

ADRIELY ZAMBIASI BOLLER

Estudo da quimiodiversidade do fungo *Hypoxylon investiens*: uso do GNPS para a identificação de novos metabólitos

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Dra. Dulce Helena Siqueira Silva

Araraquara

2022

B691e Boller, Adriely Zambiasi
Estudo da quimiodiversidade do fungo Hypoxylon
investiens: uso do GNPS para a identificação de novos
metabólitos / Adriely Zambiasi Boller. -- Araraquara, 2022
139 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara
Orientadora: Dulce Helena Siqueira Silva

1. Fungos endofíticos. 2. Algas vermelhas. 3.
Organismos marinhos. 4. Espectrometria de massa. 5.
Produtos naturais. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

"Estudo da quimiodiversidade do fungo *Hypoxylon investiens*: uso do GNPS para a identificação de novos metabólitos"

AUTORA: ADRIELY ZAMBIASI BOLLER**ORIENTADORA: DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



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

Documento assinado digitalmente



PATRICIA SARTORELLI

Data: 19/08/2022 22:18:0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dra. PATRICIA SARTORELLI (Participação Virtual)
Departamento de Química / Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - Diadema



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

Araraquara, 19 de agosto de 2022

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Adriely Zambiasi Boller

Nome em citações bibliográficas: BOLLER, A. Z.; BOLLER, Adriely Zambiasi; Adriely Zambiasi Boller; A. Z. Boller; BOLLER, ADRIELY Z.

ENDEREÇO

Endereço Profissional: NuBBE - Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Rua Prof. Francisco Degni, 55 – Araraquara-SP, CEP: 14081-970, SP – Brasil

e-mail: adrielyzb@gmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2019 - 2022

Mestrado em Química - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Instituto de Química, Araraquara - SP.

Título:

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

Bolsista: CNPq.

2014-2019

Graduação em Química Licenciatura – Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá – PR.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2021-2021

Minicurso: Sequenciamento Sanger. (Carga horária: 8 h)

Laboratório de Análises Biomoleculares – Multiusuários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP).

2021-2021

Minicurso: Análise de dados de metabolômica explorando ferramentas do GNPS: dos princípios básicos a ferramentas in silico de anotação. (Carga horária: 5h)

Sociedade Brasileira de Química – Divisão de Produtos Naturais.

2021-2021

Minicurso: Boas prática no uso do dicroísmo circular em química de produtos naturais. (Carga horária: 5h)

Sociedade Brasileira de Química – Divisão de Produtos Naturais.

2021-2021

Minicurso: Dominando os processos seletivos de estágio. (Carga horária: 2h)

20º Semana de Química da Unicamp, Campinas-SP, Brasil.

2021-2021

Minicurso: 1+1=3. Soft Skills e a Inexatidão dos Valores. (Carga horária: 2h)

20º Semana de Química da Unicamp, Campinas-SP, Brasil.

2021-2021

Minicurso: Origin e Excel para Químicos de todas as áreas. (Carga horária: 2h)

20º Semana de Química da Unicamp, Campinas-SP, Brasil.

2021-2021

Minicurso: Primeiros passos no processamento de espectros de RMN. (Carga horária: 1,5h)

20º Semana de Química da Unicamp, Campinas-SP, Brasil.

2017- 2017

Minicurso: Extensão universitária em Cálculo Estequiométrico e o Ensino de Química. (Carga horária: 40h).

Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá – PR, Brasil.

2017-2017

Minicurso: Extensão universitária em Ensino de Química para Alunos com deficiência visual. (Carga horária: 19h).

Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá – PR, Brasil.

2016 - 2016

Minicurso: Hexys Day-Soluções para Melhor Performance Análises. (Carga horária: 3h).

Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá – PR, Brasil.

2015 - 2015

Minicurso: InfoQUI - ACD/LAb. (Carga horária: 4h).

Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá – PR, Brasil.

2015-2016: Iniciação Científica

Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá –PR, Brasil

Título do projeto: Síntese de SBA-16 a partir de cinzas do bagaço de cana

Orientadora: Prof.^a Dr^a Silvia Luciana Fávaro

2015-2015: Iniciação Científica

Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá –PR, Brasil

Título do projeto: Aplicação de métodos quimiométricos na síntese de MOF's utilizando embalagens multicamadas como fonte de ácido tereftálico.

Orientadora: Prof.^a. Dr^a. Silvia Luciana Fávaro

PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- 20º Semana de Química da Unicamp. 2021. (Congresso)
- Workshop INCT BioNat. 2019. (Outro)
- 17º Semana de Química da Unicamp. 2018. (Congresso).
- XXV Encontro Anual de Iniciação Científica (XXV EAIC). 2016. (Congresso).
- XXIV Encontro Anual de Iniciação Científica (XXIV EAIC). 2015. (Congresso).
- II Semana da Bioquímica. 2014. (Congresso).

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo suporte e apoio durante a mudança para ter a oportunidade de cursar mestrado, pelas palavras de carinho e incentivo durante todo período de pandemia.

Ao meu namorado Matheus por toda compreensão, amor e carinho em momentos de angústia e pela apoio e motivação durante todo esse período de pandemia.

À Ana Letícia pela amizade e paciência por me ajudar em diversas análises e explicação de experimentos.

Aos alunos do grupo, Iatã, Rafael Viana, Edelson, Givaldo, Lucas e Victor Hugo, pelos momentos de apoio, ensinamentos, contribuição em diversas etapas da pesquisa.

À minha orientadora, professora Dulce, por pelos ensinamentos, reuniões e discussões sobre minha pesquisa e, principalmente, por ter me aceitado como aluna de mestrado.

Aos professores e funcionários do Instituto de Química que nos auxiliam e ajudam diariamente na realização dos trabalhos.

À agência de fomento, CNPq, pela bolsa com processo nº 133469/2019-0 e investimento na pesquisa.

Por fim, agradeço a todos que conheci durante esse período de mestrado que puderam me ajudar através de elogios, críticas e ensinamentos valiosos.

*“Prometa-me que você sempre lembrará:
Você é mais corajoso do que você acredita ser,
mais forte do que você parece, e mais
inteligente do que você pensa ser.”*

(Alan Alexander Milne, Ursinho Pooh)

RESUMO

Os produtos naturais representam uma importante fonte de moléculas bioativas para a descoberta de novos fármacos. Extratos de organismos e microrganismos marinhos têm-se destacado para esta finalidade em função de sua marcante quimiodiversidade, como as algas vermelhas, produtoras de metabólitos secundários variados, incluindo substâncias halogenados e linhagens de fungos endofíticos a elas associados. Neste trabalho foram investigados extratos de uma linhagem do fungo endofítico *Hypoxylon investiens*, isolado da alga marinha *Asparagopsis taxiformis*. O fungo foi cultivado em meio líquido de batata e dextrose (MBD), bem como em meio sólido de arroz, em diversos tempos de cultivo e utilizou-se a ferramenta *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) para auxiliar na escolhas. Essa plataforma utiliza dados de espectrometria de massas para gerar redes moleculares, organizando-os a partir da similaridade dos espectros experimentais e o banco de dados da plataforma. O uso do GNPS permitiu anotar mais de 50 substâncias presentes nos extratos em estudo, incluindo a nicotinamida e a 4-hidroxi-6-metil-2-pirona, isoladas anteriormente dessa espécie de fungo, e a emetina, uma substância anotada na maioria dos extratos analisados, e que, de acordo com dados da literatura, apresenta atividade anti-SARS-COV-2. Os extratos obtidos foram fracionados por técnicas cromatográficas, e seus constituintes químicos, identificados por técnicas espectrométricas. Duas substâncias foram purificadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) e identificadas pela análise dos dados de ressonância magnética nuclear (RMN) uni e bidimensional, espectrometria de massas e espectrometria UV-Vis. Suas estruturas foram identificadas como o derivado de binaftaleno daldinona C e o éster fenólico monaspilosina. Esses resultados corroboram com a importância do aprofundamento no estudo de produtos naturais de microrganismos marinhos, bem como a utilização do GNPS para a investigação de extratos complexos e anotações mais rápidas e precisa de seus constituintes químicos, além de contribuir para a pesquisa e conhecimento da quimiodiversidade do bioma marinho brasileiro.

Palavras-chave: *Hypoxylon investiens*; *Asparagopsis taxiformis*; algas vermelhas; fungos endofíticos; GNPS; quimiodiversidade; organismos marinhos.

ABSTRACT

Natural products represent an important source of bioactive molecules for the discovery of new drugs. Extracts of marine organisms and microorganisms have been highlighted for this purpose due to their remarkable chemodiversity, such as red algae, which produce various secondary metabolites, including halogenated substances and endophytic fungal strains associated with them. In this work, extracts from a lineage of the endophytic fungus *Hypoxylon investiens*, isolated from the seaweed *Asparagopsis taxiformis*, were investigated. The fungus was cultivated in liquid potato and dextrose (PDB) medium, as well as in solid rice medium, at different cultivation times and the Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) tool was used to assist in the choices. This platform uses mass spectrometry data to generate molecular networks, organizing them based on the similarity of the experimental spectra and the platform's database. The use of GNPS allowed the recording of more than 50 substances present in the extracts under study, including nicotinamide and 4-hydroxy-6-methyl-2-pyrone, previously isolated from this species of fungus, and emetine, a substance identified in most of the analyzed extracts, and which, according to literature data, has anti-SARS-COV-2 activity. The extracts obtained were fractionated by chromatographic techniques, and their chemical constituents were identified by spectrometric techniques. Two substances were purified by means of high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) and identified by analyzing one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance (NMR), mass spectrometry and UV-Vis spectrometry data. Their structures were identified as the binaphthalene derivative daldinone C and the phenolic ester monaspilosine. These results corroborate the importance of deepening the study of natural products of marine microorganisms, as well as the use of GNPS for the investigation of complex extracts and faster and more accurate annotations of their chemical constituents, in addition to contributing to the research and knowledge of chemodiversity from the Brazilian marine biome.

Keywords: *Hypoxylon investiens*; *Asparagopsis taxiformis*; red algae; endophytic fungi; GNPS; chemodiversity; marine organisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação estrutural da morfina (1) e da quinina (2).....	22
Figura 2 – Representações estruturais do ácido acetilsalicílico (3), da salicina (4), penicilina (5) e digitoxina (6).....	23
Figura 3 – Representações estruturais do Taxol (7), Imipenem (8), do Aztreonam (9) e da Nocardicina (10).	24
Figura 4 – Quantidade de novos compostos naturais de fontes marinhas obtidos nos anos de 2014 até 2018.....	25
Figura 5 – Representações estruturais dos compostos Lurbinectedin (11), Belantamab Mafodotin (12), Enfortumab vedotin (13) e Polatuzumab vedotin (14).....	26
Figura 6 – Número de novos compostos associado aos diferentes grupos de organismos marinhos de 2015 a 2019.....	27
Figura 7 – Alga marinha <i>Asparagopsis taxiformis</i>	28
Figura 8 – Representações estruturais dos compostos acaromycina A (15) e (+)-cryptosporin (16) Insulicolídeo A (17) Asperolídeos A e B (18-19).....	29
Figura 9 – Mapa com distribuição dos locais de coleta microbiana. As cores amarela e verde apresentam maior densidade de coletas marinhas.	30
Figura 10 – Representações estruturais dos compostos 1,3-diidroxi-6-(2-hidroxipropil)-8-metoxiantraceno-9,10-diona (20), carnequinazolinas B-C (21 - 22), flavusídeos A-B (23 - 24).....	31
Figura 11 – Representação estrutural do composto BNT.....	32
Figura 12 – Representações estruturais dos compostos hypoxylídeo (26), viridistratina B (27) e daldiquinona (28).	32
Figura 13 – Representações estruturais dos compostos hypotiens A-D (29-32).....	33
Figura 14 – Compostos isolados do fungo <i>Hypoxylon investiens</i> por Chang <i>et. al.</i> (2014)...	34
Figura 15 – Substâncias isoladas do fungo <i>Hypoxylon investiens</i> por Rufino (2019) e Silva (2016).....	35
Figura 16 – Exemplo de espectros de massas com valores de cosseno entre eles.	37
Figura 17 – Linhagem AT-01 do fungo endofítico <i>Hypoxylon investiens</i> isolada da alga vermelha <i>Asparagopsis taxiformis</i>	41
Figura 18 – Rede molecular calculada para os dados de UPLC-MS/MS das amostras dos extratos do fungo <i>Hypoxylon investiens</i> crescido em MBD (azul), meio sólido de	

arroz (rosa), controle do meio de arroz (verde) e controle do meio líquido (vermelho) no modo positivo.	49
Figura 19 – Estrutura da <i>N</i> -acetil-2-fenilamina.	50
Figura 20 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental do da <i>N</i> -acetil-2-feniletilamina.	51
Figura 21 – Estrutura da ciclopamina.	51
Figura 22 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental do composto ciclopamina.	52
Figura 23 – Ampliação dos clusters da rede molecular calculada para os dados de UPLC-MS/MS das amostras dos extratos do fungo <i>Hypoxylon investiens</i> crescido em MBD e meio sólido de arroz no modo positivo.	53
Figura 24 – Rede molecular calculada para os dados de UPLC-MS/MS das amostras dos extratos do fungo <i>Hypoxylon investiens</i> crescido em MBD (azul), meio sólido de arroz (rosa), controle do meio de arroz (verde) e controle do meio líquido (vermelho) no modo negativo.	55
Figura 25 – Estrutura da 6,8-dihidroxi-3-metil-isocumarina.	56
Figura 26 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental do composto 6,8-diidroxi-3-metil-isocumarina.	57
Figura 27 – Estrutura da emodina.	57
Figura 28 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental do composto emodina.	58
Figura 29 – Ampliação do cluster da rede molecular calculada para os dados de UPLC-MS/MS das amostras dos extratos do fungo <i>Hypoxylon investiens</i> crescido em MBD e meio sólido no modo negativo.	59
Figura 30 – Cromatograma do extrato obtido em meio de arroz ACN em gradiente exploratório com detecção em 254 nm. Luna Phenomenex® C ₁₈ , (250 x 4,60 mm), 5µm; Solvente A: H ₂ O; Solvente B: MeOH. Grad. Exp.: 5-100% de B em 45 min.; 1,00 mL.min ⁻¹	60
Figura 31 – Cromatograma do extrato obtido em meio de MBD em gradiente exploratório no com detecção em 254 nm. Luna Phenomenex® C ₁₈ , (250 x 4,60 mm), 5µm; Solvente A: H ₂ O; Solvente B: MeOH. Grad. Exp.: 5-100% de B em 50 min.; 1,00 mL.min ⁻¹	61

Figura 32 – Rede molecular calculada para os dados de UPLC-MS/MS das amostras dos extratos do fungo <i>Hypoxylon investiens</i> crescido em MBD nos períodos de 7 dias (amarelo), 14 dias (verde), 21 dias (roxo), 28 dias (azul), 35 dias (rosa) e branco do meio (vermelho) no modo positivo.....	63
Figura 33 – Estrutura da emetina.	64
Figura 34 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental da emetina.	65
Figura 35 – Estrutura da genisteína.	65
Figura 36 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental do composto genisteína.....	66
Figura 37 – Ampliação do cluster da rede molecular calculada para os dados de UPLC-MS/MS das amostras dos extratos do fungo <i>Hypoxylon investiens</i> crescido em MBD nos períodos de 7, 14, 21, 28 e 35 dias no modo positivo.....	67
Figura 38 – Rede molecular calculada para os dados de UPLC-MS/MS das amostras dos extratos do fungo <i>Hypoxylon investiens</i> crescido em MBD nos períodos de 7 dias (amarelo), 14 dias (verde), 21 dias (roxo), 28 dias (azul), 35 dias (rosa) e controle do meio líquido (vermelho) no modo negativo.	68
Figura 39 – Estrutura da 7-hidroxi-3-(2-hidroxipropil)-5-metilisocromona-1-ona.	69
Figura 40 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental do composto 7-hidroxi-3-(2-hidroxipropil)-5-metilisocromona-1-ona.....	70
Figura 41 – Estrutura do ácido fenilglioxílico.....	70
Figura 42 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental do composto ácido fenilglioxílico.....	71
Figura 43 – Estrutura do resveratrol.	72
Figura 44 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental do composto resveratrol.	72
Figura 45 – Ampliação do cluster da rede molecular calculada para os dados de UPLC-MS/MS das amostras dos extratos do fungo <i>Hypoxylon investiens</i> crescido em MBD nos períodos de 7 dias, 14 dias, 21 dias, 28 dias, 35 dias no modo negativo.	73
Figura 46 – Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos bruto em AcOEt da curva de crescimento do fungo <i>H. investiens</i> em 230 nm. Luna Phenomenex® C ₁₈ , (250	

x 4,60 mm), 5 μ m; Solvente A: H ₂ O; Solvente B: MeOH. Grad. Exp.: 5-100% de B em 50 min.; 1,00 mL.min ⁻¹	74
Figura 47 – Espectro de UV-vis com tempo de retenção de 40,11 min do extrato obtido do cultivo em meio líquido de PDB (1) e espectro UV-vis do composto BNT isolado por Lee <i>et. al.</i> (2019).	75
Figura 48 – Espectro do UV-vis com tempo de retenção de 39,46 min do extrato de meio líquido de MBD.	75
Figura 49 – Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos bruto dos cultivos em larga escala em 230 nm. Luna Phenomenex® C ₁₈ , (250 x 4,60 mm), 5 μ m; Solvente A: H ₂ O; Solvente B: MeOH. Grad. Exp.: 5-100% de B em 50 min.; 1,00 mL.min ⁻¹	77
Figura 50 – Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto do cultivo em larga escala em 230 nm. Luna Phenomenex® C ₁₈ , (250 x 4,60 mm), 5 μ m; Solvente A: H ₂ O; Solvente B: MeOH. Grad. Exp.: 5-100% de B em 50 min.; 1,00 mL.min ⁻¹	77
Figura 51 – Rede molecular calculada para os dados de UPLC-MS/MS das amostras dos extratos do fungo <i>Hypoxylon investiens</i> crescido em MBD e as frações 1-10 e o branco do meio líquido de PDB no modo positivo.....	79
Figura 52 – Estrutura da β -ecdisterona.....	80
Figura 53 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental da β -ecdisterona.	81
Figura 54 – Estrutura da 5,3',4',5'-tetrametoxi-6,7-metilenodioxiiisoflavona.	81
Figura 55 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental do 5,3',4',5'-tetramethoxy-6,7-methylenedioxyisoflavone.....	82
Figura 56 – Estrutura do ginsenosídeo Rg3.	83
Figura 57 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental do ginsenosídeo Rg3.....	83
Figura 58 – Ampliação do cluster da rede molecular calculada para os dados de UPLC-MS/MS das amostras dos extratos do fungo <i>Hypoxylon investiens</i> crescido em MBD e as frações 1-10 e o branco do meio líquido de PDB no modo positivo....	85
Figura 59 – Rede molecular calculada para os dados de UPLC-MS/MS das amostras dos extratos do fungo <i>Hypoxylon investiens</i> crescido em MBD e as frações 1-10 e o controle do meio líquido de MBD no modo negativo.	87

Figura 60 – Estrutura da daidzeína.	88
Figura 61 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental da daidzeína.	89
Figura 62 – Estrutura Criptotanshinona.	89
Figura 63 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental da criptotanshinona.	90
Figura 64 – Estrutura endocrocina.	91
Figura 65 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental da endocrocina.	91
Figura 66 – Estrutura da baicaleína.	92
Figura 67 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental da baicaleína.	93
Figura 68 – Ampliação do cluster da rede molecular calculada para os dados de UPLC-MS/MS das amostras dos extratos do fungo <i>Hypoxylon investiens</i> crescido em MDB e as frações 1-10 e o branco do meio líquido de PDB no modo positivo....	94
Figura 69 – Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto e as frações 1- 5 com detecção em 230 nm. Luna Phenomenex® C ₁₈ , (250 x 4,60 mm), 5µm; Solvente A: H ₂ O; Solvente B: MeOH. Grad. Exp.: 5-100% de B em 50 min.; 1,00 mL.min ⁻¹	95
Figura 70 – Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto e as frações 6-10 com detecção em 230 nm. Luna Phenomenex® C ₁₈ , (250 x 4,60 mm), 5µm; Solvente A: H ₂ O; Solvente B: MeOH. Grad. Exp.: 5-100% de B em 50 min.; 1,00 mL.min ⁻¹	96
Figura 71 – Fracionamento do extrato bruto de MBD em C ₁₈ com diferentes concentrações de (MeOH:H ₂ O) de fase móvel.	96
Figura 72 – Análise da fração 4 por CLAE semipreparativa em coluna C ₁₈ Coluna Analítica Luna Phenomenex® C ₁₈ , (250 x 10,0 mm), eluída em modo gradiente com H ₂ O:MeOH (52-89%) em 35 min, λ = 230 nm.	97
Figura 73 – Espectro no UV-Vis da subfração 4.6B (66% MeOH: 34% de H ₂ O).	98
Figura 74 – Espectro de massas de alta resolução da subfração 4.6B (Bruker- MaXIm Impact – ESI-Q-TOF).	100
Figura 75 – Espectro de RMN de ¹ H da subfração 4.6B (CD ₃ OD; 600 MHz).	101

Figura 76 – Espectro de TOCSY do sinal em 1.68 ppm da subfração 4.6B (CD ₃ OD; 600 MHz).....	102
Figura 77 – Mapa de contornos COSY da subfração 4.6B (CD ₃ OD; 600 MHz).....	103
Figura 78 – Ampliação do mapa de contornos COSY na região aromática da subfração 4.6B (CD ₃ OD; 600 MHz).....	104
Figura 79 – Ampliação do mapa de contornos COSY da subfração 4.6B (CD ₃ OD; 600 MHz).	105
Figura 80 – Mapa de contornos HSQC da subfração 4.6B (CD ₃ OD; 600 MHz).....	106
Figura 81 – Mapa de contornos HMBC da subfração 4.6B (CD ₃ OD; 600 MHz).....	107
Figura 82 – Mapa de contornos HMBC da subfração 4.6B, ampliado na região aromática (CD ₃ OD; 600 MHz).....	108
Figura 83 – Mapa de contornos HMBC da subfração 4.6B ampliado (CD ₃ OD; 600 MHz).	109
Figura 84 – Estrutura da daldinona C.....	110
Figura 85 – Espectro de massas de alta resolução da subfração 4.7B (Bruker- MaXIx Impact – ESI-Q-TOF).....	113
Figura 86 – Espectro de RMN de ¹ H da subfração 4.7B (CD ₃ OD; 600 MHz).	114
Figura 87 – Mapa de contornos COSY da subfração 4.7B (CD ₃ OD; 600 MHz).....	115
Figura 88 – Mapa de contornos HSQC da subfração 4.7B (CD ₃ OD; 600 MHz).....	116
Figura 89 – Mapa de contornos HMBC da subfração 4.7B (CD ₃ OD; 600 MHz).....	117
Figura 90 – Estrutura da monaspilosina.	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Massas obtidas dos extratos brutos de cada dia da curva de crescimento do fungo <i>H. investiens</i>	62
Tabela 2 – Massas obtidas dos extratos brutos de cada dia do cultivo em larga escala.	76
Tabela 3 – Dados de RMN da subfração 4.6B e para a daldinona C (600 MHz; CD ₃ OD)...	110
Tabela 4 – Dados de RMN da subfração 4.7B e para a daldinona C (600 MHz; CD ₃ OD)...	118

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ_H	Deslocamento químico de ^1H (em ppm)
δ_C	Deslocamento químico de ^{13}C (em ppm)
λ	Comprimento de onda
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
AT	<i>Asparagopsis taxiformis</i>
BDA	Meio de batata dextrose ágar
BNT	(1,1' – binaftaleno)-4,4',5,5'-tetrol
CC	Cromatografia em coluna
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i> – Espectrometria de correlação (^1H x ^1H)
CoV-2	Corona vírus 2
d	Dubleto
DAD	Detector de arranjo de diodos
dd	Duplo dubleto
ddd	Duplo duplo dubleto
dddd	Duplo duplo duplo dubleto
ESI	Ionização por eletrospray
Extr.	Extrato Bruto
Fen	Fenilalanina
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
Hex	Hexano
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation correlation</i> – correlação heteronuclear a múltiplas ligações (^1H x ^{13}C)
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i> – correlação heteronuclear a uma ligação (^1H x ^{13}C)
ITS	Internal Transcribed Spacer – Espaçador transcrito interno
J	Constante de acoplamento
Leu	Leucina
m	Multiplete

MBD	Meio de batata-dextrose
MS	Espectrometria de massas
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
NaOCl	Hipoclorito de sódio
Pro	Prolina
Q-TOF	Analisador quadrupolo-tempo de voo
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
UHG	Ultra high resolution – alta resolução
UPLC	Ultra performance liquid chromatography – Cromatografia líquida de alta eficiência
UV-vis	Ultra-violeta-visível
s	Singleto
SARS	Síndrome respiratória aguda grave
Smad	Small mother against decapentaplegic - Proteínas Mães contra decapentaplégico pequena
t	Tripleto
TGF- β	Transforming growth fator $-\beta$ – fator de transformação do crescimento beta
Tir	Tirosina
TOCSY	Total correlation spectroscopy – Espectrometria de correlação total
TOF	Analisador por tempo de voo
tR	Tempo de retenção

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	21
1.1.	História dos produtos naturais	21
1.2.	Organismos marinhos.....	24
1.3.	Algas vermelhas	27
1.4.	Fungos marinhos.....	28
1.5.	Fungos do gênero <i>Hypoxylon</i>	31
1.6.	Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS)	36
2.	OBJETIVOS.....	39
2.1.	Objetivo Geral.....	39
2.2.	Objetivos Específicos	39
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1.	Coleta do material.....	40
3.2.	Isolamento das linhagens fúngicas	40
3.3.	Escolha do meio de cultivo	41
3.4.	Obtenção do perfil químico	44
3.5.	Cultivo do extrato em larga escala	45
3.6.	Fracionamento do extrato bruto.....	45
3.7.	Cromatografia Líquido de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)	46
3.8.	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (^1H) e Carbono (^{13}C)	46
3.9.	Espectrometria de massas de alta resolução	46
3.10.	Anotação dos compostos através da espectrometria de massas e rede molecular GNPS	47
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	48
4.1.	Análise dos meios de cultivo.....	48

4.1.1.	Análise das anotações da plataforma do GNPS	48
4.1.2.	Análise por CLAE-DAD.....	60
4.2.	Análise do perfil químico.....	61
4.2.1.	Análise das anotações da plataforma do GNPS	62
4.2.2.	Análise por CLAE-DAD.....	74
4.3.	Análise do extrato em larga escala	76
4.3.1.	Análise por CLAE-DAD.....	76
4.4.	Fracionamento do extrato bruto.....	78
4.4.1.	Análise das anotações da plataforma do GNPS	78
4.4.2.	Análise por CLAE-DAD.....	95
4.5.	Purificação fração 4	97
4.5.1.	Elucidação estrutural da substância 4.6B.....	97
4.5.2.	Elucidação estrutural da substância 4.7B.....	111
5.	CONCLUSÃO	120
	REFERÊNCIAS	122
	APÊNDICE.....	127

1. INTRODUÇÃO

1.1. História dos produtos naturais

A química de produtos naturais é considerada a subárea da química orgânica mais antiga, visto que, alguns aspectos dessa área foram estabelecidos e consolidados desde os tempos da alquimia (BERLINCK *et. al.*, 2017).

Um dos fatos que evidenciam essa antiga origem é que ao longo de séculos, os humanos vêm utilizando materiais de origem natural para suas necessidades básicas, dentre elas destaca-se o uso de plantas com fins medicinais. Os primeiros relatos de uso de plantas na medicina tradicional foram representados em tabletes de argila datados de cerca de 2600 a.C. na Mesopotâmia, este documento apresentava cerca de 1000 preparados de origem vegetal, dentre elas, espécies de cedro, suco de papoula e alcaçuz (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Apesar da origem das tábuas mesopotâmicas, o registro mais conhecido é o Papiro de Ebers, o qual era considerado o texto mais antigo que trata sobre conhecimentos médicos, datado de 2.900 a.C. Ele descreve cerca de 700 preparados utilizados, principalmente de origem vegetal, tais como funcho e o coentro, além disso, também descreve algumas doenças e formas de tratamento (PODURI, 2021).

Há inúmeros registros de documentos e pessoas que ajudaram no desenvolvimento da química de produtos naturais ao longo dos séculos, além do Papiro de Ebers. Um exemplo é Hipócrates (460-377 a.C.) considerado o “pai da medicina”. Reuniu um conjunto de cerca de 70 livros indicando, para cada enfermidade relatada, um tipo de tratamento, sua obra ficou conhecida como Corpus Hipocratium (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017). Outro exemplo foi Pedanius Dioscórides, que descreveu em sua obra *De Materia Medica*, por volta dos anos 50-70 d.C., mais de mil remédios dentre óleos, beberagens e unguentos, assim como o uso do ópio como medicamento e veneno. Sua obra ficou conhecida como uma das principais referências para área de medicina ocidental até o Renascimento (1300-1600) (NOGUEIRA; MONTANARI; DONNICI, 2009).

Mas foi a partir do século XIX, com o avanço na área de química, que então foi possível analisar, separar e identificar os princípios ativos das plantas relatadas anteriormente. O primeiro princípio ativo isolado foi a morfina (**1**), em 1816, pelo farmacêutico Friedrich Wilhelm Adam Sertürner (1783-1841), a qual foi obtida do ópio da papoula (*Papaver*

somniferum). Logo a seguir em 1820, a quinina **(2)** foi isolada da *Cinchona iedgeriana*, um dos medicamentos utilizado no tratamento da malária (CRAGG; NEWMAN, 2013).

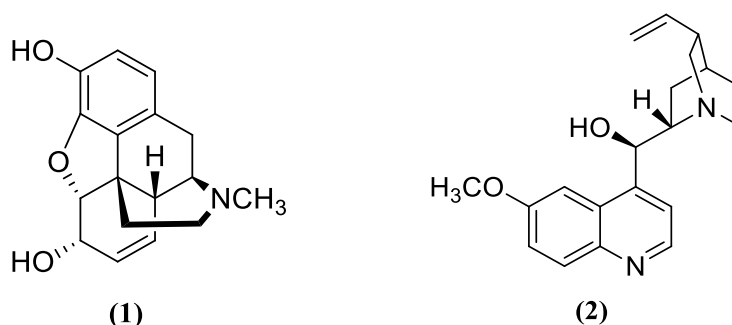


Figura 1 – Representação estrutural da morfina **(1)** e da quinina **(2)**.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

Outros exemplos incluem o ácido acetilsalicílico **(3)**, cuja comercialização começou em 1899 através da empresa farmacêutica Bayer, a qual semi-sintetizou o fármaco a partir da salicina **(4)**, um produto natural encontrado no salgueiro (*Salix alba*); e a digitoxina **(6)**, um glicosídeo cardiotônico, também considerado um dos marcos da história dos produtos naturais. Esse princípio ativo de medicamentos para insuficiência cardíaca congestiva e arritmias foi isolado da *Digitalis purpurea L.* e teve sua primeira análise estrutural realizada em 1925 por Adolf Otto Reinhold Windaus (1876-1959). Outra importante descoberta foi o antibiótico penicilina G **(5)**, encontrado por Alexander Fleming (1871-1955) em 1929, o qual foi isolado do fungo *Penicillium notatum* e até hoje é comercializado (MEDINA, 2016; SILVA, 2016).

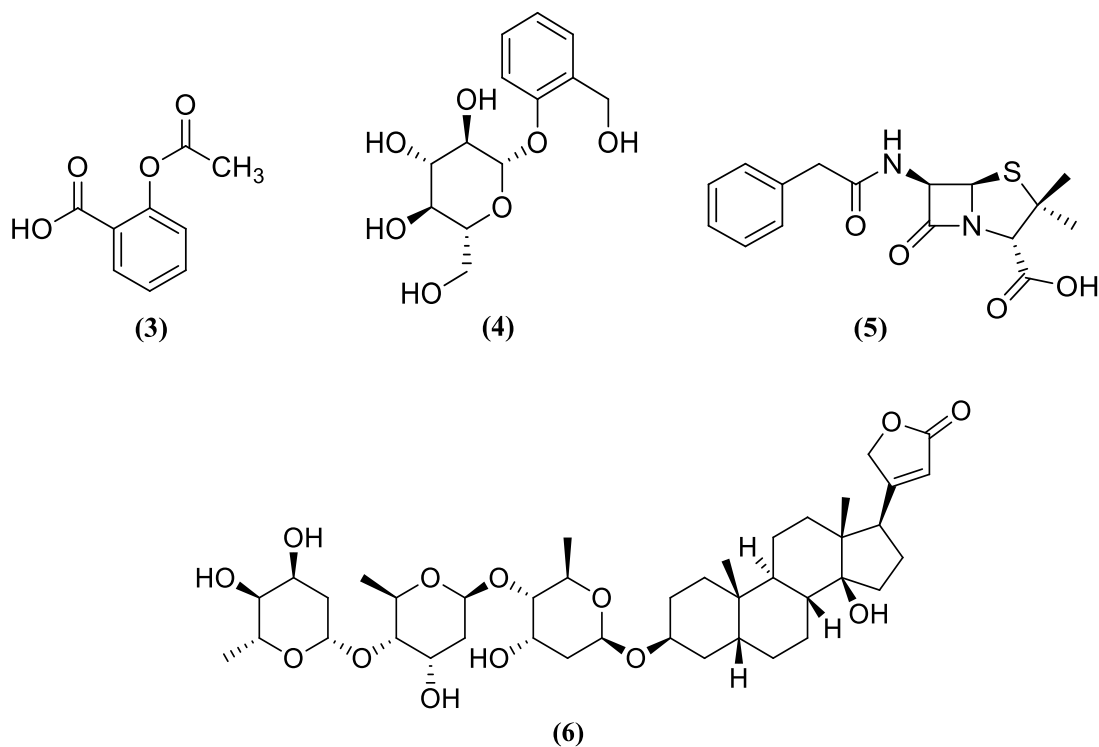


Figura 2 – Representações estruturais do ácido acetilsalicílico (3), da salicina (4), penicilina (5) e digitoxina (6).

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

O estudo de micro-organismos teve como marco importante a descoberta acidental de Fleming, e desde então pode-se destacar compostos importantes obtidos de micro-organismos, como os antibióticos Nocardicina (10), Imipenem (8) e Aztreonam (9), e o antitumoral, Taxol (7). Este último é um dos medicamentos mais utilizados para o tratamento do câncer de mama e foi isolado a partir do *Taxus brevifolia* (teixo do Pacífico), em 1971. Quando descoberto, o Taxol era obtido da casca da árvore, a qual após retirada matava a árvore, sem contar que a demanda de fármaco era muito grande para a quantidade de Taxol produzido por árvore. Então em 1993 relatou-se que alguns fungos presentes na planta também sintetizavam Taxol (SILVA, 2016; VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2005)

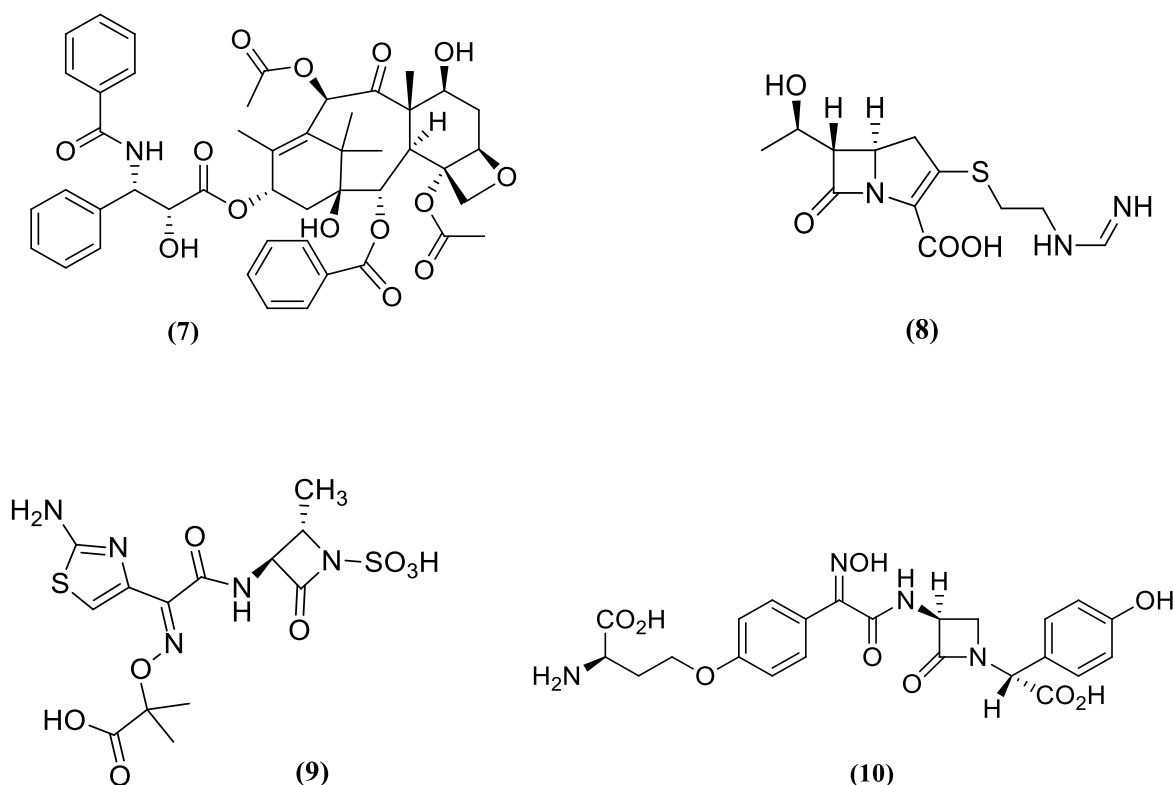


Figura 3 – Representações estruturais do Taxol (7), Imipenem (8), do Aztreonam (9) e da Nocardicina (10).

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

Além dos estudos com micro-organismos de plantas, uma área mais recentemente explorada é o estudo de organismos e micro-organismos marinhos, como esponjas, algas, entre outros. O processo evolutivo de algumas espécies, que resultou em relações de mutualismo, pode também produzir substâncias únicas e com potencial para estudos de bioatividades. Algumas das atividades já relatadas serão descritas a seguir, incluindo a propriedade anticâncer, antiviral, anticoagulante e antitrombóticas, dentre diversas outras (PINTO *et. al.*, 2002). Este trabalho pretende ser mais uma via de exploração através da análise do fungo *Hypoxylon investiens* associado à alga marinha *Asparagopsis taxiformis*.

1.2. Organismos marinhos

A maior parte da superfície terrestre, cerca de 75%, é constituída por oceanos e apesar da sua vasta extensão ainda é pouco explorado. A vasta biodiversidade encontrada no ambiente marinho pode ser classificada em microrganismos, macroalgas e invertebrados. Os microrganismos compreendem as cianobactérias, microalgas, fungos, bactérias, entre outros. As macroalgas englobam as algas marinhas vermelhas, verdes e marrons. E por fim, os invertebrados, como esponjas, corais, moluscos, entre outros. Aproximadamente 250.000

espécies de organismos marinhos estão descritas, justificando o aumento nos estudos da área, como mostra a **Figura 4** (BARRECA *et. al.*, 2020; CARROLL *et. al.*, 2021).

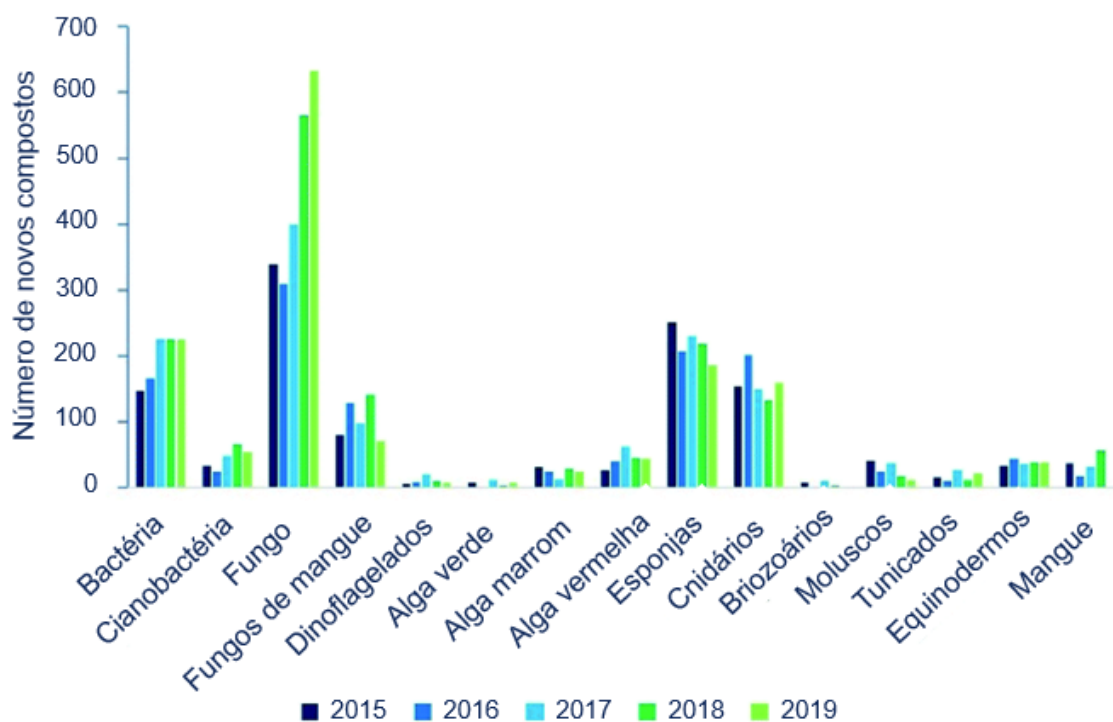


Figura 4 – Quantidade de novos compostos naturais de fontes marinhas obtidos nos anos de 2014 até 2018.

Fonte: Adaptado de Carroll *et.al.* (2021).

Estudos envolvendo organismos marinhos relataram a descoberta de moléculas únicas e com diversas propriedades biológicas promissoras para o tratamento de doenças humanas, principalmente câncer. Segundo, Mayer *et. al.* até 2017 cerca de 313 compostos marinhos foram relatados na literatura com novas propriedades farmacológicas. Dentre essas atividades encontram-se: antifúngica, antiviral, antidiabética, anti-inflamatória, entre outras (MAYER *et. al.*, 2021).

A página Marine Pharmacology apresenta fármacos derivados de organismos marinhos e qual a fase clínica em que se encontram. Alguns dos últimos fármacos aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) são: Lurbinectedin (ZepzelcaTM), Belantamab Mafodotin (BlenrepTM), Enfortumab vedotin (PAVCEVTM), e Polatuzumab vedotin (PolivyTM). Os fármacos BlenrepTM, aprovado em 2020, e PAVCEVTM e PolivyTM em 2019 são utilizados para

tratamento de tipos de câncer específicos. O Zepzelca™ é um alcaloide obtido de um tunicado, e aprovado como fármaco em 2020 para o uso no tratamento de metástase de câncer de pulmão (PAPON; COPP; COURDAVAULT, 2022). As estruturas desses compostos estão mostradas na **Figura 5**.

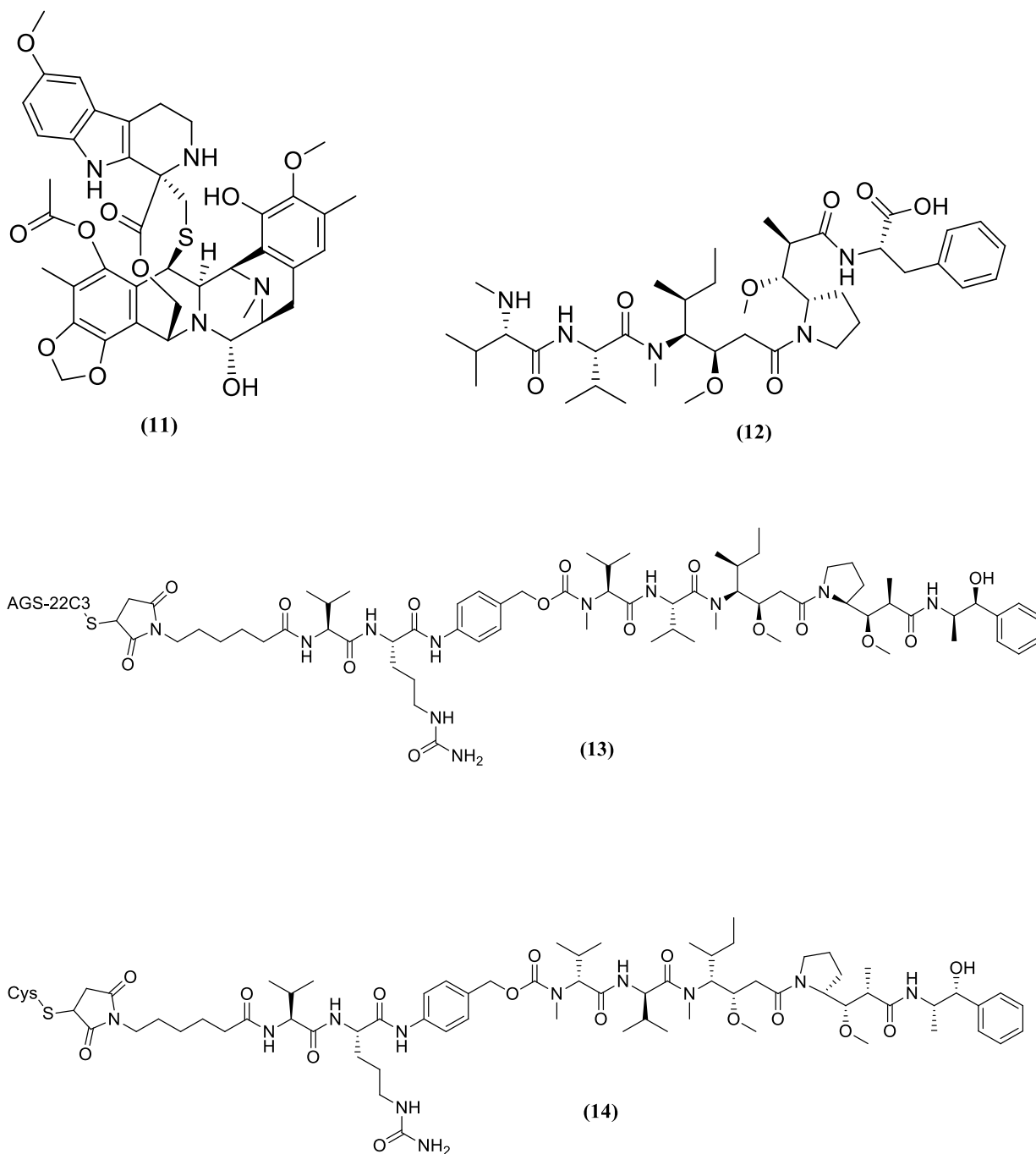


Figura 5 – Representações estruturais dos compostos Lurbinectedin **(11)**, Belantamab Mafodotin **(12)**, Enfortumab vedotin **(13)** e Polatuzumab vedotin **(14)**.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

1.3. Algas vermelhas

As algas ou macroalgas são divididas em três grandes grupos, de acordo com sua coloração, as algas vermelhas (Rhodophyta), algas marrons (Phaeophyceae) e as algas verdes (Chlorophyta). Esses organismos multicelulares podem ser encontrados mais facilmente em regiões costeiras e de águas tropicais e subtropicais. As algas são de grande interesse comercial visto que são utilizadas atualmente em diferentes áreas como farmacêutica, cosmética e indústria alimentícia (LEANDRO; PEREIRA; GONÇALVES, 2019).

As algas vermelhas apresentam essa coloração devido à presença de ficoeritrina (pigmento) em suas células (BARZKAR *et. al.*, 2019). Na **Figura 6**, pode-se observar que entre o grupo das algas, existe um maior estudo com algas vermelhas devido à presença de produtos naturais com diversas atividades biológicas e pela presença de compostos halogenados. Dentre essas algas pode-se destacar o gênero *Asparagopsis* que possuem relatos de compostos com propriedades antifúngicas, antibacterianas e antiprotozoárias (GENOVESE *et. al.*, 2012).

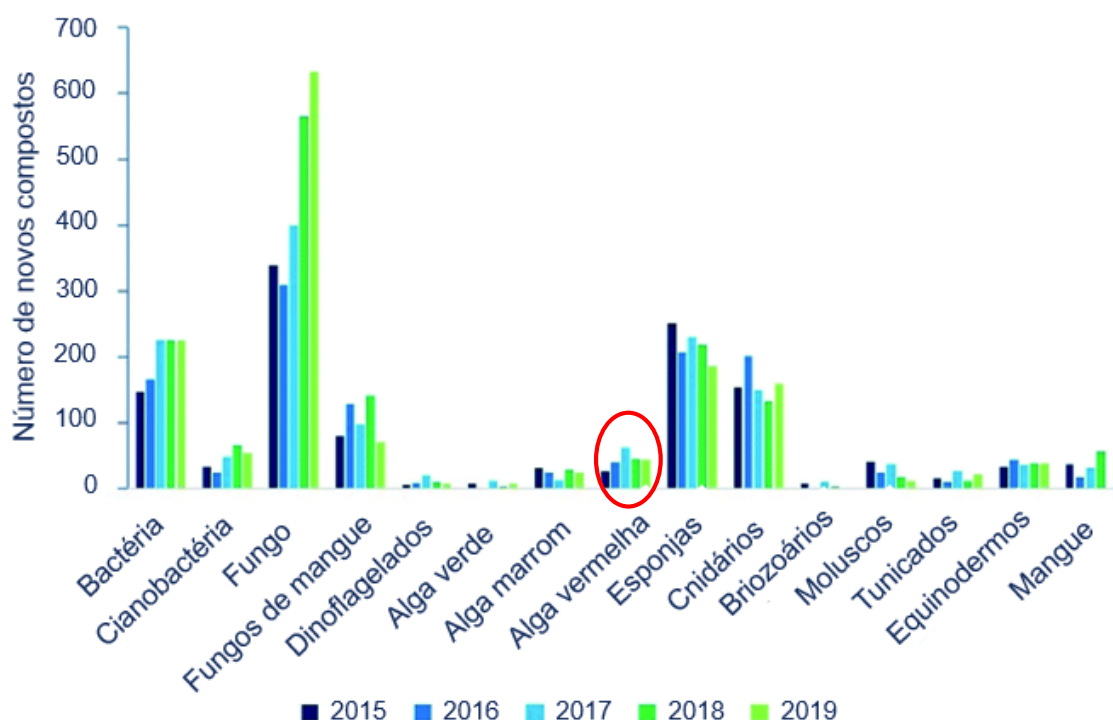


Figura 6 – Número de novos compostos associado aos diferentes grupos de organismos marinhos de 2015 a 2019.

Fonte: Adaptado de Carroll *et.al.* (2021).

A alga vermelha do gênero *Asparagopsis*, espécie *taxiformis* (**Figura 7**) da qual foi isolada a linhagem do fungo endofítico estudado nesse trabalho apresenta diversos metabólitos

secundários com variadas bioatividades, dentre elas, a antibacteriana, antimicrobiana, antifúngica e antiviral (VUCKO *et. al.*, 2017).



Figura 7 – Alga marinha *Asparagopsis taxiformis*.

Fonte: ASPARAGOPSIS *taxiformis* (2018).

1.4. Fungos marinhos

Fungos podem ser encontrados em diferentes ambientes, desde o mais ameno até locais mais extremos como geleiras. Os fungos marinhos foram relatados em sedimentos marinhos, troncos, algas, corais e esponjas. Apesar da vasta diversidade desse grupo a maior parte dos estudos concentram-se nos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium* o que não representa a real diversidade dos metabólitos secundários desse grupo e ressalta a importância dos estudos de outras espécies (IMHOFF, 2016).

Fungos marinhos são de grande importância para a descoberta de novos fármacos, visto que oferecem estruturas químicas únicas com uma ampla quimiodiversidade e diversas atividades biológicas, como antivirais, antibacterianas e anticancerígenas. Os compostos acaromycin A (**15**) e (+)-cryptosporin (**16**) isolados do fungo *Acaromyces ingoldii* FS121 obtido de sedimentos do fundo do mar apresentaram atividade citotóxica. O Insulicolídeo A

(17) isolado do *Aspergillus ochraceus* derivado de uma alga marinha e Asperolídeos A e B (18-19) obtidos do fungo endofítico *Aspergillus wentii* derivado da alga marinha *Sargassum* sp também apresentaram citotoxicidade (DESHMUKH; PRAKASH; RANJAN, 2018).

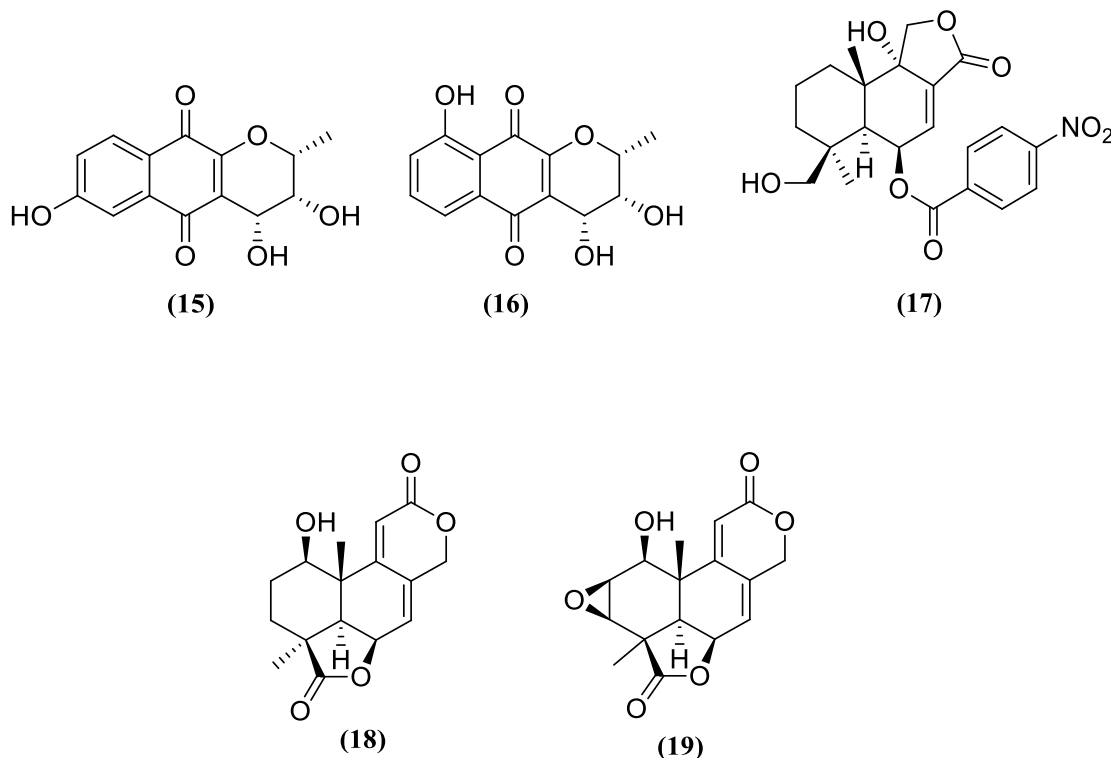


Figura 8 – Representações estruturais dos compostos acaromycina A (15) e (+)-cryptosporin (16) Insulicolídeo A (17) Asperolídeos A e B (18-19).

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

Fungos que são associados a plantas, algas, corais, esponjas, entre outros recebem o nome de fungos endofíticos, os quais são microrganismos que ao se deparar com estresses abióticos e bióticos podem produzir substâncias com bioatividade. Essa associação entre o fungo e o hospedeiro pode ser benéfica para ambos. O endofítico produz substâncias que aumentam a resistência da planta, como a tolerância à seca, alta temperatura, baixo pH, entre outros. E o hospedeiro fornece proteção para o crescimento e multiplicação do fungo (RANA *et. al.*, 2019). Por conta dessa capacidade de adaptação o estudo com fungos marinhos tem crescido muito. A **Figura 9** mostra os locais com maiores coletas de microrganismos, sendo os hotspots locais com maior densidade de coletas (amarelo e verde).

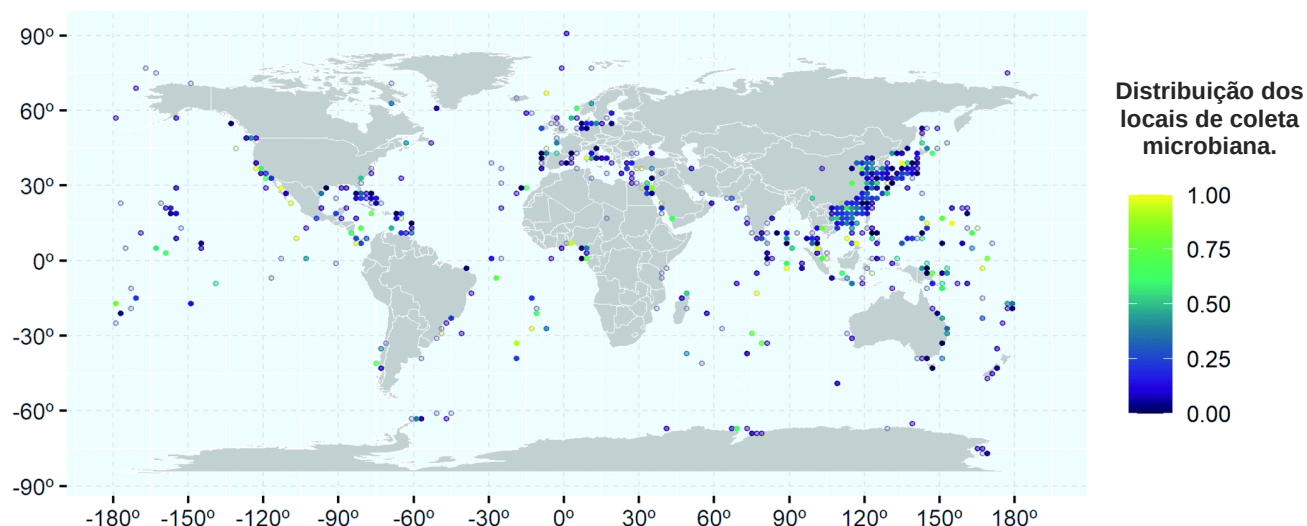


Figura 9 – Mapa com distribuição dos locais de coleta microbiana. As cores amarela e verde apresentam maior densidade de coletas marinhas.

Fonte: Adaptado de Voser; Campbell; Carroll (2021).

Os fungos endofíticos são conhecidos por serem fontes de diversas classes de produtos naturais como alcaloides, lignanas, fenóis, terpenos, esteroides, quinonas, isocumarinas, lactonas, dentre outros. Sendo assim, também apresentam ampla variedade de atividades farmacológicas, como antibiótica, anticâncer, antiviral, antidiabética, imunossupressora, dentre outras (LI *et. al.*, 2018).

A antraquinona 1,3-diidroxí-6-(2-hidroxipropil)-8-metoxiantraceno-9,10-diona (**20**) isolada do fungo *Aspergillus versicolor* obtido da alga verde *Halimeda opuntia* apresenta atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*. O fungo endofítico *Aspergillus carneus* KMM 4638 obtido da alga marrom *Laminaria sachalinensis*, forneceu os compostos carnequinazolinas B (**21**) e C (**22**) que apresentam atividade antimicrobiana e citotóxica. Os compostos nitrogenados flavusídeos A (**23**) e B (**24**) isolados do fungo *Aspergillus flavus* MFA500 obtido da alga verde *Codium fragile* apresentou atividade antibacteriana contra *S.aureus* (ZHANG; LI; WANG, 2016).

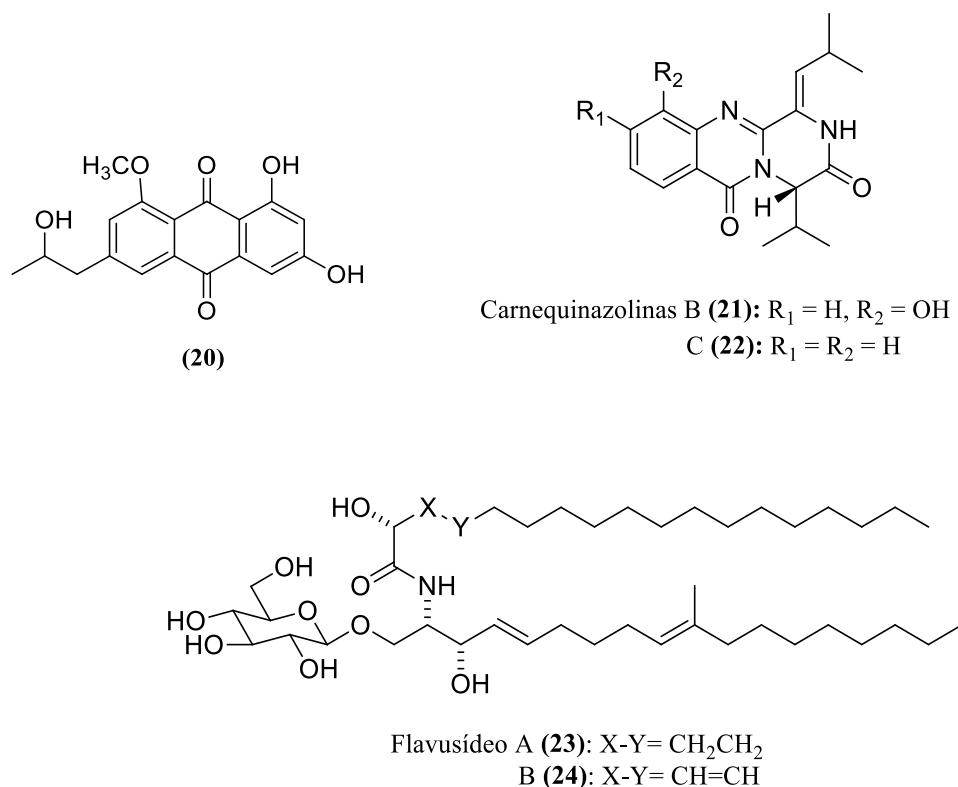
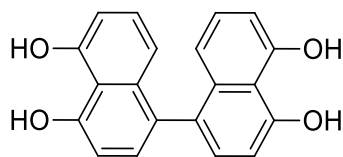


Figura 10 – Representações estruturais dos compostos 1,3-diidroxi-6-(2-hidroxipropil)-8-metoxiantraceno-9,10-diona (20), carnequinazolininas B-C (21 - 22), flavusídeos A-B (23 - 24).

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

1.5. Fungos do gênero *Hypoxylon*

O gênero *Hypoxylon* faz parte da ordem Xylariales, uma das mais diversas e promissoras ordens de fungo para obtenção de metabólitos secundários, englobando várias famílias e gêneros. Uma dessas famílias é a Hypoxylaceae que dependendo da espécie pode apresentar mais de 20 compostos distintos, sendo que a maioria pertence às classes de azafilonas ou binaftalenos. Um dos compostos presente em espécies da família Hypoxylaceae é o (1,1' – binaftaleno)-4,4',5,5'-tetrol (BNT) (25). Além do BNT cerca de 200 diferentes compostos já foram identificados em espécies dessa família e com distintas bioatividade (HELALY; THONGBAI; STANDLER, 2018; KUHNERT *et. al.*, 2021).

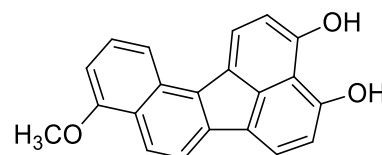
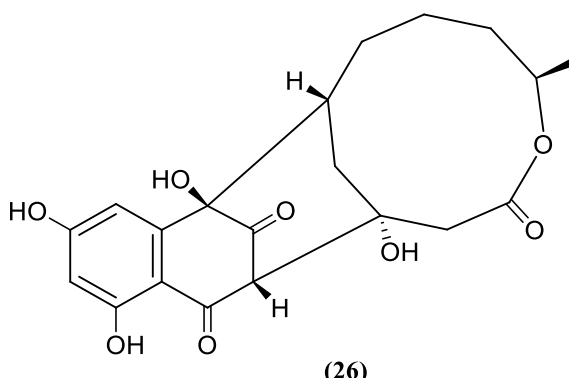


(25)

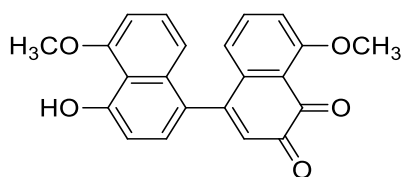
Figura 11 – Representação estrutural do composto BNT.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

Um estudo com *Hypoxylon fuscum* forneceu o composto hypoxylídeo (26), que apresentou atividade citotóxica contra leucemia. *Annulohypoxylon viridistratum*, uma espécie também presente na família Hypoxylaceae, apresentou o composto fenólico, viridistratina B (27), que mostrou atividade citotóxica contra carcinoma e adenocarcinoma pulmonar, e atividade antimicrobiana. O composto daldiquinona (28) isolado da *Daldinia concentrica* apresentou atividade antiangiogênica (BECKER; STADLER, 2020).



(27)



(28)

Figura 12 – Representações estruturais dos compostos hypoxylídeo (26), viridistratina B (27) e daldiquinona (28).

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

A espécie foi estudada nesse projeto é a *Hypoxylon investiens*, ainda com poucos estudos na literatura, sendo que o mais recente relata a descoberta de quatro novas α -pironas

denominadas hypotiens A-D (**29-32**), que não apresentaram atividade citotóxica ou antimicrobiana (YUAN *et. al.*, 2019).

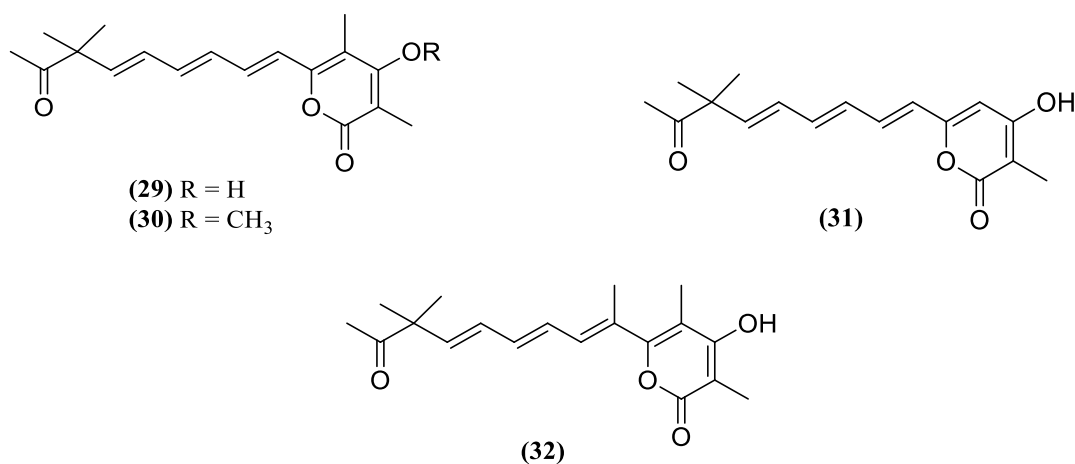


Figura 13 – Representações estruturais dos compostos hypotiens A-D (**29-32**).

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

Chang *et. al.* (2014) também desenvolveram um estudo com *H.investiens* e relataram um total de 29 substâncias representadas na **Figura 14**. Dentre elas, o 8-metoxinaftaleno-1,7-diol (**34**), 8-metoxinaftalen-1-ol (**35**) e 1,8-dimetoxinaftaleno (**36**) apresentaram atividade inibitória do óxido nítrico e da Interleucina-6 (CHANG *et. al.*, 2014).

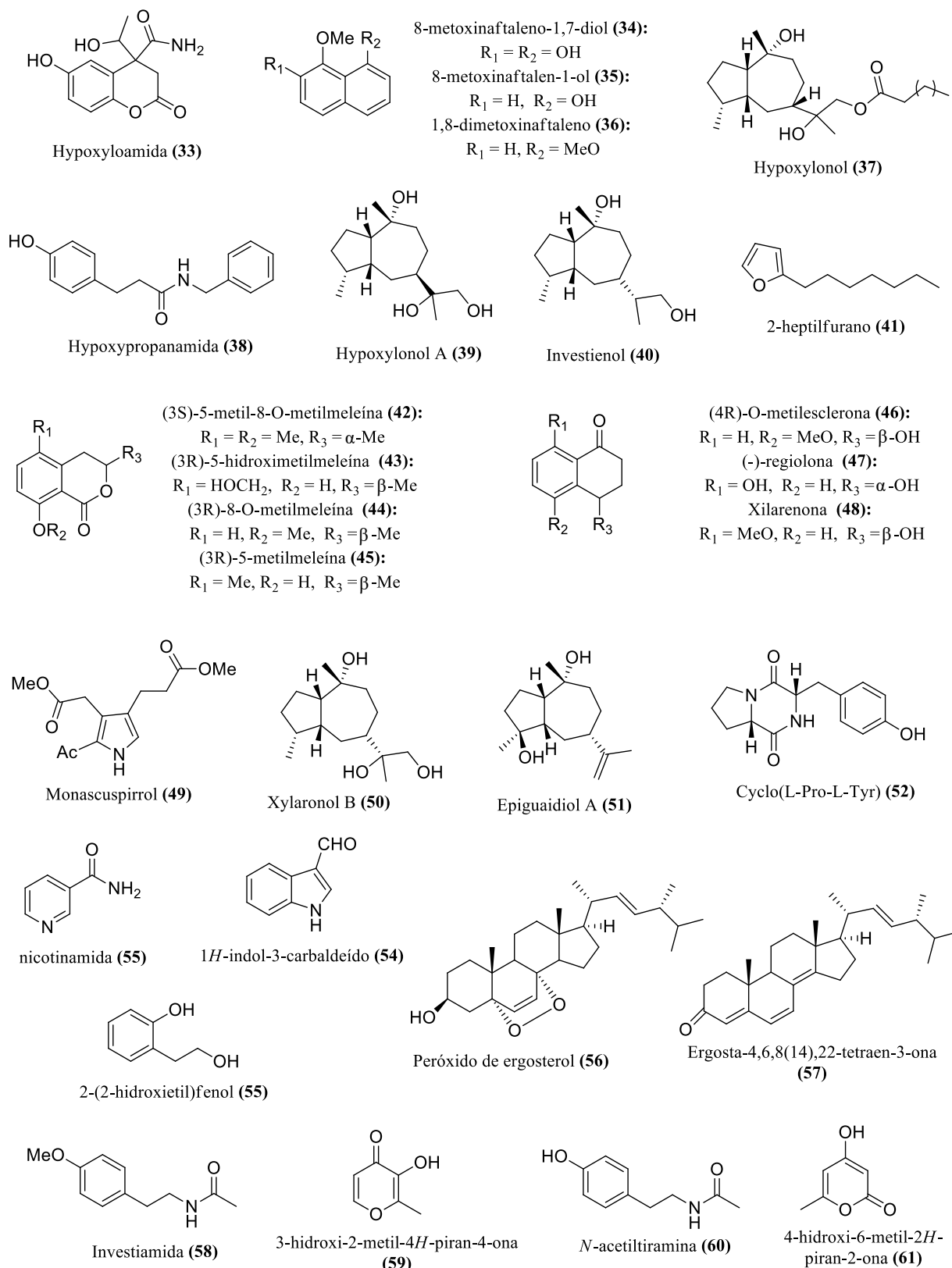


Figura 14 – Compostos isolados do fungo *Hypoxyylon investiens* por Chang *et. al.* (2014).

Fonte: Adaptado de Chang *et. al.* (2014).

Uma linhagem do fungo *H. investiens* também foi isolada anteriormente pelo grupo de pesquisa NuBBE do Instituto de Química de Araraquara – Unesp. A investigação desta linhagem resultou na purificação das dicetopiperazinas ciclo(Pro-Tir) **(62)**, ciclo(Pro-Fen) **(63)** e ciclo(Pro-Leu) **(64)**, três isocumarinas: 5-hidroximetil-meleína **(65)**, 4-hidroxi-5-metilmeleína **(66)** e 5-metilmeleína **(67)**, duas tetralonas: nodulisporona **(68)** e isosclerona **(69)**, e o ácido 3-nitropropanóico **(70)**. Também foi identificado duas substâncias inéditas dímeros de naftol: 5'-metoxi-1,2,3,4-tetraidro-1,1'-binaftaleno-2,4,4',8-tetrol **(71)** e 8'-metoxi-1,2,3,4-tetraidro-1,1'-binaftaleno-2,2',4,8-tetrol **(72)** representados na **Figura 15**. As frações obtidas do extrato desta linhagem também apresentaram inibição moderada das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, envolvidas na doença de Alzheimer (RUFINO, 2019; SILVA, 2016).

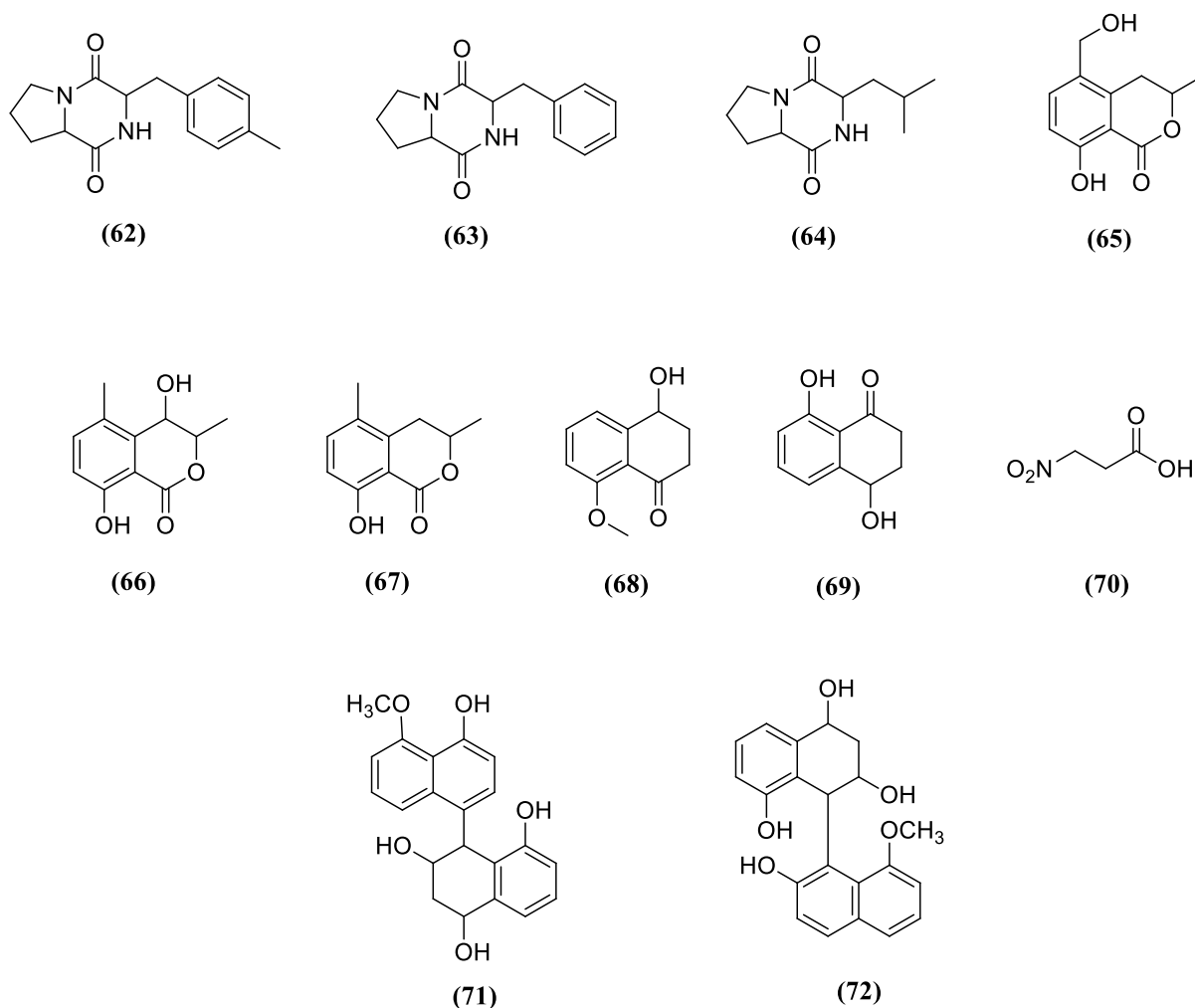


Figura 15 – Substâncias isoladas do fungo *Hypoxylon investiens* por Rufino (2019) e Silva (2016).

Considerando o longo tempo dispendido e quantidades relevantes de solventes orgânicos e outros reagentes pouco amigáveis ambientalmente, utilizadas em etapas de fracionamento dos extratos e purificação dos constituintes químicos, bem como o baixo rendimento de substâncias purificadas, frequentemente insuficientes para os ensaios biológicos, optou-se, no presente trabalho por adotar a ferramenta *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) para detecção das substâncias contidas no extrato em estudo, visando agilizar a etapa de identificação, orientar com mais precisão o isolamento dessas substâncias e análise de múltiplos dados de espectrometria de massas simultaneamente.

1.6. *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS)

A exploração de produtos naturais por meio do uso de redes moleculares tornou-se uma ferramenta muito utilizada, pois facilita a identificação de metabólitos presentes em misturas complexas, como os extratos brutos de fontes naturais (RAMOS *et. al.*, 2019). Deve-se destaque à análise por espectrometria de massas, a qual possui um papel fundamental nesta nova abordagem, uma vez que fornece com precisão a massa molecular e tem alta sensibilidade para detecção de fragmentos de moléculas orgânicas (KUO; HUANG; HSU, 2019).

O GNPS é uma plataforma online e gratuita a qual utiliza dados de espectrometria de massas para a geração de redes moleculares. A plataforma organiza os espectros adquiridos e os classifica a partir da similaridade que é calculada utilizando uma medida de cosseno modificado. Para cada espectro é associado um vetor espectral e dado dois vetores espectrais pode-se calcular o vetor entre eles e este fornece o cosseno de similaridade entre os espectros (WATROUS *et. al.*, 2012). Considere como exemplo os vetores espectrais V_1 e V_2 , o cosseno entre estes é dado por:

$$\cos \theta = \frac{V_1 \cdot V_2}{\|V_1\| \|V_2\|} \quad (1)$$

O valor de cosseno varia entre 0 e 1, sendo que quanto mais próximo a 1 maior a similaridade, enquanto a proximidade de 0 indica maior diferença espectral, limitando ao valor pré estabelecido (PILON *et. al.*, 2021; TIAM *et. al.*, 2019). A figura (16) demonstra um exemplo de similaridade entre diferentes espectros e o valor de cosseno entre eles.

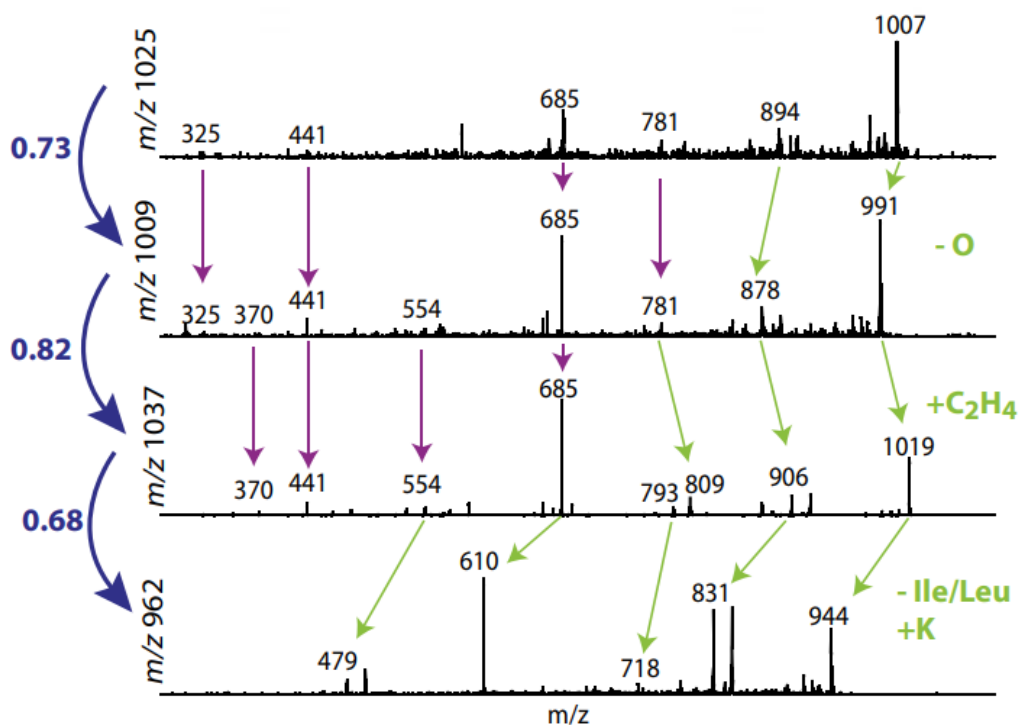


Figura 16 – Exemplo de espectros de massas com valores de cosseno entre eles.

Fonte: Watrous *et. al.* (2012)

Além do valor de cosseno, os espectros do banco de dados também são classificados de acordo com a qualidade dos dados e a confiabilidade dessas anotações. Existem três categorizações dos dados: *gold*, *silver* e *bronze*, sendo que *gold* indica espectros de estruturas sintetizadas, com caracterização estrutural completa por RMN e outros métodos padrão, garantindo alta confiabilidade. *Silver* engloba dados de estruturas isoladas ou anotadas em extratos brutos obtidos a partir de publicações científicas. Enquanto a categoria *bronze* inclui espectros com caracterização incompleta ou não referendados por uma publicação científica. Níveis de ouro e prata só podem ser atribuídos por membros autorizados e treinados pela equipe responsável pela plataforma, enquanto classificações bronze também podem ser promovidas ao passar por uma análise e preencherem os requisitos necessários (PILON *et. al.*, 2021).

De acordo com Quinn *et. al.*, diversos estudos apontam que os usos de redes moleculares para orientar o isolamento e detecção de metabólitos bioativos foram bem sucedidos. Na área de produtos naturais as redes moleculares estão sendo muito utilizadas para a descobertas de novos compostos, como no caso do estudo com bactéria do gênero *Vibrio* que forneceram substâncias com potencial antibacteriano, anti-inflamatório e analgésico. Em outro estudo, com a bactéria *Burkholderia thailandensis*, foram descobertos 100 novos compostos não relatados anteriormente na literatura científica (QUINN *et. al.*, 2017).

Em estudo recente, Zannella *et. al.* (2021) utilizaram a plataforma GNPS para identificar estruturas presentes no extrato metanólico de folhas verdes da videira (*Vitis vinífera*), que apresentaram atividade contra o vírus SARS-CoV-2 (corona vírus 2 da síndrome respiratória aguda grave) e HSV-1 (vírus da herpes simplex tipo 1). O extrato da folha foi capaz de inibir a replicação dos vírus e atuou nos estágios iniciais das infecções quando aplicado em uma concentração de 10µg/mL, representando dados promissores para aplicações na indústria farmacêutica. O extrato foi analisado por espectrometria de massas e posteriormente inserido na plataforma GNPS possibilitando assim a identificação de 40 compostos fenólicos, dentre eles a caracterização de 35 flavonoides derivados da quercetina (ZANNELLA *et. al.*, 2021).

Diante destes exemplos, considera-se que o uso da abordagem incluindo a análise de redes moleculares por meio da ferramenta GNPS, associado a etapas complementares de fracionamento e purificação de amostras selecionadas, bem como a avaliação de bioatividade através de bioensaios, seja importante para o estudo da linhagem do fungo *Hypoxylon investiens*, visando o aprofundamento do conhecimento químico e biológico desta espécie, explorando sua quimiodiversidade, com potencial para fornecer substâncias atrativas ao desenvolvimento de agentes terapêuticos e agregar valor à biodiversidade marinha do Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo o uso da plataforma do GNPS como uma ferramenta para assistir na anotação dos principais metabólitos secundários dos extratos e frações do fungo endofítico *Hypoxylon investiens* isolado da alga vermelha *Asparagopsis taxiformis*, realizar o isolamento e identificação dos metabólitos empregando métodos espectroscópicos (dados de RMN uni e bidimensionais), espectrométricos (espectro de massas).

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar o crescimento do fungo em meios diferentes, períodos diferentes e em escala ampliada para identificação e isolamento de metabólitos;
- Analisar os perfis químicos do extrato sólido e líquido em escala reduzida e identificação dos metabólitos por UPLC-MS/MS, por CLAE-DAD e pelo sistema do GNPS;
- Analisar redes moleculares e espectros de massas para identificação das substâncias;
- Identificar e elucidar substâncias majoritárias das frações por técnicas espectroscópicas e espectrométricas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta do material

Pequenas quantidades da alga vermelha *Asparagopsis taxiformis* (AT) foram coletadas em junho de 2013 no costão direito da praia da Fortaleza, em Ubatuba – São Paulo. A identificação da alga foi realizado pela Dr^a Nair Yokoya do Instituto de Botânica (Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo) e uma exsicata foi armazenada e identificada como SP 401.747 no Herbário do Instituto de Botânica (SP).

3.2. Isolamento das linhagens fúngicas

Para o isolamento das linhagens fúngicas foram recolhidos espécimes saudáveis da alga em estudo, as quais foram lavadas com água do mar e armazenadas em 3 frascos contendo água do mar esterilizada em autoclave e o antibiótico cloranfenicol (concentração de 200 mg/mL) para evitar o crescimento bacteriano, e então foram transportados em caixas térmicas para o Instituto de Química em Araraquara – Unesp (IQ-Ar). Para o isolamento do fungo utilizaram-se as seguintes etapas: primeiramente a alga foi esterilizada superficialmente através de imersão em solução de NaOCl 1% por 6 segundos e em etanol 70% por dois segundos, seguido por lavagem em água do mar esterilizada por 10 minutos.

Após a esterilização a alga foi seccionada, com o auxílio de uma pinça e bisturis estéreis, e inserida em meio de cultivo autoclavado contendo batata-dextrose-ágar (BDA), água do mar esterilizada e o antibiótico cloranfenicol (200 mg/mL). O desenvolvimento dos fungos foi monitorado até a observação do aparecimento de pequenas colônias, as quais foram repicadas sucessivamente em placas com meio de cultivo conforme descrito acima até a obtenção de linhagens puras. Foram obtidas 7 linhagens de fungos endofíticos da *A. taxiformis*, codificados como AT01-AT07, as quais foram preservadas em *slants* (frascos contendo água do mar ou água ultra pura esterilizada e o fungo em meio sólido BDA), lacrados e armazenados em temperatura ambiente na micoteca do Departamento de Bioquímica e Química Orgânica do IQ – Ar.

A linhagem utilizada neste trabalho, foi identificada como *Hypoxyton investiens* pela empresa Genotyping Biotecnologia (Botucatu-SP) através do sequenciamento Sanger em regiões específicas do DNA (ITS) do micro-organismo. Em seguida, as linhagens fúngicas foram enviadas para avaliação complementar, realizada em parceria com o Prof. Dr. Marcos

Antônio Soares (UFMT, Cuiabá, MT), através de taxonomia molecular e morfológica, confirmando assim o gênero e a espécie da linhagem do fungo isolada.

As coletas das algas e as etapas de isolamento, assim como a identificação das linhagens fúngicas foram realizadas pela Dr^a. Rebeca P. Medina (MEDINA, 2016).

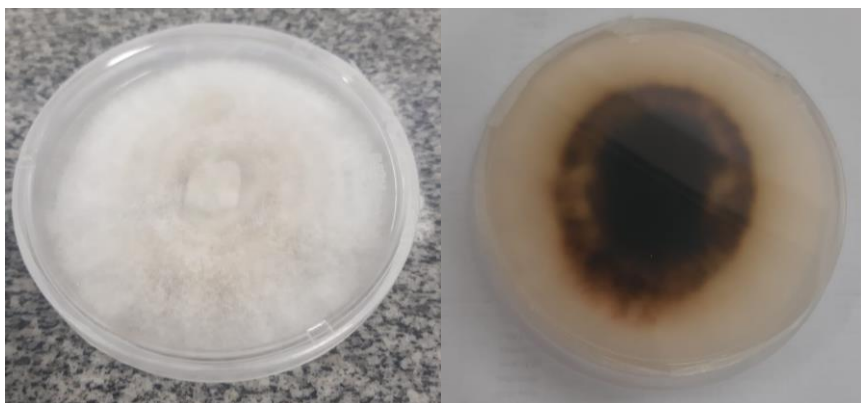


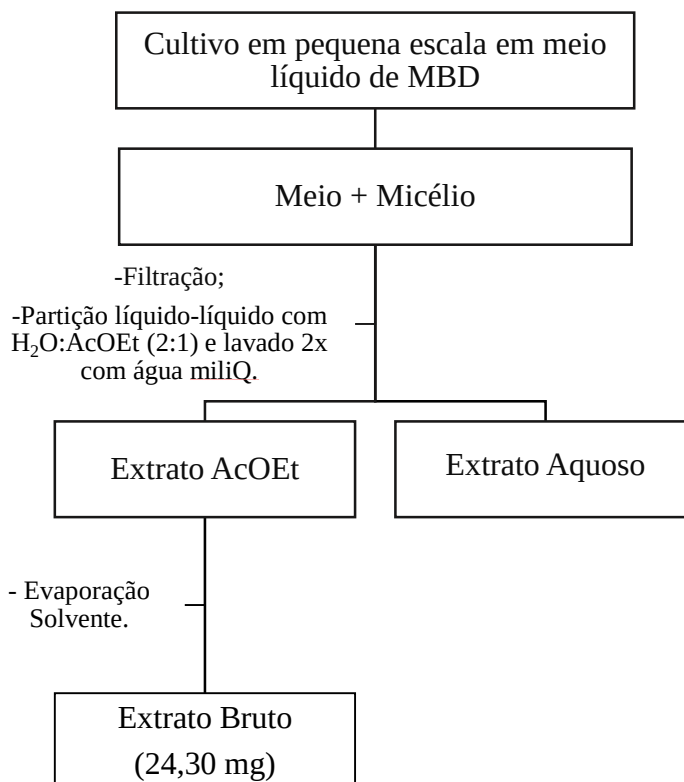
Figura 17 – Linhagem AT-01 do fungo endofítico *Hypoxylon investiens* isolada da alga vermelha *Asparagopsis taxiformis*.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

3.3. Escolha do meio de cultivo

Para a escolha do meio de cultivo utilizou-se preliminarmente o meio sólido de arroz e o meio líquido de batata e dextrose (MBD). Amostras do fungo endofítico *H. investiens* foram inoculadas em 1 placas de Petri contendo meio de cultivo BDA. Após 8 dias de crescimento a 25°C um terço do micélio crescido em cada placa foi inoculado em cada frasco de Erlenmeyer (500 mL) contendo 7,2 g de MBD em 300 mL de água MiliQ, e autoclavados por 20 minutos, totalizando assim 3 frascos, sendo mantidos a 25°C. Também foram preparados frascos apenas com o meio líquido como controle.

Após o respectivo período de incubação o caldo foi separado do micélio por filtração a vácuo e o filtrado foi submetido à partição líquido-líquido com acetato de etila (AcOEt). O solvente orgânico foi evaporado no evaporador rotativo. A obtenção dos extratos estão demonstrados no **Esquema 1**.

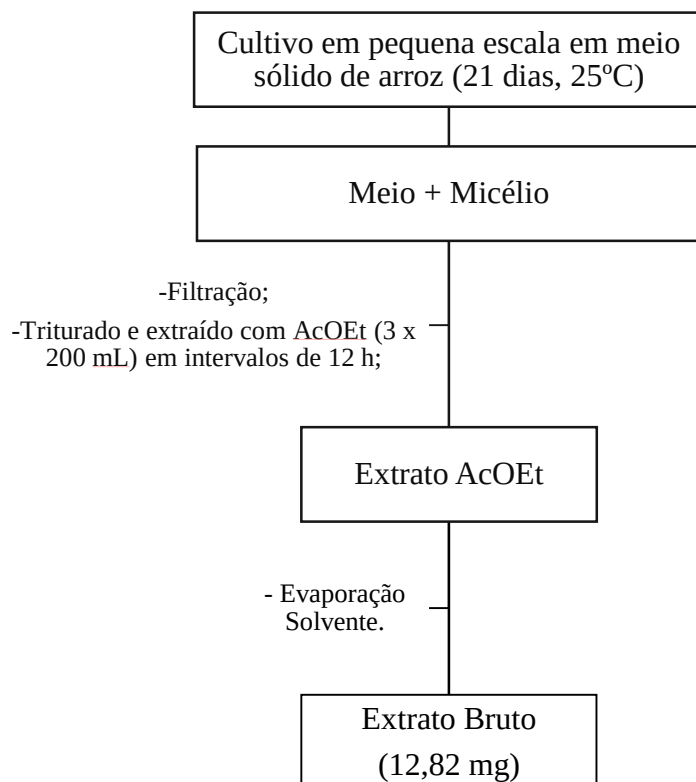


Esquema 1 – Obtenção dos extratos brutos cultivados em meio líquido de MBD.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

Para o cultivo em meio sólido cerca de um terço do micélio de cada placa de Petri foi inoculado no meio sólido de arroz contendo água ultra pura esterilizada em 3 frascos de Erlenmeyer contendo 90 g de arroz e 75,0 mL de água.

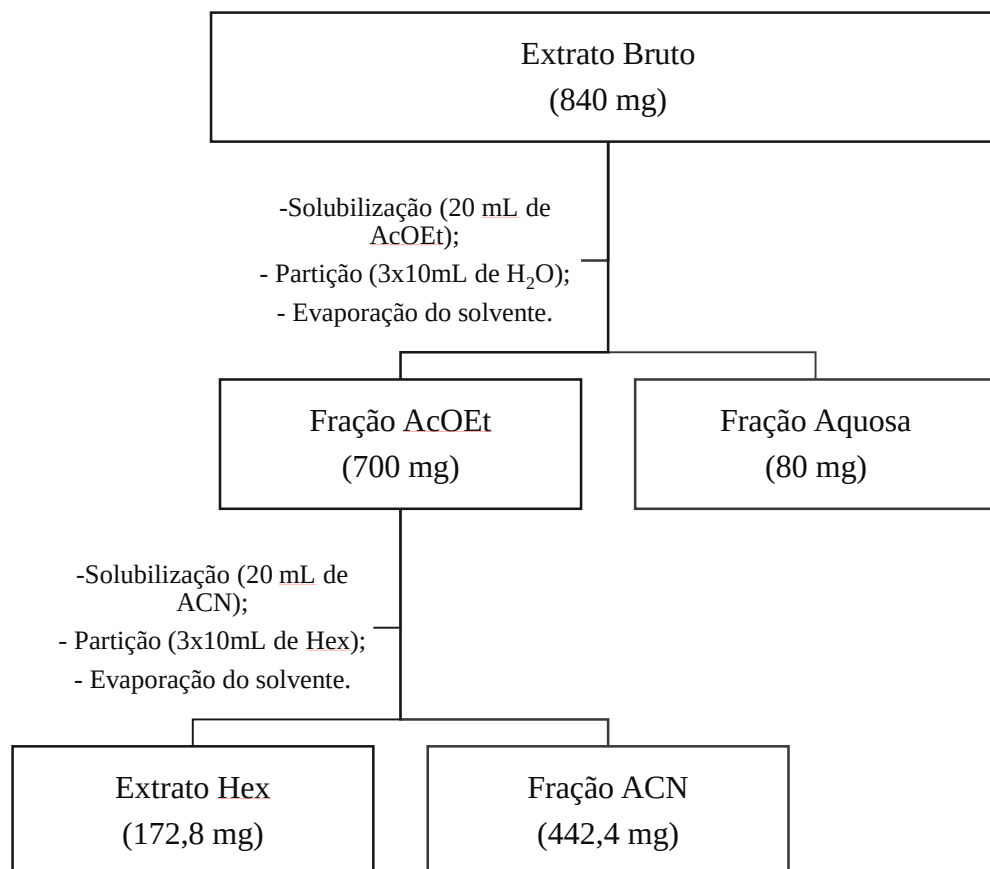
Após o período de incubação (21 dias a 25°C), o meio sólido foi triturado e extraído com AcOEt (3 x 200 mL) em intervalos de 12h a cada extração. Feito isso, a fração orgânica foi concentrada em evaporador rotativo, fornecendo o extrato bruto do fungo em estudo, como demonstra o **Esquema 2**.



Esquema 2 – Obtenção dos extratos brutos cultivados em meio sólido de arroz.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

Após a obtenção do extrato bruto em meio sólido, utilizou-se 840 mg para fazer as outras partições conforme mostrados no **Esquema 3**.



Esquema 3 – Obtenção das frações do cultivado em meio sólido de arroz.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

Os extratos brutos secos foram analisados por CLAE-DAD para a obtenção do perfil químico dos extratos obtidos em de cada meio de cultivo e por espectrometria de massas de alta resolução.

3.4. Obtenção do perfil químico

Para a obtenção do perfil químico, amostras do extrato do fungo endofítico *H. investiens* foram inoculadas em 5 placas de Petri contendo meio de cultivo BDA. Após 8 dias de crescimento em 25°C, um terço do micélio crescido em cada placa foi inoculado em cada frasco de Erlenmeyer (500 mL) contendo 7,2 g de caldo de batata e dextrose (MBD) em 300 mL de água MiliQ, e autoclavados por 20 minutos, totalizando assim 3 frascos para cada dia, sendo estes: 7 dias, 14 dias, 21 dias, 28 dias e 35 dias e em 25°C. Também foram preparados frascos apenas com o meio líquido como controle.

Após o respectivo período de incubação o caldo foi separado do micélio por filtração a vácuo e o filtrado foi submetido à partição líquido-líquido com AcOEt. O solvente orgânico foi evaporado no evaporador rotativo. Os extratos brutos secos foram analisados por CLAE-DAD

para a obtenção do perfil químico de cada período e por espectrometria de massas de alta resolução.

3.5. Cultivo do extrato em larga escala

Para obter o extrato bruto do fungo *Hypoxylon investiens* com maior massa, cultivou-se esta linhagem inicialmente em 4 placas de Petri contendo BDA. Após o crescimento do fungo (cerca de 8 dias para ocupar a placa), fez-se o repique para 20 placas de Petri contendo o mesmo meio e no mesmo período de tempo.

Cada micélio crescido nas placas foi dividido em 3 partes iguais para a inoculação em meio líquido. Para a preparação do meio líquido utilizaram-se 45 frascos de Erlenmeyers de 500 mL, cada um contendo 7,2 g de MBD em 300 mL de água MiliQ, e autoclavados por 40 minutos. Os frascos de Erlenmeyers foram conservados estáticos por 28 dias a 25°C. Estes processos foram repetidos quatro vezes com intuito de obter um total de 180 Erlenmeyers de cultivo da linhagem fúngica em estudo.

Após o período de fermentação dos fungos, o micélio foi separado do caldo fermentado através do processo de filtração a vácuo. O filtrado aquoso foi submetido à partição líquido-líquido com AcOEt, seguido de evaporação do solvente para obtenção dos extratos brutos, os quais foram submetidos à análise de CLAE-DAD visando obter seus perfis químicos e por espectrometria de massas de alta resolução.

3.6. Fracionamento do extrato bruto

Para o fracionamento utilizando-se uma coluna de vidro empacotada com a fase estacionária octadecil silano (C₁₈) (Sorbent Technologies, Inc), que possui partículas de 40 – 75 µm (200 – 400 mesh), porosidade de 60 Å. As dimensões da coluna utilizadas foram 34 cm de altura e 2,4 cm de diâmetro. O sistema de eluição consistiu de uma combinação dos solventes metanol e água nas proporções de 24%; 35%; 58%; 61%; 73%; 77%; 84%; 87%; 98% e 100% de metanol. As frações obtidas foram submetidas à análise de CLAE-DAD e por espectrometria de massas de alta resolução a fim de obter seus perfis químicos.

3.7. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

Para análises por CLAE-DAD analítico foi utilizado o equipamento modelo Shimadzu® com duas bombas LC-6AD, comunicadora CBM-20A, injetor automático SIL-10AF e detector de arranjos de diodos SPD-M20A.

Foi utilizada a coluna analítica Luna Phenomenex® tipo octadecil silano (C₁₈; 250 x 4,60 mm; 5 µm; 100 Å), e injeção de 30 µL de cada amostra em gradiente exploratório de H₂O/MeOH (95:05 - 0:100) por 50 min e fluxo de 1,0 mL min⁻¹. Para realizar a análise por CLAE-DAD as amostras foram submetidas a clean-up em cartuchos de C₁₈. Em seguida, foram secas e diluídas em 100% de MEOH, até concentração de 10 mg.mL⁻¹.

Para a análise no modo semi-preparativo utilizou-se o equipamento Shimadzu® com detector ultravioleta com arranjo de diodos SPD-M20A, duas bombas LC-6AD, comunicadora CBM-20A. As amostras foram preparadas com concentração de 18 mg/mL em uma solução de 52% de MeOH, posteriormente foram injetadas manualmente e eluídas em uma coluna Phenomenex® Luna C₁₈ (250 x 10,0 mm; 5 µm; 100 Å). Todos os dados cromatográficos foram analisados no programa LC solution®.

3.8. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (¹H) e Carbono (¹³C)

As análises de RMN de ¹H uni e bidimensionais (COSY, TOCSY, HSQC e HMBC) foram realizados no equipamento Bruker Ascend™ 600 MHz com campo magnético de 14,1 T e criosonda TCI (Triple Channel Inverse) de 5 mm. As amostras foram solubilizadas em CD₃OD e utilizou-se o sinal do solvente como referência para os deslocamentos químicos de ¹H (δ_H = 3,21). As análises de RMN de ¹³C foram referenciados de acordo com o pico do solvente CD₃OD (δ_H = 47,5).

3.9. Espectrometria de massas de alta resolução

As análises foram realizadas em um espectrômetro de massas UHR-ESI-TOF MaXis™ Impact (*Ultra High Resolution - Electrospray Ionization - Time of flight*) equipado com eletrospray (ESI) como fonte de ionização e analisador quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF). Para o preparo das amostras utilizou-se uma concentração de 1mg/mL, em seguida foram centrifugadas por 3 min em 1000 rpm e injetadas diretamente no espectrômetro.

3.10. Anotação dos compostos através da espectrometria de massas e rede molecular GNPS

Os espectros de massas de alta resolução obtidos no formato RAW foram convertidos para o formato .mzML pelo software MSConvert. Os dados compactados foram inseridos na plataforma com o auxílio do programa WinSCP. A criação da rede molecular está disponível no site do GNPS¹ (WANG *et. al.*, 2016).

Os parâmetros utilizados para a construção da rede molecular foram: tolerância de massa do íon precursor e do íon fragmento, 0,2 e 0,2 Da respectivamente, mínimos de pares de cosseno 0.7 e 6 para íons fragmentos semelhantes. O tamanho dos clusters foram restringidos para o mínimo de 2 nodos. Os dados gerados pela rede molecular foram importados e visualizados na plataforma Cytoscape Versão 3.8.2.

¹ GNPS: Global Natural Products Social Molecular Networking. **GNPS**, 20 de maio de 2022. Disponível em: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>. Acessado em: 01 jun. 2022.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Análise dos meios de cultivo

Os extratos do meio líquido de batata e do meio sólido de arroz foram secos e analisados por espectrometria de massas para a anotação dos compostos e das redes moleculares, e por CLAE-DAD que possibilitou a comparação da produção metabólica do fungo nos dois meios de cultivo.

4.1.1. Análise das anotações da plataforma do GNPS

Os meios de cultivo de MBD e arroz foram analisados por UPLC-MS/MS e os dados inseridos na plataforma do GNPS, resultando assim nas redes moleculares do modo positivo e negativo visando permitir a análise comparativa dos dois diferentes tipos de meios de cultivo. A rede molecular do modo positivo apresentou 1208 nodos, esses estão retratados com gráficos de pizza pintados de 4 cores diferentes dependendo da contribuição de cada meio (**Figura 18**). Tanto na rede molecular de modo negativo quanto positivo foi possível observar clusters formados por nodos apenas do meio sólido de arroz (rosa) e outros clusters com a presença apenas do meio líquido de MBD (azul). Os clusters são formados a partir da correlação entre os nodos e a massa molecular do íon. Caso apresentem os mesmos íons precursores e/ou semelhanças na fragmentação, os nodos estarão conectados entre si.

A rede molecular no modo positivo ²apresenta maior quantidade de nodos e de clusters formados. Também pode-se destacar que o modo positivo apresentou a formação de clusters com nodos predominantemente do extrato obtido do cultivo em meio líquido. Os nodos que possuem a presença do branco do meio de MBD e/ou do branco do meio sólido não foram utilizados para análise.

² MEIO sólido de arroz e meio líquido de MBD: modo positivo. **GNPS**, 25 de out de 2021. Disponível em: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=4bb4183df1ca44db8e443ce759aba9d3>. Acessado em: 01 jun. 2022.

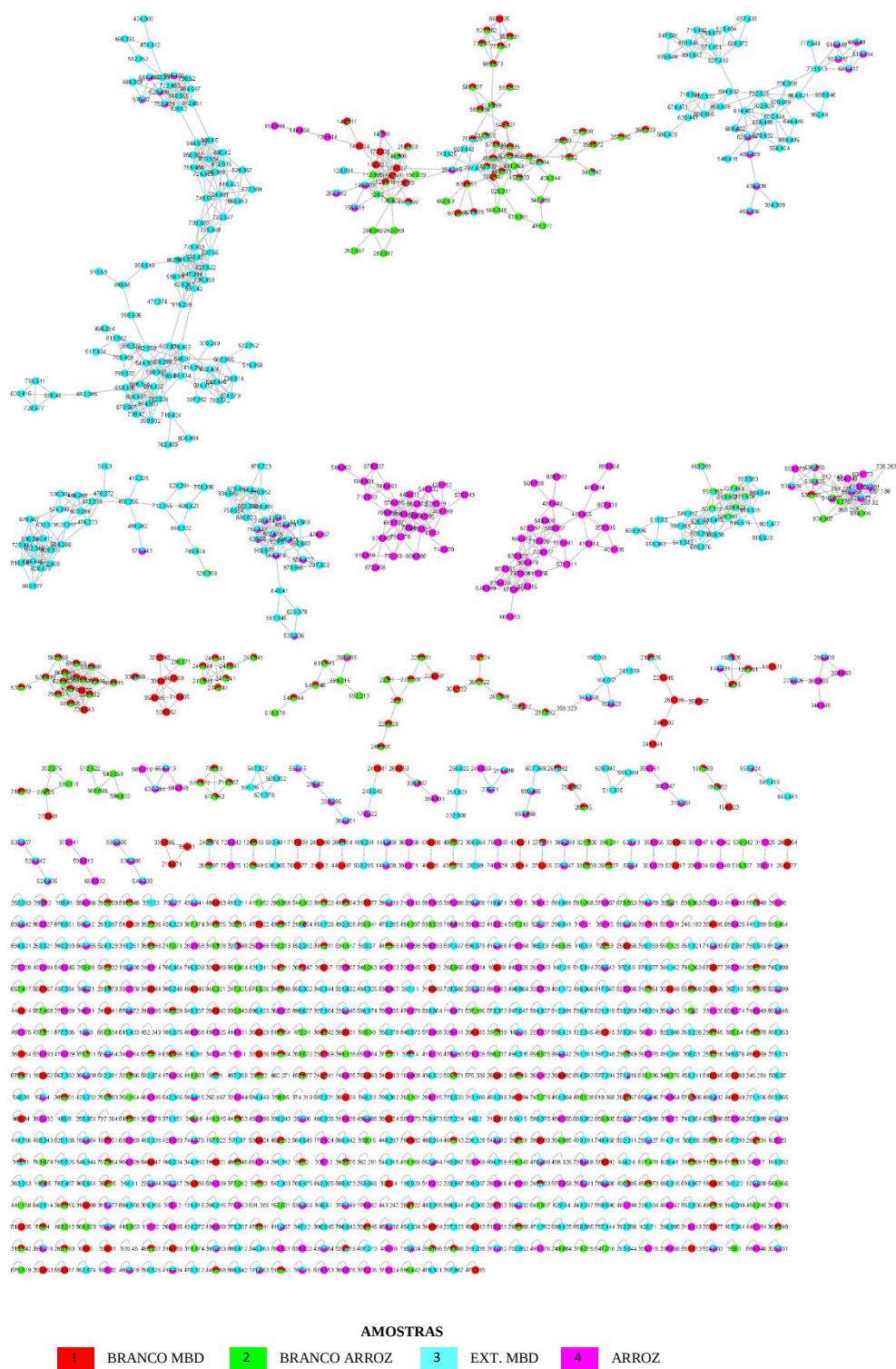


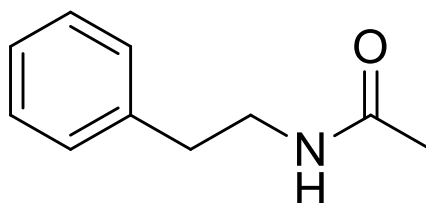
Figura 18 – Rede molecular calculada para os dados de UPLC-MS/MS das amostras dos extratos do fungo *Hypoxylon investiens* crescido em MBD (azul), meio sólido de arroz (rosa), controle do meio de arroz (verde) e controle do meio líquido (vermelho) no modo positivo.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

Além da formação dos clusters, também é possível analisar uma lista gerada pelo GNPS com a anotação de possíveis constituintes presentes nos extratos e frações. Essa análise indicou que o meio de MBD foi o que apresentou o maior número de substâncias com valores de cosseno alto e intermediário, indicando grau de confiabilidade relevante para as anotações. Já o meio de arroz apresentou menos constituintes e substâncias que também foram detectadas no meio de MBD.

Alguns dos constituintes do meio líquido e presentes nos dois meios, que apresentaram uma maior similaridade entre os espectros de massas da literatura e o experimental, estão listados a seguir. Os demais compostos, cuja anotação foi providenciada pela plataforma do GNPS, encontram-se no **Apêndice A e B**. Destacam-se a nicotinamida (**55**) e a 4-hidroxi-6-metil-2-pirona (**61**), isoladas por Chang *et. al.* (2014) e que foram anotadas na rede molecular do modo negativo para o extrato obtido em meio líquido de MBD com valor de cosseno de 0,79 e classificação *gold* para nicotinamida e cosseno 0,70 com classificação *bronze* para a 4-hidroxi-6-metil-2-pirona.

A substância (**73**) foi anotada como *N*-acetil-2-feniletilamina (**Figura 19**), sendo detectada no extrato obtido do cultivo no meio líquido de MBD, por meio do GNPS com cosseno de 0,83 e com dados da literatura classificados como *bronze*. No estudo desenvolvido por Lee *et. al.* (2021) essa substância apresentou inibição da via TGF- β /Smad e supressão da metástase de células de câncer de pulmão. Essa substância é similar a (**58**) e (**60**), que apresentam um grupo OMe e uma hidroxila, respectivamente, como substituinte na posição *para*, anteriormente isolados por Chang *et.al.* (2014).



(73)

Figura 19 – Estrutura da *N*-acetil-2-fenilamina.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

A comparação dos espectros de massas, **Figura 20**, mostra uma alta similaridade dos sinais mais intensos e a ausência de alguns sinais menos intensos como os sinais em aproximadamente em m/z 85 e 102, justificando assim o valor de 0,83 de cosseno.

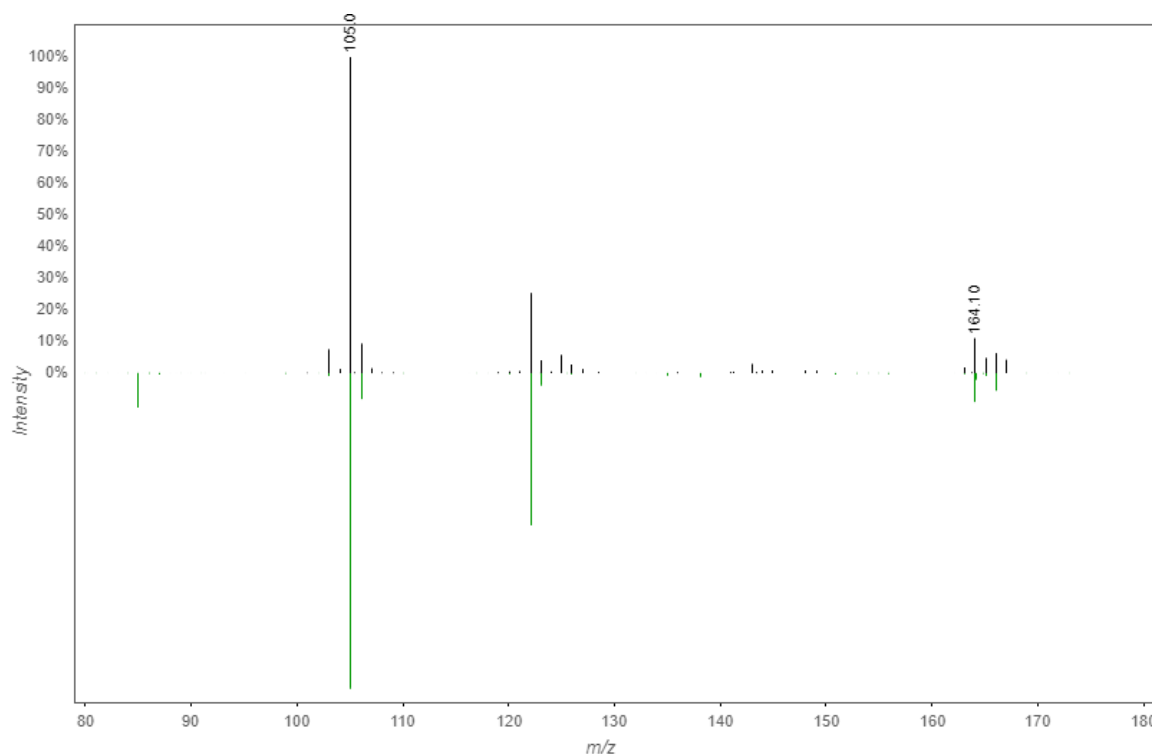


Figura 20 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental do da *N*-acetil-2-feniletilamina.

Fonte: Adaptado de Wang *et. al.* (2016).

A ciclopamina (**74**), também detectada no extrato obtido em meio líquido de MBD, anotada pelo GNPS com cosseno de 0,78 e dados da literatura classificados como *gold*, foi anteriormente avaliada por Carballo *et. al.* (2020) e apresentou efeito em linhagens celulares de glioblastoma.

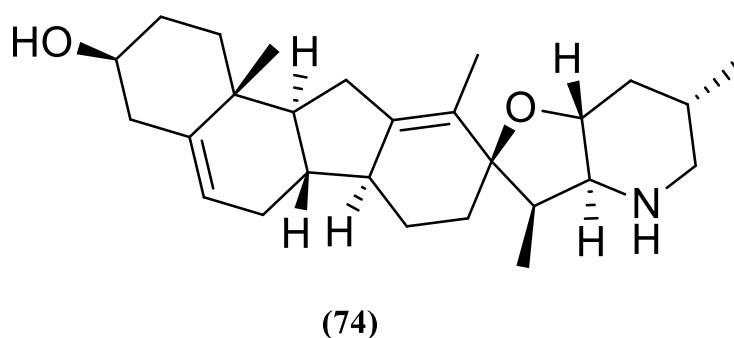


Figura 21 – Estrutura da ciclopamina.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

O valor de cosseno mais baixo para a comparação dos espectros de massas, **Figura 22**, é ocasionado pela ausência de alguns sinais, com intensidade mais baixa, na região de m/z 380,

entretanto os sinais de maior intensidade do espectro da literatura (verde) correspondem com os sinais do espectro experimental.

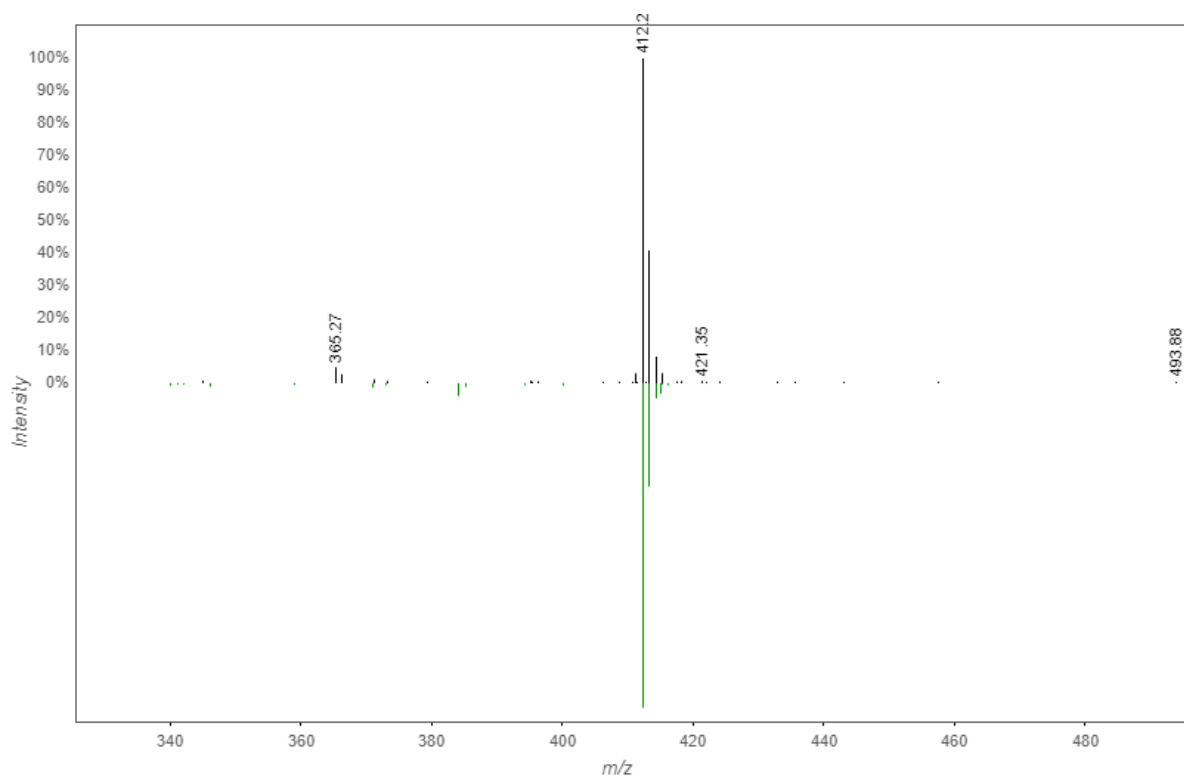


Figura 22 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental do composto ciclopamina.

Fonte: Adaptado de Wang *et. al.* (2016).

Na ampliação da rede molecular dos extratos de MBD e meio sólido de arroz no modo positivo, **Figura 23**, pode-se observar em qual cluster está localizada cada substância anotada pela plataforma do GNPS e quais são os meios presentes em cada nodo.

A rede molecular dos extratos de MBD e meio sólido de arroz no modo negativo ³ demonstrada na **Figura 24** é constituída de 727 nodos e está retratada da mesma forma que a do modo positivo.

³ MEIO sólido de arroz e meio líquido de MBD: modo negativo. **GNPS**, 25 de out de 2021. Disponível em: https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/result.jsp?task=2c988b6703fb420bab5d718209515831&view=view_all_annotations_DB. Acessado em: 01 jun. 2022.

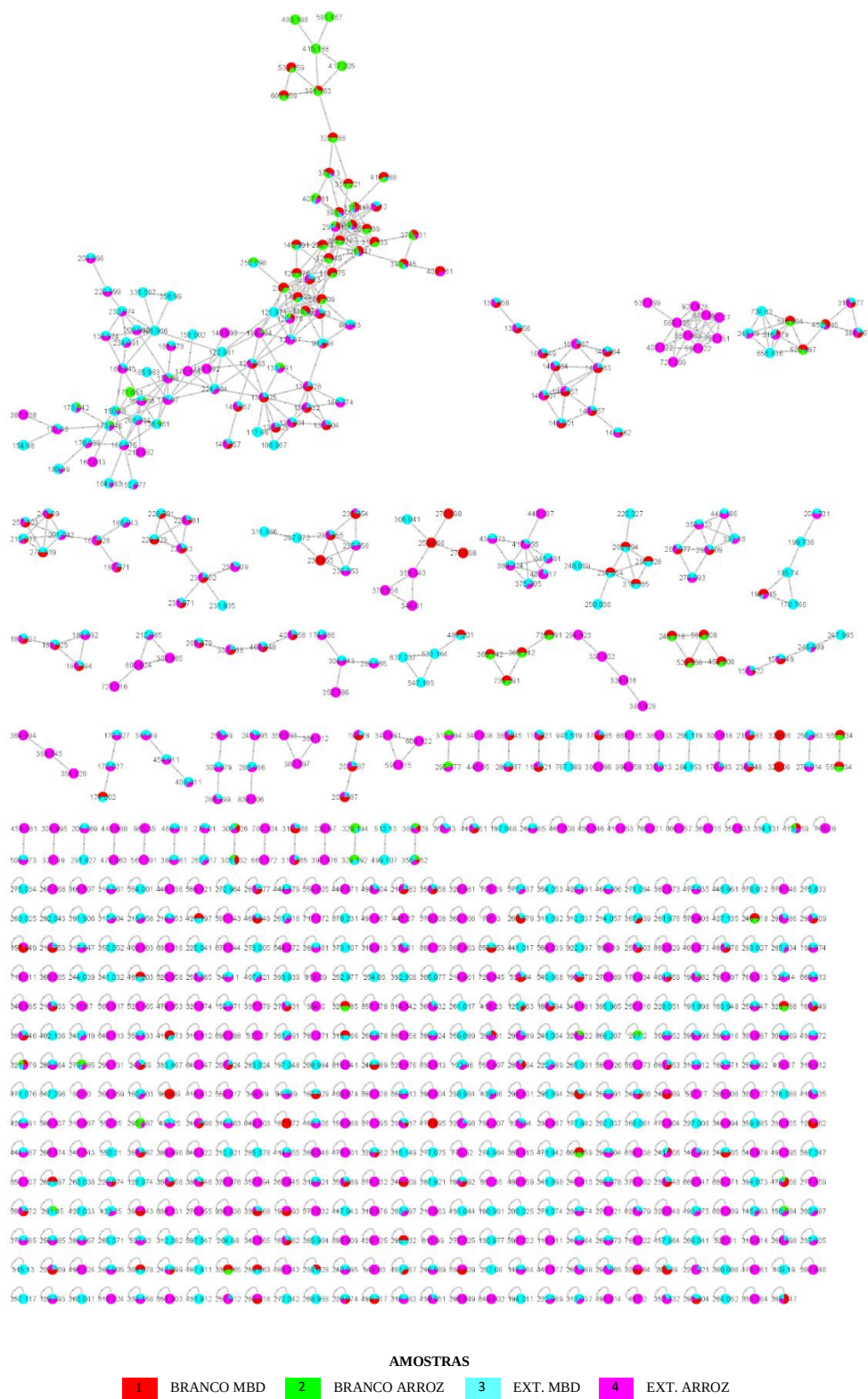


Figura 24 – Rede molecular calculada para os dados de UPLC-MS/MS das amostras dos extratos do fungo *Hypoxylon investiens* crescido em MBD (azul), meio sólido de arroz (rosa), controle do meio de arroz (verde) e controle do meio líquido (vermelho) no modo negativo.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

Para tratamento dos dados obtidos no modo negativo foi realizada análise similar, e constatou-se uma menor quantidade de clusters assim como a predominância de clusters heterogêneos. A lista de constituintes gerada pelo GNPS apresentou características similares ao modo positivo. O extrato obtido em meio de MBD foi o que apresentou o maior número de constituintes com valores de cosseno alto e intermediário. Já o extrato obtido em meio de arroz apresentou menos componentes ou substâncias que também foram detectadas no extrato obtido em meio de MBD. Os constituintes considerados mais relevantes, com maiores valores de cosseno e que não estão presentes no branco do MBD e no branco do arroz foram descritos abaixo.

A substância **(75)** foi detectada apenas no extrato obtido em meio líquido, e anotada como 6,8-diidroxi-3-metil-isocumarina, pelo GNPS com cosseno igual a 0,75 e comparação com dados da literatura classificados como *bronze*. Essa isocumarina foi detectada em diversas espécies de fungos, como *Aspergillus versicolor* KJ801852, *Aspergillus similanensis* sp. nov. KUFA 0013, *Botryosphaeria* sp. KcF6, *Penicillium coffeae* MA-314 e *Myrothecium* sp. OUCMDZ-2784 e mostrou potencial inibidor da guanosina-3',5'-monofosfato fosfodiesterase (HEGDE *et. al.*, 1989; NOOR *et. al.*, 2020). A presença de isocumarinas, como por exemplo 5-hidroximetil-meleína **(65)**, 4-hidroxi-5-metilmeleína **(66)** e 5-metilmeleína **(67)** também foram relatadas por Rufino (2019) e isoladas da mesma linhagem fúngica. No trabalho de Chang *et.al.* (2014) também é relatada a presença de isocumarinas para a espécie fúngica *H.investiens*, como a (3S)-5-metil-8-O-metilmeleína **(42)**, (3R)-5-hidroximetilmeleína **(43)**, (3R)-8-O-metilmeleína **(44)** e (3R)-5-metilmeleína **(45)**.

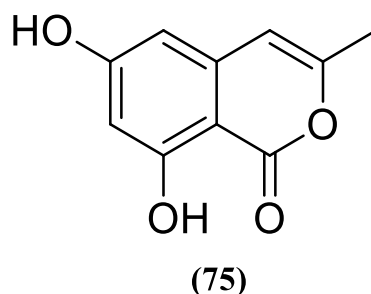


Figura 25 – Estrutura da 6,8-dihidroxi-3-metil-isocumarina.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

Na **Figura 26**, pode-se observar que apesar do espectro experimental apresentar todos os picos do espectro da biblioteca ele possui uma defasagem de m/z 0,02 entre os picos do espectro experimental e o da literatura.

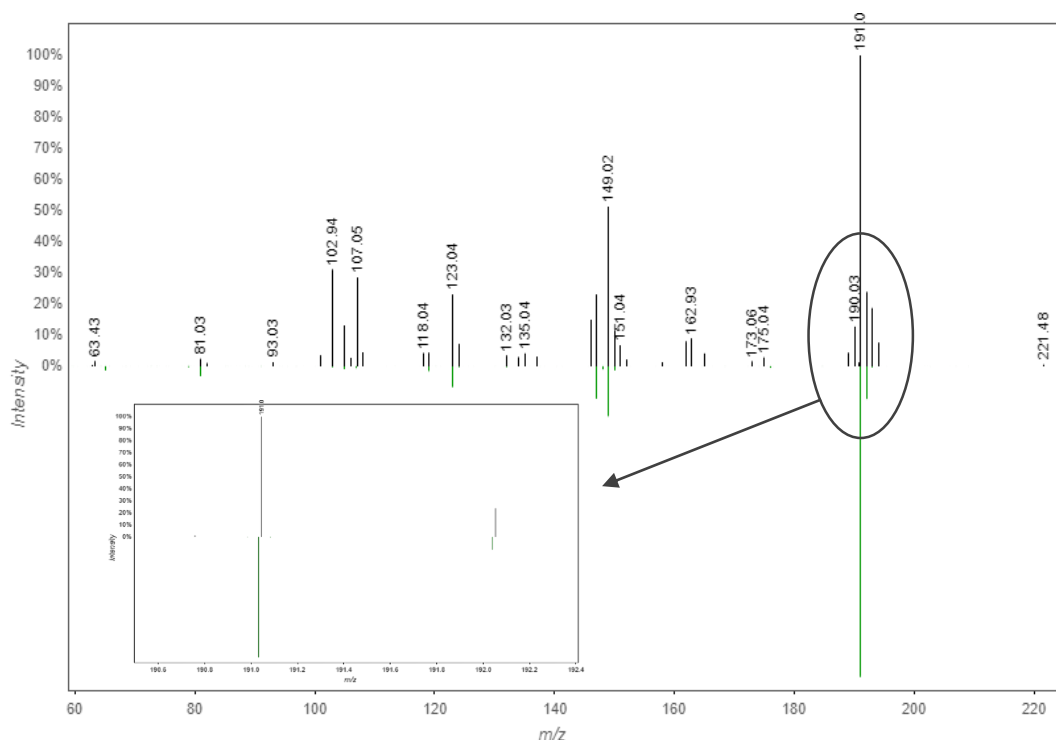


Figura 26 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental do composto 6,8-diidroxi-3-metil-isocumarina.

Fonte: Adaptado de Wang *et. al.* (2016).

A substância **(76)**, anotada como emodina foi isolada de espécies de planta como *Rheum palmatum*, *Polygonum cuspidatum*, *Polygonum multiflorum*, *Aloe vera* e *Cassia obtusifolia* e apresenta atividade antiviral, antibacteriana, imunossupressora, entre outras (DONG *et. al.*, 2016). Essa substância também foi anotada nos extratos dos dois meios de cultivo pela plataforma do GNPS com cosseno de 0,89 e dados da literatura classificados como *bronze*.

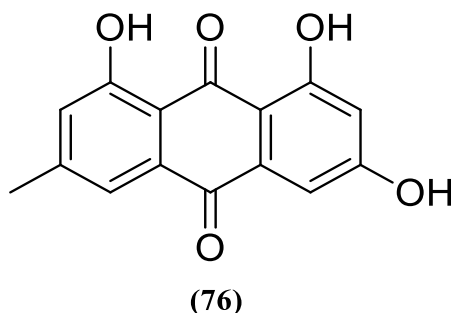


Figura 27 – Estrutura da emodina.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

A comparação dos espectros de massas, **Figura 28**, apresenta um bom valor de cosseno devido sua alta similaridade de sinais, diferenciando apenas das intensidades dos mesmos.

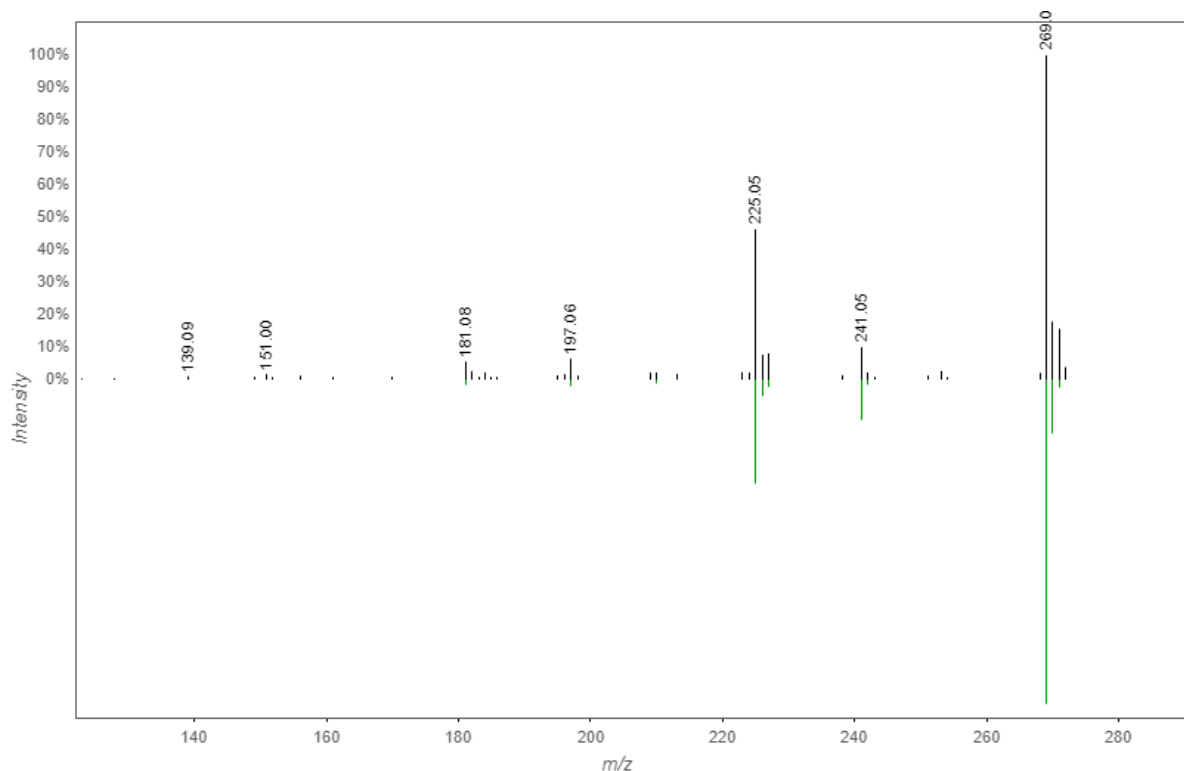


Figura 28 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental do composto emodina.

Fonte: Adaptado de Wang *et. al.* (2016).

Na ampliação da rede molecular dos extratos de MBD e do meio sólido de arroz no modo negativo, **Figura 29**, pode-se observar em qual cluster está localizada cada substância anotada pela plataforma do GNPS e qual meio foi anotada cada estrutura. A nicotinamida (**55**) e a 4-hidroxi-6-metil-2-pirona (**61**), também foram anotadas na rede molecular do modo negativo e estão retratadas na **Figura 29**. As estruturas (**55**) e (**61**) já foram isoladas da mesma espécie de fungo endofítico por Chang *et. al.* (2014).

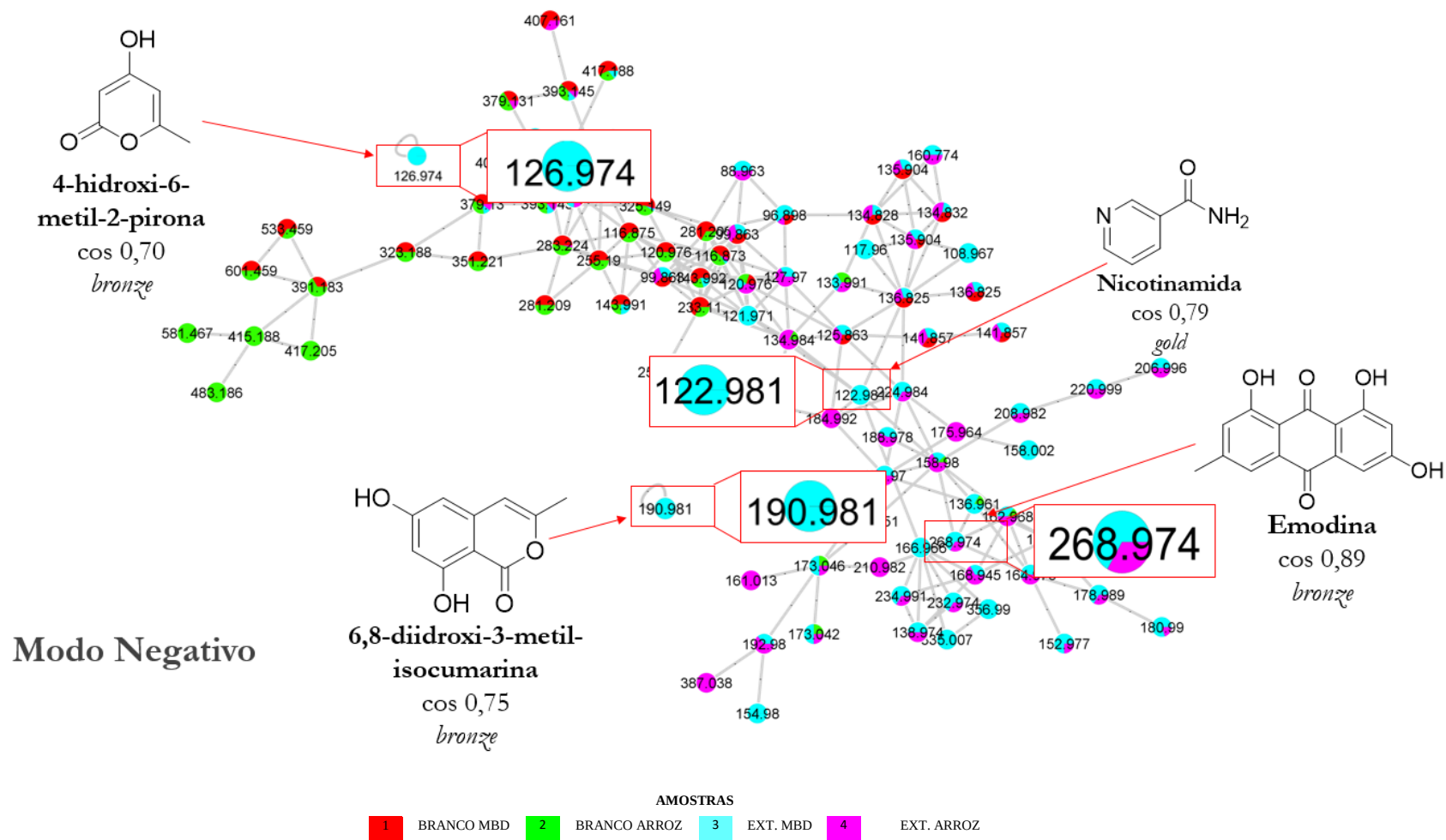


Figura 29 – Ampliação do cluster da rede molecular calculada para os dados de UPLC-MS/MS das amostras dos extratos do fungo *Hypoxylon investiens* crescido em MBD e meio sólido no modo negativo.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

As redes moleculares dos dois meios de cultivo apresentaram diversas formações de nodos e clusters, mas o extrato do meio líquido demonstrou maior formação de clusters e nodos, constituídos majoritariamente do meio de MBD e com menos constituintes identificados tanto no branco (controle) quanto no meio de cultivo de arroz. Também realizou-se a análise dos extratos pelo CLAE-DAD para subsidiar a abordagem adotada na etapa seguinte deste projeto.

4.1.2. Análise por CLAE-DAD

O cromatograma do extrato bruto obtido em meio de arroz apresenta mais bandas na região de média a baixa polaridade enquanto o cromatograma do extrato obtido em meio de MBD apresenta bandas distribuídas por todo cromatograma, indicando assim uma diversidade de compostos de alta, média e baixa polaridade como pode ser evidenciado na **Figura 30** e **Figura 31**.

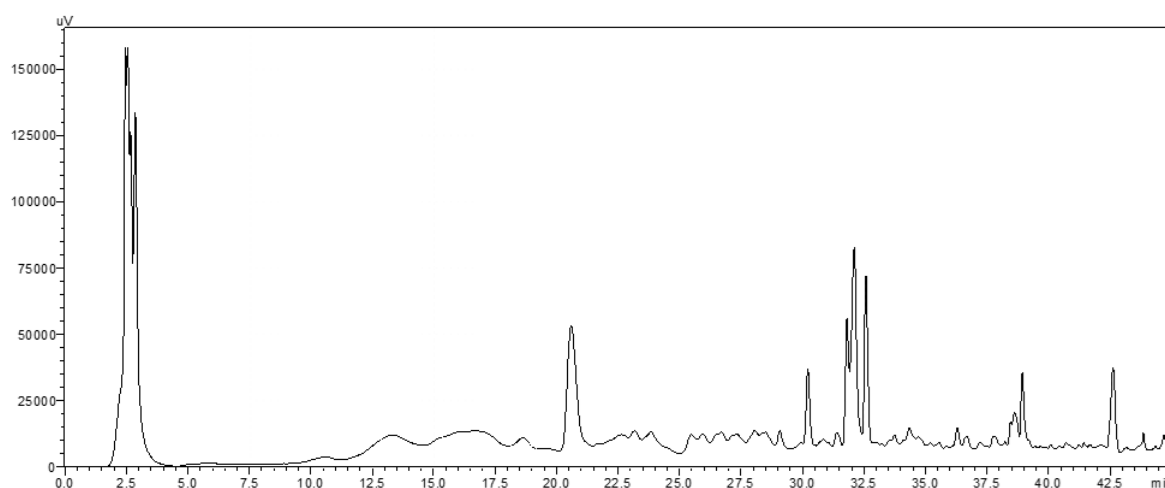


Figura 30 – Cromatograma do extrato obtido em meio de arroz ACN em gradiente exploratório com detecção em 254 nm. Luna Phenomenex® C₁₈, (250 x 4,60 mm), 5µm; **Solvente A:** H₂O; **Solvente B:** MeOH. **Grad. Exp.:** 5-100% de B em 45 min.; 1,00 mL.min⁻¹.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

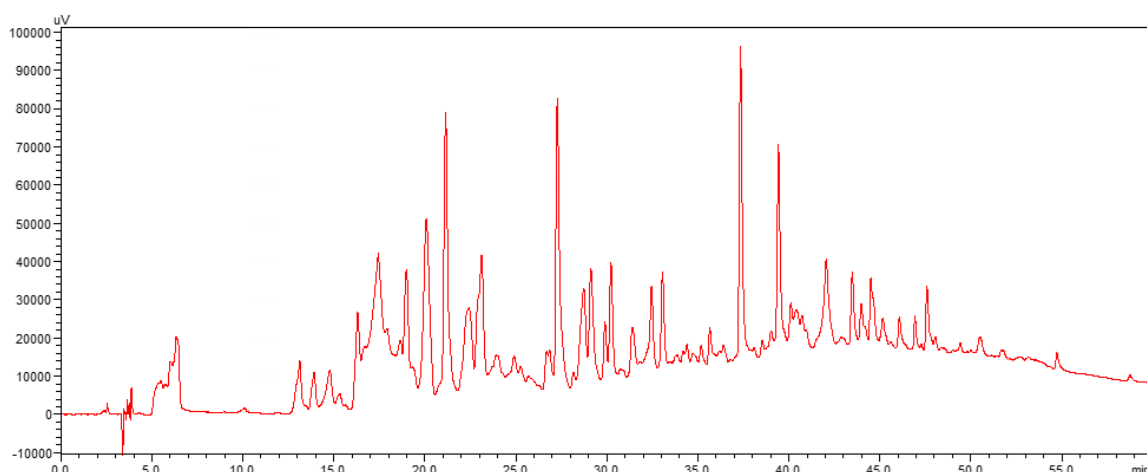


Figura 31 – Cromatograma do extrato obtido em meio de MBD em gradiente exploratório no com detecção em 254 nm. Luna Phenomenex® C₁₈, (250 x 4,60 mm), 5µm; **Solvente A:** H₂O; **Solvente B:** MeOH. **Grad. Exp.:** 5-100% de B em 50 min.; 1,00 mL.min⁻¹.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

Para dar continuidade ao projeto escolheu-se o meio líquido MDB, uma vez que esse apresentou maior quantidade de compostos identificados pelo GNPS e a análise por CLAE-DAD permitiu identificar uma maior diversidade de metabólitos secundários.

4.2. Análise do perfil químico

Inicialmente pesou-se os extratos secos de 7, 14, 21, 28 e 35 dias (**Tabela 1**) para análise do perfil químico, sendo que para os extratos obtidos em 21, 28 e 35 dias de cultivo foram utilizados caldos de apenas dois frascos de Erlenmeyers, uma vez que um dos três frascos aparentavam estar contaminado com outro fungo.

Tabela 1 – Massas obtidas dos extratos brutos obtidos em diferentes tempos de cultivo do fungo *H. investiens*.

Extrato	Massa (mg)	Massa por Erlenmeyer (mg)
7 dias*	24,40	8,13
14 dias*	66,30	22,10
21 dias**	111,10	55,50
28 dias**	48,60	24,30
35 dias**	90,50	45,25

* Foram utilizados 3 frascos de Erlenmeyer.

** Foram utilizados 2 frascos de Erlenmeyer.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

4.2.1. Análise das anotações da plataforma do GNPS

Os extratos de 7, 14, 21, 28 e 35 dias obtidos para a verificação da diversidade da produção metabólica pelo fungo *H. investiens* foram analisados por UPLC-MS/MS e os dados inseridos na plataforma do GNPS resultando assim nas redes moleculares mostradas a seguir. A rede molecular do modo positivo ⁴é constituída de 1005 nodos, retratados como gráficos de pizza pintados com 6 cores diferentes dependendo da contribuição de cada extrato (**Figura 32**).

⁴ PERFIL químico meio líquido de MBD: modo positivo. **GNPS**, 21 de set de 2021. Disponível em: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=dca1557013264d10afaed63211e92c40>. Acessado em 01 de jun de 2022.

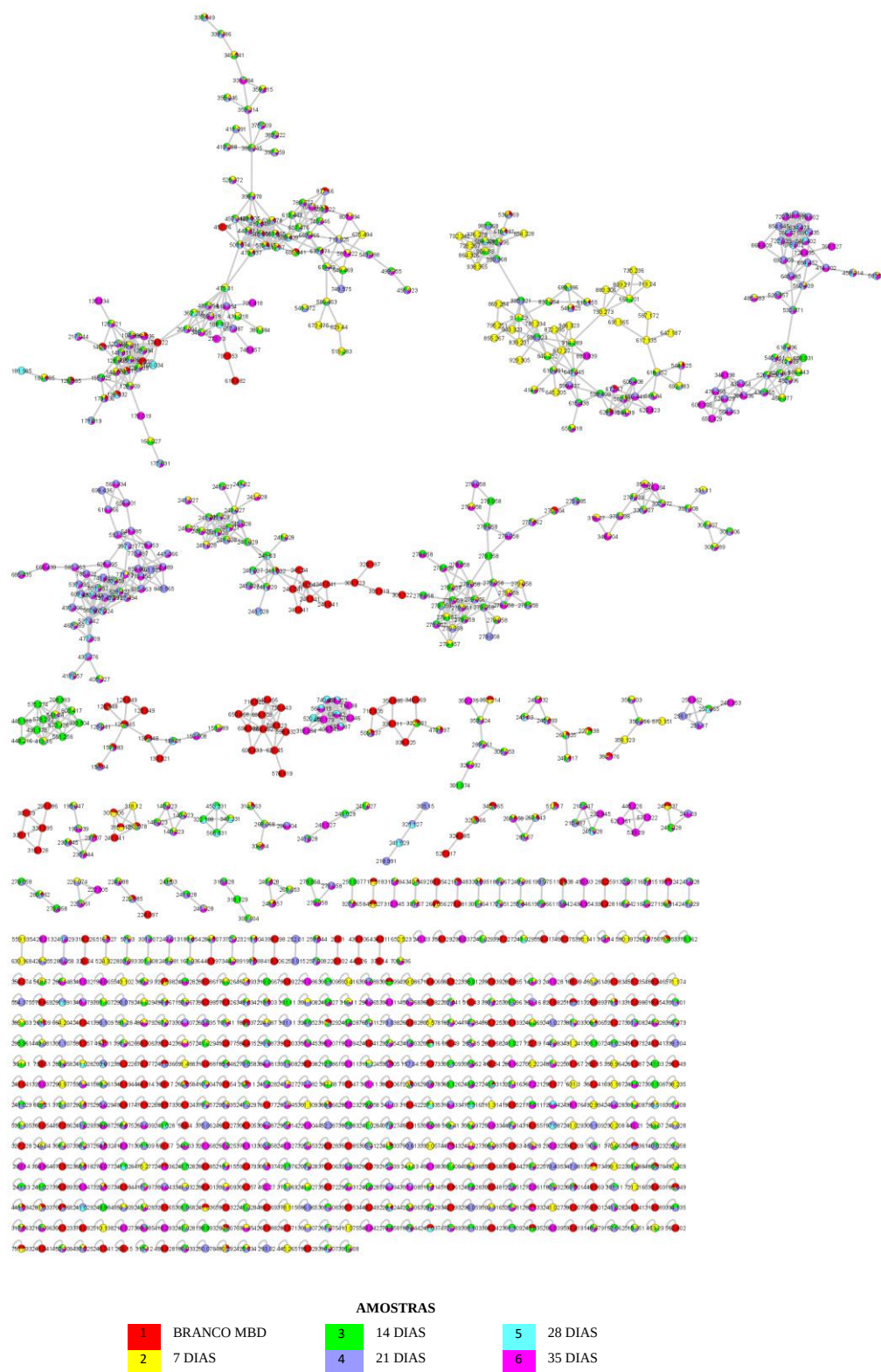


Figura 32 – Rede molecular calculada para os dados de UPLC-MS/MS das amostras dos extratos do fungo *Hypoxyton investiens* crescido em MBD nos períodos de 7 dias (amarelo), 14 dias (verde), 21 dias (roxo), 28 dias (azul), 35 dias (rosa) e branco do meio (vermelho) no modo positivo.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

No modo positivo observou-se a presença de clusters bastante heterogêneos e a maior quantidade de nodos com a presença dos extratos de 21 (roxo) e 35 dias (rosa). Para o contínuo estudo do perfil químico também foi criada uma lista de compostos na plataforma do GNPS. Embora a lista gerada pelo GNPS não apresente uma grande diversidade de compostos detectados em extratos de apenas um período de cultivo, verificou-se que os cultivos em períodos de 14, 21 e 35 dias foram os mais recorrentes em compostos com cosseno alto e intermediário, indicando maior confiabilidade no assinalamento dos constituintes de cada extrato. Alguns desses compostos listados pelo GNPS foram destacados abaixo. Para a análise das redes moleculares não foram considerados nodos com a presença do branco do MBD (vermelho).

A emetina (**77**) foi anotada nos extratos obtidos de cultivos em 7, 14, 21 e 35 dias, com cosseno de 0,91, e dados da literatura classificados como *gold*. Esse composto é um alcaloide presente em várias famílias de plantas como Rubiaceae, Alangiaceae e Icacinaceae. A raiz da planta *Psychotria ipecacuanha* Stokes (Rubiaceae) é uma das principais fontes da emetina e pode ser encontrada nas regiões de Mata Atlântica no sudeste do Brasil (SAKINBOYE; BAKARE, 2011). No recente estudo de Kumar *et. al.* (2021), a emetina também apresentou uma potencial atividade anti-SARS-CoV-2 (KUMAR *et. al.*, 2021).

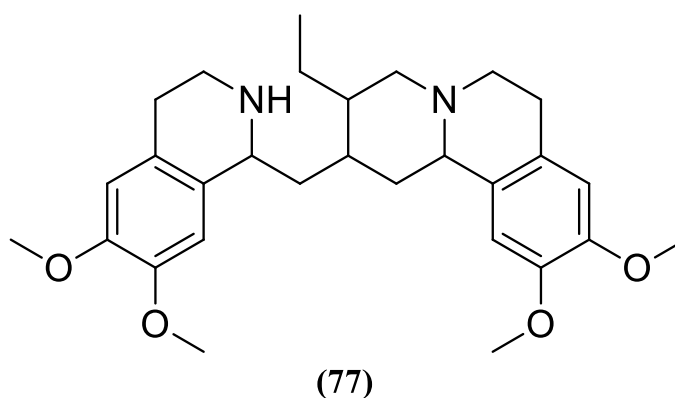


Figura 33 – Estrutura da emetina.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

A **Figura 34** demonstra alta similaridade entre os sinais experimentais e da literatura, assim como o valor de cosseno. Os sinais de menor intensidade, bem próximos a linha de base estão ausentes no espectro experimental ocasionando esse valor de cosseno 0,91.

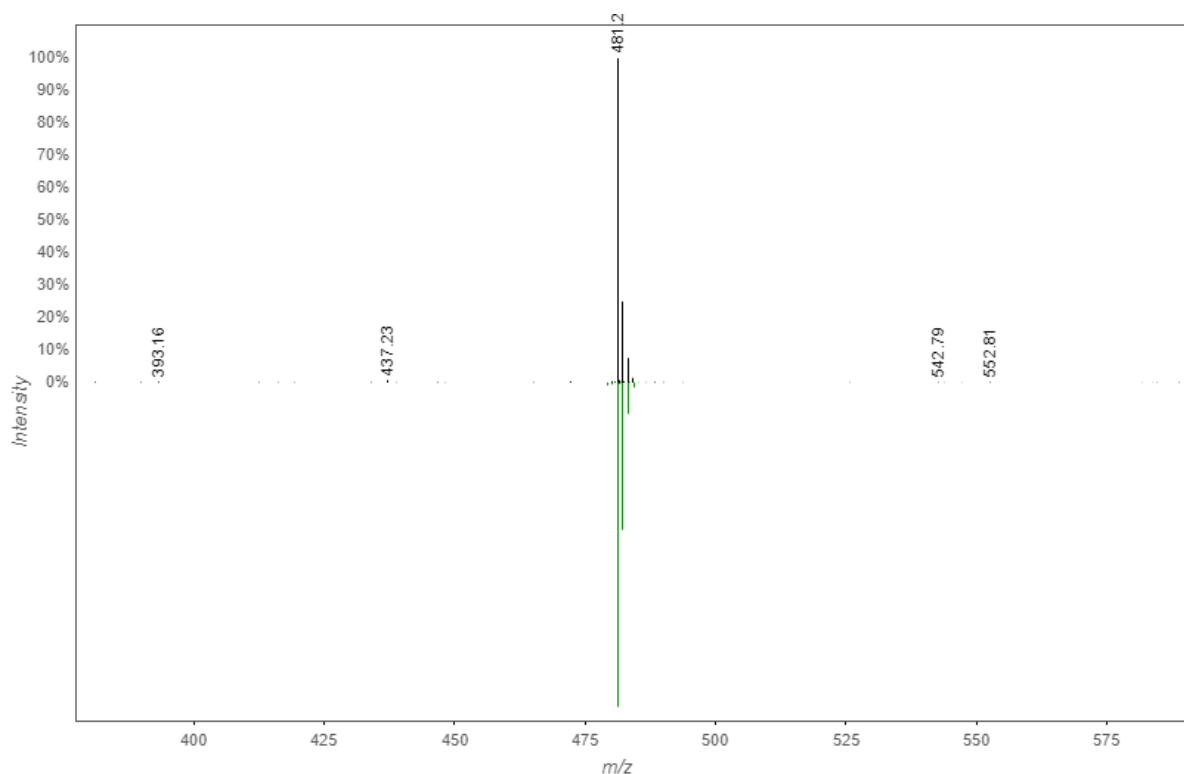


Figura 34 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental da emetina.

Fonte: Adaptado de Wang *et. al.* (2016).

O isoflavonoide genisteína (**78**) também foi identificado nos extratos obtidos com períodos de cultivo de 7, 14, 21 e 35 dias, com cosseno de 0,72 e dados da literatura classificados como *bronze*. A inclusão de genisteína na dieta apresenta vários potenciais benéficos relatados na literatura, como a quimioprevenção do câncer de mama e próstata, doenças cardiovasculares e doenças pós-menopausa (DIXON; FERREIRA, 2002).

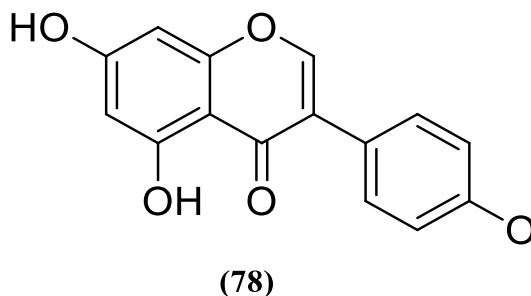


Figura 35 – Estrutura da genisteína.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

A genisteína apresentou um valor de cosseno de 0,72, pois a comparação dos espectros de massas, **Figura 36**, mostra a ausência de alguns sinais, de menor intensidade, na região de m/z 175 no espectro experimental.

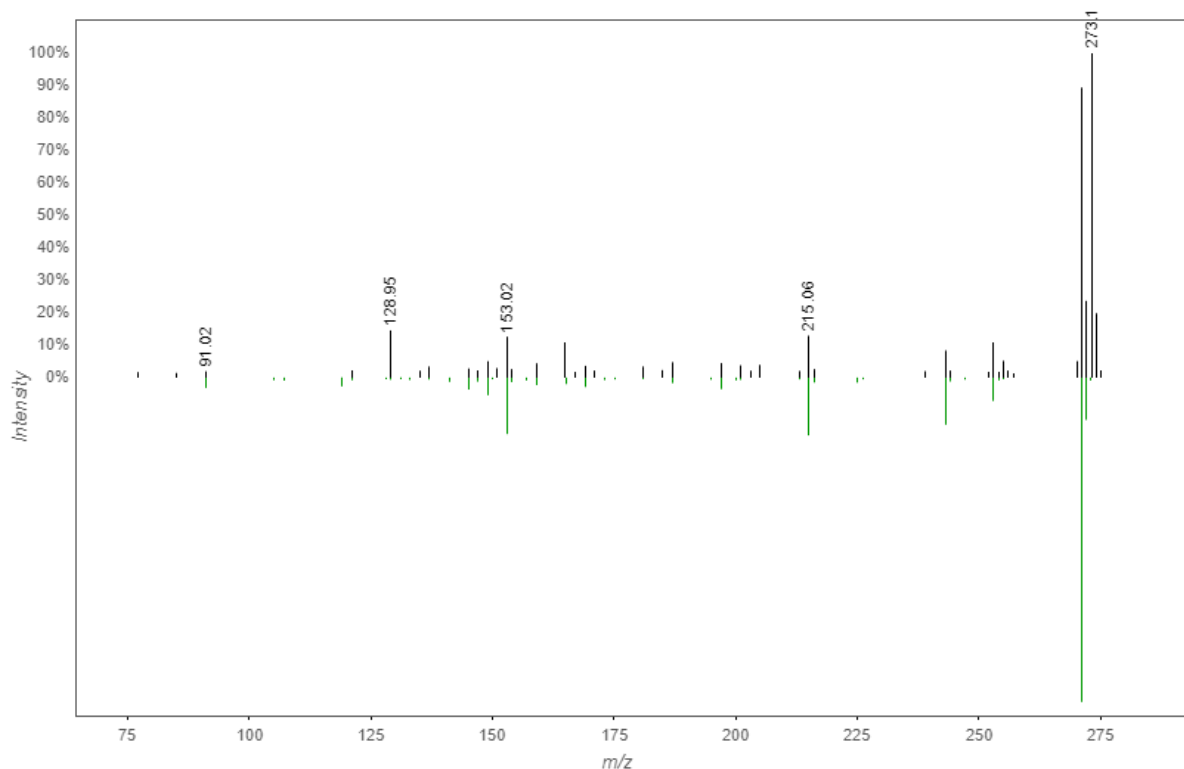
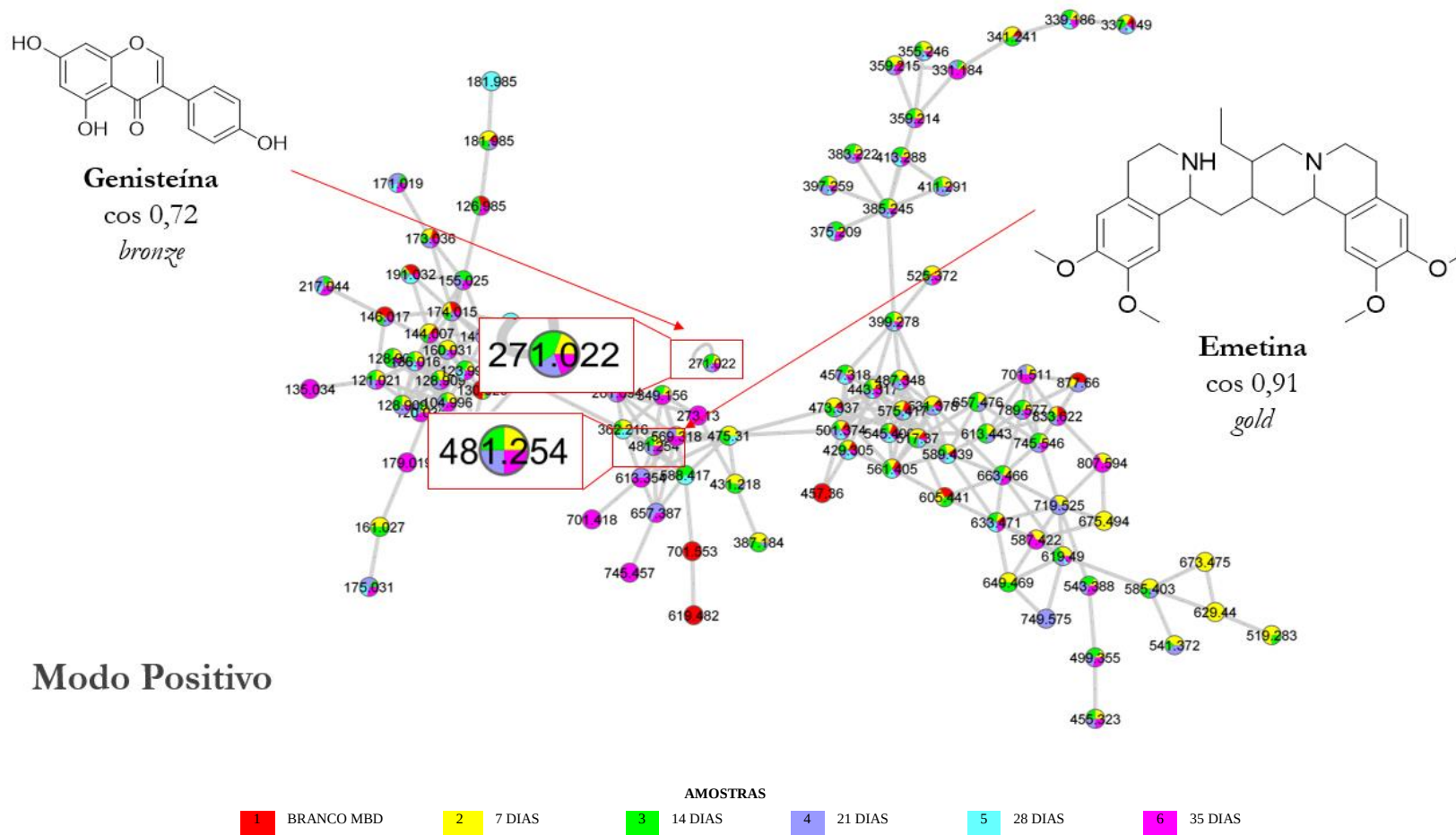


Figura 36 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental do composto genisteína.

Fonte: Adaptado de Wang *et. al.* (2016).

Na ampliação da rede molecular do perfil químico no modo positivo, **Figura 37**, pode-se observar em qual cluster está localizada as substâncias anotada pela plataforma do GNPS e em qual extrato estão presentes.



A **Figura 38** apresenta a rede molecular do modo negativo ⁵é constituída de 109 nodos retratados em 6 cores diferentes dependendo da contribuição de cada extrato.

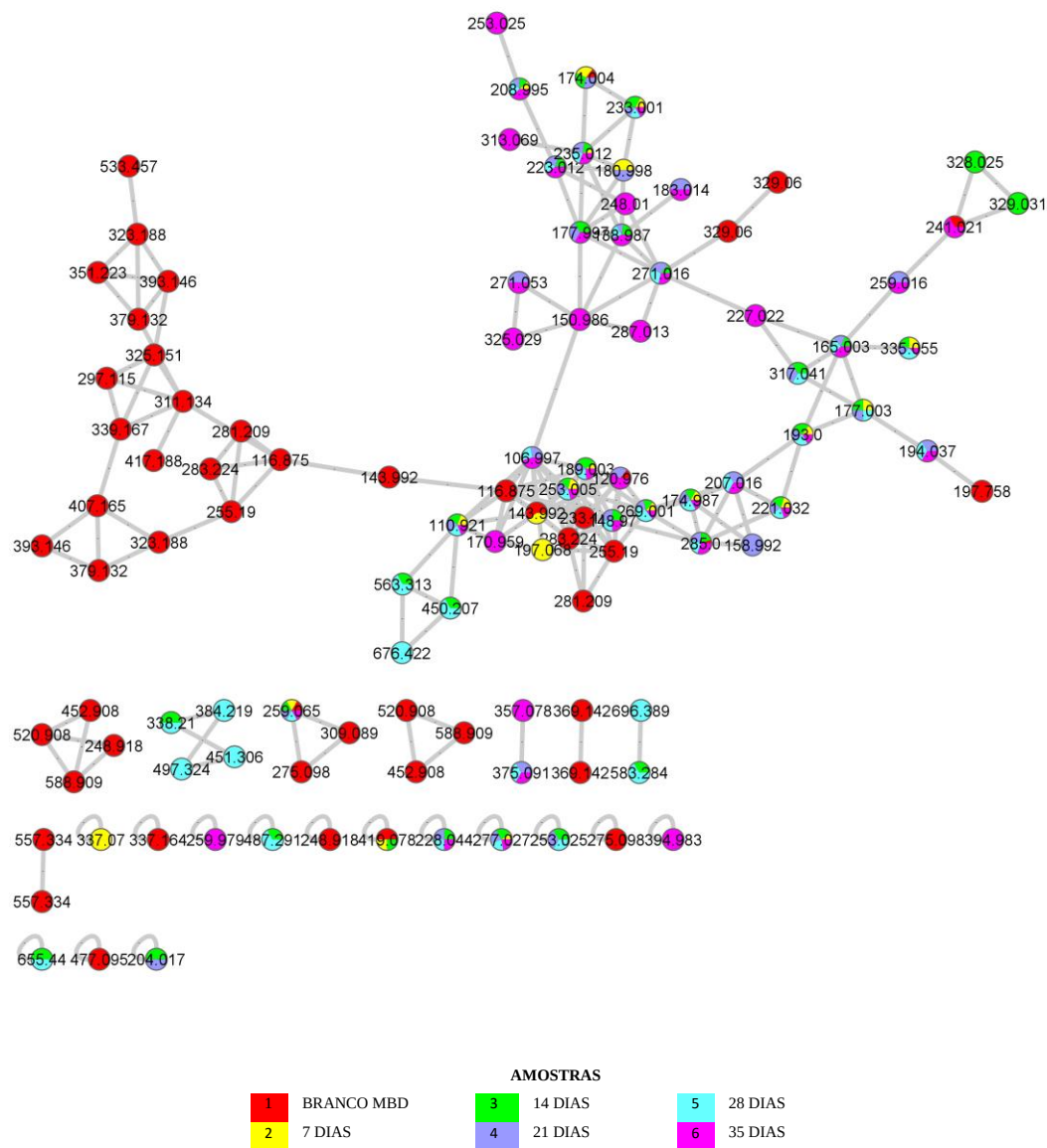
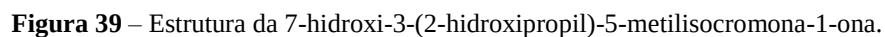


Figura 38 – Rede molecular calculada para os dados de UPLC-MS/MS das amostras dos extratos do fungo *Hypoxylon investiens* crescido em MBD nos períodos de 7 dias (amarelo), 14 dias (verde), 21 dias (roxo), 28 dias (azul), 35 dias (rosa) e controle do meio líquido (vermelho) no modo negativo.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

⁵ PERFIL químico meio líquido de MBD: modo negativo. **GNPS**, 21 de set de 2021. Disponível em: https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/result.jsp?task=d534480cf8104a829617794a51d25f41&view=view_all_annotations_DB. Acessado em 01 de jun de 2022.

No modo negativo identificou o composto 7-hidroxi-3-(2-hidroxipropil)-5-metilisocromona-1-ona (**79**) também foi identificado no modo negativo para os extratos de 7, 14, 21, 28 e 35 dias com cosseno de 0,76 e com dados da literatura classificados como *gold*. O estudo de Wang *et. al.* (2012) isolou esse composto do fungo *Ulocladium* sp. e também relatou uma fraca atividade contra *Candida albican* (WANG *et. al.*, 2012).



A **Figura 40** mostra uma alta diferença entre os sinais de menor intensidade dos dois espectros, justificando o valor de cosseno é 0,76, entretanto é possível observar que os sinais de maior intensidade possuem correspondência entre os espectros.

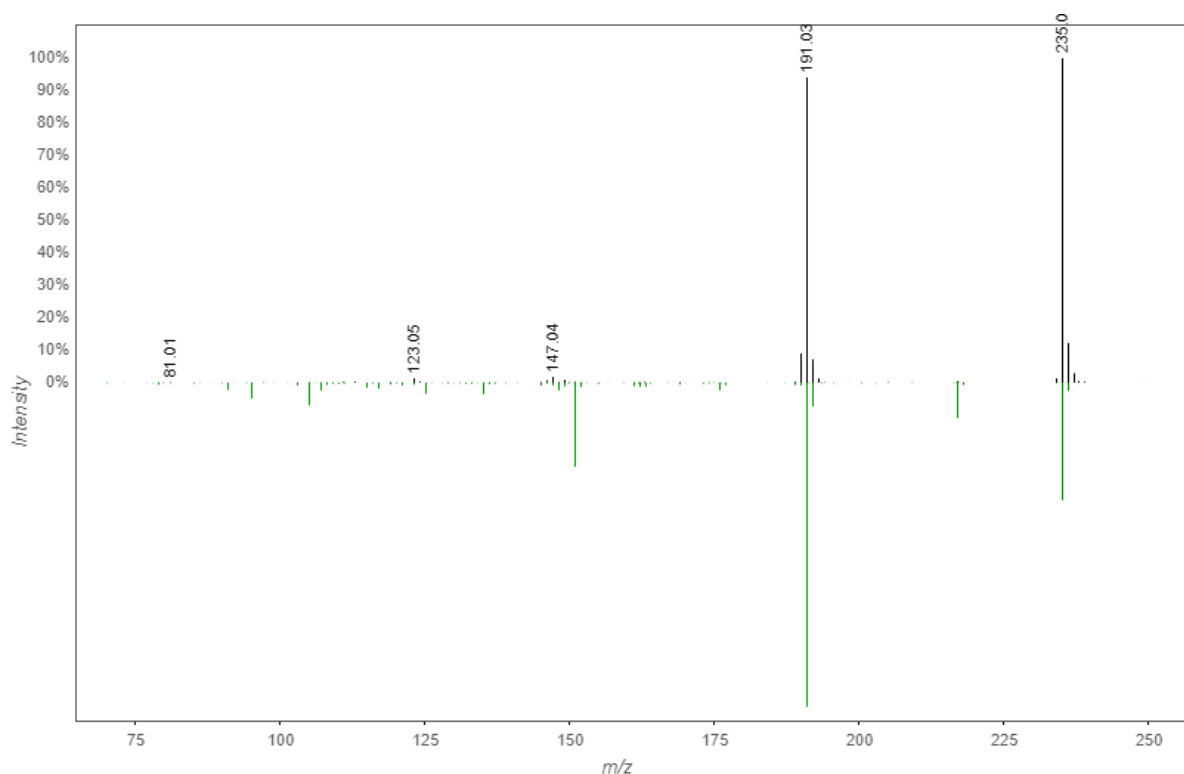


Figura 40 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental do composto 7-hidroxi-3-(2-hidroxiopropil)-5-metilisocromona-1-ona.

Fonte: Adaptado de Wang *et. al.* (2016).

O ácido fenilglioxílico (**80**) foi identificado para extratos de 14, 21, 28 e 35 dias com cosseno de 0,92 e com dados da literatura classificados como *bronze*. He *et. al.* (2012) relatam que o ácido fenilglioxílico é um intermediário importante para agentes anti-hipertensivos (HE *et. al.*, 2012).

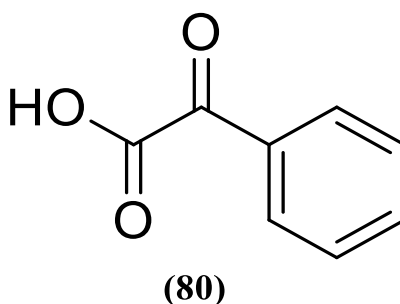


Figura 41 – Estrutura do ácido fenilglioxílico.

Fonte: Adaptado de Wang *et. al.* (2016).

A **Figura 42** assim como o valor de cosseno mostram a alta similaridade entre os espectros, diferenciando-os apenas por uma defasagem entre os sinais de m/z 0,12.

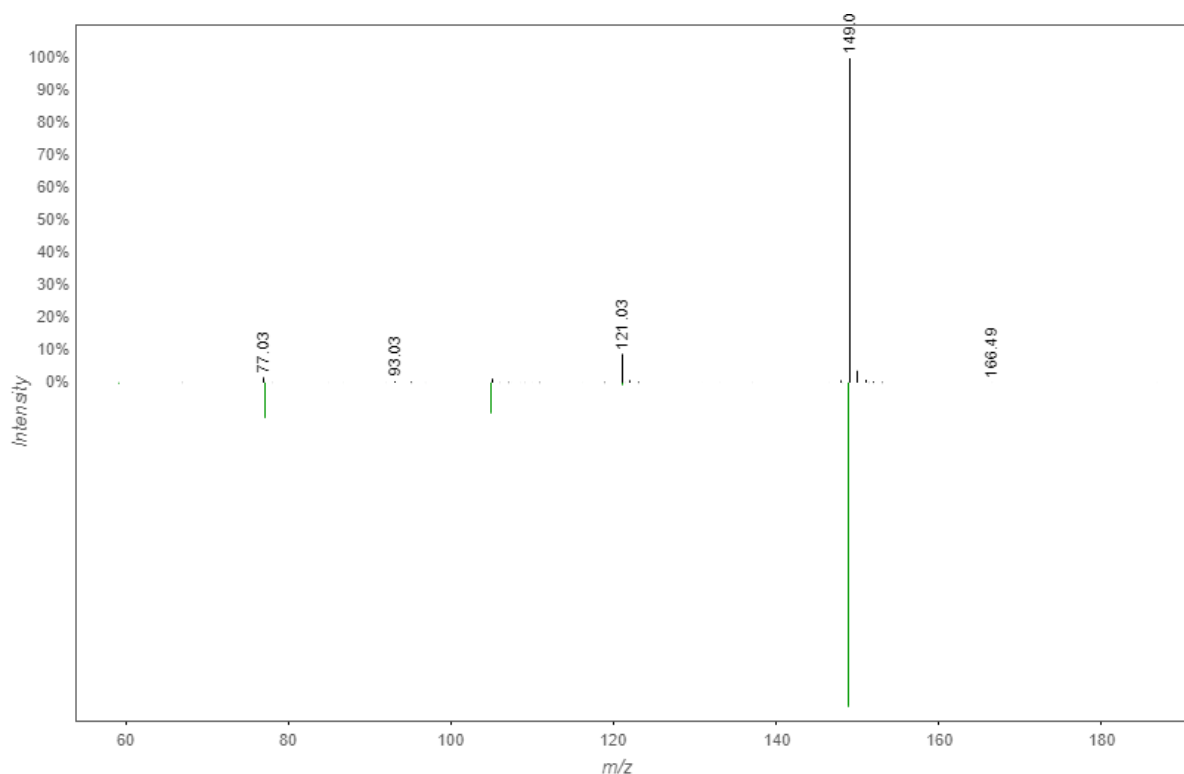


Figura 42 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental do composto ácido fenilglioxílico.

Fonte: Adaptado de Wang *et. al.* (2016).

O resveratrol (**81**) foi identificado apenas no extrato de 35 dias de tempo de cultivo, e com cosseno de 0,75, e com dados da literatura classificados como *bronze*. É um composto que possui vários benefícios para saúde incluindo atividade anticâncer, anti-inflamatória, antidiabética, anti-idade e com prevenção a doenças cardiovasculares e pode ser encontrado em diversas frutas, vegetais e em amendoim (RAUF *et. al.*, 2017). Essa substância foi isolada anteriormente de várias fontes de fungos endofíticos da planta *Vitis vinífera*, como fungos do gênero *Lasiodiplodia*, *Arcopilus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Botryphaeria* (ABDEL-HADI *et. al.*, 2022).

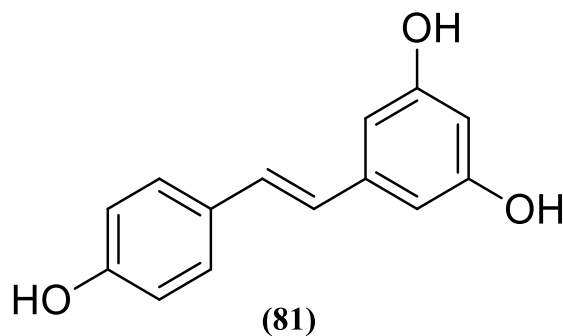


Figura 43 – Estrutura do resveratrol.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

A **Figura 44** mostra a similaridade entre o espectro experimental e da biblioteca, apresentando a correspondência dos sinais de maior intensidade com a diferença e ausência de alguns sinais de média e menor intensidade, resultando assim em um cosseno menor.

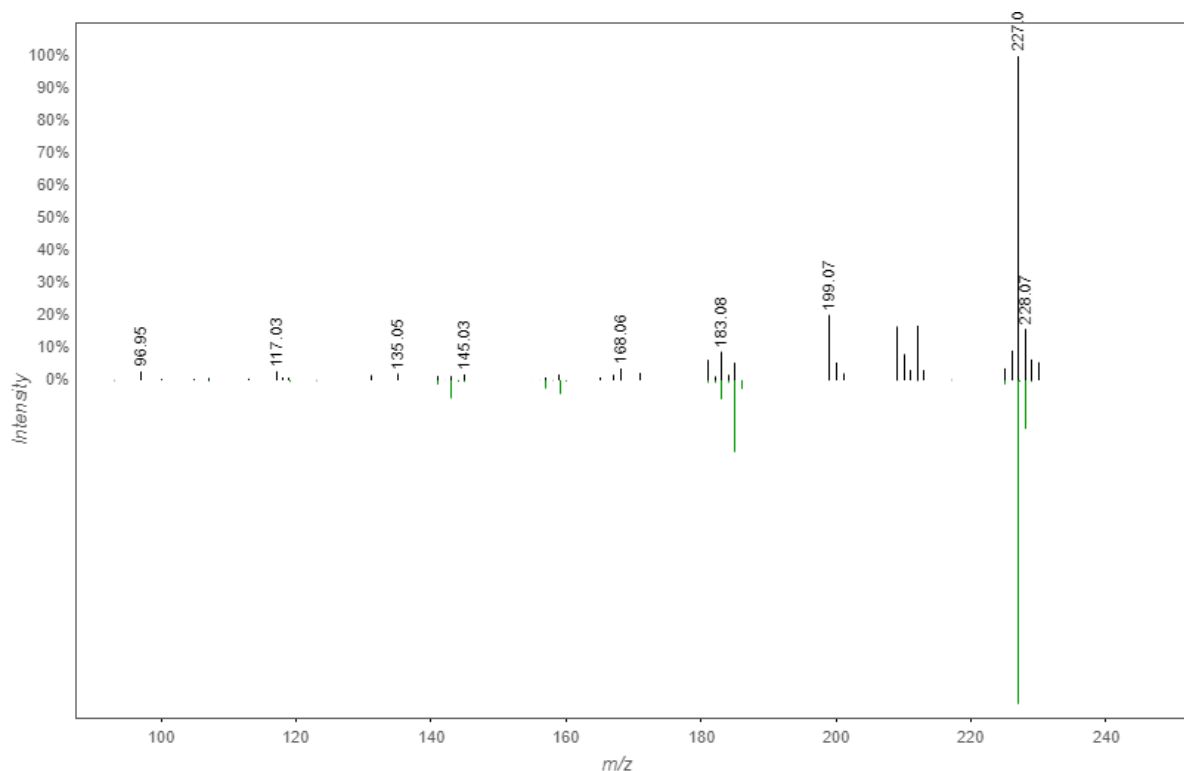


Figura 44 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental do composto resveratrol.

Fonte: Adaptado de Wang *et. al.* (2016).

Na ampliação da rede molecular do perfil químico no modo negativo, **Figura 45**, pode-se observar em qual nodo está localizada cada substância e em qual extrato foram anotadas.

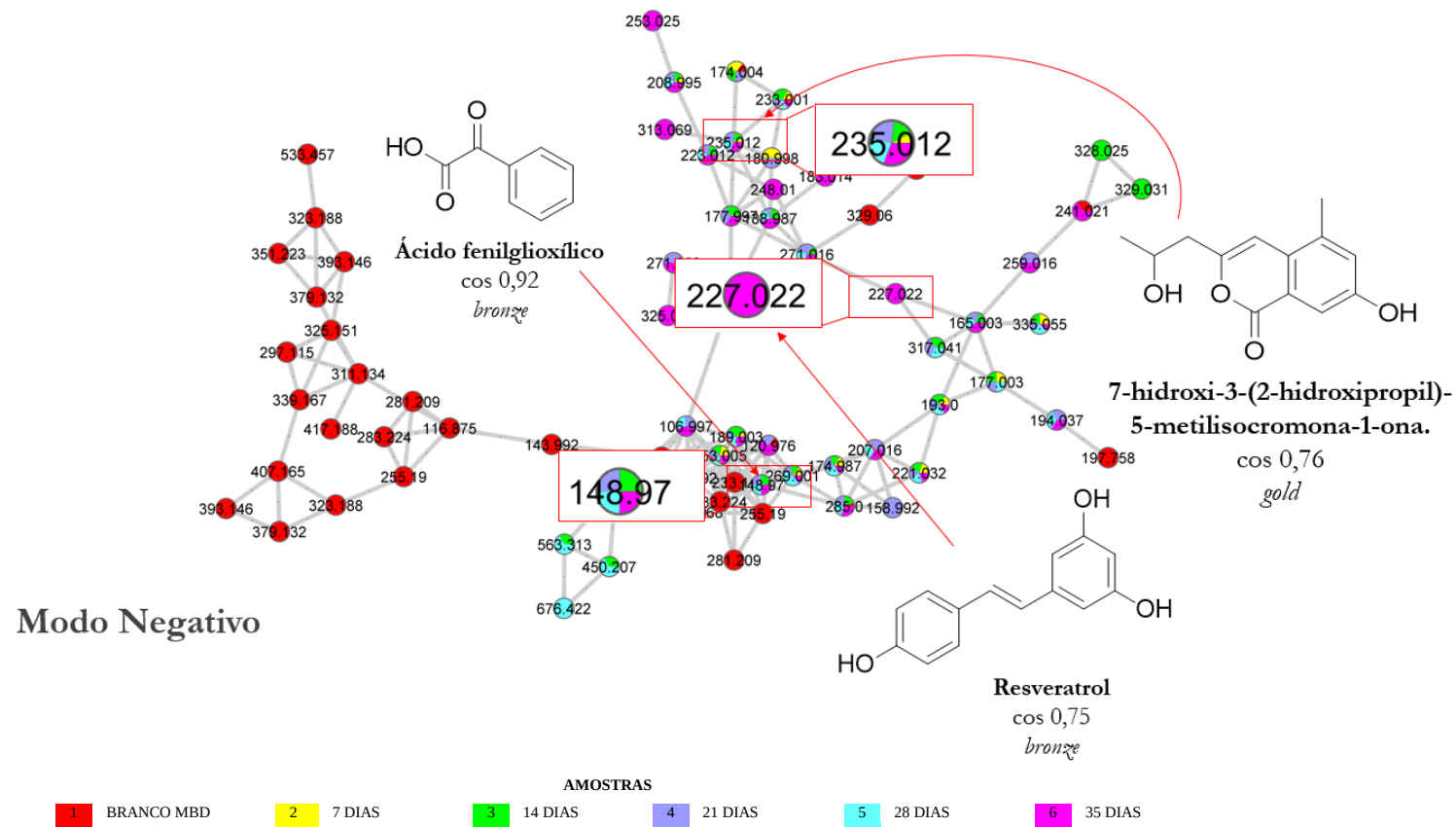


Figura 45 – Ampliação do cluster da rede molecular calculada para os dados de UPLC-MS/MS das amostras dos extratos do fungo *Hypoxylon investiens* crescido em MBD nos períodos de 7 dias, 14 dias, 21 dias, 28 dias, 35 dias no modo negativo.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

Os períodos de cultivo que mais apresentaram nodos e identificação de estruturas pela plataforma do GNPS foram os de 14, 21 e 35 dias no modo positivo, entretanto no modo negativo também foi evidenciado que o extrato de 28 dias estava presente em vários nodos e que as estruturas anotadas nele tinham um valor de cosseno alto e intermediário. Para uma melhor escolha do período de cultivo do fungo endofítico decidiu-se analisar os dados de CLAE-DAD.

4.2.2. Análise por CLAE-DAD

Os extratos de 7, 14, 21, 28 e 35 dias foram analisados por CLAE-DAD no mesmo comprimento de onda ($\lambda = 230$ nm) e seus perfis cromatográficos demonstraram uma variedade interessante de metabólitos, cujas bandas cromatográficas na região de 41 e 37 min mostraram redução de intensidade após 21 dias de incubação do fungo enquanto as bandas na região de 40,11 e 39,46 min apresentaram uma maior intensidade, como demonstrado na **Figura 46**, o que possivelmente indica consumo de alguns dos metabólitos produzidos anteriormente.

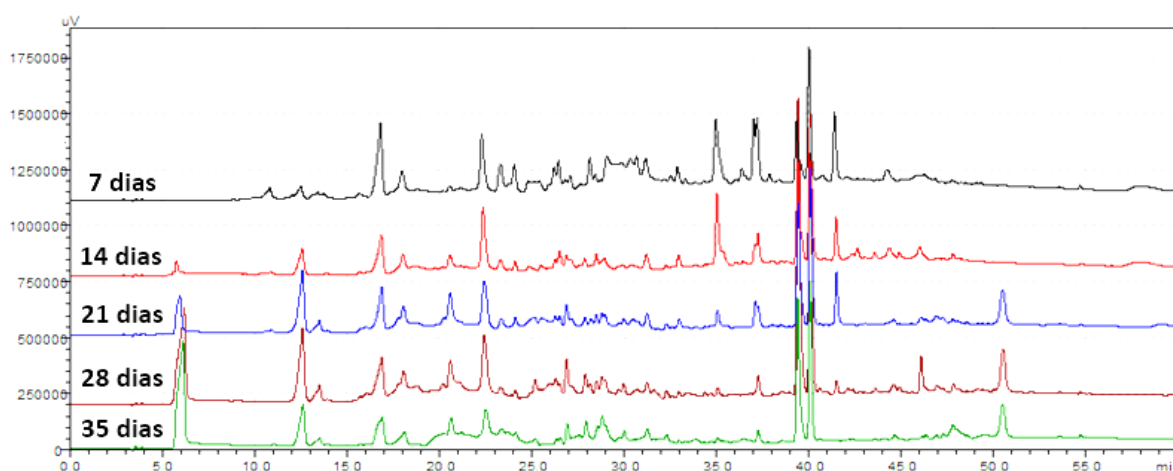


Figura 46 – Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos bruto em AcOEt da curva de crescimento do fungo *H. investiens* em 230 nm. Luna Phenomenex® C₁₈, (250 x 4,60 mm), 5 μ m; **Solvente A:** H₂O; **Solvente B:** MeOH. **Grad. Exp.:** 5-100% de B em 50 min.; 1,00 mL.min⁻¹.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

Todos os extratos obtidos dessa espécie fúngica apresentam dois sinais de maior intensidade ($t_R = 40,11$ e $39,46$ min) com o perfil de absorção no UV-vis apresentados na **Figura 47** e **Figura 48**. O sinal com tempo de retenção de 40,11 min apresenta o mesmo perfil de UV-vis do BNT isolado por Lee *et.al.* (2019) e isolado anteriormente de gêneros *Hypoxylon*.

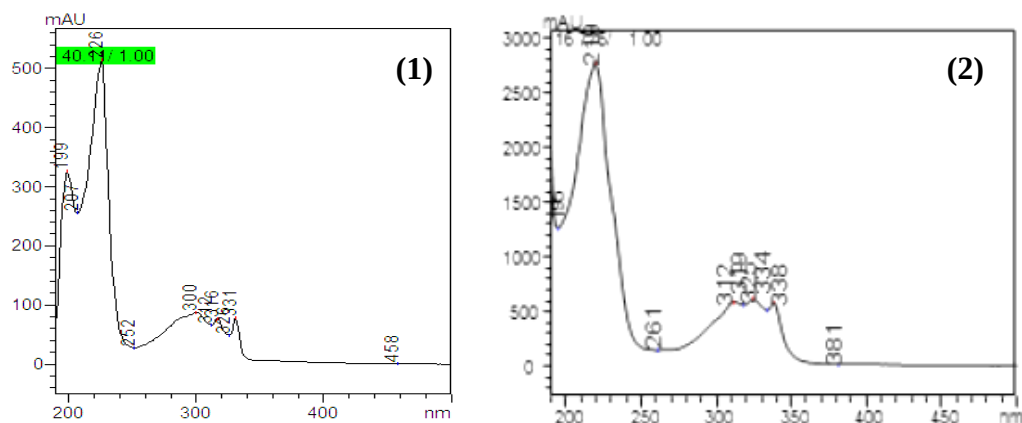


Figura 47 – Espectro de UV-vis com tempo de retenção de 40,11 min do extrato obtido do cultivo em meio líquido de PDB (1) e espectro UV-vis do composto BNT isolado por Lee *et. al.* (2019).

Fonte: (1) Elaborada pela Autora (2022) e (2) Lee *et. al.* (2019).

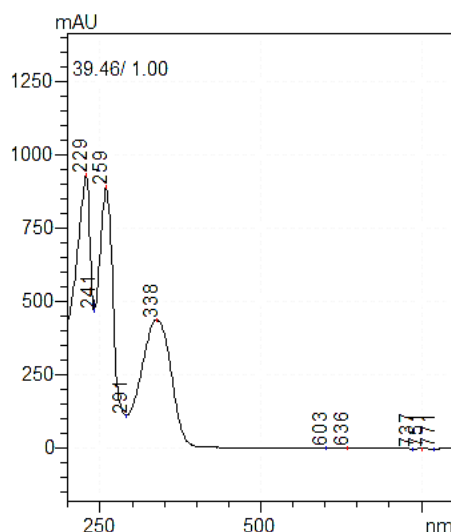


Figura 48 – Espectro do UV-vis com tempo de retenção de 39,46 min do extrato de meio líquido de MBD.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

O extrato bruto de 28 dias, apesar de indicar uma menor produção de extrato que o de 21 dias, ele apresenta uma maior intensidade dos picos em 39,46 min e 40,11 min e uma mesma produção de metabólitos secundários. Sendo assim para dar continuidade ao projeto escolheu-se o meio de 28 dias para o cultivo em larga escala, uma vez que esse apresentou uma significativa quantidade de compostos identificados pelo GNPS e a análise por CLAE-DAD identificou uma maior intensidade dos sinais que estão presente em todos os períodos de cultivo.

4.3. Análise do extrato obtido de cultivo em larga escala

O cultivo em larga escala foi feito em 28 dias e em um total de 180 Erlenmeyers. Devido à elevada quantidade de frascos, o cultivo foi separado em 4 dias e em cada dia foram preparados 45 frascos com meio + fungo, obtendo assim o total esperado para a larga escala. Após o período de crescimento armazenou-se separadamente o material produzido em cada etapa do cultivo em larga escala, obtendo as massas presentes na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Massas obtidas dos extratos brutos de cada dia do cultivo em larga escala.

Extrato	Massa (mg)
Ext. AcOEt (I)	694,50
Ext. AcOEt (II)	909,40
Ext. AcOEt (III)	929,80
Ext. AcOEt (IV)	1225,90

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

4.3.1. Análise por CLAE-DAD

Os extratos obtidos em cada etapa da larga escala foram analisados por CLAE-DAD para a observar o perfil químico e através da análise constatou-se que os extratos possuem o mesmo comportamento, sendo assim foi possível a junção de todos eles. Os cromatogramas podem ser observados na **Figura 49**.

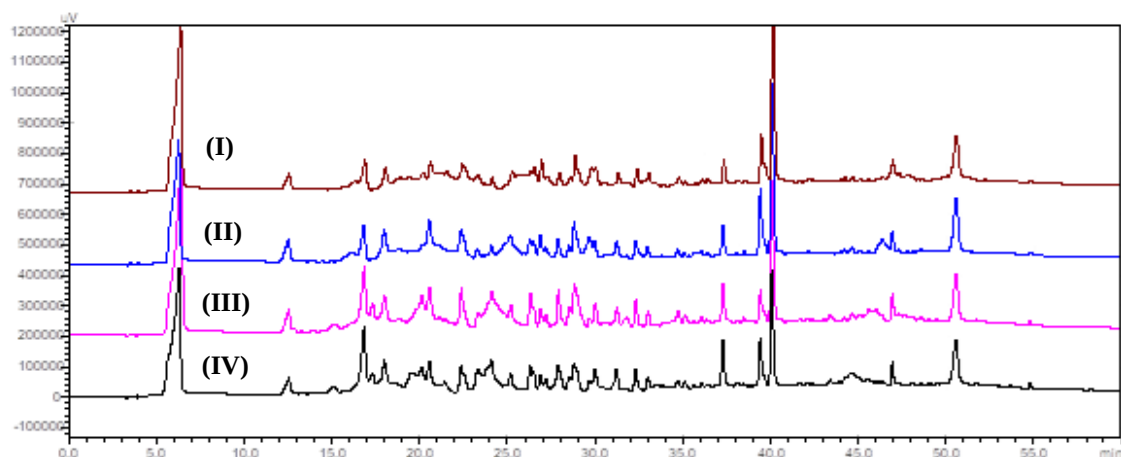


Figura 49 – Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos bruto dos cultivos em larga escala em 230 nm. Luna Phenomenex® C₁₈, (250 x 4,60 mm), 5µm; **Solvente A:** H₂O; **Solvente B:** MeOH. **Grad. Exp.:** 5-100% de B em 50 min.; 1,00 mL.min⁻¹.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

A análise dos cromatogramas mostrou perfis químicos iguais, permitindo a junção das amostras para obter uma massa de 3,759 g para o fracionamento em coluna e para as frações. Após juntar todos os extratos, analisou-se novamente por CLAE-DAD, **Figura 50**.

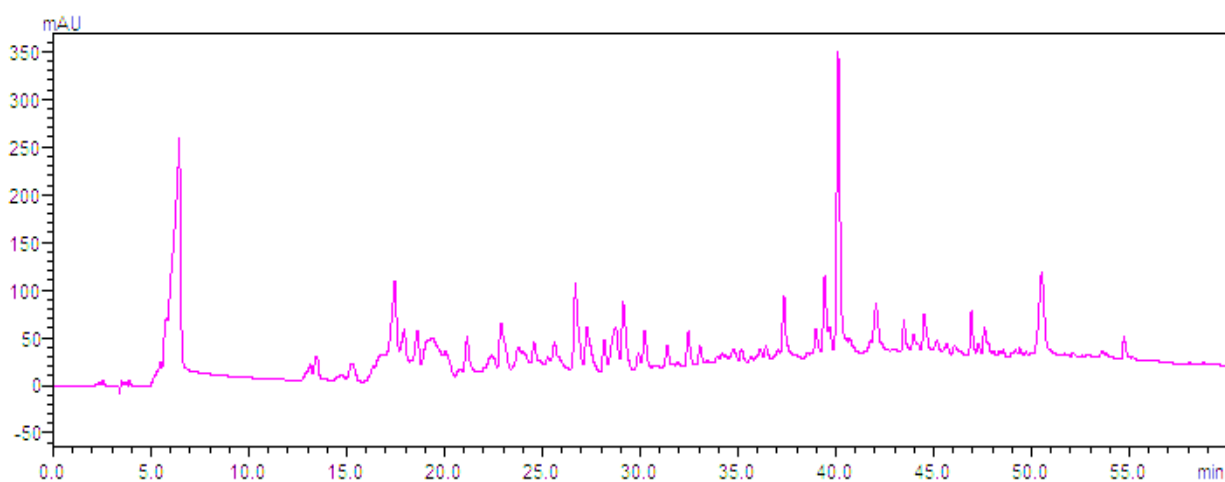


Figura 50 – Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto do cultivo em larga escala em 230 nm. Luna Phenomenex® C₁₈, (250 x 4,60 mm), 5µm; **Solvente A:** H₂O; **Solvente B:** MeOH. **Grad. Exp.:** 5-100% de B em 50 min.; 1,00 mL.min⁻¹.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

4.4. Fracionamento do extrato bruto

Para o fracionamento utilizou-se uma amostra de 3,5 g de extrato bruto e uma coluna de vidro empacotada com fase reversa (C₁₈), resultando em dez frações as quais para a análise da diversidade da produção metabólica foram analisados por UPLC-MS/MS e os dados inseridos na plataforma do GNPS.

4.4.1. Análise das anotações da plataforma do GNPS

A **Figura 51** apresenta a rede molecular do modo positivo ⁶é constituída de 1565 nodos, esses estão retratados com gráficos de pizza pintados de 12 cores diferentes dependendo da contribuição de cada fração e meio de MBD.

⁶ CULTIVO em larga escala: modo positivo. **GNPS**, 25 de out de 2021. Disponível em: https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/result.jsp?task=22e989a2e7c2453d91d306cc2678137d&view=view_all_annotations_DB. Acessado em: 01 jun. 2022.

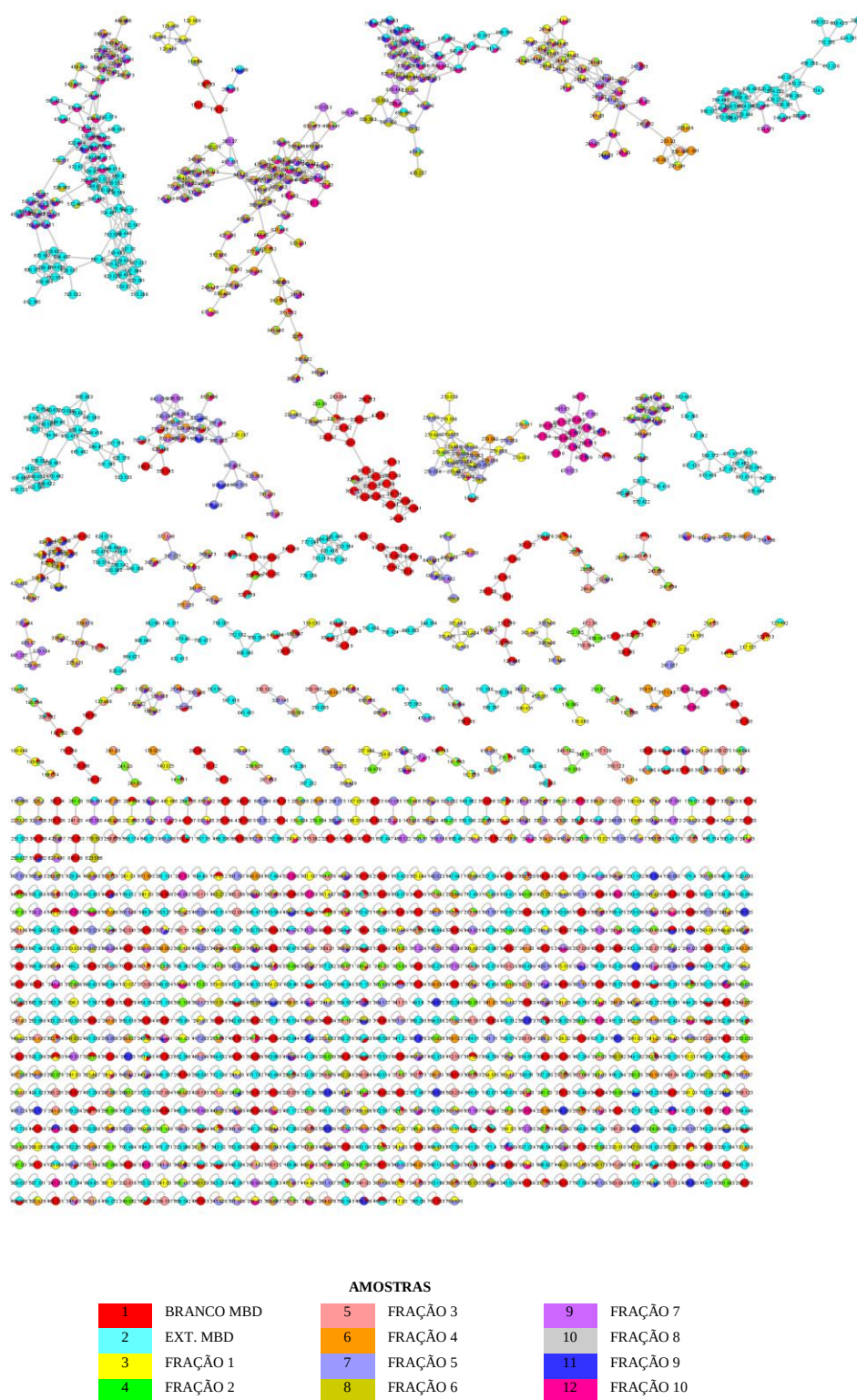


Figura 51 – Rede molecular calculada para os dados de UPLC-MS/MS das amostras dos extratos do fungo *Hypoxylon investiens* crescido em MBD e as frações 1-10 e o branco do meio líquido de PDB no modo positivo.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

A rede molecular no modo positivo apresenta maior quantidade de nodos e de clusters formados. Além disso, pode-se observar que a maior parte dos clusters são constituídos de nodos heterogêneos, apresentam mais de uma coloração. Os nodos com a presença do branco de MBD (vermelho) foram descartados durante as análises das redes moleculares.

A lista gerada pelo GNPS com possíveis compostos presentes no extrato e nas frações também foi analisada e observou-se que as frações 4, 5 e 6 apresentaram um maior número de compostos com valor de cosseno alto e intermediário. Alguns desses estão listados abaixo e os demais compostos listados pela plataforma do GNPS encontram-se em **Apêndice A e B**.

A emetina, **Figura 33**, um dos compostos identificado nos extratos de 7, 14, 21 e 35 dias e discutido anteriormente também foi detectado para as frações 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 e 10 com cosseno de 0,92 e dados da literatura classificados como *gold*.

A β -ecdisterona (**82**) foi anotada no modo positivo e nas frações 6, 7, 9 e 10 com cosseno de 0,85 e com dados da literatura classificados como *gold*. Esse terpenoide apresenta várias propriedades relatadas como antitumoral, anti-inflamatória e mais recentemente Chen *et. al.* (2017) relataram o potencial antidiabético dessa substância (CHEN *et. al.*, 2017).

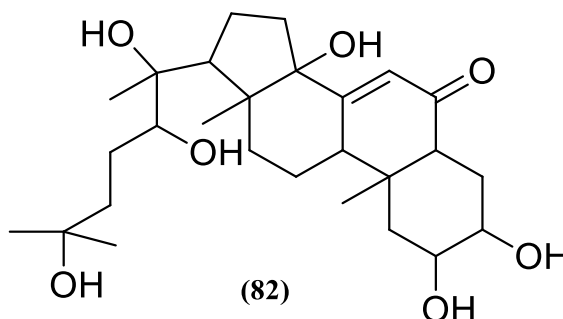


Figura 52 – Estrutura da β -ecdisterona.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

Na **Figura 53** é possível observar que os espectros possuem uma pequena defasagem (m/z 0,02) e também a ausência de alguns sinais de menor intensidade, resultando assim um valor de cosseno de 0,85.

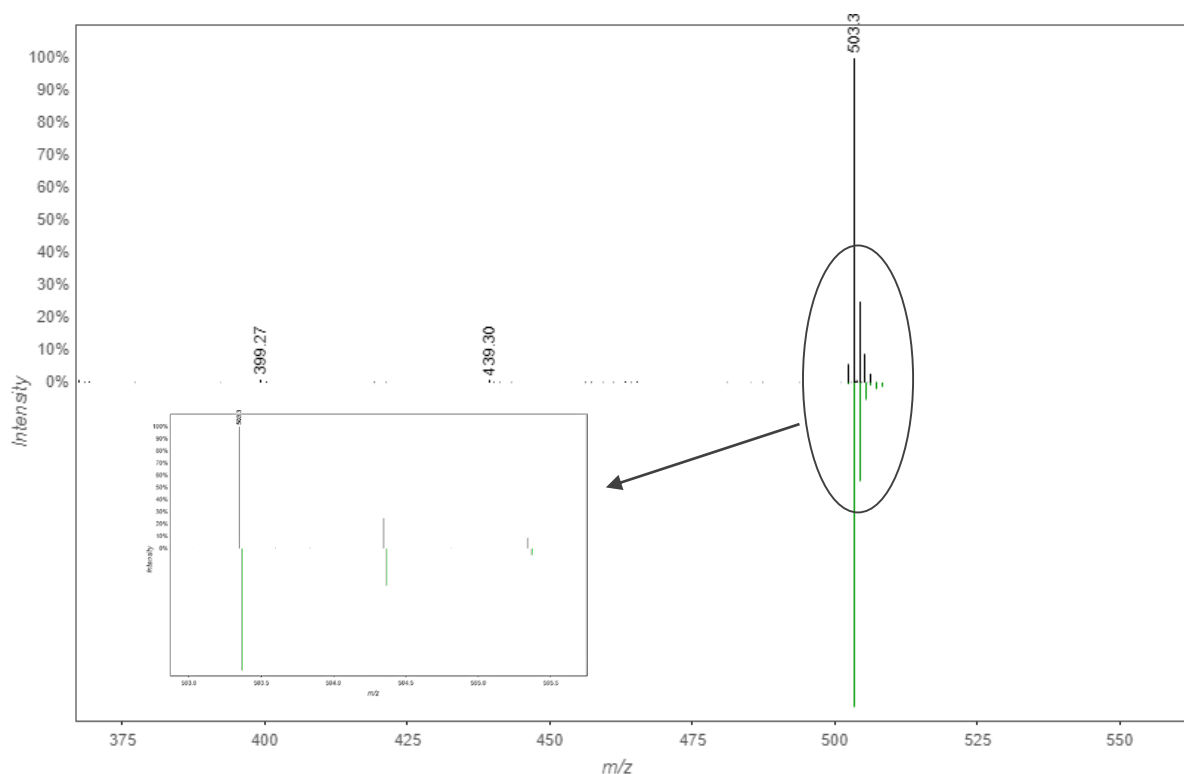


Figura 53 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental da β -ecdisterona.

Fonte: Adaptado de Wang *et. al.* (2016).

O isoflavonóide 5,3',4',5'-tetrametoxi-6,7-metilenodioxisoflavona (**83**) apresenta estudos na literatura com potencial imunoterapêutico e efeito terapêutico para doença de Parkinson (ZHANG *et. al.*, 2021). Essa estrutura foi anotada para as frações 3, 5 e 6 com cosseno de 0,76 e dados da literatura classificados como *gold*.

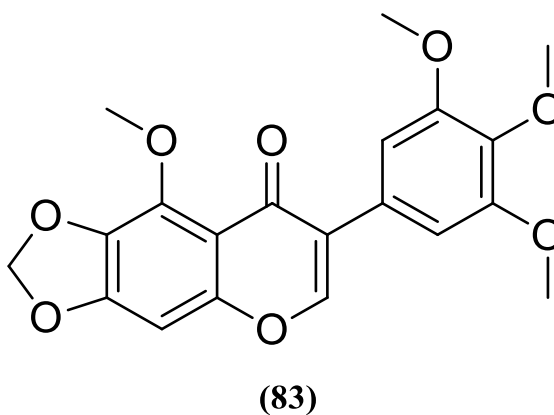


Figura 54 – Estrutura da 5,3',4',5'-tetrametoxi-6,7-metilenodioxisoflavona.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

Na comparação dos espectros de massas (**Figura 55**) é possível observar que o espectro experimental possui todos os sinais de maior intensidade, entretanto com uma defasagem de 0,11 m/z . Também nota-se a ausência de alguns sinais de menor intensidade como na região de 393 m/z , resultando assim no valor de cosseno de 0,76.

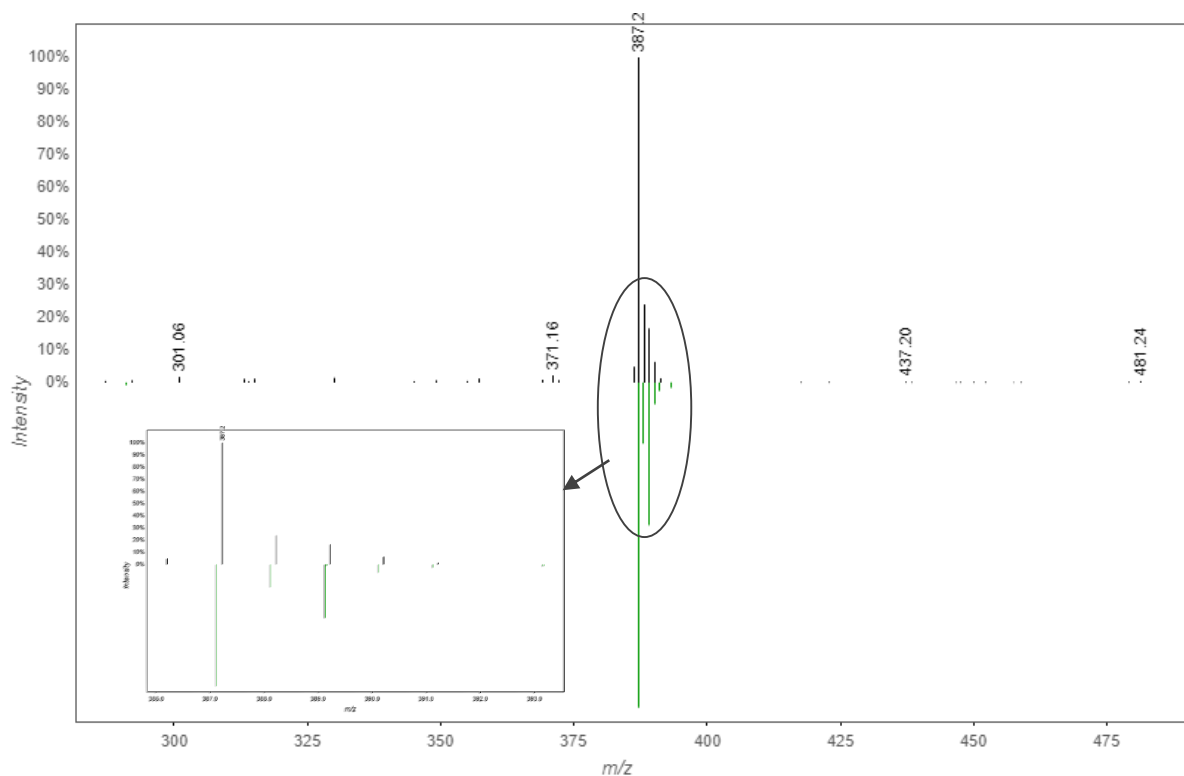


Figura 55 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental do 5,3',4',5'-tetramethoxy-6,7-methylenedioxyisoflavone.

Fonte: Adaptado de Wang *et. al.* (2016).

O ginsenosídeo Rg3 (**84**) foi identificado apenas na fração 9 no modo positivo com cosseno de 0,79 e dados na literatura classificados como *gold*. No estudo apresentado por Han *et. al.* (2021), o ginsenosídeo Rg3 foi isolado de *Panax ginseng* C.A. Meyer e relata efeitos neuroprotetores em camundongos com doença de Parkinson, atividade antioxidante, anticâncer e anti-inflamatória.

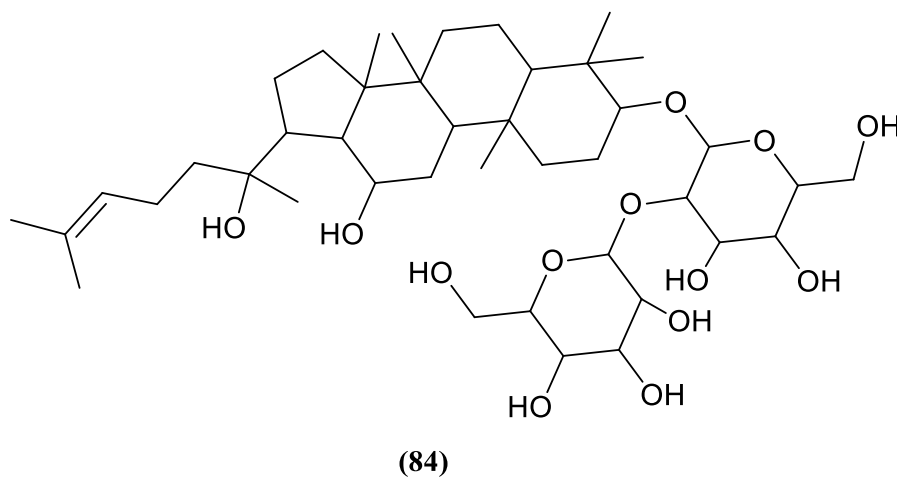


Figura 56 – Estrutura do ginsenosídeo Rg3.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

O valor de cosseno de 0,79 pode ser justificado devido à ausência de alguns sinais na região de m/z 823 e também pela defasagem dos picos de m/z 0,01 como demonstrados na **Figura 57**.

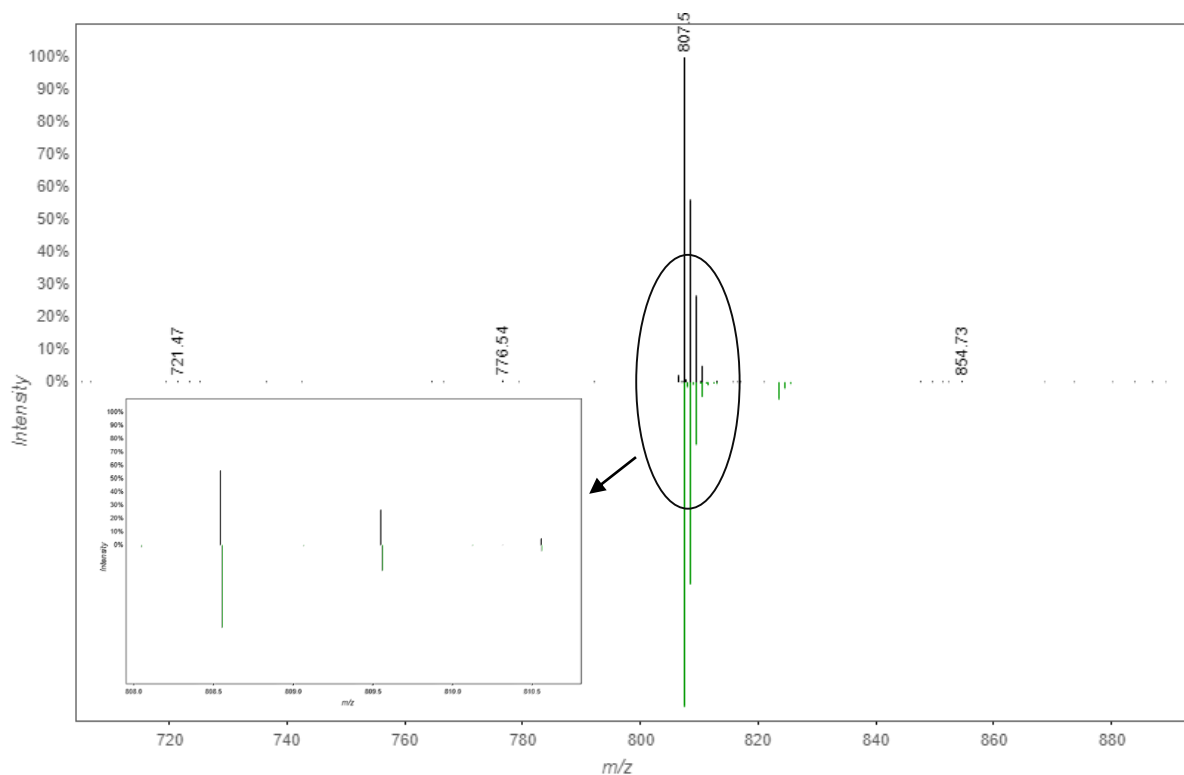
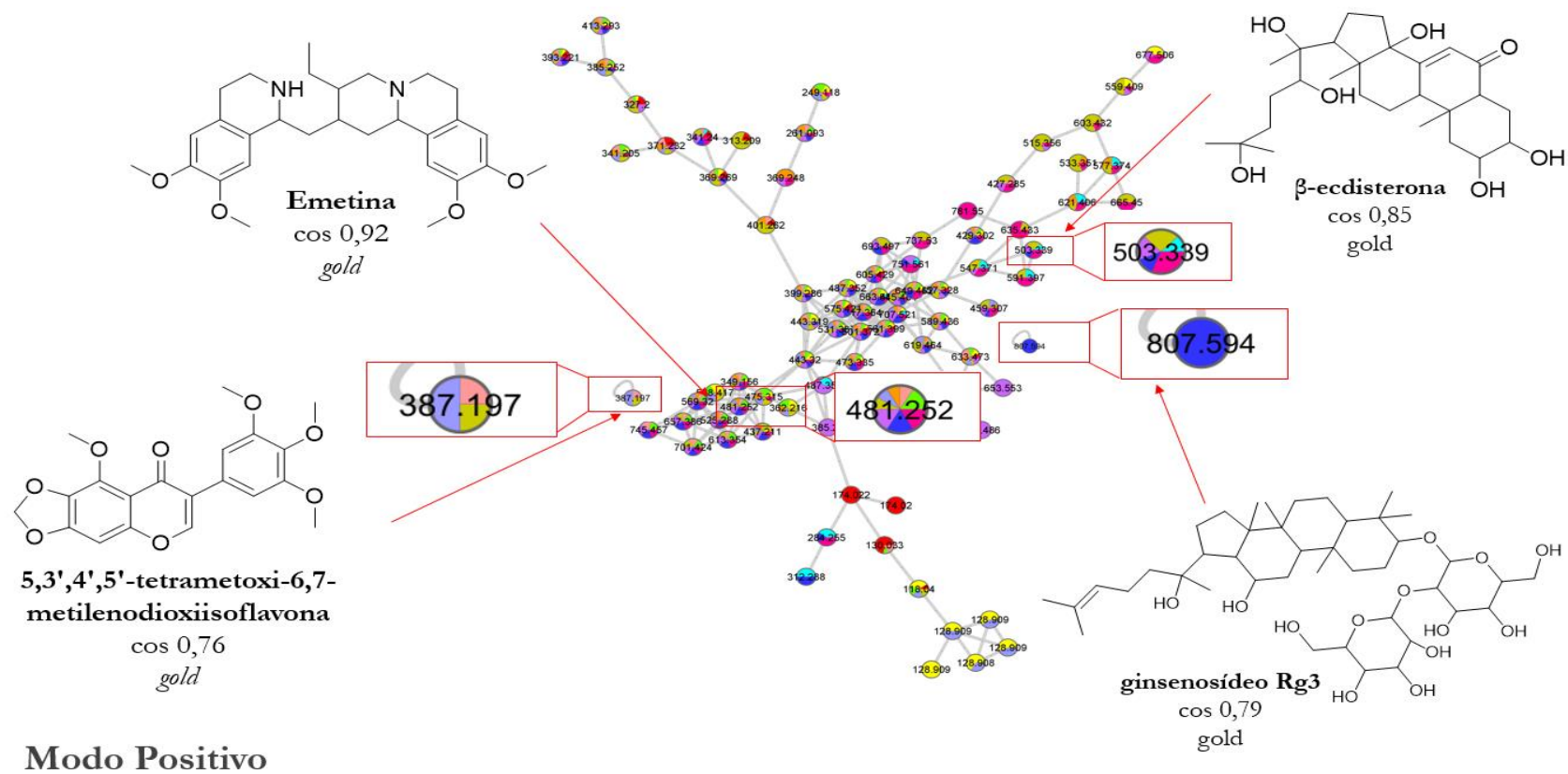


Figura 57 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental do ginsenosídeo Rg3.

Fonte: Adaptado de Wang *et. al.* (2016).

Na ampliação da rede molecular das frações 1-10 no modo positivo, **Figura 58**, pode-se observar em qual cluster está localizada cada substância anotada pela plataforma do GNPS e em qual fração essas estruturas estão presentes.



AMOSTRAS							
1	BRANCO MBD	3	FRAÇÃO 1	5	FRAÇÃO 3	7	FRAÇÃO 5
2	EXT. MBD	4	FRAÇÃO 2	6	FRAÇÃO 4	8	FRAÇÃO 6
						9	FRAÇÃO 7
						10	FRAÇÃO 8
						11	FRAÇÃO 9
						12	FRAÇÃO 10

Figura 58 – Ampliação do cluster da rede molecular calculada para os dados de UPLC-MS/MS das amostras dos extratos do fungo *Hypoxylon investiens* crescido em MBD e as frações 1-10 e o branco do meio líquido de PDB no modo positivo.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

A rede molecular do modo negativo ⁷é constituída de 645 nodos, sendo esses retratados da mesma forma que o modo positivo (**Figura 59**).

⁷ CULTIVO em larga escala: modo negativo. **GNPS**, 25 de out de 2021. Disponível em: https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/result.jsp?task=31e411da21b74e00988972e8a1ca6f45&view=view_all_annotations_DB. Acessado em: 01 jun. 2022.

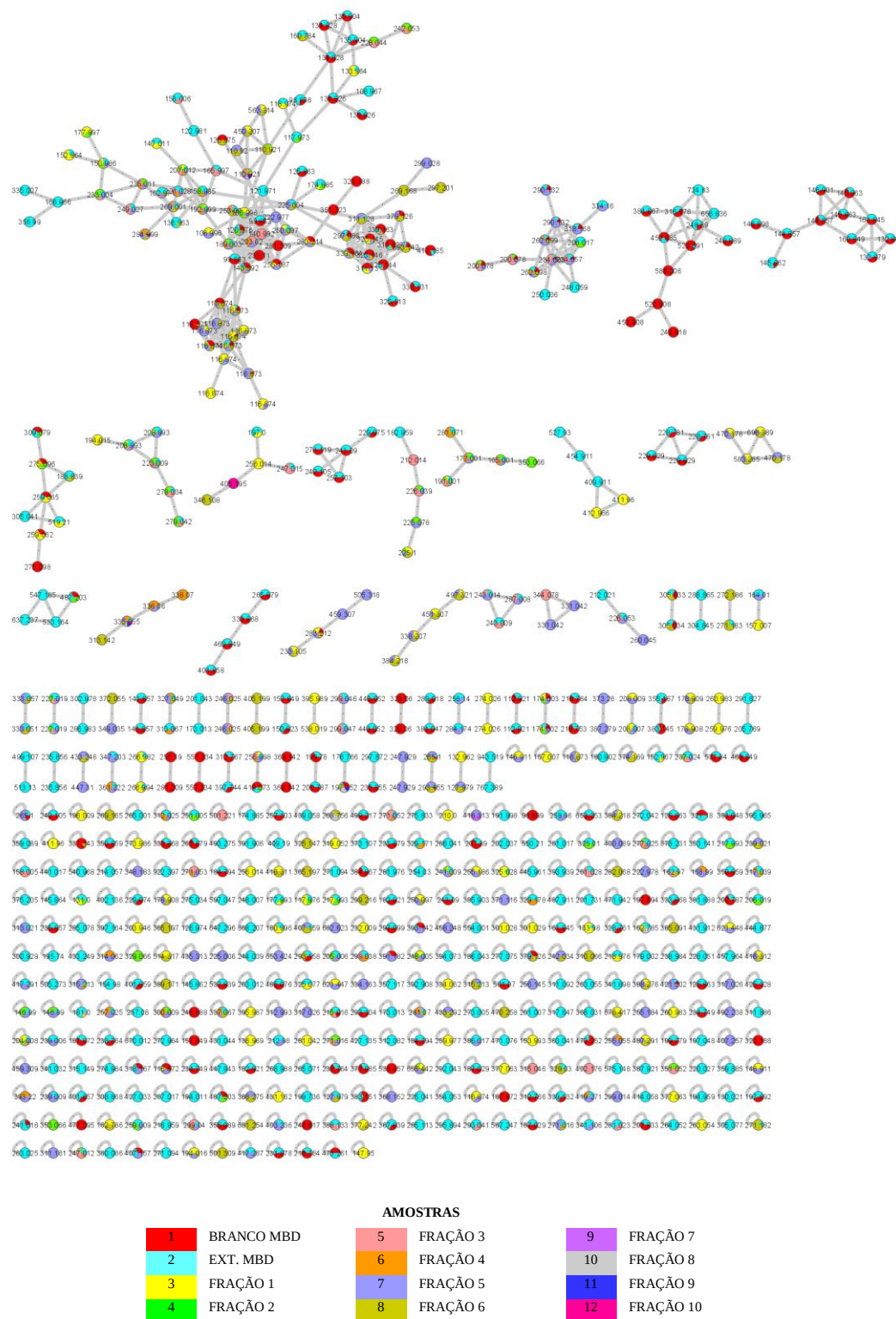


Figura 59 – Rede molecular calculada para os dados de UPLC-MS/MS das amostras dos extratos do fungo *Hypoxylon investiens* crescido em MBD e as frações 1-10 e o controle do meio líquido de MBD no modo negativo.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

Para o modo negativo também foi feita análise similar e constatou-se uma menor quantidade de clusters e a mesma predominância de clusters heterogêneos, presença de vários meios em um nodo. Assim como no modo positivo, as frações 5 e 6 foram as que apresentaram mais estruturas com valores de cosseno alto e intermediário. Alguns desses, considerados mais relevantes foram descritos abaixo e os demais compostos listados no **Apêndice A e B**.

No modo negativo a daidzeína **(85)** foi anotada para as frações 3- 6 com cosseno igual a 0,93 e dados da literatura classificados como *bronze*. A daidzeína é uma isoflavona muito presente na soja e em outras espécies de Fabaceae, e apresenta atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticâncer e inibe a replicação do vírus da hepatite C (HE *et. al.*, 2021).

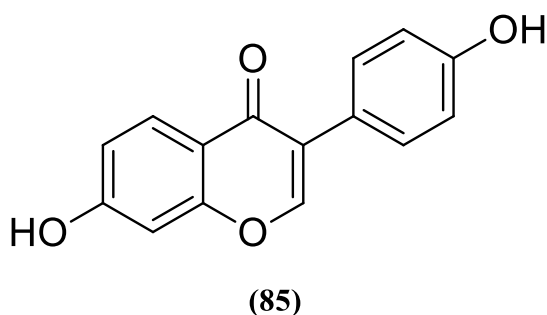


Figura 60 – Estrutura da daidzeína.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

O espectro experimental e o espectro da literatura da daidzeína apresentam um alto valor de similaridade (cosseno de 0,93). A **Figura 61** mostra a comparação desses espectros e a correspondência entre os sinais experimentais e da literatura, tanto os de maior quanto os de menor intensidade.

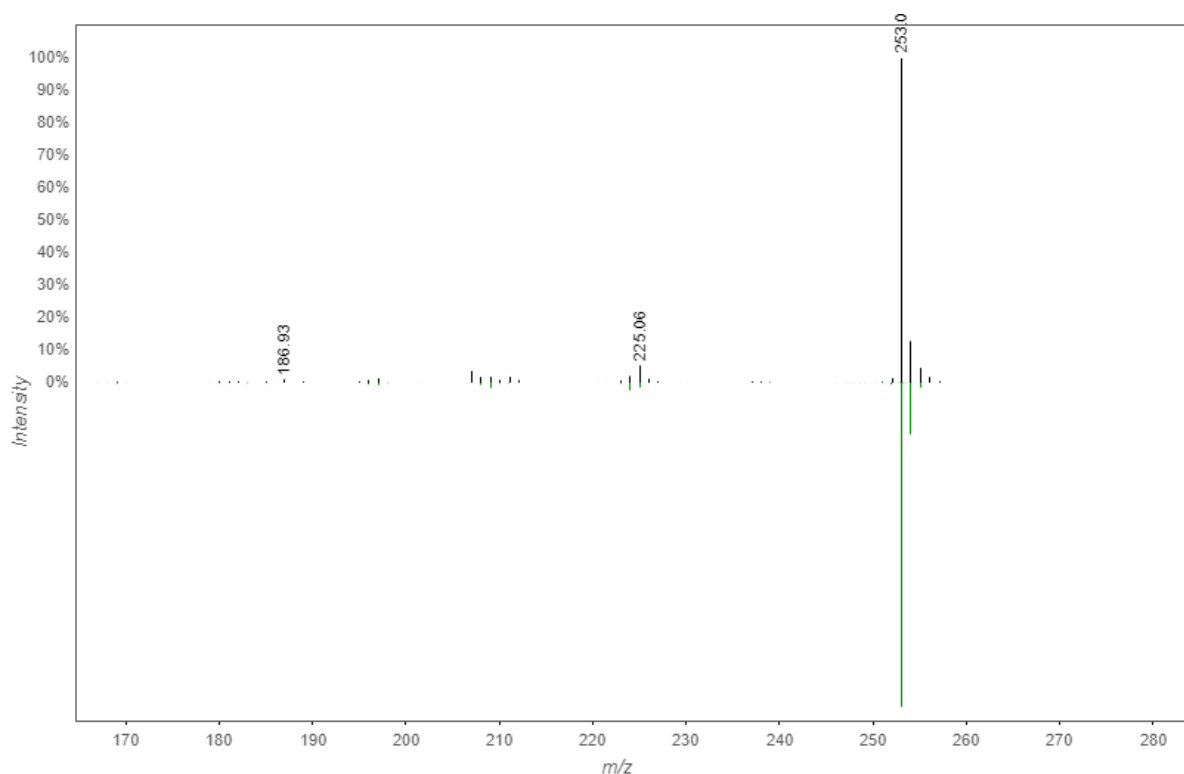


Figura 61 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental da daidzeína.

Fonte: Adaptado de Wang *et. al.* (2016).

A criptotanshinona (**86**) é um diterpenóide encontrado em plantas do gênero *Salvia* com atividade anti-inflamatória, antitumoral, neuroprotetora e entre outras (WU *et. al.*, 2020). Esse constituinte foi identificado na fração 6 com cosseno correspondendo a 0,78 e dados da literatura classificado como *bronze*.

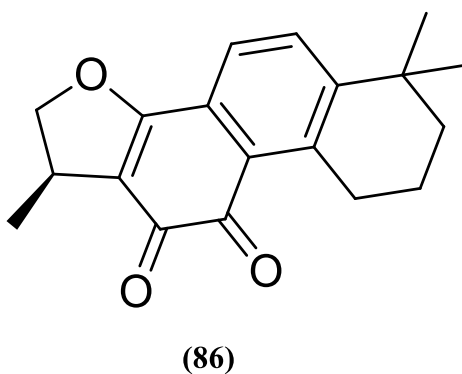


Figura 62 – Estrutura Criptotanshinona.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

A comparação dos espectros experimental e o da literatura para a criptotanshinona (**Figura 63**), evidencia a similaridade dos sinais de maior e menor intensidade, diferenciando apenas pela ausência de um sinal em m/z 268 e pela defasagem de m/z 0,09.

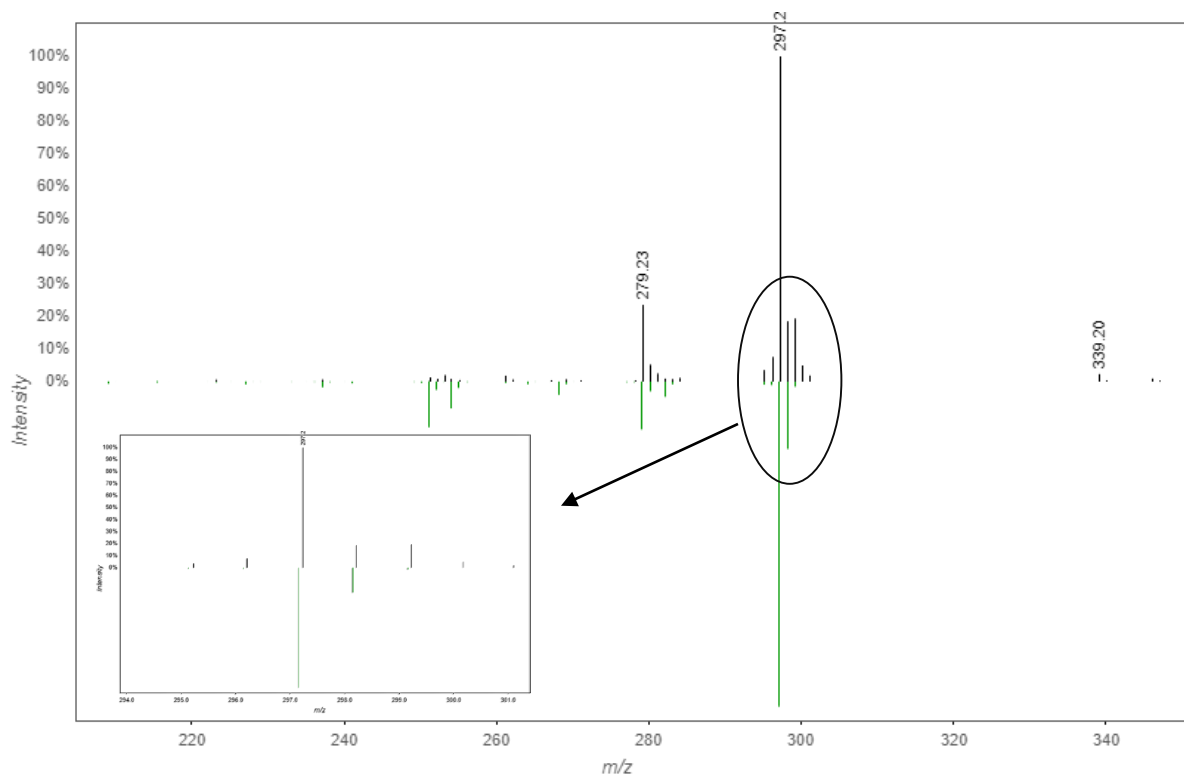


Figura 63 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental da criptotanshinona.

Fonte: Adaptado de Wang *et. al.* (2016).

A antraquinona endocrocina (**87**) foi anotada na fração 5 com cosseno de 0,84 e dados da literatura com classificação *bronze*. A literatura cita seu potencial antiviral, anti-inflamatório, imunossupressor e para tratamento da doença de Alzheimer (SUN *et. al*, 2019)

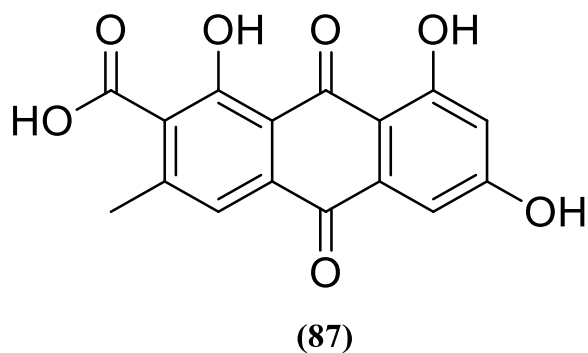


Figura 64 – Estrutura endocrocina.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

A **Figura 65** e o valor de cosseno evidenciam alta similaridade entre os dois espectros, visto que eles diferenciam apenas por alguns sinais de média intensidade na região de m/z 197.

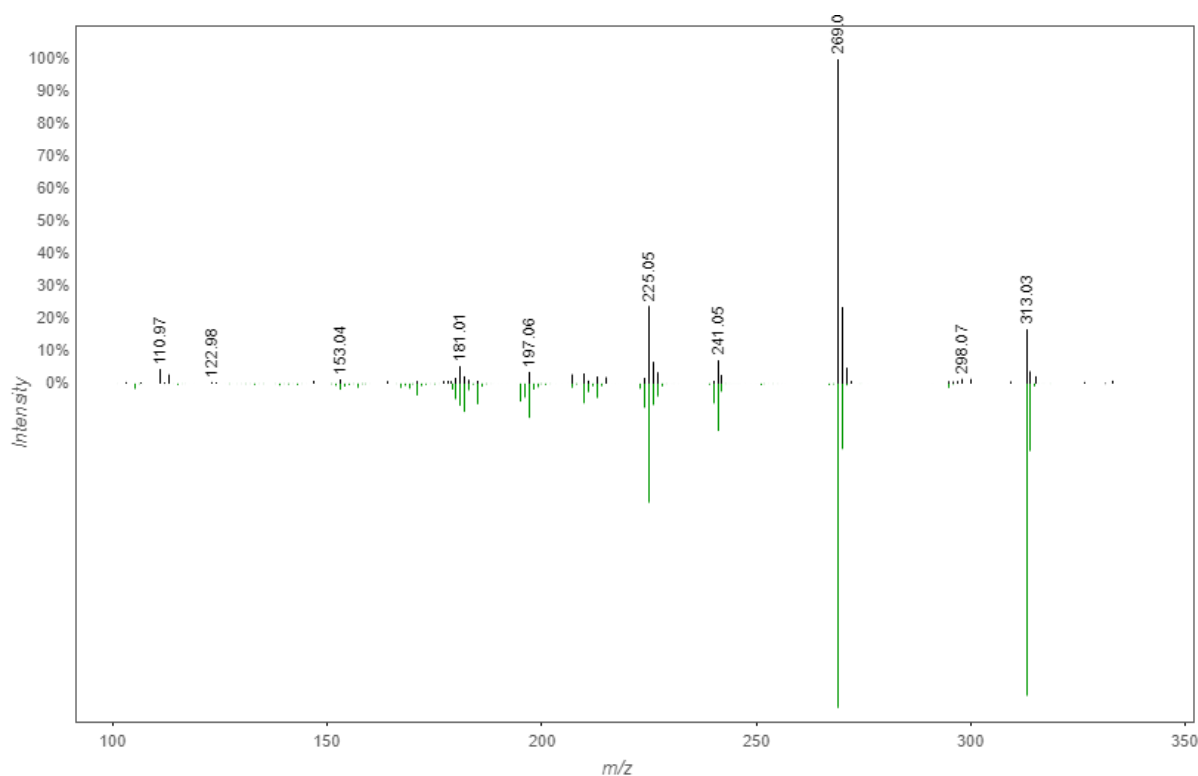


Figura 65 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental da endocrocina.

Fonte: Adaptado de Wang *et. al.* (2016).

A baicaleína (**88**) foi anotada no modo negativo apenas para a fração 6 com cosseno igual a 0,85 e com dados da literatura classificados como *bronze*. Essa flavona é um constituinte

das raízes da *Scutellariae radix* que apresenta diversas propriedades farmacológicas como antiviral, antioxidante, anti-inflamatória, entre outras (LIU *et. al.*, 2016).

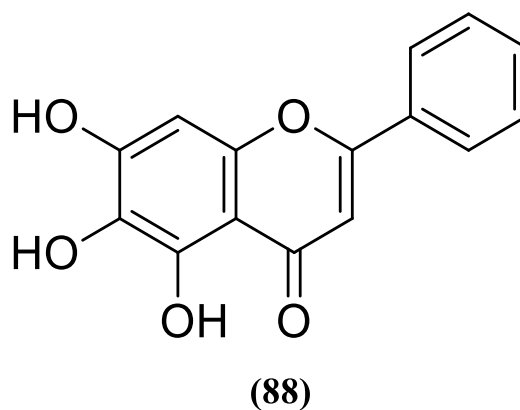


Figura 66 – Estrutura da baicaleína.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

A **Figura 67** apresenta a comparação entre o espectro experimental e o da literatura, evidenciando uma boa correlação entre os sinais presentes nos dois espectros, que se diferenciam apenas pela defasagem de m/z 0,15 que resulta em um valor de cosseno de 0,85.

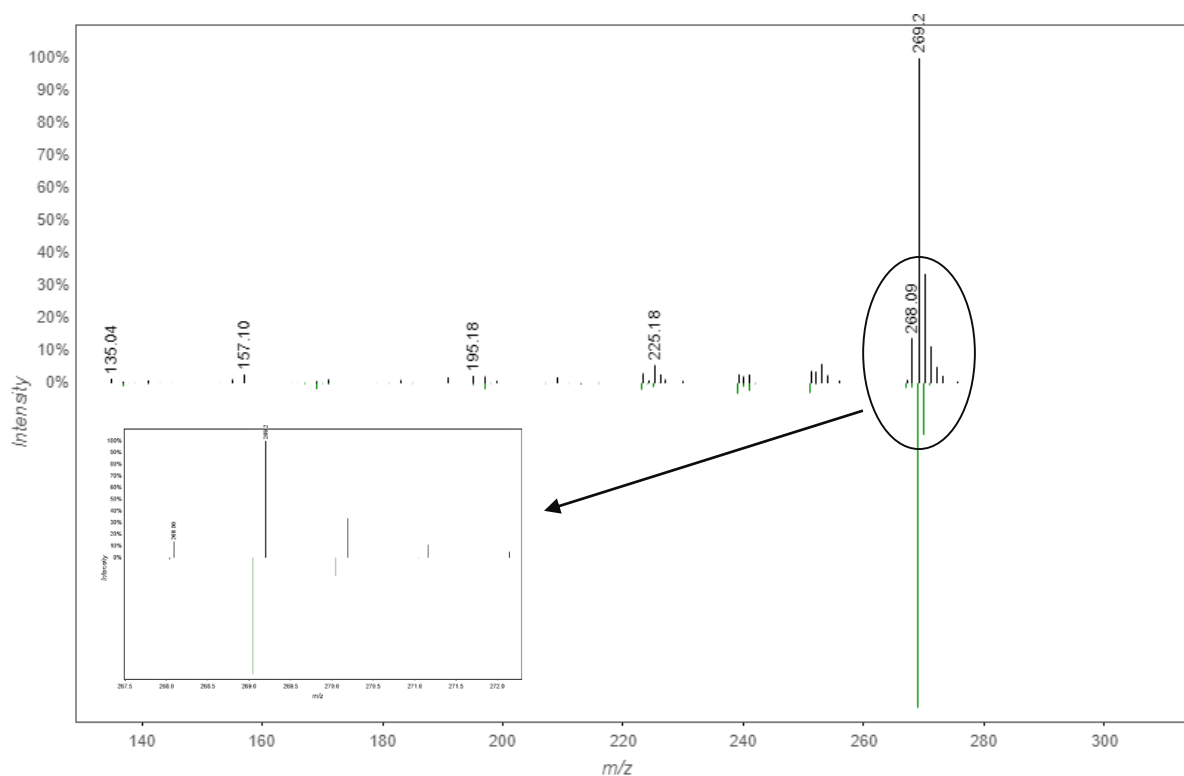


Figura 67 – Comparação do espectro de massas da plataforma do GNPS com o espectro experimental da baicaleína.

Fonte: Adaptado de Wang *et. al.* (2016).

Na ampliação da rede molecular das frações 1-10 no modo negativo, **Figura 68**, pode-se observar em qual cluster está localizada cada substância anotada pela plataforma do GNPS, seus respectivos valores de cosseno e em quais frações elas foram anotadas.

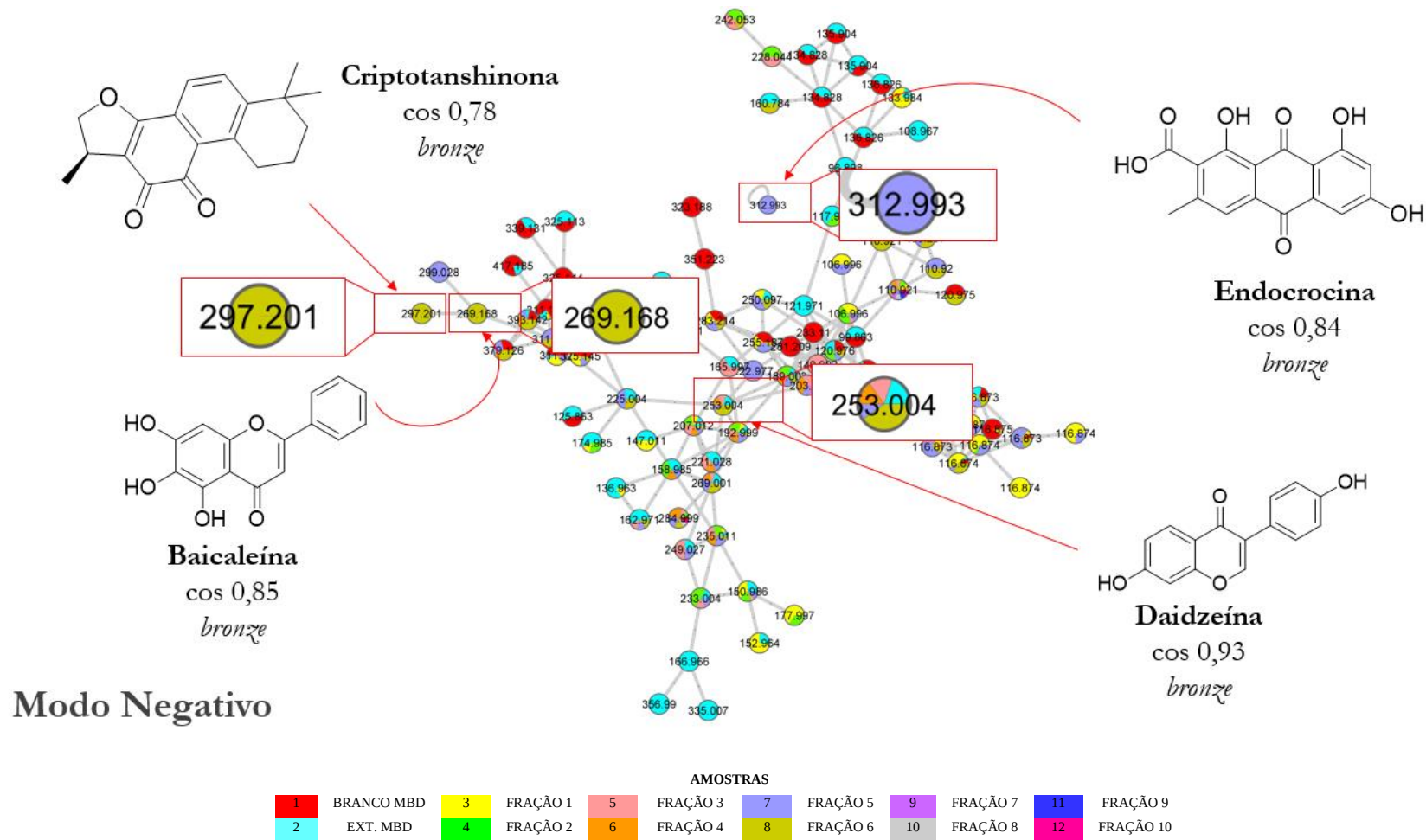


Figura 68 – Ampliação do cluster da rede molecular calculada para os dados de UPLC-MS/MS das amostras dos extratos do fungo *Hypoxylon investiens* crescido em MDB e as frações 1-10 e o branco do meio líquido de PDB no modo positivo.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

As frações que obtiveram maior quantidade de estruturas anotadas pela plataforma do GNPS foram as frações 4 e 5 tanto no modo positivo quanto no modo negativo. Dessa forma optou-se para analisar os dados de CLAE-DAD para decidir se continuaria a análise das 2 frações.

4.4.2. Análise por CLAE-DAD

Para obtenção do perfil químico as frações resultantes do extrato do meio líquido de MBD, foram analisadas por CLAE-DAD analítico em gradiente exploratório. Após a análise dos cromatogramas (**Figura 69**) e (**Figura 70**) optou-se por continuar o estudo com a fração 4, uma vez que essa apresentava massa adequada e os picos de interesse.

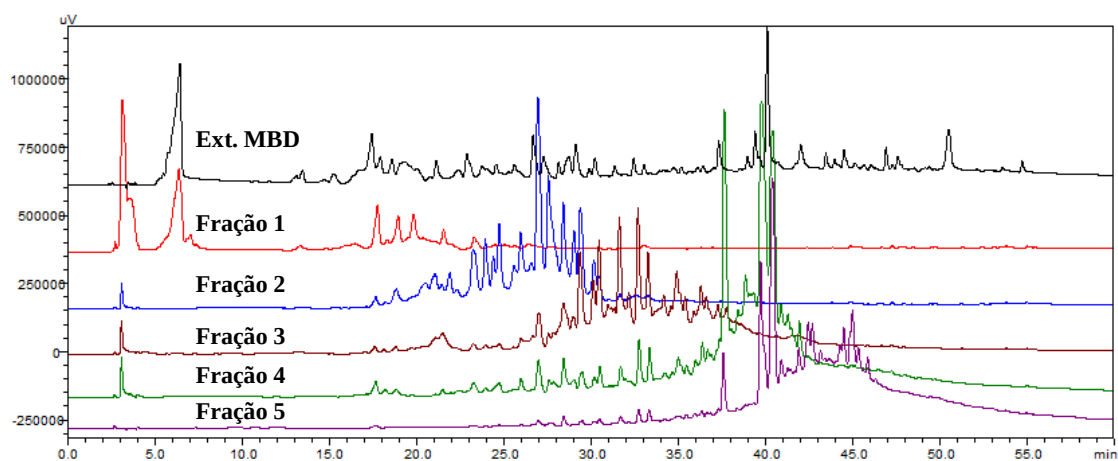


Figura 69 – Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto e as frações 1- 5 com detecção em 230 nm. Luna Phenomenex® C₁₈, (250 x 4,60 mm), 5µm; **Solvente A:** H₂O; **Solvente B:** MeOH. **Grad.** **Exp.:** 5-100% de B em 50 min.; 1,00 mL.min⁻¹.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

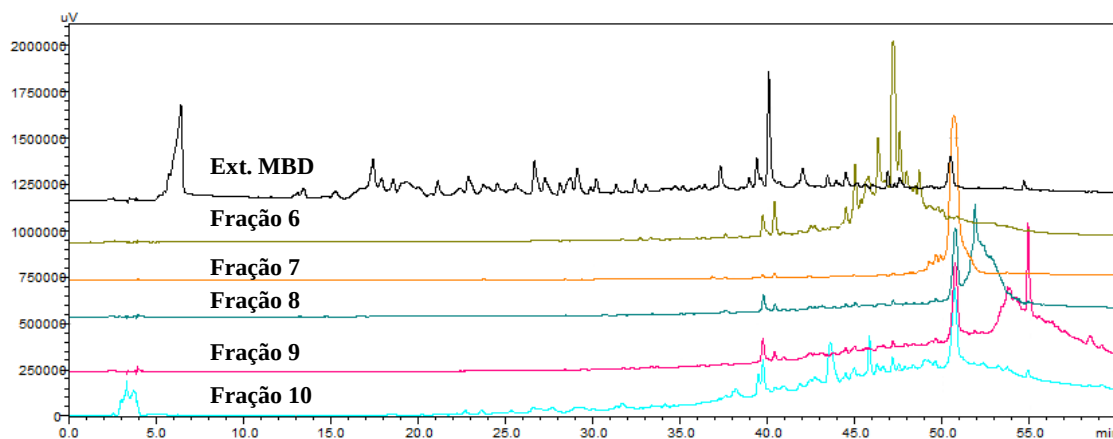


Figura 70 – Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto e as frações 6-10 com detecção em 230 nm. Luna Phenomenex® C₁₈, (250 x 4,60 mm), 5µm; **Solvente A:** H₂O; **Solvente B:** MeOH. **Grad.** **Exp.:** 5-100% de B em 50 min.; 1,00 mL.min⁻¹.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

Na **Figura 71** são mostradas as frações obtidas na separação do extrato junto com suas respectivas massas e a proporção de MeOH:H₂O usada na eluição de cada fração.



Figura 71 – Fracionamento do extrato bruto de MBD em C₁₈ com diferentes concentrações de (MeOH:H₂O) de fase móvel.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

Selecionou-se apenas a fração 4 para a purificação devido a presença de picos de interesse em 39,46 min e 40,11 min, por apresentarem uma maior quantidade de substâncias anotadas por meio do GNPS e possuir perfil químico similar à fração 5. Essa fração foi analisada novamente por CLAE-DAD analítico para o desenvolvimento de um método mais eficiente para o isolamento dos picos de interesse utilizando CLAE-DAD preparativo.

4.5. Purificação da fração 4

A fração 4 foi analisada por CLAE semipreparativa, **Figura 72**, em coluna de C₁₈ eluída em modo gradiente com H₂O:MeOH (52-89%) em 35 min. Obteve-se duas subfrações (4.6B e 4.7B) com massa e pureza suficientes para as análises de determinação estrutural. As subfrações foram analisadas por RMN uni e bidimensionais e comparadas com dados encontrados na literatura.

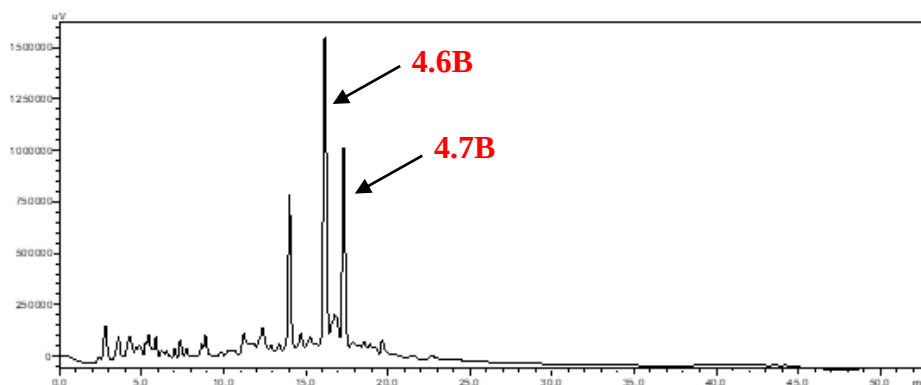


Figura 72 – Análise da fração 4 por CLAE semipreparativa em coluna C₁₈ Coluna Analítica Luna Phenomenex® C₁₈, (250 x 10,0 mm), eluída em modo gradiente com H₂O:MeOH (52-89%) em 35 min, $\lambda = 230$ nm.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

4.5.1. Elucidação estrutural da substância 4.6B

A subfração 4.6B (2,0 mg) foi obtida como um sólido de coloração marrom. As análises de RMN uni e bidimensionais, espectro de massas e dados obtidos na literatura permitiram sua identificação como Daldinona C. O espectro de UV-Vis, **Figura 73**, apresentou bandas de absorção máxima em $\lambda = 220, 259$ e 338 nm compatíveis com os valores de UV-vis apresentados por Gu *et.al.* (2007) que foram: $\lambda = 224, 259$ e 337 nm (GU *et. al.*, 2007).

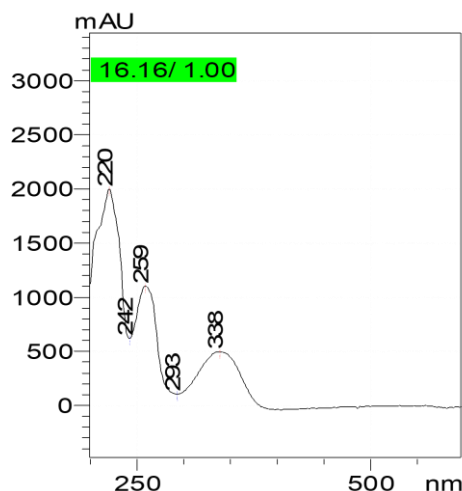


Figura 73 – Espectro no UV-Vis da subfração 4.6B (66% MeOH: 34% de H₂O).

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

O espectro de massas de alta resolução (**Figura 74**) apresentou um pico em m/z 359,2411 referente ao aduto de sódio $[M+Na]^+$, compatível com o relatado na literatura, com m/z 359,0883, atribuído à Daldinona C (C₂₀H₁₆O₅Na) (GU *et. al.*, 2007).

O espectro de RMN de ¹H, **Figura 75**, da subfração 4.6B apresentou cinco sinais na região de hidrogênios aromáticos, sendo um dubleto em δ_H 7.78 (J_{12-13} = 8.41 Hz, 1H) e outro em δ_H 6.77 (J_{13-12} = 8.41 Hz, 1H) que foram atribuídos aos hidrogênios H-12 e H-13 de um dos sistemas aromáticos da estrutura. Os outros três sinais da região de hidrogênios aromáticos são dois dubletos em δ_H 6.73 (J_{3-4} = 8.35 Hz, 1H) e δ_H 7.11 (J_{5-4} = 7.85 Hz, 1H) que correspondem respectivamente aos hidrogênios H-3 e H-5, enquanto o tripleto em δ_H 7.42 (J_{4-3} = 8.06 Hz, 1H) foi atribuído ao H-4. Além disso, foram observado sinais de hidrogênios diastereotópicos em δ_H 3.20 (dd; J_{8-9} = 11.75; $J_{8\alpha-8\beta}$ = 5.93 Hz; H-8 α ; 1H), 2.82 (dd; J_{8-9} = 15.63; $J_{8\beta-8\alpha}$ = 1.94 Hz; H-8 β ; 1H), 1.68 (ddd; J_{18-17} = 24.6; J_{18-12} = 12.4; $J_{18\alpha-18\beta}$ = 5.5 Hz, H-18 α 1H) e um multipletto em δ_H 2.33 (1H) atribuído ao H-18 β .

No espectro de TOCSY-1D, **Figura 76**, irradiando-se no duplo duplo dubleto em δ_H 1.68, foi possível observar que os sinais em δ_H 2.33, 2.55, 2.70, 2.82 e 3.20 fazem parte de um mesmo sistema de spins isolado. Além disso, foi possível verificar a sobreposição de sinais do H-9 e H-17 em δ_H 2.55 devido a diferença de intensidade, e que os sinais em δ_H 2.82 e 3.20 se encontram mais distantes do sinal irradiando e, ainda, o desdobramento do H-8 α .

Com o mapa de contornos COSY, **Figura 77**, pode-se observar todas as correlações entre os hidrogênios da estrutura. Na **Figura 78** observam-se as correlações entre os sinais de

um dos sistemas aromáticos; H-3, H-4 e H-5, assim como as correlações dos hidrogênios do outro sistema aromáticos, H-12 e H-13. Na **Figura 79** também pode-se observar as correlações entre os H-18 α , H-18 β , H-19, H-9 e H-17. Além disso, também foi possível observar que o H-8 β apresenta correlação com os H-8 α e H-9, enquanto o H-8 α apresenta uma correlação de menor intensidade com o H-9.

O mapa de contornos HSQC (**Figura 80**) mostra os sinais metínicos dos sistemas aromáticos em δ_C 115.7 (C-13), 116.3 (C-3), 120.2 (C-5), 131.3 (C-12), 136.87 (C-4) e os sinais em δ_C 55.7 (C-9) e 41.4 (C-19) atribuídos ao sistema cíclico. Os carbonos metilênicos apresentaram sinais em δ_C 35.1 (C-8), 28.3 (C-18) e 37.6 (C-17).

A partir do mapa de contornos HMBC e suas ampliações (**Figura 81-83**) verificaram-se as correlações entre o H-3 (δ_H 6.73; d; 1H) com o carbono quaternário em δ_C 115.4 (C-1); as correlações entre o H-4 e os sinais do carbono da hidroxila em δ_C 161.3 (C-2) e o carbono quaternário em δ_C 144.3 (C-6). Também foi verificada a correlação dos H-8 α e H-8 β com o carbono da carbonila C-7 (δ_C 203.47). O carbono da hidroxila C-10 (δ_C 79.1) apresenta correlações com os hidrogênios H-5 (δ_H 7.11; d; 1H), H-8 β (δ_H 3.20; dd; 1H) e H-9 (δ_H 2.55; m; 1H). Os sinais em δ_C 137.6 e δ_C 113.73 foram atribuídos respectivamente ao C-11 e C-15 devido a correlação com o H-13 (δ_H 6.77; d; 1H). O H-12 (δ_H 7.78; d; 1H) apresenta correlações com o carbono da hidroxila C-14 (δ_C 160.4) e o carbono quaternário C-20 (δ_C 149.2), sendo que este último também correlaciona com o H-19 (δ_H 2.7; m; 1H). Para concluir, a carbonila C-16 (δ_C 203.76) apresenta correlação com H-17 (δ_H 2.55; m; 2H). Estas correlações, aliadas aos dados de COSY e HSQC evidenciaram a identificação de 4.6B como a daldinona C.

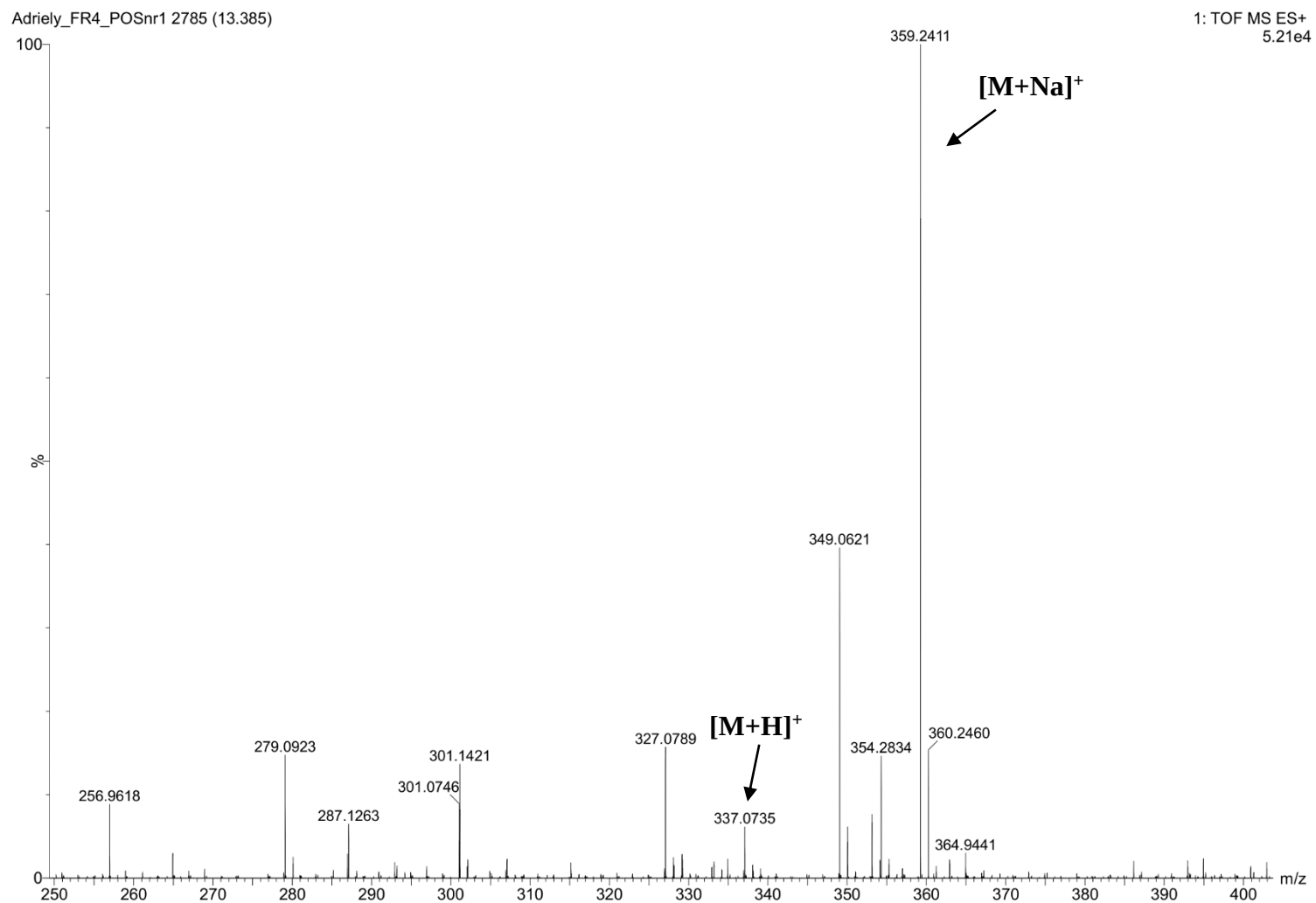


Figura 74 – Espectro de massas de alta resolução da subfração 4.6B (Bruker- MaXIx Impact – ESI-Q-TOF).

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

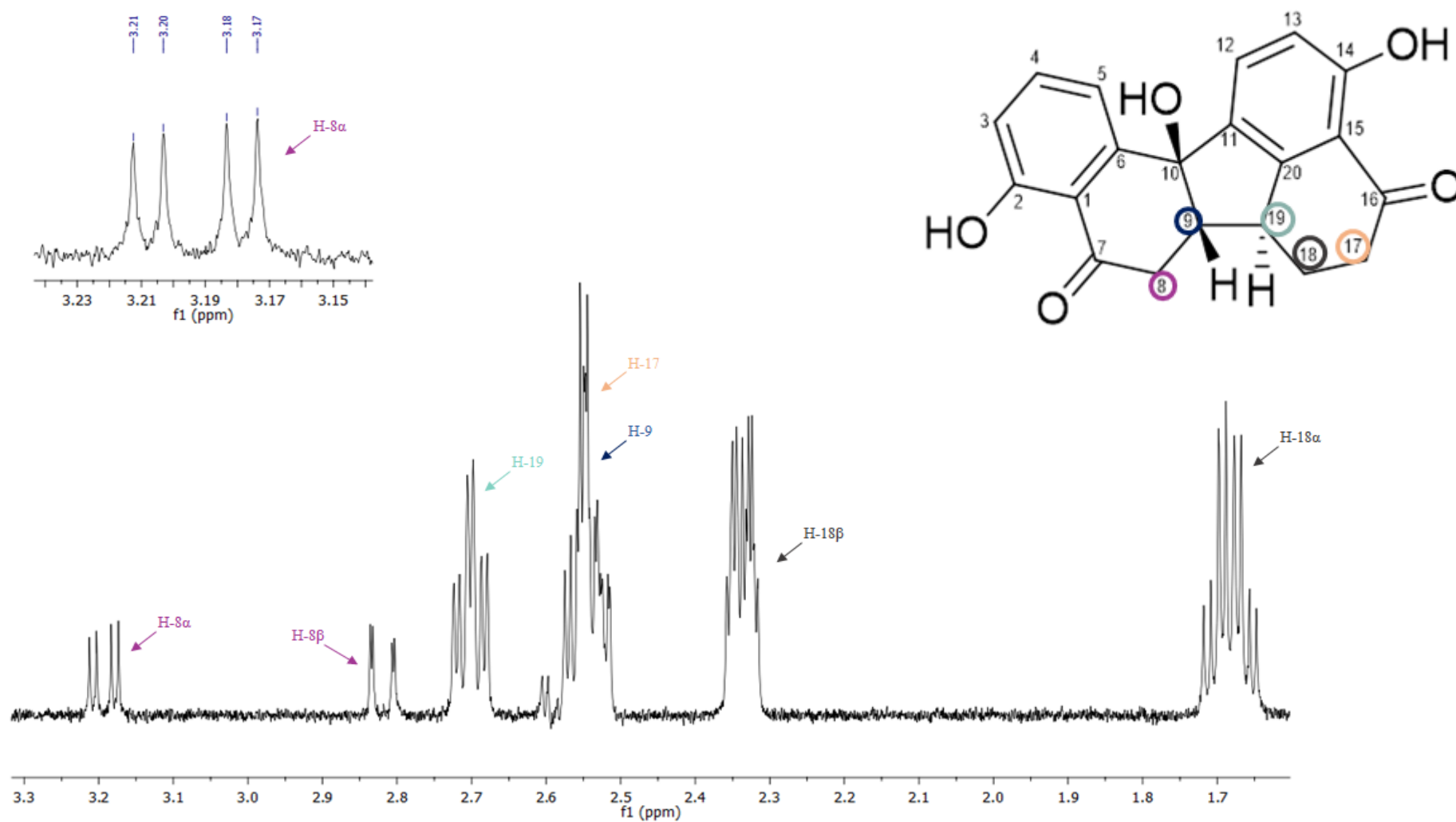


Figura 76 – Espectro de TOCSY do sinal em 1.68 ppm da subfração 4.6B (CD₃OD; 600 MHz).

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

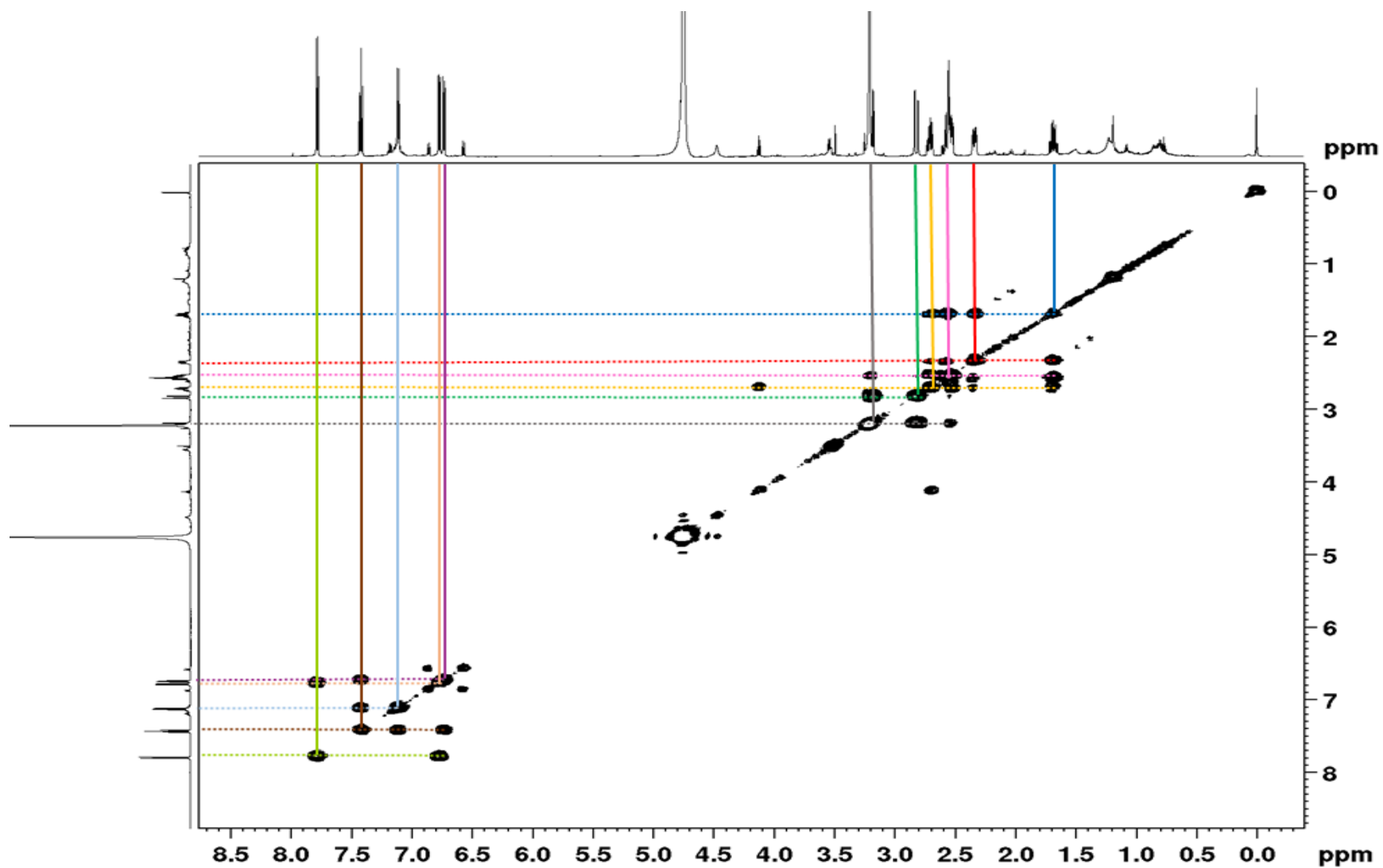


Figura 77 – Mapa de contornos COSY da subfração 4.6B (CD₃OD; 600 MHz).

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

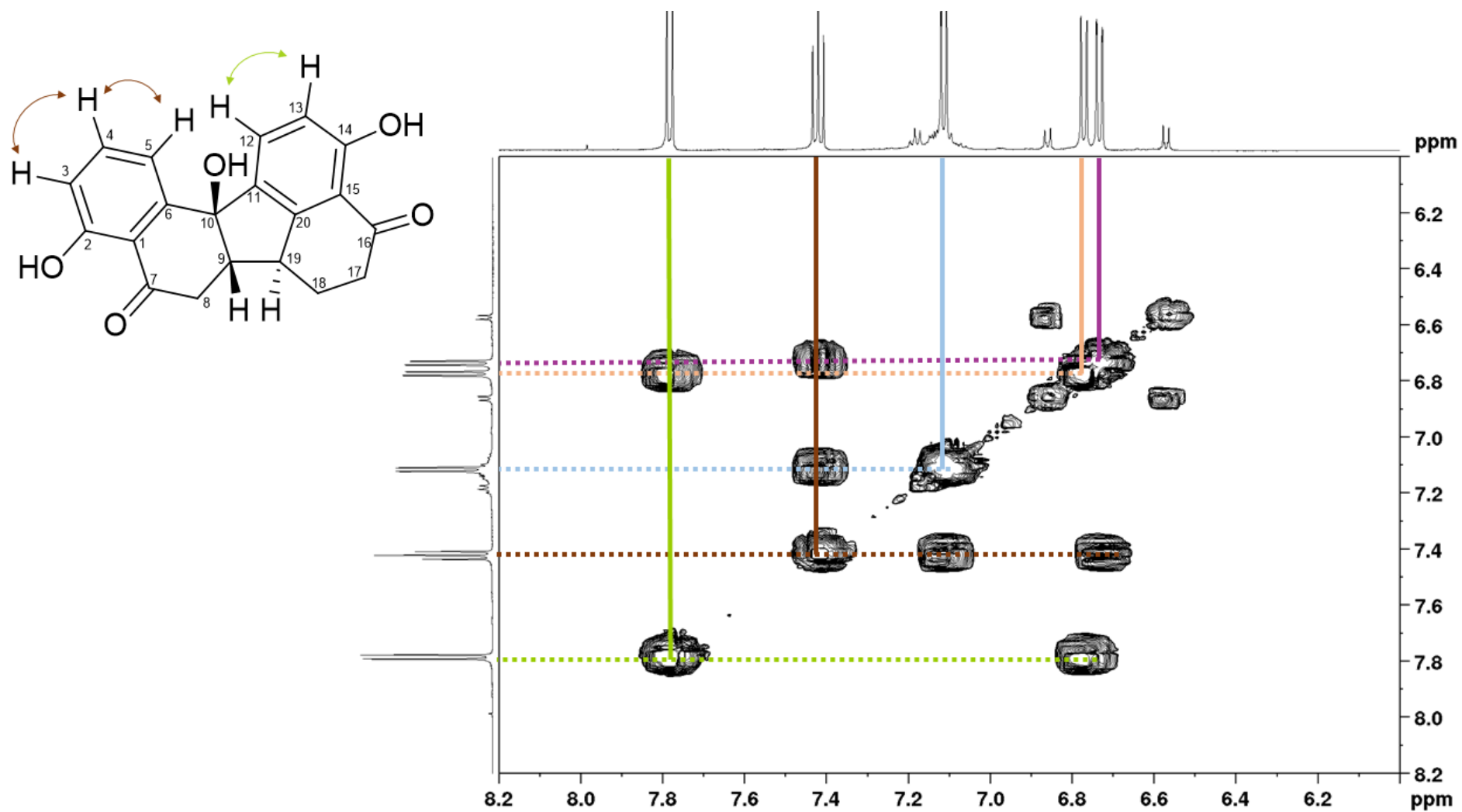


Figura 78 – Ampliação do mapa de contornos COSY na região aromática da subfração 4.6B (CD₃OD; 600 MHz).

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

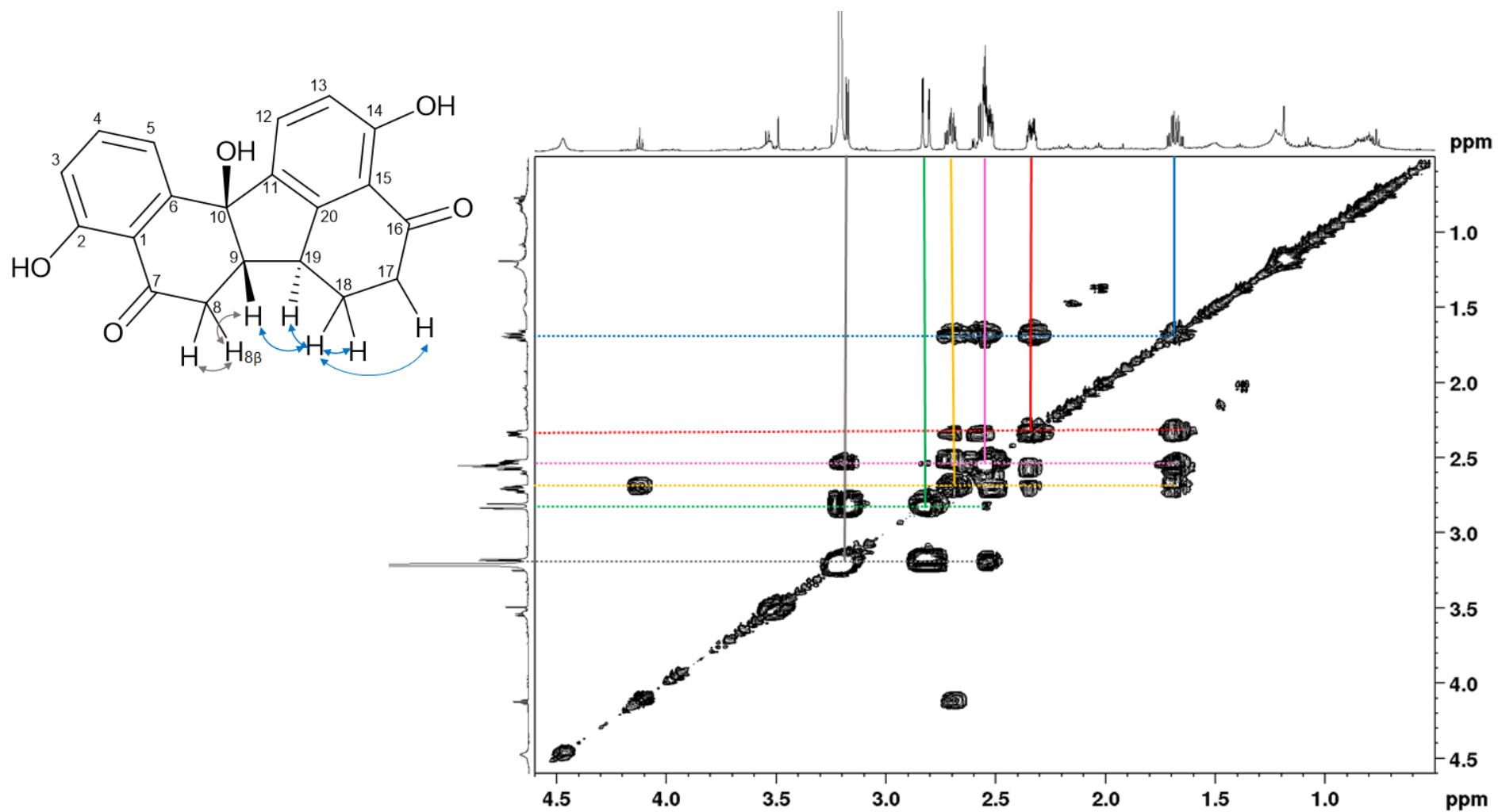


Figura 79 – Ampliação do mapa de contornos COSY da subfração 4.6B (CD₃OD; 600 MHz).

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

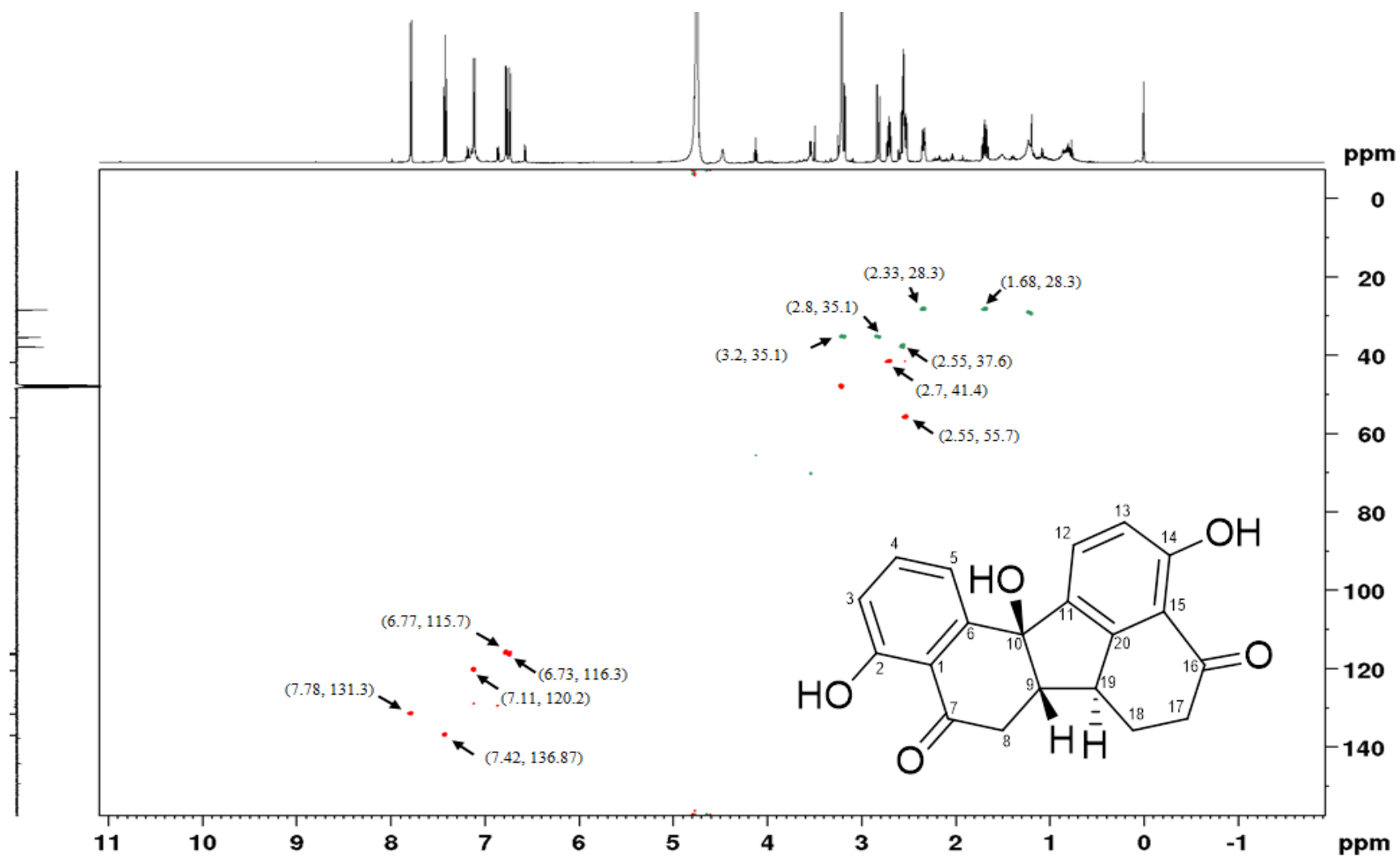


Figura 80 – Mapa de contornos HSQC da subfração 4.6B (CD_3OD ; 600 MHz).

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

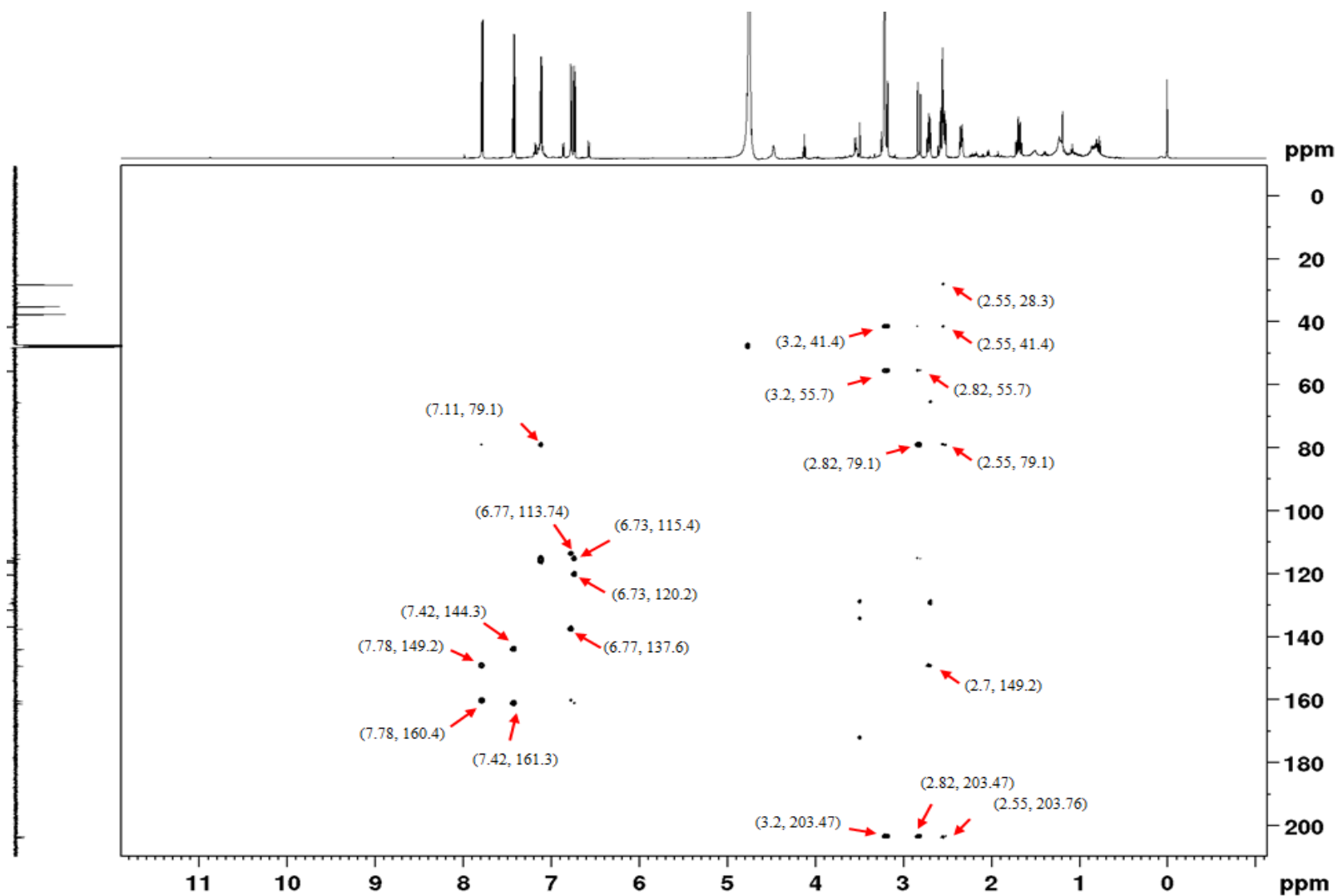


Figura 81 – Mapa de contornos HMBC da subfração 4.6B (CD_3OD ; 600 MHz).

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

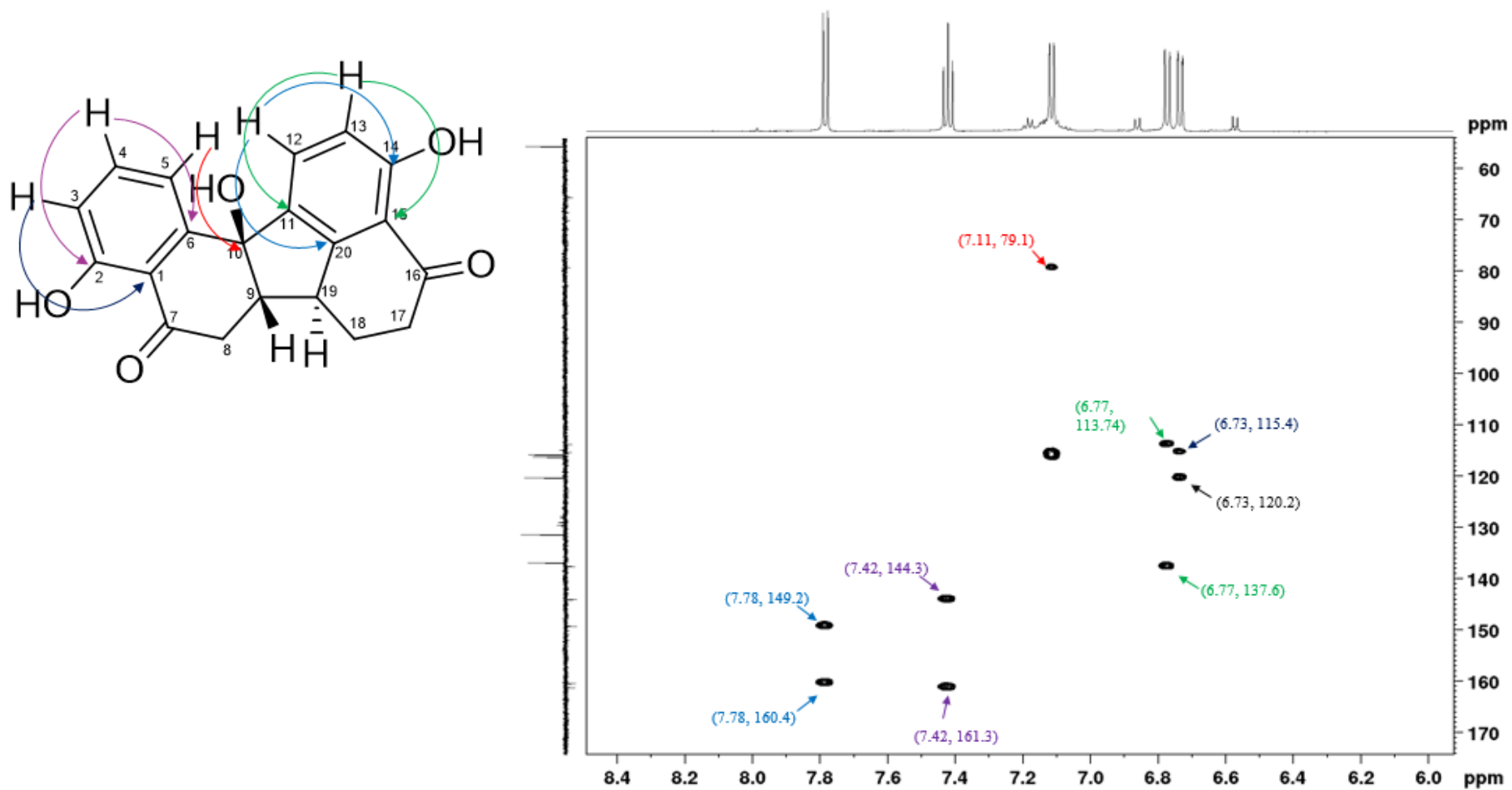


Figura 82 – Mapa de contornos HMBC da subfração 4.6B, ampliado na região aromática (CD₃OD; 600 MHz).

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

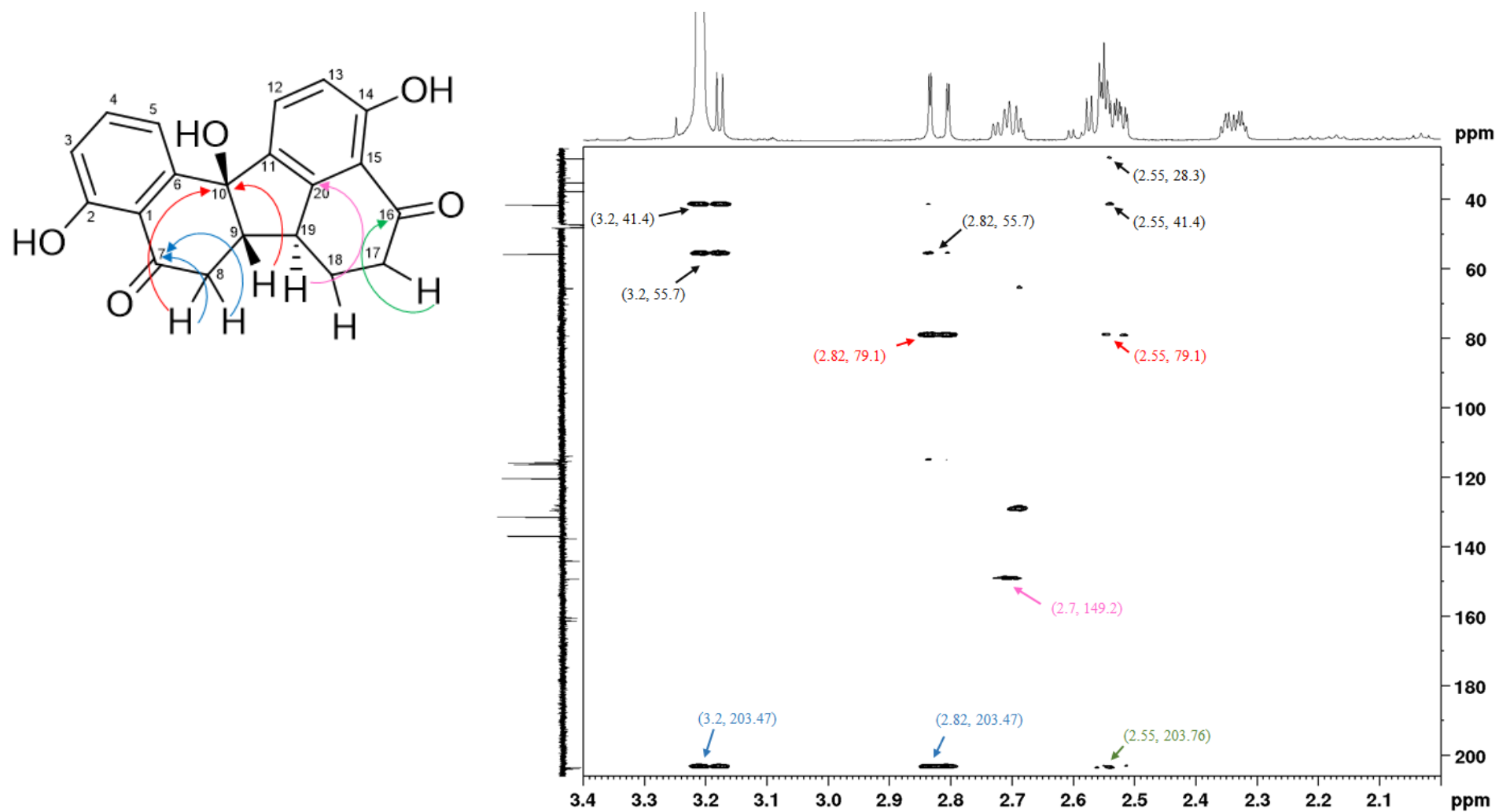


Figura 83 – Mapa de contornos HMBC da subfração 4.6B ampliado (CD_3OD ; 600 MHz).

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

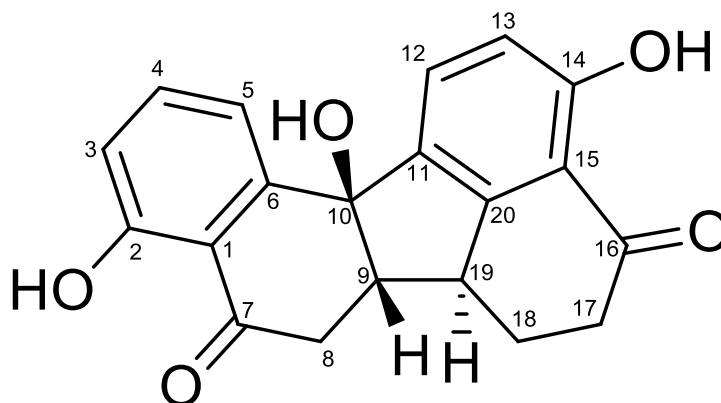


Figura 84 – Estrutura da daldinona C.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

Tabela 3 – Dados de RMN da subfração 4.6B e para a daldinona C (600 MHz; CD₃OD).

4.6B				Daldinona C*	
Nº	δ _C	δ _H (ppm) <i>J</i> (mult. e Hz)		δ _C	δ _H (ppm) e <i>J</i> (mult. e Hz)
1	115.4	-		116.1	-
2	161.3	-		162.5	-
3	116.3	6.73 (d; J=8.35)		118.4	6.89 (d; J= 8.2)
4	136.87	7.42 (t; J=8.06)		138.3	7.5 (t; J=8.2; 8.0)
5	120.2	7.11 (d; J=7.85)		120.4	7.14 (d; J= 8.0)
6	144.3	-		143.8	-
7	203.47	-		203.5	-
8	35.1	2.82 (dd; J= 15.63; 1.94)		36.5	2.92 (dd; J= 17.5; 1.5)
		3.20 (dd; J= 11.75; 5.93)			3.29 (dd; J= 17.5; 5.7)
9	55.7	2.55 (m)		56.6	2.64 (ddd; J= 10.3; 5.7; 1.5)
10	79.1	-		80.7	-
11	137.6	-		149.6	-
12	131.3	7.78 (d; J= 8.41)		131.9	7.81 (d; J= 8.1)
13	115.7	6.77 (d; J= 8.41)		117.6	6.91 (d; J= 8.1)
14	160.4	-		161.7	-
15	113.74	-		115.0	-
16	203.76	-		203.9	-
17	37.6	2.55 (m)		38.7	2.57 (ddd; J= 17.8; 13.7; 4.6)
					2.72 (ddd; J= 17.8; 3.8; 2.9)

		1.68 (ddd; J= 24.6; 12.4;		1.81 (dddd; J= 17.2; 13.7;
		5.5)		11.2; 3.8)
18	28.3	2.33 (m)	29.0	2.42 (dddd; J= 17.2; 4.6; 4.5;
				2.9)
19	41.4	2.70 (m)	42.4	2.79 (ddd; J= 11.2; 10.3; 4.5)
20	149.2	-	137.6	-

Fonte: Elaborada pela Autora (2022). * 500 M/Hz, CDCl₃ (GU *et. al.*, 2007).

No estudo realizado por Yang *et. al.* (2020) a daldinona C foi isolada do fungo *Marasmius berteroi* e apresentou atividade inibitória da acetilcolinesterase na concentração de 50µg/mL.

Em outro estudo, essa substância foi isolada do fungo endofítico *Hypoxylon truncatum* obtido da *Artemisia annua*, sendo relatada a atividade citotóxica frente a linhagem de células de câncer colorretal humano, com valor de IC₅₀ = 49,5 µM (GU *et. al.*, 2007).

4.5.2. Elucidação estrutural da substância 4.7B

A subfração 4.7B (2,0 mg) foi obtida como um sólido de coloração amarelada. As análises de RMN uni e bidimensionais, espectro de massas e comparação com dados obtidos na literatura, permitiram sua identificação como 2-fenilacetato de fenetila.

O espectro de massas de alta resolução (**Figura 85**) apresentou um pico em *m/z* 255,0998 referente à molécula desprotonada [M-H]⁻.

A **Figura 86** apresenta o espectro de RMN de ¹H da subfração 4.7B em que pode-se observar os sinais de tripleto em δ_H 4,49 (t; J₁₀₋₁₁ = 6,72; H-10, 2 H) e 2,91(t; J₁₁₋₁₀ = 6,83; H-11, 2 H), a presença de um singlete em 3,50 (2H) atribuído aos hidrogênios H-7. No mapa de contornos de COSY, **Figura 87** é possível observar a correlação entre os dois tripletos indicando assim a proximidade entre o H-10 e H-11.

No mapa de contorno HSQC (**Figura 88**) observou-se os sinais de carbonos metilênicos (representados em vermelho) em δ_C 34,9 (C-11), 40,0 (C-7) e 65,6 (C-10) e sinais de carbonos metínicos (representados em verde) em δ_C 115,0 (C-16), 126,2 (C-4), 128,0 (C-6), 128,5 (C-5) e 129,9 (C-17).

A partir do mapa de contornos HMBC, **Figura 89**, verificaram-se as correlações entre o H-17 (δ_{H} 7.03; d; 1H) com o carbono da hidroxila em δ_{C} 155.7 (C-15) e com o carbono aromático em δ_{C} 129.9 (C-13); as correlações entre o H-10 (δ_{H} 4.29; t; 2H) e os sinais do carbono da carbonila em δ_{C} 172.0 (C-8) e o carbono aromático em δ_{C} 137.9 (C-12). Também foi verificada a correlação do H-6 (δ_{H} 7.27; m; 1H) com o carbono aromático em δ_{C} 128.0 (C-2); a correlação do H-5 (δ_{H} 7.17; m; 1H) com o carbono aromático em δ_{C} 128.5 (C-3). E o carbono aromático C-16 (δ_{C} 115.0) apresenta correlação com o hidrogênio H-14 (δ_{H} 6.72; m; 1H).

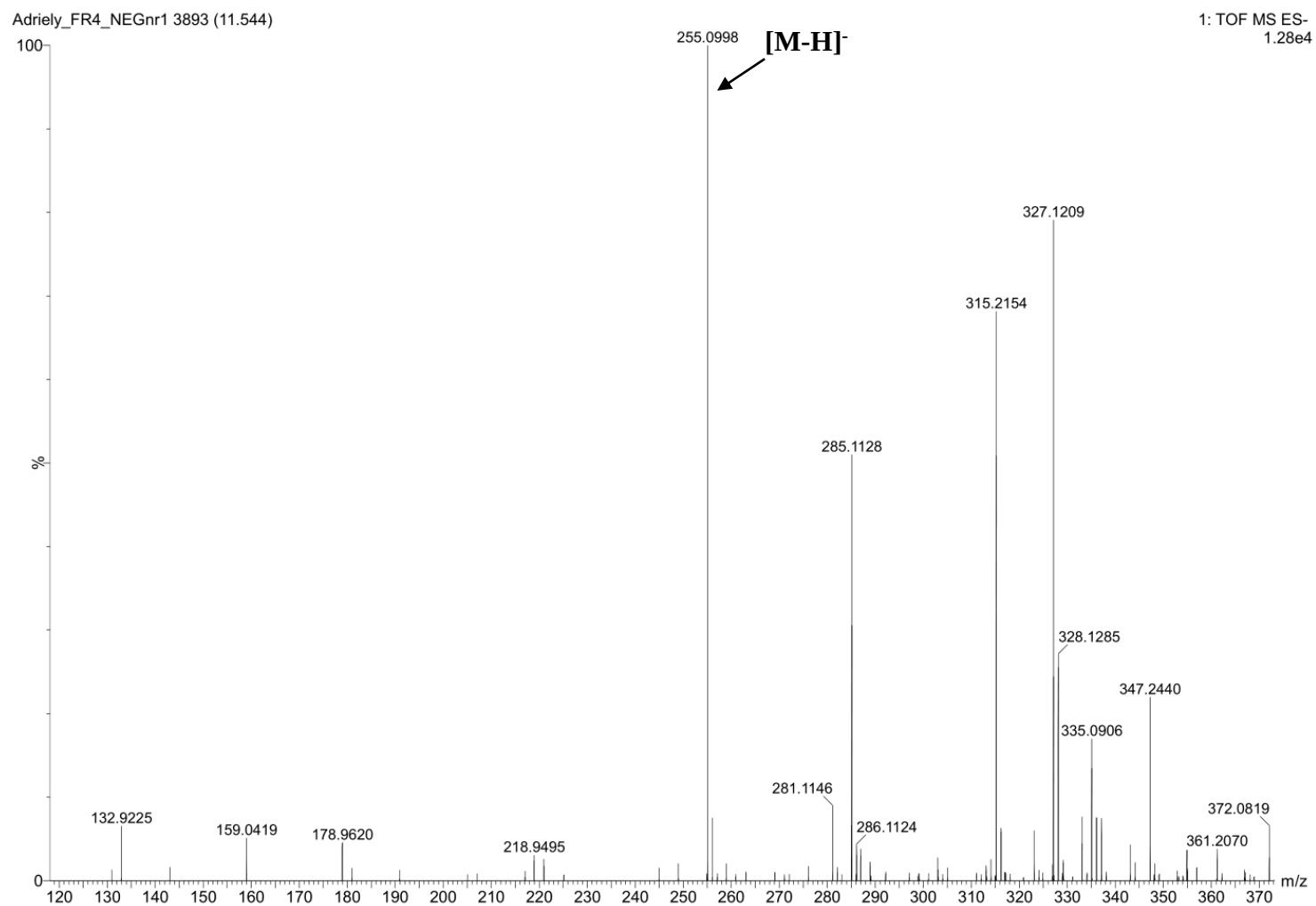


Figura 85 – Espectro de massas de alta resolução da subfração 4.7B (Bruker- MaXix Impact – ESI-Q-TOF).

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

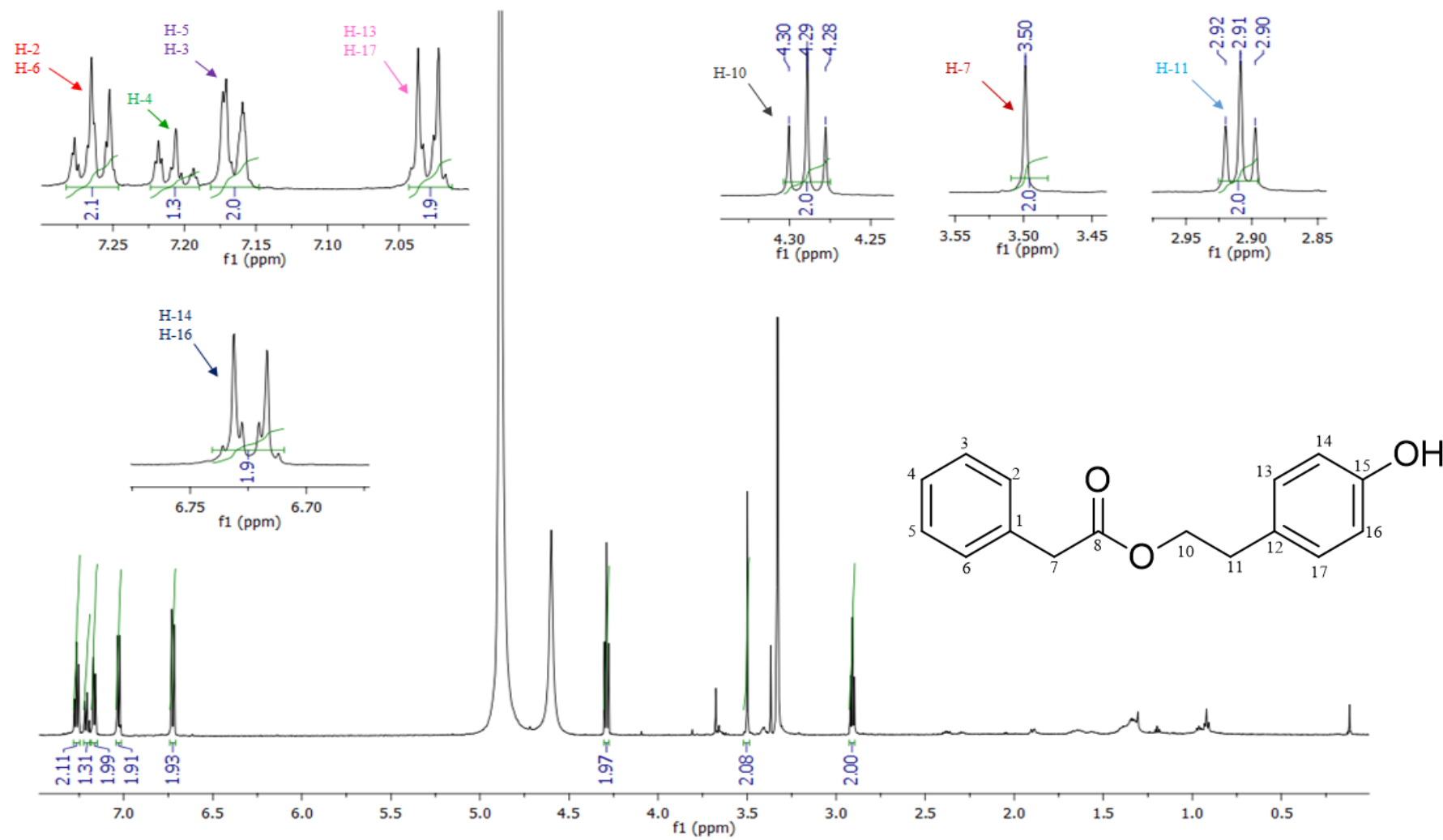


Figura 86 – Espectro de RMN de ^1H da subfração 4.7B (CD_3OD ; 600 MHz).

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

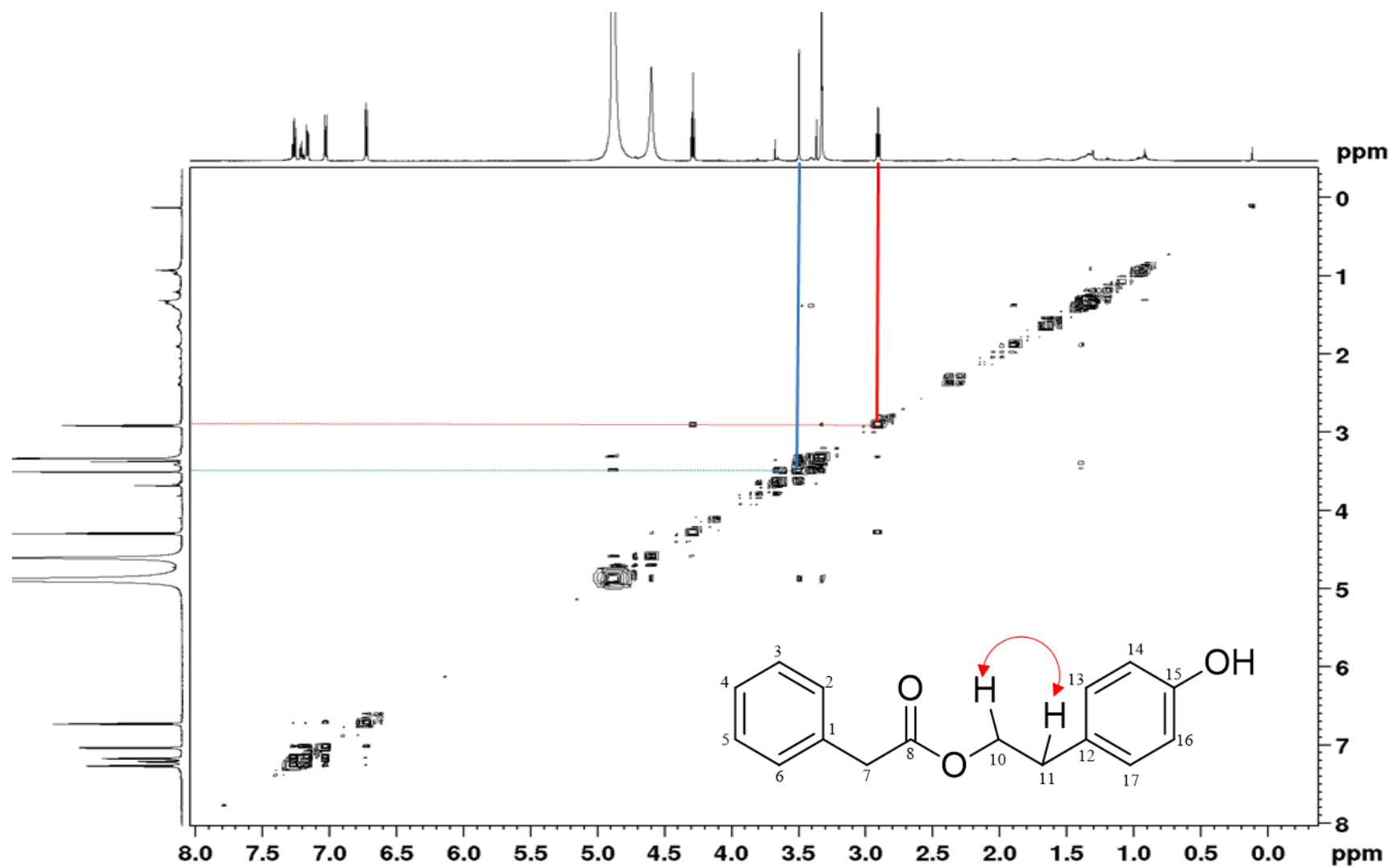


Figura 87 – Mapa de contornos COSY da subfração 4.7B (CD₃OD; 600 MHz).

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

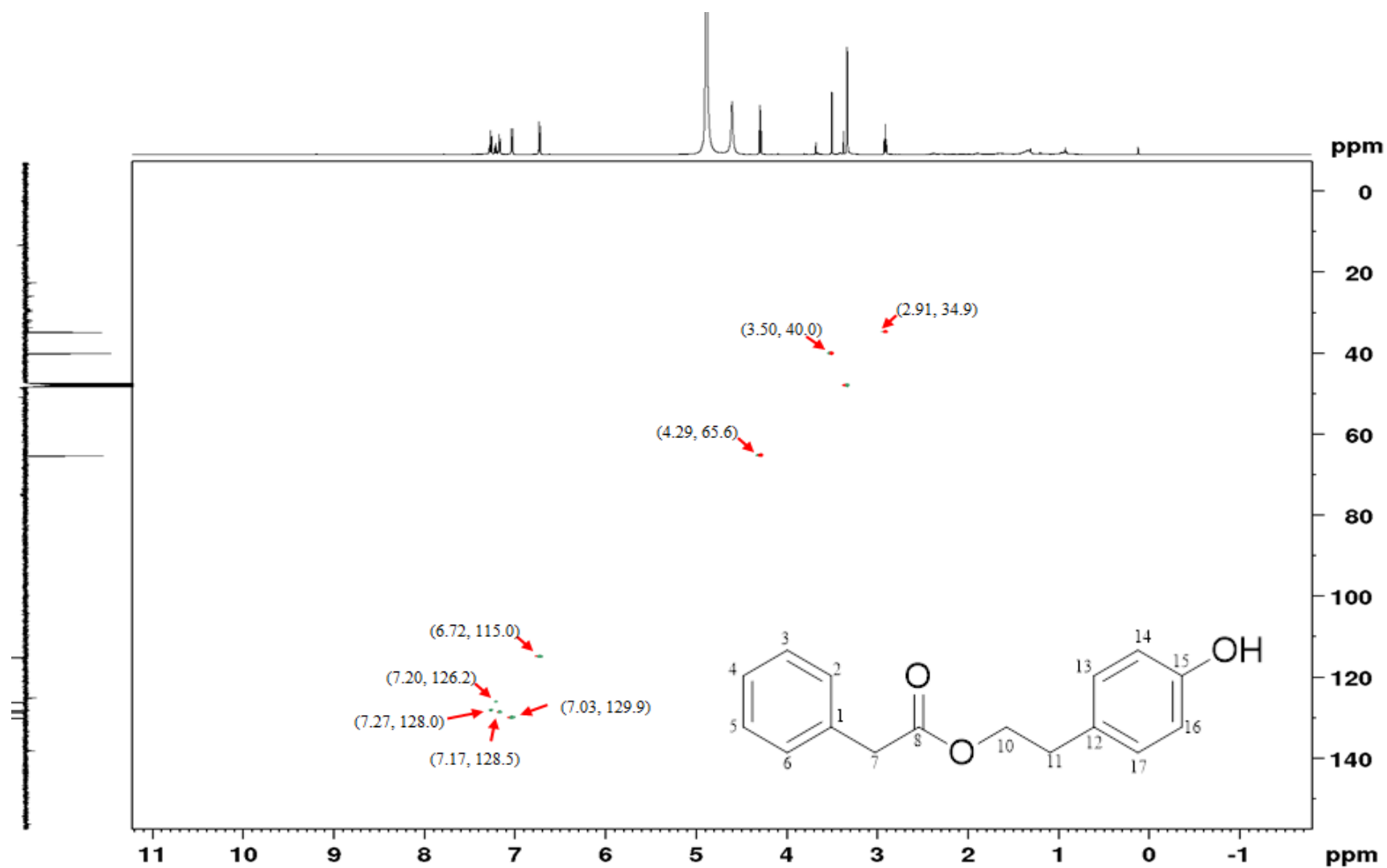


Figura 88 – Mapa de contornos HSQC da subfração 4.7B (CD₃OD; 600 MHz).

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

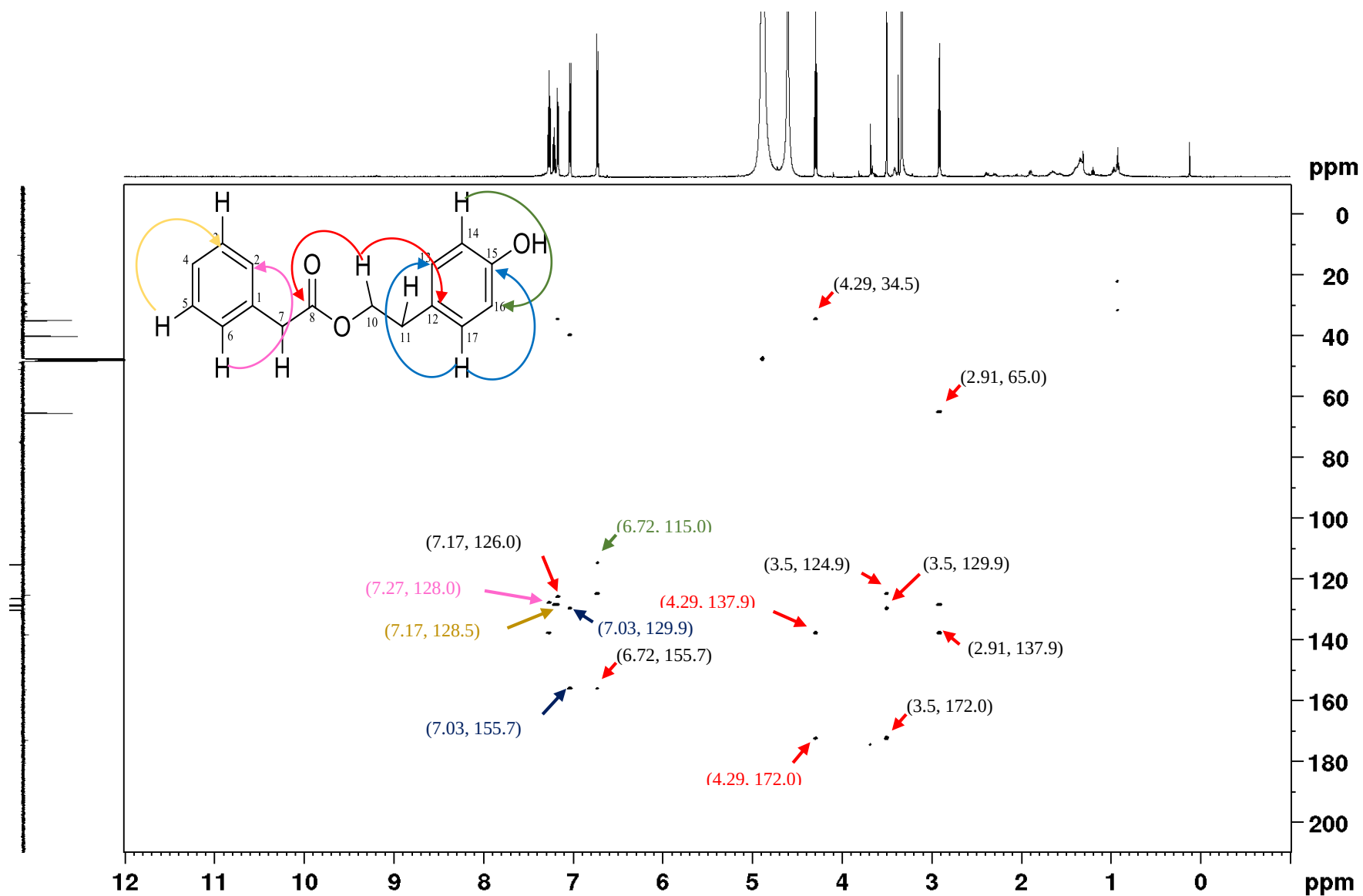


Figura 89 – Mapa de contornos HMBC da subfração 4.7B (CD_3OD ; 600 MHz).

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

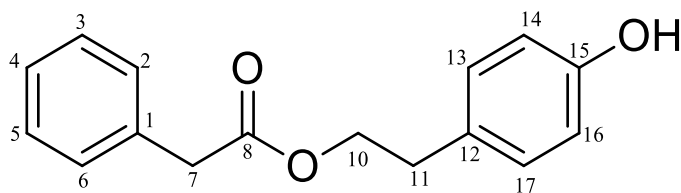


Figura 90 – Estrutura da monaspilosina.

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

Tabela 4 – Dados de RMN da subfração 4.7B e para a monaspilosina (600 MHz; CD₃OD).

4.7B			Monaspilosina	
Nº	δ _c	δ _H (ppm) <i>J</i> (mult. e Hz)	δ _c	δ _H (ppm) e <i>J</i> (mult. e Hz)
1	124,9	-	133,9	-
2	128,0	7,27 (m)	129,3	7,09(m)
3	128,5	7,17 (m)	127,1	7,09(m)
4	126,0	7,21 (m)	128,5	7,09(m)
5	128,5	7,17 (m)	127,1	7,09(m)
6	128,0	7,27 (m)	129,3	7,09(m)
7	40,0	3,50 (s)	41,4	3,60 (s)
8	172,0	-	171,6	-
10	65,0	4,29 (t, 6,72)	65,6	4,26 (t, 7,0)
11	34,5	2,91 (t, 6,83)	34,1	2,84 (t, 7,0)
12	137,9	-	129,6	-
13	129,9	7,03 (m)	130,0	7,0 (d, 8,8)
14	115,0	6,72 (m)	115,3	6,72 (d, 8,8)
15	155,7	-	154,2	-
16	115,0	6,72 (m)	115,3	6,72 (d, 8,8)
17	129,9	7,03 (m)	130,0	7,0 (d, 8,8)
OH-15	-	4,6 (s)	-	4,90 (s)

Fonte: Elaborada pela Autora (2022). * 400 MHz, CDCl₃ (CHENG *et. al.*, 2008).

Cheng *et. al.* (2020) isolaram a monaspilosina do fungo *Monascus pilosus* BCRC 38072. A substância apresentou atividade moderada frente ao sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) com 40 % de inibição.

Outro estudo, realizado com monaspilosina sintetizada relatou a inatividade da estrutura em estudo citotóxico frente a células de carcinoma epitelial humano, câncer de mama e a fibroblastos de rim de macaco verde africano, e atividade antimalárica (TADPETCH *et. al.*, 2015).

5. CONCLUSÃO

O progresso científico vem permitindo o isolamento, elucidação estrutural e o desenvolvimento de fármacos com o princípio ativos desses produtos naturais de forma pura e controlada, para garantir eficácia e segurança. Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram a importância dos estudos com organismos marinhos, principalmente fungos endofíticos que representam uma fonte rica de novos bioativos e de novas estruturas.

Com os estudos realizados usando o GNPS foi possível analisar os constituintes presentes em dois meios de cultivos diferentes, em variados tempos de cultivo e nas frações obtidas através do extrato líquido de MBD. Com o auxílio da plataforma do GNPS foi possível identificar diversas estruturas, dentre elas, uma isocumarina, 6,8-diidroxí-3-metil-isocumarina, com potencial inibidor da guanosina-3',5'-monofosfato fosfodiesterase. Estruturas semelhantes a constituintes isolados anteriormente por Rufino (2019) e Chang *et. al.* (2014).

Além da isocumarina também pode-se destacar a identificação de nicotinamida e 4-hidroxi-6-metil-2-pirona através da plataforma do GNPS, estruturas isoladas anteriormente por Chang *et. al.* (2014). A emetina estrutura anotada nos cultivos de 7, 14, 21 e 35 dias e com um cosseno de 0,91 também deve-se destaque devido ao seu recente estudo realizado por Kumar *et. al.* (2021) o qual apresentou atividade contra anti-SARS-CoV-2.

Com o uso do GNPS e da técnica cromatográfica CLAE-DAD, foi possível isolar duas estruturas ainda não relatadas nessa espécie de fungo: daldinona C e monaspilosina, a partir do extrato de batata do fungo *Hypoxylon investiens*. Para identificação estrutural utilizou-se dados do RMN uni e bidimensional e espectrometria de massas. Na literatura identificou estudos utilizando a daldinona C os quais relatam atividade inibitória da acetilcolinesterase na concentração de 50µg/mL e outro estudo relatando atividade citotóxica frente à linhagem de células de câncer colorretal humano.

Por outro lado, a monaspilosina apresentou atividade moderada frente ao sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) com 40 % de inibição e inatividade da estrutura em estudo citotóxico frente a células de carcinoma epitelial humano, câncer de mama e a fibroblastos de rim de macaco verde africano, e atividade antimalárica. As duas estruturas se mostram promissoras para o contínuo estudo de suas bioatividade.

Considerando o fungo estudado, *H.investiens*, e o pouco conhecimento que se tem sobre a espécie pode-se inferir que o presente projeto contribui para o conhecimento do perfil químico do fungo e a quimiodiversidade de micro-organismos marinhos da costa brasileira.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HADI, A. *et. al.* Stroke preventing effect of resveratrol isolated from fungi and in vivo activity in male albino rats. **Journal of King Saud University-Science**, v. 34, n. 5, p. 102074, 2022.
- ASPARAGOPSIS taxiformis*. **INaturalist**, 06 de abr. de 2018. Disponível em: <https://www.inaturalist.org/photos/14933172>. Acessado em: 30 jan. 2022.
- APPROVED Marine Drugs. **Marine Pharmacology**, 21 jan. 2022. Disponível em: <https://www.marinepharmacology.org/approved>. Acessado em: 30 jan. 2022.
- BARRECA, M. *et. al.* Marine anticancer agents: an overview with a particular focus on their chemical classes. **Marine Drugs**, v. 18, n. 12, p. 619-647, 2020.
- BARZKAR, N. *et. al.* Metabolites from marine microorganisms, micro, and macroalgae: Immense scope for pharmacology. **Marine drugs**, v. 17, n. 8, p. 464-493, 2019.
- BECKER, K.; STADLER, M. Recent progress in biodiversity research on the Xylariales and their secondary metabolism. **The Journal of Antibiotics**, v. 74, n. 1, p. 1-23, 2021.
- BERLINCK, R. G. S. *et. al.* A química de produtos naturais do Brasil do século XXI. **Química Nova**, v. 40, p. 706-710, 2017.
- CARBALLO, G. B. *et. al.* Cyclopamine sensitizes glioblastoma cells to temozolomide treatment through sonic hedgehog pathway. **Life Sciences**, v. 257, p. 118027, 2020.
- CARROLL, A. R. *et. al.* Marine natural products. **Natural product reports**, v. 38, n. 2, p. 362-413, 2021.
- CHANG, C. *et. al.* Inhibitory effects of constituents of an endophytic fungus *Hypoxyton investiens* on nitric oxide and interleukin-6 production in RAW264. 7 Macrophages. **Chemistry & biodiversity**, v. 11, n. 6, p. 949-961, 2014.
- CHEN, L. *et. al.* β -Ecdysterone from *Cyanotis arachnoidea* exerts hypoglycemic effects through activating IRS-1/Akt/GLUT4 and IRS-1/Akt/GLUT2 signal pathways in KK-Ay mice. **Journal of functional foods**, v. 39, p. 123-132, 2017.
- CHENG, M. *et. al.* Secondary metabolites from the mycelia of the fungus *Monascus pilosus* BCRC 38072. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 3, p. 394-397, 2008.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.
- DESHMUKH, S. K.; PRAKASH, V.; RANJAN, N. Marine fungi: a source of potential anticancer compounds. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2536, 2018.
- DIXON, R. A.; FERREIRA, D. Genistein. **Phytochemistry**, v. 60, n. 3, p. 205-211, 2002.
- DONG, X. *et. al.* Emodin: a review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 8, p. 1207-1218, 2016.

GENOVESE, G. *et. al.* In vitro evaluation of antibacterial activity of *Asparagopsis taxiformis* from the Straits of Messina against pathogens relevant in aquaculture. **Marine environmental research**, v. 73, p. 1-6, 2012.

GU, W. *et. al.* Cytotoxic benzo [j] fluoranthene metabolites from *Hypoxylon truncatum* IFB-18, an endophyte of *Artemisia annua*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 1, p. 114-117, 2007.

HAN, Y. *et. al.* Ginsenoside Rg3 exerts a neuroprotective effect in rotenone-induced Parkinson's disease mice via its anti-oxidative properties. **European journal of pharmacology**, v. 909, p. 174413, 2021.

HE, Y. *et. al.* Biosynthesis of benzoylformic acid from benzoyl cyanide by a newly isolated *Rhodococcus sp.* CCZU10-1 in toluene–water biphasic system. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 88-95, 2012.

HE, Y. *et. al.* Dietary daidzein inhibits hepatitis C virus replication by decreasing microRNA-122 levels. **Virus Research**, v. 298, p. 198404, 2021.

HEGDE, V. R. *et. al.* Naturally produced isocoumarins: inhibitors of calmodulinsensitive cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate phosphodiesterase. **Journal of industrial microbiology**, v. 4, n. 3, p. 209-213, 1989.

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

IMHOFF, J. F. Natural products from marine fungi: still an underrepresented resource. **Marine drugs**, v. 14, n. 1, p. 19, 2016.

KUHNERT, E. *et. al.* Secondary metabolite biosynthetic diversity in the fungal family Hypoxylaceae and Xylaria hypoxylon. **Studies in mycology**, v. 99, p. 100118, 2021.

KUMAR, R. *et. al.* Emetine suppresses SARS-CoV-2 replication by inhibiting interaction of viral mRNA with eIF4E. **Antiviral research**, v. 189, p. 105056, 2021.

KUO, T.; HUANG, H.; HSU, C. Mass spectrometry imaging guided molecular networking to expedite discovery and structural analysis of agarwood natural products. **Analytica chimica acta**, v. 1080, p. 95-103, 2019.

LEANDRO, A.; PEREIRA, L.; GONÇALVES, A. M. M. Diverse applications of marine macroalgae. **Marine drugs**, v. 18, n. 1, p. 17, 2020.

LEE, D. *et. al.* Protective effect of hypoxylonol C and 4, 5, 4', 5'-tetrahydroxy-1, 1'-binaphthyl isolated from *Annulohypoxylon annulatum* against streptozotocin-induced damage in INS-1 cells. **Bioorganic Chemistry**, v. 90, p. 103053, 2019.

LEE, M. J. *et. al.* Chemical Investigation of Diketopiperazines and N-Phenethylacetamide Isolated from *Aquimarina sp.* MC085 and Their Effect on TGF- β -Induced Epithelial–Mesenchymal Transition. **Applied Sciences**, v. 11, n. 19, p. 8866, 2021.

LI, S. *et. al.* Novel natural compounds from endophytic fungi with anticancer activity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 156, p. 316-343, 2018.

LIU, H. *et. al.* The fascinating effects of baicalein on cancer: a review. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 10, p. 1681, 2016.

MAYER, A. M. S. *et. al.*. Marine pharmacology in 2016–2017: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Marine Drugs**, v. 19, n. 2, p. 49, 2021.

MEDINA, R. P. **Prospecção química e biológica das algas vermelhas *Asparagopsis taxiformis* e *Pyropia spiralis* e seus fungos endofíticos**. 2016. 430f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2019.

MONTEIRO, S. da C.; BRANDELLI, C. L. C. **Farmacobotânica: aspectos teóricos e aplicação**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017. 160 p.

NOGUEIRA, L. J.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch. **Revista virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 227-240, 2009.

NOOR, A. O. *et. al.* Naturally occurring isocoumarins derivatives from endophytic fungi: Sources, isolation, structural characterization, biosynthesis, and biological activities. **Molecules**, v. 25, n. 2, p. 395, 2020.

PAPON, N.; COPP, B. R.; COURDAVAULT, V. Marine drugs: biology, pipelines, current and future prospects for production. **Biotechnology advances**, v. 54, p. 107871, 2022.

PILON, A. C. *et. al.* Redes moleculares: uma análise sobre anotações e descoberta de novos ativos. **Química Nova**, v. 44, p. 1168-1179, 2021.

PINTO, A. C. *et. al.* Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

PODURI, R. **Drug Discovery and Development**. India: Central University on Punjab, 2021. *E-book*. 522 p. DOI 10.1007/978-981-15-5534-3. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-981-15-5534-3.pdf>. Acessado em: 22 de fev. 2022.

QUINN, R. A. *et. al.* Molecular networking as a drug discovery, drug metabolism, and precision medicine strategy. **Trends in pharmacological sciences**, v. 38, n. 2, p. 143-154, 2017.

RAMOS, A. E. F. *et. al.* Natural products targeting strategies involving molecular networking: different manners, one goal. **Natural product reports**, v. 36, n. 7, p. 960-980, 2019.

RANA, K. L. *et. al.* Endophytic fungi: biodiversity, ecological significance, and potential industrial applications. **Springer nature switzerland**, 2019. p. 1-62.

RAUF, A. *et. al.* A comprehensive review of the health perspectives of resveratrol. **Food & function**, v. 8, n. 12, p. 4284-4305, 2017.

RUFINO, V. H. L. **Bioprospecção do fungo endofítico *Hypoxylon investiens* isolado da alga marinha *Asparagopsis taxiformis* para obtenção de compostos bioativos**. 2019. 112 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2019.

SAKINBOYE, E.; BAKARE, O. Biological activities of emetine. **The Open Natural Products Journal**, v. 4, n. 1, 2011.

SILVA, A. D. **Bioprospecção do fungo endofítico *Hypoxylon investiens* associado à alga marinha *Asparagopsis taxiformis*: potencial antifúngico, anticolinesterásico e antitumoral**. 2016. 151 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

SUN, L. *et al.* Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of endocrocin and emodin. **Metabolic engineering**, v. 54, p. 212-221, 2019.

TADPETCH, K. *et al.* Cytotoxic naphthoquinone and a new succinate ester from the soil fungus *Fusarium solani* PSU-RSPG227. **Phytochemistry Letters**, v. 11, p. 106-110, 2015.

TIAM, S. K. *et al.* Insights into the diversity of secondary metabolites of *Planktothrix* using a biphasic approach combining global genomics and metabolomics. **Toxins**, v. 11, n. 9, p. 498, 2019.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. da S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

VOSER, T. M.; CAMPBELL, M. D.; CARROLL, A. R. How different are marine microbial natural products compared to their terrestrial counterparts?. **Natural Product Reports**, 2022.

VUCKO, M. J. *et al.* The effects of processing on the in vitro antimethanogenic capacity and concentration of secondary metabolites of *Asparagopsis taxiformis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 3, p. 1577-1586, 2017.

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, Aug. 2016.

WANG, Q. *et al.* Polyketides with antimicrobial activity from the solid culture of an endolichenic fungus *Ulocladium* sp. **Fitoterapia**, v. 83, n. 1, p. 209-214, 2012.

WATROUS, J. *et al.* Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 26, p. E1743-E1752, 2012.

WU, Y. *et al.* Cryptotanshinone: a review of its pharmacology activities and molecular mechanisms. **Fitoterapia**, v. 145, p. 104633, 2020.

YANG, N. N. *et al.* Naphthrene compounds from mycelial fermentation products of *Marasmius berteroi*. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 3898, 2020.

YUAN, C. *et al.* New α -pyrones from an endophytic fungus, *Hypoxylon investiens* J2. **RSC advances**, v. 9, n. 47, p. 27419-27423, 2019.

ZANNELLA, C. *et al.* Antiviral activity of vitis vinifera leaf extract against SARS-CoV-2 and HSV-1. **Viruses**, v. 13, n. 7, p. 1263, 2021.

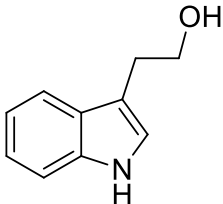
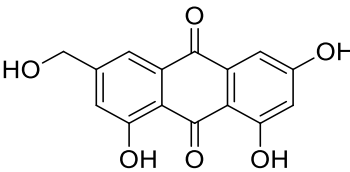
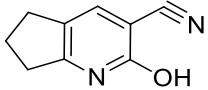
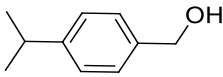
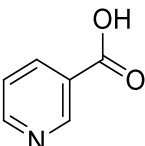
ZHANG, P.; LI, X.; WANG, B.. Secondary metabolites from the marine algal-derived endophytic fungi: Chemical diversity and biological activity. **Planta medica**, v. 82, n. 09/10, p. 832-842, 2016.

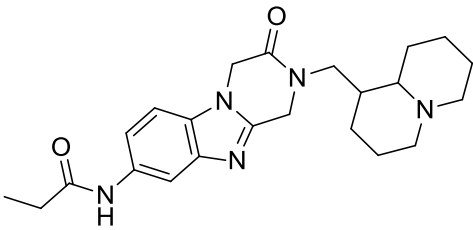
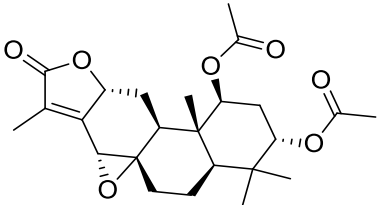
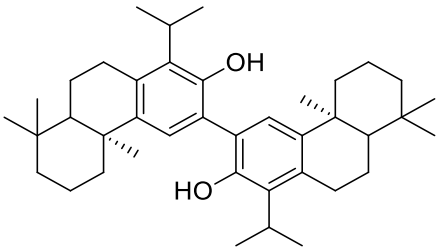
ZHANG, X. *et al.* Characterization of the metabolites of irisflorentin by using ultra-high performance liquid chromatography combined with quadrupole/orbitrap tandem mass

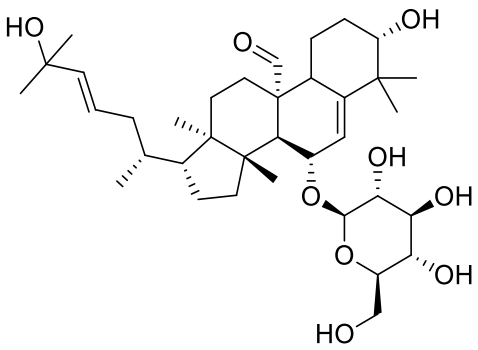
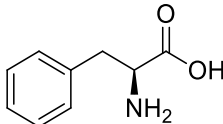
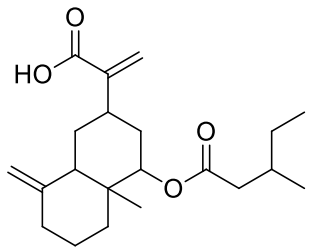
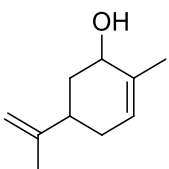
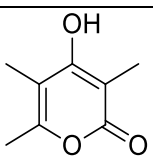
spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 203, p. 114222, 2021.

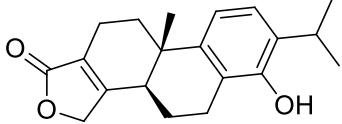
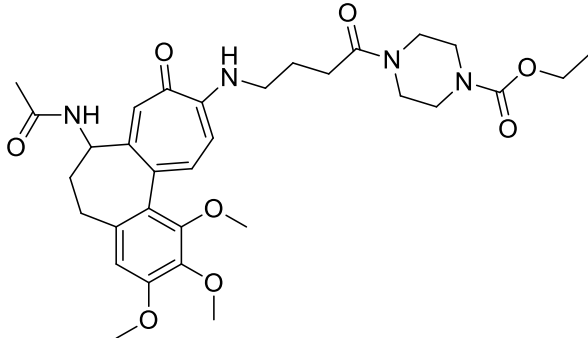
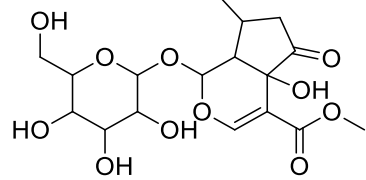
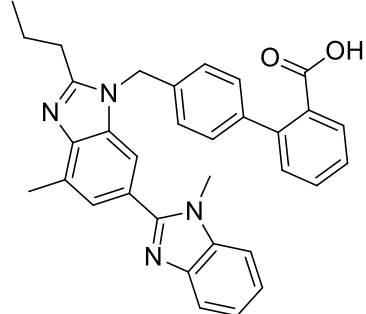
APÊNDICE

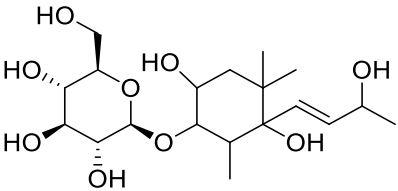
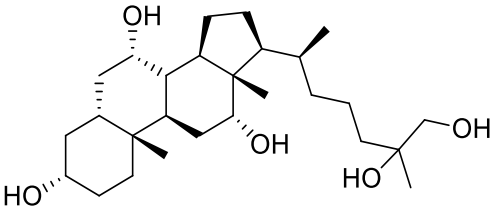
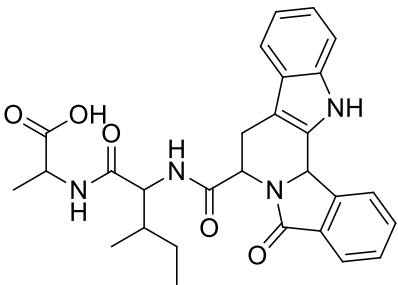
Apêndice A – Tabela dos constituintes identificados pelo GNPS modo positivo.

Extrato/ Fração	Composto	m/z	Cosseno	Classificação da biblioteca
Arroz	 3- (2- hidroxietil)indol	144.00	0,80	Bronze
Arroz	 Citreoroseína	287.00	0,76	Bronze
Arroz	 2-hidroxi-6,7-diidro-5H-ciclopenta[b]piridina-3-carbonitrila	161.01	0,72	Gold
Arroz	 (4-isopropilfenil) metanol	133.01	0,79	Bronze
Ext. 7 dias Ext. 14 dias Ext. 21 dias Ext. 28 dias Ext. 35 dias	 Ácido nicotínico	123.99	0,92	Bronze

Ext. 7 dias Ext. 14 dias Ext. 21 dias Ext. 28 dias Ext. 35 dias	 N-(2-(((1S,9aR)-octahidro-1H-quinolizin-1-il)methyl)-3-oxo-1,2,3,4-tetrahidrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pirazin-8-il)propionamida	410.30	0,8	Gold
Ext. 7 dias Ext. 14 dias Ext. 21 dias Ext. 28 dias Ext. 35 dias	 (1aS,3aR,5S,7S,7aR,7bS,8aR,11bR)-4,4,7a,11-tetrametil-10-oxo-3,3a,4,5,6,7,7a,7b,8,8a,10,11b-dodecahidro-2H-oxireno[2',3':1,10a]fenantro[3,2-b]furan-5,7-diil diacetato	415.20	0,75	Gold
Ext. 7 dias Ext. 14 dias Ext. 21 dias Ext. 35 dias	 (4bS,4'bS)-1,1'-diisopropil-4b,4'b,8,8,8',8'-hexametil-4b,4'b,5,5',6,6',7,7',8,8a,8',8'a,9,9',10,10'-hexadeca-hidro-[3,3'-bifenantreno]-2,2'-diol	569.44	0,88	Bronze

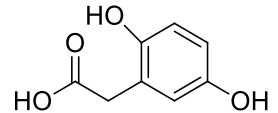
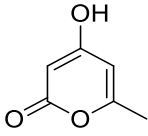
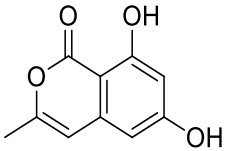
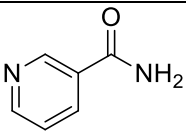
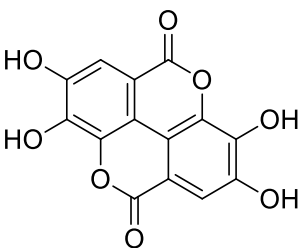
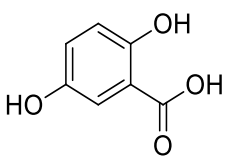
Ext. 7 dias Ext. 14 dias Ext. 21 dias Ext. 35 dias Fração 2 Fração 3 Fração 6 Fração 7 Fração 9 Fração 10	 Momordicosideo L	657.39	0,80	Gold
Ext. 7 dias Ext. 14 dias Ext. 21 dias Ext. 35 dias	 Ácido (S)-2-amino-3-fenilpropanoico	166.04	0,87	Gold
Ext. 7 dias Ext. 14 dias Ext. 21 dias Ext. 35 dias Frações 1-7 Frações 9-10	 Ácido 2-(4a-metil-8-metileno-4-((3-metilpentanoil)oxi)decahidronaftalen-2-il)acrílico	349.16	0,87 0,90	Bronze
Ext. 35 dias	 Carveol	135.03	0,7	Bronze
Ext. 14 dias Ext. 21 dias Ext. 35 dias	 4-hidroxi-3,5,6-trimetilpiran-2-ona	155.03	0,74	Gold

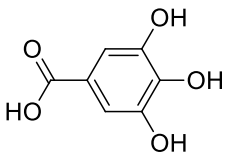
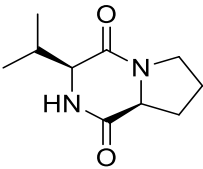
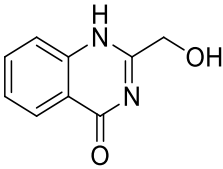
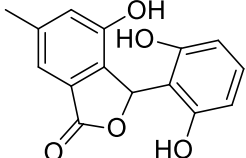
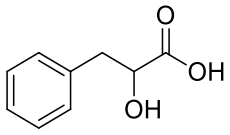
Fração 7	 (3bR,9bS)-6-hidroxi-7-isopropil-9b-metil-3b,4,5,9b,10,11-hexa-hidrofenantro[1,2-c]furan-1(3H)-ona	311.22	0,87	Bronze
Fração 7 Fração 10	 etil 4-(4-((7-acetamido-1,2,3-trimetoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[a]heptalen-10-il)amino)butanoil)piperazina-1-carboxilato	633.47	0,83	Gold
Fração 3 Fração 6 Fração 7 Fração 10	 Hastatosídeo	427.29	0,88	Gold
Fração 6 Fração 7 Fração 10	 Ácido 4'-((1,7'-dimetil-2'-propil-1H,3'H-[2,5'-bibenzo[d]imidazol]-3'-il)metil)-[1,1'-bifenil]-2-	515.36	0,81	Bronze

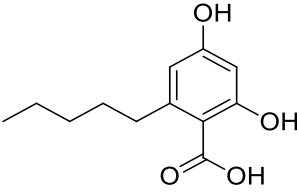
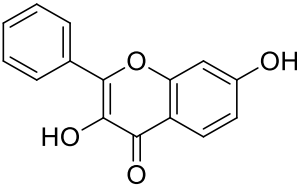
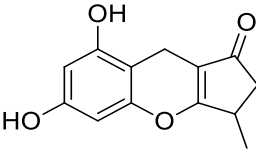
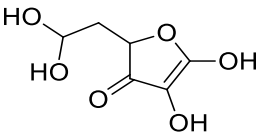
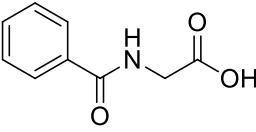
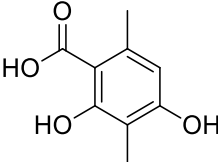
	carboxílico			
Fração 1 Fração 2 Fração 3 Fração 4 Fração 5 Fração 6 Fração 7 Fração 9 Fração 10	 (2R,3R,4S,5S,6R)-2-((3,6-diidroxi-3-((E)-3-hidroxibut-1-en-1-il)-2,4,4-trimetilciclohexil)oxi)-6-(hidroximetil)tetra-hidro-2H-piran-3,4,5-triol	429.30	0,85	Gold
Fração 1 Fração 2 Fração 3 Fração 4 Fração 5 Fração 6 Fração 10	 (3S,5R,7S,8R,9R,10R,12R,13S,14R,17S)-17-((2S)-6,7-diidroxi-6-metilheptan-2-il)-10,13-dimetilhexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantreno-3,7,12-triol	475.31	0,88	Gold
Fração 2 Fração 3 Fração 4 Fração 6 Fração 7 Fração 9 Fração 10	 Ácido 2-(3-metil-2-(5-oxo-7,8,13,13b-tetra-hidro-5H-benzo[1,2]indolizino[8,7-b]indole-7-carboxamido)pentanamido)propanoico	525.29	0,90	Gold

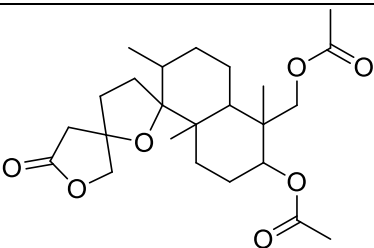
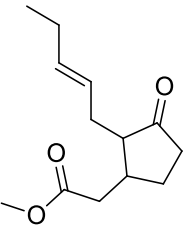
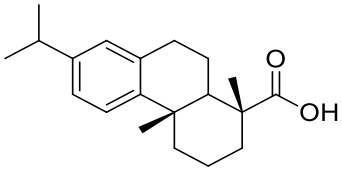
Fonte: Elaborada pela Autora (2022).

Apêndice B – Tabela dos constituintes identificados pelo GNPS modo negativo.

Extrato/ Fração	Composto	<i>m/z</i>	Cosseno	Classificação da biblioteca
MBD	 Ácido homogentísico	166.97	0,89	Gold
MBD	 4-hidroxi-6-metil-2-pirona	126.97	0,70	Bronze
MBD	 6,8-diidroxi-3-metil-1H-isocromon-1-ona	190.98	0,75	Bronze
MBD	 Nicotinamida	122.98	0,79	Gold
Arroz MBD	 Ácido Elágico	300.95	0,87	Bronze
Arroz MBD	 Ácido 2,5-dihidroxibenzóico	152.98	0,81	Gold

Arroz MBD	 Ácido Gálico	168.94	0,90	Bronze
Extr. 7 dias	 Ciclo(L-Val-L-Pro)	197.07	0,91	Bronze
Ext. 7 dias Ext. 14 dias Ext. 21 dias Ext. 28 dias	 2-(hidroximetil)-4(3H)-quinazolinona	177.00	0,87	Bronze
Ext. 14 dias Ext. 21 dias Ext. 28 dias Ext. 35 dias Fração 2 Fração 3 Fração 4 Fração 5	 3-(2,6-diidroxifenil)-4-hidroxi-6-metilisobenzofuran-1(3H)-ona	271.02	0,75 0,72	Bronze
Ext. 14 dias Ext. 21 dias Ext. 28 dias Ext. 35 dias	 Ácido 2-hidroxi-3-fenilpropanoico	165.00	0,92	Bronze
Ext. 14 dias Ext. 21 dias Ext. 28 dias		223.01	0,72	Bronze

Ext. 35 dias	 Ácido 2,4-diidroxi-6-pentilbenzóico			
Ext. 7 dias Ext. 14 dias Ext. 21 dias Ext. 28 dias Ext. 35 dias	 3,7-diidroxi-2-fenil-4H-cromon-4-ona	253.00	0,97	Bronze
Ext. 7 dias Ext. 14 dias Ext. 21 dias Ext. 28 dias Ext. 35 dias	 6,8-diidroxi-3-metil-2,3-diidrociopenta[b]cromon-1(9H)-a	233.00	0,80	Bronze
Ext. 7 dias Ext. 14 dias Ext. 21 dias Ext. 28 dias Ext. 35 dias	 Ascorbato	174.99	0,93	Gold
Ext. 14 dias Ext. 21 dias Ext. 35 dias	 Ácido 2-benzoamidoacético	178.00	0,90	Gold
Extr. 7 dias Ext. 35 dias	 Ácido 2,4-diidroxi-3,6-dimetilbenzóico	181.00	0,89	Bronze
Fração 5		459.31	0,81	Gold

	 (1R,2R,5R,5'S,6S,8aS)-6-(acetiloxi)-2,5,8a-trimetil-5''-oxo-octahidro-2H-dispiro[naftaleno-1,2':5',3''-bis(oxolano)]-5-il metil acetato			
Fração 3	 (E)-metil 2-(3-oxo-2-(pent-2-en-1-il)ciclopentil)acetato	247.01	0,74	Gold
Fração 5 Fração 6	 Ácido (1R,4aS)-7-isopropil-1,4a-dimetil-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octa-hidrofenantreno-1-carboxílico	299.03	0,85	Bronze

Fonte: Elaborada pela Autora (2022).