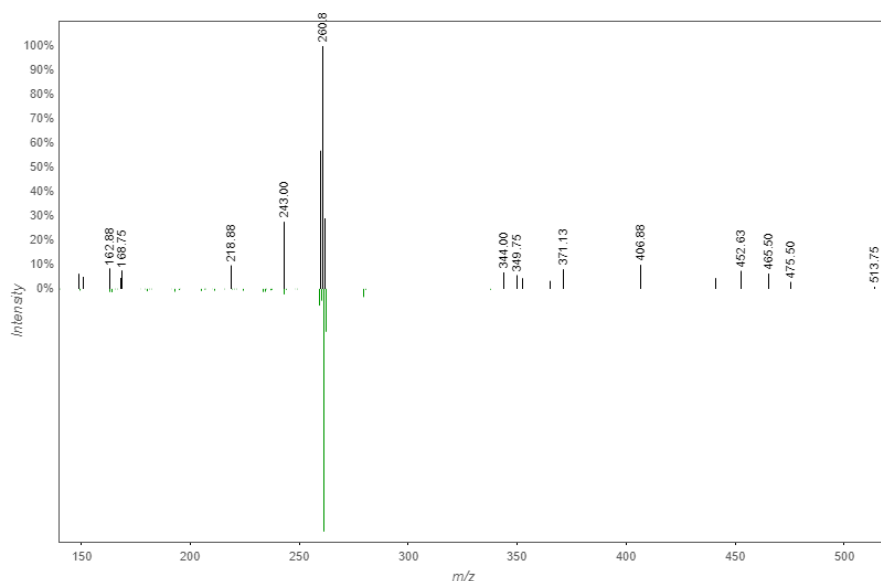


Figura 31: Comparação entre os espectros de massa experimental (preto) da substância (**33**) com o banco de dados(verde) da plataforma GNPS. Fonte: Autor

4.5 Perfil químico dos extratos por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de massas (GC-MS)

Com os extratos obtidos no planejamento experimental, foram feitas as análises por GC-MS, com o interesse de explorar mais os metabólitos produzidos pelo fungo, por meio de técnica mais específica na detecção de compostos mais apolares. Por outro lado, após a realização das reações de metoximação e sililação dos extratos, mesmo moléculas polares, conseguem ser detectadas mais facilmente após a derivação, visto que, passaram a ser mais voláteis e, portanto, susceptíveis a análise por GC-MS.

Após as análises, observou-se que os cromatogramas apresentaram alta complexidade, apresentando grande quantidade de picos e resolução muito baixa em algumas regiões dos cromatogramas (**Figura 32**). Com isso, levou-se em consideração a intensidade dos picos na identificação das substâncias, tendo em vista que os picos de menor intensidade podem ou não fazer parte do ruído da análise. A partir disso, foi possível caracterizar as substâncias presentes nas amostras analisadas a partir da biblioteca NIST e compará-las com a literatura.

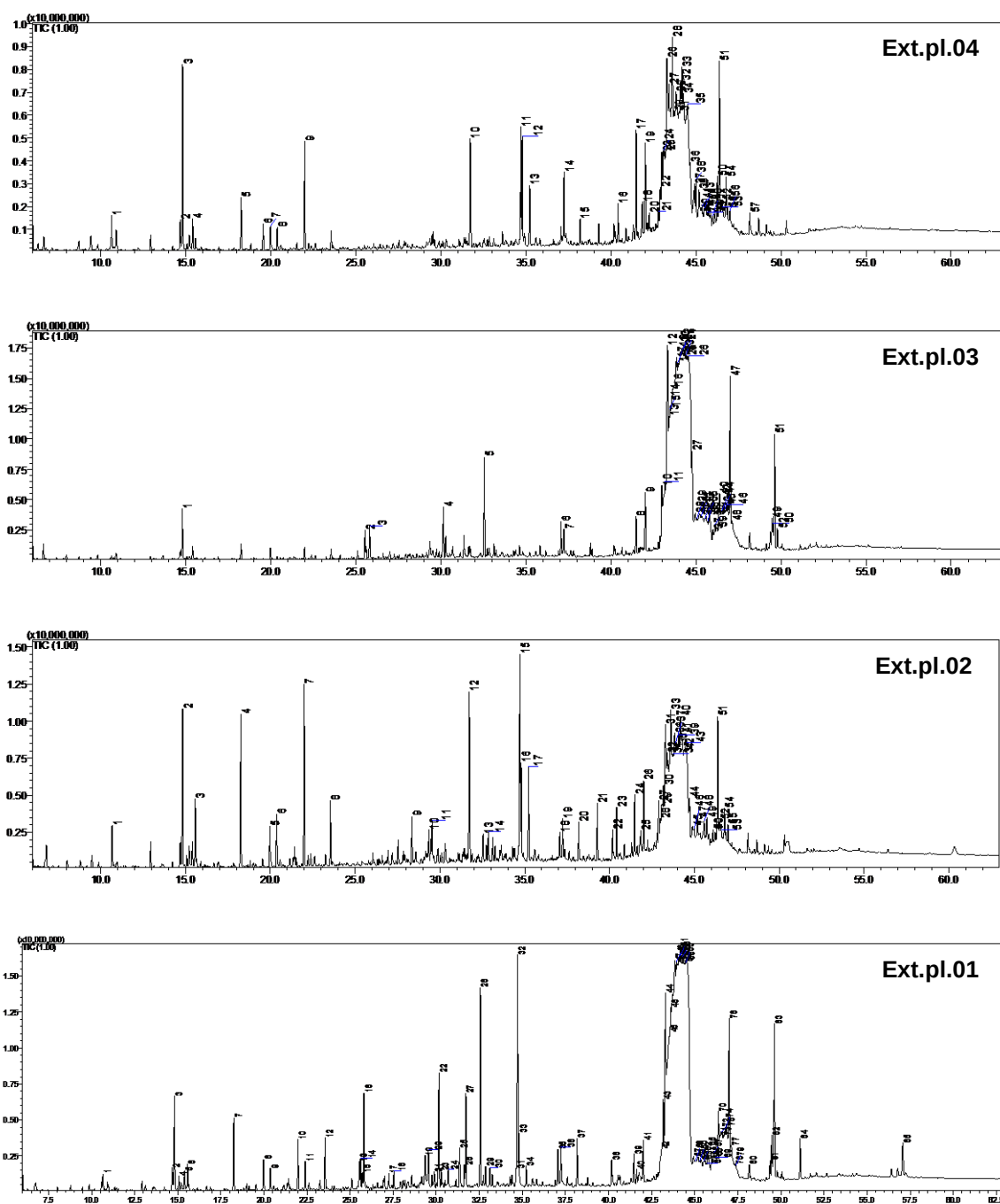


Figura 32: Espectros de GC-MS dos extratos Ext.pl.01 - 04 obtidos da linhagem DM01M1.

Fonte: Autor

Após análise, foi possível propor as substâncias presentes em cada um dos extratos (**Tabelas 5-8**), levando em consideração apenas valores de similaridade acima de 80% com a biblioteca NIST e realizou-se os cálculos dos índices de retenção para cada um, sendo comparados com os índices encontrados na literatura. Percebe-se que, os cromatogramas referentes aos

extratos Ext.pl.01 e Ext.pl.03 possuem uma maior semelhança, bem como os extratos Ext.pl.02 e Ext.pl.04 apresentaram também semelhança, conforme evidenciado nas análises cromatográficas para investigar seu perfil químico. Esses resultados podem ser explicados, ao menos parcialmente, pelo fato de cada conjunto de extratos terem sido obtidos em condições semelhantes de crescimento do fungo e, quando feita a caracterização das substâncias presentes, nota-se a presença de metabólitos e constituição química semelhantes para os extratos de cada conjunto (**Figura 33**).

Tabela 5: Constituintes químicos presentes no extrato Ext.pl.01 obtido da linhagem DM01M1

Nº	Nome	Similaridade (%)	RI ^{lit.}	RI ^{cal.}	Referência
34	Maltol	91	1088	1093	(MAHAJAN; GODDIK; QIAN, 2004)
35	Ácido 4-hidroxibenzenoacético	94	1570	1549	(ISIDOROV; KOTOWSKA; VINOGOROVA, 2005)
36	Tirosol	94	1568	1580	
37	Arabitol	96	1749	1753	(MEDEIROS; SIMONEIT, 2007)
38	Manitol	96	1969	1968	(ISIDOROV; KOTOWSKA; VINOGOROVA, 2005)
33	Ácido octadeca-9,12-dienóico	96	2214	2223	(ISIDOROV et al., 2008)

RI^{lit.} = índice de retenção na literatura e RI^{cal.} = índice de retenção experimental calculado

Tabela 6: Constituintes químicos presentes no extrato Ext.pl.02 obtido da linhagem DM01M1

Nº	Nome	Similaridade (%)	RI ^{lit.}	RI ^{cal.}	Referência
39	Ácido 2-furóico	89	1131	1141	(TRETYAKOV, K.V., 2007)
40	Ácido butanodióico	96	1322	1322	(ISIDOROV; KOTOWSKA; VINOGROROVA, 2005)
35	Ácido 4-hidroxibenzenoacético	95	1649	1648	(ISIDOROV; KOTOWSKA; VINOGROROVA, 2005)
41	Ácido palmítico	89	2052	2052	(ISIDOROV; KOTOWSKA; VINOGROROVA, 2005)
33	Ácido octadeca-9,12-dienóico	95	2214	2219	(ISIDOROV et al., 2008)
42	Ácido Oleico	92	2220	2223	(ISIDOROV et al., 2008)
43	Ácido esteárico	92	2250	2249	(ISIDOROV et al., 2008)
44	9-Octadecenamida	90	2375	2370	(ZHAO et al., 2008)

RI^{lit.} = índice de retenção na literatura e RI^{cal.} = índice de retenção experimental calculado

Tabela 7: Constituintes químicos presentes no extrato Ext.pl.03 obtido da linhagem DM01M1

Nº	Nome	Similaridade (%)	RI ^{lit.}	RI ^{cal.}	Referência
45	Xilose, tetraquis(trimetilsilis)éter, trimetilsililoxima (isômero 1)	86	1740	1740	(TRETYAKOV, K.V., 2011)
46	Arabitol	96	1749	1752	(MEDEIROS; SIMONEIT, 2007)
38	Manitol	95	1969	1967	(ISIDOROV; KOTOWSKA; VINOGROROVA, 2005)
44	9-Octadecenamida	89	2375	2369	(ZHAO et al., 2008)

RI^{lit.} = índice de retenção na literatura e RI^{cal.} = índice de retenção experimental calculado

Tabela 8: Constituintes químicos presentes no extrato Ext.pl.04 obtido da linhagem DM01M1

Nº	Nome	Similaridade (%)	RI ^{lit.}	RI ^{cal.}	Referência
39	Ácido 2-furóico	93	1131	1139	(TRETAKOV, K.V., 2011)
36	Tirosol	96	1568	1580	(ANDRIAMAHARAVO, N.R., 2014)
41	Ácido palmítico	92	2052	2051	(ISIDOROV; KOTOWSKA; VINOGRADOVA, 2005)
33	Ácido octadeca-9,12-dienóico	95	2214	2218	(ISIDOROV et al., 2008)
42	Ácido Oleico	94	2220	2223	(ISIDOROV et al., 2008)
43	Ácido esteárico	93	2250	2248	(ISIDOROV et al., 2008)
44	9-Octadecenamida	92	2375	2370	(ZHAO et al., 2008)

RI^{lit.} = índice de retenção na literatura e RI^{cal.} = índice de retenção experimental calculado

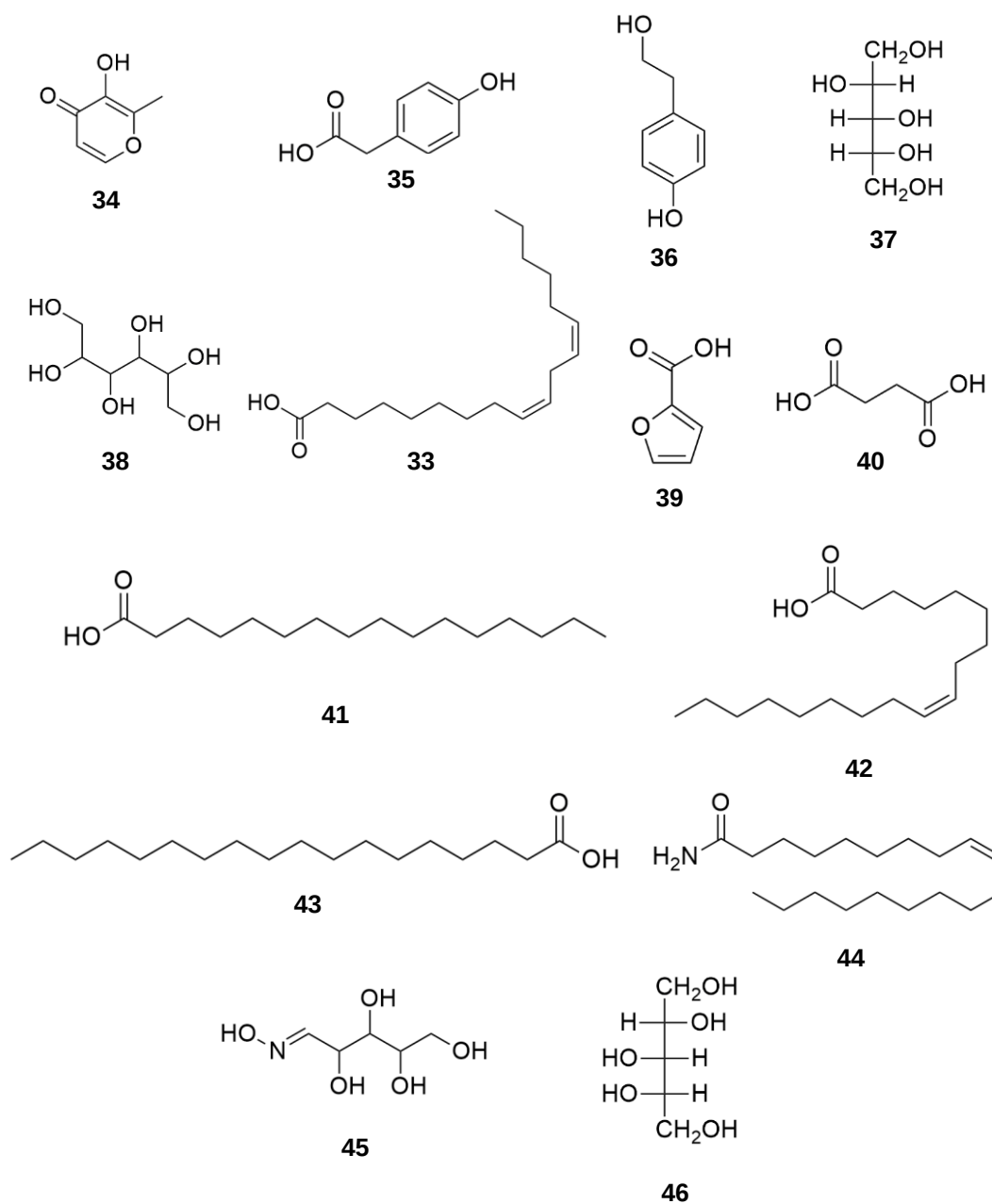


Figura 33: Estrutura química dos compostos caracterizados por GC-MS da linhagem DM01M1.

Fonte: Autor.

Para os demais extratos, também foi realizada a análise de GC-MS (**Figura 34**), sendo eles obtidos em condições semelhantes de crescimento fúngico.

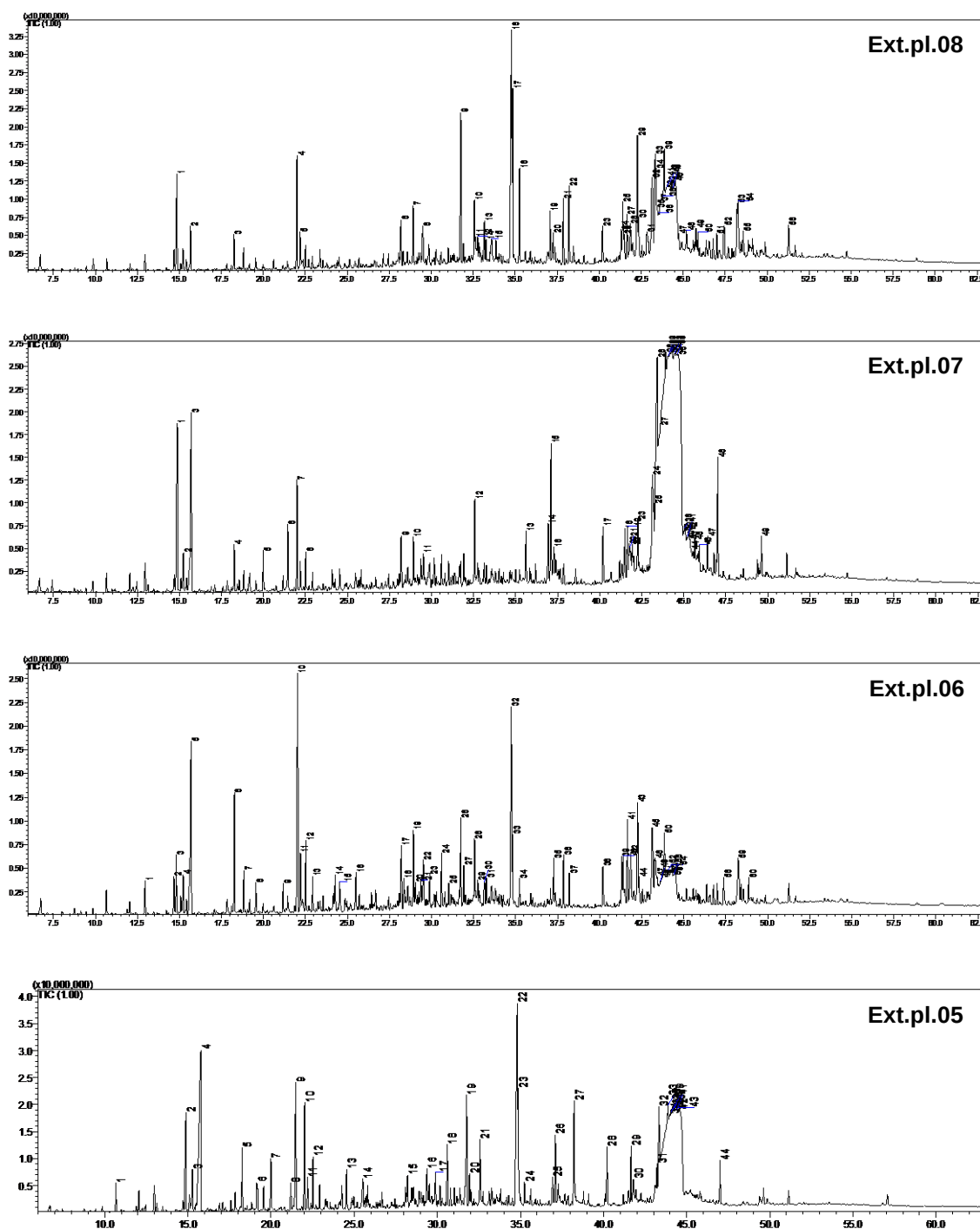


Figura 34: Espectros de GC-MS dos extratos Ext.pl.05 - 08 obtidos da linhagem DM01M1.

Fonte: Autor

Assim como os quatro primeiros extratos analisados, os cromatogramas também apresentaram semelhanças, já que as condições do crescimento fúngico também foram semelhantes, sendo os extratos Ext.pl.06 e Ext.pl.08 cultivados em pH 8,0 e temperatura de 30 °C e apresentado maior número de

picos que os demais, o que corroborou os resultados obtidos a partir da análise estatística e, a partir dos espectros, foi possível propor as substâncias presentes nos extratos (**Tabelas 9-12**) e as estruturas de alguns de seus constituintes químicos (**Figura 35**).

Tabela 9: Constituintes químicos presentes no extrato Ext.pl.05 obtido da linhagem DM01M1

Nº	Nome	Similaridade (%)	RI ^{lit.}	RI ^{cal.}	Referência
47	Catecol	93	1330	1330	(ISIDOROV; KOTOWSKA; VINOGROROVA, 2005)
48	Pirogalol	95	1559	1559	(ISIDOROV; KOTOWSKA; VINOGROROVA, 2005)
36	Tirosol	97	1568	1582	(ANDRIAMAHARAVO, N.R., 2014)
41	Ácido palmítico	94	2052	2053	(ISIDOROV; KOTOWSKA; VINOGROROVA, 2005)
33	Ácido octadeca-9,12- dienóico	95	2214	2224	(ISIDOROV et al., 2008)
42	Ácido Oleico	93	2220	2227	(ISIDOROV et al., 2008)
43	Ácido esteárico	86	2250	2250	(ISIDOROV et al., 2008)

RI^{lit.} = índice de retenção na literatura e RI^{cal.} = índice de retenção experimental calculado

Tabela 10: Constituintes químicos presentes no extrato Ext.pl.06 obtido da linhagem DM01M1

Nº	Nome	Similaridade (%)	RI ^{lit.}	RI ^{cal.}	Referência
47	Catecol	93	1330	1327	(ISIDOROV; KOTOWSKA; VINOGROROVA, 2005)
49	Ácido 3,4- dihidroxibutanóico	93	1439	1449	(KIMURA; YAMAMOTO; YAMAGUCHI, 1999)
36	Tirosol	96	1568	1583	(ANDRIAMAHARAVO, N.R., 2014)
41	Ácido palmítico	92	2052	2052	(ISIDOROV; KOTOWSKA; VINOGROROVA, 2005)
33	Ácido octadeca-9,12- dienóico	95	2214	2220	(ISIDOROV et al., 2008)
42	Ácido Oleico	93	2220	2224	(ISIDOROV et al., 2008)
43	Ácido esteárico	90	2250	2249	(ISIDOROV et al., 2008)
44	9-Octadecenamida	92	2375	2372	(ZHAO et al., 2008)

RI^{lit.} = índice de retenção na literatura e RI^{cal.} = índice de retenção experimental calculado

Tabela 11: Constituintes químicos presentes no extrato Ext.pl.07 obtido da linhagem DM01M1

Nº	Nome	Similaridade (%)	RI ^{lit.}	RI ^{cal.}	Referência
47	Catecol	96	1330	1327	(ISIDOROV; KOTOWSKA; VINOGROROVA, 2005)
48	Pirogalol	95	1559	1558	(ISIDOROV; KOTOWSKA; VINOGROROVA, 2005)
36	Tirosol	96	1568	1581	(ANDRIAMAHARAVO, N.R., 2014)
44	9-Octadecenamida	85	2375	2372	(ZHAO et al., 2008)

RI^{lit.} = índice de retenção na literatura e RI^{cal.} = índice de retenção experimental calculado

Tabela 12: Constituintes químicos presentes no extrato Ext.pl.08 obtido da linhagem DM01M1

Nº	Nome	Similaridade (%)	RI ^{lit.}	RI ^{cal.}	Referência
47	Catecol	93	1330	1327	(ISIDOROV; KOTOWSKA; VINOGROROVA, 2005)
36	Tirosol	96	1568	1582	(ANDRIAMAHARAVO, N.R., 2014)
41	Ácido palmítico	94	2052	2053	(ISIDOROV; KOTOWSKA; VINOGROROVA, 2005)
33	Ácido octadeca-9,12- dienóico	96	2214	2223	(ISIDOROV et al., 2008)
50	Ácido 9-octadecenóico	94	2227	2227	(ISIDOROV et al., 2008)
43	Ácido esteárico	95	2250	2250	(ISIDOROV et al., 2008)
44	9-Octadecenamida	90	2375	2372	(ZHAO et al., 2008)

RI^{lit.} = índice de retenção na literatura e RI^{cal.} = índice de retenção experimental calculado

Observa-se que a maioria das substâncias presentes nos extratos obtidos a partir do crescimento fúngico em pH 8, foram semelhantes às obtidas em pH 5, podendo observar a presença de alguns derivados de benzeno como o catecol (47), pirogalol (48), ácido 3,4-dihidroxitetranóico (49) e o ácido 9-octadecenóico (50) que diferentemente, não foram observados sua produção em pH 5.

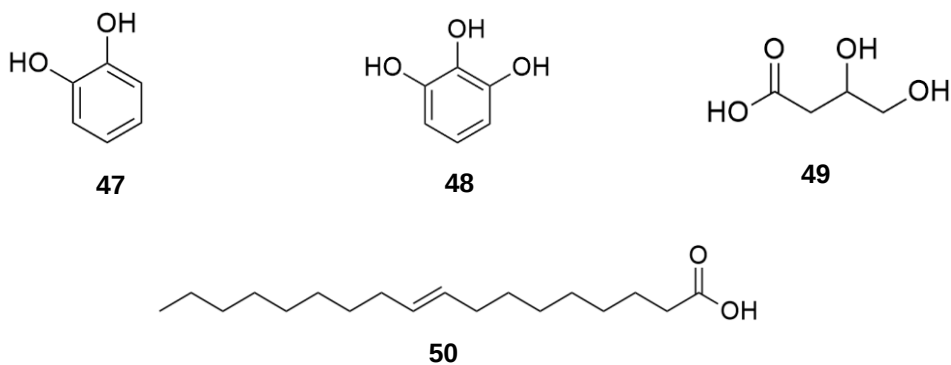


Figura 35: Estrutura química dos compostos caracterizados por GC-MS da linhagem DM01M1.

Fonte: Autor.

Também foi realizada a análise de GC-MS para o extrato Ext.pl.09 (**Figura 36**), obtido no ponto central do planejamento experimental. Nota-se que, em comparação aos demais cromatogramas, apresentou um menor número de picos, sendo possível propor apenas três compostos (**Tabela 13**), que também foram encontrados nos demais extratos.

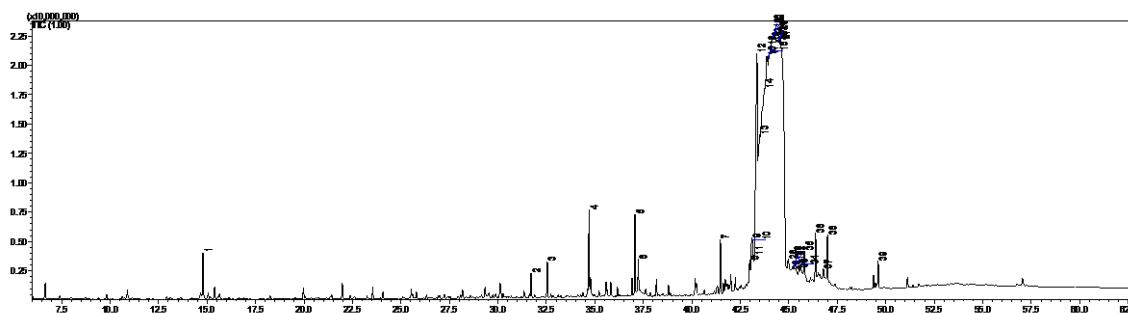


Figura 36: Espectro de GC-MS do extrato Ext.pl.09 obtido da linhagem DM01M1. Fonte: Autor

Tabela 13: Constituintes químicos presentes no extrato Ext.pl.09 obtido da linhagem DM01M1

Nº	Nome	Similaridade (%)	RI ^{lit.}	RI ^{cal.}	Referência
41	Ácido palmítico	93	2052	2050	(ISIDOROV; KOTOWSKA; VINOGOROVA, 2005)
33	Ácido (9Z,12Z)- octadeca-9,12-dienóico	95	2214	2218	(ISIDOROV et al., 2008)
44	(Z)-9-Octadecenamida	90	2375	2370	(ZHAO et al., 2008)

RI^{lit.} = índice de retenção na literatura e RI^{cal.} = índice de retenção experimental calculado

O perfil químico obtido pelas análises de GC-MS corroborou juntamente com os resultados da análise estatística, mostrando um maior número de picos nos cromatogramas quando o crescimento fúngico era realizado em pH 5 e 8, bem como a quimiodiversidade dos extratos e no final, obter um melhor conhecimento do perfil químico produzido pelo fungo *H. monticulosa*.

Após a análise do perfil por GC-MS, comparou-se as substâncias com as anotações feitas por meio da análise de redes moleculares, usando a plataforma GNPS a partir dos dados de LC-MS, onde foi possível observar que o ácido octadeca-9,12-dienóico (**6**) foi detectado em ambas as análises realizadas, evidenciando as redes moleculares e a plataforma GNPS como uma ferramenta auxiliar de alta relevância na caracterização do perfil químico de matrizes complexas como os estratos de fungos sob análise.

4.6 Fracionamento do extrato Ext.pl.10 e isolamento da substância Frc12

Com os resultados obtidos a partir do planejamento experimental, observou-se que os experimentos 9, 10 e 11, realizados em torno dos pontos centrais, apresentaram maior rendimento de extrato, então, realizou-se o fracionamento do extrato obtido no experimento 10 (Ext.pl.10). O intervalo de coleta para cada fração foi determinado com base no perfil químico obtido do extrato em questão (**Figura 37**), com o intuito de isolar os picos que apresentaram maior intensidade no cromatograma. O fracionamento iniciou-se com 224,4 mg de extrato e, após todas as análises, obteve-se uma massa de 60,4 mg somando todas as frações coletadas.

Após o fracionamento, obteve-se 18 frações (**Tabela 14**). O fracionamento foi realizado por HPLC-DAD utilizando uma coluna preparativa de sílica derivatizada C-18 e eluição em modo gradiente MeOH/H₂O (44-100%).

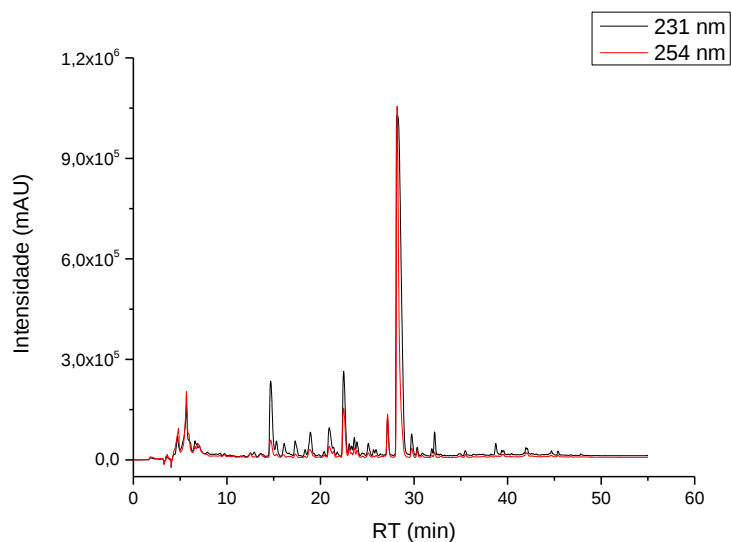


Figura 37: Perfil químico do extrato Ext.pl.10 por HPLC-DAD em modo gradiente 44-100% (MeOH/H₂O) em 45 min. Fonte: Autor

Tabela 14: Fracionamento em CC com fase estacionária C-18 do extrato Ext.pl.10

Fração	Intervalo de coleta (min)	Massa (mg)
Frc1	5 – 10	3,8
Frc2	10 – 12	1,2
Frc3	12 – 15	1,8
Frc4	15 – 16.15	0,2
Frc5	16.15 – 17	0,8
Frc6	17 – 18.5	0,2
Frc7	18.5 – 20	0,6
Frc8	20 – 22	2,2
Frc9	22 – 24	3,2
Frc10	24 – 25	0,9
Frc11	25 – 29	5,4
Frc12	29 – 31.5	26,1
Frc13	31.5 – 33	3,5
Frc14	33 – 35	4,5
Frc15	35 – 40.3	2,6
Frc16	40.3 – 42	1,5
Frc17	42 – 45	1,7
Frc18	45 – 47	0,2

Todas as frações foram submetidas às análises em HPLC-DAD para obtenção do perfil (**APÊNDICE D**). A maioria das frações apresentaram baixos valores de massa no final, e ao analisar os cromatogramas, os picos apresentaram baixa intensidade e em alguns casos, um número superior a 5 picos foram observados nas frações, o que acabou não viabilizando o isolamento das substâncias presentes nestas frações. Para a fração 12 (Frc12), foi obtido um valor maior de massa, e ao analisar o perfil químico (**Figura 38**), foi possível observar um pico de grande intensidade no cromatograma, levando a hipótese de que a substância majoritária estaria em maior grau de pureza, e um dos fatores que levou a essa conclusão devido à cristalização da substância (**Figura 39**), antes mesmo de secar o solvente, o que resultou no isolamento da substância sem precisar realizar etapas adicionais de purificação. Após as análises de HPLC-DAD, foi possível observar o espectro de UV para a substância isolada (**APÊNDICE E**), sendo observados os grupos cromóforos presentes na estrutura da molécula.

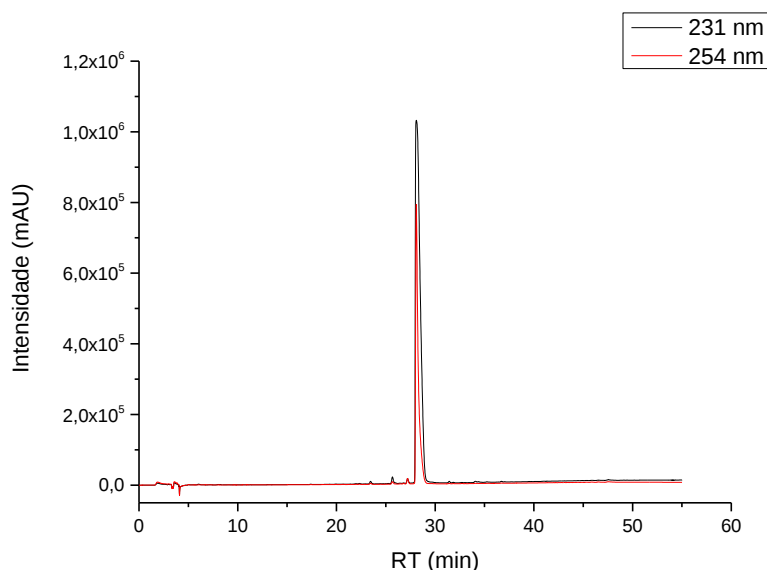


Figura 38: Cromatograma da fração Frc12 obtido em coluna analítica de C-18 por HPLC-DAD em modo gradiente 44-100% (MeOH/H₂O) em 45 min. Fonte: Autor



Figura 39: Cristais formados da substância isolada na fração Frc12. Fonte: Autor

4.6.1 Análise de infravermelho (IV)

Para melhor entendimento sobre a estrutura química da substância isolada, realizou-se a análise de IV (**Figura 40**). A partir do cromatograma, pode-se observar a presença de uma carbonila de cetona (ν 1703 cm^{-1}), carbonila de amida (ν 1686 cm^{-1}), estiramento da ligação carbono-oxigênio (ν 1268 cm^{-1}), nitrogênio de amida secundária (ν 3420 cm^{-1}), hidroxila de álcool (ν 3268 cm^{-1}), ligação dupla olefínica (ν 1646 cm^{-1}) e um sinal em (ν 977 cm^{-1}) mostrando a posição trans da dupla ligação, além de ligações H-C de carbono sp^3 (ν 2956 e 2924 cm^{-1}).

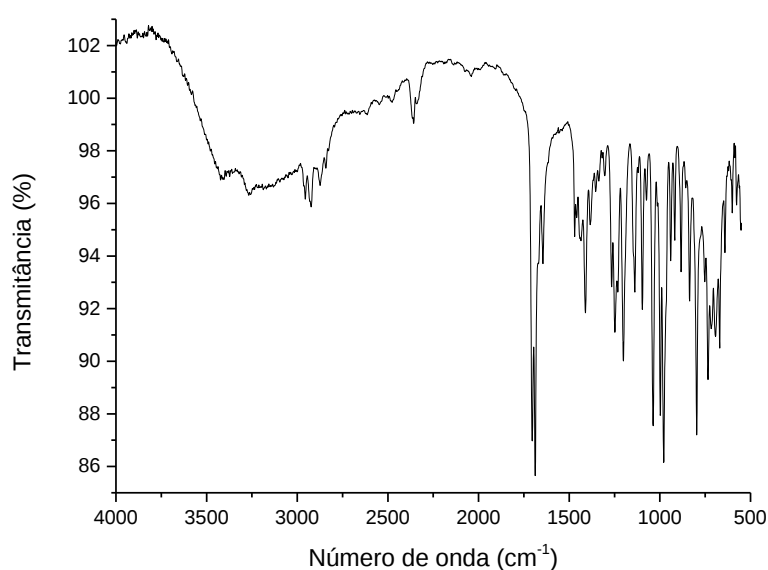


Figura 40: Espectro no infravermelho da substância Frc12 isolada. Fonte: Autor

4.6.2 Análise de MSMS da substância Frc12 por injeção direta no MS

Realizou-se a análise no MS por injeção direta, para evidenciar a massa da substância isolada e, com o auxílio do espectro de infravermelho, reunir mais informações para proposta de uma possível estrutura. Após análise, observou-se que o espectro apresentou a substância com obteve-se o espectro de MSMS (**Figura 41**), em modo positivo, sendo possível observar o pico de m/z 368,43 referente à substância isolada.

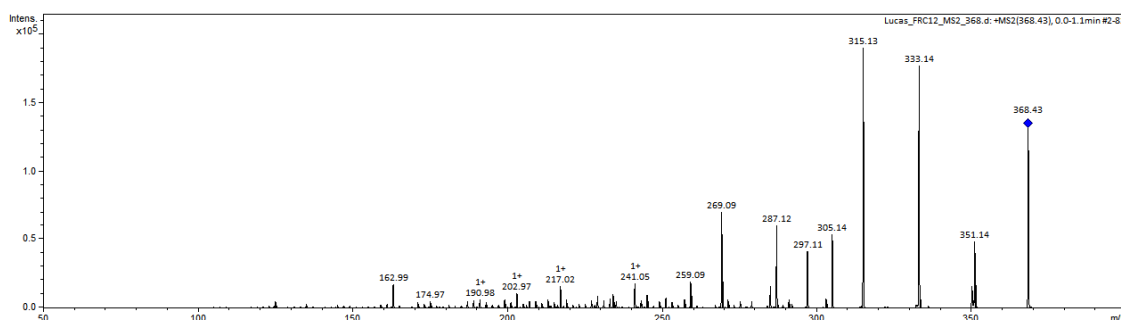


Figura 41: Cromatograma de MSMS da substância Frc12 por infusão direta no MS.

Fonte: Autor

Após a análise, pôde-se observar a massa molecular da substância, bem como sua sugerir sua fórmula molecular $C_{19}H_{30}NO_6$, sendo possível supor que pode haver nitrogênio na estrutura devido seu valor de massa, bem como podendo ser observado no espectro de infravermelho a presença de carbonila e nitrogênio de amida.

4.6.3 Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) da substância Frc12

Para as análises de RMN, realizou-se os experimentos de 1H , DEPTQ, HSQC, HMBC e TOCSY (**APÊNDICE F**). O TOCSY foi realizado em 2,185; 2,814 e 3,781 ppm, onde foi observado que a estrutura possui três sistemas de spin.

Com base nos valores de deslocamento (**Tabela 15**), pode-se observar que os hidrogênios em δ_H 2,76 e 2,83 ppm são considerados diastereotópicos,

bem como os hidrogênios em δ_H 4,41 e 4,52 ppm. A estrutura também possui uma dupla ligação representada pelos hidrogênios δ_H 6,14 ppm e através do valor de J_{HH} (15,75 Hz), percebe-se que a dupla ligação está em uma configuração trans. Já o hidrogênio δ_H 4,83 pode estar relacionado ao nitrogênio da amida, mas não é uma certeza dessa posição, tendo em vista que a partir do espectro não foi possível observar o carbono referente à carbonila de amida, mesmo sendo realizado o RMN de nitrogênio, uma vez que a análise foi realizada em um equipamento que não possui criosonda, não sendo possível observar os sinais no espectro. Também foi observado a presença da carbonila de cetona em δ_C 194,66 ppm, tendo os resultados observados nos espectros de RMN corroborando com os resultados obtidos com o espectro de IV.

Mesmo com os dados de RMN, IV e o espectro de MSMS por infusão direta, não foi possível elucidar a estrutura da substância Frc12, tendo como perspectiva futura sua elucidação.

Tabela 15: Deslocamento químico dos espectros de RMN de ^1H (600 MHz) e DEPTQ (150 MHz) em $\text{MeOH-}d_4$

δ_{H} ppm (mult.)	J_{HH} (Hz)	DEPTQ (δ_{C} ppm)
0,91 (t)	-	12,9
1,34 (m)	6,57; 6,57; 6,57; 3,77 e 3,77	22,1 e 31,1
1,45 (p)	7,74; 7,74; 7,37 e 7,37	28,5
1,87 (d)	1,35	11,4
2,17 (q)	7,14; 7,14 e 6,82	33,1
2,76 (dd)	15,80 e 6,94	27,3
2,83 (dd)	15,77 e 7,74	27,3
3,76 (d)	2,83	59,7
4,41 (d)	12,90	58,9
4,52 (d)	12,88	58,9
4,83 (s)	-	64,5
5,85 (dt)	15,93; 6,95 e 6,95	138,8
6,14 (dd)	15,75; 1,61; 1,59 e 1,59	121,3
6,69 (t)	-	135,1
-	-	130,6
-	-	149,3
-	-	194,7

4.7 Crescimento em larga escala e obtenção do extrato

Para a otimização (**Tabela 16**), o crescimento do fungo em larga escala seguiu de acordo com os resultados obtidos a partir do planejamento experimental. O fungo foi inoculado em 60 frascos Erlenmeyer e após o período de crescimento obteve-se 454 mg do extrato (OTM) em AcOEt . Após a obtenção do extrato, foi realizado um clean-up em coluna de bancada de C-18, obtendo 420 mg de extrato no final do processo.

Tabela 16: Crescimento em larga escala da linhagem DM01M1

Temperatura (°C)	Crescimento (dias)	pH	Massa (mg)
30	30	8,0	420

4.7.1 Fracionamento do extrato OTM em coluna de Sephadex LH-20

Depois de obter o extrato em condições otimizadas de crescimento (OTM), realizou-se um fracionamento em coluna cromatográfica aberta usando Sephadex LH-20 e eluição com MeOH 100%, com o intuito de obter frações com melhor separação entre os picos e facilitar posteriormente o isolamento das substâncias, sendo obtidas no total 28 frações (**Tabela 17**), onde o fracionamento teve início com 420 mg de extrato e no final, obteve-se 150 mg somando todas as frações coletadas.

Tabela 17: Fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do extrato OTM eluída com MeOH 100%

Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)
F1	11,3	F15	11,0
F2	15,3	F16	11,7
F3	20,2	F17	11,0
F4	52,5	F18	11,2
F5	131,8	F19	11,1
F6	126,4	F20	11,1
F7	74,5	F21	6,4
F8	32,7	F22	10,3
F9	25,9	F23	11,3
F10	24,3	F24	10,7
F11	22,0	F25	10,9
F12	14,6	F26	11,6
F13	12,7	F27	11,3
F14	11,9	F28	10,4

Todas as frações foram submetidas à análise de HPLC-DAD para obtenção do perfil (**APÊNDICE G**). A partir dos valores de massa obtido em cada fração, nota-se que as frações F4 - F7 apresentaram maior massa, mas ao analisar os cromatogramas (**Figura 42**), apresentaram uma elevada complexidade e um número grande de picos e baixa resolução em algumas regiões dos cromatogramas, o que dificultaria o isolamento das substâncias, por este motivo optou-se por não trabalhar com essas frações.

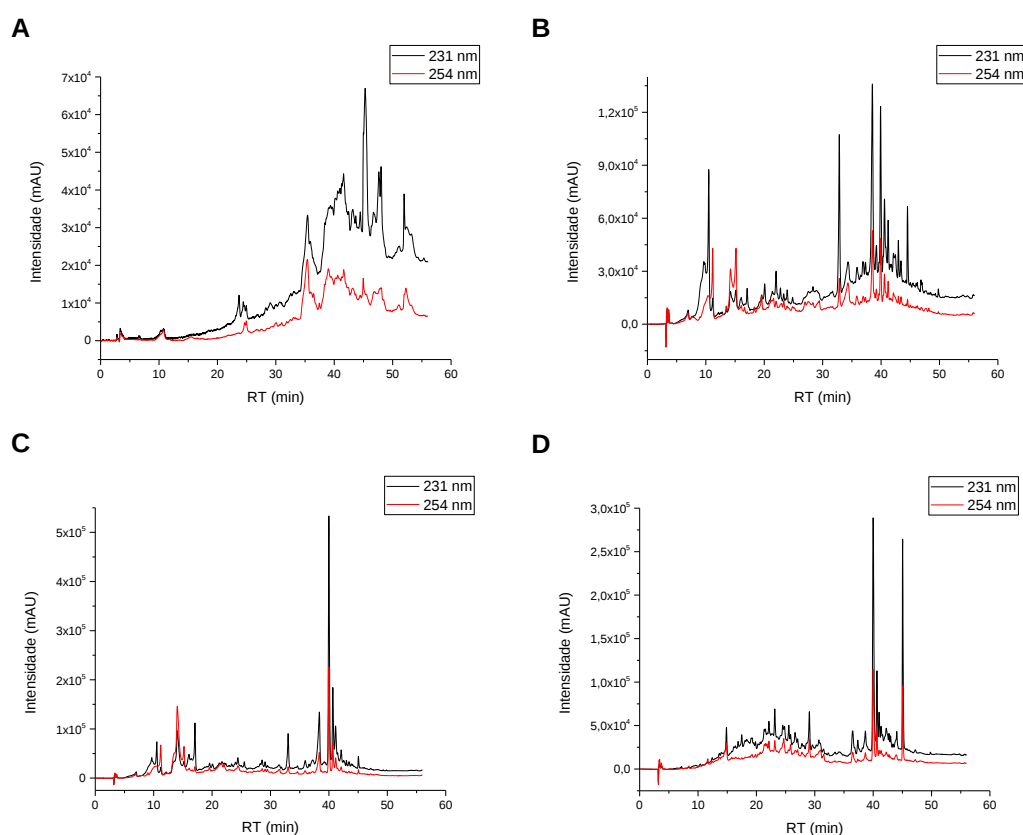


Figura 42: Perfil químico obtido em coluna analítica de C-18 das frações **A)** F4, **B)** F5, **C)** F6 e **D)** F7 por HPLC-DAD em modo gradiente 5-100% (MeOH/H₂O) em 45 min. Fonte: Autor

Já as frações F10 e F11 não apresentaram altos valores de massa como as frações mencionadas anteriormente, mas, ao analisar seu perfil químico por HPLC-DAD (**Figura 43**), apresentaram um cromatograma semelhante e mais simples dentre todas as 28 frações analisadas. Então, fez-se novamente a

análise dessas frações por HPLC utilizando uma coluna de sílica derivatizada C-18 preparativa para efetuar o isolamento, principalmente do pico de maior intensidade, presente em ambos os cromatogramas.

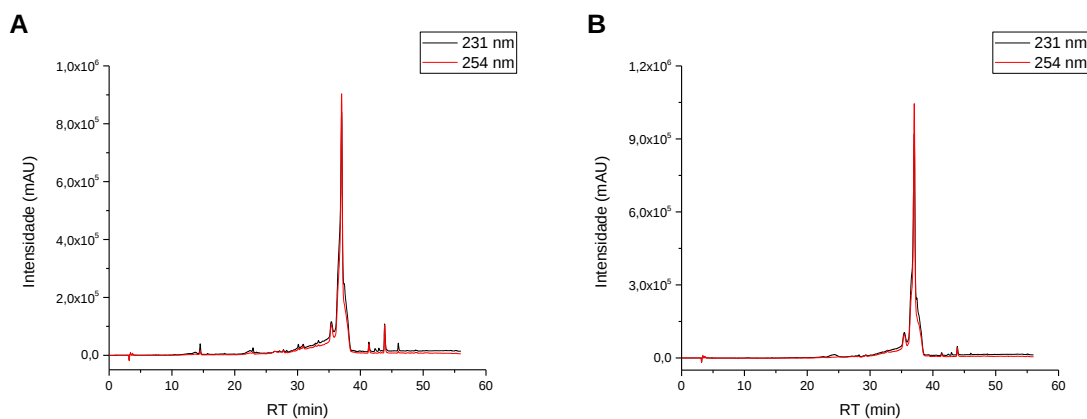


Figura 43: Perfil químico obtido em coluna analítica de C-18 das frações **A)** F10 e **B)** F11 por HPLC-DAD em modo gradiente 5-100% (MeOH/H₂O) em 45 min. Fonte: Autor

4.7.2 Fracionamento das frações F10 e F11 e isolamento das substâncias F10.7.1, F10.7.2, F11.2.1 e F11.2.2

Fez-se novamente a análise dessas frações no HPLC utilizando uma coluna de C-18 preparativa e eluição com MeOH/H₂O (5-100% em 45 min) para efetuar o isolamento, principalmente do pico de maior intensidade apresentado em ambos os cromatogramas. Ambas as frações foram injetadas a uma concentração de 10 mg.mL⁻¹, o que ocasionou o aumento da intensidade dos demais picos presentes (**Figura 44**), mostrando um número maior de picos do que quando analisado no modo analítico.

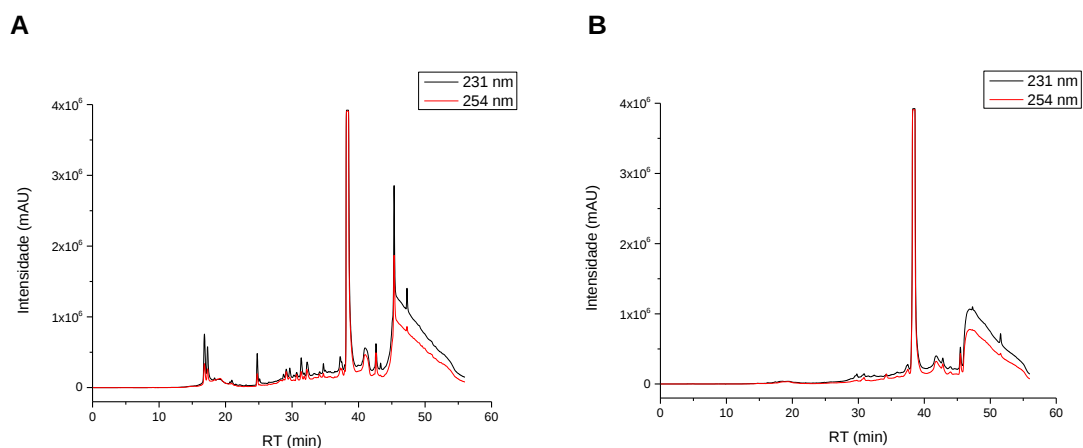


Figura 44: Cromatogramas das frações **A)** F10 e **B)** F11 por HPLC-DAD utilizando uma coluna de C-18 preparativa em modo gradiente 5-100% (MeOH/H₂O) em 45 min. Fonte: Autor

Com o grande número de picos presentes, fez-se um novo fracionamento das frações F10 (24,3 mg) e F11 (22,0 mg), com o intuito de isolar as substâncias presentes. Para a fração F10, foram obtidas outras 14 subfrações (**Tabela 18**), com um rendimento final de 19 mg, enquanto para a fração F11 foram geradas outras 11 subfrações (**Tabela 19**), com rendimento de 15,8 mg. Para cada uma das subfrações coletadas, o intervalo de tempo escolhido foi de acordo com o perfil apresentado na **Figura 44**.

Tabela 18: Fracionamento em coluna preparativa de C-18 da fração F10

Subfração	Intervalo de coleta (min)	Massa (mg)
F10.1	16.5 – 17.2	0,9
F10.2	17.2 – 17.75	0,6
F10.3	24 – 25	0,7
F10.4	31 – 31.75	0,6
F10.5	32 – 32.75	0,3
F10.6	36 – 37.6	1,6
F10.7	37.6 – 39.4	2,7
F10.8	40 – 42	1,1
F10.9	42 – 43	1,0
F10.10	43 – 45.2	1,6
F10.11	45.2 – 46	0,8
F10.12	46 – 49.7	2,0
F10.13	49.7 – 51.5	1,8
F10.14	51.5 - 55	3,0

Tabela 19: Fracionamento em coluna preparativa de C-18 da fração F11

Subfração	Intervalo de coleta (min)	Massa (mg)
F11.1	36.5 – 38	0,8
F11.2	38 – 40	2,1
F11.3	41 – 42.5	1,6
F11.4	42.5 – 43.5	0,9
F11.5	43.5 – 44.25	1,3
F11.6	45 – 46	0,9
F11.7	46 – 47	1,0
F11.8	47 – 48	1,6
F11.9	48 – 51	2,7
F11.10	51 – 52	1,4
F11.11	52 - 55	1,5

As subfrações foram submetidas à análise por HPLC-DAD, e a partir dos cromatogramas obtidos com a fração F10 (**APÊNDICE H**) e F11 (**APÊNDICE I**),

observou-se que apenas as subfrações F10.7 e F11.2 apresentaram menor complexidade, sendo mais viável o isolamento das substâncias presentes, apresentando uma mistura com dois picos coeluídos em ambas (**Figura 45**), sugerindo maior facilidade de isolamento das duas substâncias presentes. Sendo assim, decidiu-se trabalhar apenas com as subfrações F10.7 e F11.2, sendo geradas duas subfrações para cada uma (**Tabela 20**).

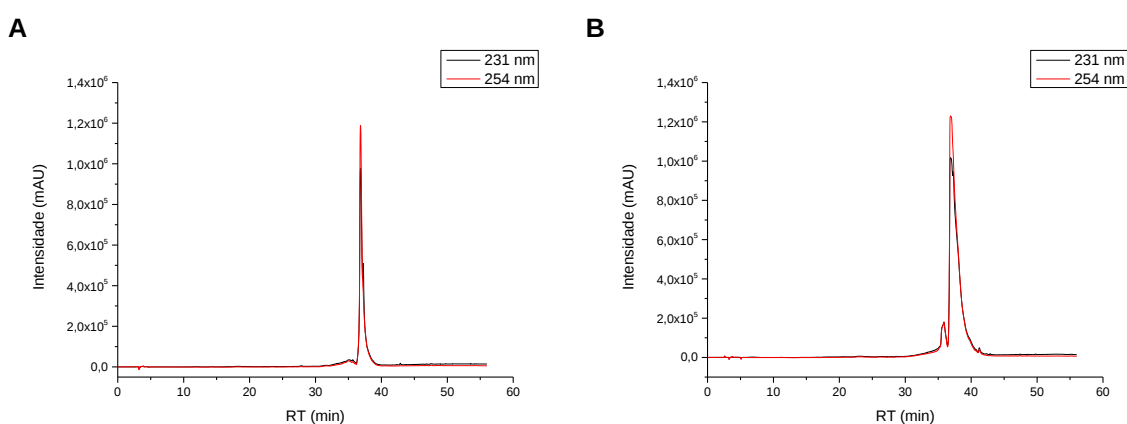


Figura 45: Cromatogramas referentes às sub frações **A)** F10.7 e **B)** F11.2 por HPLC-DAD utilizando uma coluna de C-18 preparativa em modo gradiente 5-100% (MeOH/H₂O) em 45 min. Fonte: Autor

Tabela 20: Isolamento das substâncias presentes nas subfrações F10.7 e F11.2

Subfração	Massa (mg)
F10.7.1	1,0
F10.7.2	0,7
F11.2.1	0,1
F11.2.2	0,1

Após o isolamento das quatro substâncias, observou que todas apresentaram uma coloração amarelada e, por terem sido isoladas com RT próximos, como mostrado na **Figura 45**, sua coloração podem indicar que se trata da mesma substância para todos os isolados. Outro fato de apresentarem uma coloração mais vibrante, o que pode ser uma indicativa da presença de

grupos cromóforos e alta conjugação de duplas ligações. Após as análises de HPLC-DAD, foram também observados os espectros de UV das substâncias isoladas (**APÊNDICE J**).

4.7.3 Elucidação estrutural das substâncias F10.7.1, F10.7.2, F11.2.1 e F11.2.2

4.7.3.1 Análise das substâncias por UPLC-ESI-QqTOF-MS/MS

Após o isolamento das quatro substâncias, fez-se a análise por espectrometria de massas de alta resolução, o que evidenciou que os isolados F10.7.1, F10.7.2, F11.2.1 apresentaram um mesmo valor de massa, podendo se tratar da mesma substância ou de isômeros, apresentando um valor médio de massa de m/z 285,04 obtido em modo negativo (**Figura 46**). A fórmula molecular sugerida para o íon detectado é de $C_{15}H_9O_6^-$ com massa calculada para 285,0399 Da.

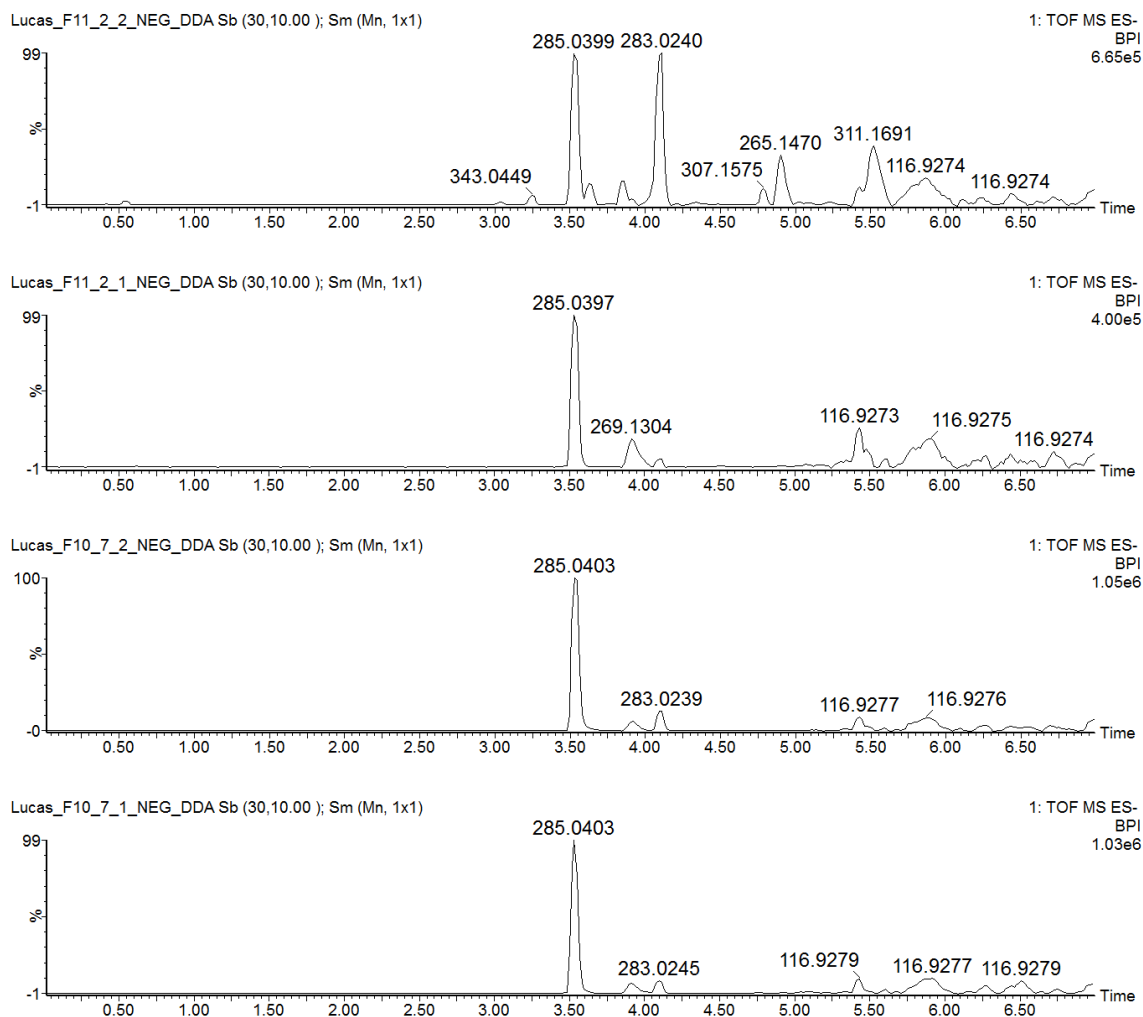


Figura 46: Cromatograma das substâncias F10.7.1, F10.7.2, F11.2.1 e F11.2.2 em modo negativo por UPLC-ESI-QqTOF-MS/MS. Fonte: Autor

Observou-se que, a substância F11.2.2 apresenta o mesmo pico com m/z 285,04 mas ao mesmo tempo mostra uma mistura com outra substância com m/z 283,02 que também apareceu no cromatograma F10.7.1 e F10.7.2, mas em menor intensidade.

4.7.3.2 Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Inicialmente, realizou-se a análise de RMN para todos os quatro isolados, mas dada pouca massa de isolado para as substâncias F11.2.1 e F11.2.2, apresentou sinais de baixa intensidade nos espectros de ^1H , DEPTQ, HSQC,

HMBC e COSY, não sendo possível realizar a identificação das substâncias analisadas. Em contrapartida, através da análise de espectrometria de massas de alta resolução, constatou-se que todos os quatro metabólitos isolados tratavam da mesma substância. Sendo assim, foram utilizados os espectros da substância F10.7.2 para a elucidação estrutural, pois foi a que apresentou espectros de melhor resolução.

Mesmo com o espectro de massas de alta resolução apontando outra substância em mistura m/z 283,02 $[M-H]^-$, não houve nenhuma interferência nos sinais entre as substâncias, sendo possível realizar a análise em conjunto com os dados de RMN visando propor sua estrutura química (**Figura 47**).

O espectro de RMN de 1H (**Figura 48**) mostrou dois simpletos, um em 4,58 ppm, referente aos quatro hidrogênios de hidroxilas e o outro em 4,69 ppm referente a dois hidrogênios metilênicos de CH_2 α -carbonílico. O espectro também apresentou sinais na região de hidrogênios aromáticos, com um duplete em 6,57 ppm e uma constante de acoplamento (J_{HH}) de 2,43 Hz, indicativa de acoplamento em *meta*, um duplete em 7,19 ppm (J_{HH} 2,41 Hz), além de outros dois dupletos em 7,26 ppm (J_{HH} 1,37 Hz) e em 7,73 ppm (J_{HH} 1,62 Hz) (**Tabela 21**). Cada duplete corresponde a um hidrogênio aromático e, pelo valor das constantes de acoplamento, estão todos orientados em posição *meta* no anel, compatíveis com os valores de J_{HH} entre 1 e 3 Hz, conforme reportado na literatura.

O espectro de DEPTQ (**Figura 49**) mostrou os sinais dos carbonos presentes na estrutura, apresentando um sinal em δ_C 62,7 ppm referente ao carbono metilênico C-6, quatro sinais em δ_C 108,7; 109,2; 116,5 e 120,4 ppm referentes aos carbonos nas posições C-1, C-3, C-9 e C-7 dos dois anéis aromáticos e por último um sinal por volta de δ_C 151,8 ppm referente ao carbono carbonílico C-5 e, dado ao valor de deslocamento, é uma indicativa de carbonila de éster. Ao analisar o mapa de contorno HSQC (**Figura 50**), foi possível realizar as correlações entre os hidrogênios da estrutura e seus respectivos carbonos.

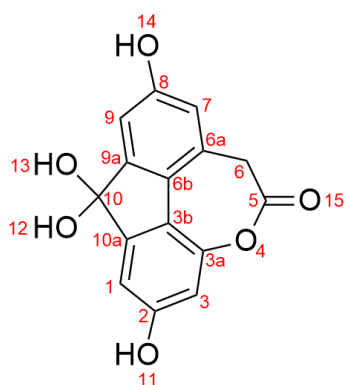


Figura 47: Proposta estrutural para a substância F10.7.2. Fonte: Autor

Tabela 21: Deslocamentos de RMN de ^1H (600 MHz) e DEPTQ (150 MHz) em $\text{MeOH-}d_4$

Posição	δ_{H} (mult.)	J_{HH} (Hz)	DEPTQ
1	6,57 (<i>d</i>)	2,43	108,7
2	-	-	-
3	7,19 (<i>d</i>)	2,41	109,2
3a	-	-	-
3b	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	151,8
6	4,69 (<i>s</i>)	-	62,7
6a	-	-	-
6b	-	-	-
7	7,26 (<i>d</i>)	1,37	120,4
8	-	-	-
9	7,73 (<i>d</i>)	1,62	116,5
10	-	-	-
11	4,59 (<i>s</i>)	-	-
12	4,59 (<i>s</i>)	-	-
13	4,59 (<i>s</i>)	-	-
14	4,59 (<i>s</i>)	-	-
15	-	-	-

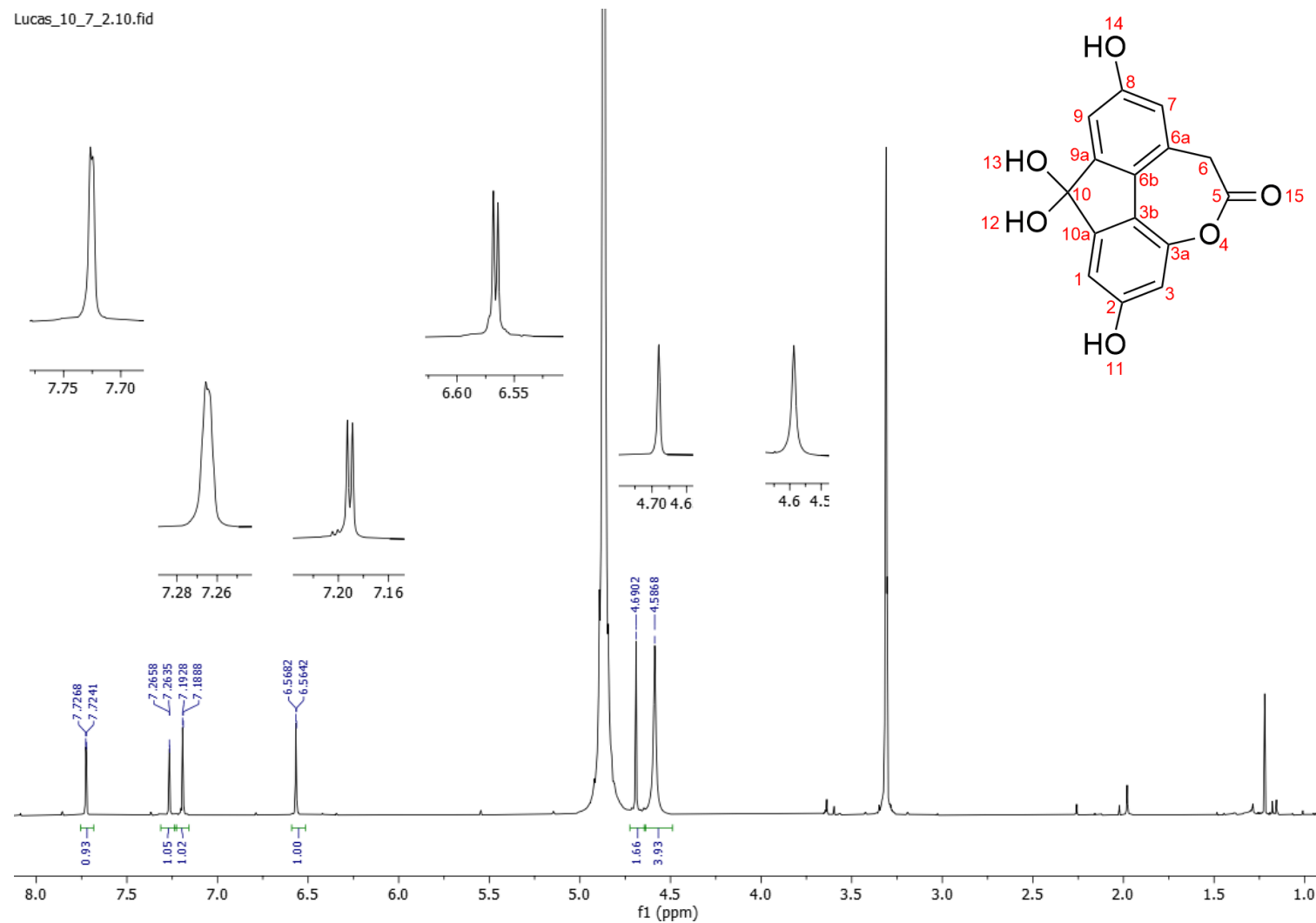


Figura 48: Espectro de RMN de ^1H da substância F10.7.2 (MeOH- d_4 , 600 MHz). Fonte: Autor

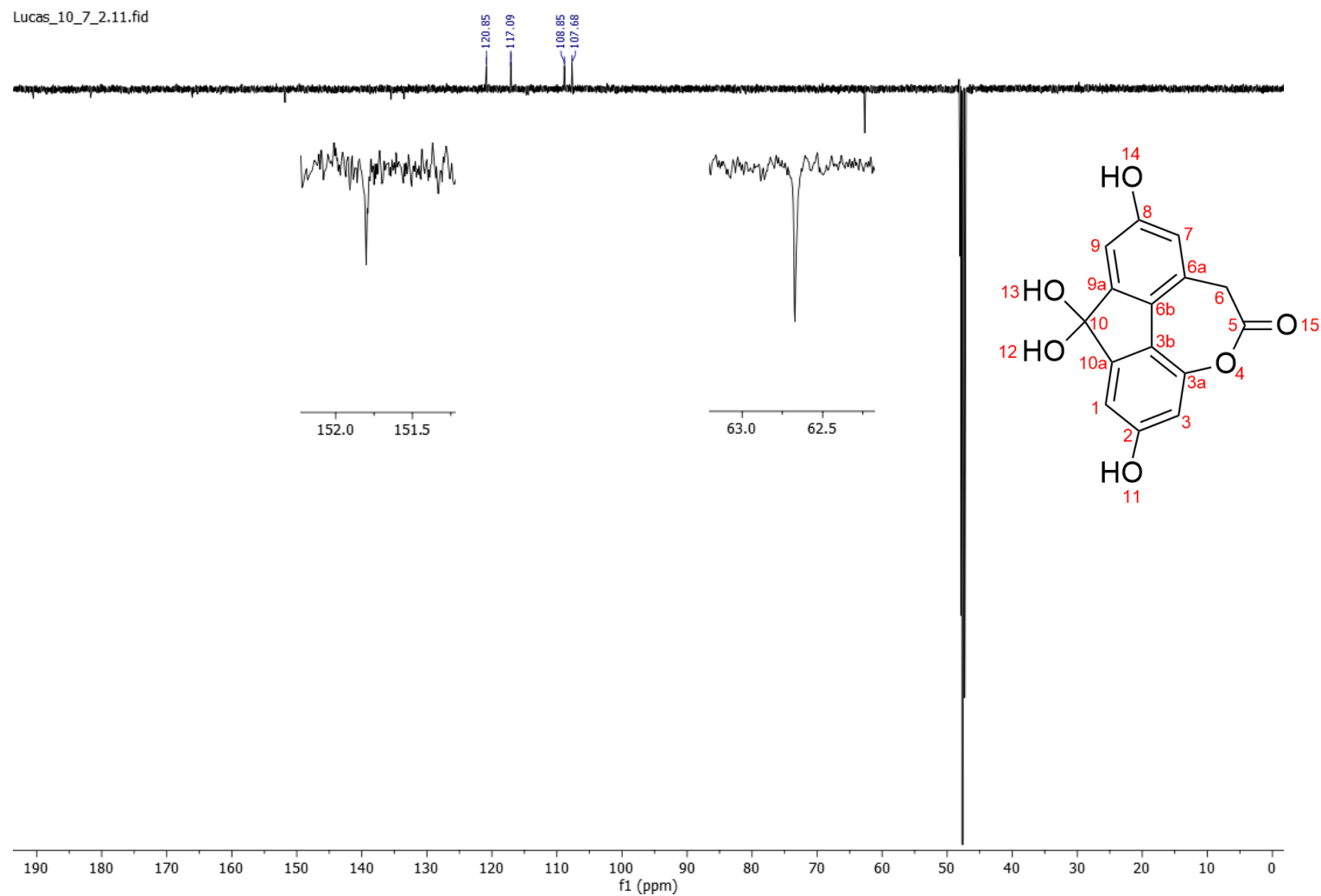


Figura 49: Espectro de DEPTQ da substância F10.7.2 (MeOH-*d*4, 150 MHz). Fonte: Autor

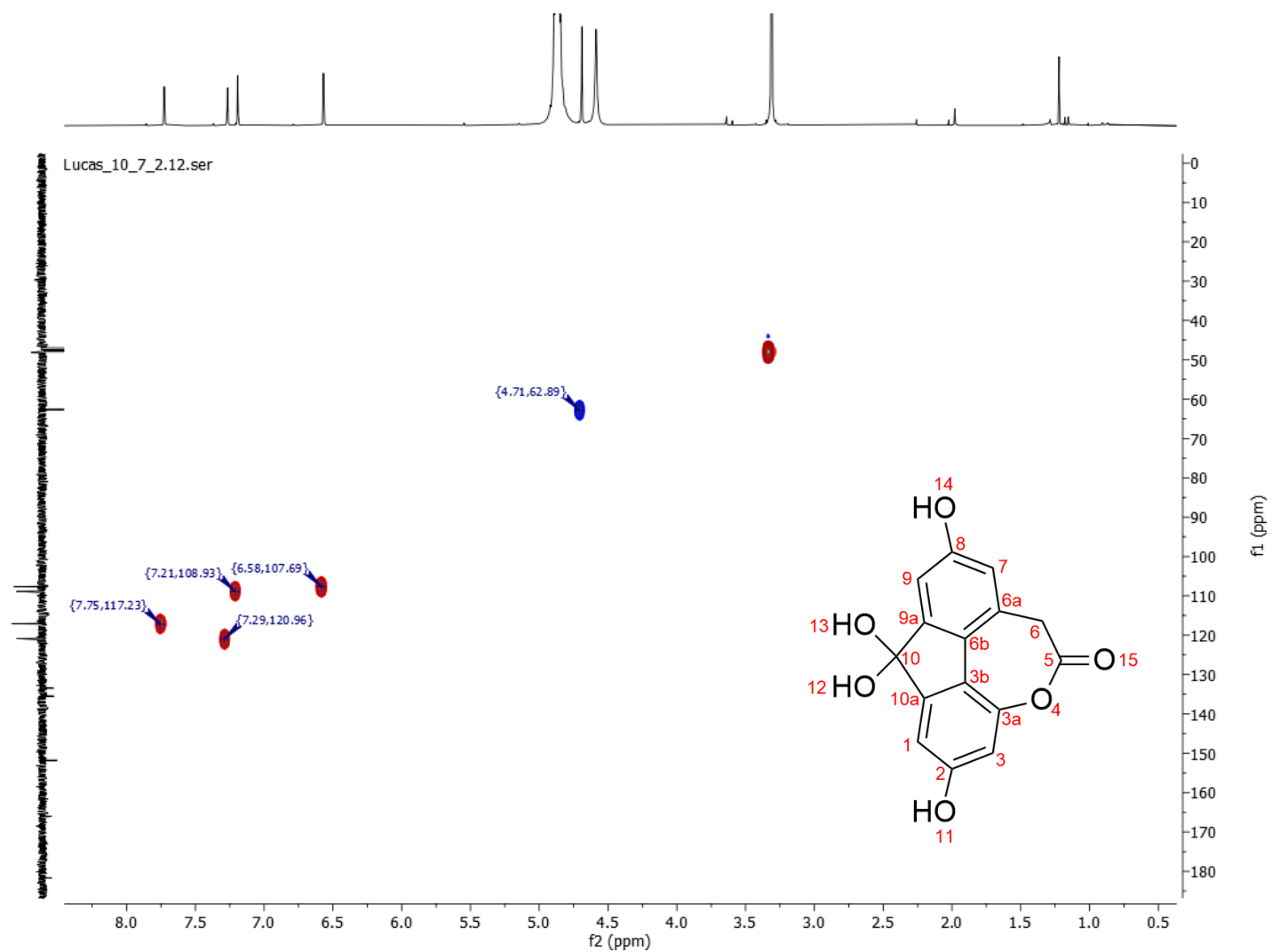


Figura 50: Mapa de contorno HSQC da substância F10.7.2 (MeOH-*d*₄, 600 MHz). Fonte: Autor

A partir do mapa de contorno COSY (**Figura 51**), não foi possível fazer as correlações entre os hidrogênios, pois mostrou apenas os átomos correlacionados com eles mesmos.

As correlações apresentadas pelo espectro de HMBC (**Figura 52**), evidenciou a posição dos carbonos na estrutura química, podendo observar a correlação dos hidrogênios metilênicos do CH₂ (δ_H 4,69) com o carbono da carbonila (C-5, δ 151,8) e com o carbono do anel aromático (C-7, δ_C 120,4). Os hidrogênios em relação *meta* do primeiro anel aromático mostram apenas correlação entre seus carbonos, sendo o H-1 (δ_H 6,57) correlacionado ao C-3 (δ_C 109,2) e o H-3 (δ_H 7,19) uma correlação com o C-1 (δ_C 108,7).

Já os hidrogênios em relação *meta* do segundo anel aromático mostram correlacionam com os carbonos a três ligações, evidenciando a correlação de H-9 (δ_H 7,73) com C-7 (δ_C 120,4) e de H-7 (δ_H 7,26) com C-9 (δ_C 116,5), bem como com o carbono metilênico C-6 (δ_C 62,7).

Após analisar todas as correlações observadas no espectro de HMBC, as multiplicidades e constantes de acoplamento no espectro de RMN de ¹H, propôs a estrutura para a substância F10.7.2, nomeada como Hypoxepinona A, ou, seguindo as normas da IUPAC, 2,8,10,10-tetraidroxi-6,10-diidro-5H-fluoreno[4,5-bcd]oxepin-5-ona, com auxílio do programa ChemDraw Ultra 12.0.

Fez-se uma busca nos principais banco de dados (CAS SciFinder e PubChem), com intuito de buscar se a substância isolada já teria sido reportada na literatura, bem como se teria similaridade com outras estruturas, e foi constatado que não há nenhuma publicação científica relacionada com a estrutura proposta, deduzindo que o isolado pode tratar-se de uma substância inédita.

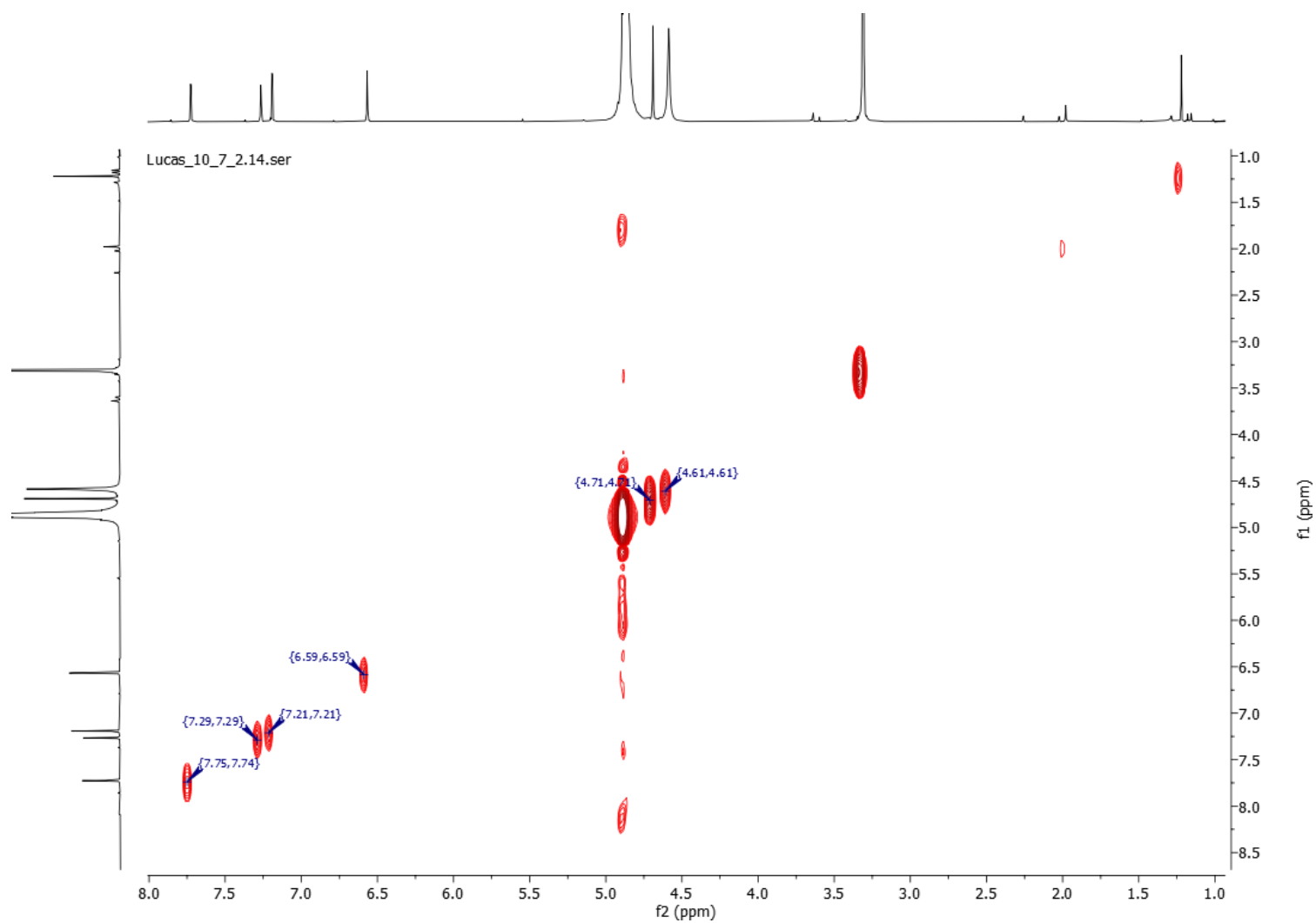


Figura 51: Mapa de contorno COSY da substância F10.7.2 (MeOH-*d*4, 600 MHz). Fonte: Autor

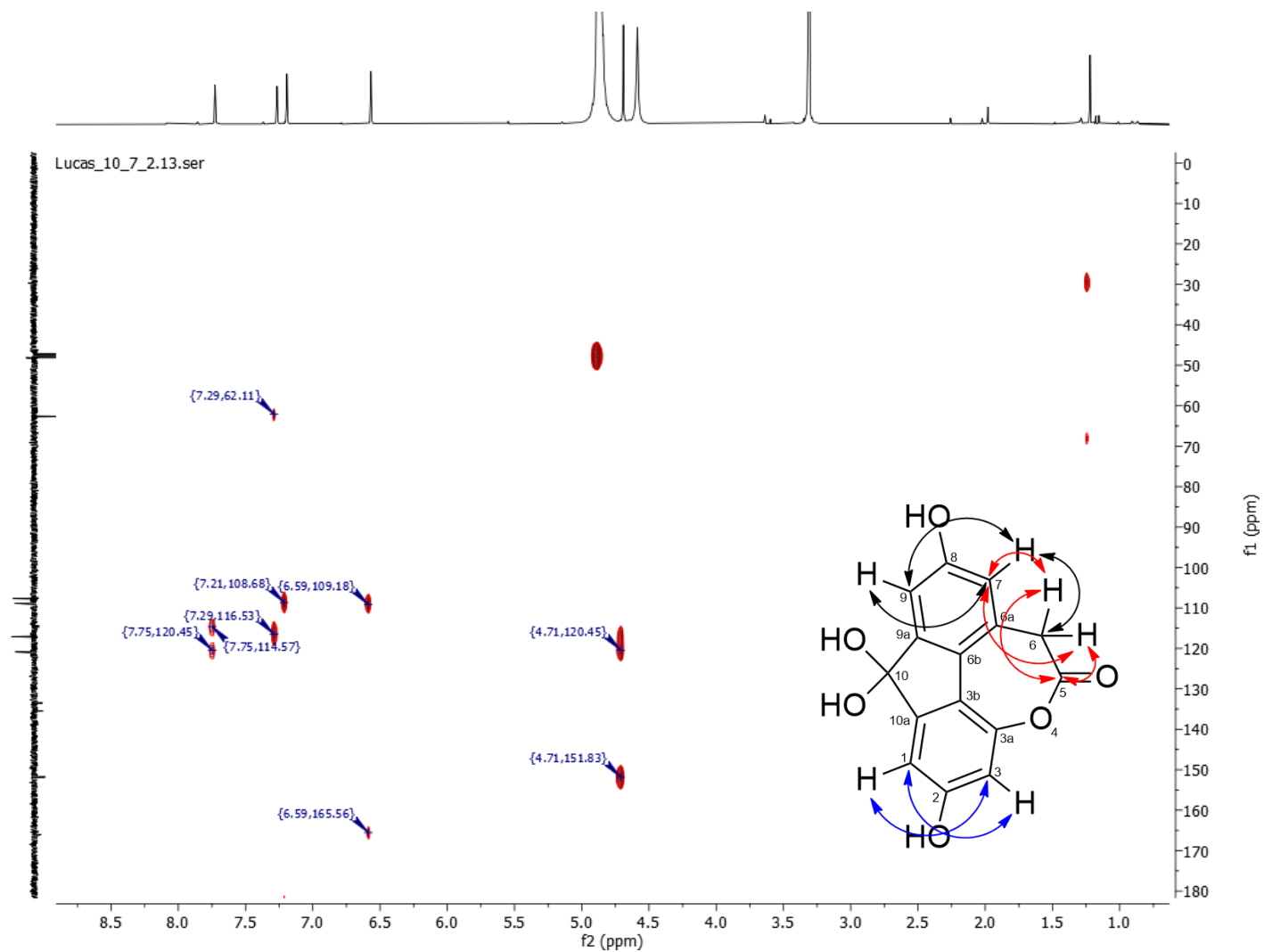


Figura 52: Mapa de contorno HMBC da substância F10.7.2 (MeOH-*d*4, 600 MHz). Fonte: Autor

Como resposta a proposta estrutural, utilizou-se do ChemDraw 3D para determinar o grau de estabilidade da estrutura por meio de sua conformação de menor energia (**Figura 53**), considerando a existência de tensão nos anéis, já que se trata de uma estrutura tetracíclica com anéis fundidos, incluindo dois anéis aromáticos fundidos a um anel de lactona bem como a um anel de cinco carbonos.

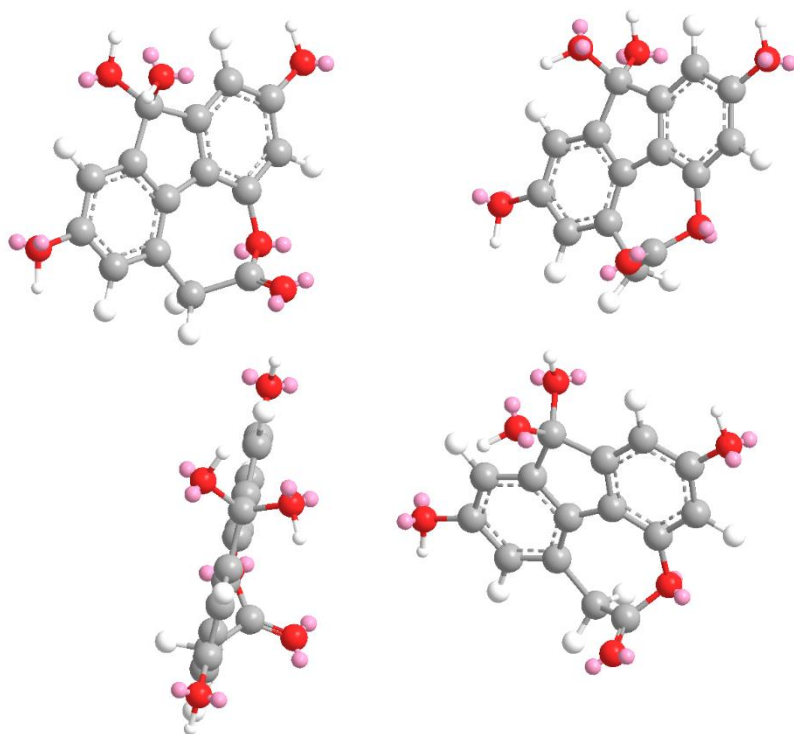


Figura 53: Estrutura 3D da substância F10.7.2 em diferentes ângulos evidenciando a coplanaridade dos dois anéis aromáticos. Fonte: Autor

4.7.3.3 Fragmentação da substância F10.7.2 por UPLC-ESI-QqTOF-MS/MS

Com os dados de MSMS da substância F10.7.2, foram observadas as fragmentações (**Figura 54**) que a molécula pode sofrer, e com isso, pode-se propor as estruturas referentes aos principais fragmentos presentes no cromatograma (**Figura 55**), a fim de verificar se os fragmentos observados de fato condizem com a proposta estrutural realizada.

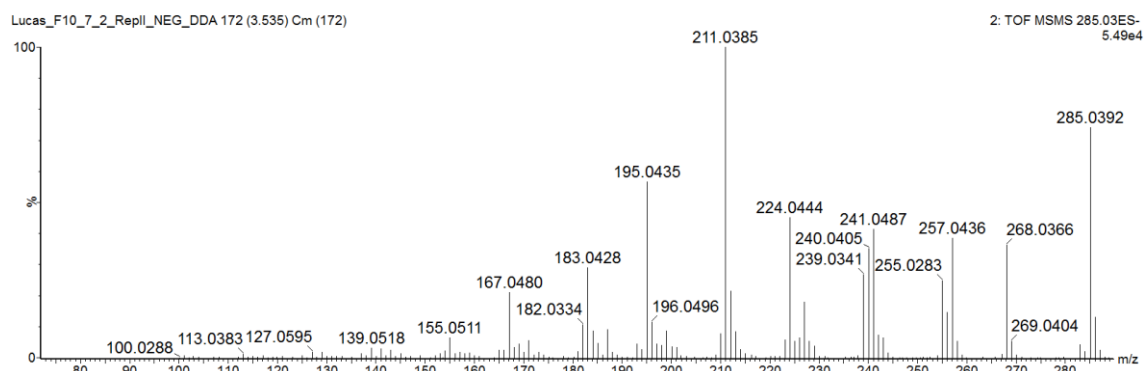


Figura 54: Espectro de fragmentação da substância F10.7.2 por UPLC-ESI-QqTOF-MS/MS.

Fonte: Autor

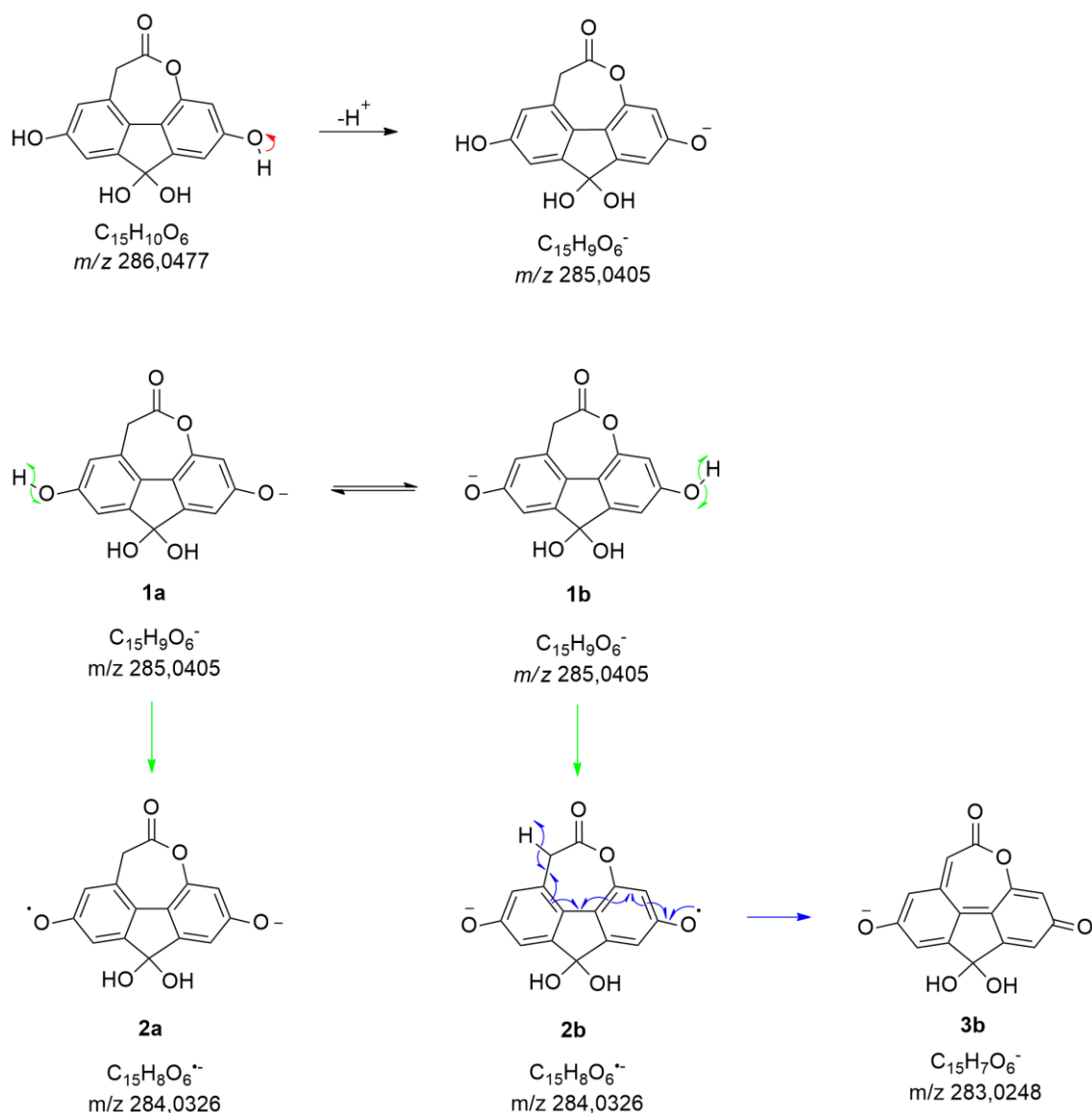


Figura 55: Estruturas de fragmentação da substância F10.7.2 considerando dois sítios de desprotonação propostas a partir do espectro de MSMS. Fonte: Autor

Com base na estrutura principal proposta, pode haver dois sítios de desprotonação referente às duas hidroxilas ligadas aos dois anéis aromáticos, resultado em uma basicidade em fase gasosa muito próximas, já que quando comparada com as hidroxilas ligadas ao anel de cinco membros, ambas ligadas aos anéis aromáticos possuem maior facilidade de serem desprotonadas, podendo ser estabilizadas por ressonância. A proposta de duas estruturas com

diferentes desprotonações corrobora com os fragmentos observados quando é aplicado um zoom em torno do pico referente à substância (**Figura 56**).

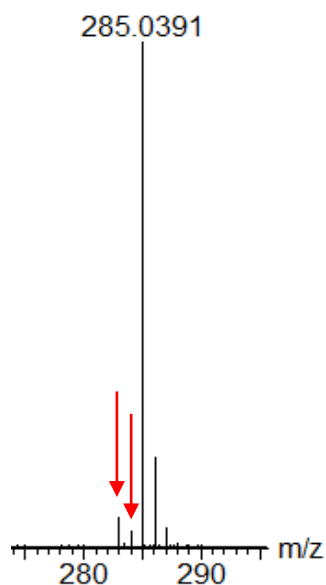


Figura 56: Picos característicos dos dois fragmentos com relação aos diferentes sítios de desprotonação da substância F10.7.2. Fonte: Autor

Seguindo esta linha de raciocínio, pode ocorrer três séries diferentes de fragmentação para a estrutura. A primeira série segue a partir da estrutura 1a, quando a estrutura está em sua forma inicial (**Figura 57**).

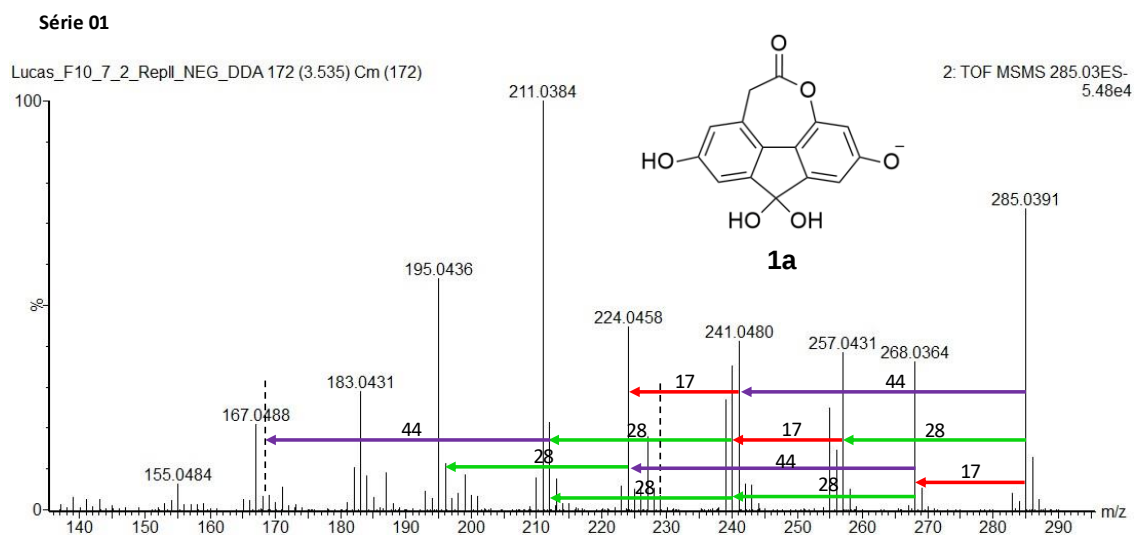


Figura 57: Espectro de MSMS para a primeira série de fragmentação. Fonte: Autor

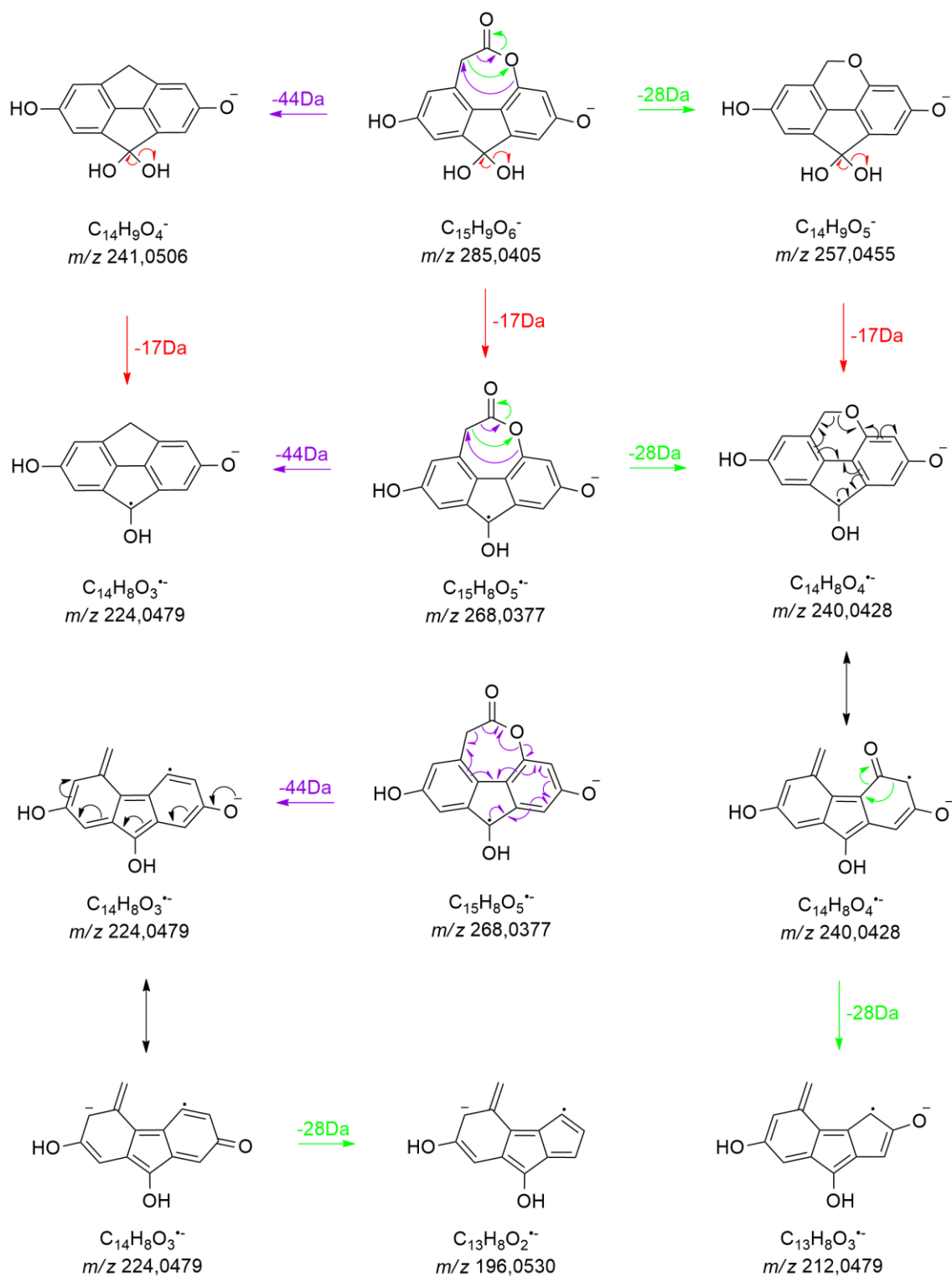


Figura 58: Proposta das estruturas de fragmentação referente à estrutura 1a (Série 1) do espectro de MSMS. Fonte: Autor

A segunda série de fragmentação se dá a partir da estrutura 2a, que foi originada a partir da perda de um hidrogênio radicalar da hidroxila (**Figura 59**).

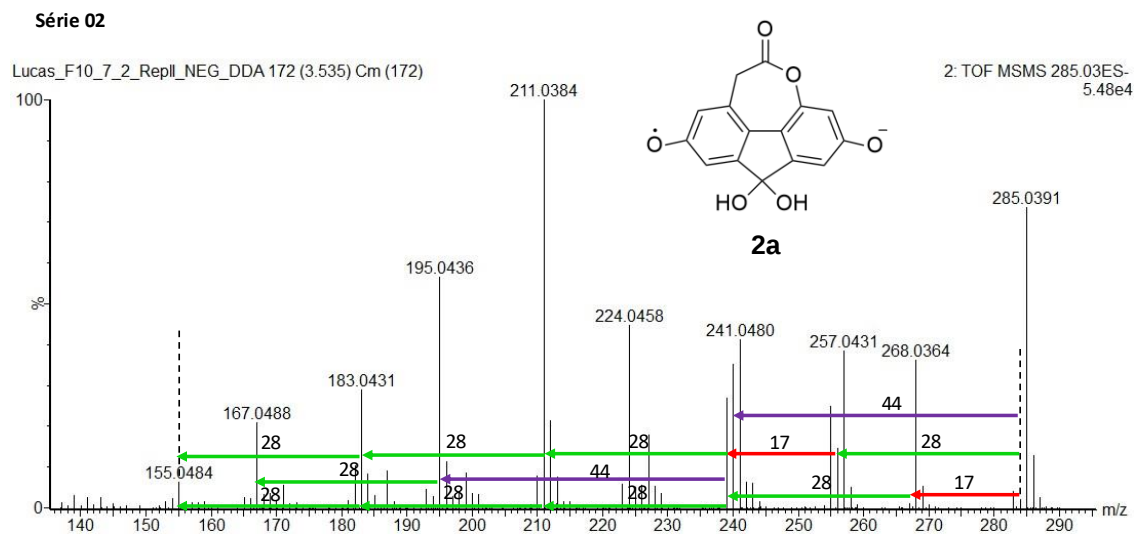


Figura 59: Espectro de MSMS para a segunda série de fragmentação. Fonte: Autor

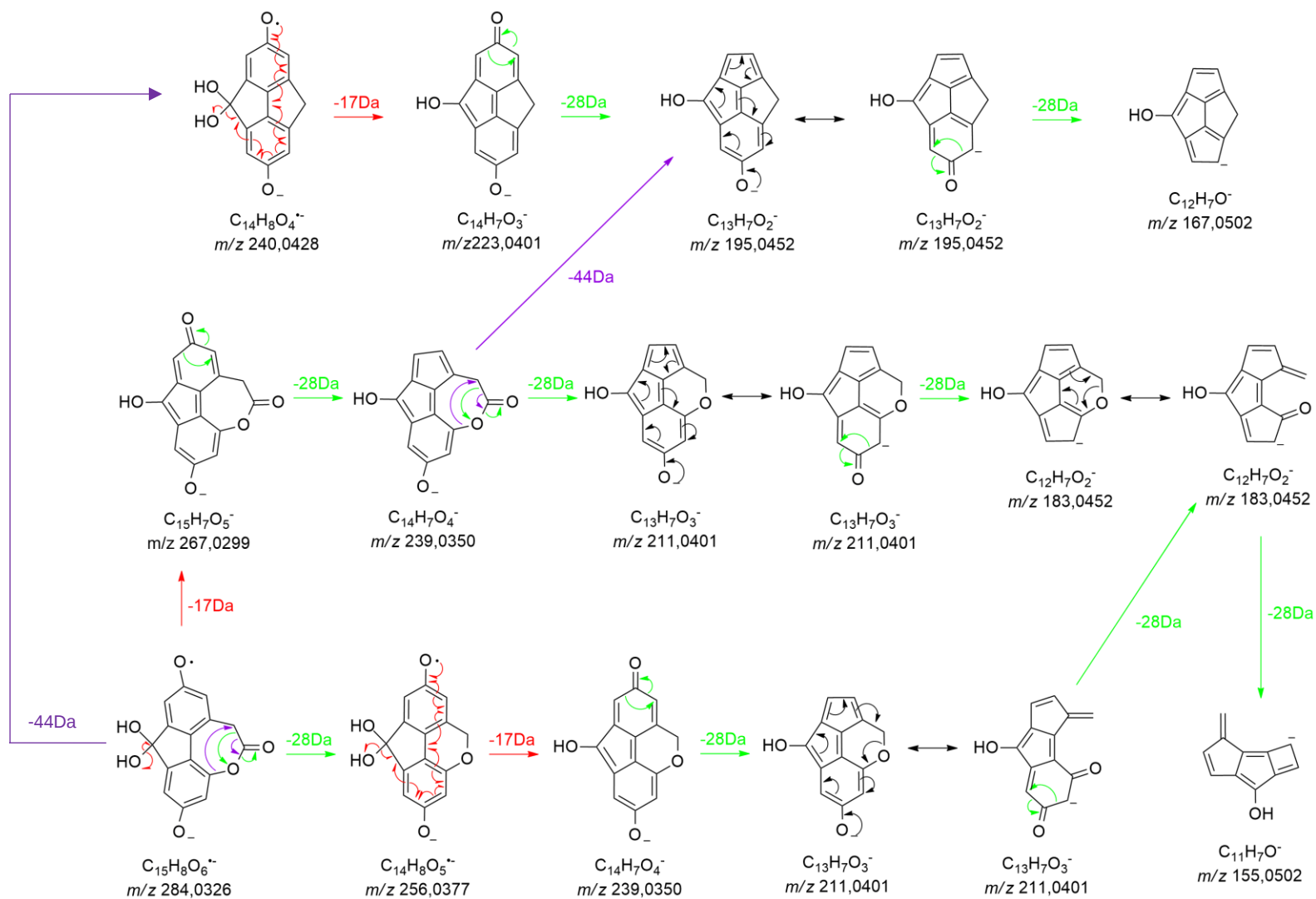


Figura 60: Proposta das estruturas de fragmentação referente à estrutura 2a (Série 2) do espectro de MSMS. Fonte: Autor

Pôr fim a terceira série de fragmentação ocorre a partir da estrutura 3b, que também ocorre uma perda de hidrogênio radicalar do CH₂ por ressonância (Figura 61).

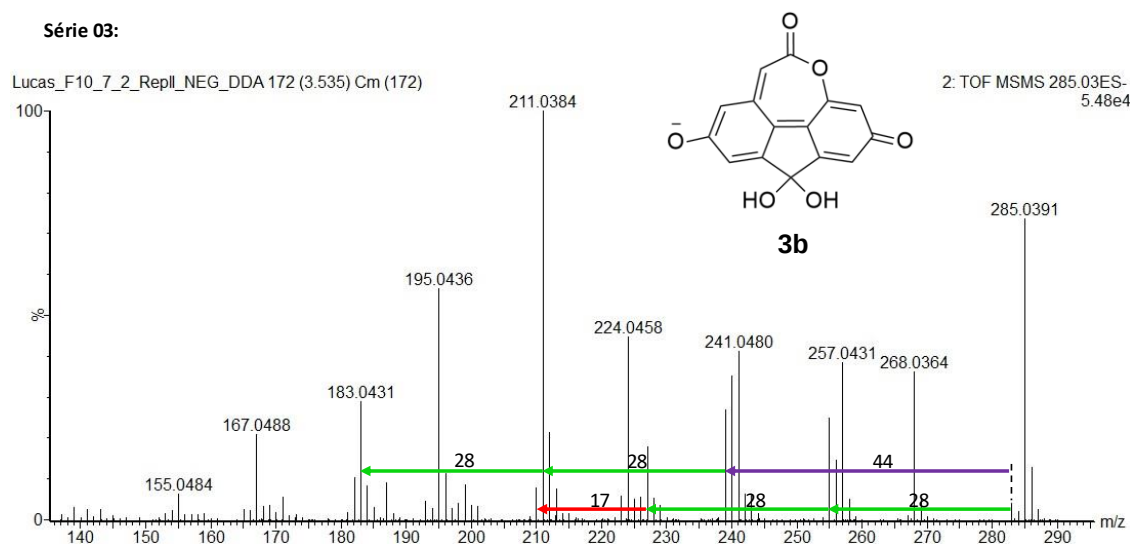


Figura 61: Espectro de MSMS para a terceira série de fragmentação. Fonte: Autor

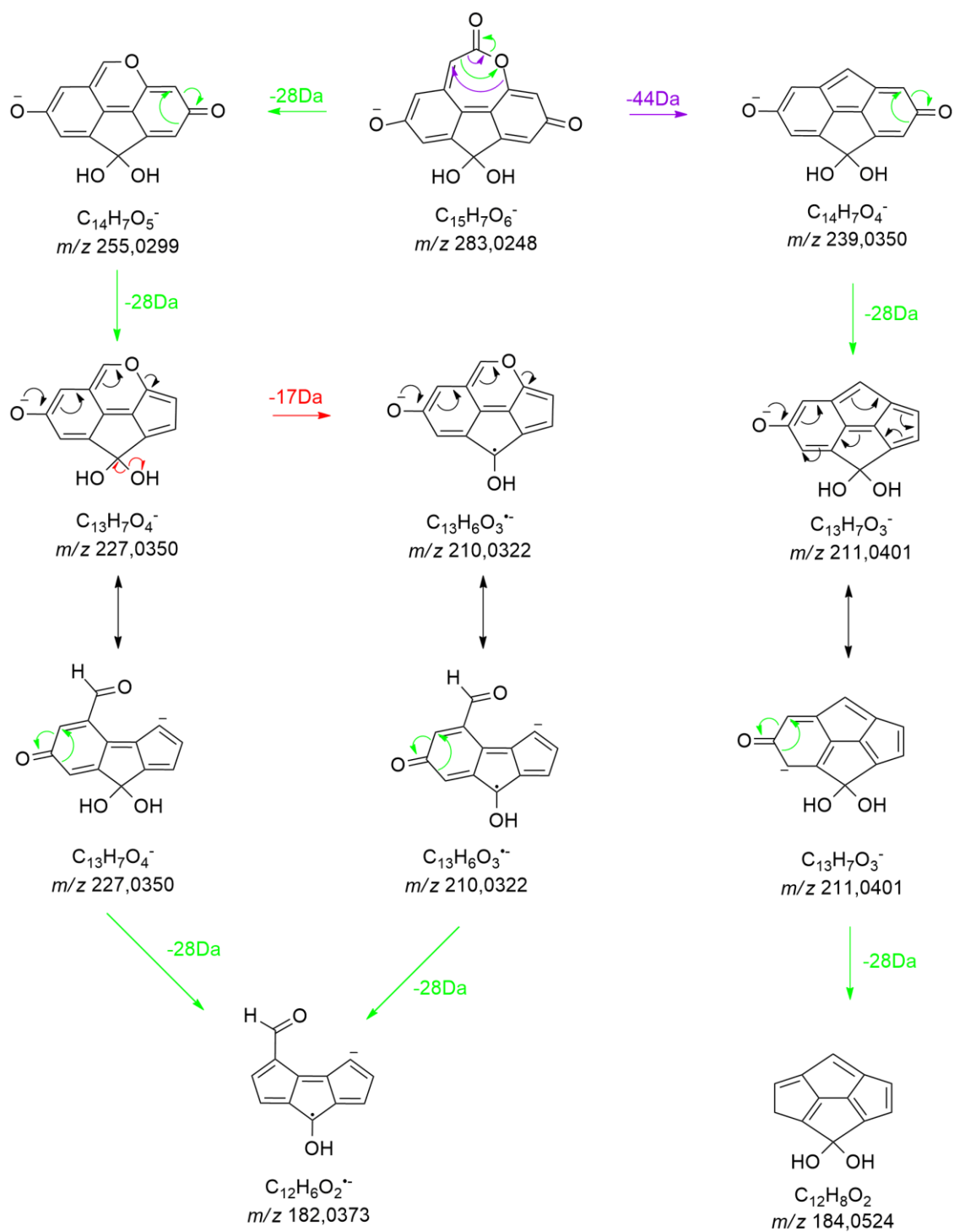


Figura 62: Proposta das estruturas de fragmentação referente à estrutura 3b (Série 3) do espectro de MSMS. Fonte: Autor

4.8 Bioensaios

4.8.1 Atividade antibacteriana

4.8.1.2 Avaliação da atividade de extratos do planejamento experimental

Os ensaios antibacterianos foram realizados com alguns extratos obtidos a partir do planejamento experimental, sendo escolhidos de acordo com as variáveis utilizadas durante o crescimento do fungo e do extrato obtido cultivando o fungo em água do mar (MAR). Como resultado (**Tabela 22**), os extratos não apresentaram atividade antibacteriana na concentração testada, neste caso, para que houvesse atividade, deveria apresentar uma inibição à linhagem bacteriana a uma concentração $\leq 512 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados apresentados na tabela mostram apenas como $> 512 \mu\text{g.mL}^{-1}$, pois, mesmo que as amostras não apresentaram atividade para aquela concentração testada, pode ser que utilizando uma concentração maior, venha apresentar alguma inibição do crescimento bacteriano.

Tabela 22: Triagem inicial dos extratos do planejamento experimental a $512 \mu\text{g.mL}^{-1}$

Linhagens bacterianas	Ext.pl.03	Ext.pl.07	Ext.pl.08	Ext.pl.11	MAR
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984*	>512	>512	>512	>512	>512
<i>S. aureus</i> ATCC 25923*	>512	>512	>512	>512	>512
<i>S. aureus</i> ATCC 8095*	>512	>512	>512	>512	>512
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212*	>512	>512	>512	>512	>512
<i>E. faecium</i> ATCC 700221*	>512	>512	>512	>512	>512
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	>512	>512	>512	>512	>512
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>512	>512	>512	>512	>512
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	>512	>512	>512	>512	>512
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>512	>512	>512	>512	>512

* Linhagens de bactérias gram positivas, as demais sem marcação são bactérias gram negativas

4.8.1.3 Avaliação da atividade de extratos da curva de crescimento e substância isolada

Ao comparar os cromatogramas do planejamento experimental com os cromatogramas dos extratos obtidos com a curva de crescimento do fungo, há uma diferença aparente na quantidade de picos presentes, mostrando assim uma diferença no perfil químico dos extratos. A partir disso, os extratos referentes à curva, foram enviados para análise de atividade antibacteriana, bem como a substância isolada (Frc12).

Assim como os resultados obtidos para os extratos do planejamento, também apresentaram inibição bacteriana para a concentração testada (**Tabela 23**), mesmo assim, há chances de os extratos serem ativos a uma concentração maior.

Tabela 23: Triagem inicial dos extratos da curva de crescimento e substância isolada a 512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Linhagens bacterianas	Ext.02	Ext.03	Ext.04	Ext.05	Ext.06	Ext.07	Frc12
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984*	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>S. aureus</i> ATCC 25923*	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>S. aureus</i> ATCC 8095*	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212*	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>E. faecium</i> ATCC 700221*	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512

* Linhagens de bactérias gram positivas, as demais sem marcação são bactérias gram negativas

4.8.2 Ensaio de citotoxicidade

A **Tabela 24** mostra os percentuais de inibição do crescimento celular das amostras testadas em linhagem de carcinoma colorretal humano (HCT116). Como observado, os extratos Ext.pl.07, Ext.pl.08, Ext.pl.11 e Ext.05 foram capazes de inibir o crescimento celular em percentual superior ou igual a 75%

quando testadas na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo assim, foram submetidas à análise de IC_{50} .

Tabela 24: Inibição do crescimento celular (%) das amostras testadas em linhagem de HCT116, com as concentrações de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (média $\pm$ EPM; n=2).

Amostras	5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	
	Inibição (%)	EPM	Inibição (%)	EPM
Ext.pl.03	13,58	9,23	59,32	12,10
Ext.pl.07	-3,47	2,40	75,22	18,60
Ext.pl.08	20,04	9,58	75,63	22,57
Ext.pl.11	3,58	8,00	89,95	4,98
Ext.05	-4,27	2,78	96,75	1,68

Já na linhagem de câncer de mama humano (MCF7), como mostrado na **Tabela 25**, as amostras não foram ativas em ambas as concentrações.

Tabela 25: Inibição do crescimento celular (%) das amostras testadas em linhagem de MCF7, com as concentrações de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (média $\pm$ EPM; n=02).

Amostras	5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	
	Inibição (%)	EPM	Inibição (%)	EPM
Ext.pl.03	-0,63	13,63	29,20	12,68
Ext.pl.07	-13,73	6,84	58,03	19,25
Ext.pl.08	-3,85	9,56	46,07	18,06
Ext.pl.11	-5,42	9,78	69,10	7,64
Ext.05	-20,19	7,85	57,88	21,06

Mesmo os extratos não obtendo resultados significativos em ambas as concentrações contra linhagem de MCF7, mostraram ótimos resultados contra HCT116 quando testados a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O extrato referente à curva de

crescimento, foi o que apresentou melhor porcentagem de inibição celular, apresentando um valor médio de 96,75% a uma concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Os extratos referentes ao planejamento experimental, também apresentaram resultados significativos quando testados em uma concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, tendo apenas o Ext.pl.03 apresentado valor inferior a 60%, podendo-se concluir assim que, os extratos que se mostraram mais ativos foram aqueles onde o crescimento do fungo foi realizado em valores mais altos de temperatura e pH.

A partir dos resultados obtidos, realizou-se então a regressão não linear do controle positivo doxorubicina (**Figura 63**), usada durante a triagem das amostras, com concentrações de 0,0032 a 10 μM em linhagem de **A)** carcinoma de colorretal humano (HCT116, $\text{IC}_{50}=0,38 \mu\text{M}$, intervalo de confiança de 0,23 a 0,61 μM , $R^2= 0,94$; $n=02$) e **B)** câncer de mama humano (MCF7, $\text{IC}_{50}=0,47 \mu\text{M}$, intervalo de confiança de 0,18 a 1,57 μM , $R^2= 0,81$; $n=02$).

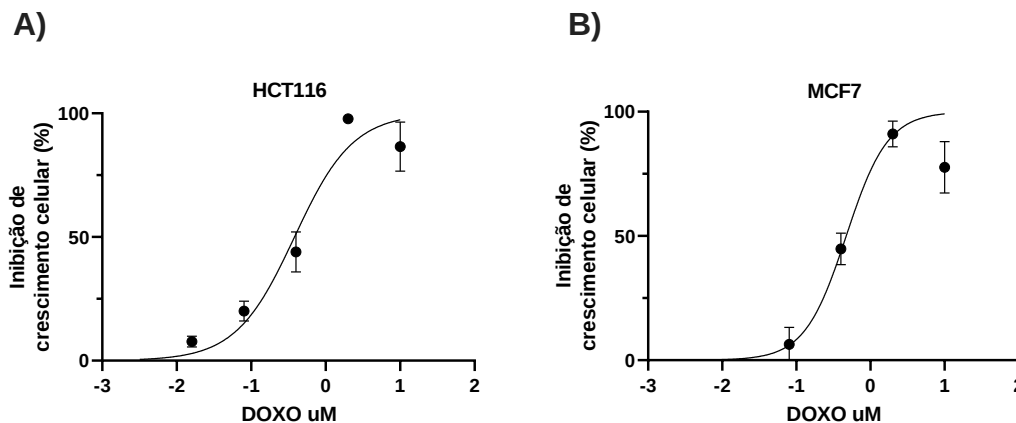


Figura 63: Regressão não linear do controle positivo doxorubicina com concentrações de 0,0032 a 10 μM em linhagem de **A)** carcinoma colorretal humano (HCT116, $n=02$) e **B)** câncer de mama humano (MCF7, $n=02$). Fonte: Autor

Após os extratos referente à curva de crescimento apresentarem um potencial citotóxico significativo, os demais extratos da curva, bem como a substância isolada na fração Frc12 e o extrato preparado em água do mar, foram

também enviadas para a realização dos ensaios. Para o ensaio com a linhagem HCT116 (**Tabela 26**), percebe-se que praticamente todos os extratos apresentaram um percentual de inibição acima de 90%, com exceção do extrato Ext.01, sendo o único extrato obtido da curva de crescimento que apresentou um perfil químico diferente dos demais a partir das análises de PCA e PLS-DA.

Têm-se também que, a substância isolada apresentou uma alta porcentagem de inibição, aproximadamente de 95%, o que é um resultado bastante significativo quando comparado as demais amostras testadas, pois, o extrato é uma mistura complexa de substâncias e, por mais que apresente atividade, não é possível afirmar se a mistura das substâncias presentes é que possui atividade, ou se é apenas uma determinada substância presente que desenvolve esse papel.

Tabela 26: Inibição do crescimento celular (%) das amostras testadas em linhagem de HCT116, com as concentrações de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (média $\pm$ EPM; n=2).

Amostras	5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	
	Inibição (%)	EPM	Inibição (%)	EPM
Frc12	-4,94	7,51	94,75	1,07
Ext.01	-15,44	4,94	69,87	4,09
Ext.02	-16,38	11,55	95,31	1,62
Ext.03	-20,04	6,77	94,65	1,50
Ext.04	-28,79	10,09	94,63	1,34
Ext.06	-18,65	8,59	93,47	2,35
Ext.07	6,50	8,44	96,76	1,25
MAR	-13,35	8,48	94,37	1,84

Quando as mesmas amostras foram testadas para a linhagem de MCF7 (**Tabela 27**), observou-se que apenas o extrato Ext.07 apresentou uma porcentagem de inibição acima de 80%, tratando-se de um resultado bastante significativo, tendo em vista que de todas as amostras testadas, apenas uma conseguiu inibir o crescimento de células de câncer de mama humano, o que pode resultar em estudo futuros sobre as substâncias presentes neste extrato,

bem como o isolamento delas. Em contrapartida, quando analisada a substância Frc12, a mesma não apresentou uma alta inibição, quando comparada à linhagem de HCT116, o que indica uma alta seletividade da substância para determinados tipos de câncer.

Tabela 27: Inibição do crescimento celular (%) das amostras testadas em linhagem de MCF7, com as concentrações de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (média $\pm$ EPM; n=02).

Amostras	5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	
	Inibição (%)	EPM	Inibição (%)	EPM
Frc12	3,95	4,95	59,34	3,22
Ext.01	3,88	1,82	56,77	2,92
Ext.02	-6,01	6,30	62,86	5,04
Ext.03	-18,28	8,55	64,03	3,28
Ext.04	-11,74	5,62	65,00	2,52
Ext.06	-10,98	6,17	61,62	1,70
Ext.07	11,93	4,93	83,74	2,15
MAR	12,52	7,54	64,65	2,79

A partir dos resultados obtidos, realizou-se então a regressão não linear do controle positivo doxorubicina (**Figura 64**), usada durante a triagem das amostras, com concentrações de 0,0032 a 10 μM em linhagem de **A**) carcinoma de colorretal humano (HCT116, IC_{50} =0,38 μM , intervalo de confiança de 0,23 a 0,61 μM , R^2 = 0,94; n=02) e **B**) câncer de mama humano (MCF7, IC_{50} =0,47 μM , intervalo de confiança de 0,18 a 1,57 μM , R^2 = 0,81; n=02).

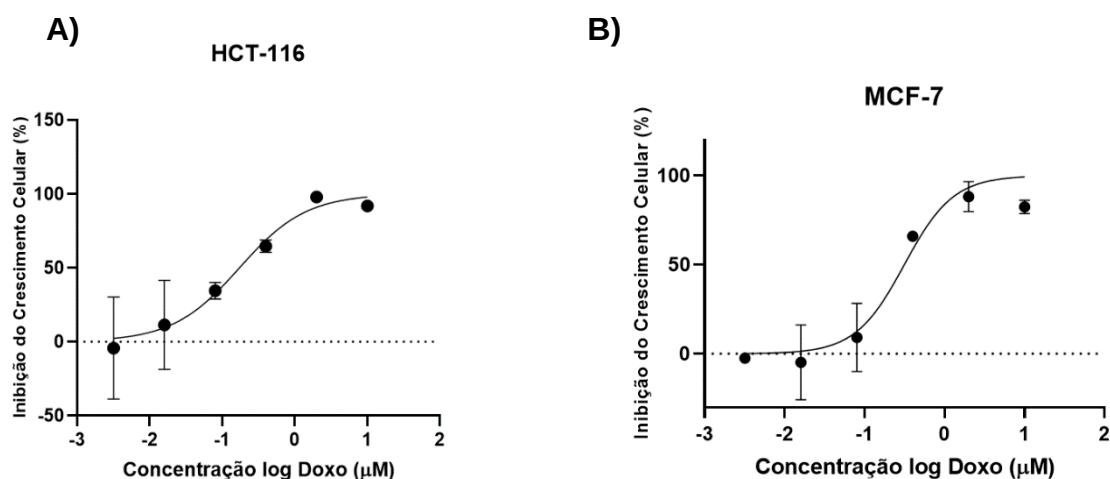


Figura 64: Regressão não linear do controle positivo doxorrubicina com concentrações de 0,0032 a 10 µM em linhagem de **A)** carcinoma colorretal humano (HCT116, n=02) e **B)** câncer de mama humano (MCF7, n=02)

4.8.3 Atividade larvicida e pupicida contra *Aedes aegypti*

Inicialmente, foram testados alguns extratos obtidos com o planejamento experimental (**Tabela 26**). Como resultados, os extratos não apresentaram atividade contra a larva e pupa do mosquito da dengue (*Aedes aegypti*), apresentando baixos valores na mortalidade, mesmo em longos período de incubação. Mesmo os extratos Ext.pl.03 e Ext.pl.11, que provocaram maior mortalidade das pupas que os demais, ainda sim, são considerados de valor baixo.

Tabela 28: Mortalidade de larvas e pupas do mosquito *Aedes aegypti*

Amostras	Mortalidade (%) - Larvas			Mortalidade (%) - Pupas	
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h
Ext.pl.03	0	5	5	26	40
Ext.pl.04	0	10	10	0	0
Ext.pl.08	0	12,5	25	0	0
Ext.pl.11	0	12,5	15	33	33

Como não foi possível obter resultados relevantes para as amostras testadas, optou-se por não enviar os demais extratos para ensaio.

4.8.4 Ensaio antifúngico

4.8.4.1 Suscetibilidade de fungos a drogas extratoras e antifúngicas

Foram testados os extratos referentes à curva de crescimento (**Tabela 27**), alguns extratos do planejamento experimental (**Tabela 28**) e a substância isolada juntamente com o extrato obtido em água do mar (**Tabela 29**), juntamente com o controle positivo contra *C. albicans* (**Tabela 30**).

Tabela 29: Concentração mínima inibitória (MIC $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e concentração fungicida mínima (MFC $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de extratos da curva de crescimento frente a linhagem de *Candida albicans*

Amostras	MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	MFC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Amphotericin B	0,125	0,5
Caspofungin	0,125	0,5
Itraconazole	0,25	0,5
Ext.02	250	>250
Ext.03	31,3	>250
Ext.04	31,3	>250
Ext.05	62,5	>250
Ext.06	125	>250
Ext.07	62,5	>250

Tabela 30: Concentração mínima inibitória (MIC $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e concentração fungicida mínima (MFC $\mu\text{g.mL}^{-1}$) do planejamento experimental frente a linhagem de *Candida albicans*

Amostras	MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	MFC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Amphotericin B	0,125	0,5
Caspofungin	0,125	0,5
Itraconazole	0,25	0,5
Ext.pl.1	250	>250
Ext.pl.3	62,5	>250
Ext.pl.6	62,5	>250
Ext.pl.7	125	>250

Tabela 31: Concentração mínima inibitória (MIC $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e concentração fungicida mínima (MFC $\mu\text{g.mL}^{-1}$) da substância Fcr12 e extrato MAR frente a linhagem de *Candida albicans*

Amostras	MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	MFC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Amphotericin B	0,125	0,5
Caspofungin	0,125	0,5
Itraconazole	0,25	0,5
Frc12	125	>250
MAR	31,3	>250

Os resultados dos testes com os extratos demonstraram uma atividade fungistática, já que os extratos avaliados não conseguiram matar a *C. albicans*. Porém, observou-se que, os extratos Ext.03, Ext.04 e MAR apresentaram menores valores de MIC, mas nenhum deles atingiu concentrações menores que o controle.

4.8.5 Ensaio anticolinesterástico

Os resultados obtidos do ensaio de triagem pontual frente as enzimas AChE_{ee} e BChE_{hu} evidenciaram uma baixa atividade dos extratos obtidos com o planejamento experimental (**Tabela 31**), e quando comparado os percentuais de inibição dos extratos com o padrão de galantamina, apresentaram valores abaixo

de 30% para ambas as enzimas. Mesmo apresentando moderada atividade frente as enzimas AChE_{ee} e BChE_{hu}, os extratos Ext.pl.01 e Ext.pl.03 foram os obtiveram maior inibição para ambas as enzimas.

Tabela 32: Resultados dos ensaios de triagem pontual para as enzimas acetilcolinesterase de peixe elétrico (AChE_{ee}) e butirilcolinesterase humana (BChE_{hu})

Amostras	% Inibição	
	ICER-AChE _{ee}	ICER-BChE _{hu}
Galantamina ^a	96,7 ± 0,6	92,7 ± 2,0
Ext.pl.1	27,0 ± 3,2	28,5 ± 2,6
Ext.pl.3	28,1 ± 2,1	27,0 ± 1,2
Ext.pl.6	22,3 ± 4,9	19,8 ± 3,1
Ext.pl.7	25,5 ± 1,7	25,3 ± 2,7

^aInibidor padrão de AChE_{ee} e BChE_{hu}

5 CONCLUSÃO

A utilização de ferramentas quimiométricas foi de grande importância durante as análises, pois foi possível observar não só a variação do perfil químico do fungo *Hypomontagnella monticulosa*, como também correlacionar seu metabolismo, observando que houve pouca variação no perfil químico com o passar dos dias de crescimento, concluindo assim que o metabolismo se diferencia apenas nos primeiros dias de crescimento. O fungo também foi cultivado em água do mar, mas o rendimento em massa de extrato não foi relevante quando comparado com seu crescimento em água ultra pura, bem como o seu perfil químico.

No intuito de promover uma maior quimiodiversidade, fez-se a alteração dos parâmetros de cultivo da linhagem fúngica, pode-se notar variação no perfil químico, não só entre os diferentes experimentos realizados, mas principalmente quando comparado os resultados com os obtidos na curva de crescimento, observando uma mudança em seu metabolismo quando crescido sob influências externas, evidenciando grande relevância na busca de melhores condições de cultivo.

A partir dos extratos obtidos, realizou-se o isolamento de duas substâncias (Frc12 e F10.7.2) e, através das análises de RMN (uni e bidimensionais), juntamente com o massas de alta resolução, foi possível propor a estrutura química para a substância F10.7.2, nomeada como Hypoxepinona A, ou, seguindo as normas da IUPAC, 2,8,10,10-tetraidroxi-6,10-diidro-5H-fluoreno[4,5-bcd]oxepin-5-ona, uma lactona tetracíclica tetraidroxilada. A partir de uma busca feita nos principais bancos de dados, pode-se concluir que a substância ainda não foi relatada na literatura.

Os extratos obtidos foram submetidos à ensaios antibacteriano, citotóxico, antifúngico e larvicida, visando um estudo biológico mais aprofundado da linhagem fúngica, já que não há tantos estudos relacionados na literatura, pode-se verificar que os extratos apresentaram potencial citotóxico significativo. Quando testados a uma concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentaram atividade inibitória contra linhagem de carcinoma colorretal humano (HCT116), sendo que o extrato Ext05 apresentou porcentagem de inibição acima de 96%, $\text{IC}_{50} = 0,38$

µM com relação ao controle positivo de doxorubicina. Dentre todas as amostras testas, apenas o extrato Ext.07 apresentou citotoxicidade contra células de câncer de mama humano (MCF7) acima de 80% de inibição, o que gera um interesse futuro estudar os metabólitos presentes neste extrato. Quando testado a substância isolada Frc12, a mesma apresentou inibição de aproximadamente 95% contra a linhagem de HCT116 e quando testada contra linhagem de MCF7 a mesma não apresentou citotoxicidade elevado, o que evidencia a seletividade da substância contra diferentes tipos de câncer.

Os resultados obtidos evidenciam a importância no estudo de produtos naturais visando sua utilização na descoberta de extratos e substâncias naturais capazes de atuar no tratamento de doenças ou como protótipos para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Neste sentido, este trabalho demonstrou o potencial citotóxico dos extratos, evidenciando a importância de estudos adicionais com o fungo *Hypomontagnella monticulosa* visando melhor entendimento de suas propriedades biológicas. De forma mais ampla, este trabalho contribuiu também para a percepção da importância de estudos mais aprofundados acerca do metabolismo do fungo, e eventuais interações mediadas por produtos de seu metabolismo secundário, e potenciais impactos no ponto de vista ecológico, bem como para ações de conservação e exploração sustentável do bioma marinho. Este contexto, permite, assim, verificar a relevância deste trabalho por contemplar diretamente metas dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável, com destaque para os ODS 14, relacionados à conservação e uso sustentável dos oceanos, doas mares e dos recursos marinhos para o desenvolvimento sustentável: ODS 3, visando saúde e bem estar, considerando o potencial relevante de descoberta de novos produtos naturais bioativos a partir de fungos do bioma marinho, em função de sua marcante quimiodiversidade; além dos ODS 4, que buscam assegurar a educação inclusiva, de qualidade e promover oportunidade de aprendizagem, e ODS 17, voltados a fortalecer os meios de implementação e revitalizar a parceria global para o desenvolvimento sustentável.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANAND, J. et al. Bioactive potential and composition analysis of sulfated polysaccharide from *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borgeson. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, n. 2017, p. 1238–1244, 2018.
- ANDRIAMAHARAVO, N.R. Retention Data. NIST Mass Spectrometry Data Center., NIST Mass Spectrometry Data Center, 2014.
- ANTONIO, M. et al. O Uso De Macroalgas Marinhas Na Agricultura. **Acta Iguazu**, v. 3, n. 2, p. 69–76, 2014.
- BERLINCK, R. G. S. Bioprospecção no Brasil: um breve histórico. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, p. 27–30, 2012.
- BERLINCK, R. G. S. et al. The chemistry of natural products in Brazil in the XXI century. **Quimica Nova**, v. 40, n. 6, p. 706–710, 2017.
- BHATNAGAR, I.; KIM, S. K. Marine antitumor drugs: status, shortfalls and strategies. **Marine drugs**, v. 8, n. 10, p. 2702-2720, 2010.
- BLUNT, J. W. et al. Marine Natural Products. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 2, p. 170-244, 2009.
- BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 382–431, 2016.
- BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 35, n. 1, p. 8–53, 2018.
- BRAMHACHARI, P. V. et al. Secondary Metabolites from Marine Endophytic Fungi: Emphasis on Recent Advances in Natural Product Research. In: SINGH, B. P. Advances in Endophytic Fungal Research. **Fungal Biology: Springer Nature Switzerland AG**, p. 339-350, 2019.
- BUGD, L., CUPERTINI, P., WOLF, T., TREICHEL, H. Use of Algae Biomass As a Biosorbent for the Removal of Heavy Metals: **Ciatec**, v. 10, n. 1, p. 53– 67, 2018.
- CABRITA, M. T.; VALE, C.; RAUTER, A. P. Halogenated compounds from marine algae. **Marine Drugs**, v. 8, n. 8, p. 2301–2317, 2010.

CARROLL, A. R. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 37, n. 2, p. 175–223, 2020.

CARROLL, A. R. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 38, n. 2, p. 362–413, 2021.

CARROLL, A. R. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 39, n. 2, 2022.

CHENG, M. J. et al. Metabolites from the Endophytic Fungus *Hypoxyton monticulosum*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 56, n. 6, p. 1170–1172, 2020.

Clinical & Laboratory Standards Institute: CLSI Guidelines. M27-A3: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, 2008.

DAI, J. et al. Curvularin-type metabolites from the fungus *Curvularia* sp. isolated from a marine alga. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 36, p. 6928–6937, 2010.

EMERY, F. S. et al. A química na natureza. **Sociedade Brasileira de Química**, São Paulo, 2013.

FENICAL, W.; PAUL, V. J. Antimicrobial and cytotoxic terpenoids from tropical green algae of the family Udoteaceae. **Hydrobiologia**, v. 116–117, n. 1, p. 135–140, 1984.

FOLMER, F. et al. Photosynthetic marine organisms as a source of anticancer compounds. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 4, p. 557–579, 2010.

FORSYTHE, P.; PATERSON, S. Ciclosporin 10 years on: Indications and efficacy. **Veterinary Record**, v. 174, n. SUPPL.2, p. 13–21, 2014.

GAO, S. S. et al. Conidiogenones H and I, two new diterpenes of cyclopiane class from a marine-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. **Chemistry and Biodiversity**, v. 8, n. 9, p. 1748–1753, 2011a.

GAO, S. S. et al. Secondary metabolites from a marine-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. **Marine Drugs**, v. 9, n. 1, p. 59–70, 2011b.

GAO, S. S. et al. Penicisteroids A and B, antifungal and cytotoxic polyoxygenated steroids from the marine alga-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 10, p. 2894–2897, 2011c.

GOGINENI, V. et al. Role of symbiosis in the discovery of novel antibiotics. **Journal of Antibiotics**, v. 73, n. 8, p. 490–503, 2020.

GUIMARÃES, L. F. L.; COLLINS, C. H. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Introdução à Métodos Cromatográficos. Campinas, SP: **Editora da UNICAMP**, 1997. p. 183-238.

GUIRY, M. D. How many species of algae are there? **Journal of Phycology**, v. 48, n. 5, p. 1057–1063, 2012.

GÜVEN, K. C.; PERCOT, A.; SEZIK, E. Alkaloids in marine algae. **Marine Drugs**, v. 8, n. 2, p. 269–284, 2010.

HASAN, S. et al. Major bioactive metabolites from marine fungi: A Review. **Bioinformation**, v. 11, n. 4, p. 176–181, 2015.

HELALY, S. E.; THONGBAI, B.; STADLER, M. Diversity of biologically active secondary metabolites from endophytic and saprotrophic fungi of the ascomycete order Xylariales. **Natural Product Reports**, v. 35, n. 9, p. 992–1014, 2018.

HONÓRIO, A. E. Avaliação química e biológica de fungos endofíticos associados a algas marinhas *Acanthophora spicífera*, *Dichotomaria marginata* e *Sargassum vulgare*. 2018. 267 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

ISIDOROV, V. A.; KOTOWSKA, U.; VINOGOROVA, V. T. GC identification of organic compounds based on partition coefficients of their TMS derivatives in a hexane-acetonitrile system and retention indices. **Analytical Sciences**, v. 21, n. 12, p. 1483–1489, 2005.

ISIDOROV, V. A. et al. Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of metabolites from the needles and roots of pine seedlings at early stages of pathogenic fungi *Armillaria ostoyae* attack. **Trees - Structure and Function**, v. 22, n. 4, p. 531–542, 2008.

JAROSZYŃSKA, J. Isolation of free phenolic compounds from arboreal leaves by use of the Florisil/C18 system. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 377, n. 4, p. 702–708, 2003.

JU, Y. M.; ROGERS, J. D. A Revision of the Genus *Hypoxylon*. [Mycologia Memoir, n. 20]. **American Phytopathological Society**, St Paul. p. 1-365, 1996.

KIM, S. K.; WIJESEKARA, I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 1, p. 1–9, 2010.

KUMAR, N. et al. Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview. **Talanta**, v. 123, p. 186–199, 2014.

KURIAKOSE, G. C. et al. Sub-acute Toxicity Assessment of Taxol Isolated From *Fusarium Solani*, an Endophytic Fungus of *Taxus Brevifolia*, in Wistar Rats and Analyzing Its Cytotoxicity and Apoptotic Potential in Lung Cancer Cells. **Frontiers in Oncology**, v. 10, n. October, p. 1–12, 2020.

LAMBERT, C. et al. *Hypomontagnella* (Hypoxylaceae): a new genus segregated from *Hypoxylon* by a polyphasic taxonomic approach. **Mycological Progress**, v. 18, n. 1, p. 187-201, 2018.

LEMAN-LOUBIÈRE, C. et al. Sporothriolide-Related Compounds from the Fungus *Hypoxylon monticulosum* CLL-205 Isolated from a *Sphaerocladina* Sponge from the Tahiti Coast. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 10, p. 2850–2854, 2017a.

LEMAN-LOUBIÈRE, C. et al. Sporochartines A-E, a new family of natural products from the marine fungus *Hypoxylon monticulosum* isolated from a *Sphaerocladina* sponge. **Frontiers in Marine Science**, v. 4, n. DEC, p. 1–9, 2017b.

MAHAJAN, S. S.; GODDIK, L.; QIAN, M. C. Aroma compounds in sweet whey powder. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 12, p. 4057–4063, 2004.

MANGANYI, M. C. et al. Biodiversity and antibacterial screening of endophytic fungi isolated from *Pelargonium sidoides*. **South African Journal of Botany**, v. 116, p. 192– 199, 2018.

MASSART, D. L. et al. Data Handling in Science and Technology. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 38, n. 6, p. 1254–1254, 1998.

MCKENNA, A. M. et al. Unprecedented ultrahigh resolution FT-ICR mass spectrometry and parts-per-billion mass accuracy enable direct characterization of nickel and vanadyl porphyrins in petroleum from natural seeps. **Energy and Fuels**, v. 28, n. 4, p. 2454– 2464, 2014.

MEDEIROS, P. M.; SIMONEIT, B. R. T. Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1141, n. 2, p. 271–278, 2007.

MIRANDA, C. V.; COSTA ALMEIDA, R. A importância do farmacêutico na dispensação e controle de medicamentos classificados como antimicrobianos. **Saúde multidisciplinar**, p. 1–12, 2020.

MISHRA, V. K. et al. Determination and production of antimicrobial compounds by *Aspergillus clavatonanicus* strain MJ31, an endophytic fungus from *Mirabilis jalapa* L. using UPLC-ESI-MS/MS and TD-GC-MS analysis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, p. 1–24, 2017.

MOLINSKI, T. F. NMR of natural products at the “nanomole-scale”. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 3, p. 321–329, 2010.

MOSMANN, Tim. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65 p. 55-63, 1983.

OLIVEIRA, A. L. Algas e micro-organismos como fonte de substâncias bioativas: química e biologia de *Bostrychia radicans* e fungos endofíticos associados. 2013. 206 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

PAMPFILE, J. A. et al. Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: o caso do *Colletotrichum* sp. **Revista UNINGÁ**, v. 53, n. 1, p. 113–119, 2017.

PENNA, T. C.; CORRERA, T. C. Técnicas avançadas para a identificação de isômeros por espectrometria de massas. **Química Nova**. V. 45, n. 8, p. 1125-1137, 2020.

PEREIRA-FILHO, E.R. Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados. São Carlos (SP): Edufscar; 2015.

PEREIRA, J. C. et al. Potencial alelopático e identificação dos metabólitos secundários em extratos de *Canavalia ensiformis* L. **Revista Ceres**, v. 65, n. 3, p. 243–252, 2018.

PEI-GEN, X., SHAN-LIN, F. Traditional antiparasitic drugs in China. **Parasitol Today**, v. 2, p. 353–355, 1986.

POMPONI, S. A. The bioprocess-technological potential of the sea. **Progress in Industrial Microbiology**, v. 35, n. C, p. 5–13, 1999.

QIAO, M. F. et al. Indoloditerpenes from an algicolous isolate of *Aspergillus oryzae*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 19, p. 5677–5680, 2010.

RAMAKRISHNAN, V.; LUTHRIA, D. L. Recent applications of NMR in food and dietary studies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 1, p. 33–42, 2017.

RAMAKRITINAN, C. M. et al. MAA-Palythine Compound of Three Red (Macro) Algae: *Gelidiella acerosa*, *Acanthophora spicifera* and *Hypnea musciformis* of Gulf of Mannar, Southeast Coast of India. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 7, p. 607–615, 2017.

RIGHETTI, L. et al. High resolution-ion mobility mass spectrometry as an additional powerful tool for structural characterization of mycotoxin metabolites. **Food Chemistry**, v. 245, n. December 2017, p. 768–774, 2018.

RUIZ-TORRES, V. et al. An updated review on marine anticancer compounds: The use of virtual screening for the discovery of small-molecule cancer drugs. **Molecules**, v. 22, n. 7, 2017.

SACCHI, R.; PAOLILLO, L. NMR for Food Quality and Traceability. *Advances in Food Diagnostics*, p. 101–117, 2007.

SAKAI, R. et al. Cellular and subcellular localization of kainic acid in the marine red alga *Digenea simplex*. **Cell and Tissue Research**, v. 322, n. 3, p. 491–502, 2005.

SÁNCHEZ-BALLESTEROS, J. et al. Phylogenetic study of *Hypoxylon* and related genera based on ribosomal ITS sequences. **Mycologia**, v. 92, n. 5, p. 964–977, 2000.

SARASAN, M. et al. Marine algicolous endophytic fungi-a promising drug resource of the era. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 1039–1052, 2017.

SEIDL, C. et al. A novel on-flow mass spectrometry-based dual enzyme assay. **Analytica Chimica Acta**, v. 1072, p. 81–86, 2019.

SHEU, J. H. et al. Study on cytotoxic oxygenated desmosterols isolated from the red alga *Galaxaura marginata*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 9, p. 900–903, 1997.

SMIT, A. J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. **Journal of Applied Phycology**, v. 16, n. 4, p. 245–262, 2004.

STADLER, M. Importance of secondary metabolites in the Xylariaceae as parameters for. **Current Research in Environmental & Applied Mycology**, v. 1, n. 2, p. 75–133, 2011.

STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endop. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214–6, 1993.

SURUP, F. et al. Sporothriolide derivatives as chemotaxonomic markers for *Hypoxylon monticulosum*. **Mycology**, v. 5, n. 3, p. 110–119, 2014.

TEIXEIRA, V. L. Marine natural products from seaweeds. **Revista Virtual de Quimica**, v. 5, n. 3, p. 343–362, 2013.

THOMFORD, N. E. et al. Natural products for drug discovery in the 21st century: Innovations for novel drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, 2018.

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. April 2019, p. 112338, 2020.

TRET'YAKOV, K.V. Retention Data. NIST Mass Spectrometry Data Center., NIST Mass Spectrometry Data Center, 2007.

TRET'YAKOV, K.V. Retention Data (March 2011). NIST Mass Spectrometry Data Center., NIST Mass Spectrometry Data Center, 2011.

VANZOLINI, K. L. et al. Acetylcholinesterase Immobilized Capillary Reactors–Tandem Mass Spectrometry: An On-Flow Tool for Ligand Screening. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, p. 2038–2044, 2013.

WANG, S. et al. Chaetopyranin, a benzaldehyde derivative, and other related metabolites from *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus derived from the marine red alga *Polysiphonia urceolata*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 11, p. 1622–1625, 2006.

WANG, Y. et al. Current state of the art of mass spectrometry-based metabolomics studies - a review focusing on wide coverage, high throughput and easy identification. **RSC Advances**, v. 5, n. 96, p. 78728–78737, 2015.

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.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S. K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 14–21, 2011.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 5, p. 753–771, 2006.

ZHANG, P.; LI, X.; WANG, B. G. Secondary Metabolites from the Marine Algal-Derived Endophytic Fungi: Chemical Diversity and Biological Activity. **Planta Medica**, v. 82, n. 9–10, p. 832–842, 2016.

ZHAO, C. X. et al. Temperature-programmed retention indices for gas chromatography-mass spectroscopy analysis of plant essential oils. **Journal of Chromatography A**, v. 1096, n. 1–2, p. 76–85, 2005.

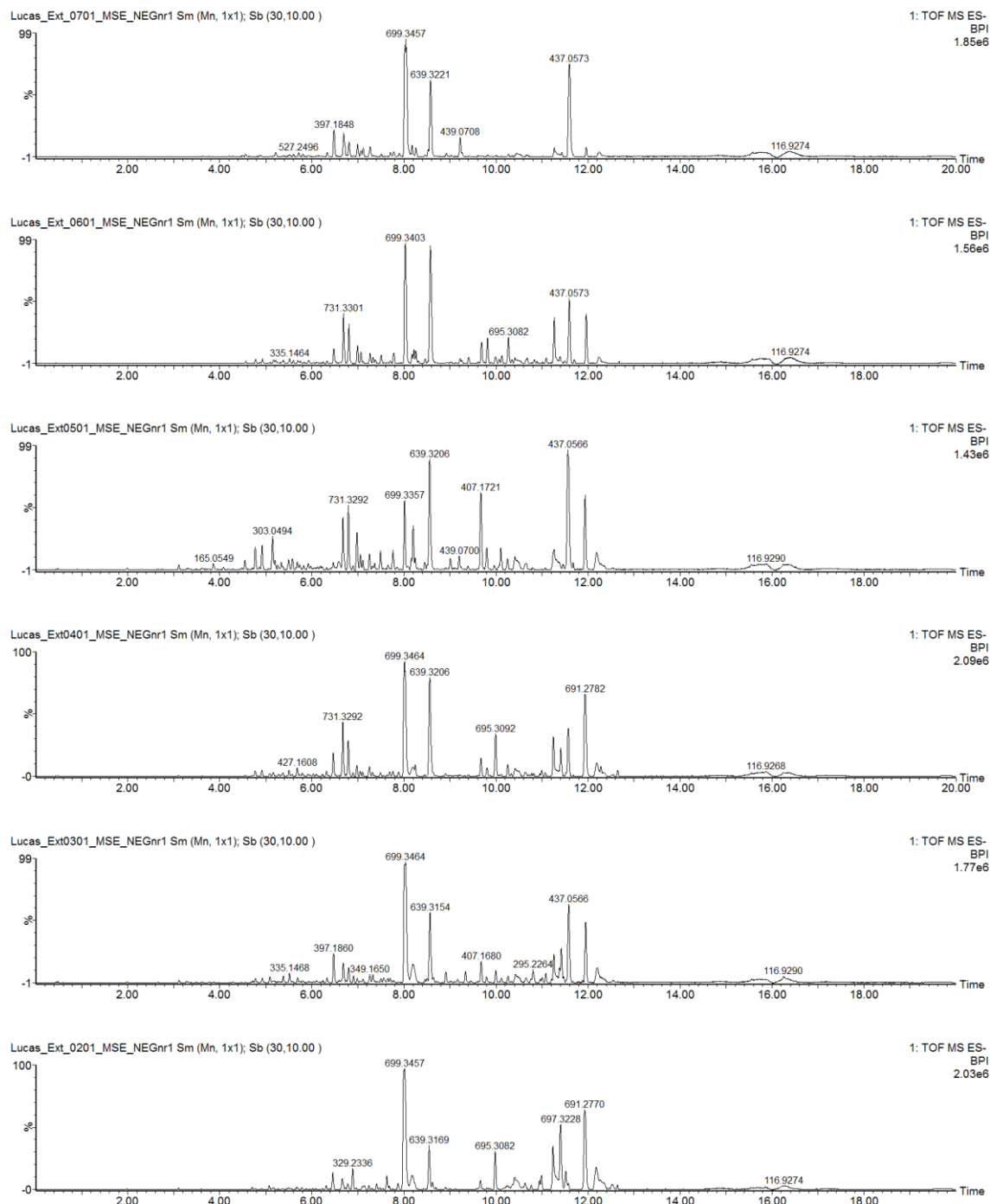
ZHAO, Y. et al. Extraction, preparation and identification of volatile compounds in Changyu XO brandy. **Chinese Journal of Chromatography (Se Pu)**, v. 26, n. 2, p. 212–222, 2008.

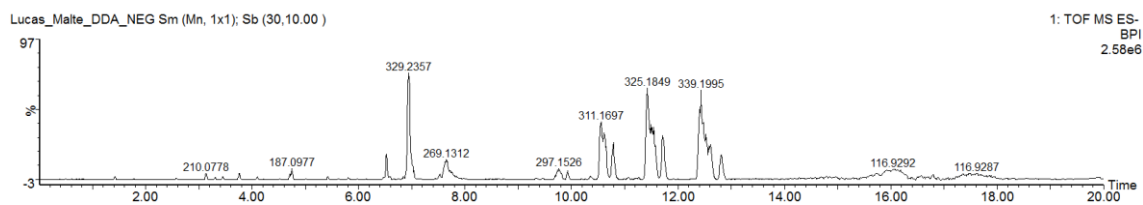
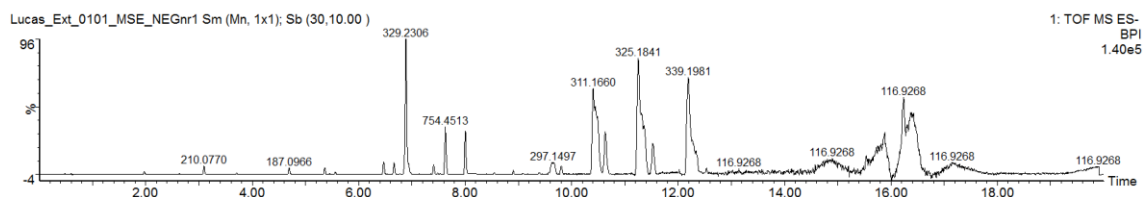
ZHAO, H. G. et al. Optimization of culture conditions for penicilazaphilone C production by a marine-derived fungus *Penicillium sclerotiorum* M-22. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 222–230, 2018.

ZHU, N. et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 2020

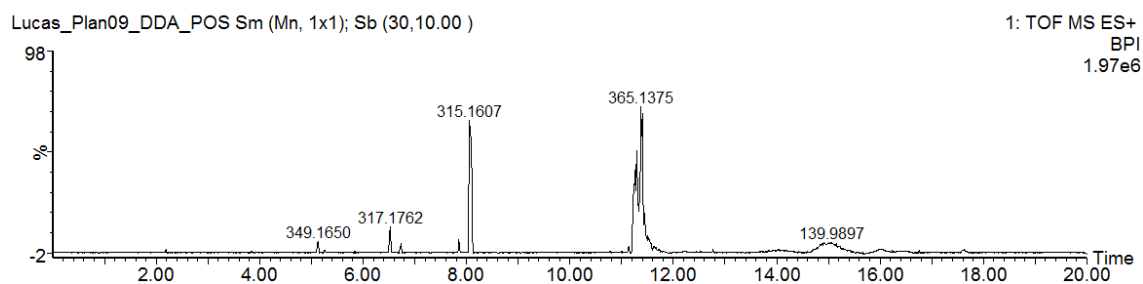
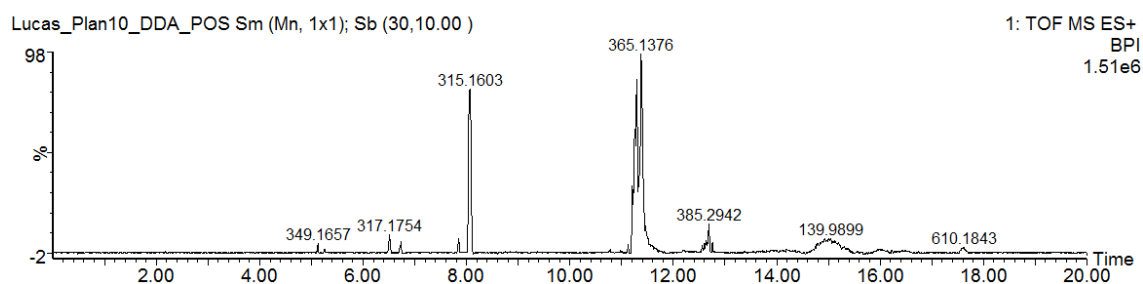
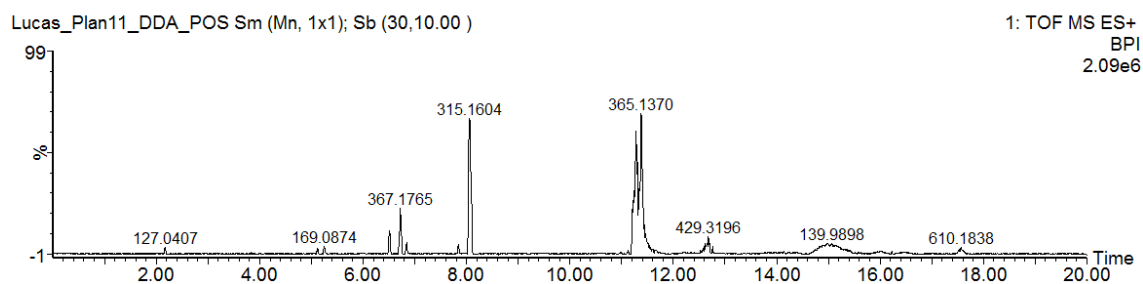
APÊNDICES

APÊNDICE A – Cromatogramas dos extratos da curva de crescimento em gradiente exploratório por UPLC-ESI-QqTOF-MS/MS em modo negativo

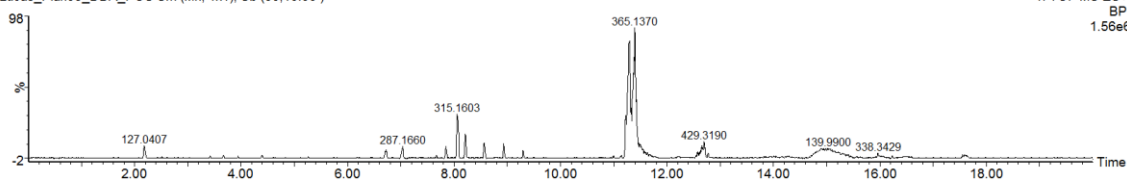




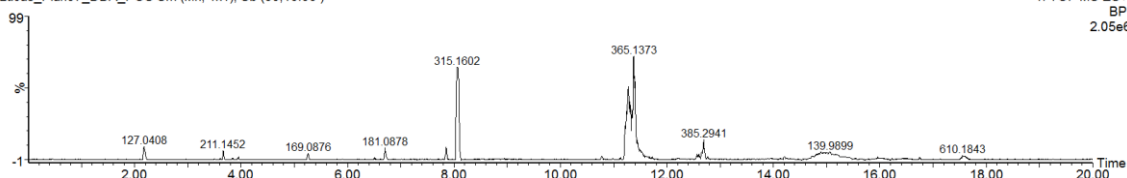
APÊNDICE B – Cromatogramas dos extratos do planejamento experimental em gradiente exploratório por UPLC-ESI-QqTOF-MS/MS em modo positivo



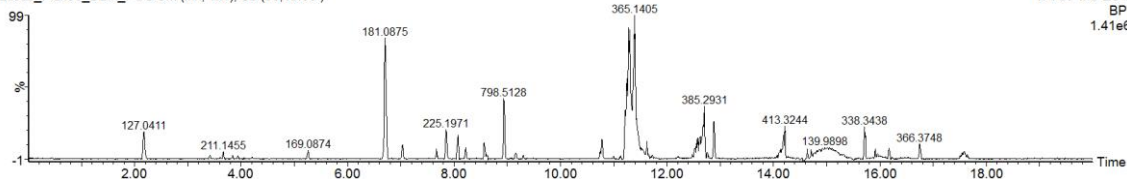
Lucas_Plan08_DDA_POS Sm (Mn, 1x1); Sb (30,10.00)



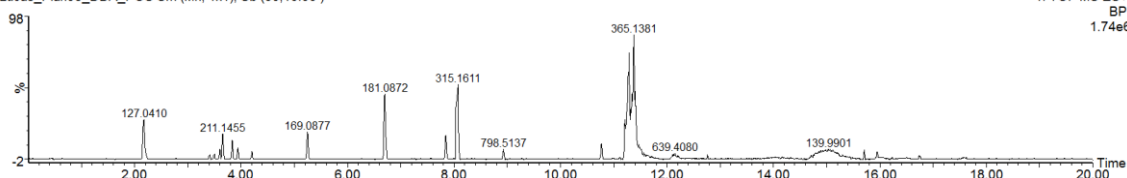
Lucas_Plan07_DDA_POS Sm (Mn, 1x1); Sb (30,10.00)



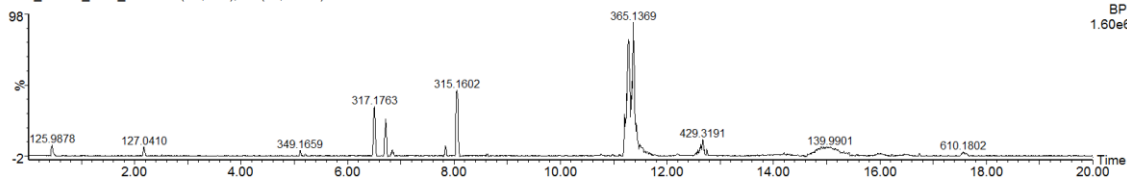
Lucas_Plan06_DDA_POS Sm (Mn, 1x1); Sb (30,10.00)



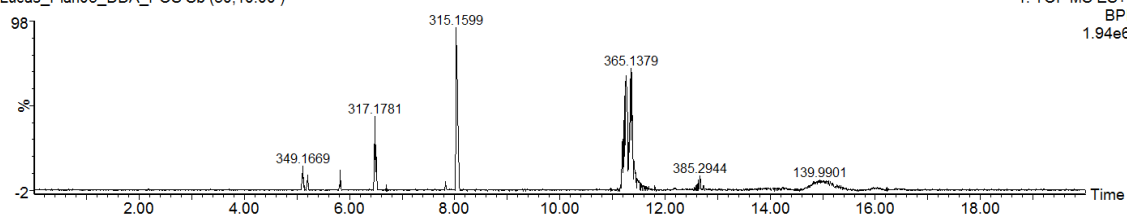
Lucas_Plan05_DDA_POS Sm (Mn, 1x1); Sb (30,10.00)

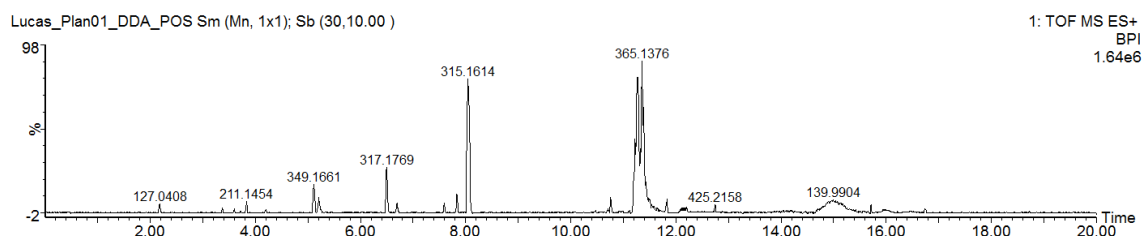
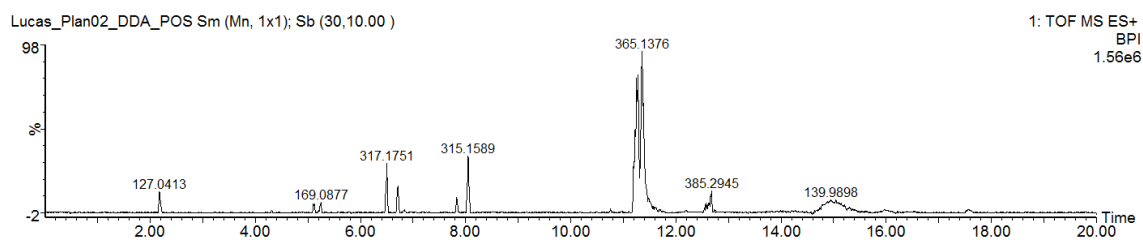


Lucas_Plan04_DDA_POS Sm (Mn, 1x1); Sb (30,10.00)

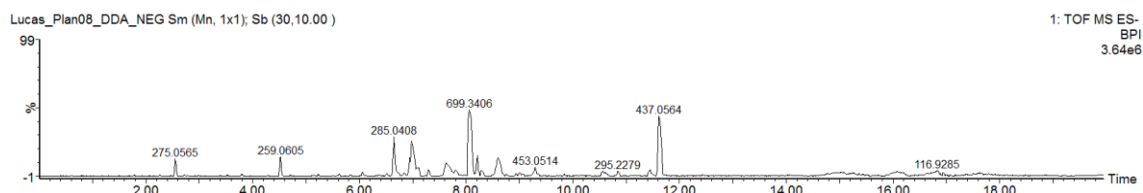
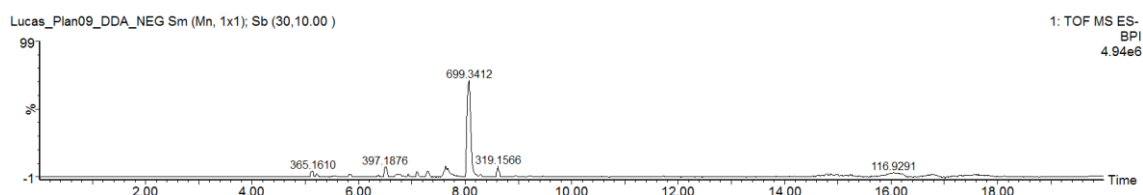
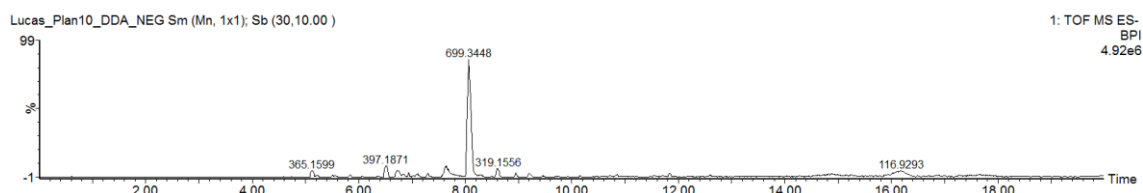
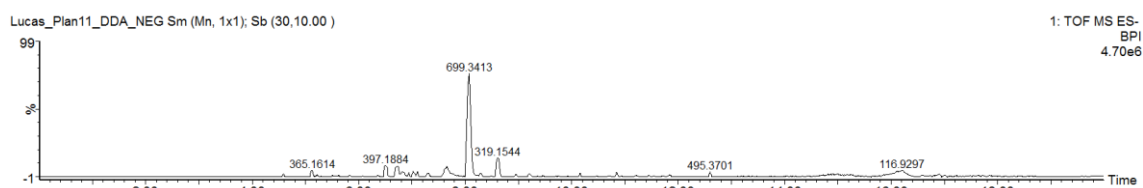


Lucas_Plan03_DDA_POS Sb (30,10.00)

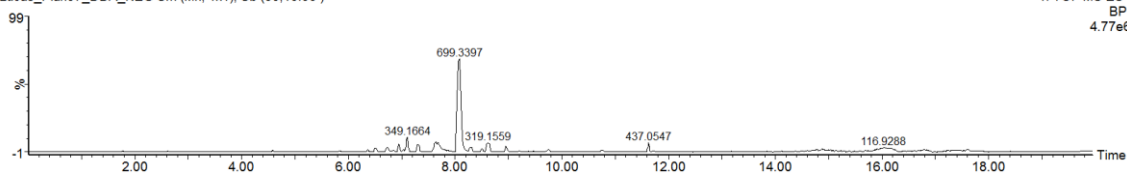




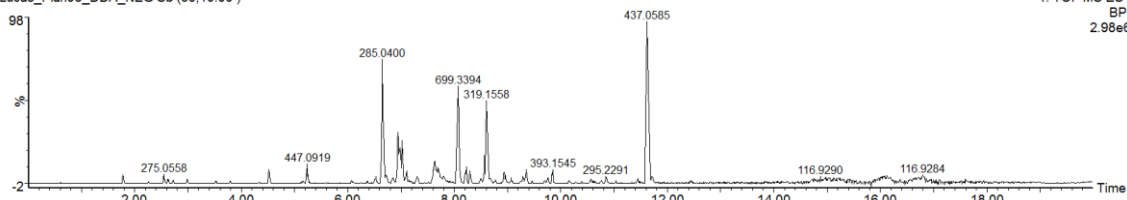
APÊNDICE C – Cromatogramas dos extratos do planejamento experimental em gradiente exploratório por UPLC-ESI-QqTOF-MS/MS em modo negativo



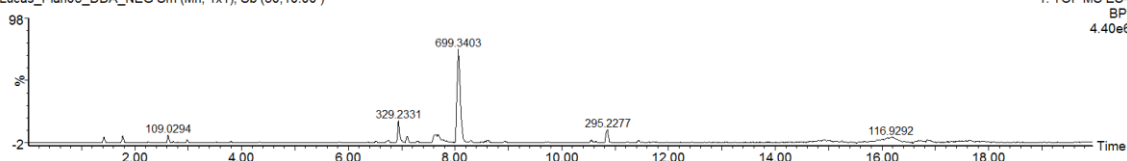
Lucas_Plan07_DDA_NEG Sm (Mn, 1x1); Sb (30,10.00)



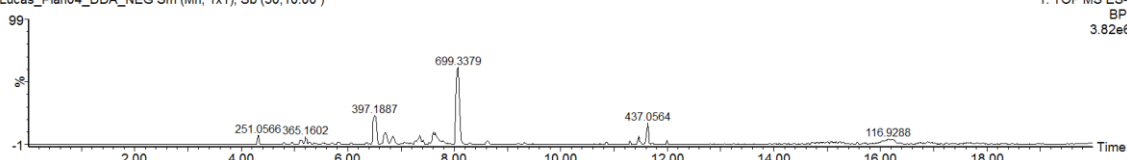
Lucas_Plan06_DDA_NEG Sb (30,10.00)



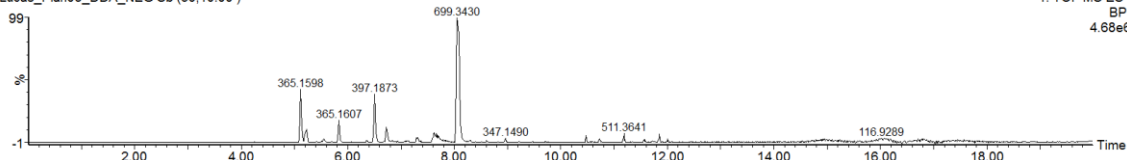
Lucas_Plan05_DDA_NEG Sm (Mn, 1x1); Sb (30,10.00)



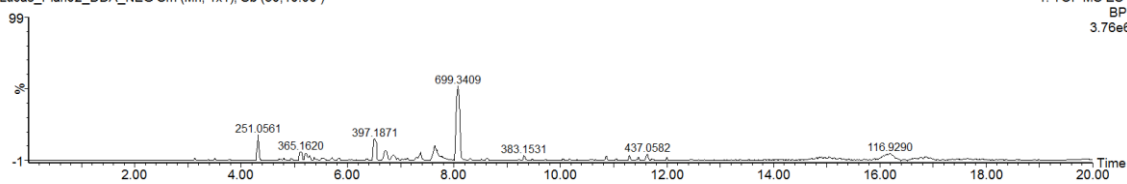
Lucas_Plan04_DDA_NEG Sm (Mn, 1x1); Sb (30,10.00)



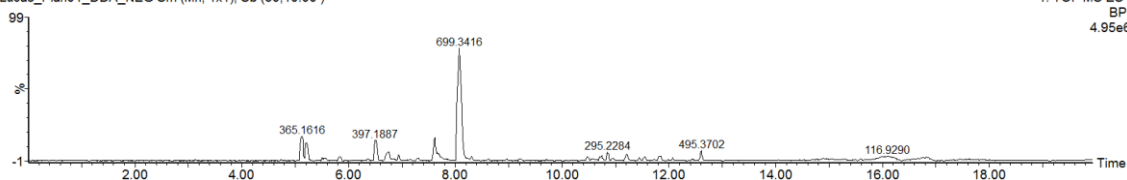
Lucas_Plan03_DDA_NEG Sb (30,10.00)



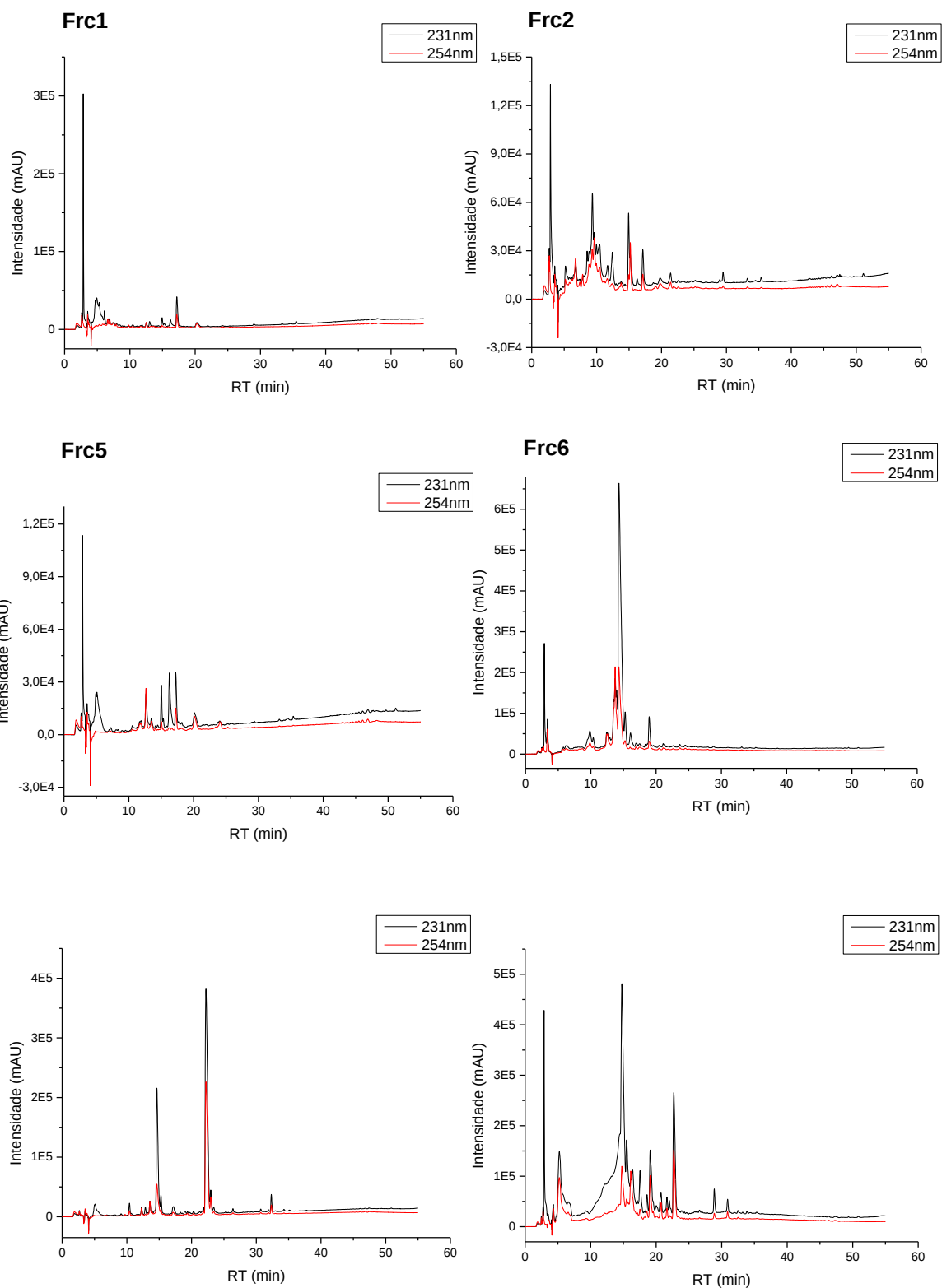
Lucas_Plan02_DDA_NEG Sm (Mn, 1x1); Sb (30,10.00)

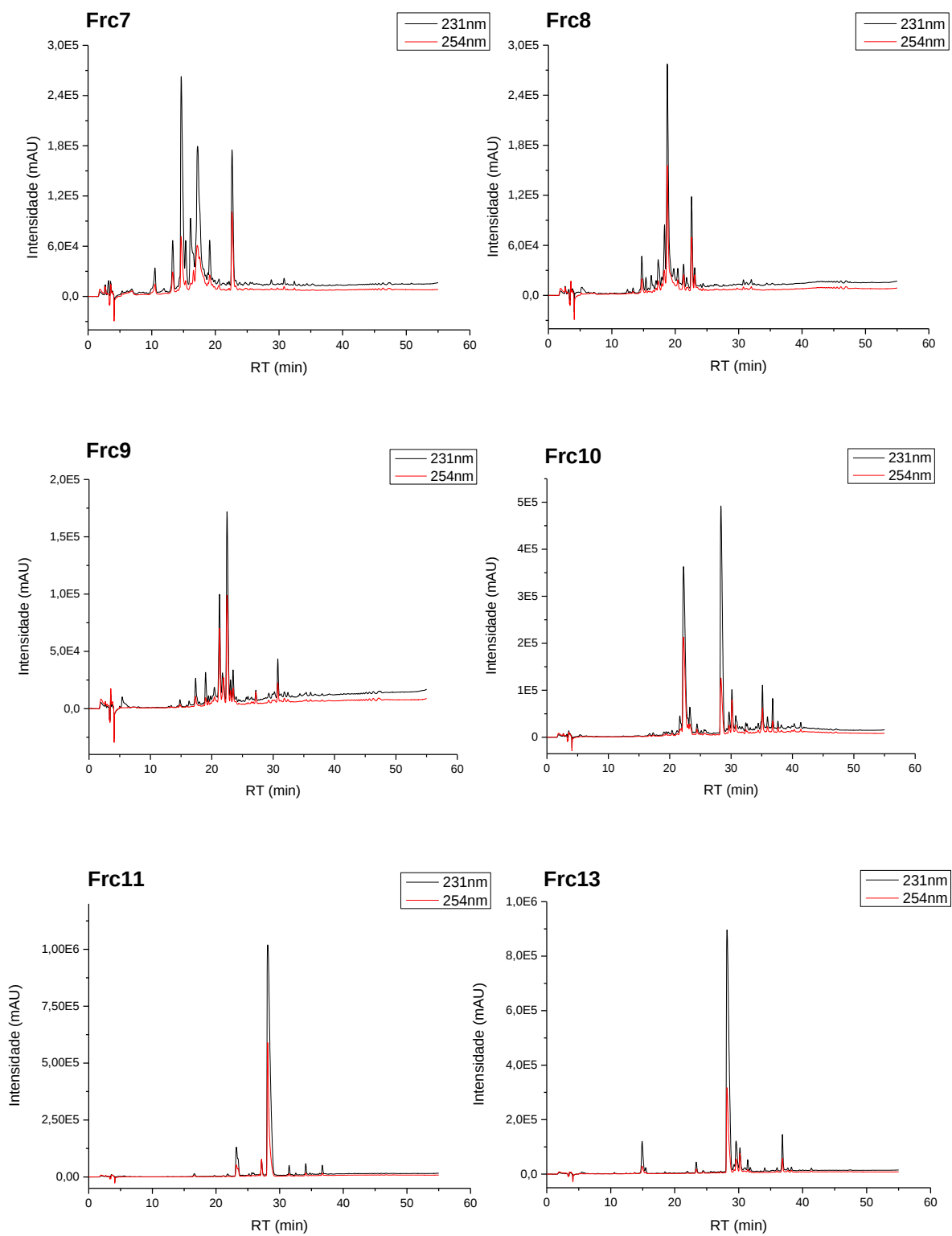


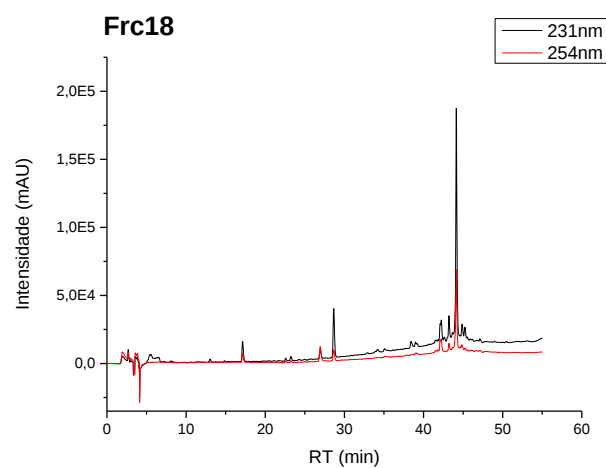
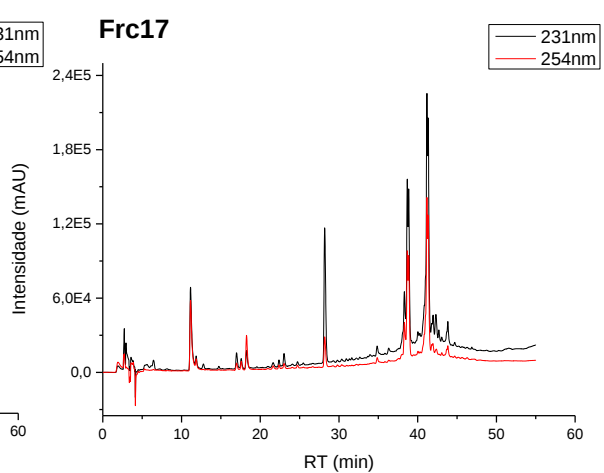
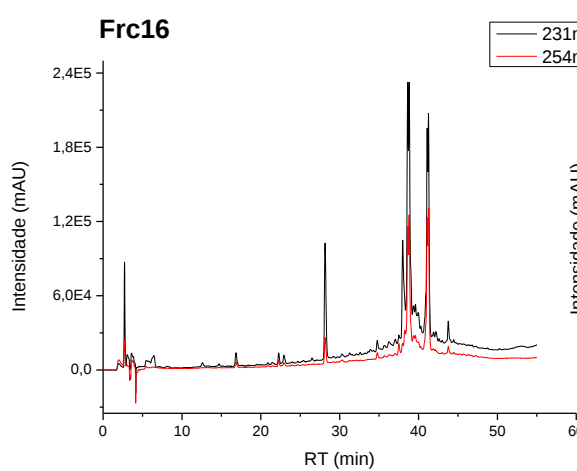
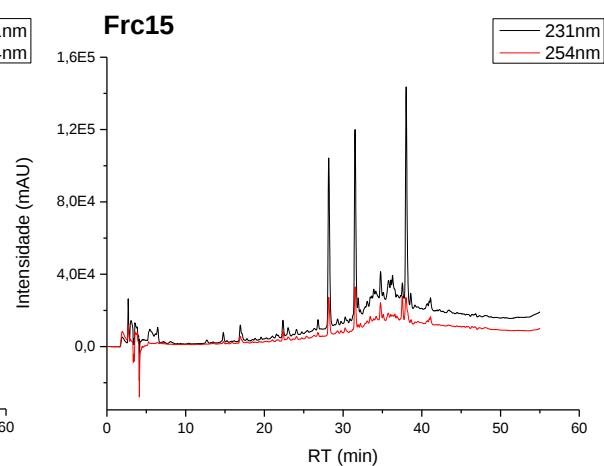
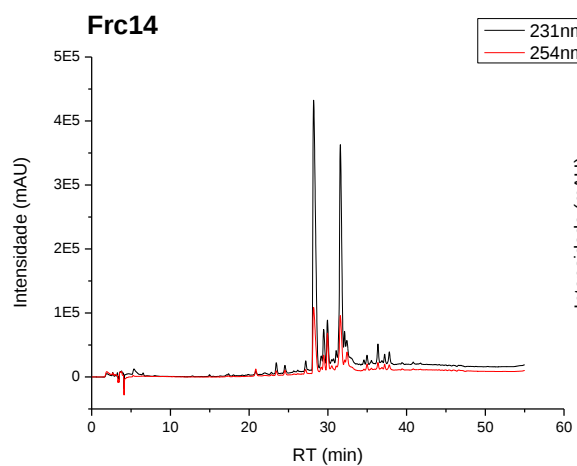
Lucas_Plan01_DDA_NEG Sm (Mn, 1x1); Sb (30,10.00)



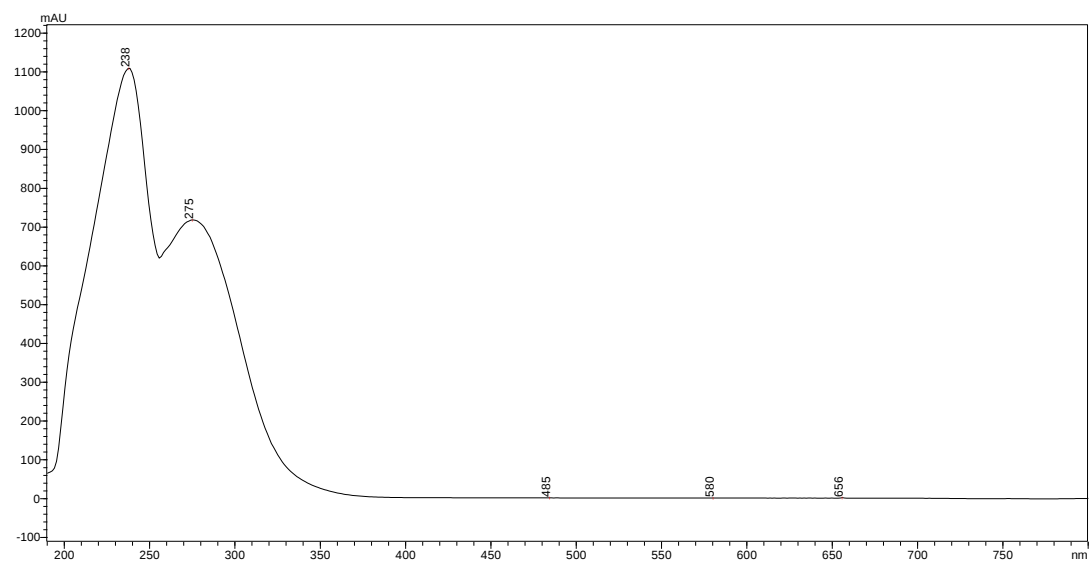
APÊNDICE D – Cromatogramas das frações obtidas a partir do extrato Ext.pl.10 por HPLC-DAD em modo gradiente 44-100% (MeOH/H₂O) em 45 min





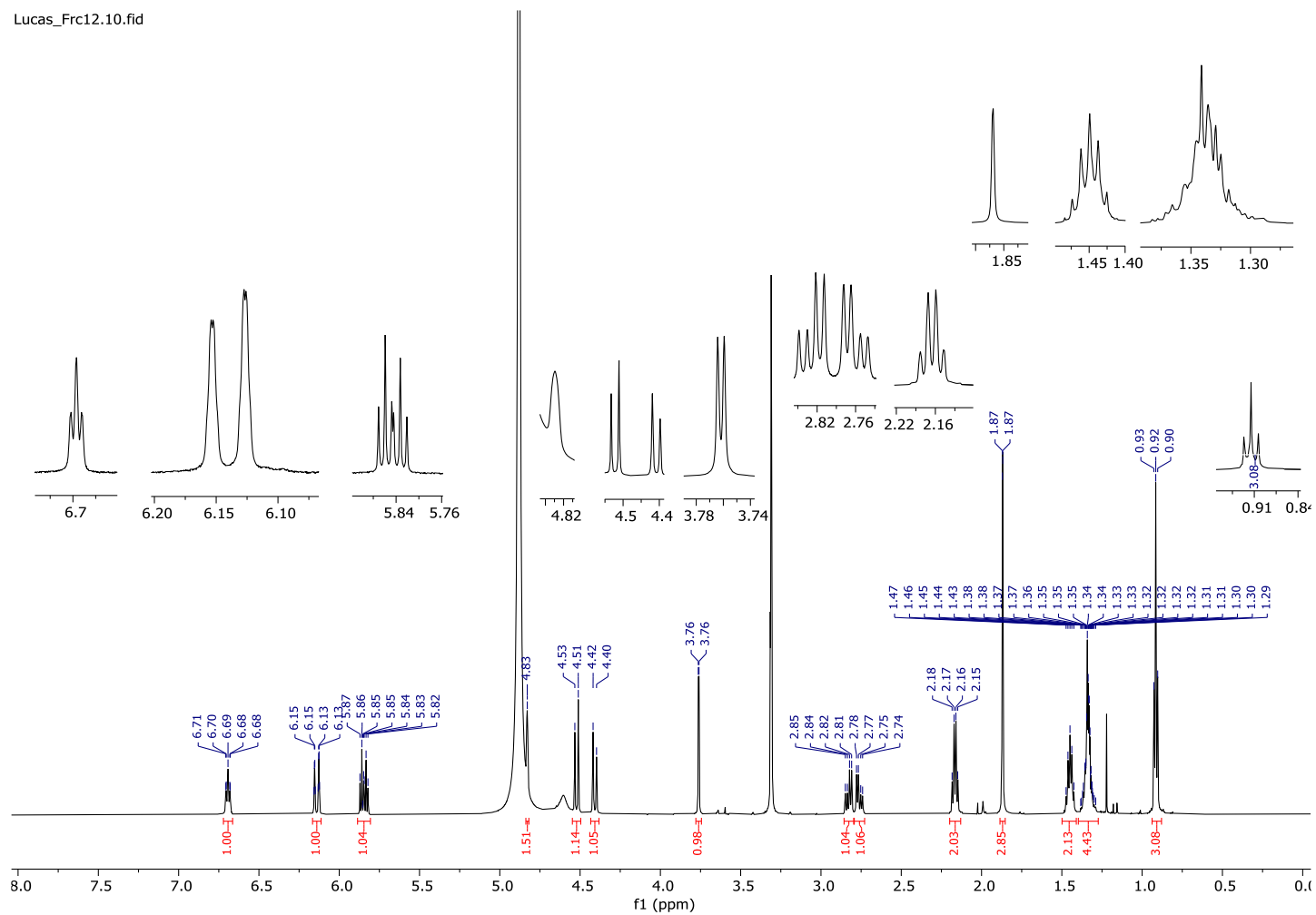


APÊNDICE E - Espectro de UV da substância Frc12 isolada



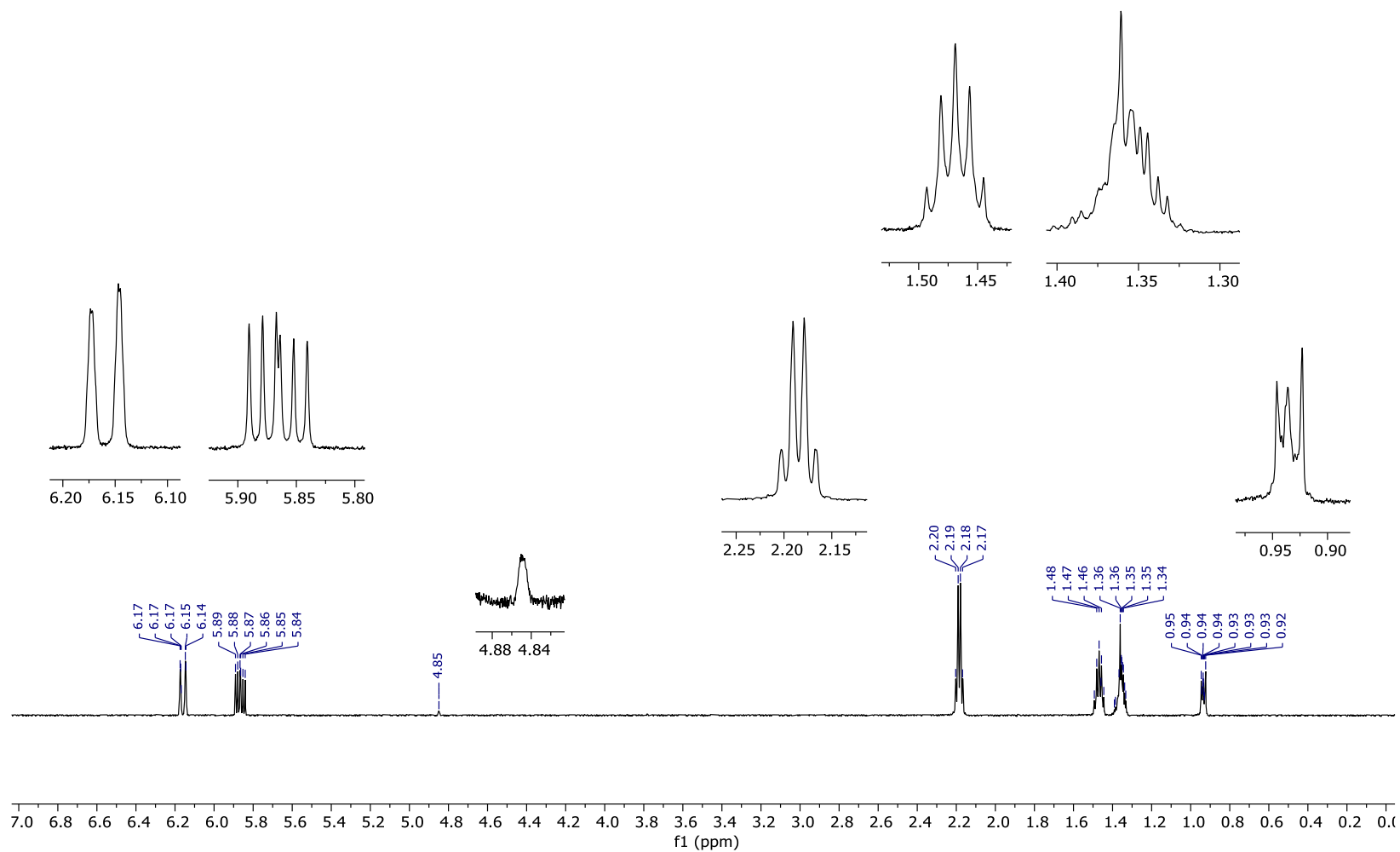
APÊNDICE F – Espectros de RMN da substância Frc12 isolada

Lucas_Frc12.10.fid

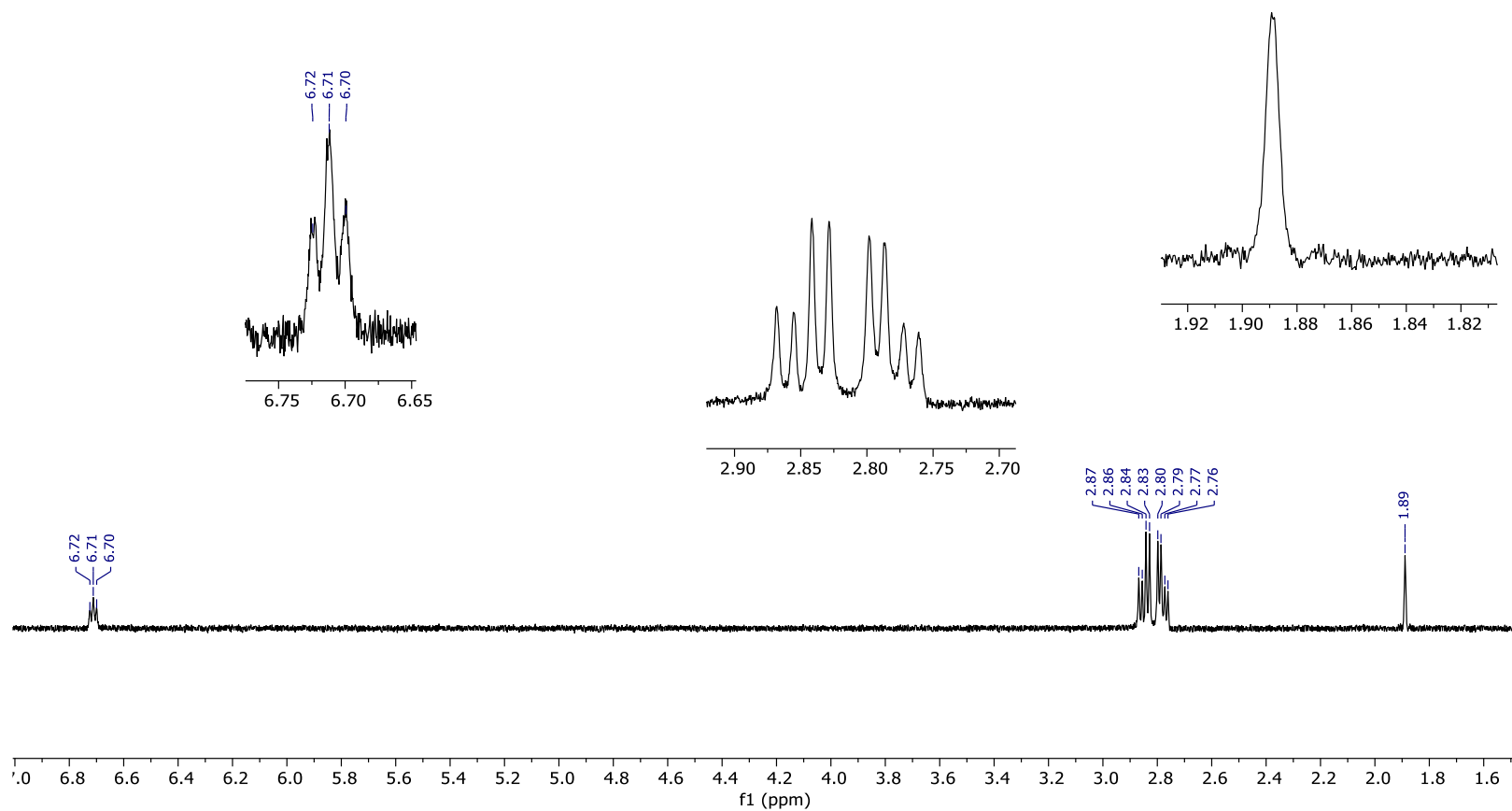


Espectro de ^1H

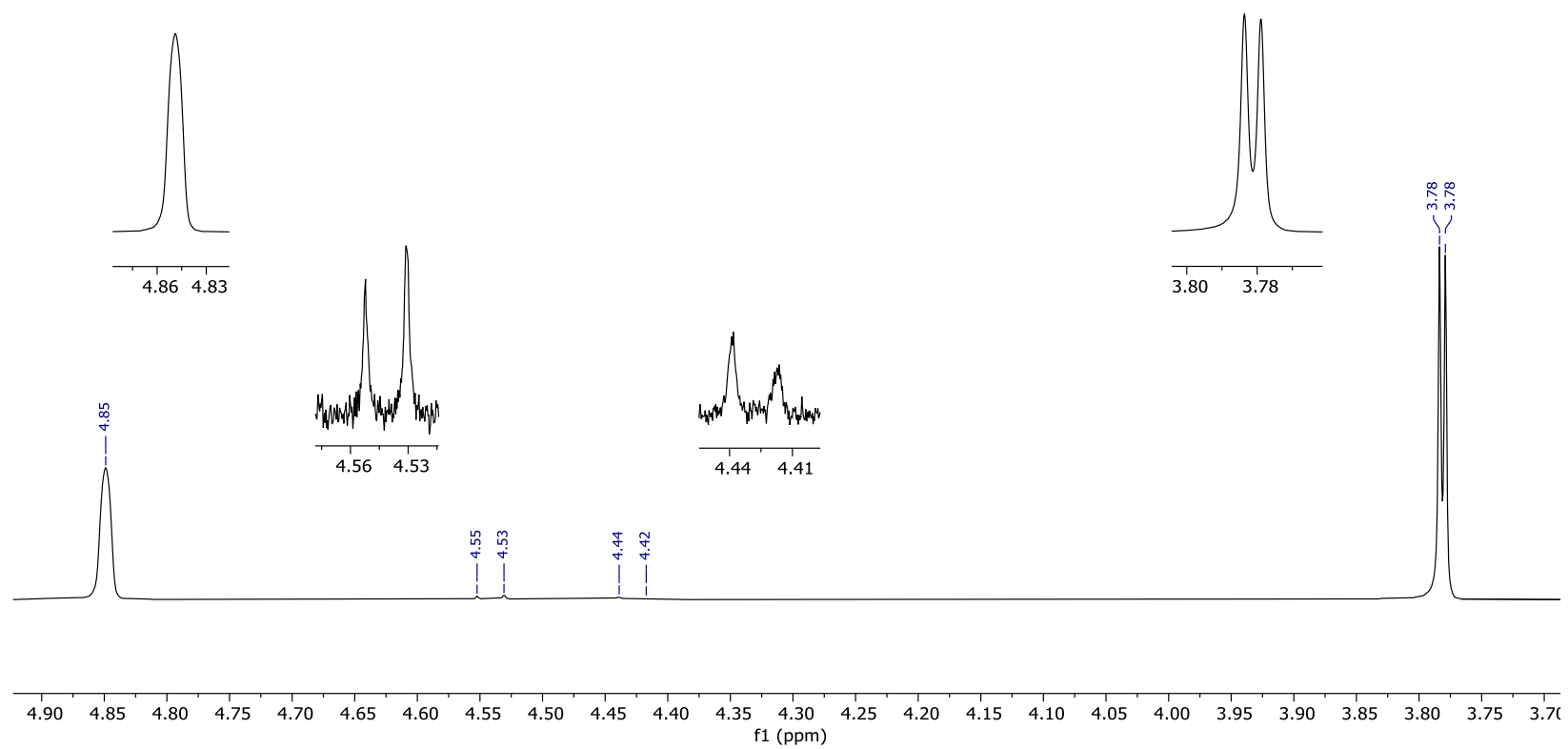
Lucas_Frc12.11.fid
tocsy1d 2.185 ppm



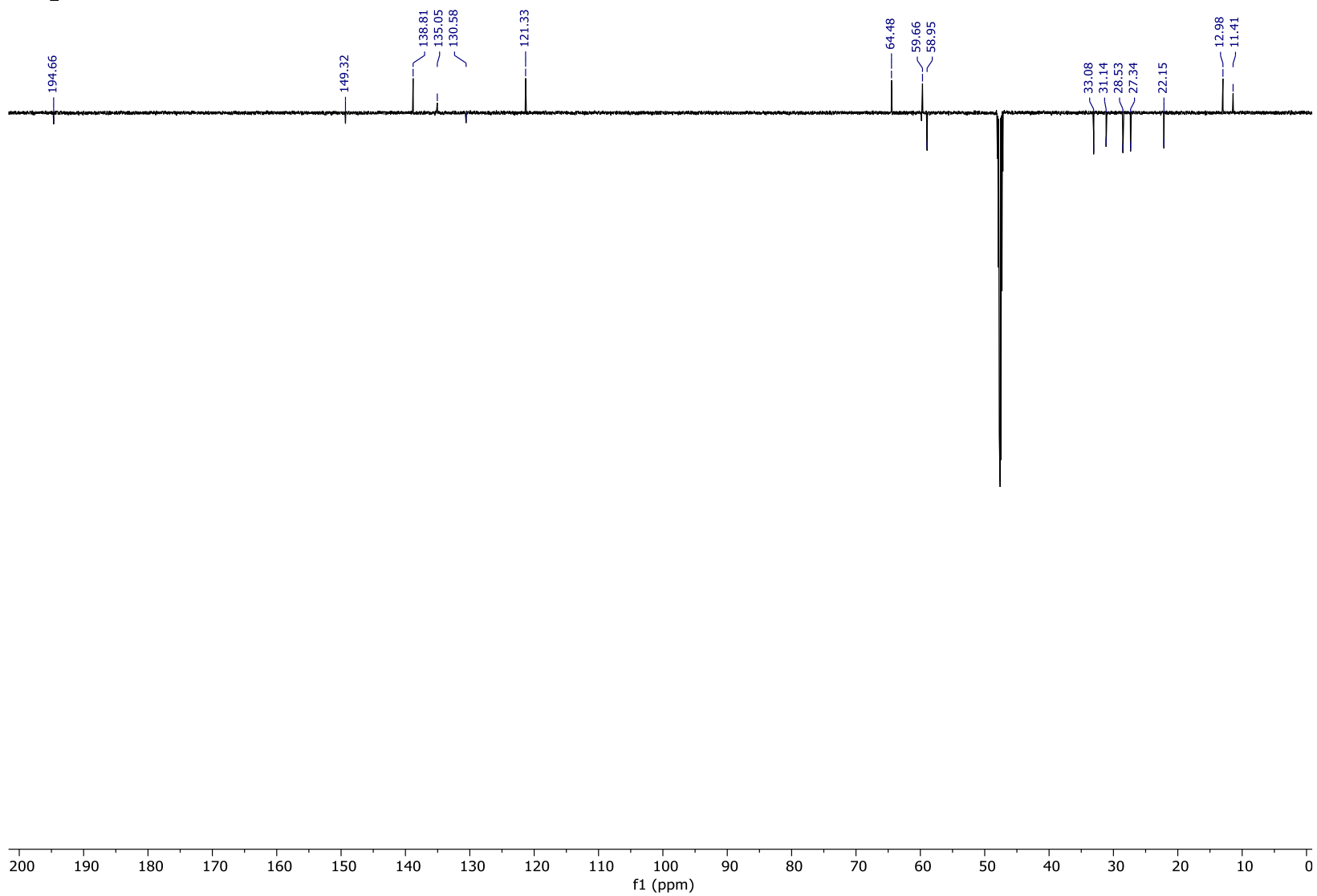
Lucas_Frc12.12.fid
tocsy1d 2.814 ppm



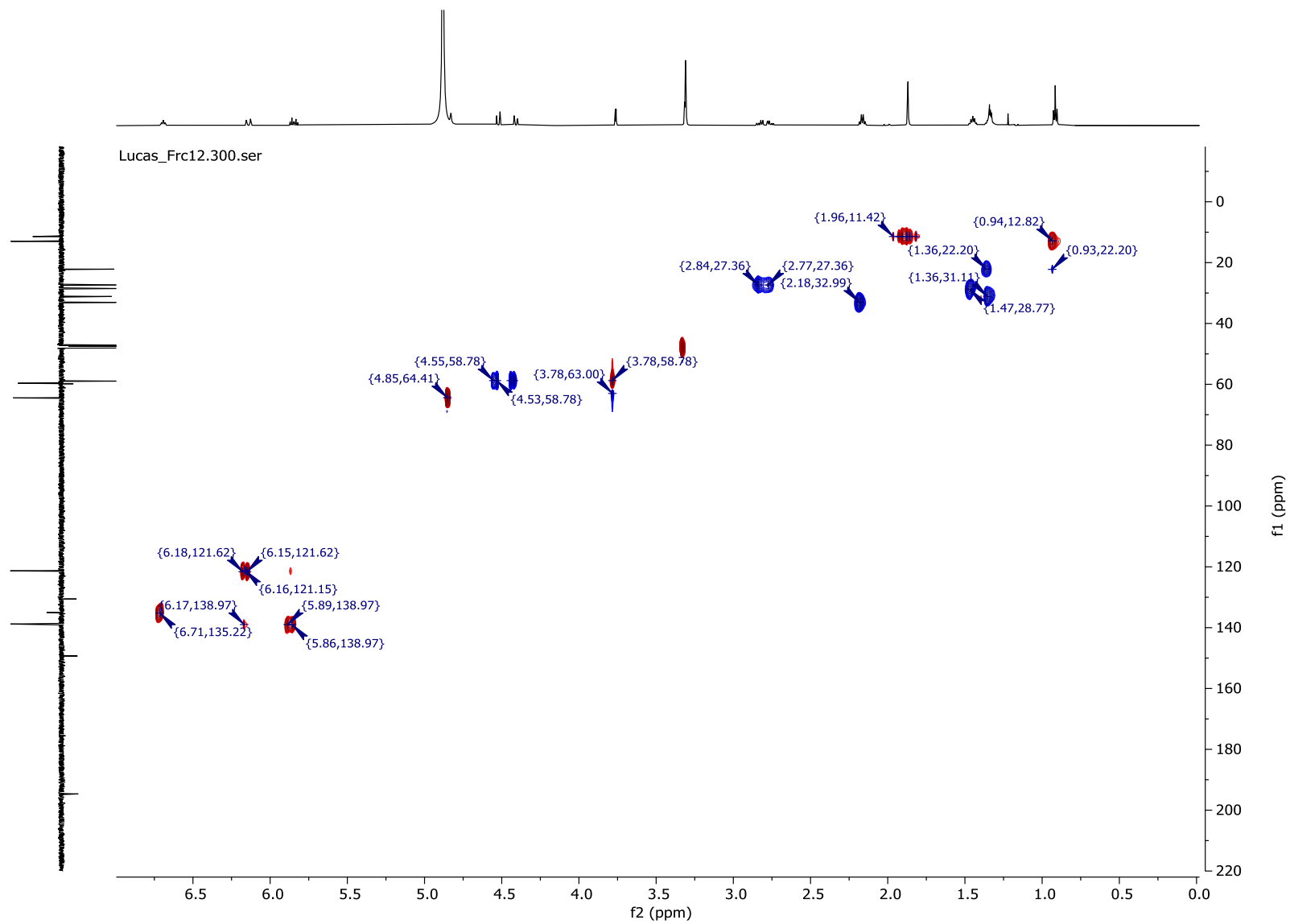
Lucas_Frc12.13.fid
tocsy1d 3.781 ppm



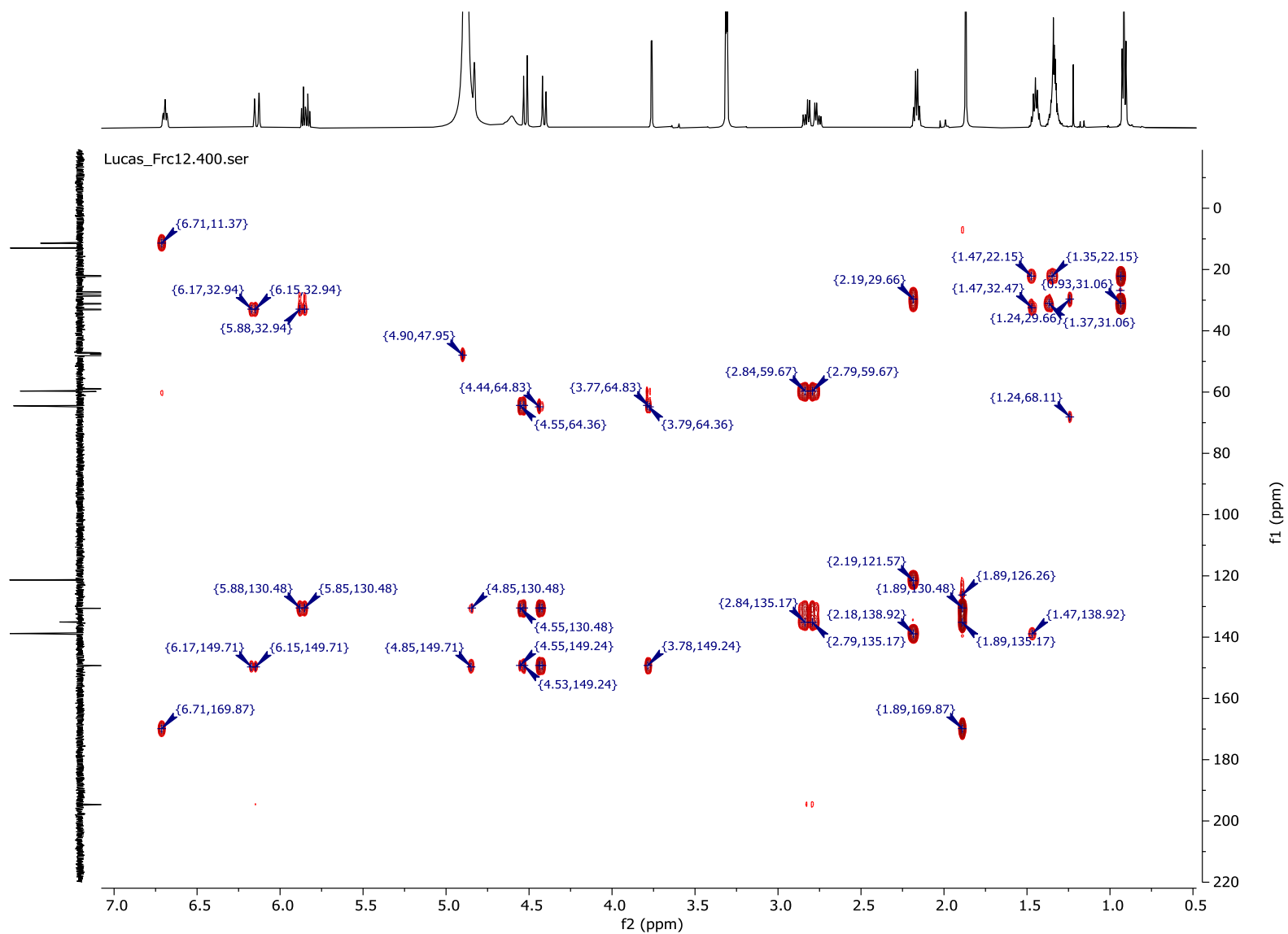
Lucas_Frc12.20.fid



Espectro de DEPTQ

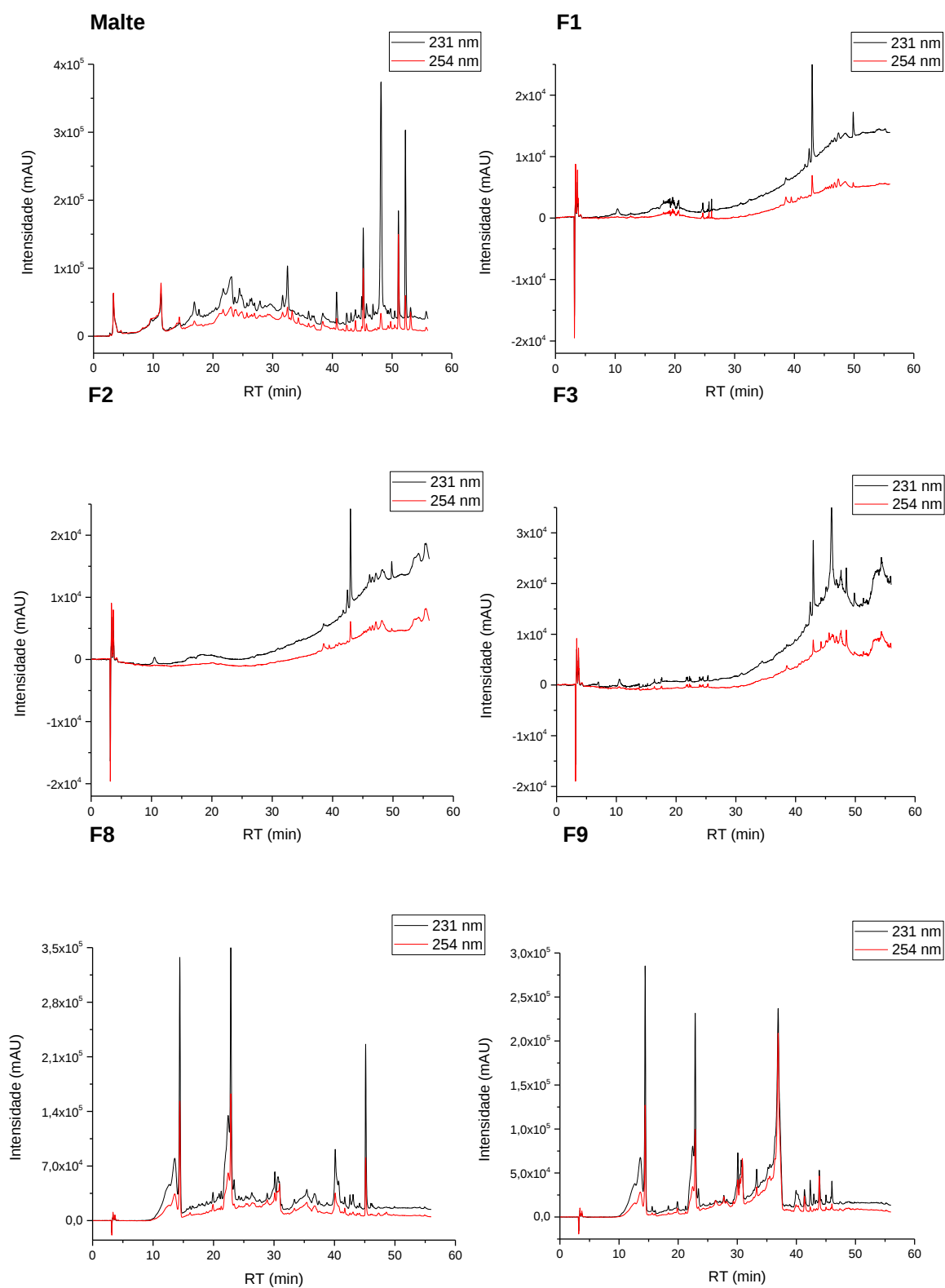


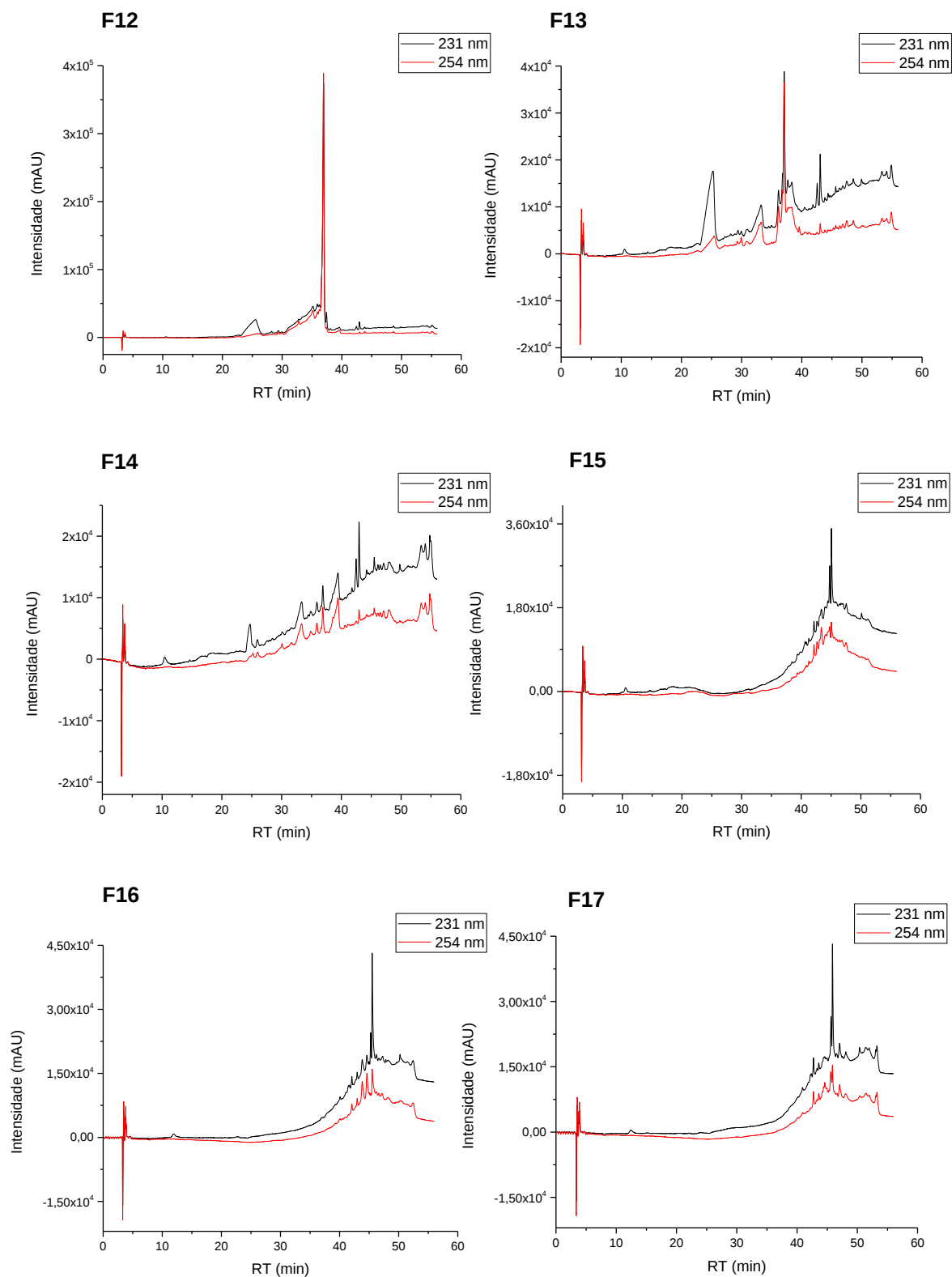
Mapa de contorno HSQC

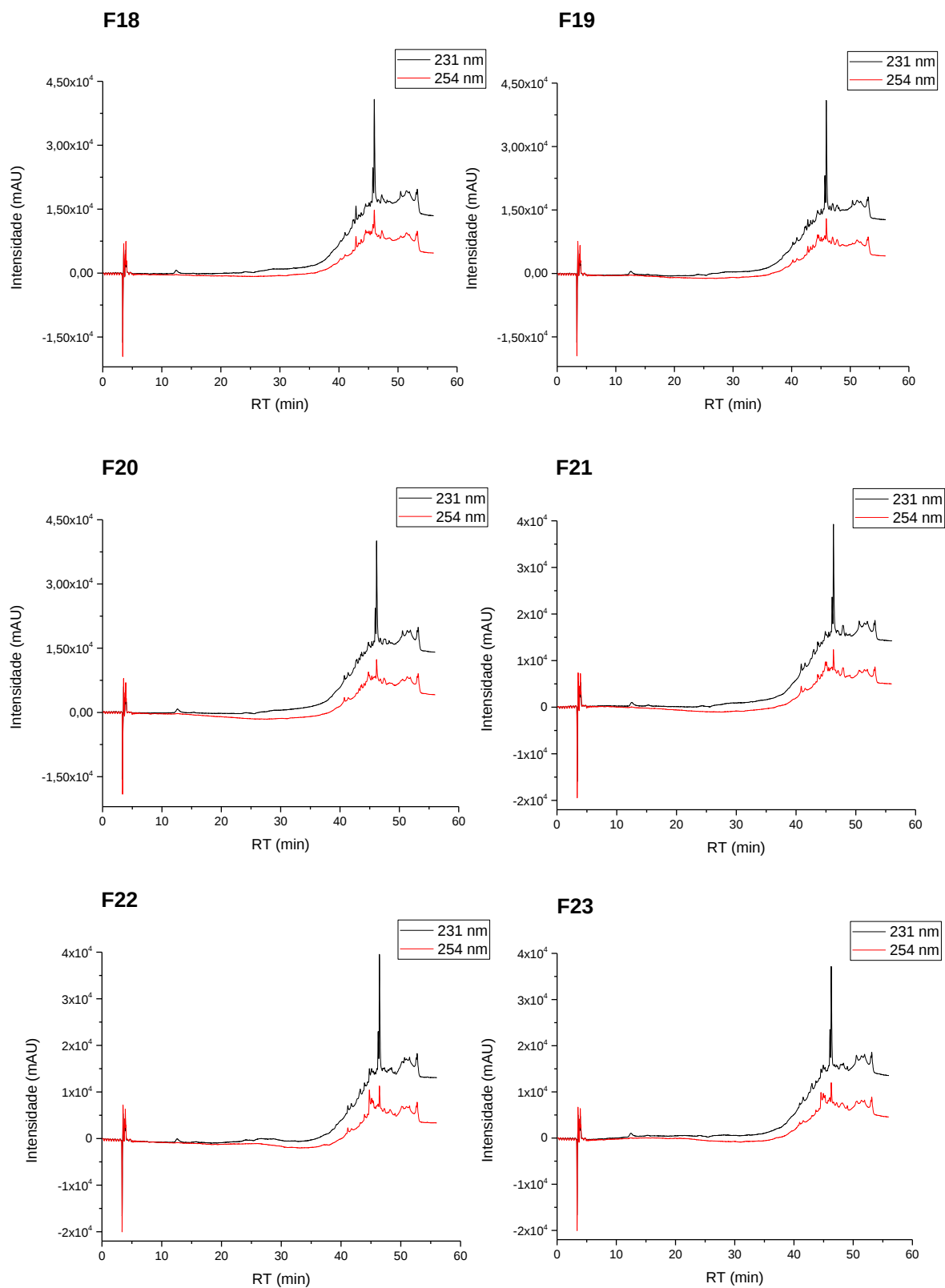


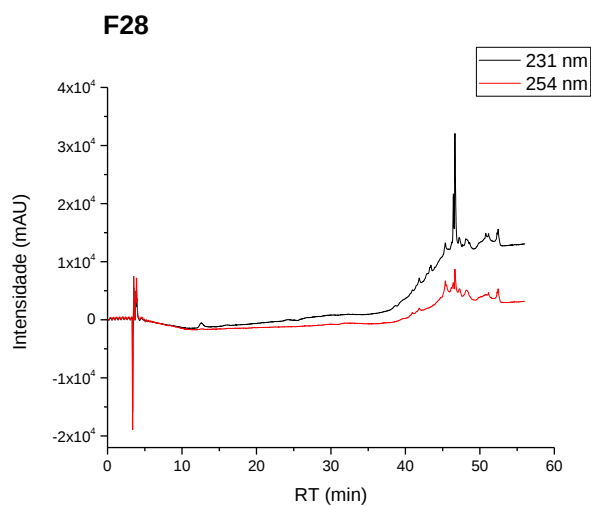
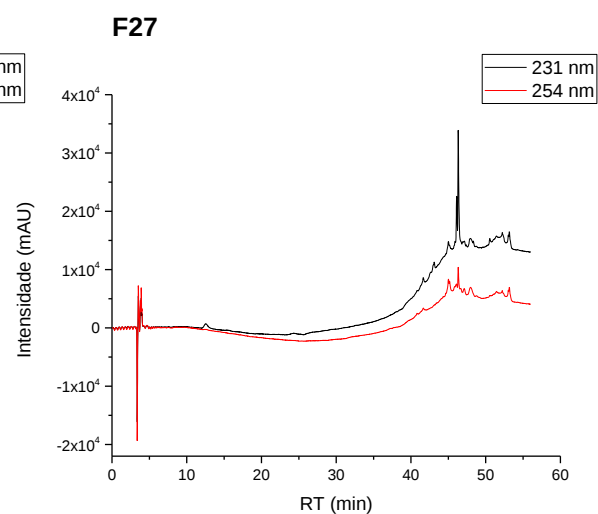
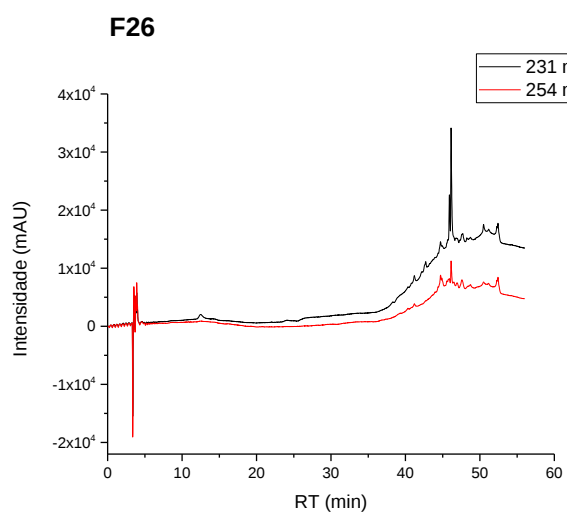
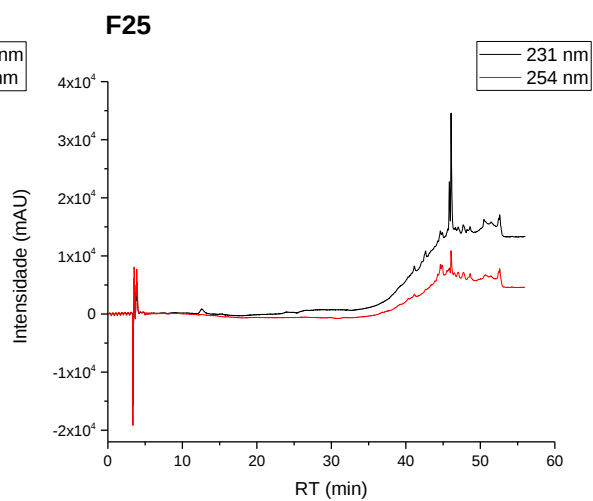
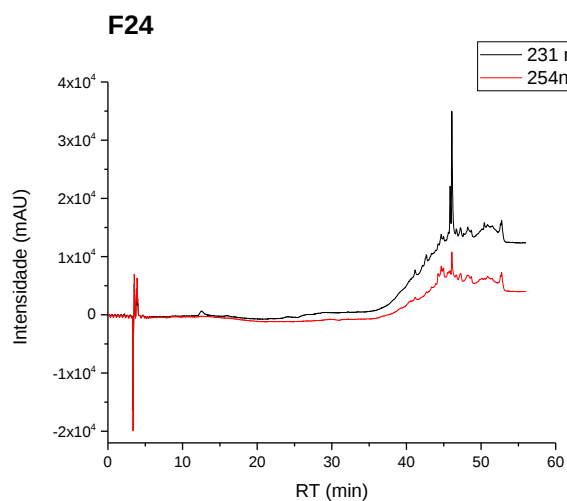
Mapa de contorno HMBC

APÊNDICE G – Cromatogramas das frações obtidas a partir do extrato OTM por HPLC-DAD em modo gradiente 5-100% (MeOH/H₂O) em 45 min

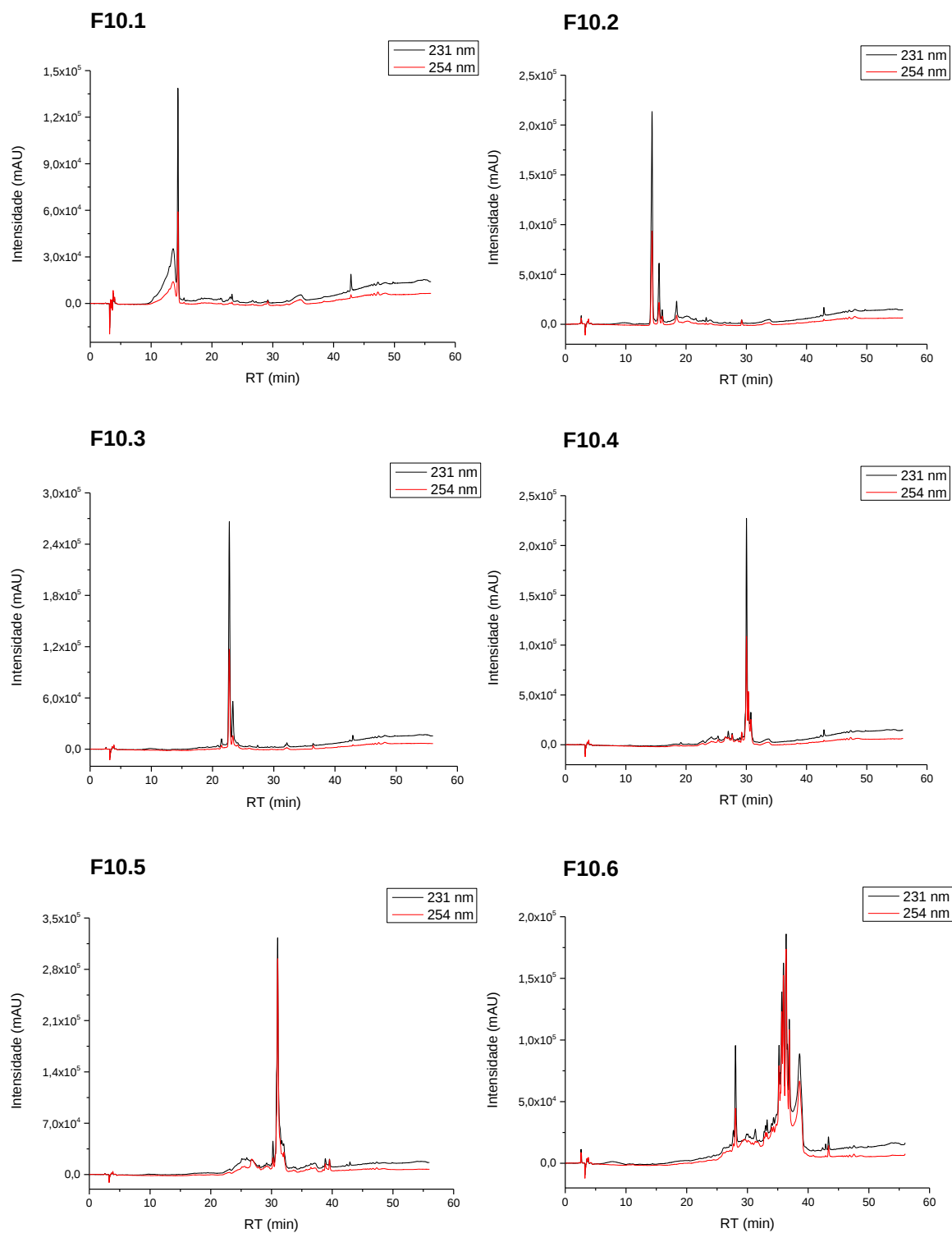


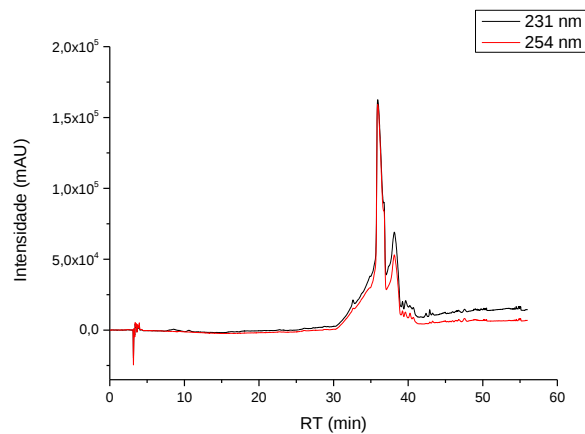
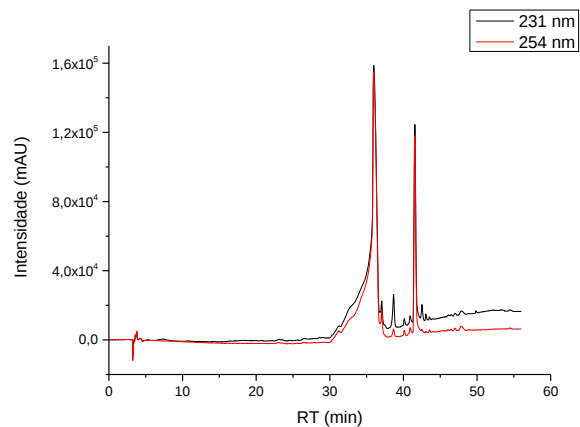
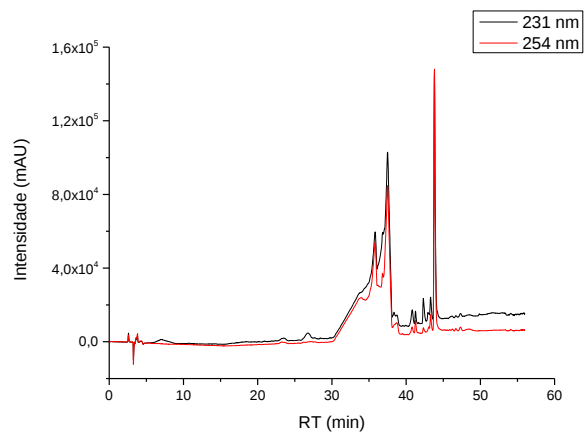
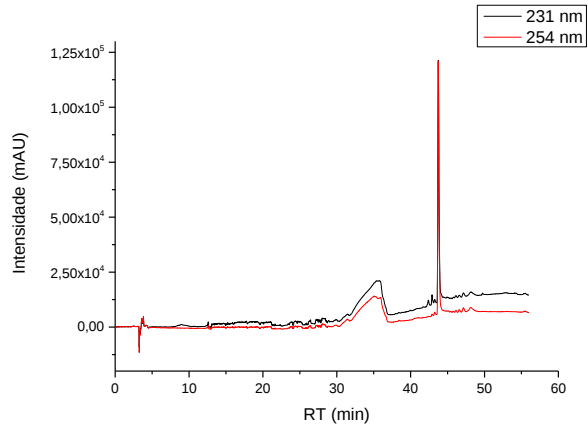
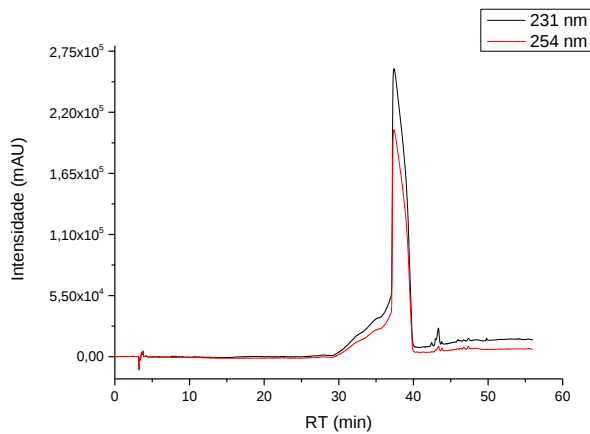
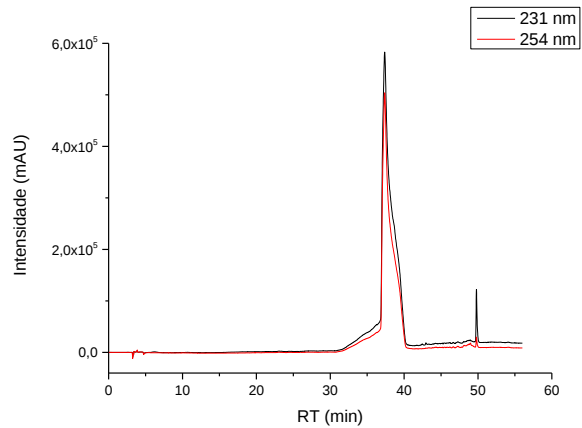


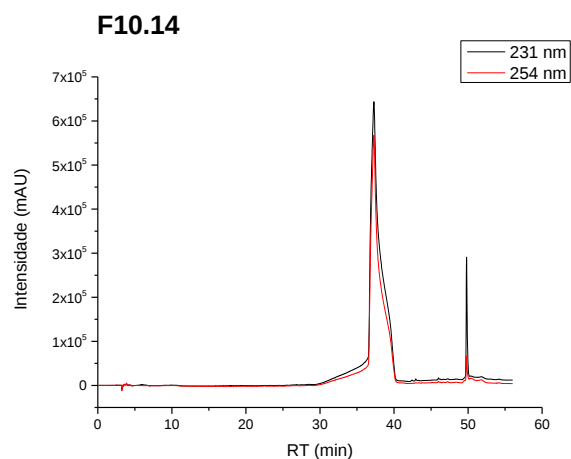




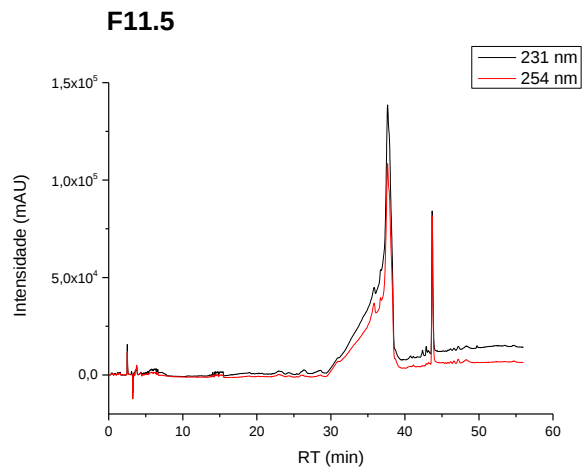
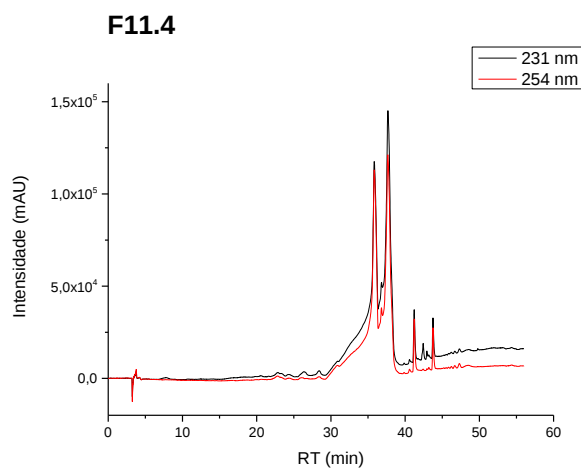
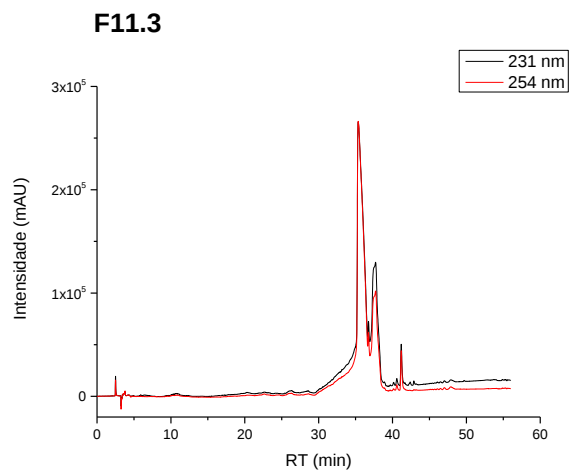
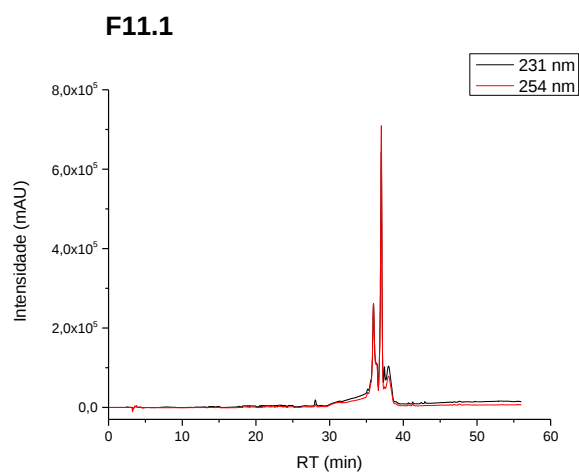
APÊNDICE H – Cromatogramas das subfrações obtidas a partir da fração F10 por HPLC-DAD em modo gradiente 5-100% (MeOH/H₂O) em 45 min

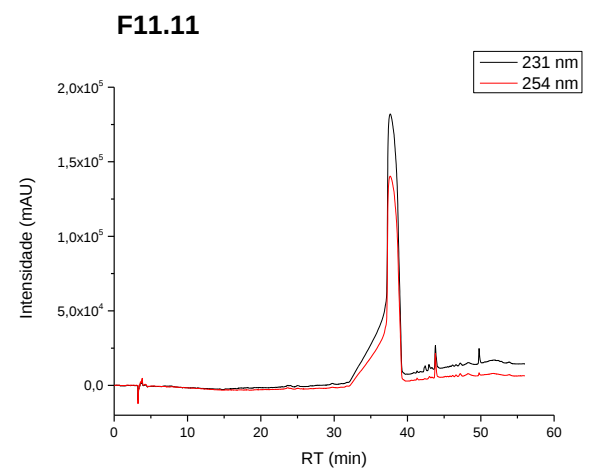
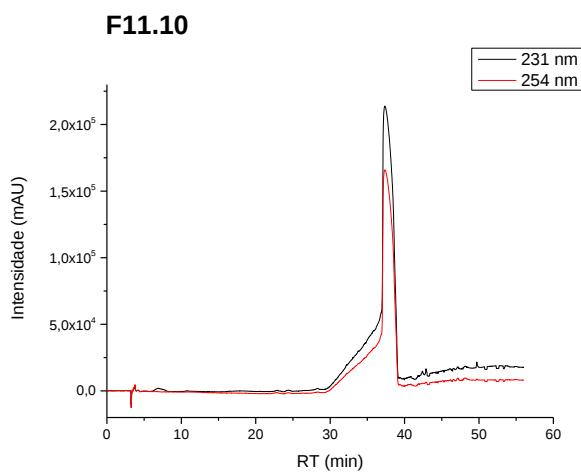
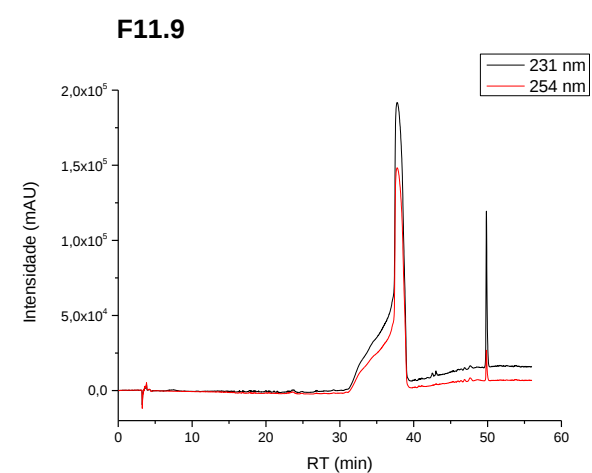
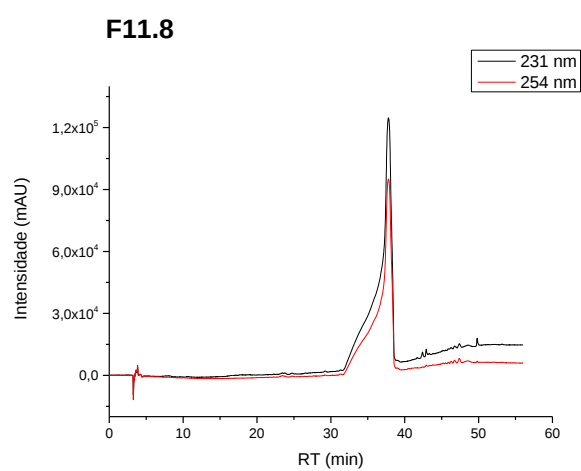
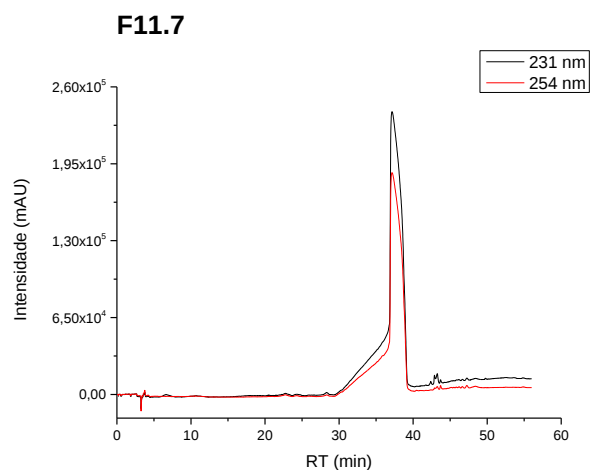
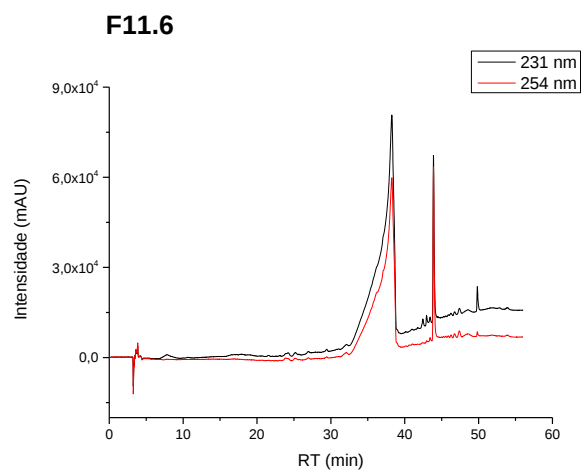


F10.8**F10.9****F10.10****F10.11****F10.12****F10.13**



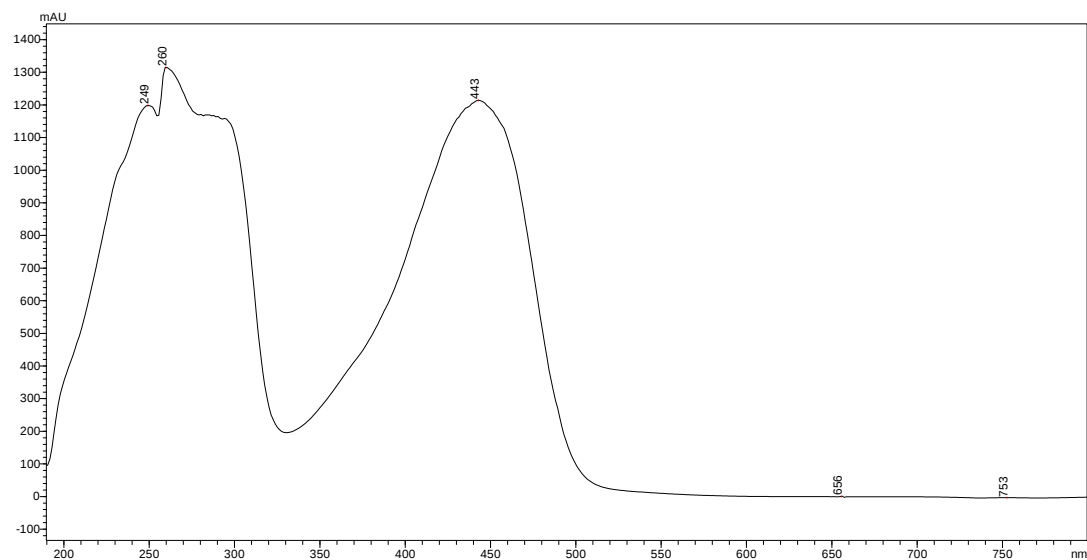
APÊNDICE I – Cromatogramas das subfrações obtidas a partir da fração F11 por HPLC-DAD em modo gradiente 5-500% (MeOH/H₂O) em 45 min



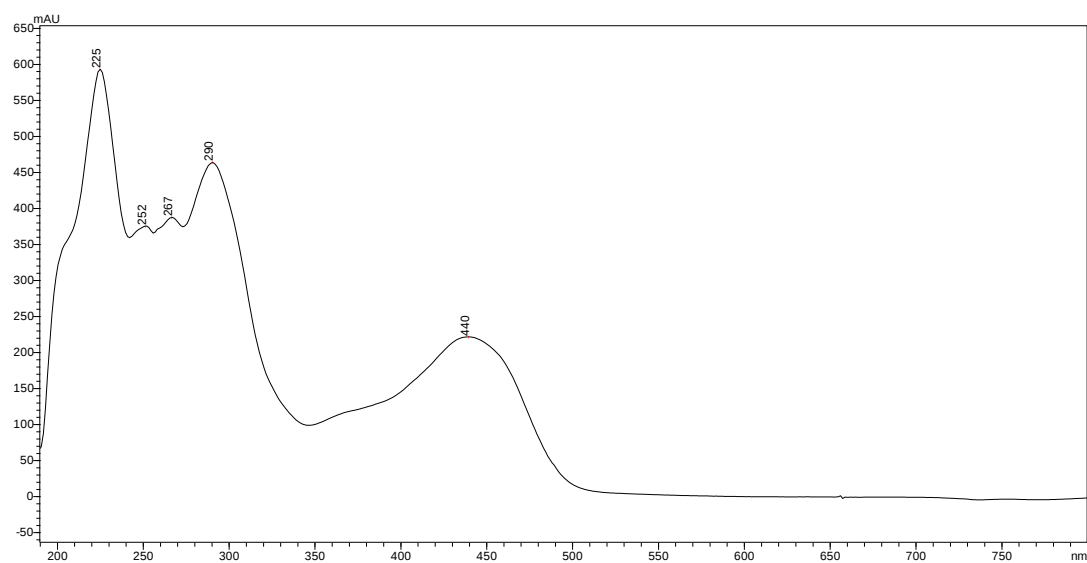


APÊNDICE J - Espectro de UV das substâncias isoladas F10.7.1; F10.7.2; F11.2.1 e F11.2.2

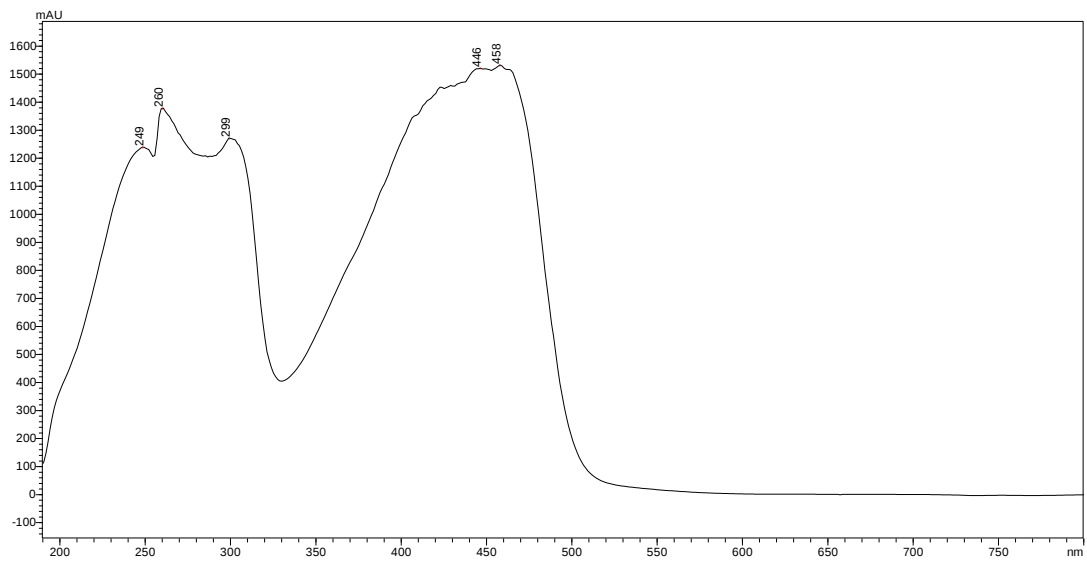
F10.7.1



F10.7.2



F11.2.1



F11.2.2

