



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

EDELSON DE JESUS SÁ DIAS

**ESTUDO METABOLÔMICO E BIOPROSPECÇÃO DO FUNGO ENDOFÍTICO
Fusarium solani, ASSOCIADO À ALGA MARINHA VERMELHA *Dichotomaria
marginata*.**

ARARAQUARA

2025

EDELSON DE JESUS SÁ DIAS

ESTUDO METABOLÔMICO E BIOPROSPECÇÃO DO FUNGO ENDOFÍTICO *Fusarium solani*, ASSOCIADO À ALGA MARINHA VERMELHA *Dichotomaria marginata*.

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

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena S. Silva

ARARAQUARA

2025



D541e Dias, Edelson de Jesus Sá
Estudo metabolômico e bioprospecção do fungo endofítico
Fusarium solani, associado a alga marinha vermelha
Dichotomaria marginata / Edelson de Jesus Sá Dias. --
Araraquara, 2025
103 f. : il.

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

1. *Fusarium solani*. 2. Fungos marinhos. 3. Compostos
bioativos. 4. Produtos naturais. 5. Citotoxicidade. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Esta pesquisa tem como objetivo a bioprospecção do fungo endofítico *Fusarium solani* isolado da alga marinha *Dichotomaria marginata*, com foco na identificação, isolamento e caracterização de novos produtos naturais de origem marinha, bem como na avaliação de seu potencial citotóxico. Este estudo visa contribuir para a descoberta de compostos bioativos com relevância terapêutica, particularmente em um cenário onde a necessidade de novos agentes terapêuticos têm se tornado um desafio global.

A relevância da pesquisa reside na ampliação do conhecimento sobre a associação simbiótica entre *Fusarium solani* e *Dichotomaria marginata*, destacando a riqueza do ambiente marinho, que, embora seja um dos biomas mais biodiversos do planeta, permanece subexplorado em comparação com ambientes terrestres. O ambiente marinho, caracterizado por condições de alta pressão seletiva, favorece o desenvolvimento de mecanismos adaptativos únicos em seus organismos, resultando na produção de metabólitos secundários com estruturas químicas e propriedades biológicas únicas. Esses compostos frequentemente possuem potencial para aplicações farmacológicas, como agentes antimicrobianos, anticancerígenos, anti-inflamatórios e antioxidantes.

Além do impacto científico, o projeto também representa uma oportunidade significativa para a capacitação técnica e profissional. A pesquisa abrange o domínio de técnicas avançadas de cromatografia, fundamentais para a separação e identificação de compostos bioativos, além de metodologias específicas para o estudo de fungos endofíticos e suas atividades biológicas. Este treinamento prepara os pesquisadores para enfrentar desafios futuros na pesquisa de produtos naturais de origem marinha, contribuindo para o avanço da ciência e tecnologia no campo da bioprospecção e biotecnologia.

Este trabalho promove práticas de bioprospecção sustentáveis, alinhando-se aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 3, 9 e 14, ao apoiar a exploração racional e conservação dos ecossistemas marinhos e estimular a inovação científica responsável.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This research aims to bioprospect the endophytic fungus *Fusarium solani* isolated from the marine alga *Dichotomaria marginata*, focusing on the identification, isolation, and characterization of new natural products of marine origin, as well as evaluating their cytotoxic potential. This study seeks to contribute to the discovery of bioactive compounds with therapeutic relevance, particularly in a context where the demand for new therapeutic agents has become a global challenge.

The significance of the research lies in expanding knowledge about the symbiotic association between *Fusarium solani* and *Dichotomaria marginata*, highlighting the richness of the marine environment, which despite being one of the most biodiverse biomes on the planet remains underexplored compared to terrestrial environments. The marine environment, characterized by conditions of high selective pressure, promotes the development of unique adaptive mechanisms in its organisms, resulting in the production of secondary metabolites with unique chemical structures and biological properties. These compounds often hold potential for pharmacological applications, such as antimicrobial, anticancer, anti-inflammatory, and antioxidant agents.

In addition to its scientific impact, the project also represents a significant opportunity for technical and professional training. The research encompasses the mastery of advanced chromatographic techniques, essential for the separation and identification of bioactive compounds, as well as specific methodologies for studying endophytic fungi and their biological activities. This training equips researchers to face future challenges in the study of natural products of marine origin, contributing to the advancement of science and technology in the fields of bioprospecting and biotechnology.

This work promotes sustainable bioprospecting practices, aligning with Sustainable Development Goals (SDGs) 3, 9, and 14, by supporting the rational exploration and conservation of marine ecosystems and encouraging responsible scientific innovation.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Estudo metabolômico e bioprospecção do fungo endofítico *Fusarium solani* associado à alga marinha *Dichotomaria marginata*"

AUTOR: EDELSON DE JESUS SÁ DIAS

ORIENTADORA: DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA

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

Examinadora:



Documento assinado digitalmente

DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA

Data: 25/04/2025 14:36:30-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA (Participação Virtual)

Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Documento assinado digitalmente



ISABELE RODRIGUES NASCIMENTO

Data: 24/04/2025 20:20:19-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a ISABELE RODRIGUES NASCIMENTO (Participação Virtual)

Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Documento assinado digitalmente



GUSTAVO SOUZA DOS SANTOS

Data: 25/04/2025 08:53:39-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. GUSTAVO SOUZA DOS SANTOS (Participação Virtual)

Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Documento assinado digitalmente



ANTONIO JOSE CANTANHEDE FILHO

Data: 25/04/2025 08:44:17-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. ANTÔNIO JOSÉ CANTANHEDE FILHO (Participação Virtual)

Departamento Acadêmico de Química / Instituto Federal do Maranhão - IFMA

Documento assinado digitalmente



AUGUSTO LEONARDO DOS SANTOS

Data: 25/04/2025 09:25:02-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. AUGUSTO LEONARDO DOS SANTOS (Participação Virtual)

Departamento de Química / Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - Diadema

Araraquara, 24 de abril de 2025

DADOS CURRICULARES

Nome: Edelson de Jesus Sá Dias

Nascimento: 31 de outubro de 1991

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Pinheiro – MA

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2019 – Atual: Doutorado em Química junto ao Departamento de Bioquímica e Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, São Paulo, Brasil e integrante do Núcleo de Bioensaios Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE).

Título: **Estudo metabolômico e bioprospecção do fungo endofítico *Fusarium solani* associado a alga marinha vermelha *Dichotomaria marginata*.**

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

2017 – 2019: Mestrado em Química, junto ao Departamento de Química do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão, IFMA, São Luís, Maranhão Brasil, com período sanduíche na Universidade Federal do Pará, sob supervisão da Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos.

Título: **Estudo químico, efeito fitotóxico e atividade antimicrobiana da espécie *Humiria balsamifera* (Aubl).**

Orientador: Prof. Dr. Antônio José Cantanhede Filho

2010 – 2016: Graduação em Licenciatura em Química, junto ao Departamento de Química da Universidade Federal do Maranhão, UFMA, São Luís, Maranhão, Brasil

Título: **Experimentos de química orgânica com materiais alternativos para aplicação no ensino médio.**

Orientador: Prof. Dr. Joacy Batista de Lima

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2024 – 2024: Formação em Educação para a Carreira e Projeto de Vida. (300h).

Ministério da Educação, MEC – Secretaria de Educação Básica, SEB, Brasil.

2024 – 2024: Formação em Ciências da Natureza e suas Tecnologias. (180h).

Ministério da Educação, MEC – Secretaria de Educação Básica, SEB, Brasil.

2024 – 2024: Formação em Matemática e suas Tecnologias. (180h).

Ministério da Educação, MEC – Secretaria de Educação Básica, SEB, Brasil.

2024 – 2024: Psicologia da Educação - CAPES. (60h).

Universidade Estadual do Maranhão, UEMA, Brasil.

2024 – 2024: Gestão Escolar da Educação Básica - CAPES. (60h).

Universidade Estadual do Maranhão, UEMA, Brasil.

2024 – 2024: Multimeios em Educação - CAPES. (60h).

Universidade Estadual do Maranhão, UEMA, Brasil.

2024 – 2024: Ética Profissional - CAPES. (45h).

Universidade Estadual do Maranhão, UEMA, Brasil.

2024 – 2024: Mediação em EaD - CAPES. (30h).

Universidade Estadual do Maranhão, UEMA, Brasil.

2022 – 2023: Comunicação e Escrita Científica. (4:30h).

American Chemical Society, Estados Unidos.

2020 – 2022: Preparatório para teste de proficiência TOEFL ITP. (32h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2017 – 2017: Processos de Adsorção. (12h).

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão, IFMA, Brasil.

2017 – 2017: Química Verde e Catálise. (12h).

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão, IFMA, Brasil.

2014 – 2014: Química dos Materiais Alternativos. (40h).

Universidade Federal do Maranhão, UFMA, Brasil.

2012 – 2012: Análise Físico-Química e Bacteriológica de água. (40h).

Universidade Federal do Maranhão, UFMA, Brasil.

2010 – 2010: Mecanismos de Reação. (4h)

Universidade Federal do Maranhão, UFMA, Brasil.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

1. Artigos completos publicados em periódicos

- DIAS, E. J. S.; CANTANHEDE FILHO, A. J.; CARNEIRO, F. J. C.; ROCHA, C. Q.; SILVA, L. C. N.; SANTOS, J. C. B.; BARROS, T. F.; SANTOS, D. M. Antimicrobial Activity of Extracts from the *Humiria balsamifera* (Aubl). PLANTS **JCR**, v. 10, p. 1479, 2021.

2. Participações em eventos científicos

- I Workshop de Química de Microrganismos, 2020.

3. Trabalhos publicados em Anais de Eventos Científicos

- **DIAS, E. J. S.**; SILVA, G. S.; ZANATTA, A. C. ; SANTOS, A. L.; SILVA, D. H. S. Chemodiversity and cytotoxic activity of *Fusarium solani* isolated from red marine seaweed *Dichotomania marginata*. In: 46º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, 2023. v. 46. p. 889.
- MENDONCA, I. C.; **DIAS, E. J. S.**; SILVA, G. S.; RUFINO, V. H. L.; MOURA, L. H. S.; SILVA, D. H. S. . Induction of secondary metabolites through Coculture of endophytic fungi strains isolated from marine red algae. In: 46º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, 2023. v. 46. p. 889.
- SILVA, G. S.; **DIAS, E. J. S.**; VIEIRA, R.; MOURA, L. H. S.; SILVA, D. H. S. Time dependency of chemodiversity of extracts from *Annulohypoxylon stigiunendophytic* fungi isolated from red alga *Asparagopsis taxiformis*. In: 45º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Maceió, 2022. v. 45. p. 801.
- MOURA, L. H. S.; **DIAS, E. J. S.**; SANTOS, A. L. P.; SILVA, G. S.; HONORIO, A. E.; SILVA, D. H. S. Secondary metabolites from the endophytic fungus *Hypomontagnella monticulosa* using factorial design and GNPS molecular networking. In: 45º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Maceió, 2022. v. 45. p. 787.
- **DIAS, E. J. S.**; HONORIO, A. E.; SILVA, G. S.; SANTOS, A. L. P.; MOURA, L. H. S.; SILVA, D. H. S. Chemical study of *Fusarium solani*, an endophyte fungal strain isolated from the red marine alga *Dichotomaria marginata*. In: 46º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2022. v. 46. p. 708.

4. Trabalhos Apresentados

- **DIAS, E. J. S.**; SANTOS, A. L.; SILVA, G. S.; ZANATTA, A. C.; SILVA, D. H. S. Chemodiversity and cytotoxic activity of *Fusarium solani* isolated from red marine seaweed *Dichotomania marginata*, 2023.
- **DIAS, E. J. S.**; HONORIO, A. E.; SILVA, G. S.; MOURA, L. H. S.; SANTOS, A. L. P.; SILVA, D. H. S. Chemical study of *Fusarium solani*, an endophyte fungal strain isolated from the red marine alga *Dichotomaria marginata*, 2022.
- MOURA, L. H. S.; SANTOS, A. L. P.; **DIAS, E. J. S.**; SILVA, G. S.; HONORIO, A. E.; SILVA, D. H. S. Secondary metabolites from the endophytic fungus *Hypomontagnella monticulosa* using factorial design and GNPS molecular networking. 2022.
- SILVA, G. S.; SANTOS, A. L. P.; VIEIRA, R.; **DIAS, E. J. S.**; MOURA, L. H. S.; SILVA, D. H. S. Time dependency of chemodiversity of extracts from *Annulohyphoxylon stigiunendophytic* fungi isolated from red alga *Asparagopsis taxiformis*, 2022.
- **DIAS, E. J. S.**; CANTANHEDE FILHO, A. J.; CARNEIRO, F. J. C.; ROCHA, C. Q.; SILVA, L. C. N.; MARQUES, J. C. Chemical characterization by LC-MS/S and antimicrobial activity on crude extracts of *Humiria balsamifera* (Aubl), 2019.

5. Outras participações

- Avaliador no XXXIV Congresso de Iniciação Científica da Unesp-IQ/Araraquara. 2023. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- Avaliador no XXXIV Congresso de Iniciação Científica da Unesp-IQ/Araraquara. 2022. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- Avaliador no XXXIV Congresso de Iniciação Científica da Unesp-IQ/Araraquara. 2021. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- Avaliador no XXXIV Congresso de Iniciação Científica da Unesp-IQ/Araraquara. 2020. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

IDIOMAS

Inglês: Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Ana Clara e Edmundo, a minha irmã,
Ediane, ao meu irmão, Edmundo Júnior
(in memoriam), e ao meu sobrinho,
Miguel, por serem sempre a minha fonte
inesgotável de força e honestidade.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ana Clara e Edmundo, os alicerces da minha vida, meus maiores exemplos de perseverança, humildade e honestidade

À minha irmã, Ediane e ao meu irmão, Edmundo (*in memoriam*), por todo amor, carinho e por todo apoio em todos os momentos.

Ao meu sobrinho, Miguel por todo amor e luz que trouxe à minha vida.

À minha orientadora, Prof. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva, por ter me aceitado como aluno, por todos os ensinamentos e conselhos, por sua confiança e por ser sempre uma referência em diversos momentos.

Ao meu grupo de pesquisa NuBBE-Marinhos, Lucas, Iatã, Augusto, Victor, Rafael, Adriely e Yan, por fornecerem um ambiente de apoio mútuo, por estarem dispostos a contribuir e ajudar a qualquer momento, e principalmente pela união, que nos permitiu avançar em nossas pesquisas e a crescer como pesquisadores.

Ao meu amigo e companheiro de laboratório, Dr. Givaldo Souza da Silva, por todos os conselhos, incentivos, discussões de cunho científico e principalmente pela sua valiosa amizade.

À minha amiga Dra. Camila Luiza, por toda contribuição e discussões sobre isolamento de substâncias, pela sua parceria em laboratório e por todas as caminhadas nas tardes de Araraquara.

À minha amiga Dra. Ana Caroline Zanatta, pelo grande suporte no tratamento e análises de dados de espectrometria de massas, anotação de substâncias e principalmente por sua valiosa amizade e apoio em vários momentos.

À minha amiga Dra. Karla Lima e ao meu amigo Igor Luís, pelo apoio constante e por todos os momentos que compartilhamos do Maranhão a Araraquara.

A todos os amigos do NuBBE, em especial, Maria do Carmo, Rafael Vieira, Marcelino, Ana Letícia, Victor Emanuel e Carol, por todos os momentos valiosos que compartilhamos, pelas discussões científicas e por todo acolhimento.

Aos docentes do IQ-UNESP, em especial às professoras, Dra. Isabele Rodrigues, Dra. Vanderlan Bolzani, Dra. Cíntia Milagre, Dra. Ângela Araújo, Dra. Maysa Furlan e ao Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa.

Ao Dr. João Bronzel e à Dra. Juliana Rodrigues, técnicos responsáveis pelos nossos laboratórios, pela amizade, paciência e disponibilidade em nos treinar e

supervisionar no manuseio dos equipamentos, além das excelentes análises que realizam.

Aos Dr. Nivaldo Boralle, Dr. Uenifer Couto e Dra. Lidiane Gaspareto, responsáveis técnicos do laboratório de RMN, pela paciência, dedicação em discutir cada análise e, sobretudo, por todos os ensinamentos.

À Prof. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo e Dra. Paula Rezende pela parceria e contribuições com os ensaios de atividade biológica.

Aos funcionários do IQ-UNESP, pelo excelente trabalho e que nos ajudam diariamente.

Ao IQ-UNESP e ao Programa de Pós-graduação em Química pela oportunidade de qualificação profissional, por toda infraestrutura e pelo excelente quadro de profissionais que estão sempre a disposição.

A todos que colaboraram direta e indiretamente para a realização desta importante etapa da minha formação acadêmica.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa, que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

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

É justo que muito custe o que muito vale.

Santa Tereza D'ávila

RESUMO

Com o avanço das pesquisas em bioprospecção de produtos naturais marinhos, o ecossistema oceânico tem se mostrado uma rica fonte de compostos bioativos. O isolamento de estruturas inéditas, é impulsionado pela elevada biodiversidade e pelo potencial de descoberta de novos macros e microrganismos marinhos. Nesse contexto, os fungos associados a organismos marinhos, com destaque para as algas, têm emergido como importantes produtores de metabólitos com múltiplas bioatividades e ampla quimiodiversidade. Entretanto, a remoção desses microrganismos de seu ambiente natural frequentemente resulta na perda de expressão de vias metabólicas específicas, onde os genes relacionados a biossíntese de certos compostos deixam de ser ativados, em um processo conhecido como silenciamento gênico. Dessa forma, o principal objetivo deste trabalho, foi explorar o potencial biológico e a quimiodiversidade do fungo endofítico *Fusarium solani*, que foi isolado da alga marinha *Dichotomaria marginata*. *Fusarium solani* está entre as espécies de fungos dominantes, com capacidade de proliferação em diferentes substratos, além de ser considerado uma das espécies mais promissoras na produção de moléculas bioativas. Considerando esse potencial, foram construídas curvas de crescimento em meio líquido de extrato de malte para determinar melhores condições de crescimento em relação ao tempo de cultivo e produção de extrato. O endófito também foi cultivado em meios sólidos de aveia, farelo de trigo e arroz, gerando uma quantidade em massa de extrato maior do que em meio líquido, permitindo fracionamento e análise das frações. Os extratos obtidos nos experimentos de construção da curva de crescimento e os extratos obtidos no cultivo em meios sólidos, foram analisados por CLAE-EM esses dados foram utilizados para gerar redes moleculares que permitiram identificar as semelhanças e diferenças entre os extratos, além da anotação de metabólitos com similaridade espectral com as bases da plataforma GNPS como, ácido fusaridióico, NG-391 e ciclosporina-X. Todos os extratos obtidos nos experimentos de construção da curva de crescimento, além dos extratos obtidos no cultivo em meios sólidos e suas frações de partição, foram testados contra a linhagem tumoral HCT116 (carcinoma colorretal) em duas concentrações (5 µg/mL e 50 µg/mL). Para os extratos da curva de crescimento, os melhores percentuais foram na concentração de 50 µg/mL, as amostradas de 15, 20 e 25 dias de crescimento mostraram percentuais de inibição acima de 90%, as amostras de 35 e 40 dias mostraram percentuais ainda maiores, com 99,64% e 100% de inibição respectivamente. Para os extratos obtidos em meios sólidos de aveia, trigo e arroz, foram testados os extratos brutos e suas partições acetonitrila e aquosa, também nas duas concentrações (5 µg/mL e 50 µg/mL). As partições acetonitrila dos três extratos se mostraram ativas na concentração de 50 µg/mL apresentando o mesmo percentual de inibição (100%), mas apenas o extrato bruto e partições em meio de arroz se mostraram ativas nas duas concentrações testadas. Os resultados deste trabalho contribuem para o entendimento da quimiodiversidade e potencial biológico dos fungos associados a algas marinhas, dando origem a novas perspectivas para a bioprospecção de compostos bioativos.

Palavras-chave: *Fusarium solani*; Fungos marinhos; Quimiodiversidade; Bioprospecção; Atividade antitumoral.

ABSTRACT

With the advancement of research in the bioprospecting of marine natural products, the ocean ecosystem has proven to be a rich source of bioactive compounds. The isolation of novel structures is driven by the high biodiversity and the potential for discovering new macro- and microorganisms. In this context, fungi associated with marine organisms—especially algae—have emerged as important producers of metabolites with multiple bioactivities and broad chemodiversity. However, removing these microorganisms from their natural environment often results in the loss of expression of specific metabolic pathways, where genes related to the biosynthesis of certain compounds are no longer activated, in a process known as gene silencing. Therefore, the main objective of this study was to explore the biological potential and chemodiversity of the endophytic fungus *Fusarium solani*, which was isolated from the marine alga *Dichotomaria marginata*. *Fusarium solani* is among the dominant fungal species, capable of proliferating in different substrates, and is considered one of the most promising species for the production of bioactive molecules. Considering this potential, growth curves were constructed in malt extract liquid medium to determine optimal growth conditions regarding cultivation time and extract production. The endophyte was also cultivated on solid media based on oats, wheat bran, and rice, generating a greater extract mass than in liquid medium, thus allowing for fractionation and analysis of the fractions. Extracts obtained from the growth curve experiments and from solid media cultivation were analyzed by LC-MS, and the data were used to generate molecular networks that allowed the identification of similarities and differences between the extracts, as well as the annotation of metabolites with spectral similarity to compounds in the GNPS platform database, such as fusaridionic acid, NG-391, and cyclosporin-X. All extracts from the growth curve experiments, along with those from solid media cultivation and their partitioned fractions, were tested against the HCT116 tumor cell line (colorectal carcinoma) at two concentrations (5 µg/mL and 50 µg/mL). For the growth curve extracts, the best inhibition percentages were at the 50 µg/mL concentration; the 15, 20, and 25 day samples showed inhibition above 90%, while the 35- and 40-day samples showed even higher inhibition, at 99.64% and 100%, respectively. For the extracts obtained from solid oat, wheat, and rice media, crude extracts and their acetonitrile and aqueous partitions were tested, also at two concentrations (5 µg/mL and 50 µg/mL). The acetonitrile partitions of all three extracts were active at the 50 µg/mL concentration, all showing 100% inhibition; however, only the crude extract and partitions from the rice medium were active at both tested concentrations. The results of this study contribute to the understanding of the chemodiversity and biological potential of fungi associated with marine algae, providing new perspectives for the bioprospecting of bioactive compounds.

Keywords: *Fusarium solani*; Marine fungi; Chemodiversity; Bioprospecting; Antitumor activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metabólitos de organismos marinhos aprovados como medicamentos.	18
Figura 2. Distribuição de compostos halogenados em algas marinhas.....	22
Figura 3. Desmosterol e derivados oxigenados isolados de <i>Dichotomaria marginata</i>	24
Figura 4. Estruturas RF-3192C (<i>Aspergillus niger</i> SB4) e Tennessenoide A (<i>Aspergillus</i> <i>sp</i>)	28
Figura 5. Novos sesquiterpenos cicloneanos e sesquiterpeno tricotecano halogenado	29
Figura 6. Novo glicosídeo sesquiterpênico e glicosídeos sorbicilínóides	29
Figura 7. Novos derivados do ergosterol isolados do fungo endofítico <i>Fusarium</i> sp.	31
Figura 8. Novos compostos isolados de <i>Fusarium</i> sp derivado de mangue	32
Figura 9. Compostos isolados do fungo <i>Fusarium equiseti</i> UBOCC-A-117302	34
Figura 10. Princípios ativos de medicamentos conhecidos isolados de <i>Fusarium solani</i>	36
Figura 11. Principais substâncias isoladas de <i>Fusarium solani</i>	37
Figura 12. Novas fusarinas isoladas de <i>Fusarium solani</i>	38
Figura 13. Novas naftoquinonas isoladas de <i>Fusarium solani</i>	38
Figura 14. Policetídeos isolados de <i>Fusarium solani</i> de sedimentos marinhos.....	39
Figura 15. Localização - Praia da Fortaleza em Ubatuba	45
Figura 16. Limpeza e armazenamento das amostras	45
Figura 17. Obtenção e identificação das linhagens fúngicas.	47
Figura 18. Procedimento experimental da curva de crescimento.....	48
Figura 19. Cultivo do <i>Fusarium solani</i> em meios sólidos	49
Figura 20. Esquema de partição dos extratos brutos	50
Figura 21. Produção de Micélio vs Tempo de Crescimento	53
Figura 22. Produção de extrato vs Tempo de crescimento	54
Figura 23. Rede molecular gerada pela plataforma GNPS para os dados de LC-MS da curva de crescimento	57
Figura 24. Distribuição das substâncias de <i>F. solani</i> nos extratos da curva	58

Figura 25. Cluster de Carboidratos anotados a partir dos extratos de <i>F. solani</i>	60
Figura 26. Correspondência espectral com a biblioteca do GNPS para carboidratos anotados	60
Figura 27. Cluster dos Dipeptídeos anotados a partir dos extratos de <i>F. solani</i>	61
Figura 28. Correspondência espectral com a biblioteca do GNPS para os Dipeptídeos anotados	61
Figura 29. Cluster de Nucleosídeos anotados.....	62
Figura 30. Correspondência espectral com a biblioteca do GNPS para os nucleosídeos anotados	64
Figura 31. Nós isolados de (i) fusarester D e (j) 7-(4-metoxi-2-oxo-2H-piran-6-il)-11,9 dimetiloct-6-enóico	65
Figura 33. Atividade citotóxica dos extratos da curva de crescimento contra células HCT116.....	66
Figura 34. Comparação da atividade citotóxica dos extratos nas concentrações testadas.....	67
Figura 35. Cultivo de <i>F. solani</i> em meios sólidos e obtenção dos extratos com indicação das respectivas massas	68
Figura 36. Redes moleculares para extratos de <i>F. solani</i> em meios sólidos de aveia, trigo e arroz	69
Figura 37. Distribuição das substâncias produzidas por <i>F. solani</i> em meios sólidos	70
Figura 38. Aminoácidos anotados para os extratos de <i>F. solani</i> em meios sólidos de aveia, trigo e arroz.....	73
Figura 39. Correspondência espectral com a biblioteca do GNPS para os aminoácidos anotados	74
Figura 40. Aminoácidos <i>N</i> -frutossilados anotados através da plataforma GNPS de extratos de <i>F. solani</i> obtidos em meios sólidos	75
Figura 41. Correspondência espectral com a biblioteca do GNPS para os Aminoácidos <i>N</i> -frutossilados	75
Figura 42. Ácidos alquenólicos anotados pela plataforma GNPS	76
Figura 43. Correspondência espectral com plataforma GNPS para ácidos alquenólicos	76
Figura 44. Metabólitos detectados apenas no estrado de <i>F. solani</i> em meio de arroz	77

Figura 45. Correspondência espectral com plataforma GNPS para 7-Hidroxi-3,5-dimetil-1H-isocromen-1-ona e isomarticina	78
Figura 46. Anotação da micotoxina NG-391 na plataforma GNPS para extratos de <i>F. solani</i> em meios de trigo e arroz	78
Figura 47. Correspondência espectral com plataforma GNPS para NG-391	79
Figura 48. Cluster de ciclosporinas anetadas pela plataforma GNPS.....	79
Figura 49. Correspondência espectral com a plataforma GNPS para ciclosporina-X	80
Figura 50. Atividade citotóxica dos extratos de <i>F. solani</i> em meios sólidos	81
Figura 51. Comparação da atividade citotóxica dos extratos em meios sólidos nas concentrações testadas	82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Metabólitos de organismos marinhos aprovados como medicamentos. ...	17
Quadro 2. Princípios ativos de medicamentos conhecidos isolados de <i>Fusarium solani</i>	35
Quadro 3. Meios de cultivo utilizados na pesquisa.....	42
Quadro 4. Solventes utilizados na pesquisa	42
Quadro 5. Concentrações de amostras utilizadas em casa equipamento.....	43
Quadro 6. Substâncias anotadas através da plataforma GNPS para extratos de <i>Fusarium solani</i> em meios sólidos	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BDA	Batata Dextrose Ágar
DDA	Data-dependent acquisition
EI	Electron Ionization
ESI	Electrospray Ionization
FDA	Food and Drug Administration
GNPS	Global Natural Products Social Molecular Networking
HLPC-MS	High performance liquid chromatography coupled mass spectrometry
HPLC-ESI-IT-MS/MS	High performance liquid chromatography coupled mass spectrometry electrospray and ion trap
HPLC-PDA	High performance liquid chromatography coupled photodiode array
HCT-116	Linhagem de células de adenocarcinoma de cólon humano
IPA-SP	Instituto de Pesquisas Ambientais de São Paulo
LC-MS	Liquid chromatography coupled mass spectrometry
MIC	Minimal inhibitory concentration
MN	Molecular networking
MS	Mass spectrometry
MS^E	Mass spectrometry (E-energy)
MS/MS	Tandem mass spectrometry
NuBBE	Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
PN	Produtos Naturais
PPM	Parte por milhão
QTOF	Quadrupolo e tempo de voo
t_R	Tempo de Retenção Cromatográfico
UPLC	Ultra-performance liquid chromatography
UPLC-QTOF-MS^E	Ultra-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry and time of flight
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. PRODUTOS NATURAIS DE ORGANISMOS MARINHOS	16
1.2. ALGAS MARINHAS COMO FONTE DE MOLÉCULAS BIOATIVAS.....	19
1.3. ALGAS MARINHAS VERMELHAS (RHODOPHYTAS)	20
1.4. ESPÉCIE <i>DICHOTOMARIA MARGINATA</i>	23
1.5. FUNGOS ASSOCIADOS A ALGAS MARINHAS.....	26
1.6. O GÊNERO <i>FUSARIUM</i>	30
1.7. A ESPÉCIE <i>FUSARIUM SOLANI</i>	34
2. OBJETIVOS	41
2.1. GERAL.....	41
2.2. ESPECÍFICOS	41
3. PARTE EXPERIMENTAL	42
3.1. MEIOS DE CULTIVO	42
3.2. SOLVENTES.....	42
3.3. PROCEDIMENTOS GERAIS E EQUIPAMENTOS.....	42
3.3.1. Preparo de amostras para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE	42
3.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Modo Analítico (CLAE-DAD)	43
3.3.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Espectrômetro de	
Massas com Analisador Ion Trap (CLAE-EM-IES).....	43
3.3.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Espectrômetro de	
Massas com Analisador Quadrupole Time of Flight (CLAE-EM-Q-ToF)	44
3.3.5. Outros equipamentos utilizados no desenvolvimento da pesquisa	
.....	44
4. METODOLOGIA	45
4.1. Coletado material vegetal.....	45
4.2. Obtenção e identificação de linhagens fúngicas.....	46
4.3. Curva de Crescimento de <i>Fusarium solani</i>	47
4.4. Cultivo de <i>Fusarium solani</i> em meios sólidos.....	48
4.5. Partição dos extratos de <i>Fusarium solani</i> em obtidos meios sólidos.....	49
4.6. Redes moleculares	50
4.7. Ensaios de Citotoxicidade	51

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	52
5.1. CURVAS DE CRESCIMENTO	52
5.1.1. Avaliação do perfil de crescimento	52
5.1.2. Rede Molecular gerada pela Plataforma GNPS	55
5.1.3. Distribuição das substâncias produzidas ao longo do tempo de cultivo.	58
5.1.4. Anotações da Plataforma GNPS	59
5.1.5. Atividade citotóxica dos extratos da curva de crescimento.....	65
5.2. EXTRATOS CULTIVADOS EM MEIOS SÓLIDOS	67
5.2.1. Preparo dos extratos em meios sólidos.....	67
5.2.2. Rede Molecular gerada pela Plataforma GNPS	68
5.2.3. Distribuição das substâncias produzidas pelos extratos.....	69
5.2.4. Anotações da Plataforma GNPS para os extratos.....	70
5.2.5. Atividade citotóxica dos extratos de <i>F. solani</i> em meios sólidos	79
CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
REFERÊNCIAS	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produtos naturais de organismos marinhos

A exemplo das plantas utilizadas para tratar doenças devido às suas propriedades medicinais, os organismos marinhos também possuem um histórico de utilização na medicina tradicional, embora em menor amplitude do que o das plantas. Esses relatos foram de grande importância não só para os tratamentos da época, mas também para o avanço da pesquisa em produtos naturais marinhos (MAHOMOODALLY *et al.*, 2023).

Por muito tempo, as pesquisas em produtos naturais marinhos focaram em metabólitos de algas marinhas e peixes como os biopolímeros ágar e carragenina provenientes de algas vermelhas, vitaminas A e D do óleo de fígado de peixes, além de ácidos graxos poli-insaturados como ácido eicosapentaenoico e ácido docosaexaenoico (LANE; MOORE, 2011).

Em um contexto histórico, a literatura reporta que o nascimento da química de produtos naturais marinhos foi na década de 1950, quando os cientistas Bergmann e Feeny relataram o isolamento de nucleosídeos, a espongotimidina e a espongouridina, metabólitos específicos da esponja *Cryptotethya crypta* e os primeiros produtos naturais marinhos biologicamente ativos. Essa descoberta marcou o início de uma exploração contínua levando à identificação de muitos produtos naturais marinhos com atividades biológicas (GERWICK; MOORE, 2012).

Entretanto, organismos marinhos ainda são considerados como uma fonte de produtos naturais pouco explorada, entre os principais motivos que contribuem para a pouca exploração estão os altos custos das coletas de material biológico, dificuldade de acesso aos biomas marinhos e principalmente a pequena demanda de profissionais especializados nessa área (BERLINCK *et al.*, 2017).

No entanto, é notável que nos últimos anos o interesse pelo estudo dessa área tenha crescido, tanto pela conscientização da vasta biodiversidade marinha disponível, cerca de 70% da superfície terrestre é coberta por águas, quanto pelo avanço das técnicas e estratégias de pesquisa que visam contornar os problemas que dificultam a descoberta de novas substâncias bioativas e o desenvolvimento de medicamentos à base dessas substâncias (WALI *et al.*, 2019).

Espécies de algas, bactérias, fungos, esponjas do mar e corais formam cerca de 90% da biomassa oceânica total (WALI et al., 2019). Mais de 300.000 espécies vegetais e animais são conhecidas atualmente, porém apenas uma pequena porcentagem já foi estudada a respeito de sua composição química, o que resultou na caracterização de mais de 12.000 novos compostos oriundos do bioma marinho (MORGADO; VIEIRA, 2020).

Os organismos marinhos têm a capacidade de adaptar-se a um conjunto de condições ambientais adversas e lidam constantemente com pressão seletiva que inclui competição espacial, predação, incrustação de superfície e reprodução (MORGADO; VIEIRA, 2020; PATHAK, 2020). Essas condições contribuem com que os organismos marinhos produzam metabólitos únicos e mesmo com um sistema imunológico primitivo, consigam combater patógenos e outros concorrentes (MUSTAFA *et al.*, 2020).

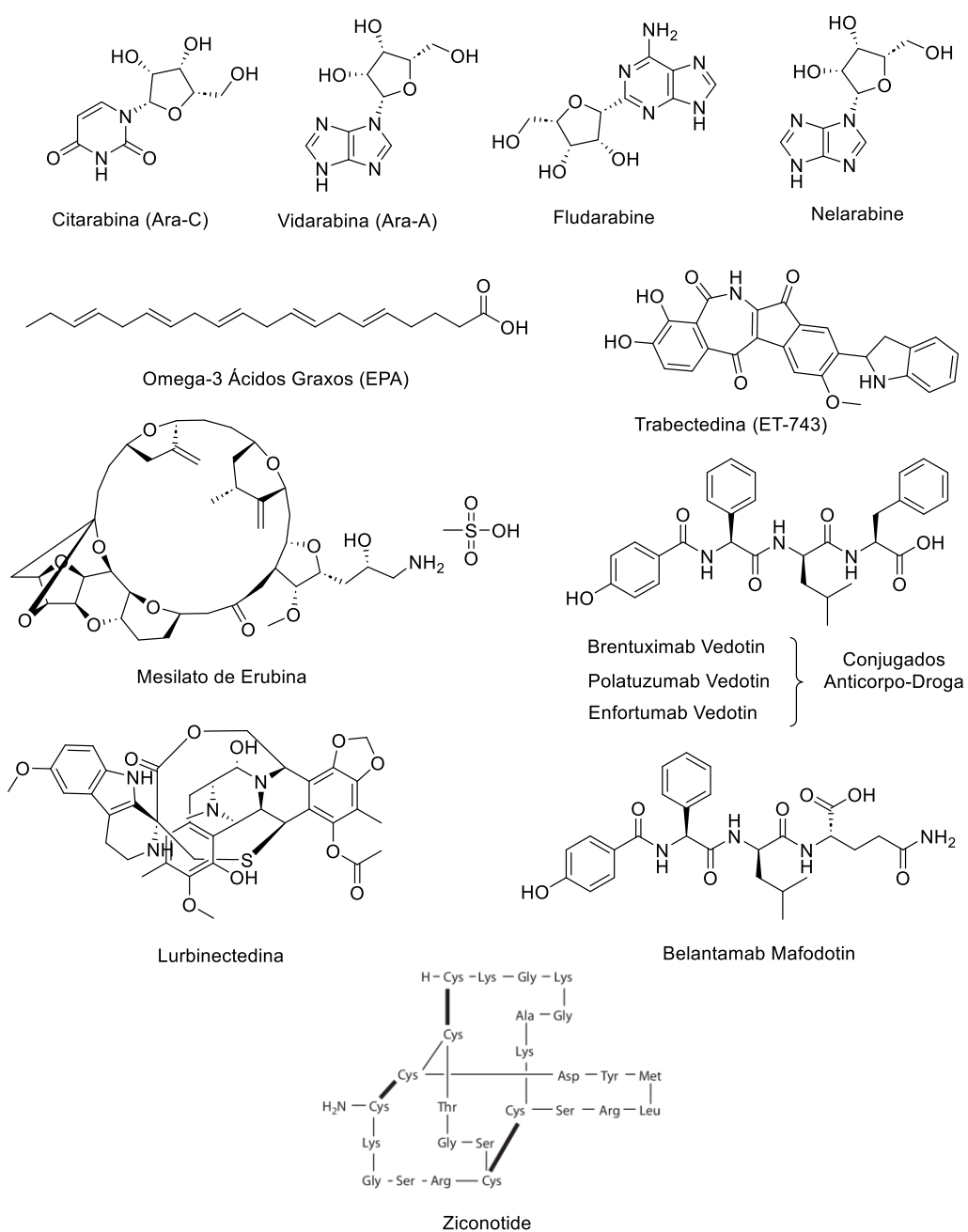
Apesar da biodiversidade marinha ser maior do que a terrestre, a pesquisa sobre biomoléculas oriundas desse bioma ainda é considerada como inicial, mas com grande potencial devido quantidade e quimiodiversidade dos compostos isolados até o momento (PATHAK, 2020). Entre os compostos isolados de diferentes organismos no decorrer da pesquisa científica em ambiente marinho, treze (**Quadro 1**) foram aprovados como medicamentos e são utilizados mundialmente.

Quadro 1. Metabólitos de organismos marinhos aprovados como medicamentos.

Nome do Composto	Prescrição	Organismo Marinho	Aprovação FDA	Área de Doença
Citarabina	Cytosar-U®	Esponja	1969	Leucemia
Vidarabina	Arasena A®	Esponja	1976	Herpes Simplex
Fludarabine	Fludara	Esponja	1991	Leucemia
Ziconotide	Prialt	Molusco	2004	Dores crônicas
Omega-3 Ácidos Graxos	Lovaza	Peixes	2004	Hipertrigliceridemia
Nelarabine	Arranon	Esponja	2005	Leucemia
Trabectedina	Yondelis	Tunicado	2015	Câncer de ovário, sarcoma de tecidos moles
Eribulina Mesilato	Halaven	Esponja	2010	Câncer de mama
Brentuximab Vedotin	Adcetris	Molusco/Cianobactéria	2011	Linfomas
Polatuzumab Vedotin	Polivy	Molusco/Cianobactéria	2019	Linfoma difuso de grandes células B

Enfortumab Vedotin	Padcev	Molusco/Cianobactéria	2019	Câncer urotelial
Lurbinectedina	Zepzelca	Tunicado	2020	Câncer de pulmão de pequenas células
Belantamab Mafodotin	Blenrep	Molusco/Cianobactéria	2020	Mieloma múltiplo

Figura 1. Metabólitos de organismos marinhos aprovados como medicamentos.



Transformar produtos naturais em produtos farmacêuticos requer muitas fases de testes rigorosos, estudos e ensaios pré-clínicos e clínicos. Os avanços em pesquisa científica e tecnologia oferecem caminhos eficientes para o desenvolvimento de novos medicamentos oriundos do mar ao mesmo tempo em que consideram práticas sustentáveis e preocupações ambientais (PATHAK, 2020).

1.2. Algas marinhas como fonte de moléculas bioativas

As algas merecem um destaque especial em meio aos organismos estudados na área de produtos naturais. Muitas espécies apresentam uma composição com alto potencial nutricional, tornando-se fontes de vitaminas essenciais, minerais, polissacarídeos, aminoácidos e ácidos graxos, se encaixando perfeitamente na dieta humana (BARBA, 2017).

Algas marinhas também desempenham um papel importante no meio ambiente, pois são responsáveis por boa parte da produção de oxigênio entre os organismos marinhos e são ótimos agentes biorremediadores, ajudando na redução de poluentes presentes nas águas. (SALEHI *et al.*, 2019)

As macroalgas bentônicas se dividem basicamente em três grupos de acordo com sua pigmentação, algas verdes (Chlorophyta), pardas (Ochrophyta) e algas vermelhas (Rhodophyta). São organismos capazes de produzir compostos com enorme variedade estrutural, sendo que cada grupo de algas produz diferentes metabólitos que podem estar associados aos seus mecanismos de defesa ou adaptação (SALEHI *et al.*, 2019).

As algas produzem substâncias através do seu metabolismo primário que são essenciais para a sua sobrevivência, desenvolvimento e reprodução, sendo normalmente carboidratos, proteínas e lipídios (SALEHI *et al.*, 2019).

Os carboidratos são o grupo de metabólitos primários mais abundante das algas, sendo que os principais, fucoidanos, alginatos, ágar e carrageninas, são basicamente polissacarídeos não digeríveis pelo organismo humano, que são usados como fibras alimentares, ajudando na regulação do intestino, colesterol e nível de açúcar no sangue ajudando a prevenir doenças como, diabetes, obesidade e câncer (CATARINO *et al.*, 2018).

As algas também são consideradas ricas fontes de proteínas, principalmente por possuírem em sua composição química, nove aminoácidos essenciais (histidina,

isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina). As proteínas desempenham uma série de funções em todos os organismos como, transporte e armazenamento de enzimas, anticorpos e hormônios, além de ser reservatório de energia (ØVERLAND *et al.*, 2019).

O perfil químico das macroalgas varia muito de acordo com a espécie, por exemplo, as algas pardas (Ochrophyta) são conhecidas por serem as únicas a biossintetizar os florotaninos, que são polifenóis com atividades *in vitro* promissoras como, atividade antiinflamatória, antitumoral e antibacteriana. Há também outras classes de metabólitos presentes na composição das Ochrophyta, incluindo vários terpenóides e acetogeninas (BLUNT *et al.*, 2018).

As macroalgas verdes (Chlorophyta) são as espécies conhecidas por produzirem terpenos e polipeptídeos que estão associados ao seu sistema de defesa contra peixes e herbívoros. Essas substâncias também possuem um potencial terapêutico interessante apresentando atividade antiviral, citotóxica, antimicrobiana, entre outras (LAKSHMI *et al.*, 2020).

Seja através de metabólitos primários ou secundários, as pesquisas com macroalgas marinhas têm crescido constantemente, contribuindo para um melhor conhecimento dessas espécies, de sua quimiodiversidade e de seu potencial para a descoberta de novos agentes terapêuticos.

1.3. Algas marinhas vermelhas (Rhodophytas)

As Rhodophytas constituem o terceiro e maior grupo de macroalgas com cerca de 6000 espécies identificadas, são frequentemente encontradas em diferentes ecossistemas abrangendo desde a extensão do ambiente marinho até a ocorrência em ecossistemas terrestres e água doce. Filogeneticamente, as Rhodophytas se dividem em sete classes, sendo elas: Bangiophyceae e Florideophyceae que agrupam diversas espécies, inclusive, algas comestíveis como *Porphyra yezoensis*, *Chondrus crispus* e *Kappaphycus alvarezii*. As classes Cyanidiophyceae, Compsopogonophyceae, Porphyridiophyceae, Rhodellophyceae e Stylonematophyceae são compostas por microalgas vermelhas (CARPENA *et al.*, 2023; MCKINNIE *et al.*, 2024).

A cor avermelhada característica das Rhodophytas é atribuída a presença de pigmentos como as ficobiliproteínas e carotenóides que juntamente com a clorofila,

conferem a coloração vermelha ou roxa nas espécies desse grupo (COTAS *et al.*, 2020; PARK *et al.*, 2024).

As espécies de algas vermelhas possuem grande diversidade de metabólitos secundários, tendo em sua composição todas as principais classes de metabólitos presentes nas outras espécies de macroalgas. Considerando sua composição química diversa, a divisão das Rhodophyta apresenta a maior quantidade de metabólitos secundários bioativos, contabilizando mais de 1600 compostos identificados, representando cerca de 53% dos compostos bioativos relatados em algas marinhas (BLUNT *et al.*, 2018; CARPENA *et al.*, 2023; CARROLL *et al.*, 2024).

Há anos, muitas espécies as algas vermelhas têm sido consumidas in natura ou incorporadas em diferentes tipos de alimentos que, a cada dia, se tornam mais frequentes na dieta dos seres humanos não só pelo sabor, mas também por serem consideradas ricas fontes de substâncias bioativas (ALGHAZEER *et al.*, 2022; POLAT *et al.*, 2023).

Os ácidos graxos poli-insaturados são comumente encontrados em espécies de algas vermelhas, são conhecidos por seus benefícios à saúde cardiovascular e por possuírem propriedades anti-inflamatórias, assim como os polissacarídeos sulfatados, que são amplamente utilizados na indústria alimentícia como agentes gelificantes e espessantes e apresentam atividades biológicas, incluindo propriedades antivirais, anticoagulantes e imunomoduladoras (CHAGAS *et al.*, 2020; ISMAIL *et al.*, 2020; YU *et al.*, 2021; ZHENG *et al.*, 2022).

As algas vermelhas também são ricas em vitaminas e micronutrientes, especialmente A, C, E e complexo B, que atuam como poderosos antioxidantes, ajudando a neutralizar radicais livres no corpo, reduzindo o estresse oxidativo e prevenindo danos celulares. A presença de minerais como iodo, ferro, cálcio e magnésio também contribui para a importância nutricional das Rhodophytas (ORTIZ-VIDEIRA *et al.*, 2021; PARK *et al.*, 2024; POLAT *et al.*, 2023).

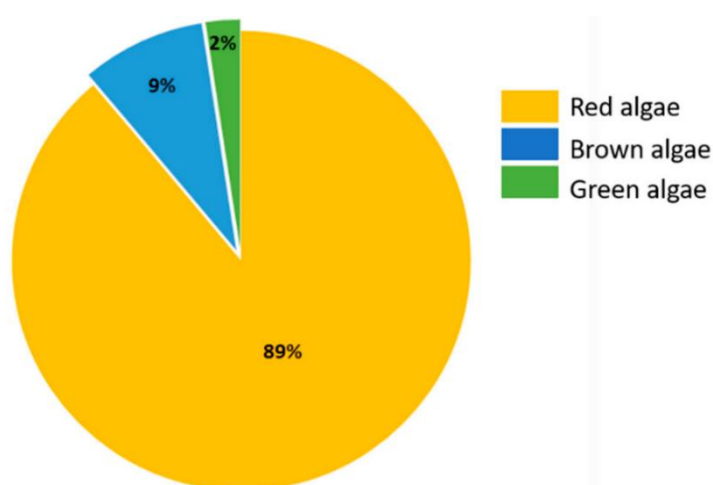
As Rhodophytas são uma fonte valiosa de fitoesteróis, moléculas estruturalmente e funcionalmente semelhantes ao colesterol, mas que só podem ser obtidos por humanos através da ingestão de alimentos onde estão presentes. Possuem propriedades anti-inflamatórias, anticancerígenas e antimicrobianas, mas o principal foco da pesquisa com fitoesteróis como fucosterol, estigmasterol e β -sitosterol, está em seus efeitos na regulação do colesterol, assim como por sua

capacidade de modular o sistema imunológico (FENG *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2022; VEZZA *et al.*, 2020).

Micosporinas também são metabólitos produzidos por espécies de Rhodophytas e estão diretamente ligados à forte atividade antioxidante apresentada por essas espécies, protegendo as células contra os danos causados pelos radicais livres, além de possuírem ação contra os raios UV-A e UV-B diminuindo seu impacto na pele, fazendo com que sejam amplamente utilizadas no desenvolvimento de produtos como: cremes, óleos, sabonetes e loções (EBRAHIMI *et al.*, 2024; ISMAIL *et al.*, 2020; MICHALAK *et al.*, 2022; SUBBIAH *et al.*, 2023).

Ainda em relação a sua composição, nos últimos anos, tem crescido o interesse sobre uma característica muito marcante das algas marinhas vermelhas, a sua capacidade de biossintetizar compostos halogenados. As macroalgas verdes, marrons e principalmente as vermelhas, são capazes de aproveitar a alta disponibilidade de íons halogenados no ambiente marinho como o cloro (Cl^-), bromo (Br^-) e iodo (I^-), oxidando-os através das enzimas haloperoxidases e incorporando-os em suas vias de biossíntese. Essa capacidade torna as Rhodophytas as principais fontes de metabólitos secundários halogenados. As espécies de algas vermelhas são responsáveis por 89% dos metabólitos isolados e identificados até o momento como mostra a (**Figura 2**) (AL-ADILAH *et al.*, 2022; JESUS *et al.*, 2019; MACHADO *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2021).

Figura 2. Distribuição de compostos halogenados em algas marinhas.



Fonte: Jesus *et al.* (2019)

Os compostos halogenados naturais (NHCs) encontrados em diferentes espécies de algas marinhas, constituem uma classe de metabólitos bastante diversificada incluindo halofenóis (117 compostos), indóis (46 compostos), sesquiterpenos (18 compostos) e derivados de naftaleno (3 compostos). No total, 184 compostos foram isolados e identificados, sendo 167 provenientes de algas marinhas vermelhas (BELOVA et al., 2021; JESUS et al., 2019).

Esses metabólitos possuem um potencial significativo como candidatos a novos produtos biotecnológicos e medicamentos, pois possuem diversas atividades biológicas como anti herbivoria e anti-incrustante que tem grande relevância ecológica, assim como, atividade antioxidante, anti-inflamatória, metabólica e antitumoral (CARPENA et al., 2023; LAVECCHIA et al., 2024).

Portanto, as Rhodophytas, com sua vasta gama de metabólitos secundários e atividades biológicas comprovadas, não só desempenham um papel ecológico crucial nos ecossistemas marinhos, como também representam uma fonte valiosa de novos compostos que podem ser destinados a biotecnologia, medicina e nutrição. No entanto, para que esses recursos possam ser aproveitados de forma responsável, é essencial que sua exploração ocorra de maneira sustentável, respeitando a conservação dos ecossistemas marinhos. Assim, é possível desenvolver novas soluções que beneficiem a sociedade e, ao mesmo tempo, preservem a biodiversidade marinha.

1.4. Espécie *Dichotomaria marginata*

O gênero *Dichotomaria* foi proposto por Lamarck (1816), porém, foi descartado e teve suas espécies reclassificadas em outro gênero, o *Galaxaura*, por Kjellmn (1900), fazendo com que *Dichotomaria marginata* passasse a se chamar *Galaxaura marginata*. Posteriormente, novas pesquisas utilizando análises moleculares e morfológicas, apontaram diferenças filogenéticas entre as espécies dos dois gêneros, fazendo com que o gênero *Dichotomaria* fosse recriado (FONTANA et al., 2024; WANG et al., 2005).

Portanto, atualmente, *Dichotomaria marginata* é classificada como uma espécie de macroalga vermelha do gênero *Dichotomaria*, pertencente ao filo das Rhodophytas, ordem Nemaliales e família Galaxauraceae. As espécies dessa família são todas calcificadas por aragonita. *D. marginata* possui de 76% a 84% de cristais

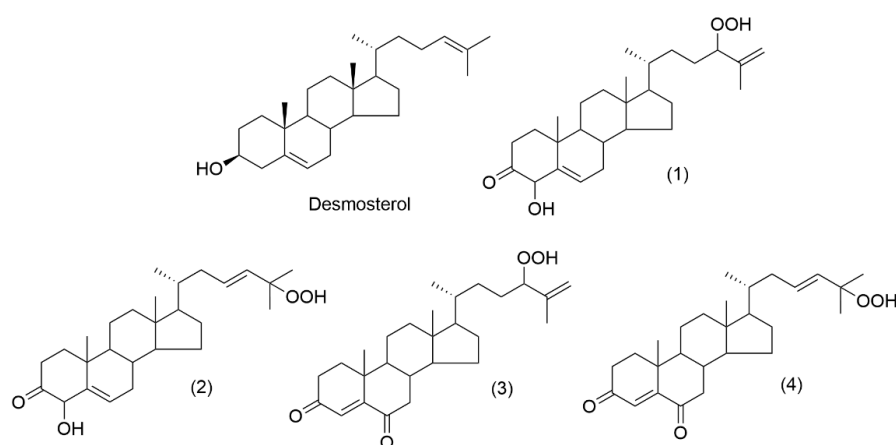
intercelulares de aragonita e é amplamente distribuída em regiões tropicais e temperadas (LIU *et al.*, 2013; RIBEIRO; YOKOYA, 2023).

Dichotomaria marginata assim como muitas espécies de macroalgas, é considerada um biorremediador e consequentemente um bioindicador de poluição marinha. A composição polissacarídica das paredes celulares e da matriz intercelular está diretamente relacionada à capacidade de retenção de substâncias poluentes (GARCIA *et al.*, 2020; RIBEIRO; YOKOYA, 2023).

De acordo com Garcia *et al.* (2020), dezesseis contaminantes emergentes foram detectados em amostras de *D. marginata* coletadas na praia da Fortaleza, em Ubatuba, SP. Algumas moléculas entre os dezesseis poluentes identificados possuem grupos que podem atuar como receptores de hidrogênio, ligando-se aos numerosos grupos hidroxila dos polímeros de açúcar, formando ligações de hidrogênio. Além dos polissacarídeos, as algas também possuem em sua composição, moléculas de lipídeos, que podem interagir com outros contaminantes de caráter apolar.

Poucos estudos relatam o potencial bioativo e quimiodiversidade da espécie *Dichotomaria marginata*. De acordo com Sheu *et al.* (1997), o extrato de *D. marginata* apresentou atividade citotóxica significativa contra carcinoma epidermóide oral e leucemia linfocítica, do mesmo extrato também foram isolados quatro derivados oxigenados do desmosterol: 24ξ-hidroperoxi-6β-hidroxicolesta-4,25-dien-3-ona (**1**), 25-hidroperoxi-6β-hidroxicolesta-4,23(E)-dien-3-ona (**2**), 24ξ-hidroperoxicolesta-4,25-dieno-3,6-diona (**3**) e 25-hidroperoxicolesta-4,23(E)-dieno-3,6-diona (**4**) (Figura 3).

Figura 3. . Desmosterol e derivados oxigenados isolados de *Dichotomaria marginata*.



Fonte: Sheu *et al.* (1997)

Em outra pesquisa, Liao et al. (2003) relataram atividade do extrato e de lectinas isoladas de *D. marginata* contra uma bactéria gram-negativa chamada *Vibrio vulnificus* que infecta humanos por meio do consumo de frutos do mar contaminados ou em contato com água do mar contaminada, causando gastroenterite ou septicemia, especialmente em indivíduos com doenças crônicas (XU et al., 2024).

Rozas e Freitas (2007) investigaram as propriedades anti-inflamatórias do extrato hexânico de *D. marginata* utilizando amostras coletadas no canal de São Sebastião, SP. O extrato apolar e as frações obtidas a partir desse extrato reduziram a inflamação tópica induzida pelo óleo de cróton em camundongos.

Martins et al (2012) estudaram as propriedades antioxidantes dos extratos de 26 espécies de algas vermelhas entre elas a *Dichotomaria marginata* e o teor de fenólicos totais produzidos por essas algas. Através do ensaio de descolorimento de β -caroteno foi constatado um percentual de 65% atividade antioxidante do extrato de *D. marginata* em uma concentração de 2,0 mg/mL. Quanto aos fenólicos totais foi verificado um teor de $89,25 \pm 8,21$ mg EAG g⁻¹. De acordo com a literatura, os compostos fenólicos estão diretamente ligados às propriedades antioxidantes de diversas espécies (SADEGHI et al., 2024).

Assim como muitas espécies de algas vermelhas, *D. marginata* também possui propriedades fotoprotetora, devido a produção de metabólitos como polissacarídeos sulfatados, carotenoides, compostos polifenólicos e principalmente aminoácidos semelhantes à micosporina. Seu extrato e substâncias isoladas tem sido amplamente estudada com intuito de desenvolver produtos que sejam eficientes contra os efeitos nocivos à pele causados pela exposição à radiação (KASANA et al., 2022; MARTINS et al., 2018; MARTINS et al., 2012).

Mesmo com poucos estudos relatando a quimiodiversidade e potencial biológico da alga *D. marginata*, é possível notar sua importância tanto como organismo biorremediador quanto como fonte de novas substâncias bioativas e matéria prima para criação de novos produtos biotecnológicos, o que justifica a continuidade dos estudos com essa espécie. Também é possível expandir os horizontes da pesquisa com a alga *D. marginata* estudando os microrganismos associados, em especial, os fungos endofíticos, que atualmente tem sido alvo de muitas pesquisas em busca de novos compostos bioativos.

1.5. Fungos associados a algas marinhas

O termo “endófito” foi introduzido primeiramente por Bary (1866), que a partir de observações microscópicas sobre a presença de células microbianas em tecidos vegetais, definiu como endófito “*qualquer organismo que cresce com tecidos vegetais*”. Posteriormente, essa definição foi reformulada por vários micologistas, porém, a definição de Petrini (1991) tem sido aceita de forma mais ampla, e nessa definição, os endófitos passaram a ser vistos como “*microrganismos assintomáticos que habitam os tecidos e órgão internos de plantas em parte de sua vida, sem causar danos aparentes ao hospedeiro*” (BOGAS *et al.*, 2024; RUNGJINDAMAI; JONES, 2024).

Nos últimos anos, os fungos têm sido encontrados em várias espécies de plantas e outros organismos, e estima-se que possam existir mais de um milhão de espécies com potencial ainda inexplorado (JEEWON *et al.*, 2019).

Apesar de ainda receberem menos atenção do que as plantas, esses microrganismos têm despertado crescente interesse, especialmente após a publicação do estudo de Stierle *et al.* (1993), que relatou a capacidade do fungo endofítico *Taxomyces andreanae* isolado de *Taxus brevifolia*, de produzir o taxol, importante substância utilizada no tratamento do câncer. Esse achado gerou entusiasmo na comunidade científica, uma vez que, até então, o taxol era obtido apenas das cascas do teixo, exigindo grandes quantidades de material vegetal para tratar apenas um paciente (JEEWON *et al.*, 2019).

Contudo, pesquisas mais recentes baseadas em análises genômicas não identificaram os genes biossintéticos essenciais para a produção de taxol em *T. andreanae*, levantando dúvidas quanto à autenticidade dessa capacidade metabólica (NARMANI *et al.*, 2022). Além disso, diversos relatos subsequentes sobre a produção de taxol por fungos endofíticos enfrentam críticas quanto à reprodutibilidade e baixos rendimentos (MEENA *et al.*, 2023). Mesmo não tendo a capacidade de produzir taxol, o estudo com *Taxomyces andreanae* impulsionou a busca por fungos com potencial para produzir metabólitos com aplicações farmacológicas, contribuindo significativamente para o avanço da bioprospecção microbiana.

A relação simbiótica dos fungos com seu hospedeiro é bastante interessante e benéfica, desempenhando um papel essencial na manutenção da saúde dos organismos envolvidos. Os fungos associados são capazes de produzir metabólitos

que estão relacionados à defesa contra possíveis patógenos vegetais, herbívoros, além de uma série de estresses bióticos e abióticos, além de contribuir para o desenvolvimento da espécie hospedeira. Para os microrganismos, a vida em simbiose permite desfrutar de um ambiente com menos competição com outros microrganismos e conseqüentemente, mais nutrientes disponíveis (YAN et al., 2018).

Atualmente, a busca por substâncias bioativas tem se tornado cada vez mais urgente à medida que novos desafios são impostos à vida humana. Ameaças como bactérias resistentes, vírus, câncer entre outras, afetam diariamente a saúde de milhares de pessoas e requerem novos agentes terapêuticos visando ao bem-estar humano (AHMED et al., 2023).

Pesquisadores da área de produtos naturais, em diversos países e instituições, têm concentrado esforços na busca por substâncias bioativas explorando diferentes fontes naturais. Uma das mais promissoras são os fungos associados provenientes do ambiente marinho, que combinam a rica biodiversidade desse ecossistema com o elevado potencial biossintético dos fungos, resultando em uma quimiodiversidade notável (AHMED et al., 2023; EL-HAWARY et al., 2020).

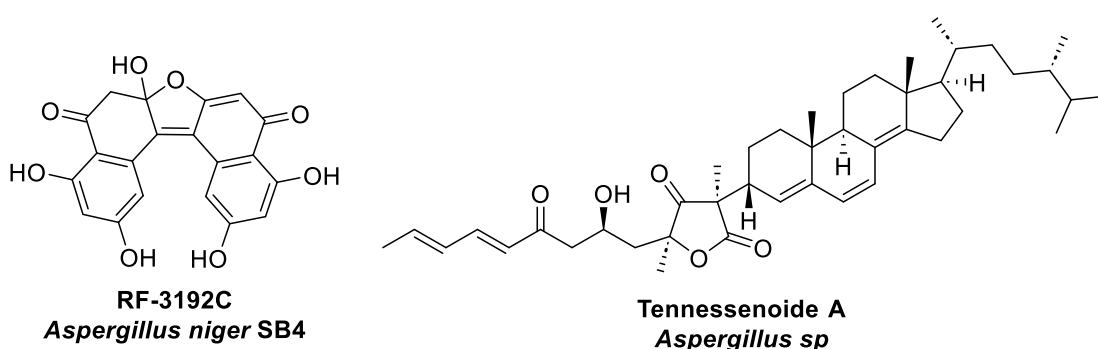
Nesse contexto, as algas marinhas têm se destacado como hospedeiras de espécies de fungos, impulsionando o crescimento das pesquisas voltadas para esses organismos. Nos últimos anos, diversos estudos relataram a descoberta de substâncias produzidas por esses microrganismos associados a macroalgas. Esses compostos naturais pertencem a variadas classes químicas, como peptídeos, policetídeos, lactonas, alcaloides e terpenos, e demonstram uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo propriedades anticancerígenas, antibacterianas, antioxidantes, antimicóticas e a inibição da enzima acetilcolinesterase. A associação entre fungos e algas, portanto, desponta como uma promissora fonte de novos agentes terapêuticos (CARROLL et al., 2024; SARASAN et al., 2017; ZHANG; LI; WANG, 2016).

De 2019 a 2022, mais de duzentas substâncias inéditas foram isoladas e identificadas a partir de fungos de algas marinhas, com a maioria desses fungos associados a macroalgas vermelhas, com destaque para os gêneros *Aspergillus* que foi fonte com maior percentual, seguido do *Trichoderma* (CARROLL et al., 2021, 2022, 2023, 2024).

Mahmound et al. (2021), investigaram o extrato metanólico do fungo *Aspergillus niger* SB4, associado à alga marinha vermelha *Laurencia obtusa* e isolaram um novo

policetídeo pentacíclico denominado FR-3192C (**Figura 4**). Através de testes antimicrobianos foi constatado a atividade do composto FR-3192C frente a *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*. Em outro trabalho mais recente, pesquisadores estudaram a espécie *Aspergillus sp.*, associado à alga marinha vermelha *Grateloupia turuturu*, e isolaram um novo metabólito híbrido policetídeo-terpeno denominado tennessenoide A (**Figura 4**). Essa nova substância apresentou ampla atividade antifúngica contra oito espécies de fungos fitopatógenos comprovada através do teste de difusão em ágar, com zona de inibição variando de 2 a 7 mm de diâmetro (ZHAO *et al.*, 2022).

Figura 4. Estruturas RF-3192C (*Aspergillus niger* SB4) e Tennessenoide A (*Aspergillus sp*)

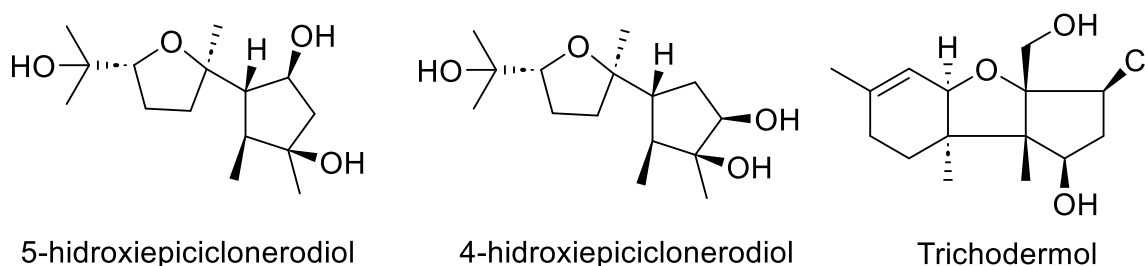


Fonte: Mahmoud *et al.*, (2021)

Xin-Yue Ma e colaboradores (2021), relataram dois novos sesquiterpenos cicloneanos (óxido de 5-hidroxiépíclonerodiol e óxido de 4-hidroxiépíclonerodiol) e um sesquiterpeno tricotecano halogenado (tricodermol clorohidrina), isolados do endófito *Trichoderma hamatum* Z36-7 associado a alga marinha vermelha *Grateloupia sp.* As substâncias isoladas (**Figura 5**) foram avaliadas quanto a sua atividade antimicrobiana contra bactérias marinhas e fitotoxicidade contra espécies de fitoplânctons. Os dois sesquiterpenos cicloneanos mostraram bom potencial antimicrobiano, inibindo o crescimento de todas as bactérias testadas (*Vibrio anguillarum*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* e *V. splendidus*), enquanto o tricodermol clorohidrina não mostrou atividade significativa. As substâncias foram testadas frente às espécies de fitoplanctons (*Amphidinium carterae*, *Chattonella marina* e

Prorocentrum donghaiense), mas apresentaram atividade apenas contra *Chattonella marina*.

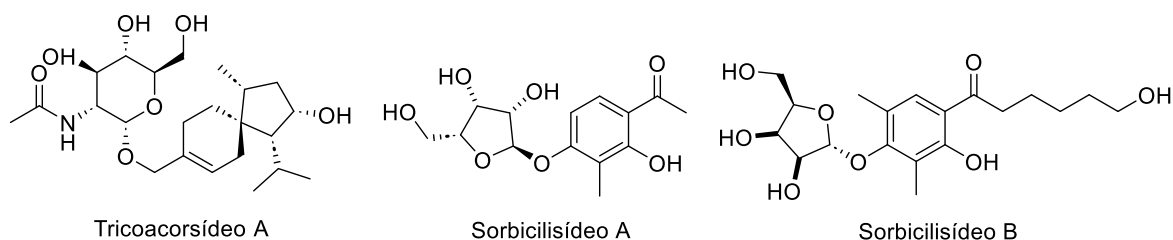
Figura 5. Novos sesquiterpenos cicloneranos e sesquiterpeno tricotecano halogenado



Fonte: Xin-Yue Ma et al., 2021.

Wang et al. (2022) isolaram um novo glicosídeo sesquiterpênico do tipo acorano, o trichoacorsídeo A, e dois glicosídeos sorbicilínóides, os sobicilísídeos A e B a partir do fungo endofítico *Trichoderma longibrachiatum* EN-586, obtido da alga marinha vermelha *Laurencia obtusa*. Estas substâncias (**Figura 6**) foram avaliadas quanto a sua capacidade antimicrobiana, o trichoacorsídeo apresentou atividade moderada contra *Staphylococcus aureus* resistente a metilina e a bactéria aquática *Vibrio harveyi*, além de outros patógenos, os sorbicilísídeos A e B exibiram potente atividade *Aeromonas hydrophilia* com MIC de 4 µg/mL que é comparável ao controle positivo cloranfenicol.

Figura 6. Novo glicosídeo sesquiterpênico e glicosídeos sorbicilínóides



Wang et al., (2022).

Em trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, o Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) com espécies de fungos endofíticos associados as algas *Asparagopsis taxiformis*, *Acanthophora*

spicifera, *Sargassum vulgare* e *Dichotomaria marginata*, foram identificados metabólitos secundários com diversas atividades biológicas como, antimicrobiana, antifúngica, anticolinesterásica, leishmanicida, tripanocida, citotóxica. Entre as espécies estudadas, destaco o endófito *Fusarium solani* que foi isolado a partir de tecidos da alga *Dichotomaria marginata* e em estudos iniciais apresentou potencial citotóxico promissor e foi escolhido como foco desta pesquisa na busca por novas substâncias bioativas (HONÓRIO, 2018).

1.6. O gênero *Fusarium*

O gênero *Fusarium* foi descrito pela primeira vez em 1809 por Johann Heinrich Friedrich Link. No entanto, ele permaneceu relativamente negligenciado até a publicação de "Die *Fusarium*" por Wollenweber e Reinking em 1935, na qual foram descritas 65 espécies, 55 variedades e 22 formas de *Fusarium*. Ao longo da história, outros nomes genéricos foram propostos para diferentes isolados de *Fusarium*, com base na morfologia dos seus estágios sexuais, como *Gibberella*, *Nectria* e *Neocosmospora*. No entanto, para evitar confusões taxonômicas, apenas o nome *Fusarium* passou a ser utilizado. Atualmente, mais de 400 espécies filogeneticamente distintas estão incluídas em 23 complexos monofiléticos no gênero *Fusarium*, embora nem todas essas espécies tenham sido formalmente identificadas ainda (GOMEZ-CHAVARRIA *et al.*, 2024).

Fusarium é um gênero pertencente ao filo Ascomycota, que inclui várias outras espécies com características patogênicas relevantes que afetam principalmente plantas e animais, porém com alguns relatos sobre contaminação em humanos com a toxina T-2. Muitas espécies de *Fusarium* são constantemente associadas a doenças de plantas pela sua capacidade de produzir micotoxinas que causam problemas agrícolas como, apodrecimento de folhas, frutos e principalmente raízes, visto que as espécies deste gênero normalmente são isoladas do solo (DWEBBA *et al.*, 2017).

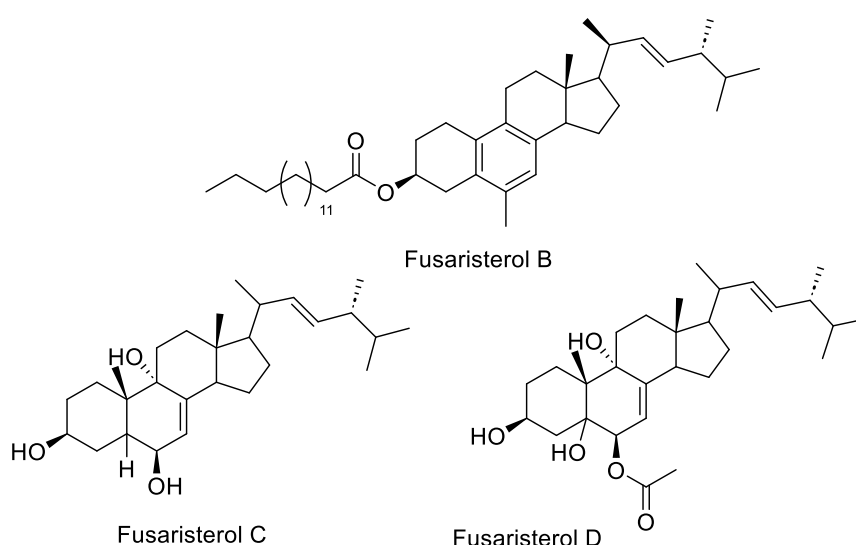
Por um lado, as diferentes espécies de *Fusarium* representam uma grande ameaça ao setor agrícola, sendo responsáveis por perdas econômicas bilionárias, mas por outro, especialmente quando isoladas em sua fase anamorfa, representam uma fonte bastante diversificada de metabólitos secundários com atividades biológicas bastante significativas, chamando a atenção da comunidade científica que

tem buscado a cada dia entender mais sobre sua quimiodiversidade e sua capacidade de associação com diferentes hospedeiros. Atualmente o *Fusarium* é considerado um dos gêneros fúngicos mais dominantes do mundo, devido a sua incrível capacidade de crescer em uma ampla gama de ambientes, ficando atrás somente dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* sp (SINGH *et al.*, 2021; YADAV; MEENA, 2021).

Muitas pesquisas têm buscado isolar metabólitos secundários produzidos por espécies de *Fusarium* associados a diferentes hospedeiros e testar suas atividades biológicas, diversos trabalhos nesse sentido foram publicados ao longo dos anos e alguns destes trabalhos principalmente os mais recentes, relatam novas substâncias que podem ajudar tanto no entendimento das espécies de *Fusarium*, como na busca por novos medicamentos (AHMED *et al.*, 2023).

Khayat e colaboradores (2019) isolaram três novos derivados do ergosterol (**Figura 7**), nomeados como Fusaristeróis B, C e D, do fungo endofítico *Fusarium* sp associado a uma planta medicinal chamada de *Mentha longifolia* L (hortelã-silvestre). Esses metabólitos foram investigados quanto ao seu potencial anti-inflamatório através da inibição da enzima 5-lipoxigenase (5-LOX). O Fusaristerol B apresentou potencial anti-inflamatório promissor com IC₅₀ de 3,61 µM em comparação com o controle indometacina, os Fusaristeróis C e D apresentaram atividade moderada, com IC₅₀ de 7,01 e 4,79 µM.

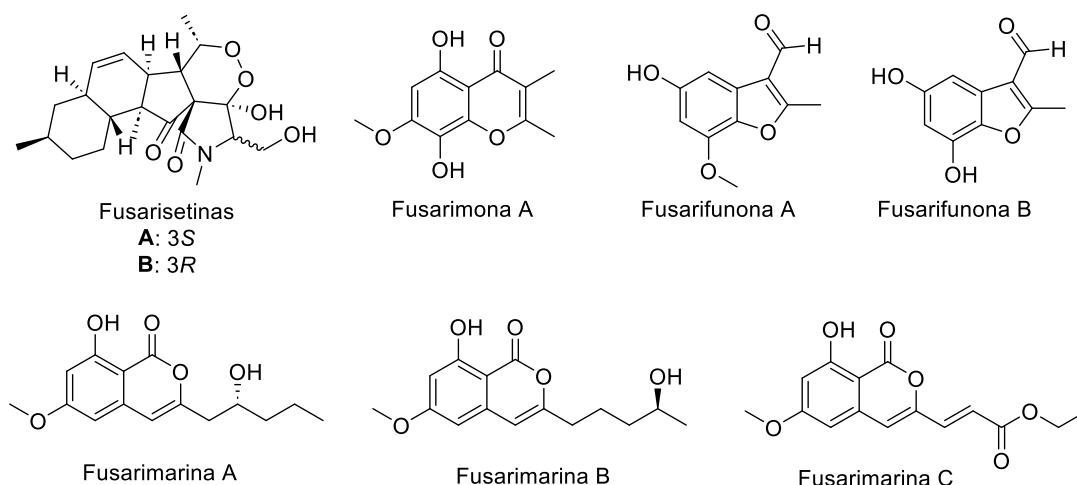
Figura 7. Novos derivados do ergosterol isolados do fungo endofítico *Fusarium* sp



Fonte: Khayat *et al.*, 2019.

Em outra pesquisa com a espécie *Fusarium* sp, porém, isolado de *Kandelia candel* uma espécie de mangue do mar da China, foram isolados oito novos compostos de quatro classes distintas (**Figura 8**). Dois derivados do ácido 3-decalinoiltetrânico, fusarisetinas E e F, uma cromona, fusarimona A, dois benzofuranos, fusarifunona A e B, além de três isocumarinas, fusarimarinas A, B e C. Os compostos foram avaliados quanto a sua citotoxicidade contra células A549 (carcinoma de pulmão), HELA (carcinoma cervical), KYSE150 (carcinoma escamoso esofágico), PC-3 (carcinoma pancreático) e MDA-MB-435 (carcinoma de mama). Entre as novas estruturas, apenas as fusarisetinas E e F se mostraram eficazes, apresentando citotoxicidade seletiva contra A549 com valores de IC₅₀ de 8,7 e 4,3 µM (CHEN *et al.*, 2022).

Figura 8. Novos compostos isolados de *Fusarium* sp derivado de mangue



Fonte: Chen *et al.*, 2022.

Recentemente, o fungo endofítico *Fusarium equiseti* UBOCC-A-117302 obtido através de uma amostra de água do mar da região costeira do Chile, foi cultivado em meio de Czapek-Dox com uma concentração de 3% de sais marinhos e produziu diversas substâncias, entre elas, seis derivados da fusarocromona (**Figura 9**) dos quais dois são inéditos, o desacetilfusarocromeno e desacetamidofusarocromo-2',3-dieno e mais quatro anteriormente relatados, fusarocromanona TDP-2, fusarocromeno, 2,2-dimetil-5-amino-6-(2' *E* -eno-4'-hidroxilbutiril)-4-cromona,

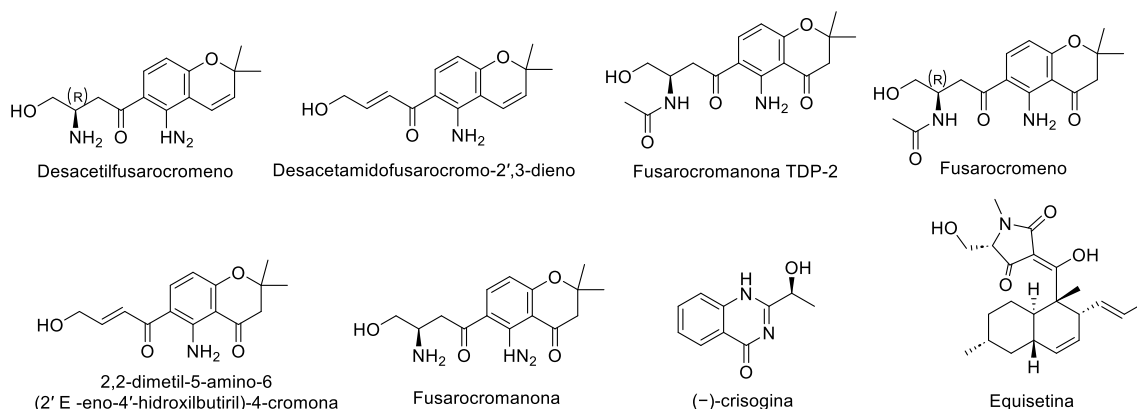
fusarocromanona, além da crisogina e equisetina. Essas substâncias foram submetidas a três tipos de atividades biológicas, ensaios de inibição de proteínas quinases, ensaio citotóxico e ensaio antimicrobiano (PHAM *et al.*, 2024).

Em relação a atividade inibitória de proteína quinase, o desacetamidofusarocromo-2,3-dieno e 2,2-dimetil-5-amino-6-(2'-E-eno-4-hidroxilbutiril)-4-cromona se destacaram, mostrando inibição de três proteínas cinases, ABL1, JAK3 e EphB1, com valores de IC₅₀ variando de 1,42 a 25,48 µM (PHAM *et al.*, 2024)..

Quanto a atividade citotóxica, todas as substâncias foram testadas contra células U-2 OS (osteossarcoma), HCT-116 (câncer colorretal) e uma linhagem celular não cancerígena, hTERT RPE-1 (células epiteliais pigmentadas da retina imortalizadas com hTERT). Fusarocromanona TDP-1 apresentou a maior citotoxicidade, com valores de EC₅₀ de 0,058 µM (RPE-1), 0,170 µM (HCT-116) e 0,232 µM (U2OS) (PHAM *et al.*, 2024).

Por fim, os compostos foram avaliados quanto às suas atividades antimicrobianas contra bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* CIP 8297 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Enterococcus faecalis* CIP A 186, *Bacillus cereus* ATCC 6464 e *Listeria monocytogenes* SOR 100) e a levedura *Candida albicans* ATCC 90028. Os compostos desacetamidofusarocromo-2',3-dieno, fusarocromeno apresentaram atividade contra *Listeria monocytogenes* (MIC de 125 µM) e a equisetina teve atividade contra *B. cereus* (MBC de 7,8 µM) e *L. monocytogenes* (MBC de 31,25 µM) (PHAM *et al.*, 2024).

Figura 9. Compostos isolados do fungo *Fusarium equiseti* UBOCC-A-117302



Fonte: Pham et al., 2024

As pesquisas mostram que as espécies *Fusarium* possuem uma incrível capacidade de colonização, adaptando-se com eficiência a diferentes ambientes, incluindo o ecossistema marinho. Embora sejam mais conhecidas por habitarem solos e causarem doenças em plantas, algumas espécies também se estabelecem em ambientes marinhos, colonizando superfícies de organismos como macroalgas, corais e outros habitantes aquáticos. Nessas condições, conseguem sobreviver à alta salinidade e interagir com diversas espécies, graças à sua versatilidade genética e metabólica, que lhes permite sintetizar enzimas e metabólitos secundários adaptados ao ambiente. Essa habilidade de colonizar e prosperar em variados nichos não apenas revela a adaptabilidade das espécies de *Fusarium*, mas também faz delas potenciais fontes de compostos bioativos com interesse farmacológico, especialmente pelos processos e substâncias únicas que produz em resposta às pressões do ambiente marinho (DESHMUKH *et al.*, 2018).

1.7. A espécie *Fusarium solani*

Fusarium solani foi inicialmente descrito como *Fusisporium solani* por von Martius, em 1842, na Alemanha, a partir de estudos relacionados à podridão do tubérculo da batata. Desde então, o fungo tem sido reconhecido como um patógeno devastador em diversos contextos agrícolas, destacando-se por sua capacidade de infectar culturas economicamente importantes, como feijoeiros e outras leguminosas, onde causa doenças como a podridão radicular. Este comportamento patogênico é impulsionado pela produção de enzimas líticas e metabólitos tóxicos, que permitem a

degradação dos tecidos do hospedeiro, resultando em perdas significativas na produção agrícola e afetando a segurança alimentar global. Além disso, *F. solani* também foi identificado como um patógeno oportunista em humanos, especialmente em indivíduos imunocomprometidos, causando infecções oculares, sistêmicas e em tecidos moles (COLEMAN, 2016; SCHROERS *et al.*, 2016).

Atualmente, *F. solani* é considerado um complexo de espécies crípticas com ampla distribuição na natureza, que vai além de sua atuação como patógeno. Estudos recentes revelaram sua capacidade de viver em simbiose com diversos hospedeiros, incluindo plantas e algas marinhas. Nessa fase simbiótica, o fungo é capaz de estabelecer relações benéficas, auxiliando o hospedeiro a lidar com estresses ambientais, como salinidade e seca (COLEMAN, 2016; SCHROERS *et al.*, 2016).

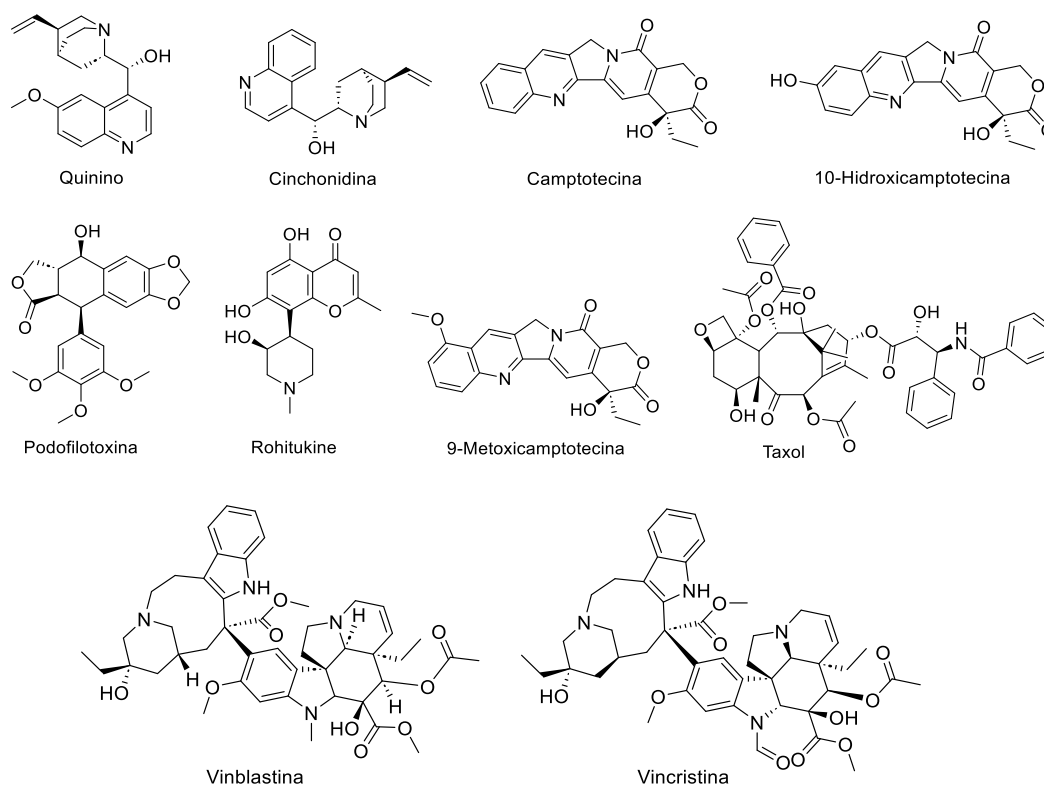
Além disso, *F. solani* ganhou destaque como fonte de metabólitos bioativos, incluindo compostos farmacologicamente relevantes, como o taxol, mitoxantrona, aloe-emodina e camptotecina, amplamente utilizados como anticancerígenos, a vitexina, com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, entre outros (**Quadro 2**). Essa dualidade entre patogenicidade e mutualismo posiciona o fungo como um organismo de interesse tanto na área de fitopatologia quanto na biotecnologia.

Quadro 2. Princípios ativos de medicamentos conhecidos isolados de *Fusarium solani*

Medicação	Planta Hospedeira	Referências
Quinino	<i>C. calisaya</i>	Hidayat et al. (2015)
Cinchonidina	<i>C. calisaya</i>	
Camptotecina	<i>C. acuminata</i> , <i>A. dimidiata</i> , <i>C. acuminata</i> ,	Ran et al. (2017) Shweta et al. (2010) Kusari et al. (2009)
10-hidroxicamptotecina	<i>A. dimidiata</i> <i>C. acuminata</i>	Shweta et al. (2010) Kusari et al. (2009)
9-metoxicamptotecina	<i>A. dimidiata</i> <i>C. acuminata</i>	Shweta et al. (2010) Kusari et al. (2009)
Podofilotoxina	<i>P. hexandrum</i>	Nadeem et al. (2012)
Rohitukine	<i>D. binectariferum</i>	Kumara et al. (2014)
Taxol	<i>T. chinensis</i> <i>T. célebica</i>	Deng et al. (2009) Chakravarthi et al. (2008)
Vinblastina	<i>C. roseus</i>	Ashuthosh et al. (2013)
Vincristina		

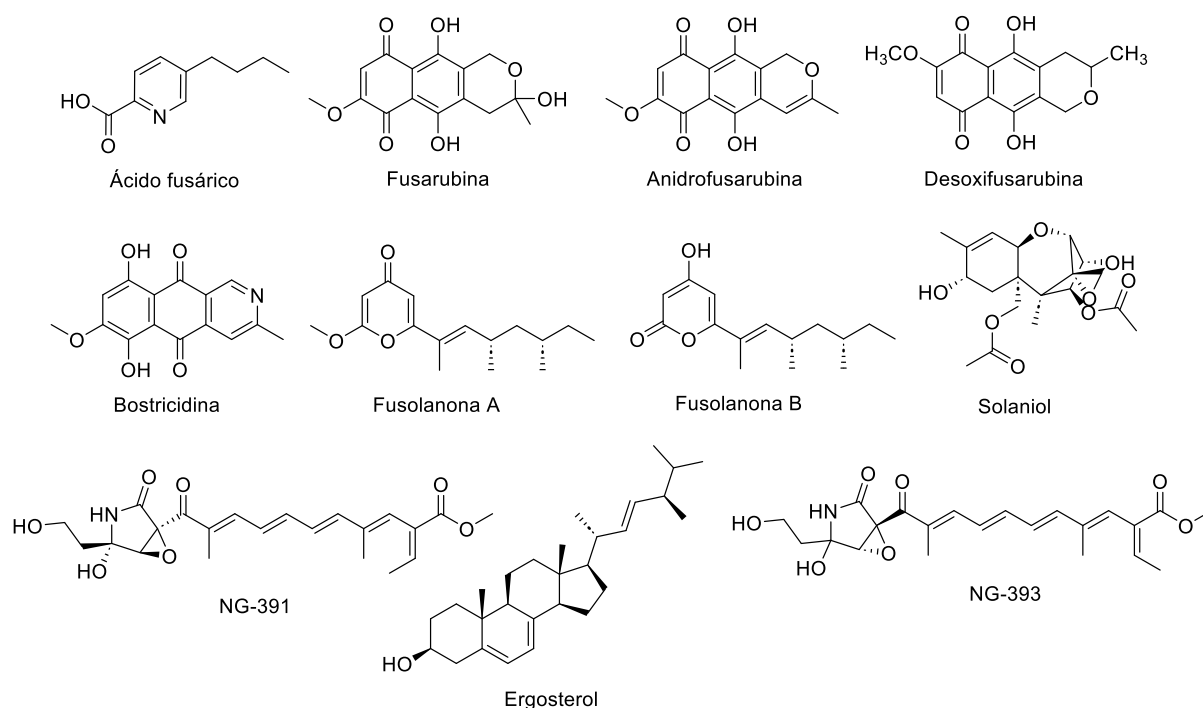
Fonte: Toghueo, (2019)

Figura 10. Princípios ativos de medicamentos conhecidos isolados de *Fusarium solani*



Fonte: Toghueo, (2019)

Algumas substâncias são características do fungo *Fusarium solani* e de outras espécies pertencentes ao gênero *Fusarium*, e se destacam principalmente por suas atividades citotóxicas e antimicrobianas. Entre essas substâncias isoladas (**Figura 11**), podemos citar o ácido fusárico, fusarubina, anidrofusarubina, 3-desoxifusarubina, bostricidina, fusolanonas A e B, NG-391 e NG-393 e o solaniol (AHMED *et al.*, 2023; KHAN *et al.*, 2018).

Figura 11. Principais substâncias isoladas de *Fusarium solani*

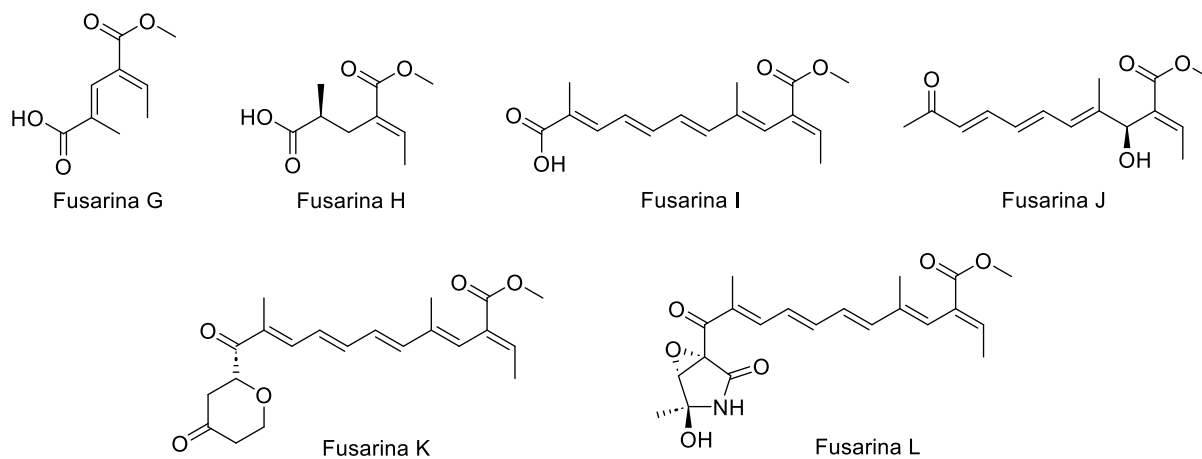
Fonte: Khan et al., (2018); Ahmed et al., (2023)

Além de sua capacidade de biossintetizar compostos bioativos que, até recentemente, eram atribuídos exclusivamente às plantas e alguns fungos característicos do seu gênero, *Fusarium solani* tem se mostrado um alvo promissor para estudos de bioprospecção com interesse em substâncias inéditas. O interesse por essa espécie deriva de sua versatilidade metabólica e da produção de metabólitos secundários com potenciais aplicações farmacêuticas e industriais (POKHREL; COLEMAN, 2023; SHALAPY; KANG, 2022).

Em uma pesquisa realizada por Luo et al. (2021), foram isoladas seis novas fusarinas, denominadas G–L (**Figura 12**), a partir do fungo *Fusarium solani* obtido de amostras de água do mar. Entre essas substâncias, quatro apresentaram atividade anti-inflamatória, inibindo a produção de óxido nítrico em células RAW264.7 ativadas por lipopolissacarídeo (LPS). A fusarina H, por exemplo, apresentou bioatividade com um valor de IC₅₀ de 22,3 µM. A fusarina I demonstrou uma bioatividade ainda mais expressiva, com um IC₅₀ de 13,1 µM, enquanto a fusarina J exibiu IC₅₀ de 13,9 µM. A fusarina K também apresentou atividade relevante, com IC₅₀ de 21,9 µM. Por outro

lado, as fusarinas G e L não mostraram bioatividade significativa, apresentando valores de IC₅₀ superiores a 50 µM.

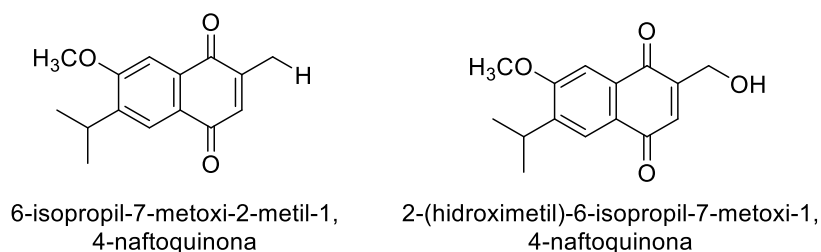
Figura 12. Novas fusarinas isoladas de *Fusarium solani*



Luo et al. (2021)

Qiu et al., (2023) isolaram duas novas substâncias da classe das naftoquinonas, extraídas do fungo endofítico *Fusarium solani*, associado a espécie *Nicotiana tabacum* (tabaco) utilizado para produção de charutos. Essas substâncias foram identificadas como 6-isopropil-7-metoxi-2-metil-1,4-naftoquinona e 2-(hidroximetil)-6-isopropil-7-metoxi-1,4-naftoquinona (**Figura 13**). Ambas mostraram bioatividade significativa contra a bactéria *Pseudomonas syringae*, principal agente patogênico da mancha angular das folhas do tabaco. Os valores de MIC₅₀ (Concentração Inibitória Mínima que reduz 50% do crescimento bacteriano) foram de 6,8 µg/mL e 5,9 µg/mL para as duas substâncias, respectivamente indicando potencial uso como agentes antibacterianos naturais.

Figura 13. Novas naftoquinonas isoladas de *Fusarium solani*



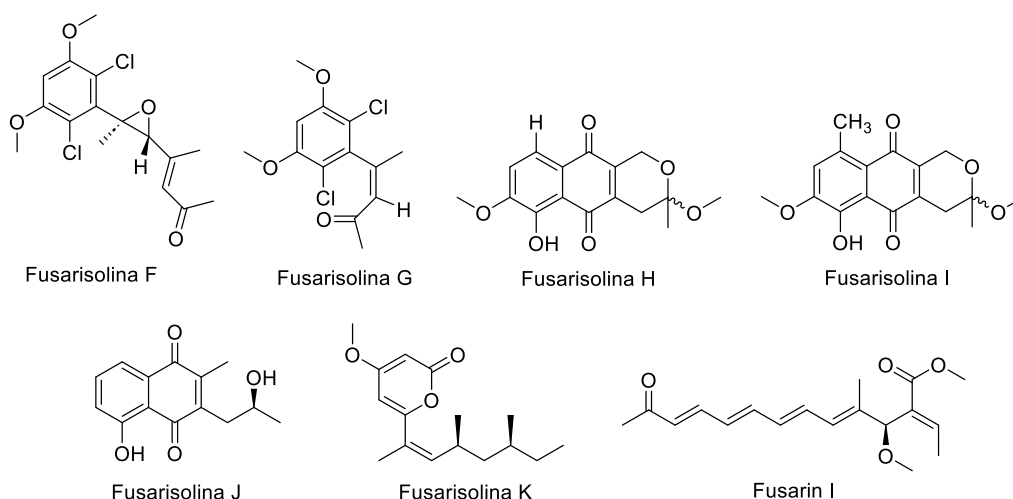
Qiu et al. (2023)

Em outra pesquisa recente realizada por Lin et al. (2023), foram isolados sete novos policetídeos do fungo *Fusarium solani* 8388, coletado na área de Shenhui, no Mar do Sul da China. Esses compostos, denominados fusarisolinas F, G, H, I, J, K e fusarina I (**Figura 14**), apresentaram estruturas químicas únicas e foram submetidos a ensaios biológicos para avaliação de sua atividade antibacteriana e citotoxicidade.

Entre as substâncias isoladas, a fusarisolina I e a fusarisolina J destacaram-se por suas significativas atividades antibacterianas contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). A fusarisolina I demonstrou um potente efeito inibitório, com um valor de MIC de 3 µg/mL, enquanto a fusarisolina J apresentou o mesmo MIC contra MRSA e, adicionalmente, exibiu citotoxicidade moderada contra linhagens celulares humanas de câncer, incluindo HeLa, A549 e KB, com valores de CC₅₀ variando entre 9,21 e 14,02 µM. Além disso, a fusarisolina H mostrou atividade antibacteriana moderada contra MRSA, com um MIC de 6 µg/mL (LIN et al., 2023).

Por outro lado, as fusarisolinas F, G e K, bem como a fusarina I, não exibiram bioatividade significativa nos ensaios realizados. Esses resultados evidenciam o potencial das fusarisolinas I e J como candidatos promissores para o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos e anticancerígenos (LIN et al., 2023).

Figura 14. Policetídeos isolados de *Fusarium solani* de sedimentos marinhos



Lin et al. (2023)

A maioria dos estudos de bioprospecção em *Fusarium solani* e em outras espécies do gênero *Fusarium*, gira em torno de linhagens isoladas de folhas e principalmente raízes de plantas terrestres, mas a exemplos das recentes pesquisas citadas anteriormente, tem crescido o interesse pelo estudo dessa espécie quando associada a organismos marinhos, como: esponjas, corais, algas marinhas entre outros organismos, enfatizando a importância da realização de novas pesquisas com intuito de explorar a quimiodiversidade do fungo endofítico *Fusarium solani* (AHMED et al., 2023; CARROLL et al., 2023).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Explorar o potencial biológico e a quimiodiversidade do fungo endofítico *Fusarium solani* isolado da alga marinha *Dichotomaria marginata*.

2.2. Específicos

- Construir a curva de crescimento do fungo *Fusarium solani* em meio líquido de extrato de malte;
- Avaliar o perfil metabólico e atividade citotóxica dos extratos preparados para estabelecer a curva de crescimento;
- Cultivar o fungo em meios sólidos de aveia, trigo e arroz;
- Fracionar os extratos obtidos no cultivo em meios sólidos;
- Avaliar o perfil metabólico dos extratos em meios sólidos e frações de partição;
- Avaliar atividade citotóxica dos extratos em meios sólidos e frações de partição;

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Meios de cultivo

Os cultivos da linhagem *Fusarium solani* em estudo, foram realizados com meios de extrato de malte, BDA, aveia, farelo de trigo e arroz, conforme descrito na (Tabela 3).

Quadro 3. Meios de cultivo utilizados na pesquisa

Meios de Cultivo	Tipo	Composição	Fabricante
Extrato de Malte	Líquido	Maltose	Neogen®
BDA	Sólido	Batata (4 g) Dextrose (20 g) Ágar (15 g)	Neogen®
Aveia	Sólido	Flocos de aveia	Quaker
Trigo	Sólido	Farelo de trigo	Campo Belo
Arroz	Sólido	Arroz parboilizado	Prato Fino

3.2. Solventes

Os solventes orgânicos utilizados para procedimentos de partição líquido-líquido, obtenção dos extratos e análises cromatográficas foram, metanol, acetato de etila, acetonitrila e hexano, conforme descrito na (Tabela 4).

Quadro 4. Solventes utilizados na pesquisa

Solventes	Especificação	Sigla	Fabricante
Metanol	P. A	MeOH	Synth®
	Grau HPLC	MeOH	Merck®
	Deuterado	MeOD	Merck® / Sigma-Aldrich®
Acetato de Etila	P. A	AcOEt	Synth®
Acetonitrila	Grau HPLC	ACN	J. T. Baker Solusorb®
Hexano	P. A	Hex	

3.3. Procedimentos gerais e equipamentos

3.3.1. Preparo de amostras para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE

Para as análises em CLAE, 10 mg de cada amostra foram solubilizados em 1 mL de MeOH, e em seguida foi realizada a extração em fase sólida com cartuchos de C18 (500 mg). Primeiramente, os cartuchos foram ativados com MeOH (3 mL) e

equilibrados com 5 mL de solução MeOH:H₂O/95:5 (v/v). Após o condicionamento, as amostras foram aplicadas nos cartuchos e eluídas com solução MeOH:H₂O/95:5 (v/v) (5 mL). Após secagem, as amostras foram pesadas e diluídas para a concentração adequada e depois centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes de cada amostra foram transferidos para vials de 2 mL e submetidos à análise. Para substâncias isoladas, não houve necessidade de *clean up*. As concentrações variam de acordo com o tipo de amostra e com o tipo de análise, como mostra a (Tabela 5).

Quadro 5. Concentrações de amostras utilizadas em casa equipamento.

Tipo de análise	Extrato Concentração	Fração Concentração	Subst. Isolada Concentração
CLAE-DAD - Analítico	1 a 5 mg/mL	1 a 5 mg/mL	1 mg/mL
CLAE-DAD - Preparativo	10 a 20 mg/mL	10 a 20 mg/mL	-
CLAE-EM-IES	1 mg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL
CLAE-EM-Q-ToF	250 ppm	250 ppm	1 ppm

3.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Modo Analítico (CLAE-DAD)

Para análises dos perfis cromatográficos das amostras, foi utilizado cromatógrafo Shimadzu, composto por bombas LC-20AT, injetor automático SIL-20A, detector ultravioleta SPD-M20A com arranjo de diodos, módulo de comunicação CBM-20A, degaseificador DGU-20A₃ e *software* LC-Solution. Também foi utilizada uma coluna de fase reversa C₁₈ da marca Phenomenex LUNA, com as dimensões 250 mm x 4,60 mm e partículas com granulação de 5 µm.

3.3.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Espectrômetro de Massas com Analisador Ion Trap (CLAE-EM-IES)

A análise do perfil químico de cada amostra por CLAE-EM foram obtidas por meio de um cromatógrafo Shimadzu®, composto por bombas LC-20AD, injetor automático SIL-20AHT, detector ultravioleta com arranjo de diodos SPD-M20A, módulo de comunicação CBM-20A, Modo: Auto-MS. MS/MS Frag Ampl: 75%. Full: 50-1200 *m/z* e degaseificador DGU-20A₃, com o *software* HighStar. Utilizou-se também uma coluna de fase reversa C₁₈ (Phenomenex LUNA: 250 mm x 4,60 mm e 5 µm). O sistema Shimadzu® opera em conjunto com um espectrômetro de massas da SL Bruker®, modelo Amazon SL, equipado com fonte de ionização Eletrospray (ESI),

analisador Ion Trap e software MassControl. Para a manipulação dos dados obtidos, foi empregado o software DataAnalysis da Bruker.

3.3.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Espectrômetro de Massas com Analisador Quadrupole Time of Flight (CLAE-EM-Q-ToF)

Para as análises de CLAE-EM de alta resolução, foi utilizado um Cromatógrafo Líquido de Ultra Performance Acquity H-Class da Waters®, composto dos módulos: Bomba quaternária (Quaternary Solvent Manager); Detector de Arranjo de Diodos; Forno de coluna e Injetor automático (Sample Manager – FTN); coluna de fase reversa (Waters Acquity UPLC HSS T3 1,8 µm 2,1 x 100 mm) e pré coluna (Waters Acquity UPLC HSS T3 1,8 µm VanGuard 2,1 x 5 mm). O Espectrômetro de Massas utilizado foi o equipamento Xevo G2-XS QToF, com fonte de ionização Eletrospray (ESI); analisador Q-ToF (Quadrupole – Time of Flight) e software MassLinx. No processamento de dados, utilizou-se o software MassLinx (Waters ®).

3.3.5. Outros equipamentos utilizados no desenvolvimento da pesquisa

Equipamento	Modelo
Autoclave vertical	Phoenix Luferco – AV-137
Balanças analíticas	Mettler Toledo AG245 e AG204
Balanças semi-analíticas	Marconi (BG2000) e Bel (S 2202)
Bomba de vácuo	Buchi (V-300)
Evaporador rotativo	Heidolph (Laborota 400 efficient)
Estufa de secagem	Marconi (MA 033)
Liofilizador	Alpha (1-2 LD Plus)
Câmara de fluxo laminar	Pachane
Ultrapurificador de água	Milli-Q®, Millipore
Incubadora SHAKER	Solab (SL – 223)
Centrífuga	Eppendorf (MiniSpin 5452)
Banho Ultrasson	Elma (Elmasonic S 60 H)

4. Metodologia

4.1. Coleta do material

Em abril de 2015, exemplares da alga marinha vermelha *Dichotomaria marginata* foram coletados no costão direito da praia da Fortaleza em Ubatuba, situada no litoral norte do estado de São Paulo (**Figura 15**).

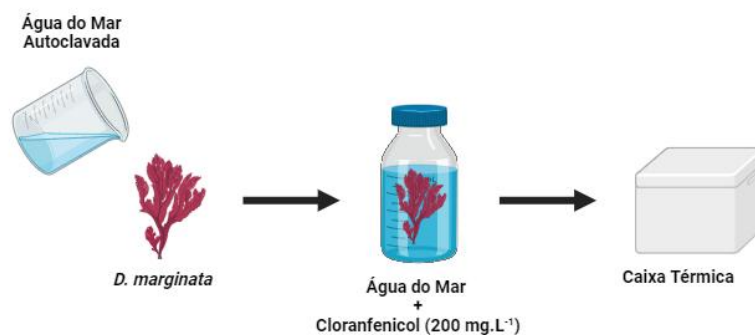
Figura 15. Localização - Praia da Fortaleza em Ubatuba



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

Após a coleta, as algas foram lavadas com água do mar e armazenadas em frascos contendo água do mar previamente autoclavada e solução do antibiótico cloranfenicol (200 mg.L^{-1}) para evitar a contaminação bacteriana, em seguida, os frascos foram acondicionados em caixas térmicas e transportados ao Instituto de Química – UNESP – Araraquara (**Figura 16**).

Figura 16. Limpeza e armazenamento das amostras



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

A identificação da alga marinha foi feita pela Dra. Nair Yokoya (Instituto de Pesquisas Ambientais (IPA) – Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo) e foi depositada uma exsicata (SP 40126) no Herbário do Instituto de Pesquisas Ambientais do Estado de São Paulo.

Em conformidade com a Lei nº 13.123/2015), as coletas de amostras de algas marinhas para este trabalho foram devidamente registradas no Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o nº de cadastro A7ED4A.

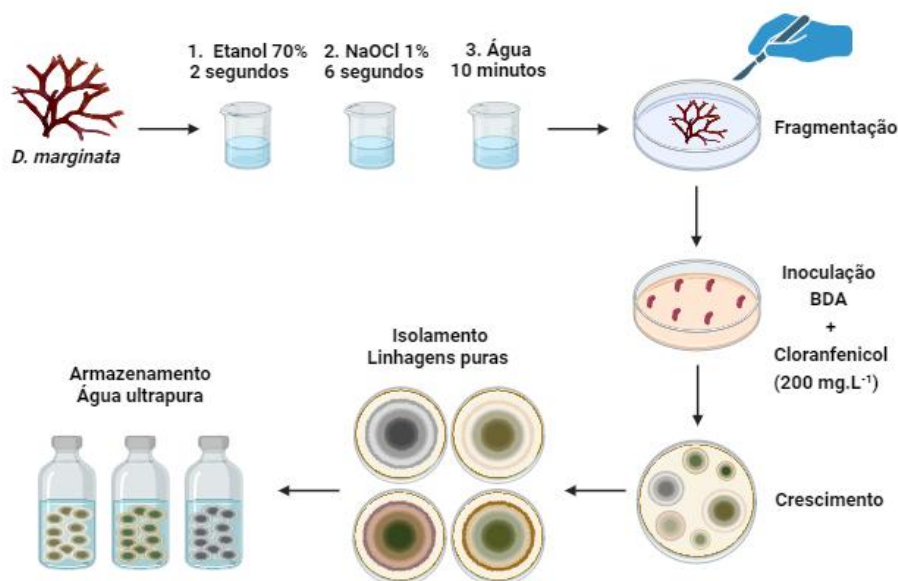
4.2. Obtenção e identificação de linhagens fúngicas

O isolamento das linhagens de fungos associados à alga marinha *Dichotomaria marginata* foi realizado como parte da pesquisa desenvolvida por Honório (2018) de acordo com a metodologia descrita abaixo:

Inicialmente, foi realizado o processo de esterilização da alga por imersão em etanol 70% por 6 segundos e em solução de NaOCl 1% por 2 segundos. Após o processo de esterilização da superfície da alga, a amostra foi lavada por imersão em água estéril por 10 minutos. A alga foi seccionada utilizando bisturi e inoculada em placa de Petri contendo o meio sólido de cultura BDA (meio de batata, dextrose e ágar) com adição de antibiótico cloranfenicol (200 mg.L^{-1}) para evitar crescimento bacteriano.

O crescimento dos endófitos foi monitorado e repiques sucessivos foram realizados para a obtenção das linhagens puras, que após isoladas, foram cortadas em pequenos pedaços e conservadas em frascos contendo água ultrapura como demonstrado no esquema da **(Figura 17)**. Os frascos foram lacrados e mantidos em temperatura ambiente na micoteca do grupo NuBBE no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (IQ-UNESP).

Figura 17. Obtenção e identificação das linhagens fúngicas.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

A partir da alga *Dichotomaria marginata*, foram isoladas 22 linhagens fúngicas, cuja identificação foi realizada em parceria com o Prof. Dr. Marcos Antônio Soares (UFMT, Cuiabá, MT), por taxonomia molecular e morfológica. Entre as espécies isoladas, foi selecionado o endófito *Fusarium solani* (DM08M2) como fonte para esta pesquisa.

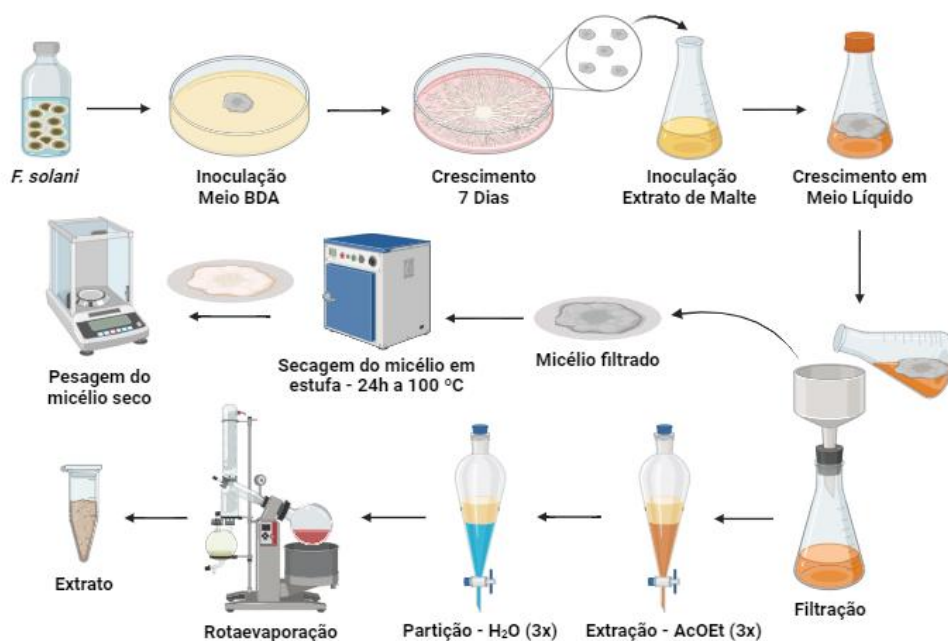
4.3. Curva de Crescimento de *Fusarium solani*

A curva de crescimento de *F. solani* foi construída com base em 8 pontos que correspondem aos períodos de cultivo do fungo (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 dias) relacionados com a massa seca de micélio e massa de extrato produzida.

Utilizando as amostras armazenadas em *slants*, o fungo *F. solani* foi repicado em placas de Petri com meio BDA por um período de 7 dias. Após esse período de crescimento em placa, o micélio foi cortado em pequenos discos de aproximadamente 7 mm de diâmetro com auxílio de uma ponteira previamente esterilizada. Em seguida 5 discos de micélio foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio líquido de extrato de malte solubilizado em água ultrapura e esterilizada em autoclave. O cultivo ocorreu a temperatura de 25 °C em modo estático. Após os

determinados tempos de cultivo, foi realizada partição líquido/líquido em todas as amostras filtradas utilizando acetato de etila (3 x 200 mL), a fase orgânica obtida foi submetida à partição com água ultrapura (1:1) e por fim, foi feita a evaporação do acetato de etila como mostra o esquema da **(Figura 18)**.

Figura 18. Procedimento experimental da curva de crescimento.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

4.4. Cultivo de *Fusarium solani* em meios sólidos

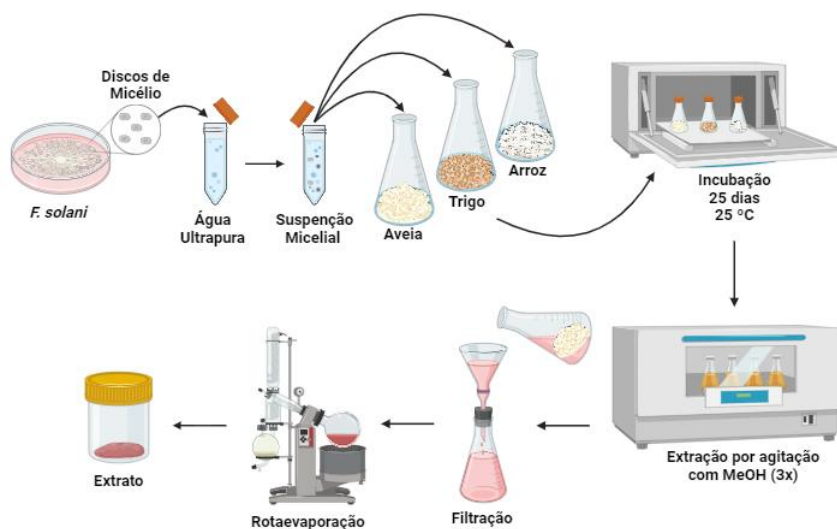
Para o cultivo do *F. solani* em meio sólido, foram escolhidos os meios de aveia, trigo e arroz. Foram pesadas quantidades específicas de cada meio em diferentes frascos Erlenmeyer de 500 mL.

O primeiro meio foi o de aveia, foram pesados 25,0 g de flocos de aveia e misturados com 30 mL de água ultrapura, depois, 50,0 g de farelo de trigo foram misturados em 50 mL de água e por último, 90,0 g de arroz parboilizado misturados em 100 mL de água. Após a pesagem, os meios foram autoclavados a 120 °C por 20 minutos, esse processo foi realizado duas vezes, com intervalo de 24h.

Na etapa seguinte, foi feita a inoculação do fungo *F. solani*, onde 15 mL de suspensão micelial previamente preparada, foram adicionados em cada frasco Erlenmeyer contendo os meios sólidos. O cultivo ocorreu por 25 dias a 25 °C em modo

estático. Ao final do tempo de cultivo, foi realizada a extração com metanol (3x 150 mL) sob agitação em equipamento shaker e com intervalo de 5h entre cada extração obtendo-se o extrato metanólico, **(Figura 19)**.

Figura 19. Cultivo do *Fusarium solani* em meios sólidos

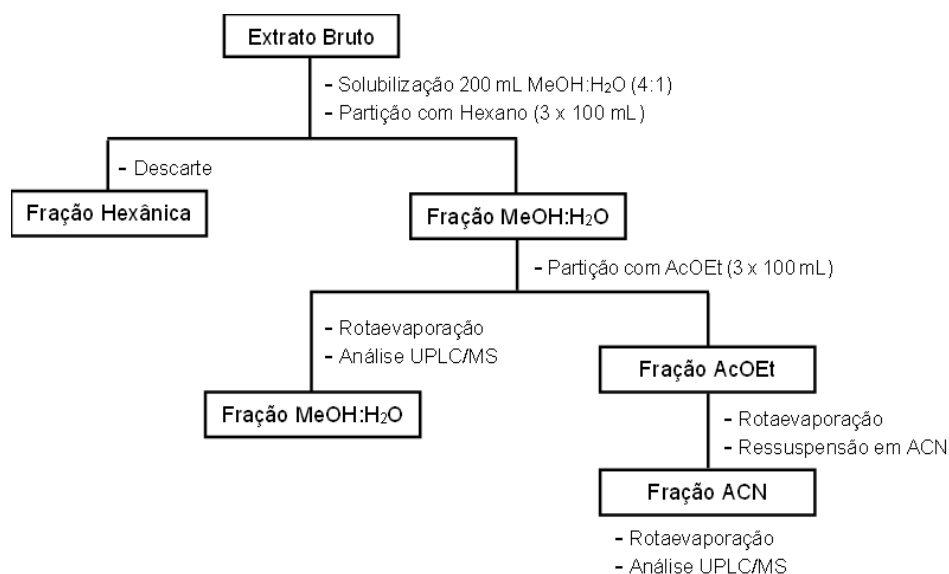


Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

4.5. Partição dos extratos de *Fusarium solani* em obtidos meios sólidos

Os extratos metanólicos brutos obtidos foram solubilizados em 200 mL de solução MeOH:H₂O (4:1 v/v) e submetidos à partição com hexano (3 x 100 mL) com intuito de separar compostos de baixa polaridade. Em seguida, a fração hidrometanólica foi submetida à partição com acetato de etila (3 x 100 mL), por sua vez, foi rotaevaporada e ressuspensa em acetonitrila de acordo com o esquema a seguir **(Figura 20)**.

Figura 20. Esquema de partição dos extratos brutos



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

4.6. Redes moleculares

As redes moleculares para este estudo foram criadas usando o fluxo de trabalho on-line (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>) no site do Global Natural Products Social (GNPS) (<http://gnps.ucsd.edu>). Primeiramente, os dados de LC-MS/MS foram convertidos para o formato mzML no software MSConvert (ProteoWizard) usando o filtro *Peak Picking* e então, foram carregados na plataforma GNPS. Os dados foram filtrados removendo todos os íons fragmentos MS/MS dentro de ± 17 Da dos íons precursores m/z . Os espectros de MS/MS foram filtrados através da escolha apenas dos 6 íons fragmento superiores na janela ± 50 Da em todo o espectro. A tolerância de massa do íon precursor foi ajustada para 2,0 Da e a tolerância dos íons fragmento MS/MS para 0,9 Da. Foi então criada uma rede onde os arcos foram filtrados para ter um escore de cosseno acima de 0,65 e mais de 6 picos combinados. Além disso, os arcos entre dois nodos foram mantidos na rede se e somente se cada um dos nodos aparecesse nos 10 nodos superiores mais similares um do outro. Finalmente, o tamanho máximo de uma família molecular foi fixado em 100, e os arcos com escore mais baixo foram removidos das famílias moleculares até que o tamanho da família molecular ficasse abaixo desse limite. Os espectros na rede foram então pesquisados em relação às bibliotecas espectrais do GNPS. Os

espectros da biblioteca foram filtrados da mesma maneira que os dados de entrada. Todas as correspondências mantidas entre os espectros da rede e os espectros da biblioteca tiveram um escore acima de 0,65 e pelo menos 4 picos combinados (WANG *et al.*, 2016).

As redes moleculares foram visualizadas usando o *software* Cytoscape v. 3.10.3 (SHANNON, 2003). As informações sobre as redes moleculares podem ser acessadas publicamente em:

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=4c8326116ace468aaffbdefb33728815> para as amostras de extratos da curva de crescimento de *Fusarium solani*;

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=9a9925c88c55427e9b83a6feeecbedce> para as amostras de extratos de *Fusarium solani* cultivado em meios sólidos de aveia, trigo e arroz;

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=a1c0aa83be2e47d9901670f5225e8b3f> para as amostras de extratos de *Fusarium solani* cultivado em meios sólidos de aveia, trigo e arroz, analisadas com a ferramenta DEREPLICATOR (version 1.2.8).

4.7. Ensaios de Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em parceria com Profa. Dra. Letícia V. Costa Lotufo e Dra. Paula Rezende (ICB) USP-SP. Foram usadas placas de 96 poços para plaquear 1×10^4 células por poço, a partir de uma solução de concentração igual a 5×10^4 células/ 200 μ L de meio. Após 24h foram adicionados os extratos em duas concentrações distintas, 5 μ M e 50 μ M, realizando cada aplicação em duplicata com tempo de incubação de 72h. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo e dimetilsulfóxido (DMSO) como controle negativo. Após a incubação o sobrenadante foi substituído por meio de cultura contendo MTT (0,5 mg/mL). Três horas após o procedimento, o sobrenadante foi removido. Após a secagem das placas, o precipitado de azul de formazana do MTT foi dissolvido em 150 μ L de DMSO, e então a absorbância da solução será medida a 570 nm (MOSMANN, 1983). Os experimentos foram realizados utilizando células de carcinoma colorretal (HCT116).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Curvas de Crescimento

5.1.1. Avaliação do perfil de crescimento

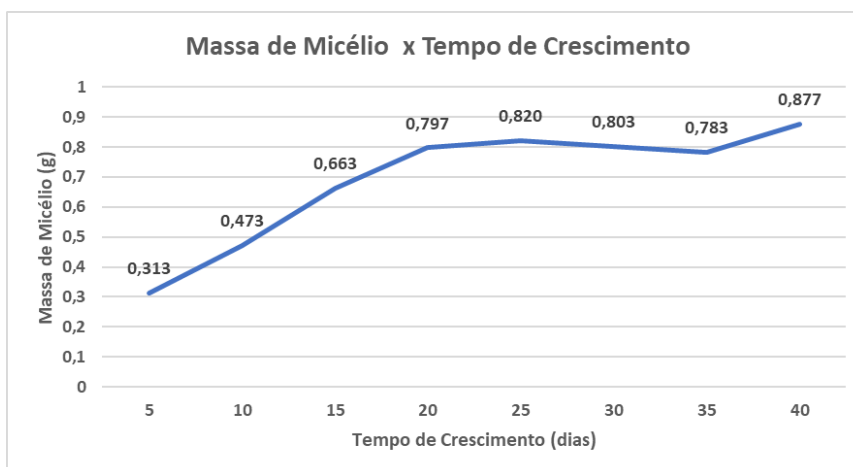
O crescimento de fungos filamentosos em culturas líquidas pôde ser medido pelo aumento no peso seco da biomassa. Para isso, utiliza-se frascos Erlenmeyer em condições estacionárias ou sob agitação. O peso seco reflete o total de biomassa acumulada durante o desenvolvimento do fungo, sendo um indicador direto de seu crescimento (LANGVAD, 1999).

Os fungos crescem em etapas diferentes, conhecidas como fases de crescimento: lag, exponencial, estacionária e de morte. Na fase lag, o crescimento é lento ou inexistente, pois o fungo está se ajustando ao ambiente. Durante a fase exponencial, o fungo cresce rapidamente, produzindo mais biomassa. Já na fase estacionária, o crescimento desacelera porque os nutrientes estão se esgotando e as condições tornam-se menos favoráveis. Por fim, na fase de morte, a biomassa diminui devido à falta de nutrientes ou ao acúmulo de substâncias tóxicas (VRABL et al., 2019).

Neste trabalho, foram construídas duas curvas de crescimento do endófito *Fusarium solani*, uma comparando a massa de micélio produzida em função do tempo de cultivo e outra comparando a massa de extrato produzida em função do tempo de cultivo. Levando em consideração as diferentes fases de crescimento do fungo, foi possível analisar cada curva e determinar a melhor condição para os experimentos seguintes.

O crescimento de fungos filamentosos pode ser avaliado por meio de diferentes parâmetros, sendo a massa de micélio um dos indicadores mais utilizados para quantificar a biomassa fúngica acumulada ao longo do tempo. A curva apresentada na (**Figura 21**), ilustra a variação da massa de micélio de *Fusarium solani* em função do tempo de cultivo, evidenciando as diferentes fases do crescimento fúngico.

Figura 21. Produção de Micélio vs Tempo de Crescimento



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

Nos primeiros dias de cultivo (0 a 15 dias), observou-se um aumento expressivo na massa de micélio, saindo de 0,313 g e atingindo 0,663 g. Esse período corresponde à fase exponencial, caracterizada por uma alta taxa de divisão celular e síntese de biomassa, favorecida pela disponibilidade de nutrientes e condições ambientais favoráveis. Durante essa fase, o fungo utiliza eficientemente os substratos disponíveis para o crescimento vegetativo, expandindo sua rede micelial.

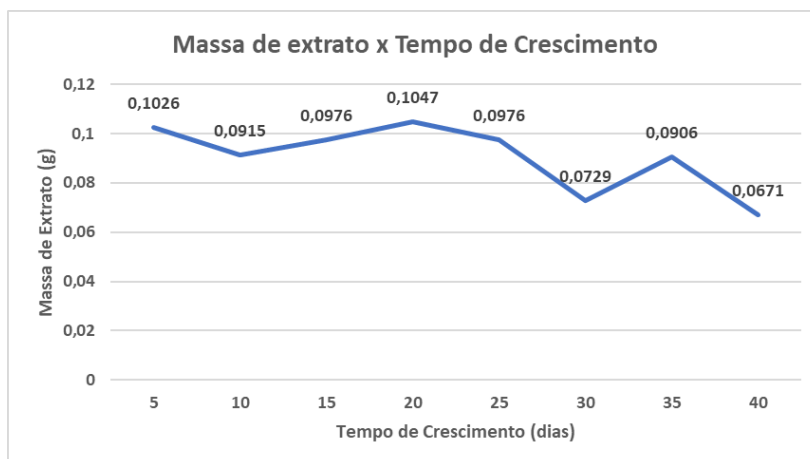
A partir do 20º dia, a taxa de crescimento começou a se estabilizar, indicando a transição para a fase estacionária. Entre os dias 20 e 30, a massa do micélio oscilou levemente, variando entre 0,797 g e 0,803 g, sugerindo um equilíbrio entre a proliferação celular e a degradação de biomassa. Esse comportamento é comumente associado à redução da disponibilidade de nutrientes e ao acúmulo de metabólitos secundários, que podem inibir o crescimento celular.

No período final da curva (35 a 40 dias), notou-se uma leve retomada no crescimento, com um aumento da massa micelial de 0,783 g para 0,877 g. Essa elevação pode estar relacionada à adaptação do fungo a condições mais adversas, possivelmente por meio da metabolização de substratos alternativos ou do desenvolvimento de estruturas de resistência. Entretanto, é importante ressaltar que esse crescimento tardio pode também estar associado à formação de esporos ou à produção de compostos secundários de interesse biotecnológico.

A (**Figura 22**), mostra a curva que relaciona ao tempo de crescimento (em dias) e a massa de extrato produzida (em gramas), revela um comportamento metabólico variável ao longo do período de cultivo. Este padrão é característico de

microrganismos que passam por interferências em fases distintas de crescimento e produção de metabólitos secundários durante seu ciclo de vida.

Figura 22. Produção de extrato vs Tempo de crescimento



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

No quinto dia de cultivo, foi registrada uma massa inicial de extrato de 0,1026 g, que posteriormente sofreu uma redução para 0,0915 g no décimo dia. Este declínio inicial pode ser associado à chamada "fase de latência", o período em que o fungo está se adaptando às condições do meio de cultivo. Durante essa fase, as células iniciam a síntese de enzimas e outros componentes necessários para o metabolismo ativo.

A partir do décimo dia, observou-se um aumento progressivo na massa de extrato, atingindo um pico de 0,1047 g no vigésimo dia. Este comportamento é indicativo da transição para a "fase exponencial" de crescimento, na qual o fungo demonstrou alta atividade metabólica e maior eficiência na síntese de metabólitos secundários. Este é o ponto de maior produtividade na curva, sugerindo que as condições ambientais eram ideais nesse período.

Entre os 20 e 30 dias, a massa de extrato apresentou uma estabilização inicial (0,0976 g no 25º dia) seguida de uma redução significativa para 0,0729 g no 30º dia. Este padrão reflete o esgotamento progressivo de nutrientes no meio de cultivo e o acúmulo de metabólitos tóxicos, fatores que são característicos da "fase estacionária". Nesta etapa, a taxa de crescimento celular diminui consideravelmente e a produção de metabólitos é regulada por mecanismos de sobrevivência, levando a uma queda na massa de extrato.

Entre os 30 e 40 dias, a massa de extrato variou de forma oscilante, aumentando ligeiramente para 0,0906 g no 35º dia e diminuindo novamente para 0,0671 g no 40º dia. Esta tendência é consistente com o início da "fase de declínio", quando o fungo enfrentou condições ambientais severas, como o esgotamento completo de nutrientes e a acumulação de subprodutos tóxicos. Estes fatores limitaram a capacidade metabólica do fungo, resultando em uma redução na produção de metabólitos secundários.

A variação na massa de extrato ao longo do tempo reflete alterações no metabolismo secundário do *Fusarium solani*. Os metabólitos secundários, geralmente são sintetizados em resposta a condições de estresse, incluindo limitação de nutrientes e alterações no pH do meio. De acordo com os dados obtidos no experimento, a concentração ideal de metabólitos foi alcançada no 20º dia, indicando o momento mais adequado para a coleta do micélio e preparo do extrato, visando as próximas etapas da pesquisa.

É válido ressaltar que a variação entre a massa de micélio e a massa de extrato produzida, indica que a produção de metabólitos secundários não está diretamente relacionada com a produção de biomassa. Enquanto o pico de metabólitos secundários foi registrado no 20º dia, o crescimento do micélio continuou, ainda que em ritmo reduzido, após esse período. Este fenômeno sugere que a síntese de metabólitos é regulada por fatores específicos que vão além do simples aumento de biomassa, incluindo estresses ambientais e alterações na fisiologia celular.

Portanto, com base nos dados das curvas de crescimento e das observações feitas, os experimentos seguintes de cultivo de *Fusarium solani* em meio líquido de extrato de malte foram realizados tendo como ponto ótimo de produção de extrato, o 20º dia de crescimento.

5.1.2. Rede Molecular gerada pela Plataforma GNPS

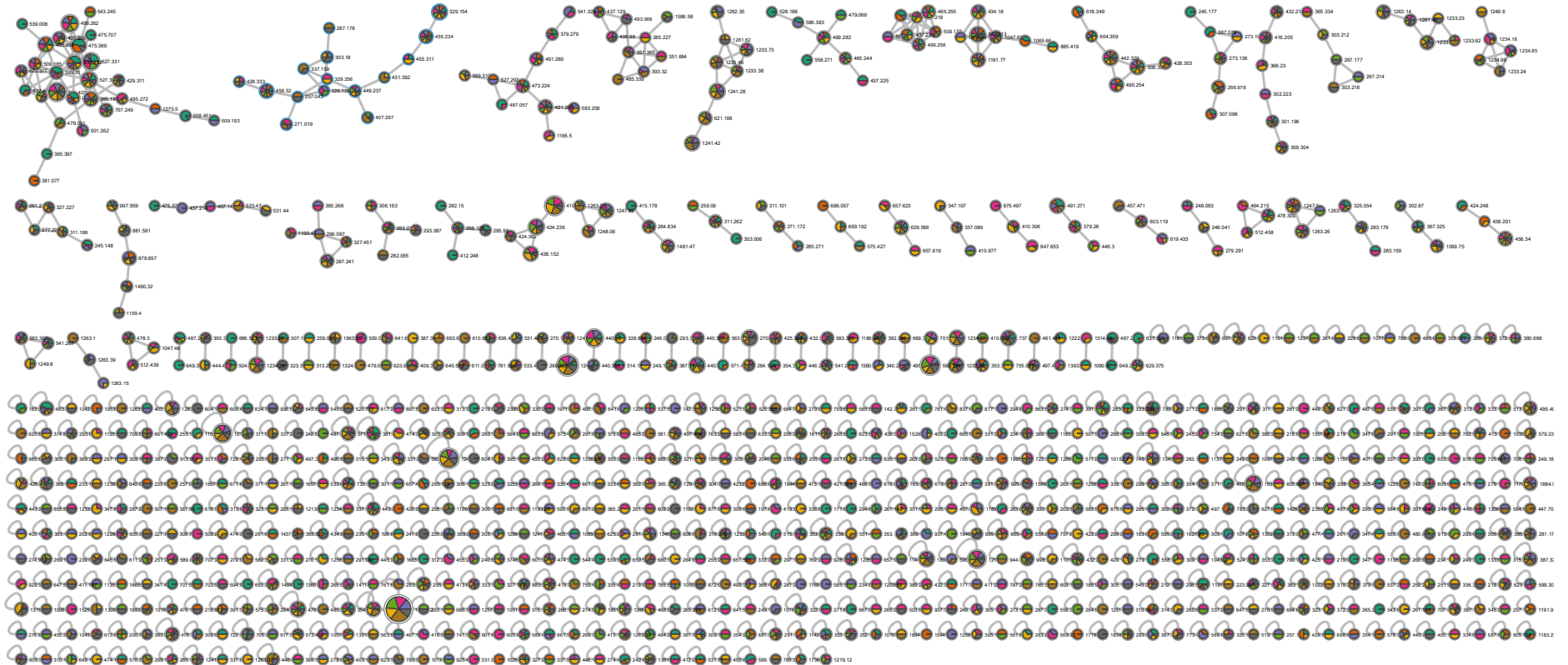
Os dados de massas dos extratos da curva de crescimento de *F. solani*, em modo positivo, foram analisados na plataforma GNPS e geraram uma rede molecular que forneceu uma visão abrangente da diversidade química e das relações estruturais. A rede é composta por 1.242 nodos (**Figura 23**), representando íons precursores, e 518 pares, indicando a presença de 518 conexões moleculares. Dentre esses nodos, 194 pertencem a clusters anotados, sendo que 97 deles estão fora de

componentes conectados, sugerindo características moleculares isoladas ou menos interconectadas. Além disso, 81 nodos vizinhos não identificados indicaram a presença de compostos ainda não caracterizados, apontando para possíveis estruturas químicas novas, pouco exploradas ou que ainda não estão presentes na base de dados.

Os dados espectrais embasaram ainda mais a análise, mostrando que, um total de 16.736 espectros foram avaliados no estudo, dos quais cerca de 10.822 foram incorporados à rede. Dentre esses, 3.283 espectros foram identificados, sendo que 902 não mostraram pertencer a nenhum cluster, indicando características espectrais isoladas. A presença de 2.563 espectros vizinhos não identificados enfatiza a proporção significativa de dados não caracterizados, que podem representar novas entidades químicas ou exigir esforços analíticos adicionais para sua identificação. Notavelmente, 6.139 espectros fazem parte de componentes identificados, refletindo uma porção substancial do conjunto de dados que foi mapeada com sucesso para estruturas moleculares conhecidas.

De modo geral, os dados da rede molecular revelam uma interação complexa entre características moleculares identificadas e não identificadas, com um número significativo de nodos e espectros isolados sugerindo uma diversidade química ainda não explorada. A presença de diversos nodos vizinhos e espectros não identificados destaca o potencial para a descoberta de novos compostos, enquanto os componentes identificados fornecem uma base para compreender as relações estruturais e funcionais dentro do conjunto de dados. Essa rede serve como um recurso valioso para futuras explorações e caracterizações da quimiodiversidade do endófito *Fusarium solani*.

Figura 23. Rede molecular gerada pela plataforma GNPS para os dados de LC-MS da curva de crescimento



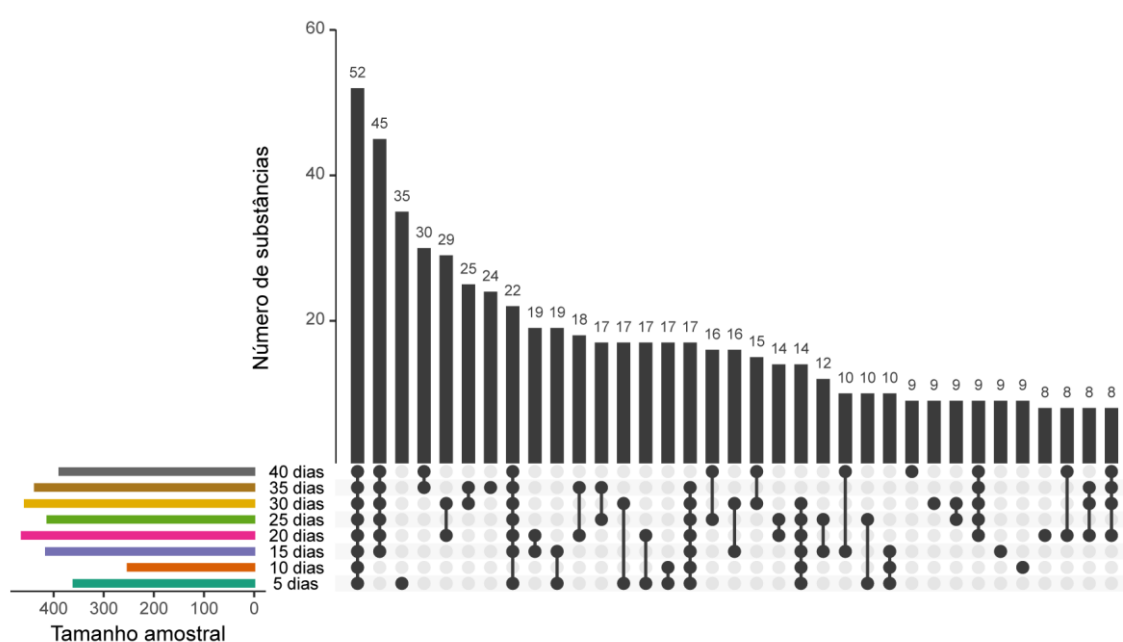
Tempo de Cultivo



5.1.3. Distribuição das substâncias produzidas ao longo do tempo de cultivo.

Utilizando os dados da rede molecular, foi possível gerar um gráfico Upset Plot (**Figura 24**) através do programa *R* (versão 4.0.0 “upSetR” package) (CONWAY et al., 2017) para analisar a presença e sobreposição de substâncias químicas identificadas nos diferentes extratos obtidos a partir da curva de crescimento do fungo endofítico *F. solani*.

Figura 24. Distribuição das substâncias de *F. solani* nos extratos da curva



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

No eixo vertical inferior do gráfico, estão indicados os tempos de cultivo que foram analisados, enquanto o eixo denominado “Tamanho amostral” nos mostra o número total de substâncias químicas detectadas em cada tempo de cultivo, e o eixo vertical principal denominado “Número de substâncias” mostra quantas substâncias estão presentes em cada combinação específica de tempos de cultivo.

O gráfico permite observar uma grande diversidade de substâncias produzidas pelo endófito ao longo do tempo de cultivo. A primeira e maior intersecção gerada no gráfico, agrupou um total de 52 substâncias que se mostraram presentes em todos os extratos, evidenciando que sua produção segue constante e não depende do tempo de cultivo, a segunda maior intersecção evidencia que 45 substâncias estão

presentes nos extratos a partir do 15º dia de crescimento até o 40º dia e não foram detectadas nos extratos 5º e 10º dia. A ausência desses metabólitos nos extratos iniciais pode estar relacionada a fase de adaptação do fungo ao meio de cultivo, nesse período inicial, o metabolismo primário é predominante e muitas vias metabólicas secundárias ainda estão inativas, podendo ser ativadas apenas durante a fase estacionária onde a produção de metabólitos secundários aumenta significativamente.

A terceira intersecção é mais específica do que as anteriores, e mostra que 35 substâncias foram detectadas apenas no extrato inicial (5º dia), e considerando que nesse período o metabolismo primário é predominante, é comum a produção de metabólitos primários como, aminoácidos, carboidratos, lipídios, ácidos orgânicos, nucleotídeos, entre outros metabólitos considerados essenciais para o desenvolvimento do microrganismo.

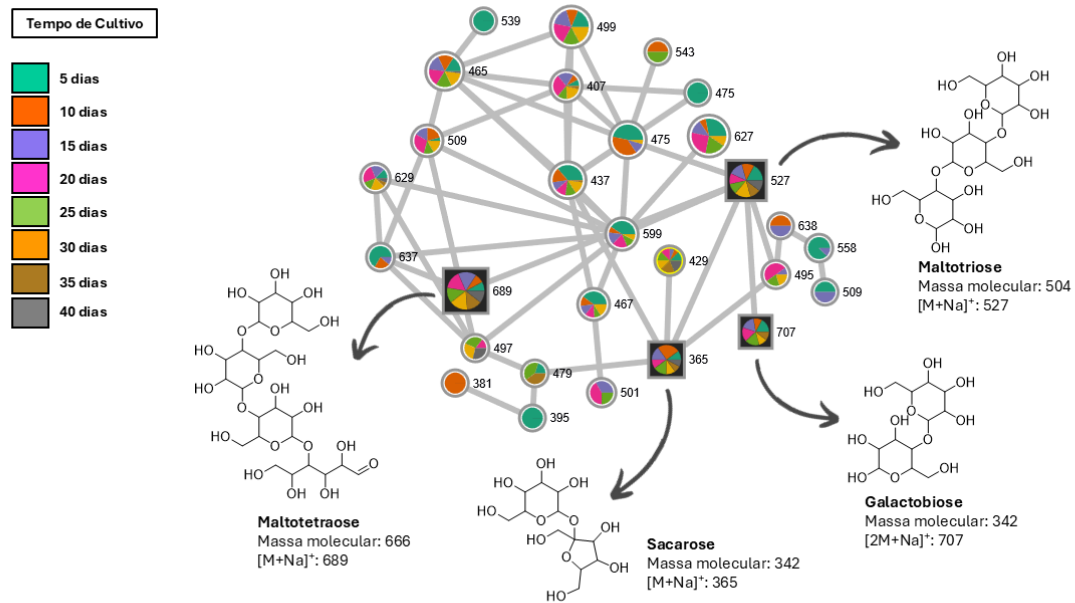
Outras intersecções são mostradas no gráfico à medida que a quantidade de substâncias agrupadas diminui. Diferente das intersecções maiores que envolvem múltiplos períodos de cultivo, intersecções menores ou exclusivas podem estar relacionadas a respostas adaptativas do fungo às condições e tempo de cultivo. A identificação dessas substâncias é de grande interesse da pesquisa em produtos naturais que busca novas substâncias bioativas para o desenvolvimento de novos medicamentos.

5.1.4. Anotações da Plataforma GNPS

A partir da rede molecular gerada na plataforma GNPS com dados de LC-MS dos extratos da curva em modo positivo, foi possível anotar substâncias que apresentaram similaridade com as bases espectrais.

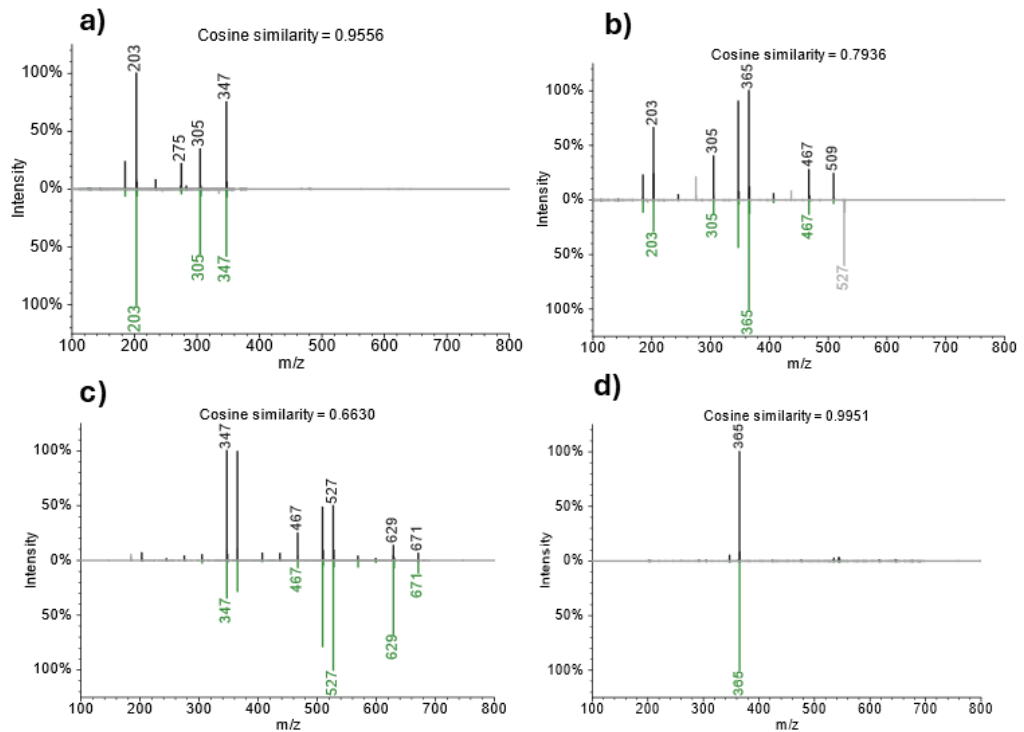
O primeiro cluster (**Figura 25**) de substâncias que foi avaliado, agrupou um total de 28 nodos indicando características semelhantes entre os íons precursores, principalmente o fato de estarem presentes em todas as amostras de extrato analisadas. A partir desse cluster, foram anotados quatro carboidratos considerando a correspondência espectral com a biblioteca GNPS MS/MS dos espectros (**Figura 26**), sendo eles a **(a)** sacarose, **(b)** maltotriose, **(c)** maltotetraose e **(d)** galactobiose, que são metabólitos primários essenciais e normalmente estão presentes durante todo o desenvolvimento fúngico.

Figura 25. Cluster de Carboidratos anotados a partir dos extratos de *F. solani*



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

Figura 26. Correspondência espectral com a biblioteca do GNPS para carboidratos anotados

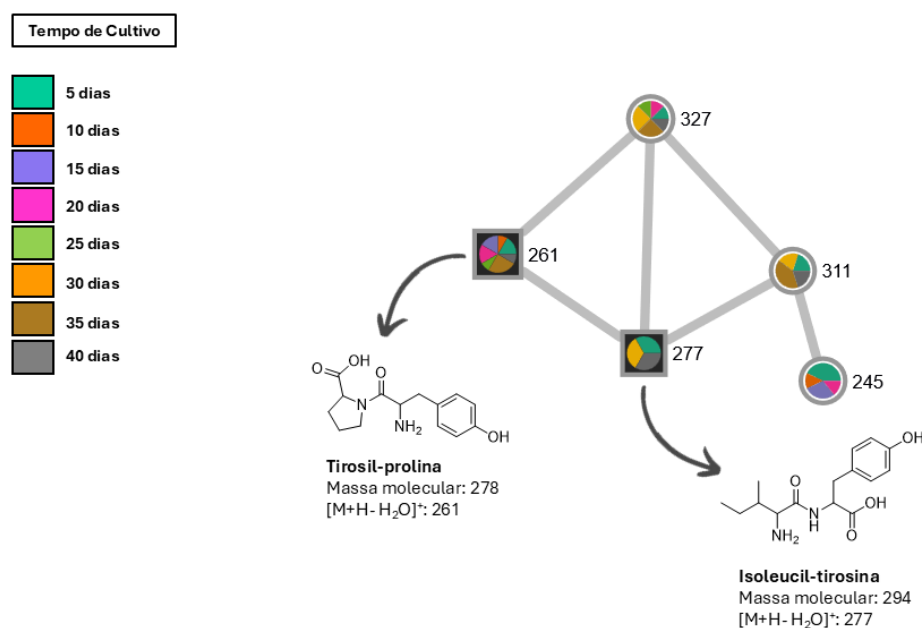


Os picos fragmentos estão destacados em preto no espectro experimental (superior) e em verde no espectro da biblioteca (inferior).

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

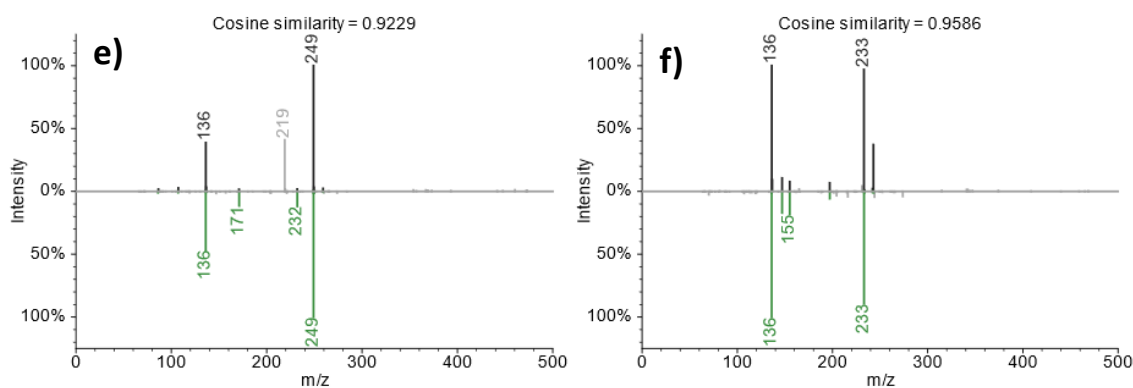
Em um outro cluster menor (**Figura 27**) da mesma rede molecular, foram anotados dois dipeptídeos, (**e**) isoleucil-tirosina (Ile-Tyr) e (**f**) tirosil-prolina (Tyr-Pro) considerando os espectros de fragmentação (**Figura 28**).

Figura 27. Cluster dos Dipeptídeos anotados a partir dos extratos de *F. solani*



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

Figura 28. Correspondência espectral com a biblioteca do GNPS para os Dipeptídeos anotados



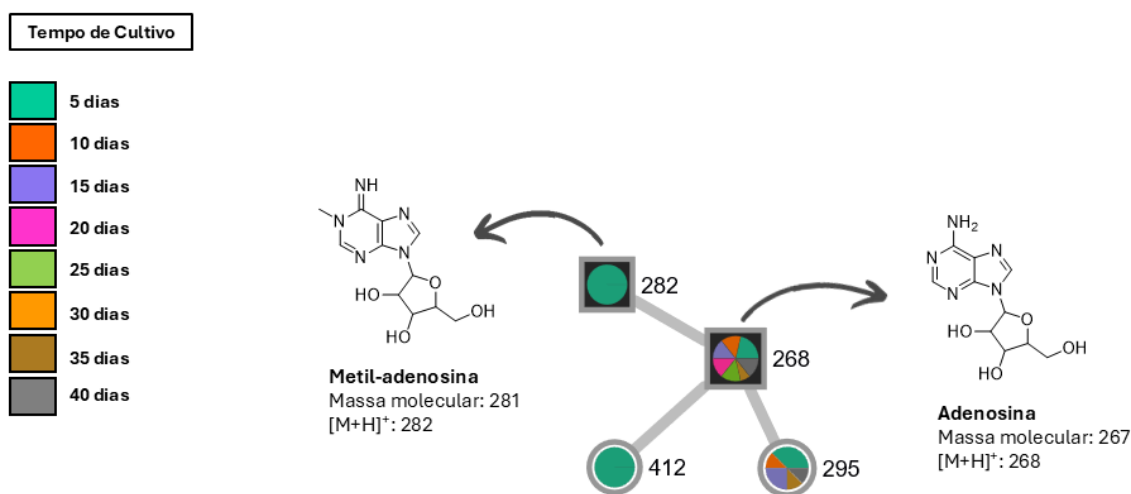
Os picos fragmentos estão destacados em preto no espectro experimental (superior) e em verde no espectro da biblioteca (inferior).

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

Os peptídeos são moléculas formadas a partir da ligação peptídica entre aminoácidos, e de alta relevância pois podem desempenhar várias funções nos organismos em que estão presentes. No caso de um fungo endofítico como o *F. solani*, podem atuar como moléculas sinalizadoras, regulando processos metabólicos, mediação da interação com o hospedeiro, proteção contra o estresse oxidativo, participação na produção de metabólitos secundários, além da modulação de virulência e colonização (LE MARQUER *et al.*, 2019).

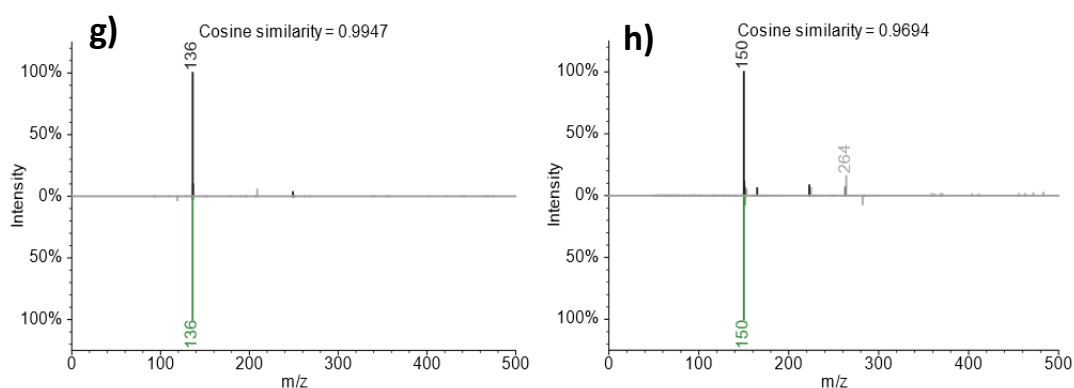
Também foram anotados dois nucleosídeos, em um pequeno cluster com apenas quatro nodos interligados (**Figura 29**). De acordo com a comparação espectral (**Figura 30**), as substâncias foram denominadas como (**g**) adenosina e (**h**) metil-adenosina.

Figura 29. Cluster de Nucleosídeos anotados



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

Figura 30. Correspondência espectral com a biblioteca do GNPS para os nucleosídeos anotados



Os picos fragmentos estão destacados em preto no espectro experimental (superior) e em verde no espectro da biblioteca (inferior).

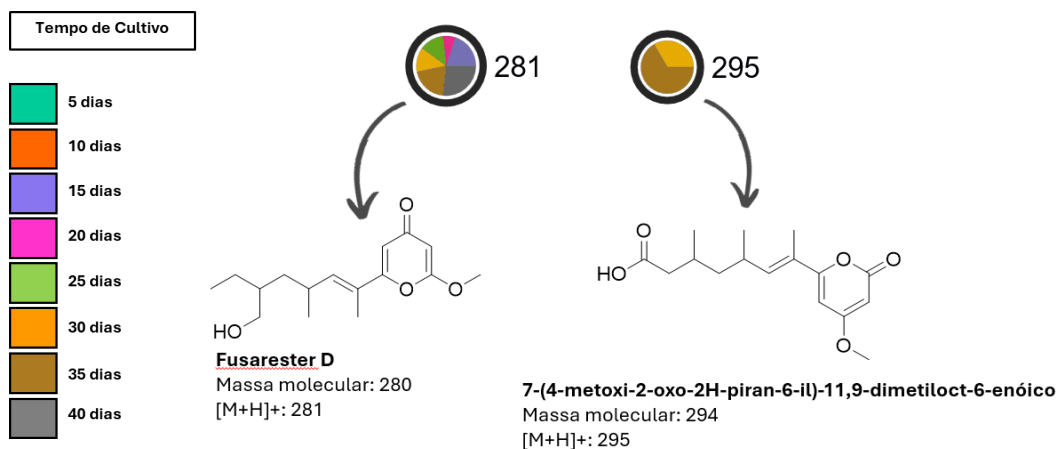
Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

Os nucleosídeos são blocos de construção de ácidos nucleicos, como o ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA). Eles são formados por um açúcar (ribose ou desoxirribose) ligado a uma base nitrogenada (adenina, guanina, citosina ou uracila). São muito importantes por sua complexa interação com ácidos nucleicos, e são a base da biologia molecular (KAWSAR *et al.*, 2024).

Do ponto de vista farmacológico, os nucleosídeos têm despertado interesse principalmente por conta de seus derivados. Modificações estruturais em moléculas de nucleosídeos levaram ao desenvolvimento de vários medicamentos antivirais, antibióticos e anticancerígenos (KAWSAR *et al.*, 2024).

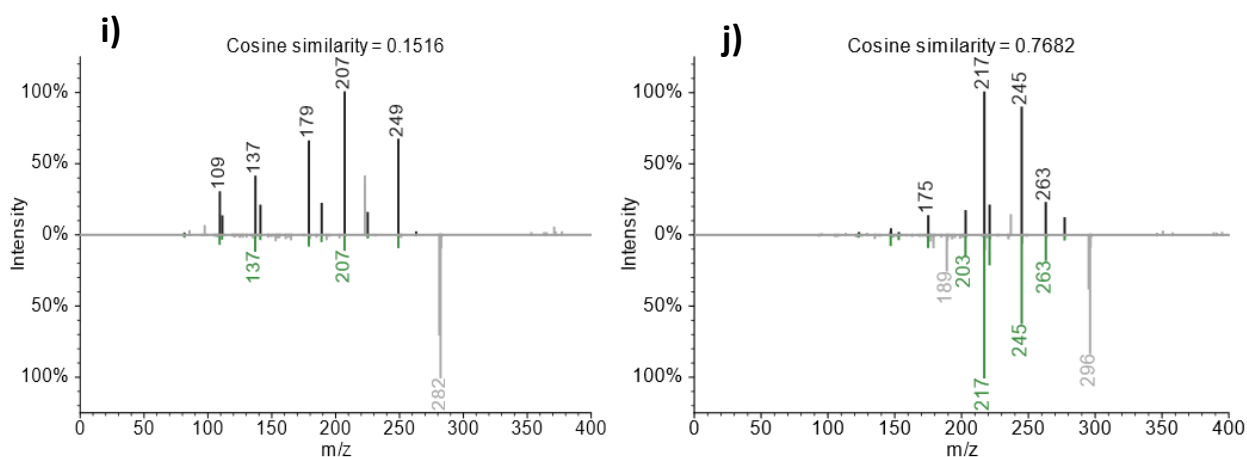
As duas últimas substâncias anotadas para os extratos da curva de crescimento através da biblioteca do GNPS, vieram de nodos isolados, que não foram agrupados em nenhum cluster, sugerindo que possuem características únicas entre os íons precursores detectados. Essas substâncias foram anotadas como, (i) fusarester D e (j) 7-(4-metoxi-2-oxo-2H-piran-6-il)-11,9-dimetiloct-6-enóico, (**Figura 31**). Na **Figura 32**, é possível analisar a correspondência espectral com a biblioteca do GNPS para as duas substâncias, confirmando sua anotação.

Figura 31. Nodos isolados de (i) fusarester D e (j) 7-(4-metoxi-2-oxo-2H-piran-6-il)-11,9-dimetiloct-6-enóico



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

Figura 32. Correspondência espectral com a biblioteca do GNPS para (i) fusarester D e (j) 7-(4-metoxi-2-oxo-2H-piran-6-il)-11,9-dimetiloct-6-enóico



Os picos fragmentos estão destacados em preto no espectro experimental (superior) e em verde no espectro da biblioteca (inferior).

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

A similaridade espectral entre a substância anotada e o padrão da substância Fusarester D, disponível na plataforma GNPS, resultou em um valor de cosseno relativamente baixo (**Figura 32 i**). Essa discrepância pode ser atribuída às diferentes condições instrumentais utilizadas na espectrometria de massas, especialmente à baixa fragmentação observada no espectro da literatura. No entanto, conforme ilustrado também na **Figura 32 i**, os fragmentos principais coincidem, corroborando a

anotação. O fusarester D foi isolado anteriormente a partir de uma cepa de *Fusarium solani* de rizosfera, durante pesquisa de doutorado realizada no Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE), e na ocasião, foi feito depósito dos dados espectrais na plataforma GNPS permitindo a comparação (VIEIRA, 2020).

Os fusarésteres constituem uma classe de ésteres macrocíclicos produzidos por espécies do gênero *Fusarium*, com atividades biológicas reportadas, incluindo atividade antifúngica e citotóxica (AMUZU *et al.*, 2024; XU *et al.*, 2023).

5.1.5. Atividade citotóxica dos extratos da curva de crescimento

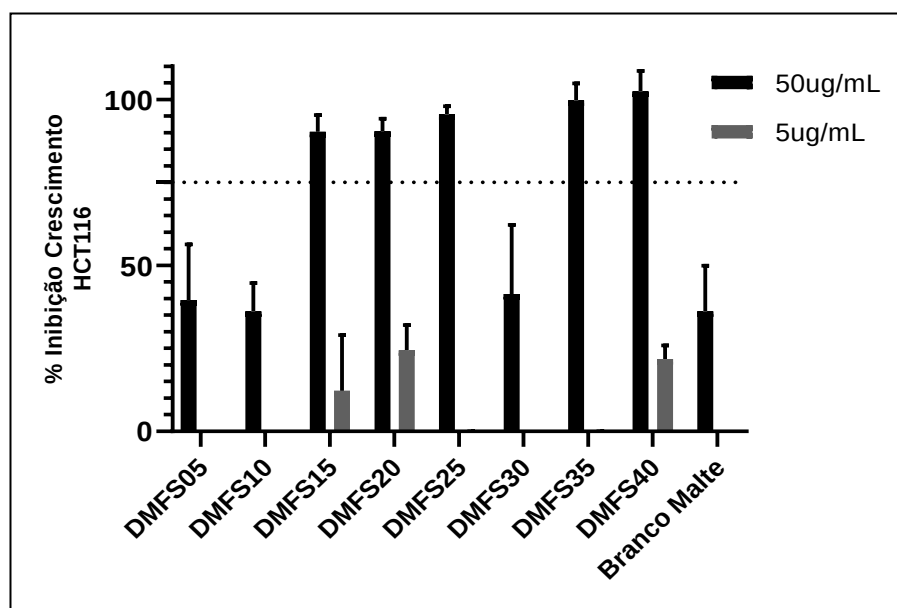
Os extratos obtidos durante o experimento de construção da curva de crescimento foram testados em duas concentrações (5 ug/mL e 50 ug/mL) contra células HCT116 (carcinoma colorretal) para avaliação do potencial de inibição de crescimento desta linhagem tumoral. Também foi testada uma amostra coletada do meio de cultivo para fins de comparação com os extratos. Os testes foram realizados em parceria com o grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Leticia Lotufo (ICB-USP-SP).

Figura 33. Atividade citotóxica dos extratos da curva de crescimento contra células HCT116

5 ug/mL			
Amostras	% Inibição	SEM	N
DMFS05	-	-	-
DMFS10	-	-	-
DMFS15	12,26	8,36	4
DMFS20	24,46	3,80	4
DMFS25	0	-	4
DMFS30	-	-	-
DMFS35	0	-	4
DMFS40	21,74	2,40	4
Branco Malte	-	-	-
50 ug/ml			
Amostras	% Inibição	SEM	N
DMFS05	39,52	9,71	4
DMFS10	36,15	4,25	4
DMFS15	90,22	2,53	4
DMFS20	90,39	1,90	4
DMFS25	95,50	0,99	4
DMFS30	41,41	10,38	4
DMFS35	99,64	2,10	4
DMFS40	100	2,49	4
Branco Malte	36,16	7,96	4

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

Figura 34. Comparação da atividade citotóxica dos extratos nas concentrações testadas



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

Através da análise dos resultados, foi possível observar que os extratos foram mais ativos contra as células HCT116 na concentração de 50 ug/mL, com destaque para os extratos DMFS15, DMFS20, DMFS25 que tiveram percentuais de inibição de crescimento da linhagem HCT116 de 90,22%, 90,39% e 95,50% respectivamente, e para extratos DMFS35 e DMFS40 que tiveram os maiores percentuais de inibição, 99,64% e 100%.

Fazendo um comparativo da atividade citotóxica com os dados da curva de crescimento que relaciona massa de extrato e tempo de cultivo, foi possível observar que os extratos da fase inicial (5 e 10 dias) mostraram percentuais de inibição menores. Nesse período também conhecido como fase lag, o fungo está usualmente se adaptando às condições impostas e consequentemente, a produção de metabólitos secundários ainda é baixa, podendo assim ter influenciado na atividade dessas amostras. Os extratos referentes aos pontos da curva onde se estabelece a fase estacionária (15, 20 e 25 dias) e que possuem as maiores massas de extrato, mostraram percentuais de inibição acima de 90%. Por outro lado, o extrato obtido em 30 dias apresentou uma considerável diminuição de massa em relação aos outros extratos. A baixa atividade apresentada por essa amostra pode estar relacionada à diminuição de massa e possivelmente, uma diminuição de metabólitos bioativos. Os dois últimos extratos da curva (35 e 40 dias) apresentaram os maiores percentuais de

inibição das células HCT116, sugerindo que, embora a produção de biomassa tenha diminuído também para essas amostras, os metabólitos responsáveis pela atividade citotóxica podem estar mais concentrados ou mais específicos nesses extratos (GONG *et al.*, 2019).

Em relação às substâncias anotadas, o fusarester D é única que possui atividade citotóxica reportada na literatura e está presente nos extratos que se mostraram ativos contra células HCT116.

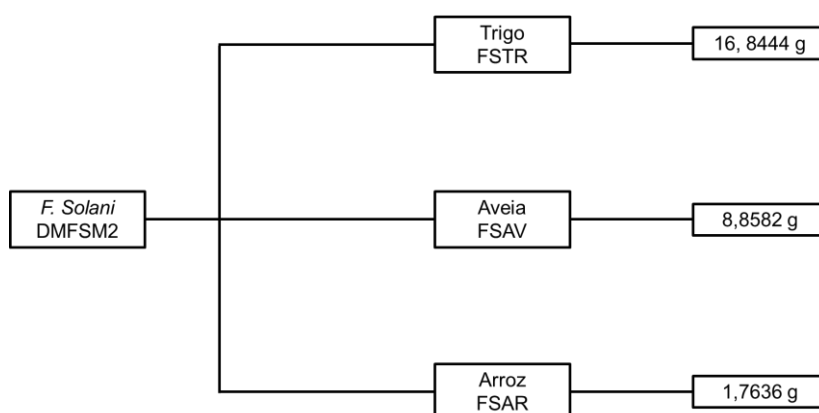
5.2. Extratos cultivados em meios sólidos

5.2.1. Preparo dos extratos em meios sólidos

Considerando a complexidade e a pequena quantidade de extrato produzido em meio líquido pelo *F. solani* nos experimentos da curva de crescimento impossibilitando os experimentos de fracionamento e purificação dos constituintes químicos, optou-se por uma nova abordagem, a fim de obter massa de extrato suficiente que permitisse realizar o fracionamento desses extratos visando ao isolamento das substâncias produzidas durante o cultivo.

Fusarium solani foi cultivado em meios de aveia, trigo e arroz e, após o tempo de cultivo, foi realizada a extração com metanol, sendo que as massas de cada extrato estão no indicadas no esquema abaixo (**Figura 35**).

Figura 35. Cultivo de *F. solani* em meios sólidos e obtenção dos extratos com indicação das respectivas massas



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

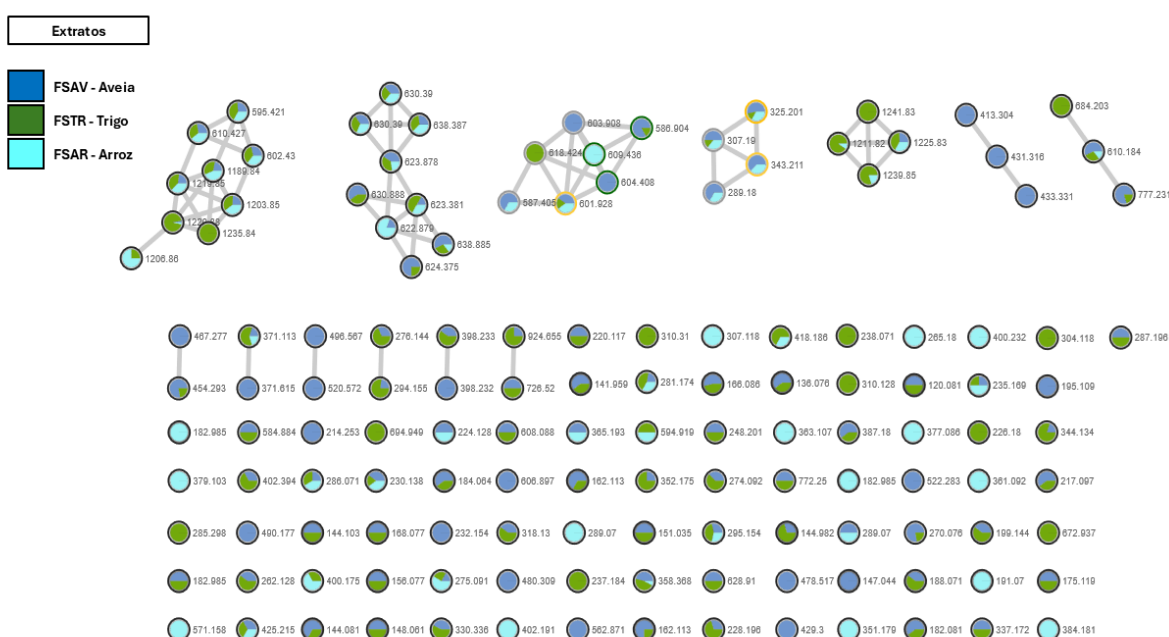
Conforme planejado, os extratos obtidos através do cultivo em meios sólidos de aveia, trigo e arroz, geraram massas maiores do que os extratos em meio líquido de malte na curva de crescimento.

5.2.2. Rede Molecular gerada pela Plataforma GNPS

Utilizando dados de espectrometria de massas de alta resolução dos extratos obtidos nos meios sólidos de trigo, aveia e arroz, foram geradas redes moleculares na plataforma GNPS (**Figura 36**). A análise dos dados dessas redes contribuiu para entender melhor a quimiodiversidade do fungo *F. solani* quando cultivado em diferentes meios. Diversas substâncias estão presentes em todos os extratos analisados, mas também foi evidenciada a presença de alguns nodos não conectados, sugerindo substâncias com características mais específicas, de ocorrência mais restrita ou até mesmo, novas substâncias ainda não catalogadas.

Em relação à rede molecular gerada para os extratos da curva de crescimento, esta rede é menor do que a anterior, considerando a exclusão de íons precursores que foram detectados nas amostras de brancos dos meios de crescimento e do branco do solvente utilizado na extração.

Figura 36. Redes moleculares para extratos de *F. solani* em meios sólidos de aveia, trigo e arroz.

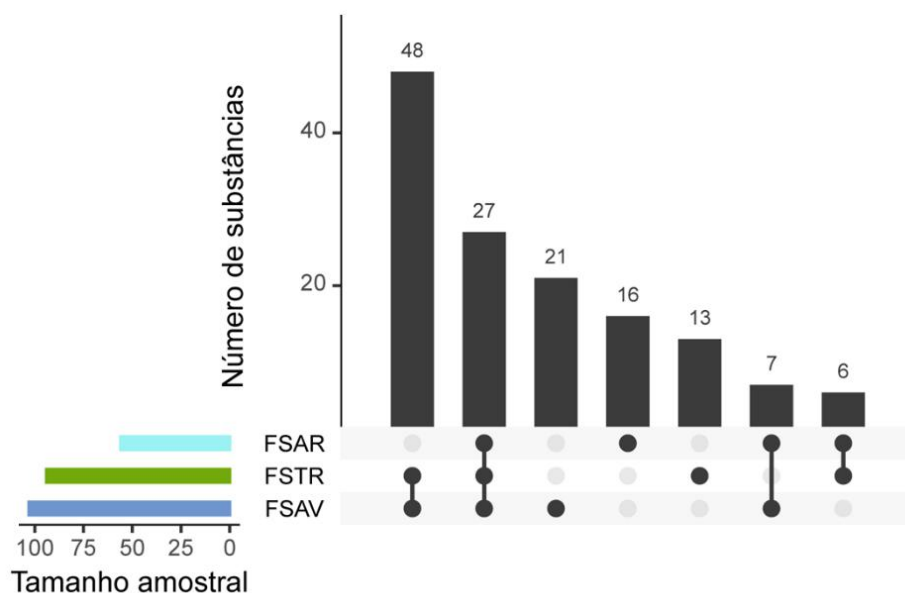


Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

5.2.3. Distribuição das substâncias produzidas pelos extratos

A análise dos dados da rede molecular gerada pela plataforma GNPS, permitiu relacionar as substâncias produzidas pelo *F. solani* nos três meios sólidos, agrupando as substâncias que são comuns entre os três extratos e destacando também as substâncias que são específicas de cada meio, como mostra o gráfico de Upset Plot (**Figura 37**).

Figura 37. Distribuição das substâncias produzidas por *F. solani* em meios sólidos



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

A maior intersecção relaciona 48 substâncias presentes exclusivamente nos extratos produzidos em meio de trigo e aveia (FSTR e FSAV) que consequentemente foram os extratos com maiores massas (**Figura 37**). A segunda intersecção, mostra um total de 27 substâncias que são comuns entre os três extratos, mostrando que, apesar de serem meios diferentes, há substâncias que puderam ser produzidas independente dos meios de cultivos utilizados, através de vias metabólicas que continuam ativas independente do substrato utilizado ou até mesmo das condições de cultivo.

As três intersecções seguintes mostram especificidades de produção metabólica de cada extrato. Um total de 21 substâncias foram detectadas exclusivamente em FSAV, 16 substâncias detectadas apenas no extrato FSAR e 13 substâncias detectadas exclusivamente em FSTR.

Os resultados observados confirmam que a mudança do meio de cultura pode influenciar diretamente a produção metabólica de fungos e outros microrganismos, induzindo rotas metabólicas diferentes, que resultam em metabólitos secundários com características específicas. Além da mudança dos meios de cultivo, a variação das condições de cultivo como, temperatura, pH, agitação, luminosidade também podem resultar na produção de diferentes metabólitos, impactando na quimiodiversidade e evidenciando a capacidade biossintética dos fungos (GERIS *et al.*, 2024).

Através dessa comparação, é possível constatar que a mudança de meios de cultivo resultou em diferentes perfis químicos do fungo *Fusarium solani*, motivando a continuidade dos estudos com intuito de identificar os metabólitos produzidos.

5.2.4. Anotações da Plataforma GNPS para os extratos

A partir da rede molecular gerada na plataforma GNPS com dados espectrometria de massas de alta resolução dos extratos em modo positivo, foi possível anotar substâncias que apresentaram similaridade com as bases espectrais (**Quadro 6**).

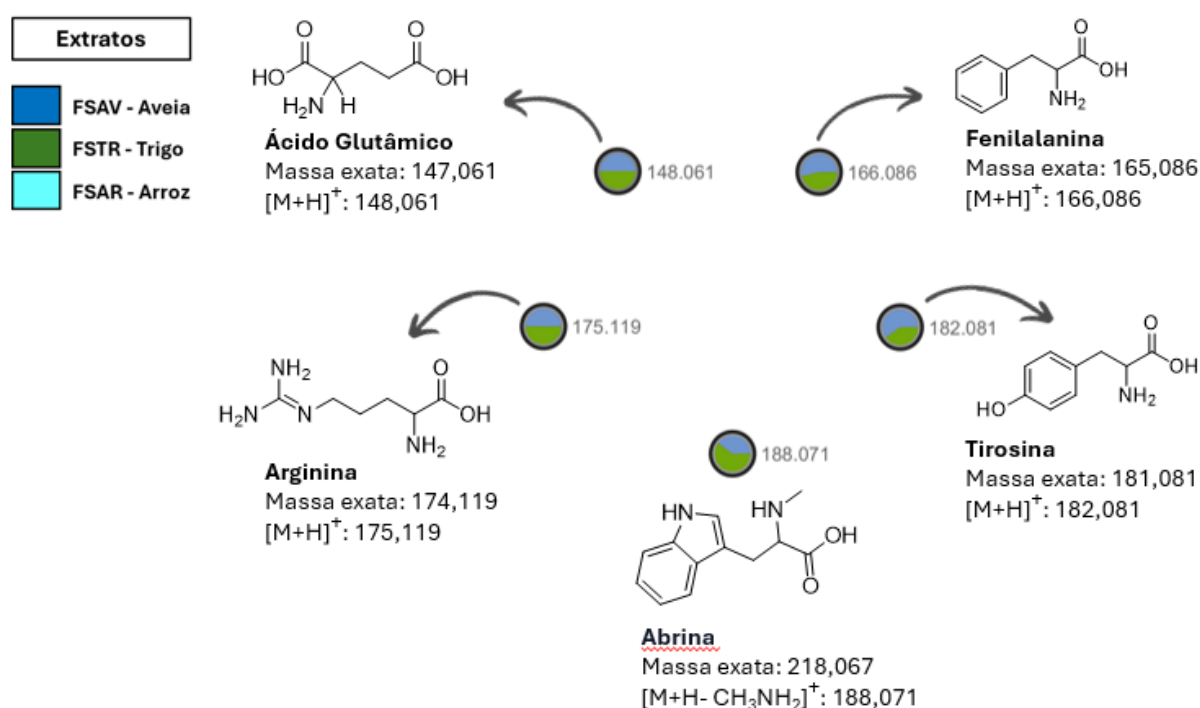
Quadro 6. Substâncias anotadas através da plataforma GNPS para extratos de *Fusarium solani* em meios sólidos

Nome da Substância	Cosseno	<i>m/z</i> amostra	<i>m/z</i> calculada	Erro de massa (ppm)	Classe da Referência
Ácido Glutâmico	0,8124	148,061	148,06	6,7	Gold
Fenilalanina	0,9920	166,086	166,086	0,0	Gold
Arginina	0,8427	175,119	175,119	0,0	Bronze
Tirosina	0,8959	182,081	182,081	0,0	Bronze
Abrina	0,8731	188,071	188,067	21,2	Bronze
N-frutossil-tirosina	0,4587	344,134	344,133	2,9	Bronze
N-frutossil-isoleucina	0,6904	294,155	294,156	- 3,3	Bronze
7-hidroxi-3,5-dimetilisocromeno-1-ona	0,9712	191,07	191,07	0,0	Gold
Isomarticina	0,9331	377,086	377,086	0,0	Bronze
Ácido Fusaridióico A	0,7249	343,211	343,211	0,0	Bronze
Ácido Fusaridióico D	0,7892	325,201	325,201	0,0	Bronze
NG-391	0,6784	418,186	418,186	0,0	Gold
Ciclosporina-X	0,4721	601,928	601,927	1,6	Bronze

As primeiras anotações seguindo a ordem da **Quadro 6**, foram realizadas para os nodos isolados, mas que pertencem à mesma classe de substâncias, os aminoácidos (**Figura 38**).

As fontes de nitrogênio são fundamentais para o desenvolvimento fúngico, atuando principalmente na formação de micélios e na biossíntese de metabólitos especializados. Os aminoácidos são os principais constituintes que compõem biomoléculas como enzimas e proteínas, assim como uma variedade de outros compostos. Os fungos são capazes de assimilar fontes inorgânicas de nitrogênio e, posteriormente, convertê-las em aminoácidos, além disso, os fungos também conseguem absorver aminoácidos diretamente do ambiente extracelular por meio de permeases de aminoácidos (AAPs) (YANG *et al.*, 2024).

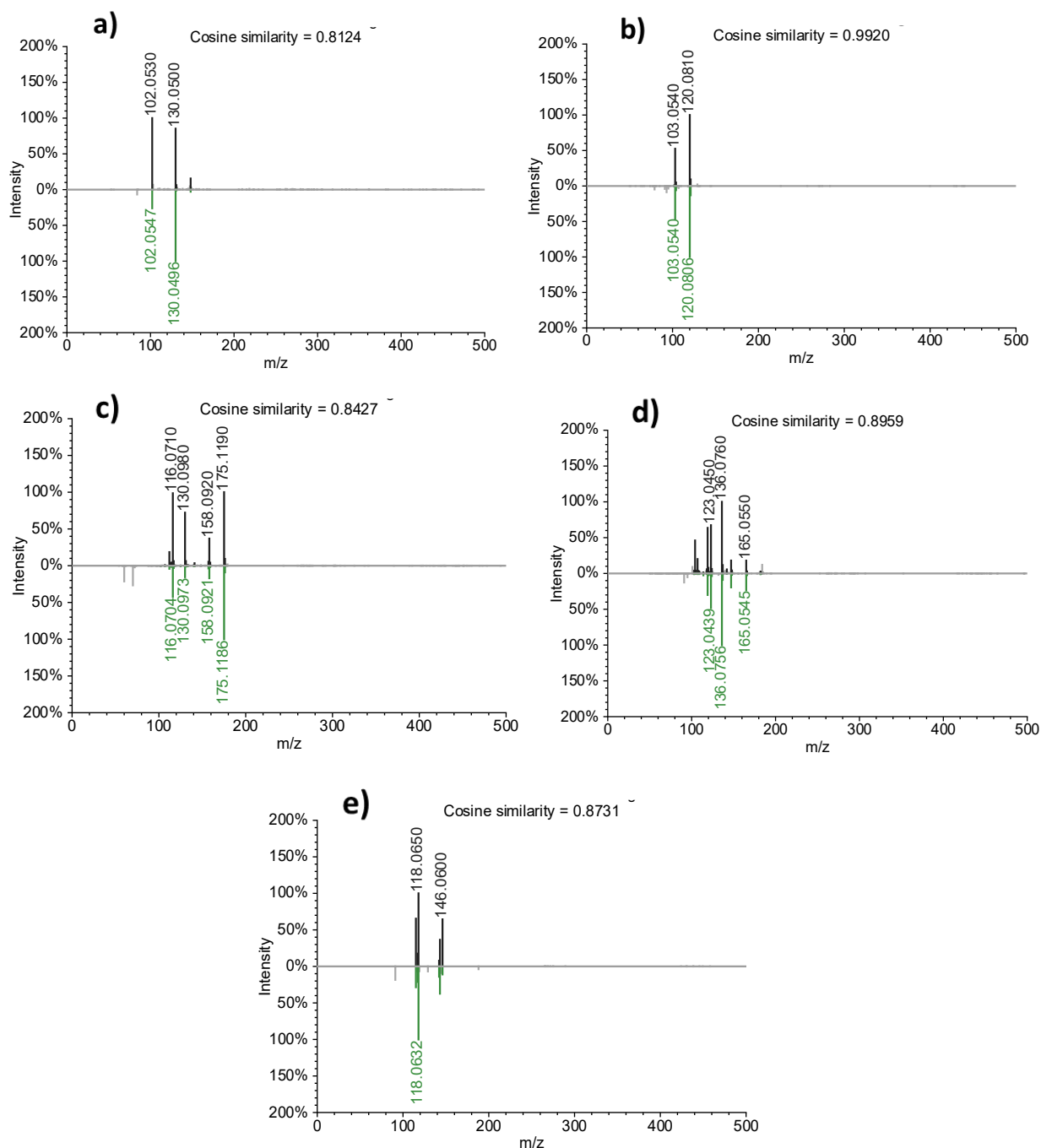
Figura 38. Aminoácidos anotados para os extratos de *F. solani* em meios sólidos de aveia, trigo e arroz



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

Para os aminoácidos anotados, é possível ver na figura (**Figura 39**), a similaridade espectral com a biblioteca da plataforma GNPS considerando os principais fragmentos para cada molécula.

Figura 39. Correspondência espectral com a biblioteca do GNPS para os aminoácidos anotados



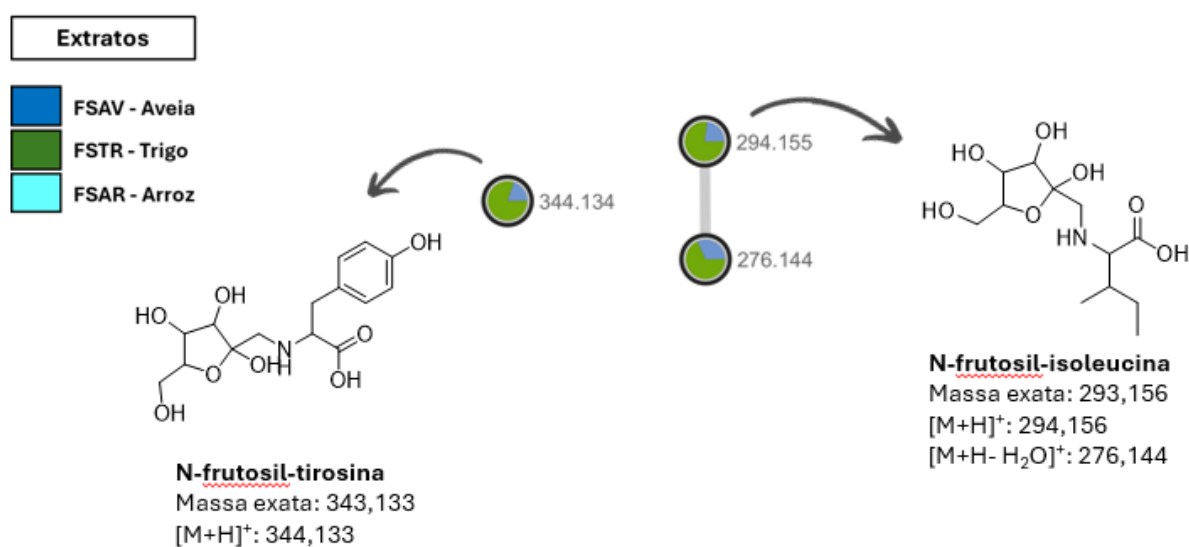
Glutamato (a), Fenilalanina (b), Arginina (c), Tirosina (d), Abrina (e)

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

Também foram anotados em nodos isolados, outros dois aminoácidos da classe dos *N*-frutossilados, a *N*-frutossil-tirosina e *N*-frutossil-isoleucina (**Figura 40**) que resultam de uma ligação entre um aminoácido e uma molécula de frutose por meio de

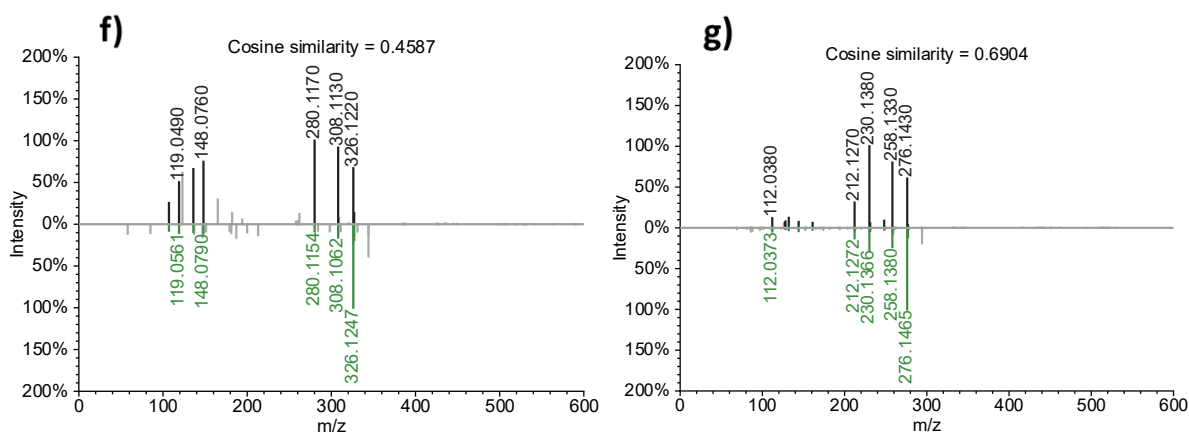
uma reação de glicação. Estes aminoácidos, assim como os que foram mostrados anteriormente, foram detectados apenas nos extratos em meio de aveia e trigo.

Figura 40. Aminoácidos *N*-frutossilados anotados através da plataforma GNPS de extratos de *F. solani* obtidos em meios sólidos



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

Figura 41. Correspondência espectral com a biblioteca do GNPS para os Aminoácidos *N*-frutossilados

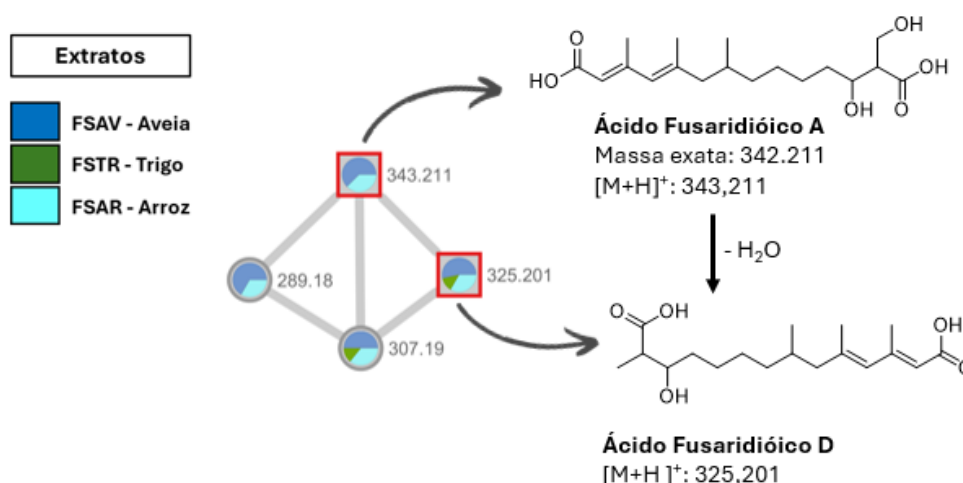


N-frutossil-tirosina (f) e N-frutossil-isoleucina (g)

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

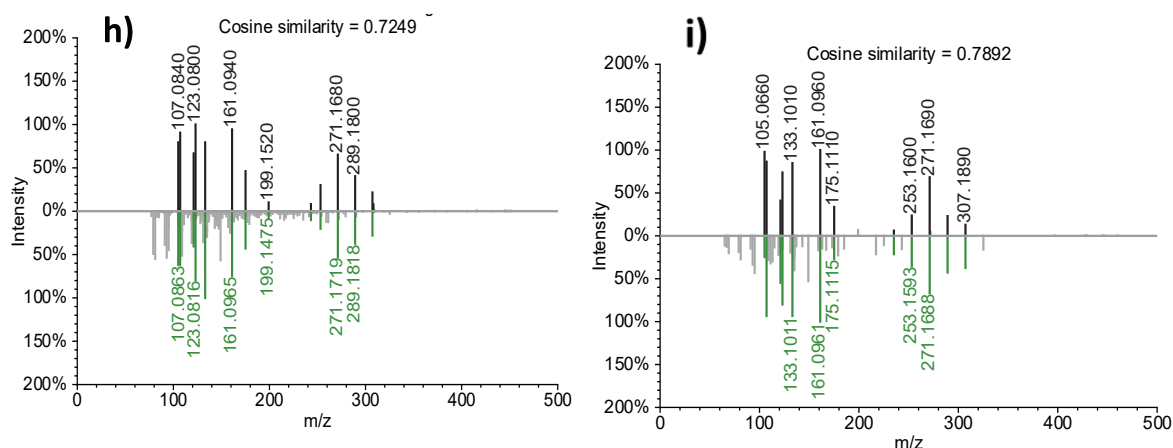
Entre as moléculas já reportadas na literatura e que são características da espécie *Fusarium solani*, foram anotados dois diácidos alquenólicos, ácido fusaridióico A e ácido fusaridióico D em um cluster que agrupou quatro nodos (**Figura 42**). Estas substâncias possuem estruturas semelhantes e, a literatura relata que o ácido fusaridióico D é um produto de desidroxilação do ácido fusaridióico A (LIU *et al.*, 2018). Quanto as suas atividades biológicas, ainda há pouco relatado, mas alguns trabalhos avaliaram seu potencial antifúngico, evidenciando atividade moderada contra algumas cepas patógenas (CHEMUTAI SUM *et al.*, 2024; LIU *et al.*, 2018; TANG *et al.*, 2022).

Figura 42. Ácidos alquenólicos anotados pela plataforma GNPS



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

Figura 43. Correspondência espectral com plataforma GNPS para ácidos alquenólicos



Ácido Fusaridióico A (h) e Ácido Fusaridióico D (g)

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

Na rede molecular dos extratos em meios sólidos de *Fusarium solani* (**Figura 36**), é possível notar a presença de vários nodos sem conexão, evidenciando a presença de substâncias com características mais específicas. Algumas dessas substâncias estão presentes nos três extratos analisados, outras são exclusivas de apenas um extrato, porém poucas foram anotadas com similaridade espectral.

Duas substâncias foram anotadas apenas para o extrato de *F. solani* em meio de arroz, um policetídeo fenólico, 7-Hidroxi-3,5-dimetil-1H-isocromen-1-ona e uma naftoquinona conhecida como isomarticina (**Figura 44**).

O policetídeo 7-Hidroxi-3,5-dimetil-1H-isocromen-1-ona é uma substância pouco estudada em relação a bioatividades, sendo relatada apenas a atividade anti-inflamatória moderada desta substância em uma pesquisa que avaliou vários policetídeos (ZENG *et al.*, 2022).

A isomarticina é uma substância recorrente em espécies de *Fusarium*, e é conhecida por sua atividade fitotóxica, causando danos em diversas plantas. Substâncias com essa capacidade têm sido estudadas na busca por biodefensivos (VAN JANSE RENSBURG *et al.*, 2001).

Figura 44. Metabólitos detectados apenas no estrado de *F. solani* em meio de arroz

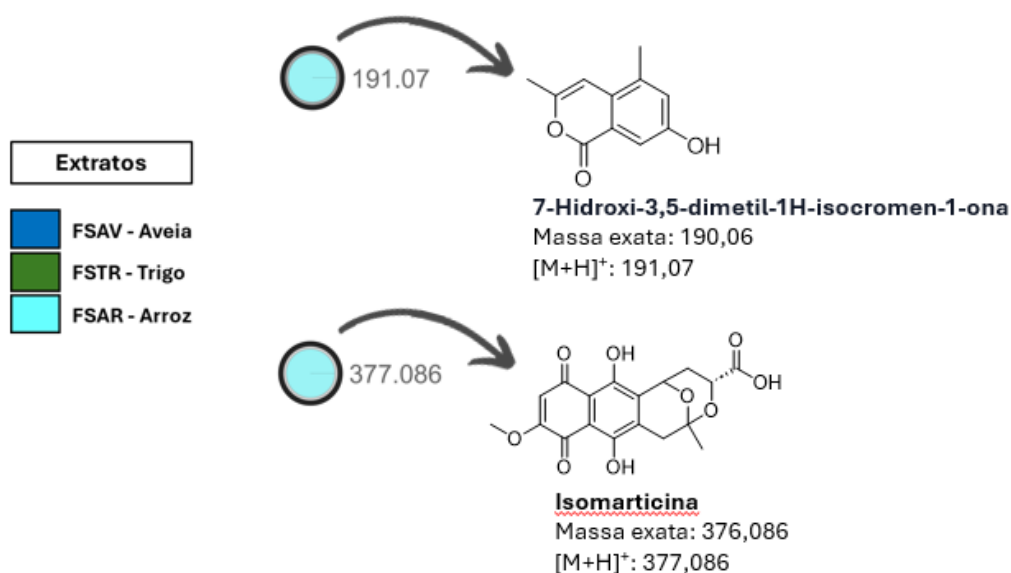
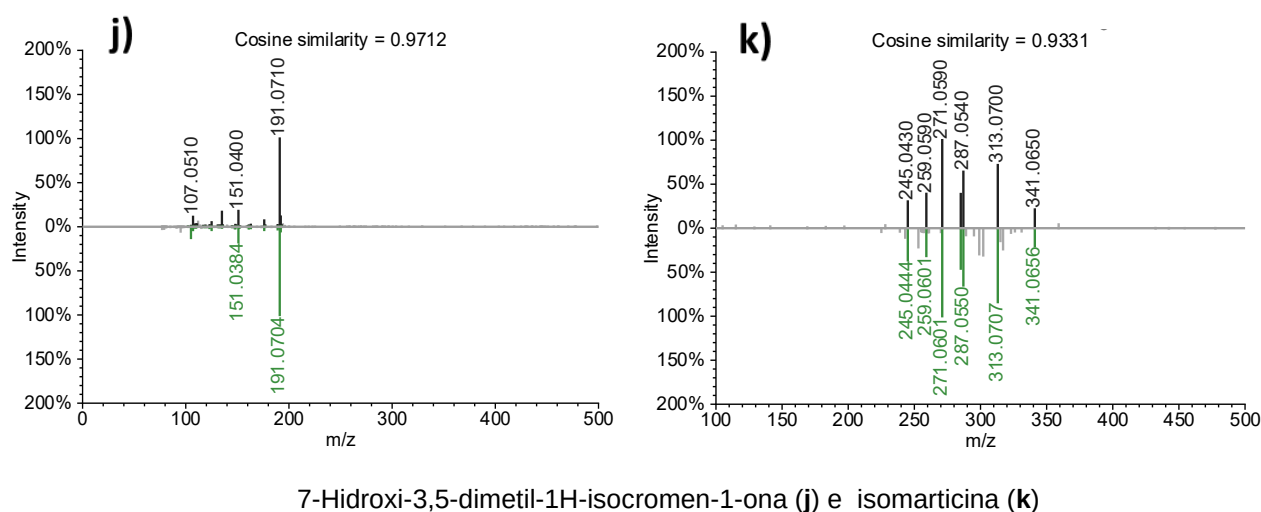


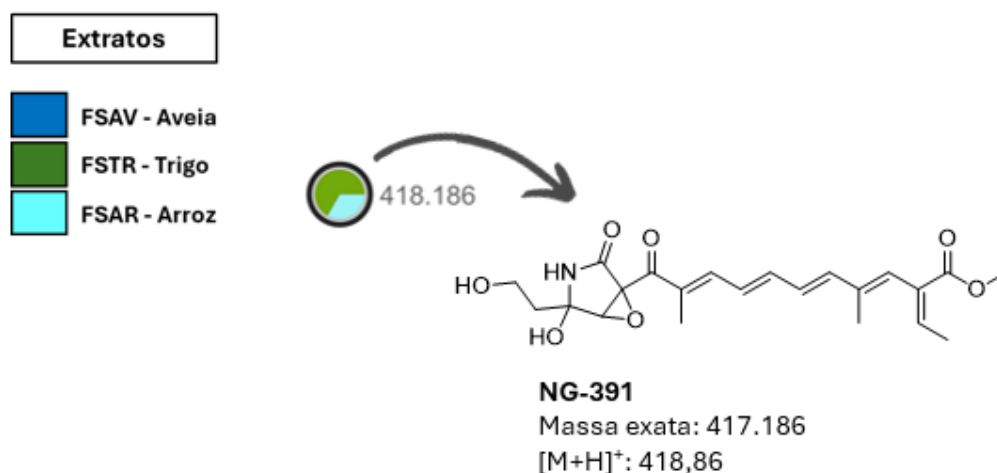
Figura 45. Correspondência espectral com plataforma GNPS para 7-Hidroxi-3,5-dimetil-1H-isocromen-1-ona e isomarticina



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

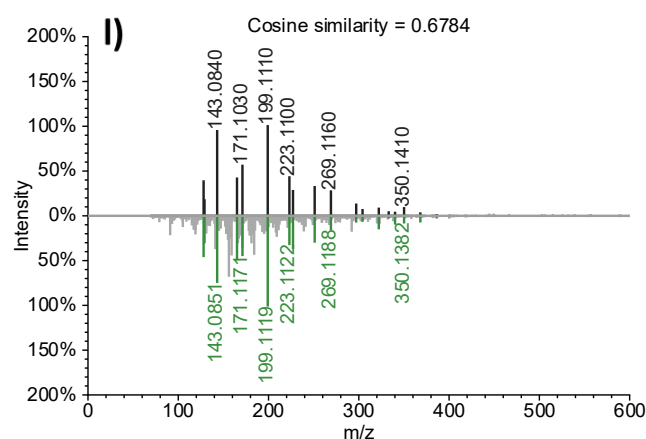
Um metabólito conhecido como NG-391, presente em espécies de *Fusarium*, foi anotado com bases nas correlações feitas da plataforma GNPS (**Figura 46**) e considerando sua similaridade espectral (**Figura 47**), o que evidenciou sua presença nos extratos em meio de trigo e arroz. Essa micotoxina é análoga às fusarinas, importante classe de metabólitos com atividades antimicrobianas e citotóxicas (AHMED et al., 2023; KHAN et al., 2018). A NG-391 apresentou atividade citotóxica contra células leucêmicas K-562, interferindo na síntese de ácidos nucleicos dessas células (BOHNERT et al., 2013).

Figura 46. Anotação da micotoxina NG-391 na plataforma GNPS para extratos de *F. solani* em meios de trigo e arroz



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

Figura 47. Correspondência espectral com plataforma GNPS para NG-391

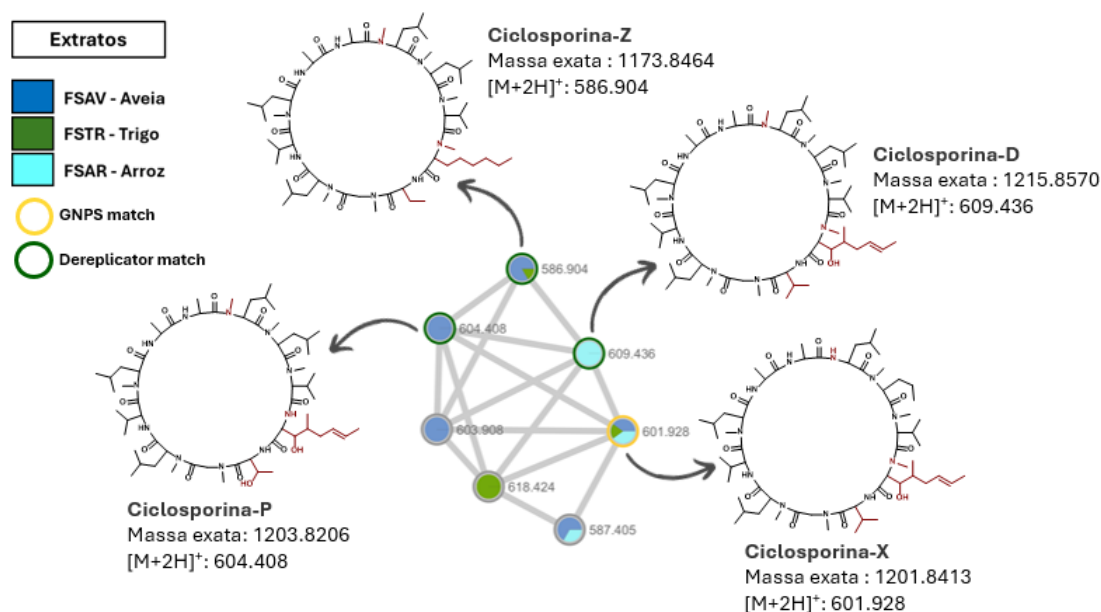


NG-391 (I)

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

Foi ainda gerada pela plataforma GNPS, anotação para o peptídeo conhecido como ciclosporina-X. Essa substância foi agrupada em cluster com 7 nodos conectados entre si, indicando a presença de substâncias análogas. Com base nesta observação, foi realizada uma análise utilizando a ferramenta DEREPLICATOR (versão 1.2.8), específica para anotação de peptídeos também na plataforma GNPS. Após análise, foi possível anotar outras moléculas de ciclosporinas (Figura 48).

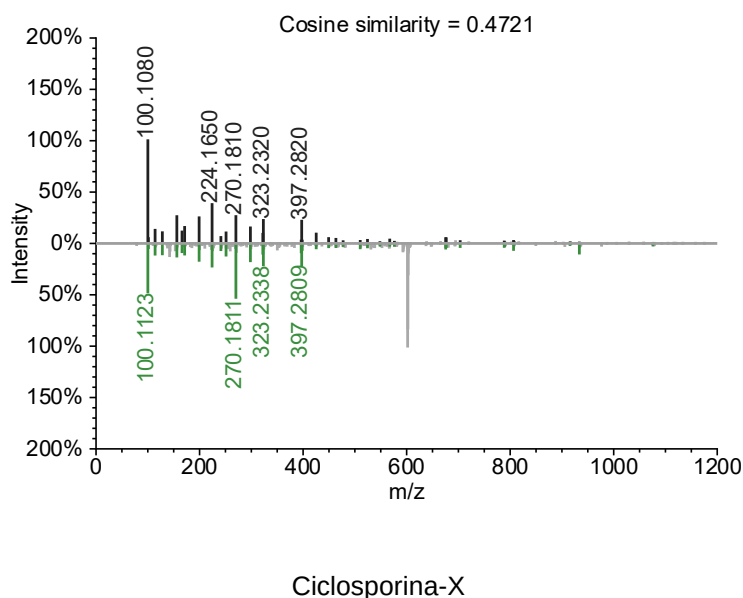
Figura 48. Cluster de ciclosporinas anotadas pela plataforma GNPS



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

As ciclosporinas anotadas possuem pequenas diferenças em suas estruturas moleculares, referentes a resíduos de aminoácidos que formam suas respectivas moléculas. É possível observar a similaridade espectral da ciclosporina-X com as bases da plataforma GNPS (**Figura 49**).

Figura 49. Correspondência espectral com a plataforma GNPS para ciclosporina-X



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

As ciclosporinas constituem uma importante classe de peptídeos cíclicos, conhecidos por sua potente ação imunossupressora, por isso são amplamente utilizadas para prevenir a rejeição de órgãos transplantados e no tratamento de doenças autoimunes (NARAYANI *et al.*, 2020; PATOCKA *et al.*, 2020).

Entre as moléculas dessa classe, a ciclosporina A (CsA) é a mais estudada devido a sua potente atividade imunossupressora além de outras atividades como, antiparasitária, antifúngica e anti-inflamatória (NARAYANI *et al.*, 2020; PATOCKA *et al.*, 2020).

Em contraste com a ciclosporina A (CsA), os análogos (CsD, CsP, CsX e CsZ) são menos explorados e não há dados na literatura sobre suas bioatividades, porém, as diferenças em suas estruturas podem representar um diferencial e um incentivo para novas pesquisas sobre essa classe de substâncias.

5.2.5. Atividade citotóxica dos extratos de *F. solani* em meios sólidos

Assim como os extratos da curva de crescimento, os extratos em meios sólidos foram testados contra células HCT116 (carcinoma colorretal). Adicionalmente, para os extratos em meios sólidos, além da avaliação da citotoxicidade dos extratos brutos, foram realizados testes também para as frações de partição líquido/líquido, visto que os extratos em meios sólidos foram obtidos com massa suficiente para partição e fracionamentos cromatográficos.

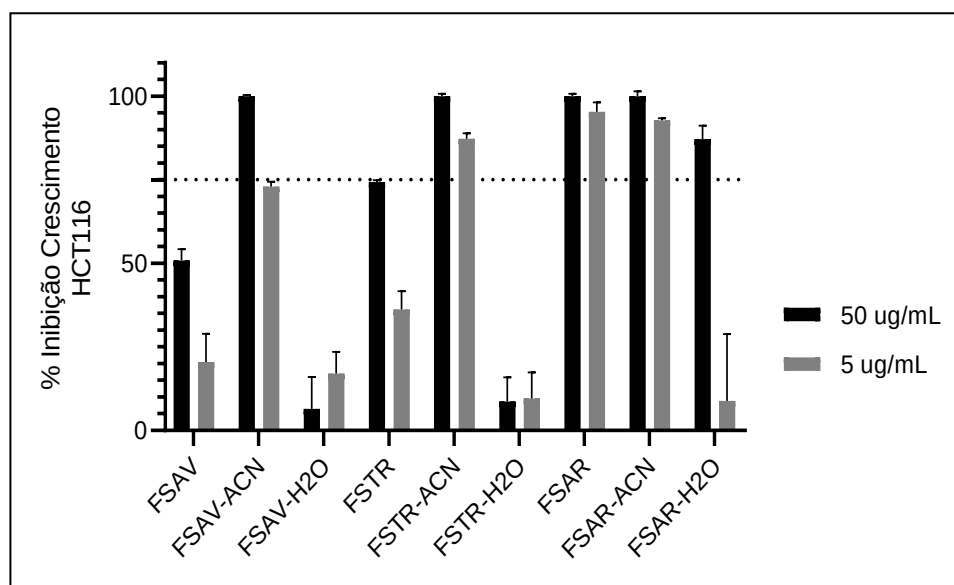
Figura 50. Atividade citotóxica dos extratos de *F. solani* em meios sólidos

50 ug/ml			
Amostras	% Inibição	SEM	N
FSAV	50,87	3,33	4
FSAV-ACN	100	0,33	4
FSAV-H2O	6,42	9,59	4
FSTR	74,27	0,55	4
FSTR-ACN	100	0,71	4
FSTR-H2O	8,66	7,25	4
FSAR	100	0,69	4
FSAR-ACN	100	1,39	4
FSAR-H2O	87,09	4,06	4
5 ug/mL			
Amostras	% Inibição	SEM	N
FSAV	20,53	8,37	4
FSAV-ACN	72,94	1,46	4
FSAV-H2O	16,97	6,56	4
FSTR	36,12	5,56	4
FSTR-ACN	87,21	1,64	4
FSTR-H2O	9,61	7,78	4
FSAR	95,26	2,83	4
FSAR-ACN	92,69	0,67	4
FSAR-H2O	8,88	19,97	4

FSAV (extrato em meio de aveia); **FSTR** (extrato em meio de trigo);
FSAR (extrato em meio de arroz)

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

Figura 51. Comparação da atividade citotóxica dos extratos em meios sólidos nas concentrações testadas



FSAV (extrato em meio de aveia), **FSAV-ACN** (partição acetoneitrila do extrato em meio de aveia), **FSAV-H2O** (partição aquosa do extrato em meio de aveia); **FSTR** (extrato em meio de trigo), **FSTR-ACN** (partição acetoneitrila do extrato em meio de trigo), **FSTR-H2O** (partição aquosa do extrato em meio de trigo); **FSAR** (extrato em meio de arroz), **FSAR-ACN** (partição acetoneitrila do extrato em meio de arroz), **FSAR-H2O** (partição aquosa do extrato em meio de arroz)

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025

Na concentração de 50 ug/mL foi possível observar um aumento na atividade quando comparamos apenas os percentuais dos extratos brutos em que, o FSAV apresentou 50,87% de inibição, o FSTR mostrou 74,27% e FSAR 100% de inibição. Por outro lado, quando a comparação é realizada com as frações de partição em ACN, todas (FSAV-ACN, FSTR-ACN e FSAR-ACN) exibiram 100% de inibição das células HCT116 nessa concentração.

Na concentração de 5 ug/mL a tendência se manteve, quando comparamos os extratos brutos, FSAV (20,53%) e FSTR (36,12%) mostraram atividades inibitórias do crescimento da linhagem HCT116 abaixo de 50%, enquanto FSAR continuou apresentando atividade muito significativa, com 95,13% de inibição.

As frações ACN mostraram percentuais maiores do que os extratos brutos na concentração de 5 ug/mL, e é possível notar novamente, um aumento na atividade com a variação do meio, a partição FSAV-ACN mostrou 72,94% de inibição, seguida

da fração de partição FSTR-ACN com 87,21%, enquanto a partição FSAR-ACN apresentou 92,69% de inibição do crescimento das células HCT116.

As frações de partição aquosas FSAV-H₂O e FSTR-H₂O não se mostram ativas nas concentrações testadas, enquanto a fração de partição FSAR-H₂O exibiu 87,09% de inibição das células HCT116 na concentração de 50 µg/mL.

Num panorama geral, os extratos e partições apresentaram potencial citotóxico atrativo para prosseguimento da investigação, com destaque para o extrato em meio de arroz, que mostrou os melhores percentuais de inibição das células HCT116. Entre as moléculas anotadas para os extratos de *F. solani*, a NG-391 possui atividade citotóxica comprovada contra células tumorais K-562 (leucemia), e pode estar diretamente ligada ao potencial citotóxico apresentado pelos extratos de *F. solani* estudados, assim como outras substâncias análogas a ela (BOHNERT *et al.*, 2013).

Apesar dos extratos apresentarem perfis cromatográficos complexos, a metodologia utilizada para realizar as partições líquido-líquido contribuiu para identificar a fração de partição mais ativa, de alta relevância para estudos futuros que visem o fracionamento e isolamento de substâncias bioativas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A construção das curvas de crescimento para a linhagem do fungo *F. solani* estudada foi essencial para identificar o tempo otimizado de crescimento baseado na produção de extrato (20 dias), além de permitir a identificação de cada fase de crescimento do fungo e das melhores condições de cultivo.

Os dados da curva, permitiram também, avaliar qual ponto apresentou o extrato mais ativo contra células HCT116 considerando o cultivo em meio líquido de malte, que no geral, apresentaram bons potenciais de inibição, com destaque para os extratos obtidos nos pontos que representavam a fase estacionária (15, 20 e 25 dias) e dos últimos extratos (35 e 40 dias).

Os extratos em meio de malte obtidos durante o experimento da curva de crescimento mostraram baixa produção de massa, mesmo no ponto ótimo da curva (20 dias). Esse fato associado à alta diversidade de produção de substâncias, resultou em extratos complexos e de difícil aplicação das técnicas cromatográficas para fracionamento e isolamento de substâncias, o que demandou uma nova abordagem, na qual foi escolhida a variação de meios de cultivo da linhagem fúngica em estudo na busca por uma produção metabólica para a obtenção massa suficiente para o trabalho e perfis cromatográficos menos complexos.

O cultivo de *Fusarium solani* em meios sólidos de aveia, trigo e arroz, forneceu um panorama diferente do observado na curva de crescimento. As massas de extratos produzidas foram maiores, permitindo realizar a avaliação da bioatividade de cada fração partição e identificar as mais ativas contra as células da linhagem tumoral HCT116.

A construção das redes moleculares foi essencial para mostrar as semelhanças e diferenças em cada extrato, tanto nas amostras da curva de crescimento quanto nos extratos em meios sólidos, evidenciando a presença de metabólitos especializados em todas as amostras assim como a exclusividade de várias substâncias em determinados extratos, confirmando a influência da mudança de meio de cultura na produção metabólica. As análises de redes moleculares também permitiram anotar substâncias com similaridade espectral por comparação com os dados das bases da plataforma GNPS e que podem estar associadas ao potencial citotóxico apresentado pelas amostras avaliadas.

Os resultados deste trabalho evidenciam a importância da pesquisa sobre microrganismos marinhos, especialmente os que são provenientes da costa brasileira e a aplicação de diferentes condições, com destaque para variações nos meios de cultivo para influenciar na produção metabólica, bioatividade e quimiodiversidade. Ressaltam também a importância do ambiente marinho brasileiro como um local de grande potencial químico e biotecnológico, de onde podem surgir descobertas inovadoras com impactos socioeconômicos e ambientais.

As contribuições desta pesquisa estão alinhadas com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável, especialmente os ODS 14 (Vida na Água) que visa conservar e usar de forma sustentável os oceanos, mares e recursos aquáticos, bem como o ODS 3, associado ao bem-estar e a melhoria da saúde, e o ODS 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura), que incentiva a inovação e o desenvolvimento de infraestruturas resilientes.

REFERÊNCIAS

- AHMED, A. M.; MAHMOUD, B. K.; MILLÁN-AGUIÑAGA, N.; ABDELMOHSEN, U. R.; FOUAD, M. A. The endophytic *Fusarium* strains: a treasure trove of natural products. **RSC Advances**, v. 13, n. 2, p. 1339–1369, 2023.
- AL-ADILAH, H.; FEITERS, M. C.; CARPENTER, L. J.; KUMARI, P.; CARRANO, C. J.; AL-BADER, D.; KÜPPER, F. C. Halogens in Seaweeds: Biological and Environmental Significance. [S. l.]: **Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)**, 2022.
- ALGHAZEER, R.; EL FATAH, H.; AZWAI, S.; ELGHMASI, S.; SIDATI, M.; EL FITURI, A.; ALTHALUTI, E.; GAMMOUDI, F.; YUDIATI, E.; TALOUZ, N.; SHAMLAN, G.; AL-FARGA, A.; ALANSARI, W. S.; ESKANDRANI, A. A. Nutritional and Nonnutritional Content of Underexploited Edible Seaweeds. **Aquaculture Nutrition**, v. 2022, 2022.
- AMUZU, P.; PAN, X.; HOU, X.; SUN, J.; JAKADA, M. A.; ODIGIE, E.; XU, D.; LAI, D.; ZHOU, L. Recent Updates on the Secondary Metabolites from *Fusarium* Fungi and Their Biological Activities (Covering 2019 to 2024). **Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)**, 2024.
- BARBA, F. J. Microalgae and seaweeds for food applications: Challenges and perspectives. **Elsevier** Ltd, 2017.
- BELOVA, L.; FUJII, Y.; CLEYS, P.; ŚMIEŁOWSKA, M.; HARAGUCHI, K.; COVACI, A. Identification of novel halogenated naturally occurring compounds in marine biota by high-resolution mass spectrometry and combined screening approaches. **Environmental Pollution**, v. 289, 2021.
- BERLINCK, R. G. S. et al. A Química de Produtos Naturais do Brasil do Século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706–710, 2017.
- BLUNT, J. W.; CARROLL, A. R.; COPP, B. R.; DAVIS, R. A.; KEYZERS, R. A.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 35, n. 1, p. 8–53, 2018.

BOGAS, A. C.; CRUZ, F. P. N.; LACAVA, P. T.; SOUSA, C. P. Endophytic fungi: an overview on biotechnological and agronomic potential. ***Brazilian Journal of Biology***, v. 84, 2024.

BOHNERT, M.; DAHSE, H. M.; GIBSON, D. M.; KRASNOFF, S. B.; HOFFMEISTER, D. The fusarin analog NG-391 impairs nucleic acid formation in K-562 leukemia cells. ***Phytochemistry Letters***, v. 6, n. 2, p. 189–192, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2013.01.001>.

CARPENA, M.; GARCIA-PEREZ, P.; GARCIA-OLIVEIRA, P.; CHAMORRO, F.; OTERO, P.; LOURENÇO-LOPES, C.; CAO, H.; SIMAL-GANDARA, J.; PRIETO, M. A. Biological properties and potential of compounds extracted from red seaweeds. ***Springer Science and Business Media B.V.***, 2023.

CARROLL, A. R.; COPP, B. R.; DAVIS, R. A.; KEYZERS, R. A.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. ***Natural Product Reports***, v. 36, n. 1, p. 122–173, 2019.

CARROLL, A. R.; COPP, B. R.; DAVIS, R. A.; KEYZERS, R. A.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. ***Natural Product Reports***, v. 37, n. 2, p. 175–223, 2020.

CARROLL, A. R.; COPP, B. R.; DAVIS, R. A.; KEYZERS, R. A.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. ***Natural Product Reports***, v. 38, n. 2, p. 362–413, 2021.

CARROLL, A. R.; COPP, B. R.; DAVIS, R. A.; KEYZERS, R. A.; PRINSEP, M. R. ***Marine natural products***, 2022.

CARROLL, A. R.; COPP, B. R.; DAVIS, R. A.; KEYZERS, R. A.; PRINSEP, M. R. ***Marine natural products***. Royal Society of Chemistry, 2023.

CARROLL, A. R.; COPP, B. R.; GRKOVIC, T.; KEYZERS, R. A.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. ***Natural Product Reports***, 2024.

CATARINO, M. D.; SILVA, A. M. S.; CARDOSO, S. M. Phycochemical constituents and biological activities of *Fucus* spp. **Marine Drugs**, v. 16, n. 8, 2018.

CHAGAS, F. D. S. et al. Sulfated polysaccharide from the red algae *Gelidiella acerosa*: Anticoagulant, antiplatelet and antithrombotic effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 159, p. 415–421, 2020.

CHEMUTAI SUM, W.; EBADA, S. S.; WANG, H.; KELLNER, H.; STADLER, M. Protoilludene and Alkenoic Acid Derivatives from the European Polypore *Fomitiporia hartigii*. **ACS Omega**, v. 9, n. 28, p. 31006–31010, 2024.

CHEN, Y.; WANG, G.; YUAN, Y.; ZOU, G.; YANG, W.; TAN, Q.; KANG, W.; SHE, Z. Metabolites With Cytotoxic Activities From the Mangrove Endophytic Fungus *Fusarium* sp. 2ST2. **Frontiers in Chemistry**, v. 10, 2022.

COLEMAN, J. J. The *Fusarium solani* species complex: Ubiquitous pathogens of agricultural importance. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, n. 2, p. 146–158, 2016.

CONWAY, J. R.; LEX, A.; GEHLENBORG, N. UpSetR: an R package for the visualization of intersecting sets and their properties. **Bioinformatics**, v. 33, n. 18, p. 2938–2940, 2017.

COTAS, J.; LEANDRO, A.; PACHECO, D.; GONÇALVES, A. M. M.; PEREIRA, L. A comprehensive review of the nutraceutical and therapeutic applications of red seaweeds (Rhodophyta). **MDPI AG**, 2020.

DESHMUKH, S. K.; PRAKASH, V.; RANJAN, N. Marine fungi: A source of potential anticancer compounds. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JAN, p. 1–24, 2018.

DWEBE, C. C.; FIGLAN, S.; SHIMELIS, H. A.; MOTAUNG, T. E.; SYDENHAM, S.; MWADZINGENI, L.; TSILO, T. J. *Fusarium* head blight of wheat: Pathogenesis and control strategies. **Crop Protection**, v. 91, p. 114–122, 2017.

EBRAHIMI, F.; SUBBIAH, V.; AGAR, O. T.; BRINGLOE, T. T.; LEGIONE, A. R.; SULERIA, H. A. R. LC-ESI-QTOF-MS/MS characterization of phenolic compounds from Victorian shorebound red seaweeds and their antioxidant capacity. ***Algal Research***, v. 82, 2024.

EL-HAWARY, S. et al. Natural product diversity from the endophytic fungi of the genus *Aspergillus*. ***RSC Advances***, v. 10, n. 36, p. 22058–22079, 2020.

FENG, S.; BELWAL, T.; LI, L.; LIMWACHIRANON, J.; LIU, X.; LUO, Z. Phytosterols and their derivatives: Potential health-promoting uses against lipid metabolism and associated diseases, mechanism, and safety issues. ***Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety***, v. 19, n. 4, p. 1243–1267, 2020.

FONTANA, S.; WANG, W. L.; TSENG, K. Y.; DRAISMA, S. G. A.; DUMILAG, R. V.; HU, Z. M.; LI, J. J.; LAI, P. H.; MATTIO, L.; SHERWOOD, A. R.; BOO, S. M.; LIU, S. L. Seaweed diversification driven by Taiwan's emergence and the Kuroshio Current: insights from the cryptic diversity and phylogeography of *Dichotomaria* (Galaxauraceae, Rhodophyta). ***Frontiers in Ecology and Evolution***, v. 12, 2024.

GARCIA, A. N. et al. *Dichotomaria marginata* (Rhodophyta) as a bioindicator for marine pollution: An overview about its metabolites and adsorbed pollutants. ***Revista de Biología Marina y Oceanografía, Valparaíso***, v. 55, n. 2, p. 128–141, 2020.

GERIS, R.; TELES DE JESUS, V. E.; FERREIRA DA SILVA, A.; MALTA, M. Exploring Culture Media Diversity to Produce Fungal Secondary Metabolites and Cyborg Cells. ***John Wiley and Sons Inc***, 2024.

GERWICK, W. H.; MOORE, B. S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology, 2012.

GOMEZ-CHAVARRIA, D. A.; RUA-GIRALDO, A. L.; ALZATE, J. F. An evolutionary view of the *Fusarium* core genome. ***BMC Genomics***, v. 25, n. 1, p. 1–16, 2024.

GONG, J.; CHEN, C.; MO, S.; LIU, J.; WANG, W.; ZANG, Y.; LI, H.; CHAI, C.; ZHU, H.; HU, Z.; WANG, J.; ZHANG, Y. Fusaresters A-E, new γ -pyrone-containing polyketides from fungus: *Fusarium* sp. Hungcl and structure revision of fusariumin D. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 17, n. 22, p. 5526–5532, 2019.

HONÓRIO, A. E. Avaliação química e biológica de fungos endofíticos associados às algas marinhas *Acanthophora spicifera*, *Dichotomaria marginata* e *Sargassum vulgare*. 2018. 153 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

ISMAIL, M. M.; ALOTAIBI, B. S.; EL-SHEEKH, M. M. Therapeutic uses of red macroalgae. **MDPI AG**, 2020.

JEEWON, R. et al. Pharmaceutical Potential of Marine Fungal Endophytes. In: **Endophytes and Secondary Metabolites**. p. 283–305.

JESUS, A.; CORREIA-DA-SILVA, M.; AFONSO, C.; PINTO, M.; CIDADE, H. Isolation and potential biological applications of haloaryl secondary metabolites from macroalgae. **Marine Drugs**, v. 17, n. 2, p. 1–19, 2019.

KASANA, N. et al. Rhodophyta as Potential Sources of Photoprotectants, Antiphotaging Compounds, and Hydrogels for Cosmeceutical Application. **Molecules**, v. 27, n. 22, p. 7788, 2022.

KAWSAR, S. M. A.; HOSSAIN, M. A.; SAHA, S.; ABDALLAH, E. M.; BHAT, A. R.; AHMED, S.; JAMALIS, J.; OZEKI, Y. Nucleoside-Based Drug Target with General Antimicrobial Screening and Specific Computational Studies against SARS-CoV-2 Main Protease. *John Wiley and Sons Inc*, 2024.

KHAN, N. et al. Endophytic *Fusarium solani*: A rich source of cytotoxic and antimicrobial naphthaquinone and aza-anthraquinone derivatives. **Toxicology Reports**, v. 5, n. August, p. 970–976, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.08.016>.

KHAYAT, M. T. et al. Anti-inflammatory metabolites from endophytic fungus *Fusarium* sp. **Phytochemistry Letters**, v. 29, p. 104–109, 2019.

LAKSHMI, D. S.; SANKARANARAYANAN, S.; GAJARIA, T. K.; LI, G.; KUJAWSKI, W.; KUJAWA, J.; NAVIA, R. A short review on the valorization of green seaweeds and ulvan: Feedstock for chemicals and biomaterials, 2020.

LANE, A. L.; MOORE, B. S. A sea of biosynthesis: Marine natural products meet the molecular age, 2011.

LANGVAD, F. A rapid and efficient method for growth measurement of filamentous fungi. **Journal of Microbiological Methods**, v. 37, n. 1, 1999.

LAVECCHIA, A.; FOSSO, B.; ENGELEN, A. H.; BORIN, S.; MANZARI, C.; PICARDI, E.; PESOLE, G.; PLACIDO, A. Macroalgal microbiomes unveil a valuable genetic resource for halogen metabolism. **Microbiome**, v. 12, n. 1, 2024.

LE MARQUER, M.; SAN CLEMENTE, H.; ROUX, C.; SAVELLI, B.; FREI DIT FREY, N. Identification of new signalling peptides through a genome-wide survey of 250 fungal secretomes. *BioMed Central Ltd.*, 2019.

LI, X.; XIN, Y.; MO, Y.; MAROZIK, P.; HE, T.; GUO, H. The Bioavailability and Biological Activities of Phytosterols. **Molecules MDPI**, p. 1–15, 2022.

LIAO, W.-R. et al. Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 7, p. 433–439, 2003.

LIN, C.; HUANG, R.; LIU, J.; LI, H.; ZHU, L.; HUANG, X.; DING, B.; LIU, L.; HUANG, H.; TAO, Y. Antibacterial Polyketides Isolated from the Marine-Derived Fungus *Fusarium solani* 8388. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 9, 2023.

LIU, S.; LIN, S.; WANG, W.; LIU, S.; LIN, S.; WANG, W. Molecular phylogeny of the genus *Dichotomaria* (Galaxauraceae, Rhodophyta) from the Indo-Pacific region,

including a new species *D. hommersandii* from South Africa. ***European Journal of Phycology***, v. 0262, n. May, p. 221–234, 2013.

LIU, S. Z.; YAN, X.; TANG, X. X.; LIN, J. G.; QIU, Y. K. New bis-alkenoic acid derivatives from a marine-derived fungus *Fusarium solani* H915. ***Marine Drugs***, v. 16, n. 12, 2018.

Luo, G., Zheng, L., Wu, Q., Chen, S., Li, J., & Liu, L. (2021). Fusarins g–l with inhibition of no in RAW264.7 from marine-derived fungus *fusarium solani* 7227. ***Marine Drugs***, 19(6). <https://doi.org/10.3390/MD19060305>

MA, X.; SONG, Y; SHI, Z; JI, N. Three sesquiterpenes from the marine-alga-epiphytic fungus *Trichoderma hamatum* Z36-7. ***Phytochemistry Letters***, v. 43, p. 98–102, 2021.

MACHADO, L. P.; STEFANELLO, E.; ANDREGHETTI, D. X.; ZAMBOTTI-VILLELA, L.; COLEPICOLO, P.; DE CARVALHO, L. R.; YOKOYA, N. S. Effects of bromide-enriched natural seawater culture medium on protein and monoterpenes output of *Ochtodes secundiramea* (Rhodophyta, Gigartinales). ***Journal of Applied Phycology***, n. Lesser 2006, 2019.

MAHMOUD, Manar M. et al. RF-3192C and other polyketides from the marine endophytic *Aspergillus niger* ASSB4: structure assignment and bioactivity investigation. ***Medicinal Chemistry Research***, v. 30, n. 3, p. 647–654, 2021.

MAHOMOODALLY, M. F.; SANAA, D. A.; ZENGİN, G.; GALLO, M.; MONTESANO, D. Traditional Therapeutic Uses of Marine Animal Parts and Derived Products as Functional Foods—A Systematic Review. *Taylor and Francis Ltd.*, 2023.

MARTINS, C. D. L. et al. Antioxidant properties and total phenolic contents of some tropical seaweeds of the Brazilian coast. ***Journal of Applied Phycology***, v. 25, n. 4, p. 1179–1187, 2013.

MARTINS, A. P. et al. Biotechnological potential of benthic marine algae collected along the Brazilian coast. ***Algal Research***, v. 33, p. 316–327, 2018.

MEENA, M. et al. Fungal production of paclitaxel: Recent advances and future perspectives. ***Frontiers in Fungal Biology***, v. 4, p. 1056015, 2023.

MCKINNIE, L. J.; CUMMINS, S. F.; ZHAO, M. Identification of Incomplete Annotations of Biosynthesis Pathways in Rhodophytes Using a Multi-Omics Approach. ***Marine Drugs***, v. 22, n. 1, 2024.

MICHALAK, I.; TIWARI, R.; DHAWAN, M.; ALAGAWANY, M.; FARAG, M. R.; SHARUN, K.; EMRAN, T. Bin; DHAMA, K. ***Antioxidant effects of seaweeds and their active compounds on animal health and production—a review***. Taylor and Francis Ltd., 2022.

MORGADO, F.; VIEIRA, L. R. Marine Bioprospecting to Improve Knowledge of the Biological Sciences and Industrial Processes. ***Springer***, p. 1–14, 2020.

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

MUSTAFA, S.; ESTIM, A.; SHALEH, S. R. M. A call for open access for marine bioprospecting. ***Environmental Policy and Law***, v. 49, n. 4–5, p. 232–236, 2020.

NARAYANI, M.; BABU, R.; CHADHA, A.; SRIVASTAVA, S. Production of bioactive cyclotides: a comprehensive overview. ***Springer Science+Business Media B.V.***, 2020.

NARMANI, A.; TABANDEH, F.; AMOOZEGAR, M. A. Genomic evidence denies taxol biosynthetic capability of the endophytic fungus *Taxomyces andreanae*. ***IMA Fungus***, v. 13, n. 1, p. 25, 2022.

ORTIZ-VIDEIRA, J.; AGUILERA, J. M.; FLORES, M.; LEMUS-MONDACA, R.; LARRAZABAL, M. J.; MIRANDA, J. M.; AUBOURG, S. P. Protective effect of red algae

(Rhodophyta) extracts on essential dietary components of heat-treated salmon. ***Antioxidants***, v. 10, n. 7, 2021.

ØVERLAND, M.; MYDLAND, L. T.; SKREDE, A. Marine macroalgae as sources of protein and bioactive compounds in feed for monogastric animals. ***Journal of the Science of Food and Agriculture***, v. 99, n. 1, p. 13–24, 2019.

PARK, S. J.; SHARMA, A.; LEE, H. J. An Update on the Chemical Constituents and Biological Properties of Selected Species of an Underpinned Genus of Red Algae: Chondrus. ***Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)***, 2024.

PATHAK, S. Marine Bioprospecting: Bioactive Compounds from Cnidarians and Molluscs - A Review. ***SSRN Electronic Journal***, p. 227–238, 2020.

PATOCKA, J.; NEPOVIMOVA, E.; KUCA, K.; WU, W. Cyclosporine A: Chemistry and Toxicity – A Review. ***Current Medicinal Chemistry***, v. 28, n. 20, p. 3925–3934, 2020.

PHAM, G. N. et al. New Fusarochromanone Derivatives from the Marine Fungus *Fusarium equiseti* UBOCC-A-117302. ***Marine drugs***, v. 22, n. 10, p. 1–13, 2024.

POKHREL, A.; COLEMAN, J. J. Inventory of the Secondary Metabolite Biosynthetic Potential of Members within the Terminal Clade of the *Fusarium solani* Species Complex. ***Journal of Fungi***, v. 9, n. 8, 2023.

POLAT, S.; TRIF, M.; RUSU, A.; ŠIMAT, V.; ČAGALJ, M.; ALAK, G.; MERAL, R.; ÖZOGUL, Y.; POLAT, A.; ÖZOGUL, F. Recent advances in industrial applications of seaweeds. ***Taylor and Francis Ltd.***, 2023.

QIU, W. Y.; CHEN, M. S.; WU, Y. P.; LI, W.; GONG, D. P.; KONG, G. H.; WANG, W. G.; LI, Y. K.; HU, Q. F.; ZHAO, G. K. Two New Antibacterial Naphthoquinones from a Cigar Tobacco-Derived Endophytic *Fusarium solani*. ***Chemistry of Natural Compounds***, v. 59, n. 6, p. 1051–1055, 2023.

RIBEIRO, A. L. N. L.; YOKOYA, N. S. Effects of elevated CO₂, temperatures and nitrogen availabilities on the physiological responses of the aragonite-calcified species *Dichotomaria marginata* (Rhodophyta, Nemaliales). **Algal Research**, v. 75, 2023.

ROZAS, E.; FREITAS, J. C. Anti-inflammatory activity of the apolar extract from the seaweed *Galaxaura marginata* (Rhodophyta, Nemaliales). **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p. 544–548, 2007.

RUNGJINDAMAI, N.; JONES, E. B. G. Why Are There So Few Basidiomycota and Basal Fungi as Endophytes? A Review. **Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)**, 2024.

SADEGHI, A.; RAJABIYAN, A.; NABIZADE, N.; MEYGOLI NEZHAD, N.; ZAREI-AHMADY, A. Seaweed-derived phenolic compounds as diverse bioactive molecules: A review on identification, application, extraction and purification strategies. **Elsevier B.V.**, 2024.

SALEHI, B.; SHARIFI-RAD, J.; SECA, A. M. L.; PINTO, D. C. G. A.; MICHALAK, I.; TRINCONE, A.; MISHRA, A. P.; NIGAM, M.; ZAM, W.; MARTINS, N. Current trends on seaweeds: Looking at chemical composition, phytopharmacology, and cosmetic applications. **Molecules**, v. 24, n. 22, 2019.

SARASAN, M.; PUTHUMANA, J.; JOB, N.; HAN, J.; LEE, J. S.; PHILIP, R. Marine algicolous endophytic fungi-a promising drug resource of the era. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 1039–1052, 2017.

SCHROERS, H. J.; SAMUELS, G. J.; ZHANG, N.; SHORT, D. P. G.; JUBA, J.; GEISER, D. M. Epitypification of *Fusisporium* (*Fusarium*) *solani* and its assignment to a common phylogenetic species in the *Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, v. 108, n. 4, p. 806–819, 2016.

SHALAPY, N. M.; KANG, W. *Fusarium oxysporum* & *Fusarium solani*: Identification, Characterization, and Differentiation the Fungal Phenolic Profiles by HPLC and the Fungal Lipid Profiles by GC-MS. **Journal of Food Quality**, v. 2022, 2022.

SHANNON, P. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, 2003.

SHEU, J. 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, set. 1997. DOI: 10.1021/np9701844.

SINGH, A.; KUMAR, J.; SHARMA, V. K.; SINGH, D. K.; KUMARI, P.; NISHAD, J. H.; GAUTAM, V. S.; KHARWAR, R. N. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of an endophytic *Fusarium proliferatum* (ACQR8), isolated from a folk medicinal plant *Cissus quadrangularis* L. **South African Journal of Botany**, v. 140, p. 87–94, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.03.004>.

SUBBIAH, V.; XIE, C.; DUNSHEA, F. R.; BARROW, C. J.; SULERIA, H. A. R. The Quest for Phenolic Compounds from Seaweed: Nutrition, Biological Activities and Applications. **Taylor and Francis Ltd.**, 2023.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214–216, 1993.

TANG, J.; HUANG, X.; CAO, M. H.; WANG, Z.; YU, Z.; YAN, Y.; HUANG, J. P.; WANG, L.; HUANG, S. X. Mono-/Bis-Alkenoic Acid Derivatives From an Endophytic Fungus *Scopulariopsis candelabrum* and Their Antifungal Activity. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, 2022.

VAN JANSE RENSBURG, J. C.; LABUSCHAGNE, N.; NEMEC, S. Occurrence of *Fusarium*-produced naphthazarins in citrus trees and sensitivity of rootstocks to isomarticin in relation to citrus blight. **Plant Pathology**, v. 50, n. 2, p. 258–265, 2001.

VEZZA, T.; CANET, F.; DE MARAÑÓN, A. M.; BAÑULS, C.; ROCHA, M.; VÍCTOR, V. M. Phytosterols: Nutritional health players in the management of obesity and its related disorders. **MDPI**, 2020.

VIEIRA, N. C. Estudo químico de fungos da rizosfera de *Senna spectabilis* utilizando abordagem OSMAC e ferramentas analíticas do estado da arte para anotação e caracterização de metabólitos. (Tese de Doutorado). Universidade Estadual Paulista, 2020.

VRABL, P.; SCHINAGL, C. W.; ARTMANN, D. J.; HEISS, B.; BURGSTALLER, W. Fungal Growth in Batch Culture – What We Could Benefit If We Start Looking Closer. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

WALI, A. F. et al. Natural products against cancer: Review on phytochemicals from marine sources in preventing cancer. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 6, p. 767–777, 2019.

WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828–837, 2016. DOI: 10.1038/nbt.3597. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nbt.3597>.

WANG, C.; DU, W.; LU, H.; LAN, J.; LIANG, K.; CAO, S. A review: Halogenated compounds from marine actinomycetes. **Molecules**, v. 26, n. 9, 2021.

WANG, W. L.; LIU, S. L.; LIN, S. M. Systematics of the calcified genera of the galaxauraceae (Nemaliales, Rhodophyta) with an emphasis on taiwan species. **Journal of Phycology**, v. 41, n. 3, p. 685–703, 2005.

WANG, Y. et al. Sesquiterpene and sorbicillinoid glycosides from the endophytic fungus *Trichoderma longibrachiatum* EN-586 derived from the marine red alga *Laurencia obtusa*. **Marine Drugs**, v. 20, n. 3, p. 177, 2022.

XU, M.; HUANG, Z.; ZHU, W.; LIU, Y.; BAI, X.; ZHANG, H. Fusarium-Derived Secondary Metabolites with Antimicrobial Effects. **MDPI**, 2023.

XU, X.; LIANG, S.; LI, Xin; HU, W.; LI, Xi; LEI, L.; LIN, H. Antibiotic resistance and virulence characteristics of *Vibrio vulnificus* isolated from Ningbo, China. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, 2024.

YADAV, G.; MEENA, M. Bioprospecting of endophytes in medicinal plants of Thar Desert: An attractive resource for biopharmaceuticals. **Biotechnology Reports**, v. 30, p. e00629, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00629>.

YAN, L. et al. Production of bioproducts by endophytic fungi: chemical ecology, biotechnological applications, bottlenecks, and solutions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 15, p. 6279–6298, 2018.

YANG, Y.; LI, Y.; ZHU, J. Research progress on the function and regulatory pathways of amino acid permeases in fungi. **Springer Science and Business Media B.V.**, 2024.

YU, G.; ZHANG, Q.; WANG, Y.; YANG, Q.; YU, H.; LI, H.; CHEN, J.; FU, L. Sulfated polysaccharides from red seaweed *Gelidium amansii*: Structural characteristics, antioxidant and anti-glycation properties, and development of bioactive films. **Food Hydrocolloids**, v. 119, 2021.

ZENG, H. T.; YU, Y. H.; ZENG, X.; LI, M. M.; LI, X.; XU, S. S.; TU, Z. C.; YUAN, T. Anti-inflammatory Dimeric Benzophenones from an Endophytic Pleosporales Species. **American Chemical Society**, 2022.

ZHENG, H.; PEI, Y.; HE, Y. L.; LIU, Y.; CHEN, M.; HONG, P.; ZHOU, C.; QIAN, Z. J. A Sulfated Polysaccharide from Red Algae (*Gelidium crinale*) to Suppress Cells Metastasis and MMP-9 Expression of HT1080 Cells. **Foods**, v. 11, n. 15, 2022.

ZHANG, P.; LI, X.; WANG, B. G. Secondary Metabolites from the Marine Algal-Derived Endophytic Fungi: Chemical Diversity and Biological Activity, 2016.