

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 29/05/2022.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
INSTITUTO DE QUÍMICA – ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA**

**NuBBE - Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de
Produtos Naturais**

NATÁLIA CAROLINA VIEIRA

**Estudo químico de fungos da rizosfera de *Senna spectabilis* utilizando abordagem
OSMAC e ferramentas analíticas do estado da arte para anotação e caracterização de
metabólitos.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

**Araraquara
2020**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
INSTITUTO DE QUÍMICA – ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA**

NATÁLIA CAROLINA VIEIRA

Estudo químico de fungos da rizosfera de *Senna spectabilis* utilizando abordagem OSMAC e ferramentas analíticas do estado da arte para anotação e caracterização de metabólitos.

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Araraquara - SP
2020

FICHA CATALOGRÁFICA

V657e Vieira, Natália Carolina
Estudo químico de fungos da rizosfera de *Senna spectabilis* utilizando abordagem OSMAC e ferramentas analíticas do estado da arte para anotação e caracterização de metabólitos / Natália Carolina Vieira. – Araraquara : [s.n.], 2020
197 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Ian Castro-Gamboa

1. Produtos naturais. 2. Fungos. 3. Metabolômica.
4. Espectrometria de massa. 5. Ressonância magnética nuclear.
I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Estudo químico de fungos da rizosfera de *Senna spectabilis* utilizando abordagem OSMAC e ferramentas analíticas do estado da arte para anotação e caracterização de metabólitos"

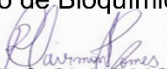
AUTORA: NATÁLIA CAROLINA VIEIRA

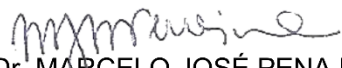
ORIENTADOR: IAN CASTRO GAMBOA

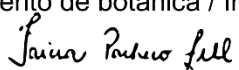
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. IAN CASTRO GAMBOA
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof.ª Dr.ª ANGELA REGINA ARAUJO
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. PAULO CLAIRMONT FEITOSA DE LIMA GOMES
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. MARCELO JOSÉ PENA FERREIRA
Departamento de botânica / Instituto de Biociências - USP - São Paulo


Prof.ª Dr.ª TAICIA PACHECO FILL
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNICAMP - Campinas

Araraquara, 29 de maio de 2020

DADOS CURRICULARES

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2016-2020

Doutorado em Química

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

Título: Estudo químico de fungos da rizosfera de *Senna spectabilis* utilizando abordagem OSMAC e ferramentas analíticas do estado da arte para anotação e caracterização de metabólitos.

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

2014-2016

Mestrado em Química

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

Título: Estudos de fungos filamentosos isolados da rizosfera de *Senna spectabilis*: uma exploração racional da biodiversidade molecular com potencial citotóxico e anticolinesterásico.

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

2009-2013

Graduação em Licenciatura em Química

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

FORMAÇÃO ACADÊMICA COMPLEMENTAR

2010 – 2013

Iniciação Científica

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

Título: Desenvolvimento de método analítico rápido para detecção de adulteração de etanol por metanol em postos de abastecimento de combustíveis automotivos.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Pezza

Bolsista: CNPq-PIBIC

2016

Estágio Docência

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

Curso de Graduação em: Engenharia Química

Nome da Disciplina: Química Orgânica II – Teórica

Carga Horária Total: 60 horas

Professor Responsável pela Disciplina: Ian Castro-Gamboa

2019-2020

Supervisão Científica

Aluna: Júlia Silva Soares (Iniciação Científica).

Título do projeto: *Sorocea bonpladii*: Modelos vegetais para o isolamento de endófitos, visando a exploração racional da diversidade molecular.

(Graduanda em Engenharia Química) - Instituto de Química - UNESP Araraquara.

Bolsista: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

DISCIPLINAS CURSADAS DURANTE O DOUTORADO

1. Aplicações em Quimiometria – Módulo I, **conceito A**
2. Aplicações em Quimiometria – Módulo II, **conceito A**
3. Aplicações em Quimiometria – Módulo III, **conceito A**
4. RMN de Produtos Naturais, **conceito A**
5. Espectrometria de Massas de Produtos Naturais, **conceito A**
6. Estereoquímica e Reatividade de Compostos Orgânicos, **conceito A**

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

1. SELEGATO, DENISE; MONTEIRO, AFIF; VIEIRA, NATÁLIA; CARDOSO, PATRÍCIA; PAVANI, VICTOR; BOLZANI, VANDERLAN; CASTRO-GAMBOA, IAN. Update: Biological and Chemical Aspects of *Senna spectabilis*. Journal of the Brazilian Chemical Society (Impresso), v. 28, p. 415-426, 2016.

2. VIEIRA, N. C., CORTELO, P. C., CASTRO-GAMBOA, I. Rapid qualitative profiling of metabolites presents in *Fusarium solani*, a rhizospheric fungus derived from *Senna spectabilis*, using GC/MS and UPLC-QTOF/MS^E techniques assisted by UNIFI information system. European Journal of Mass Spectrometry, DOI: 10.1177/1469066720922424, 2020.

ARTIGOS SUBMETIDOS

3. FERNANDES, A. C. F, VIEIRA, N. C., SANTANA, A., GANDRA, R., RUBIA, C., CASTRO-GAMBOA, I., MACEDO, J. A., MACEDO, G. A. Peanut skin inhibits inflammation and oxidative stress induced by advanced glycation end products (AGEs) in RAW264.7 cells. Food and Chemical Toxicology, (**submitted**) 2020.

ARTIGOS EM ANDAMENTO

4. VIEIRA, N. C., PILON, A. C., MONTEIRO, A. F., DA SILVA, R. R., LOPES, N. P., CASTRO-GAMBOA, IAN. *Molecular networking*: uma abordagem para anotação e descoberta de produtos naturais. Química Nova, (**manuscript**) 2020.

TEXTOS EM JORNAIS DE NOTÍCIAS/REVISTAS

1. PAVANI, V. D.; Fernandes, R. P.; VIEIRA, N. C.; Cardoso, P.; CASTRO-GAMBOA, I. Desreplicação dos metabólitos produzidos por *Fusarium oxysporum* isolado da rizosfera de *Senna spectabilis*. Ciência e Tecnologia, Jaboticabal, Sp, p. 1 - 6.
2. VIEIRA, N. C.; CASTRO-GAMBOA, I. Identificação, por desreplicação, de ácidos orgânicos produzidos por *Fusarium oxysporum*. Ciência, Tecnologia e Ambiente.

APRESENTAÇÕES DE TRABALHOS

1. ZANATTA, A. C, VIEIRA, N. C., VILEGAS, W. Molecular networking based-analysis and assessment of total flavonoid content of *Byrsonima intermedia*. XXVIII Congresso Internacional de la Sociedad Italo-Latinoamericana de ETNOMEDICINA. 2019.
2. VIEIRA, N. C.; CASTRO-GAMBOA, I. Estudo metabolômico de fungos isolados da rizosfera de *Senna spectabilis* via molecular networking e RMN. 2019. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
3. VIEIRA, N. C.; CASTRO-GAMBOA, I. Identificação, por desreplicação, de ácidos orgânicos produzidos por *Fusarium oxysporum*. 2017. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
4. VIEIRA, N. C.; MONTEIRO, AFIF; CASTRO-GAMBOA, I; ARAUJO, A. R.A; SILVA, D. H. S. Bioprospection of microorganisms from the rizosphere of *Senna spectabilis*. 2017. (Apresentação de Trabalho/Outra).
5. VIEIRA, N. C.; CASTRO-GAMBOA, I. Dereplication of metabolites from *Purpureocillium lilacinum*, a rhizospheric fungus isolated from *Senna spectabilis*: researching from a OSMAC approach. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
6. PAVANI, V. D.; Fernandes, R. P.; VIEIRA, N. C.; Cardoso, P.; CASTRO-GAMBOA, I. Desreplicação dos metabólitos produzidos por *Fusarium oxysporum* isolado da rizosfera de *Senna spectabilis*. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS, CONGRESSOS, EXPOSIÇÕES E FEIRAS

1. XII Simpósio Brasileiro de Farmacognosia e XVII Simpósio Latinoamericano de Farmacobotânica. Estudo metabolômico de fungos isolados da rizosfera de *Senna spectabilis* via molecular networking e RMN. 2019. (Simpósio).
2. 6th BCNP. Dereplication of metabolites from *Purpureocillium lilacinum*, a rhizospheric fungus isolated from *Senna spectabilis*: researching from a OSMAC approach. 2017. (Congresso).

3. 9º Reunião Anual de avaliação do programa BIOTA-FAPESP. Bioprospection of microorganisms from the rizosphere of *Senna spectabilis*. 2017. (Outra).
4. VIII Simpósio de Microbiologia Aplicada. Identificação, por desreplicação, de ácidos orgânicos produzidos por *Fusarium oxysporum*. 2017. (Simpósio).

Dedico esta tese a
Deus,
a minha família,
meus pais, irmãos e Adriano,
ao NuBBE
e ao Professor Ian

AGRADECIMENTOS

Agradeço

a UNESP e ao Instituto de Química pela oportunidade de realizar o meu doutorado nessa renomada instituição,

a CAPES, pelo Apoio à Pós-Graduação, ao Portal de Periódicos e também pela bolsa de doutorado concedida,

ao CNPq e FAPESP através dos financiamentos de pesquisa CEPID CIBFar - processo# 2013/07600-3 e INCT BioNat - processo# 465637/2014-0, 2014/50926-0,

a todos os funcionários do Instituto de Química, pelo auxílio em todos os setores,

ao grupo NuBBE, professores e amigos por tornarem nosso ambiente de trabalho muito saudável, acolhedor e produtivo,

aos técnicos João, Juliana e Marquinhos por todo o auxílio,

ao querido técnico e amigo Nivaldo, por todo o conhecimento que ele nos passa e também pelas nossas conversas durante o café,

ao Richard Fernandes pela ajuda nas Análises de Componentes Principais,

a Professora Dra. Lourdes Campaner, por permitir utilizar o seu laboratório para realizar a purificação das substâncias deste trabalho,

a Professora Dra. Isabele Nascimento e a Camila pelas medidas de rotação óptica,

ao Professor Dr. Norberto Peporine Lopes por possibilitar as análises de HPLC-ESI-microTOF II-TOF-MS,

as Professoras Dra. Ilana L. B. C. Camargo e Dra. Letícia Lotufo pela realização dos ensaios biológicos antibacteriano e citotóxico, respectivamente,

agradeço aos meus amigos da orgânica, pois sempre pude ter essas pessoas incríveis para contar, principalmente a Aninha e o Tony nos momentos mais difíceis,

agradeço, em especial, meu querido orientador e amigo Professor Ian, por sempre ser compreensivo, incentivador e afetuoso, o qual tenho muito carinho e admiração,

agradeço ao meu noivo, Adriano, por toda compreensão durante os períodos conturbados que passei nos quatro anos de doutorado e por sempre demonstrar o seu amor e apoio,

agradeço muito a minha família, em especial meus pais e irmãos, por todo apoio, amor e dedicação, já que são a minha base,

e claro, a Deus por me ter me dado uma família tão maravilhosa.

RESUMO

A utilização de produtos naturais pela humanidade, como agentes terapêuticos, é descrita desde primórdios da antiguidade e representam um importante aliado no tratamento de doenças. Com isso a busca por novas ferramentas analíticas mais robustas, com abordagem metabolômica se faz necessária, de forma a otimizar e acelerar a busca por novas moléculas e substâncias com atividade biológica promissora. Nesse contexto, esse trabalho tem como alvo de estudo, os fungos *Fusarium solani* e *Purpureocillium lilacinum* isolados da rizosfera de *Senna spectabilis*. Essas espécies de microrganismos apresentam muitos estudos químicos relatados na literatura, o que influenciou o interesse em realizar os estudos de OSMAC (*One Strain Many Compounds*). Para, assim, verificar a variação metabólica que acontece com esses fungos em diferentes tipos de cultivo (variando meio de cultura e agitação) incluindo o co-cultivo. Para os extratos obtidos também foram realizados os ensaios biológicos citotóxico e antibacteriano. Foram utilizadas ferramentas analíticas do estado da arte como GC-MS (Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas) e LC-MS (Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas) fazendo uso das ferramentas de bioinformática *Molecular Networking* (ou Rede Molecular) com a plataforma GNPS (*Global Natural Product Social Molecular Networking*) e o UNIFI (Sistema de informação científica – Waters Corporation). A espectrometria de massas (MS) foi uma grande aliada que ajudou a demonstrar a variação do perfil de metabólitos desses microrganismos em diferentes cultivos, no qual foi possível anotar 101 metabólitos nos diferentes extratos avaliados. As substâncias presentes nos extratos que não puderam ser anotadas, foram purificadas levando à caracterização 5 substâncias inéditas, sendo elas γ -pironas, α -pironas e um dipeptídeo. Uma das substâncias isoladas, 6-(11-(hidroximetil)-9-metiloct-7-en-7-il)-2-metóxi-4H-piran-4-ona, foi evidenciada nos extratos de co-cultivo e de *F. solani*. Essa substância apresentou maior concentração nos extratos de co-cultivo de acordo com os resultados de quantificação, mostrando um outro tipo de evidência da OSMAC, que aumenta a produção de substâncias ao variar o tipo de cultivo. Portanto, a utilização de abordagens metabolômicas conseguiu guiar o estudo para caracterização de metabólitos inéditos, mostrando uma alternativa para abordagens reducionistas.

Palavras-chave: Produtos Naturais. Rizosfera. *Senna spectabilis*. *Fusarium solani*. *Purpureocillium lilacinum*. Espectrometria de Massas. GNPS. UNIFI. RMN. OSMAC.

ABSTRACT

The use of natural products by mankind, as therapeutic agents, has been described since ancient times and represents an important ally in the treatment of diseases. Thus, the search for new more robust analytical tools, with a metabolomic approach is necessary, in order to optimize and accelerate the search for new molecules and substances with promising biological activity. In this context, this study is aimed at studying *Fusarium solani* and *Purpureocillium lilacinum* fungi isolated from the rhizosphere of *Senna spectabilis*. These species of microorganisms have many chemical studies reported in the literature, which influenced the interest in carrying out the studies of OSMAC (One Strain Many Compounds). Thus, to verify the metabolic variation that happens with these fungi in different types of cultivation (varying culture medium and agitation) including co-culture. For the extracts obtained, cytotoxic and antibacterial biological tests were also performed. State-of-the-art analytical tools such as GC-MS (Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry) and LC-MS (Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry) were used alongside the bioinformatics tools Molecular Networking with the platform GNPS (Global Natural Product Social Molecular Networking) and UNIFI (Scientific Information System - Waters Corporation). Mass spectrometry (MS) was a great ally that helped to demonstrate the variation of the metabolites profile of these microorganisms in different cultures, in which it was possible to note 101 metabolites in the different extracts evaluated. The substances present in the extracts that could not be annotated, were purified, leading to the characterization of 5 new substances, namely γ -pyrones, α -pyrones and a dipeptide. One of the isolated substances, 6-(11-(hydroxymethyl)-9-methyloct-7-en-7-yl)-2-methoxy-4*H*-pyran-4-one, was evidenced in the co-culture and *F. solani* extracts. This substance showed a higher concentration in co-culture extracts according to the quantification results, showing another type of evidence from OSMAC, which increases the production of substances by varying the type of cultivation. Therefore, the use of metabolomic approaches managed to guide the study to characterize unpublished metabolites, showing an alternative to reductionist approaches.

Keywords: Natural Products. Rhizosphere. *Senna spectabilis*. *Fusarium solani*. *Purpureocillium lilacinum*. Mass Spectrometry. GNPS. UNIFI. NMR. OSMAC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metabólitos secundários com atividade terapêutica isolados de diferentes fontes de produtos naturais	24
Figura 2 - Importantes metabólitos secundários isolados de fungos	26
Figura 3 - <i>Senna spectabilis</i>	27
Figura 4 - <i>Purpureocillium lilacinum</i>	28
Figura 5 - Metabólitos secundários de <i>Purpureocillium lilacinum</i>	29
Figura 6 - <i>Fusarium solani</i>	29
Figura 7 - Metabólitos secundários de espécies de <i>Fusarium</i>	31
Figura 8 - Representação da obtenção dos espectros em MS ² , até a geração da rede de interação molecular no GNPS	36
Figura 9 - A) Obtenção de espectros em MS ^E e B) Desenvolvimento de método no UNIFI até a obtenção do relatório de dados	39
Figura 10 - Esquema do primeiro fracionamento e isolamento por CC e HPLC semi-preparativo do Co-cultivo PSA	52
Figura 11 - Segundo fracionamento por HPLC-PDA semi-preparativo do Co-cultivo PSA	53
Figura 12 - Fungos inicialmente cultivados de <i>Senna spectabilis</i> para teste de viabilidade em meio PDA (frente e verso da placa)	55
Figura 13 - Co-cultivo de CSP-12Ia e CSP-14 com 15 dias de crescimento	56
Figura 14 - Alinhamento do DNA do fungo CSP-12Ia	57
Figura 15 - Alinhamento do DNA do fungo CSP-14	57
Figura 16 - Inibição do crescimento celular (%) dos extratos em linhagem de melanoma (MM- 200), com as concentrações de 5 µg/mL e 50 µg/mL (média ± SEM) (n=2)	61
Figura 17 - Inibição do crescimento celular (%) dos extratos em linhagem de carcinoma mamário (MCF-7), com as concentrações de 5 µg/mL e 50 µg/mL (média ± SEM) (n=2)	62
Figura 18 - Inibição do crescimento celular (%) dos extratos em linhagem não tumoral de pigmento epitelial de retina humana (RPE), com as concentrações de 5 µg/mL e 50 µg/mL (média ± SEM) (n=2)	63
Figura 19 - Regressão não linear do controle positivo doxorrubicina com concentrações de 0,0032 a 10 µM em linhagem de melanoma (MM-200), carcinoma mamário (MCF-7) e pigmento epitelial de retina humana (RPE) (média ± SEM) (n=2)	64
Figura 20 - Análise de Componentes Principais (PC1xPC2) dos fungos <i>Purpureocillium lilacinum</i> (Pl) e <i>F. solani</i> (Fs) e seus co-cultivos (CC). (Gráfico de scores)	66
Figura 21 - Proposta de fragmentação da substância ácido 2-propenóico-3-(4-metoxifenil)-2-etilhexil éster (1) por ionização por elétrons em GC-MS	69
Figura 22 - Proposta de fragmentação da substância ácido 3-hidróxi-decanóico (2) por ionização por elétrons em GC-MS	69
Figura 23 - Proposta de fragmentação da substância 1-indolicarboxaldeído-2-hidróxi-7-metil (17) por ionização por elétrons em GC-MS	70
Figura 24 - Proposta de fragmentação da substância lumicroma (18) por ionização por elétrons em GC-MS	70
Figura 25 - Proposta de fragmentação da substância erucilamida (23) por ionização por elétrons em GC-MS	71
Figura 26 - Proposta de fragmentação da substância tetradecanamida (26) por ionização por elétrons em GC-MS	71

Figura 27 - Proposta de fragmentação da substância 2,5-piperazinadiona-3-(fenilmetil) (28) por ionização por elétrons em GC-MS	72
Figura 28 - Proposta de fragmentação da substância 2,5-piperazinediona-3,6-bis(fenilmetil) (29) por ionização por elétrons em GC-MS	72
Figura 29 - Proposta de fragmentação da substância 3-(hidroximetil)piperazina-2,5-diona (30) por ionização por elétrons em GC-MS	73
Figura 30 - Proposta de fragmentação da substância dehidroergosterol (35) por ionização por elétrons em GC-MS	73
Figura 31 - Proposta de fragmentação da substância γ -sistosterol (36) por ionização por elétrons em GC-MS	74
Figura 32 - Proposta de fragmentação da substância 2-pirrolidina-1-decil (38) por ionização por elétrons em GC-MS	74
Figura 33 - Proposta de fragmentação da substância ácido fusárico (42) por ionização por elétrons em GC-MS	75
Figura 34 - Proposta de fragmentação da substância glicil- <i>L</i> -triptofano (43) por ionização por elétrons em GC-MS	75
Figura 35 - Proposta de fragmentação da substância benzenoetanol- α -(fenilmetil) (44) por ionização por elétrons em GC-MS	76
Figura 36 - Proposta de fragmentação da substância éter cis-2-penten-1-ol-trimetilsilil (46) por ionização por elétrons em GC-MS	76
Figura 37 - Perfil metabólico BPC de <i>P. lilacinum</i> nos diferentes cultivos (CCA, CSA, PCA, PSA) em HPLC-ESI-microTOF II-TOF-MS	84
Figura 38 - Perfil metabólico BPC de <i>F. solani</i> nos diferentes cultivos (CCA, CSA, PCA, PSA) em HPLC-ESI-microTOF II-TOF-MS	84
Figura 39 - Perfil metabólico BPC de co-cultivo nos diferentes cultivos (CCA, CSA, PCA, PSA) em HPLC-ESI-microTOF II-TOF-MS	85
Figura 40 - Representação da rede de interações moleculares obtida para os extratos avaliados, destacando os <i>clusters</i> anotados das paecilotoxinas, ciclosporinas e daidzeína, visualizada no Cytoscape	86
Figura 41 - Produção de daidzeína por <i>P. lilacinum</i> e co-cultivo observada através da rede molecular e o nodo do branco do meio de cultura representado pela daidzina.....	87
Figura 42 - Redução da daidzina em daidzeína	87
Figura 43 - Produção de paecilotoxinas por <i>P. lilacinum</i> e co-cultivo na forma $[M+2H]^{2+}$ observada na rede molecular.....	89
Figura 44 - Produção de paecilotoxinas por <i>P. lilacinum</i> e co-cultivo na forma $[M+H]^+$ observada na rede molecular.....	90
Figura 45 – Padrão de fragmentação da paecilotoxina A.....	91
Figura 46 - <i>Clusters</i> das paecilotoxinas e a anotação de possíveis análogos	92
Figura 47 – <i>Cluster</i> das paecilotoxinas e os espectro de massas da paecilotoxina I e do seu análogo contendo uma diferença de massa relacionada a uma adição de CO	93
Figura 48 - Produção de ciclosporinas por <i>F. solani</i> e co-cultivo na forma $[M+H]^+$ observada na rede molecular.....	95
Figura 49 - Íons fragmentos, via UNIFI, da substância militarinona B (67) por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo.....	99
Figura 50 - Íons fragmentos, via UNIFI da substância fumitremogina B (68) por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo.....	100

Figura 51 - Íons fragmentos, via UNIFI da substância 3,5-dimethoxidiidrofusarubina (71) proposta por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo	101
Figura 52 - Íons fragmentos, via UNIFI da substância peróxido de ergosterol (75) por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo	102
Figura 53 - Íons fragmentos, via UNIFI da substância proposta 3,4-dihidro-4,8-dihidroxi-6-metoxi-4,5-dimetil-3-metile-neisocromen-ona (76) por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo	103
Figura 54 - Íons fragmentos, via UNIFI da substância proposta 5,8-dihidroxi-6-metoxi-3-metil-2-aza-9,10-antracenediona (80) por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo	103
Figura 55 - Íons fragmentos, via UNIFI da substância beauvericina (82) por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo	104
Figura 56 - Íons fragmentos, via UNIFI de algumas diferentes enniatinas sugeridas pelo UNIFI. A) Enniantina A1. B) Enniantinas A2 e D. C) Enniantina B1.	106
Figura 57 - Representação dos tipos de íons fragmentos gerados por CID em peptídeos: a) Tipos de clivagem a/x, b/y e z/c; b) tipos de clivagem w/d	107
Figura 58 - Íons fragmentos, via UNIFI da substância sansalvamida (91) por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo	108
Figura 59 - Íons fragmentos, via UNIFI da substância paecilomicina B (97) por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo	109
Figura 60 - Íons fragmentos, via UNIFI da substância proposta <i>O</i> -glucopiranosil-2- <i>N</i> -(2 -hidroxi-3 -octadecenoil)-3-hidroxi-9-metil-4,8-sfingadienina (98) por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo ...	110
Figura 61 - Íons fragmentos, via UNIFI da substância cerebroside D (99) por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo	111
Figura 62 - Íons fragmentos, via UNIFI da substância flavoglaucina (100) por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo	111
Figura 63 - Espectro BPC do co-cultivo PSA obtido por HPLC-ESI-microTOF II-TOF-MS, e as substâncias <i>m/z</i> 281 e <i>m/z</i> 295 propostas para isolamento	119
Figura 64 - Estrutura química de 4'-hidroxiacetofenona (1)	120
Figura 65 - Espectro de ¹ H RMN (CD ₃ OD, 600 MHz) contendo a mistura das substâncias 1 e 2 destacando os valores de integrais que não são complementares	121
Figura 66 - Espectro HSQC (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 1	122
Figura 67 - Mapa de contorno HMBC (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 1	122
Figura 68 - Estrutura química da substância <i>N</i> -alanina- <i>N</i> -metilleucina (2)	124
Figura 69 - Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 2 (δ_H 0 - 4,3 ppm)	124
Figura 70 - Mapa de contorno HSQC (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 2	125
Figura 71 - Mapa de contorno HMBC (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 2	125
Figura 72 - Espectro COSY (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 2	126
Figura 73 - Espectro de massas para a substância 2 , por infusão direta em ESI-QTOF-MS/MS - Bruker	126
Figura 74 - Estrutura química da substância 3	127
Figura 75 - Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 3 (δ_H 6,8 - 8,1 ppm)	128
Figura 76 - Mapa de contorno HSQC (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 3	128
Figura 77 - Mapa de contorno HMBC (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 3	129
Figura 78 - Estrutura química da substância 4	131
Figura 79 - Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 4 , com alguns sinais importantes ampliados abaixo	132
Figura 80 - Espectro DEPTq (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 4	132

Figura 81 - Mapa de contorno HSQC (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 4	133
Figura 82 - Algumas correlações (HMBC) representadas para a substância 4	133
Figura 83 - Mapa de contorno HSQC (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 4	134
Figura 84 - Espectro de TOCSY 1 D (δ_H 6,36) (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 4	134
Figura 85 - Espectro de TOCSY 1 D (δ_H 0,96) (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 4	135
Figura 86 - Espectro de massas (HRESIMS) obtido em ESI modo positivo para a substância 4 , por ESI-QTOF-MS/MS - Waters.....	135
Figura 87 - Espectro de infra-vermelho para a substância 4	136
Figura 88 - Estrutura química da substância 5	137
Figura 89 - Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 5 , com alguns sinais importantes ampliados abaixo.....	139
Figura 90 - Espectro de DEPTq (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 5	139
Figura 91 - Mapa de contorno HSQC (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 5	140
Figura 92 - Algumas correlações (HMBC) representadas para a substância 5	140
Figura 93 - Mapa de contorno HMBC (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 5	141
Figura 94 - Espectro de TOCSY 1 D (δ_H 1,05) (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 5	141
Figura 95 - Espectro de massas (HRESIMS) obtido em ESI modo positivo para a substância 5 , por ESI-QTOF-MS/MS - Waters.....	142
Figura 96 - Espectro de infra-vermelho para a substância 5	142
Figura 97 - Estrutura química da substância 6	144
Figura 98 - Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 6	145
Figura 99 - Espectro de RMN DEPTq (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 6	145
Figura 100 - Mapa de contorno HSQC (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 6	146
Figura 101 - Algumas correlações (HMBC) representadas para a substância 6	146
Figura 102 - Mapa de contorno HMBC (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 6	147
Figura 103 - Espectro de massas (HRESIMS) obtido em ESI modo positivo para a substância 6 , por ESI-QTOF-MS/MS - Waters	147
Figura 104 – Estrutura química da substância 7	148
Figura 105 - Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 7	150
Figura 106 - Espectro de RMN DEPTq (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 7	150
Figura 107 - Mapa de contorno HSQC (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 7	151
Figura 108 - Mapa de contorno HMBC (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 7	151
Figura 109 - Espectro de massas (HRESIMS) obtido em ESI modo positivo para a substância 7 , por ESI-QTOF-MS/MS - Waters	152
Figura 110 - Estrutura química da substância 8	153
Figura 111 - Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 8	155
Figura 112 - Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 8	155
Figura 113 - Mapa de contorno HSQC (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 8	156
Figura 114 - Algumas correlações (HMBC) representadas para a substância 8	156
Figura 115 - Mapa de contorno HSQC (CD ₃ OD, 600 MHz) para a substância 8	157
Figura 116 - Espectro de massas (HRESIMS) obtido em ESI modo positivo para a substância 8 , por ESI-QTOF-MS/MS - Waters	157
Figura 117 – Comparação do tempo de retenção das substâncias 4 , 5 , 6 , 7 e 8 em espectros BPC (HPLC-ESI-IT-MS/MS) em modo positivo.....	158
Figura 118 - Espectro de MS/MS (HPLC-ESI-IT-MS/MS) da substância 4	159

Figura 119 - Espectro de MS/MS (HPLC-ESI-IT-MS/MS) da substância 7	159
Figura 120 - Espectro de MS/MS (HPLC-ESI-IT-MS/MS) da substância 6	159
Figura 121 - Espectro de MS/MS (HPLC-ESI-IT-MS/MS) da substância 8	160
Figura 122 - Espectro de MS/MS (HPLC-ESI-IT-MS/MS) da substância 5	160
Figura 123 - Espectros BPC (HPLC-ESI-IT-MS/MS) dos extratos do co-cultivo (CC) em comparação com as substâncias 5, 6 e 8 (m/z 281)	161
Figura 124 - Espectros BPC (HPLC-ESI-IT-MS/MS) dos extratos do co-cultivo (CC) em comparação com as substâncias 4, e 7 (m/z 295)	162
Figura 125 - Espectros BPC (HPLC-ESI-IT-MS/MS) dos extratos de <i>F. solani</i> (Fs) em comparação com as substâncias 5, 6 e 8 (m/z 281)	162
Figura 126 - Espectros BPC (HPLC-ESI-IT-MS/MS) dos extratos de <i>F. solani</i> (Fs) em comparação com as substâncias 4 e 7 (m/z 281)	163
Figura 127 - Curva analítica obtida das soluções padrões do analito	164

LISTA DE TABELAS

*Tabela 1 - Massas obtida dos extratos brutos.....	58
Tabela 2 - Resultados da triagem antibacteriana para os extratos de <i>P. lilacinum</i> , <i>F. solani</i> e co-cultivo	59
Tabela 3 - MIC e MBC para Co-cultivo-PSA.....	60
Tabela 4 - MIC e MBC para <i>F. solani</i> PSA	60
Tabela 5 - Inibição do crescimento celular (%) dos extratos em linhagem de melanoma (MM- 200), com as concentrações de 5 µg/mL e 50 µg/mL (média ± SEM) (n=2)	62
Tabela 6 - Inibição do crescimento celular (%) dos extratos em linhagem de carcinoma mamário (MCF-7), com as concentrações de 5 µg/mL e 50 µg/mL (média ± SEM) (n=2).....	62
Tabela 7 - Inibição do crescimento celular (%) dos extratos em linhagem não tumoral de pigmento epitelial de retina humana (RPE), com as concentrações de 5 µg/mL e 50 µg/mL (média ± SEM) (n=2)	63
Tabela 8 - Regressão não linear do controle positivo doxorrubicina com concentrações de 0,0032 a 10 µM em linhagem de melanoma (MM-200), carcinoma mamário (MCF-7) e pigmento epitelial de retina humana (RPE) (média ± SEM) (n=2)	63
Tabela 9 - Metabólitos anotados por GC-MS para <i>F. solani</i> , <i>P. lilacinum</i> e co-cultivo nos diferentes tipos de cultivo	77
Tabela 10 - Metabólitos identificados através da rede de interações moleculares (GNPS) para extratos de <i>F. solani</i> , <i>P. lilacinum</i> e co-cultivo, analisados em modo positivo em HPLC-ESI-microTOF II-TOF-MS	96
Tabela 11 - Metabólitos anotados para <i>F. solani</i> , <i>P. lilacinum</i> e Co-cultivo nos diferentes tipos de cultivo via UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo utilizando o software UNIFI	113
Tabela 12 - Dados de RMN de ¹ H e HSQC (CD ₃ OD, 600 MHz) da substância 1 em comparação com a literatura (CHEMICAL BOOK, 2020).....	120
Tabela 13 - Dados de RMN de ¹ H, HMBC, HSQC e COSY (CD ₃ OD, 600 MHz) da substância 2 ...	124
Tabela 14 - Dados de RMN de ¹ H, HMBC e HSQC (CD ₃ OD, 600 MHz) da substância 3 em comparação com a literatura (SORDON <i>et al.</i> , 2017).....	127
Tabela 15 - Dados de RMN de ¹ H, HMBC e HSQC (CD ₃ OD, 600 MHz) da substância 4	131
Tabela 16 - Dados de RMN de ¹ H, HMBC e HSQC (CD ₃ OD, 600 MHz) da substância 5	138
Tabela 17 - Dados de RMN de ¹ H, HMBC e HSQC (CD ₃ OD, 600 MHz) da substância 6	144
Tabela 18 - Dados de RMN de ¹ H, HMBC e HSQC (CD ₃ OD, 600 MHz) da substância 7 em comparação com a substância 4	149
Tabela 19 - Dados de RMN de ¹ H, HMBC e HSQC (CD ₃ OD, 600 MHz) da substância 8 em comparação com a substância 5	154
Tabela 20 - Parâmetros da curva analítica.....	165
Tabela 21 - Análise da variância para ajuste do modelo de regressão linear	166
Tabela 22 - Desvio padrão relativo (%) das áreas e tempo de retenção (t _R) calculadas para a substância 5 nos extratos de Co-cultivo e <i>F. solani</i>	166
Tabela 23 - Resultados de recuperação dos extratos de Co-cultivo e <i>F. solani</i> PSA.....	167
Tabela 24 - Teste t para os extratos de Co-cultivo e <i>F. solani</i> PSA.....	167
Tabela 25 - Concentração da substância 5 nos extratos de co-cultivo e <i>F. solani</i> PSA à 10 µg/mL. Vermelho: Extratos que não puderam ser quantificados (concentração dentro do LD e LQ, mas abaixo do primeiro ponto da curva). Azul: Extratos quantificados	169

LISTA DE APÊNDICE

Apêndice A - Levantamento de metabólitos descritos (inglês) na literatura para o gênero <i>Fusarium</i>	179
Apêndice B - Levantamento de metabólitos descritos (inglês) na literatura para o gênero <i>Purpureocillium/Paecilomyces</i>	184
Apêndice C - Estrutura química das substâncias anotadas, neste trabalho, por GC-MS e LC-MS.....	186

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aib	Ácido α -aminoisobutírico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR-FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
CC	Cromatografia em coluna
CCA	Czapek com agitação
CD₃OD	Metanol deuterado
CID	<i>Collision induced dissociation</i>
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
CSA	Czapek em modo estático
Cyc	Ciclosporina
Cycs	Ciclosporinas
DDA	<i>Data-dependent acquisition</i>
DIA	<i>Data-independent acquisition</i>
DI-ESI-IT-MS	<i>Mass spectrometers with direct infusion using electrospray and ion trap</i>
DI-ESI-QTOF	<i>Mass spectrometers with direct infusion using electrospray and time of flight</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Desoxirribonucleic acid</i>
DNP	<i>Dictionary of Natural Products</i>
DPR	Desvio padrão relativo
EI	<i>Electron ionization</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GC-MS	<i>Gas chromatography coupled mass spectrometry</i>
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>

HLPC-MS	<i>High performance liquid chromatography coupled mass spectrometry</i>
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HPLC-ESI-IT-MS/MS	<i>High performance liquid chromatography coupled mass spectrometry electrospray and ion trap</i>
HPLC-ESI-microTOF II-TOF-MS	<i>High performance liquid chromatography coupled mass spectrometry electrospray and time of flight</i>
HPLC-PDA	<i>High performance liquid chromatography coupled photodiode array</i>
HRESIMS	<i>High-resolution electrospray ionisation mass spectrometry</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i>
I_{Rcalc.}	Índice de retenção calculado
I_{Rlit.}	Índice de retenção da literatura
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
LC-MS	<i>Liquid chromatography coupled mass spectrometry</i>
LD	Limite de detecção
Leu	Leucina
LQ	Limite de quantificação
m/z	Razão massa-carga
MBC	<i>Minimal bactericidal concentration</i>
MCF-7	Células de carcinoma mamário
MeHA-MePro	<i>(4,2)-4-methylhex-2-enoic acid-4-methyl-proline</i>
MHCA	Mueller hinton cátion ajustado
MIC	<i>Minimal inhibitory concentration</i>
MM200	Células de melanoma
MN	<i>Molecular networking</i>
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
MS	<i>Mass spectrometry</i>
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i>
MS^E	<i>Mass spectrometry (E-energy)</i>
MSTFA	<i>N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida</i>

MTT	<i>Methyl thiazol tetrazolium</i>
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NuBBE	Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
OSMAC	<i>One strain many compounds</i>
PCA	<i>Potato dextrose broth</i> com agitação
PDA	<i>Potato dextrose agar</i>
PDB	<i>Potato dextrose broth</i>
PN	Produtos naturais
PSA	<i>Potato dextrose broth</i> em modo estático
QTOF	Quadrupolo e tempo de voo
R²	Fator de correlação
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPE	Pigmento epitelial de retina humana
SRM	<i>Selected reaction monitoring</i>
TOCSY	<i>Total correlation spectroscopy</i>
t_R	Tempo de retenção
UPLC	<i>Ultra-performance liquid chromatography</i>
UPLC-QTOF-MS^E	<i>Ultra-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry and time of flight</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 Uma Visão Geral sobre Produtos Naturais e sua Importância quanto aos Fungos	23
1.2 Fungos de Rizosfera	26
1.3 Espécies de Fungos Estudados: <i>Purpureocillium lilacinum</i> e <i>Fusarium solani</i>	28
1.4 Métodos de Cultivo e Análise de Extratos Fúngicos	31
1.5 Rede de Interações Moleculares: <i>Molecular Networking</i> e a Plataforma GNPS ...	35
1.6 UNIFI - Sistema de Informação Científica, Waters	37
2. OBJETIVO	40
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	41
3.1 Identificação Genética dos Fungos.....	41
3.2 Cultivo dos Fungos	41
3.3 Obtenção dos Extratos Brutos.....	42
3.4 Atividades Biológicas.....	42
3.4.1 Atividade Antibacteriana.....	42
3.4.2 Análise de Citotoxicidade.....	43
3.5 Análise de Componentes Principais.....	44
3.6 Equipamentos e Softwares Utilizados.....	44
3.6.1 RMN 600 MHz (14,1 T).....	44
3.6.2 GC-MS.....	45
3.6.3 HPLC-ESI-microTOF II-TOF-MS.....	46
3.6.4 Análises de Dados por Redes Moleculares (<i>Molecular Networking</i>)	46
3.6.5 UPLC-QTOF/MS ^E	47
3.6.6 Sistema de Informações Científicas da Waters - UNIFI.....	47
3.6.7 HPLC Analítico e HPLC-PDA Semi-preparativo	48
3.6.8 Infusão Direta por Espectrometria de Massas	48
3.6.9 HPLC-ESI-IT-MS/MS e o Software QuantAnalysis	49
3.6.10 ATR-FTIR e Medida de Rotação Óptica ($[\alpha]_D$)	50
3.7 Fracionamento e Isolamento das Substâncias do Extrato do Co-cultivo PSA.....	50
3.7.1 Primeiro Fracionamento (CC) - Isolamento das Substâncias Produzidas no Co-cultivo PSA.....	50
3.7.2 Segundo Fracionamento (HPLC-PDA Semi-preparativo) - Isolamento das Substâncias Produzidas no Co-cultivo PSA	52
3.8 Quantificação da Substância 5 (6-(11-(hidroximetil)-9-metiloct-7-en-7-il)-2-metóxi-4H-piran-4-ona)	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
4.1 Fungos Selecionados para este Trabalho	55
4.2 Identificação Genética dos Fungos CSP-14 e CSP-12Ia	56
4.3 OSMAC e Produção dos Extratos em Pequena Escala.....	57
4.4 Ensaios Biológicos.....	58
4.4.1 Atividade Antibacteriana.....	58
4.4.2 Análise de Citotoxicidade.....	60
4.5 Análise Qualitativa dos Extratos para Observação dos Efeitos da OSMAC	64
4.5.1 Análise de Componentes Principais.....	64
4.5.2 GC-MS.....	66

4.5.3	<i>Análise das Redes de Interações Moleculares - Molecular Networking (GNPS)...</i>	83
4.5.4	<i>UPLC-QTOF/MS^E e o Sistema de Informações Científicas UNIFI.....</i>	98
4.6	Fracionamento e Isolamento de Substâncias do Extrato de Co-cultivo PSA.....	119
4.6.1	<i>Primeiro Fracionamento do extrato de co-cultivo PSA.....</i>	119
4.6.1.1	<i>Elucidação estrutural da substância 1</i>	120
4.6.1.2	<i>Elucidação estrutural da substância 2</i>	123
4.6.1.3	<i>Elucidação estrutural da substância 3</i>	126
4.6.1.4	<i>Elucidação estrutural da substância 4</i>	129
4.6.1.5	<i>Elucidação estrutural da substância 5</i>	136
4.6.2	<i>Segundo Fracionamento do Extrato de Co-cultivo PSA.....</i>	143
4.6.2.1	<i>Elucidação estrutural da substância 6</i>	143
4.6.2.2	<i>Elucidação estrutural da substância 7</i>	147
4.6.2.3	<i>Elucidação estrutural da substância 8</i>	152
4.6.3	<i>Comparação das Substâncias 4, 5, 6, 7 e 8,</i>	158
4.7	Quantificação da Substância 5 (6-(11-(hidroximetil)-9-metiloct-7-en-7-il)-2-metóxi-4H-piran-4-ona) nos Extratos de <i>Fusarium solani</i> e Co-cultivo.....	163
4.7.1	<i>Validação</i>	163
4.7.1.1	<i>Curva analítica e limites de detecção e quantificação (LD e LQ)</i>	164
4.7.1.2	<i>Teste de ajuste do modelo linear (homoscedasticidade) e avaliação da significância da regressão</i>	165
4.7.2	<i>Precisão.....</i>	166
4.7.3	<i>Recuperação.....</i>	166
4.7.4	<i>Quantificação da Substância 5 nos Extratos Avaliados</i>	168
5.	CONCLUSÕES.....	170
	REFERÊNCIAS	171
	APÊNDICE	179

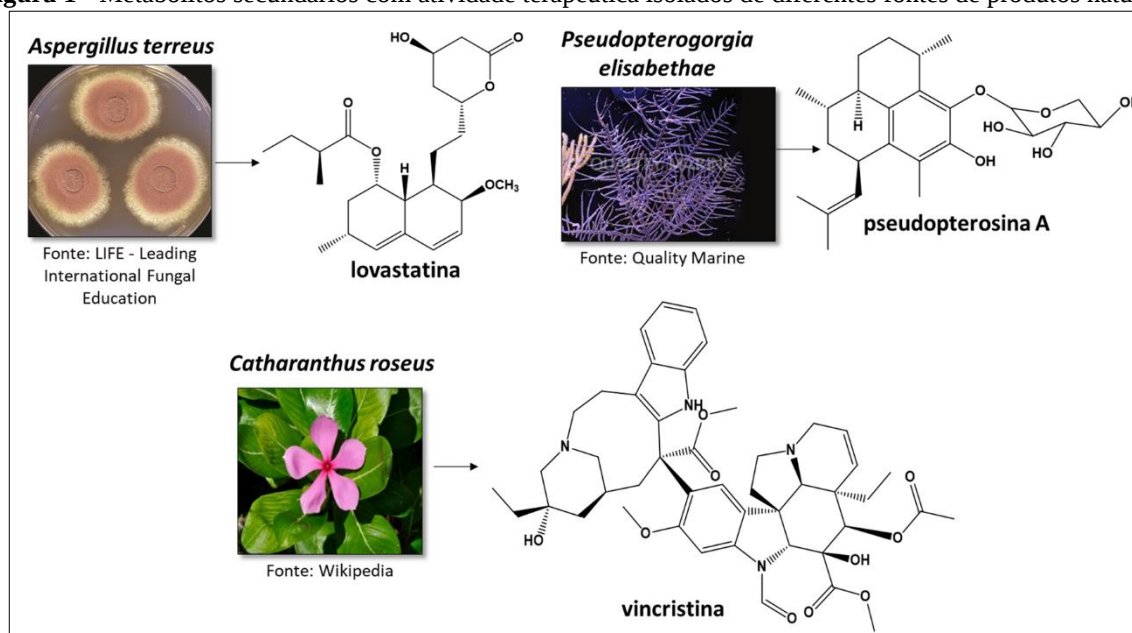
1. INTRODUÇÃO

1.1 Uma Visão Geral sobre Produtos Naturais e sua Importância quanto aos Fungos

Os produtos naturais (PN) sempre tiveram grande importância para a humanidade, tendo como fonte os microrganismos, plantas, organismos marinhos e etc. que são capazes de produzir metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são importantes para o crescimento, desenvolvimento e reprodução do indivíduo. Já os metabólitos secundários, denominados produtos naturais, são interessantes principalmente no âmbito farmacêutico. Eles são produzidos por questões de proteção, competição e interações entre indivíduos, e são característicos por sua especificidade nas espécies. Ao longo dos anos, a química de produtos naturais vem buscando, principalmente, a descoberta de novos fármacos através desses metabólitos secundários (BERNARDINI *et al.*, 2018; DIXON, 2001; PINTO *et al.*, 2002).

Um dos primeiros relatos sobre a utilização de produtos naturais, se deu em primórdios da nossa antiguidade, em 1500 a.C. na medicina egípcia através do Papiro de Ebers, que trazia um grau de compreensão sobre o corpo humano e o tratamento de várias doenças humanas através da utilização de plantas (PINTO *et al.*, 2002).

Sob esta ótica, a natureza foi capaz de nos fornecer diversos metabólitos secundários de caráter terapêutico isolados de diversas fontes; como o alcaloide indólico, vincristina (Figura 1), isolado da planta *Catharanthus roseus*, que apresenta potente atividade contra vários tipos de câncer como linfoma, câncer colorretal, câncer de mama, neuroblastoma entre outros, e é um quimioterápico importante aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) desde 1963 (NAAZ *et al.*, 2019). Outra substância de relevância é a lovastatina (Figura 1), um policetídeo, isolado do fungo *Aspergillus terreus*, utilizado como fármaco para controle do colesterol através da inibição da enzima HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A) redutase responsável pela rota biossintética do colesterol (GOSWAMI *et al.*, 2012), sendo considerado um medicamento preventivo para doenças cardiovasculares. E entre 1988 a 2003 houveram mais de 100 milhões de prescrições médicas para utilização desse fármaco considerando mais de 27 milhões de pacientes em terapia por ano (PANDEY; VARSHNEY; PANDEY, 2019). Um outro exemplo é a substância pseudopterosina A (Figura 1), um diterpeno glicosilado isolado do coral *Pseudopterogorgia elisabethae* com atividade analgésica e anti-inflamatória, utilizado como creme para uso tópico (GEORGANTEA *et al.*, 2016; MULDER *et al.*, 2015; VAN DE VELDE *et al.*, 2017).

Figura 1 - Metabólitos secundários com atividade terapêutica isolados de diferentes fontes de produtos naturais

Fonte: Figura adaptada (LIFE, 2020; QUALITY MARINE, 2020; WIKIPÉDIA, 2020)

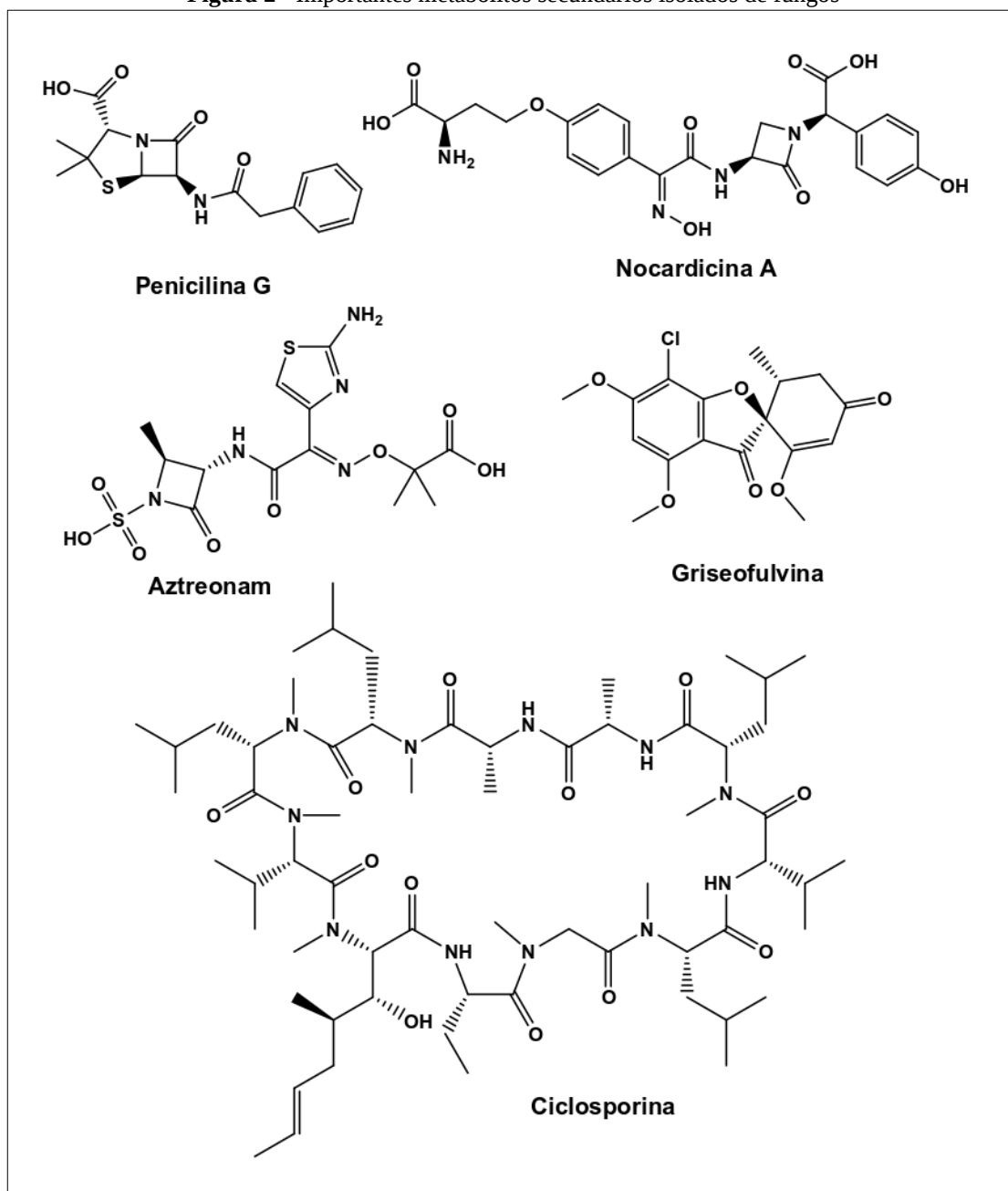
Ao longo dos anos, um dos fatos que estimulou a indústria a desenvolver programas de pesquisa em PN foi durante a segunda guerra mundial (1939-1945), após a produção em grande escala da penicilina que abriu a era dos antibióticos e também o interesse para o descobrimento de outros fármacos, como a lovastatina que foi introduzida na década de 80. Até a década de 90, 80 % dos medicamentos eram produtos naturais ou derivados. No entanto, de 1990-2000 houve um decréscimo na descoberta de novos PN, explicado pelo avanço da QC (Química Combinatória) e HTS (*Automated High Throughput Screening*), que analisava várias substâncias de uma vez frente a um alvo biológico fazendo uso de substâncias sintéticas que tinha como objetivo acelerar as análises e a descoberta de novos candidatos a fármacos. Porém apesar dessa abordagem parecer promissora e aumentar a rapidez das análises de substâncias em relação a uma atividade biológica, a quantidade de novas substâncias com atividade terapêutica diminuiu muito, devido a essas substâncias sintéticas não apresentarem a mesma diversidade estrutural que os PN forneciam, o que fez aos poucos a atenção ser voltada novamente para a química de PN (BAKER *et al.*, 2007; BERNARDINI *et al.*, 2018; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015; LI; VEDERAS, 2009).

Neste contexto, os fungos representam uma das fontes de produtos naturais que são muito relevantes para a medicina humana. Porém, ainda hoje existe uma infinidade desses organismos que não são conhecidos, visto que há uma estimativa de que existam de 2,2 a 3,8 milhões de fungos presentes no planeta, sendo que somente cerca de 120.000 foram identificados e catalogados (HAWKSWORTH; LÜCKING, 2017). Portanto, uma grande maioria permanece

inexplorada, no qual pode ser fonte promissora para a descoberta de novos metabólitos de interesse, apesar dos fungos já identificados apresentarem uma grande quantidade de substâncias importantes do ponto de vista farmacêutico, principalmente. Os fungos conhecidos, já foram capazes de produzir diversos metabólitos nos quais podem ser atribuídas a classes e substâncias importantes como os antibióticos β -lactâmicos, representados pela penicilina (Figura 2) isolada do fungo *Penicilium notatum*, descoberta em 1929, que é a base para antibióticos semi-sintéticos β -lactâmicos, além de ter encorajado a busca por novos antibióticos naturais de microrganismos como a nocardicina e o aztreonam (Figura 2) (BERNARDINI *et al.*, 2018). Outra substância importante é a griseofulvina (Figura 2), isolada de *Penicillium griseofulvum*, um potente antifúngico utilizado para o tratamento de doenças de *Tinea*, conhecida como dermatofitose, em humanos e também em animais, considerado o primeiro antifúngico utilizado, isolado em 1939 (ZHAO *et al.*, 2019). Outro metabólito relevante é o peptídeo cíclico ciclosporina A (Figura 2), isolado do fungo *Tolypocladium inflatum*, que é uma droga imunossupressora (MATA *et al.*, 2018; PINTO *et al.*, 2002) que possibilitou um maior sucesso na transfusão de órgãos. Esse metabólito representa uma interessante característica, pois apresenta aminoácidos *N*-metilados, processo não evidenciado através da maquinaria biossintética de plantas, mas que é comumente produzido por microrganismos através de ações enzimáticas (HUMPHREY; CHAMBERLIN, 1997).

Os fungos isolados de plantas, estudados dentro da química de PN, podem ser denominados endofíticos – que colonizam o interior dos tecidos da planta, epifíticos – que são encontrados na superfície da planta e os fungos de rizosfera – encontrados entre a raiz e o solo (KHARWAR *et al.*, 2010). Nesse trabalho, o foco são os fungos de rizosfera.

Figura 2 - Importantes metabólitos secundários isolados de fungos



Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

1.2 Fungos de Rizosfera

A rizosfera é a região do solo em contato direto com as raízes de uma planta, e se mostra muito rica em nutrientes. Essa região apresenta uma microbiota muito variada, contendo fungos, bactérias, vírus, nematoides, protozoários e etc. (MENDES; GARBEVA; RAAIJMAKERS, 2013).

O termo rizosfera foi introduzido em 1904 por Lorenz Hiltner, um agrônomo e fisiologista de plantas alemão. Ele afirma que a microbiota da rizosfera ajuda a planta a se proteger contra

Estudo químico de fungos da rizosfera de Senna spectabilis utilizando abordagem OSMAC e ferramentas analíticas do estado da arte para anotação e caracterização de metabólitos

ataques de patógenos, já que muitos organismos, tanto benéficos quanto oportunistas se aproximam da rizosfera para se alimentarem dos exsudatos das raízes (CARDOSO, E.J.B.N, ANDREOTE, 2016; MENDES; GARBEVA; RAAIJMAKERS, 2013). Sendo assim, essa é uma região muito importante para o controle, crescimento e desenvolvimento da planta.

Os fungos estão em maior número na rizosfera (CARDOSO, E.J.B.N, ANDREOTE, 2016; MENDES; GARBEVA; RAAIJMAKERS, 2013), e por isso, são a maioria dos patógenos, bem como a maioria dos microrganismos que auxiliam no desenvolvimento da planta. E muitos deles apresentam relações simbióticas com as raízes da planta, denominando-se micorríza (SHABNAM SHAIKH, 2016).

Com o intuito de estudar a rizosfera de *Senna spectabilis* (Figura 3), a Dra. Patrícia Cardoso Cortelo, durante o desenvolvimento da sua tese de doutorado no nosso grupo de pesquisa (NuBBE), isolou uma coleção de microrganismos dessa região, sendo eles 136 fungos e 61 bactérias.

Essa planta chamada popularmente de Cássia-do-Nordeste, é pertencente à família Fabaceae, e é cultivada em regiões tropicais. Ela é muito conhecida na medicina popular por ser útil no tratamento de várias doenças humanas, confirmados por estudos fitoquímicos. Relatando diversos metabólitos com atividade biológica de interesse como anticonvulsivante, sedativa, anti-malária, leishmanicida, antimicrobiana, citotóxica (MELO *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2010, 2011) e anticolinesterásica, na qual parte dessas atividades está atribuída aos alcaloides piperidínicos biomarcadores dessa espécie (SILVA *et al.*, 2010; VIEGAS *et al.*, 2004, 2006). Influenciando assim o interesse para o estudo de microrganismos associados à sua rizosfera.

Figura 3 - *Senna spectabilis*

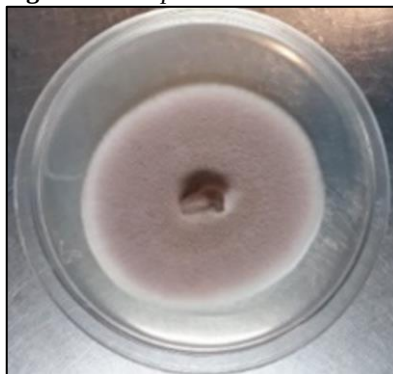


Fonte: Jardim Botânico (UTD JARDIM BOTÂNICO, 2020).

1.3 Espécies de Fungos Estudados: *Purpureocillium lilacinum* e *Fusarium solani*

Um dos fungos rizosféricos de trabalho nessa pesquisa foi o *Purpureocillium lilacinum* (Figura 4) (Ordem: Hypocreales; Família: Ophiocordycipitaceae; Divisão: Ascomycota) (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2020).

Figura 4 - *Purpureocillium lilacinum*



Fonte: Fotografia registrada pela autora, 2020.

Purpureocillium é um gênero comumente encontrado no solo e *P. lilacinum* é uma espécie que antes era conhecida como *Paecilomyces lilacinum*, porém uma revisão taxonômica, em 2011, acabou por reconhecê-lo como sendo do gênero *Purpureocillium* (LUANGSA-ARD *et al.*, 2011).

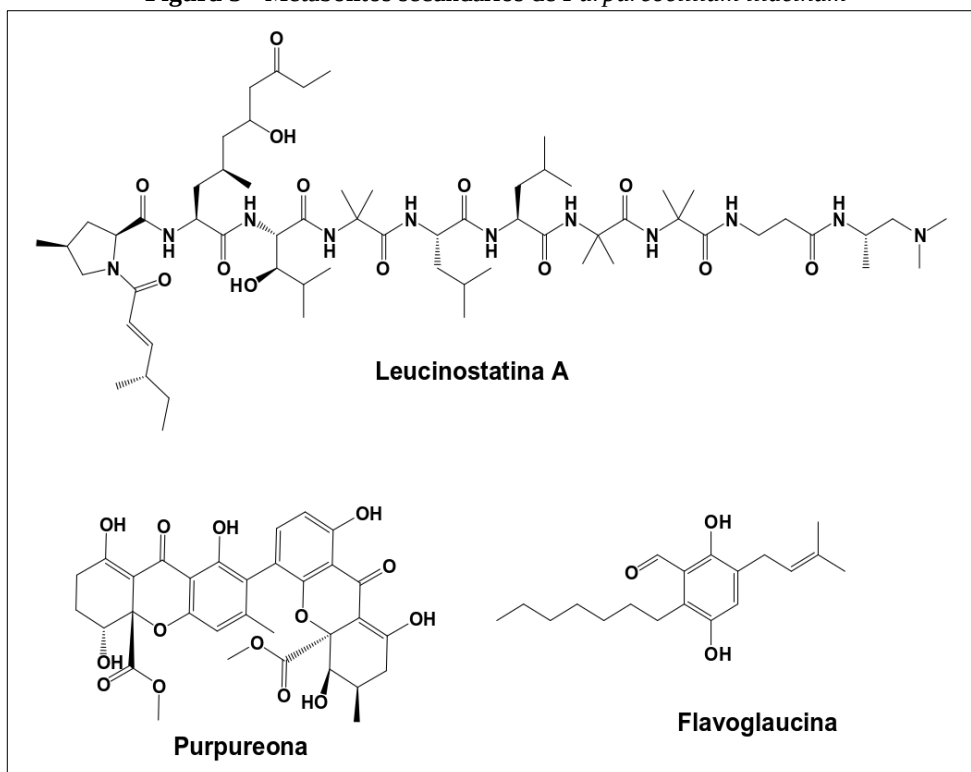
Esse fungo é muito conhecido por ser nematófago, sendo muito estudado na agricultura, pois elimina os ovos de nematoides que destroem muitas plantações (CARNEIRO, 1992) levando grandes prejuízos aos agricultores. Alguns estudos na literatura demonstram que a produção de serina protease básica por *P. lilacinum* é responsável por eliminar ovos do nematoide *Meloidogyne hapla* (BONANTS *et al.*, 1995), o qual ele é o principal patógeno. Esse nematoide infecta plantas como tomate, pepino, soja e batata, alimentos muito importantes economicamente, o que leva o controle dessa praga ser algo urgente (DAHLIN *et al.*, 2019). Outro nematoide no qual *P. lilacinum* controla, é *Caenorhabditis elegans*. Em que estudos mostram que as leucinostatinas, que são peptídeos produzidos pelo fungo, tem alta atividade contra esse nematoide *C. elegans* (DEGENKOLB; VILCINSKAS, 2016). Essa característica nematófaga o torna muito interessante para estudo, já que é uma espécie autorizada para uso como controle biológico no Brasil (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2020).

Além da atividade nematicida que o torna totalmente relevante, a bioprospecção dessa espécie já foi muito descrita na literatura com metabólitos de atividade biológica promissora. Como a produção de substâncias de caráter antitumorais como as leucinostatinas A (Figura 5)

Estudo químico de fungos da rizosfera de Senna spectabilis utilizando abordagem OSMAC e ferramentas analíticas do estado da arte para anotação e caracterização de metabólitos

e Y, que apresentaram atividade contra câncer de pâncreas (MOMOSE *et al.*, 2019). Também, a purpureona (Figura 5), um derivado de ergocromona, com potente atividade leishmanicida e antimicrobiana (LENTA *et al.*, 2016). E a flavoglaucina (Figura 5) que apresenta propriedades antioxidante, antibacteriana e anticâncer (JAYAKRISHNAN; BENJAMIN, 2016).

Figura 5 - Metabólitos secundários de *Purpureocillium lilacinum*



Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

O outro fungo em estudo nesse trabalho foi *Fusarium solani* (Figura 6) (Ordem: Hypocreales; Família: Nectriaceae; Divisão: Ascomycota; Forma Sexuada: *Nectria haematococca* (DEFESA VEGETAL, 2020)).

Figura 6 - *Fusarium solani*



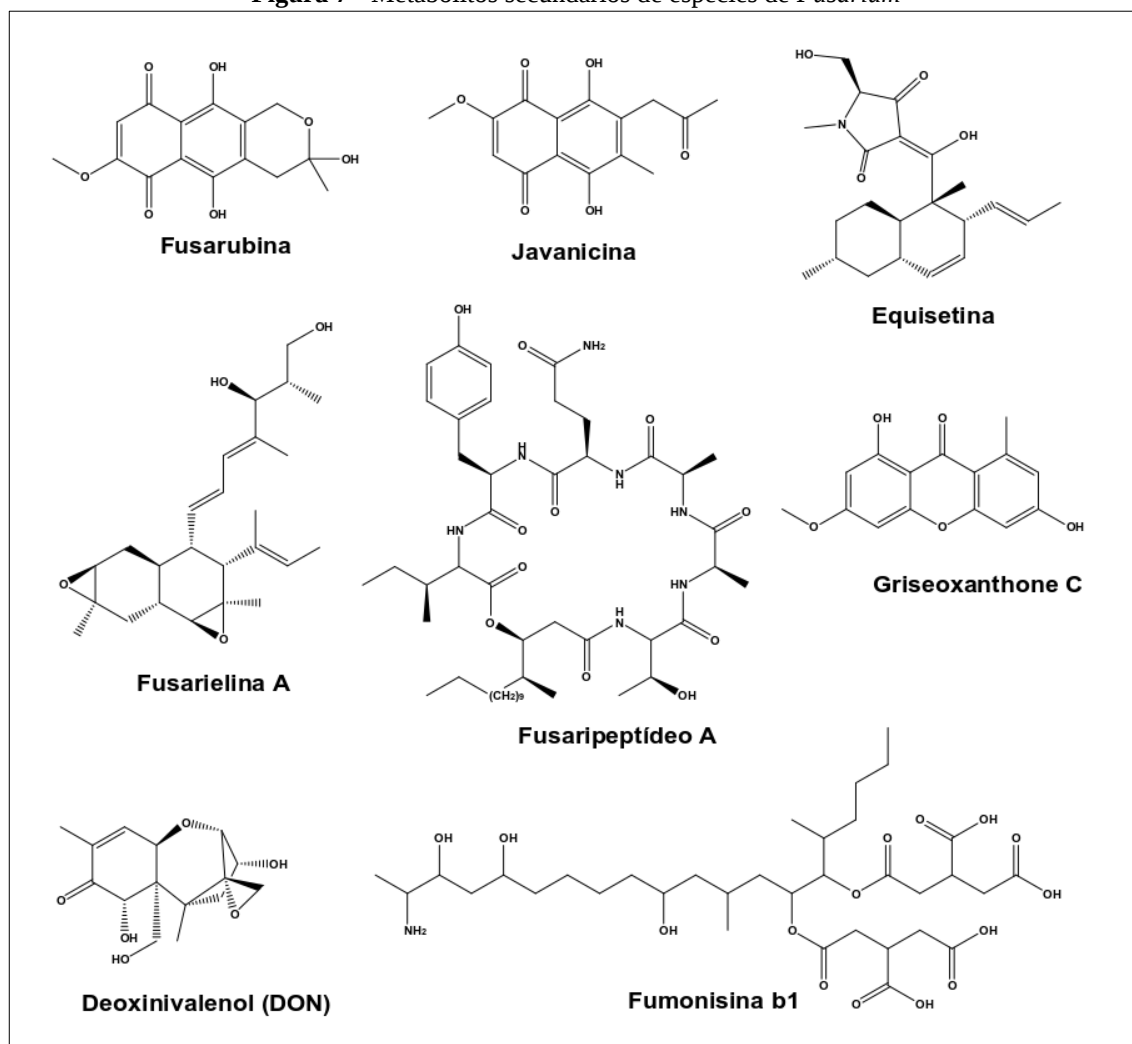
Fonte: Fotografia registrada pela autora, 2020.

O gênero *Fusarium* é comumente encontrado no meio ambiente, principalmente no solo (SALAH *et al.*, 2015), assim como *P. lilacinum*, e contém mais de 70 espécies conhecidas (MUNKVOLD, 2017). Apesar de muitas espécies de *Fusarium* serem consideradas patógenas para humanos, elas desempenham um papel ecológico importante, pois é comprovada sua capacidade de auxiliar a planta a se preparar para estresses abióticos, além de auxiliar na sua germinação, crescimento e desenvolvimento (TOGHUEO, 2019).

A bioprospecção de diversas espécies de *Fusarium* mostrou a produção de substâncias com capacidade terapêutica confirmada, como os antitumorais vincristina, vimblastina, camptotecina e taxol. Além da relevante produção de metabólitos de caráter antimicrobiano, cuja busca por esses metabólitos se faz muito necessária atualmente, devido aos patógenos resistentes aos medicamentos disponíveis. Metabólitos como fusarubina, javanicina, equisetina e fusarielina (Figura 7) foram promissores como agentes antimicrobianos (TOGHUEO, 2019). Além de alguns metabólitos com capacidade antiviral e antiparasítica que também são descritos. Como fusaripeptídeo A (Figura 7) que age contra *Plasmodium falciparum* causador da malária e a griseoxantona C (Figura 7) que foi eficaz contra o vírus da hepatite C (TOGHUEO, 2019).

Porém, *Fusarium* é também muito conhecido pela produção de micotoxinas, causando danos para a saúde humana e animal, já que é considerado um patógeno agrícola. O gênero *Fusarium* ataca principalmente plantações de grãos, gerando contaminações através de suas micotoxinas e prejuízo para as indústrias agrícolas (ESCRIVÁ; FONT; MANYES, 2015), tornando a comercialização dos alimentos contaminados, inaceitáveis (MUNKVOLD, 2017). Entre as diversas micotoxinas, os tricotecenos e fumonisinas (Figura 7) são as principais delas que causam graves efeitos sobre a saúde humana e animal. Sendo o tricoteceno deoxinivalenol (DON) a toxina produzida por *Fusarium*, que causa o maior impacto econômico (Figura 7) (MUNKVOLD, 2017).

Fusarium solani não é a espécie que mais expressa micotoxinas, porém é muito conhecida por causar podridão radicular em plantações de feijão, batata, ervilha, soja e etc. (MUNKVOLD, 2017). E é conhecida também por produzir diversos metabólitos de interesse farmacêutico como o antitumoral camptotecina (RAN *et al.*, 2017), polissacarídeos com atividade imunomoduladora (ZENG *et al.*, 2019), fusarubina (Figura 7) com atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* (SHAH *et al.*, 2017) entre outros.

Figura 7 - Metabólitos secundários de espécies de *Fusarium*

Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

1.4 Métodos de Cultivo e Análise de Extratos Fúngicos

Os cultivos usuais de microrganismos desenvolvidos em laboratório não conseguem reproduzir o ambiente natural no qual eles vivem, e portanto, sua produção metabólica é diretamente influenciada pela diferença de nutrição e também pelos aspectos físicos naturais (HEWAGE *et al.*, 2014). Dessa forma, ao estudar um microrganismo em laboratório, podemos nos deparar com o silenciamento de genes biossintéticos, devido a esses diferentes fatores (BERTRAND *et al.*, 2014).

Assim, visando estudar a diversidade metabólica de microrganismos, a técnica OSMAC traz a possibilidade de variação do cultivo, de maneira racional para a busca de diferentes metabólitos ou mesmo o aumento da produção de uma substância alvo. A manipulação dos nutrientes do meio de cultivo e também de parâmetros físicos como luz, temperatura, agitação,

pH e etc, alteram diretamente a produção de metabólitos desses micróbios (VANDERMOLEN *et al.*, 2013). Dentro da OSMAC também está inserido o co-cultivo, que se trata do cultivo de dois ou mais microrganismos juntos dividindo o mesmo espaço e nutrientes. Esse tipo de abordagem pode trazer resultados interessantes a respeito de substâncias bioativas referentes à comunicação de sinalização ou defesa entre dois ou mais microrganismos associados que não são produzidos em monoculturas (BERTRAND *et al.*, 2014). Ou até mesmo causar um aumento significativo de alguma substância quase indetectável em monoculturas, potencializando sua produção (OH *et al.*, 2007).

E para auxiliar na identificação de diferentes substâncias produzidas pelas fontes de produtos naturais, técnicas espectrométricas e espectroscópicas acopladas a métodos de separação são importantes para uma análise qualitativa inicial de extratos brutos. Evitando assim o isolamento de metabólitos já conhecidos, ajudando a direcionar o estudo para os metabólitos de interesse, inéditos ou biologicamente ativos (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

A ressonância magnética nuclear, espectroscopia ultravioleta, espectrometria de massas, são algumas das técnicas muito utilizadas dentro da metabolômica, que traz o conceito de perfil metabólico e tenta identificar qualitativa e quantitativamente todos os metabólitos presentes em um organismo (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

A espectrometria de massas é a técnica que mais se destaca, sendo amplamente utilizada em estudos metabolômicos para anotação de metabólitos (SILVA; LOPES; SILVA, 2017).

Técnicas cromatográficas acoplada a espectrometria de massas (GC-MS ou LC-MS) geram informações estruturais de milhares de metabólitos presentes em uma ou várias amostras complexas, em comparação com tempo de retenção, índice de retenção, fórmula molecular, perfil de fragmentação e etc., que podem ser comparados com bases de dados disponíveis (ALLARD; GENTA-JOUE; WOLFENDER, 2017). Essas técnicas, são utilizadas para análise de experimentos *targeted* (busca por um alvo específico) e *untargeted* (busca por uma ampla visão da amostra). Sendo o foco desse trabalho o estudo *untargeted*, em que dados experimentais são coletados e as informações químicas das substâncias presentes nas amostras são extraídas. Dessa forma é possível obter dados que podem ser compartilhados e comparados para anotação de substâncias conhecidas e análogas (AKSENOV *et al.*, 2017). Além disso, as técnicas, principalmente relacionadas a MS, avançam em estudos metabolômicos, para as substâncias chamadas de “*dark matter*”, em que informações químicas são adquiridas e catalogadas, porém não geram *match* com as bases de dados (AKSENOV *et al.*, 2017).

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) é a ferramenta do estado da arte que traz uma grande robustez em análises, principalmente pela sua boa reprodutibilidade. GC é muito utilizado e gera um bom *fingerprint*, principalmente, de amostras voláteis. Mas, também pode ser utilizado para analisar substâncias polares, termolábeis e não voláteis a partir da derivatização da amostra. A eficiência do padrão de fragmentação obtida principalmente por EI (*Electron ionization*) normalmente com a energia de ionização de 70 eV são capazes de ser amplamente comparadas com bases de dados como a NIST (*National Institute of Standards and Technology*) e GMD (*Golm Metabolome Database*) (KOPKA *et al.*, 2005). Obtendo informações sobre o índice de retenção introduzido por Kovats que são essenciais para comparação e possível anotação de metabólitos por GC-MS (BEALE *et al.*, 2018; KIND *et al.*, 2009; VIANI; SOMMER, 2013). Os analisadores mais comuns para GC-MS são os quadrupolos, que apesar de apresentarem baixa resolução para a elucidação de moléculas desconhecidas, apresentam alta sensibilidade, e boa faixa de detecção, que favorece boa anotação de metabólitos já relatados nas bases de dados. A grande vantagem de se usar GC-MS é o custo relativamente baixo, comparado a outros equipamentos, além da vantagem de contar com amplas bases de dados robustas e reprodutíveis para comparação. Já a desvantagem da técnica se dá principalmente à limitação de detecção de substâncias de baixa massa molecular (50-600 Da), (BEALE *et al.*, 2018; VIANI; SOMMER, 2013) além daquelas que são facilmente fragmentadas na alta energia de ionização utilizada, que acarreta no curto tempo de vida do íon molecular evitando sua visualização (PAVIA *et al.*, 2010).

Outra técnica muito utilizada é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a espectrometria de massas, que funciona muito bem para análises de extratos brutos. E em seguida, a introdução da cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) que permitiu a utilização de colunas com dimensões e partículas cada vez menores, que melhoram o desempenho do sistema, diminuindo o tempo de análise e aumentando a sensibilidade e eficiência de separação das substâncias a serem analisadas na sequência por espectrometria de massas (MS) (VIANI; SOMMER, 2013).

Os espectrômetros de massas contam com diversos tipos de analisadores, fontes de ionização e detectores e são bastante utilizados em conjunto com métodos cromatográficos. Os espectrômetros de massas que usam analisadores do tipo ion trap têm a vantagem de fornecer experimentos MSⁿ trazendo bons resultados de padrão de fragmentação para os metabólitos analisados, enquanto os instrumentos do tipo TOF (*time of flight*) e QTOF alcançam massas de alta resolução muito precisas que corroboram para determinar fórmulas moleculares (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009). Outro atributo importante, é a fonte de ionização, sendo

Estudo químico de fungos da rizosfera de Senna spectabilis utilizando abordagem OSMAC e ferramentas analíticas do estado da arte para anotação e caracterização de metabólitos

a ionização por *electrospray* (ESI) muito utilizada para análises qualitativas e quantitativas de amostras não voláteis de misturas complexas, pois apresenta um bom desempenho quando acoplado com cromatografia. E ainda, ESI é muito sensível, podendo analisar amostras na concentração de picomolar, ionizando desde massas muito baixas, até massas muito altas dos analitos podendo apresentar íons multicarregados (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009) possibilitando a análise dessas substâncias com massa molecular muito alta.

Os experimentos tandem (MS/MS) que apresentam Colisão por Dissociação Induzida (CID) são uma boa opção para análise de amostras complexas, pois permite a fragmentação dando informações sobre a estrutura do íon precursor, além de ser muito seletivo para análises em SRM (*Selected Reaction Monitoring*) ou MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), o que ajuda a tornar a técnica em si, LC-MS, muito confiável e útil para análises de quantificação (SNYDER; COOKS, 2016; VIANI; SOMMER, 2013).

LC-MS tem a vantagem de não precisar utilizar amostra quimicamente modificada e analisa diferentes tipos de moléculas. Mas, ao contrário do GC-MS, a técnica varia muito em relação aos instrumentos que existem disponíveis, e esse motivo faz com que as bases de dados não tenham alcançado a mesma eficiência e precisão para anotação de metabólitos quando comparadas as bases de dados de GC-MS (VIANI; SOMMER, 2013).

A abordagem mais utilizada para experimentos MS *untargeted* é a comparação com as bibliotecas de dados disponíveis (AKSENOV *et al.*, 2017) como *Dictionary of Natural Products* (DNP), METLIN (SMITH *et al.*, 2005), NIST, PUBCHEM, NUBBEDB (VALLI *et al.*, 2013) e etc, para verificar a similaridade dos dados experimentais obtidos.

Com a intenção de acelerar e melhorar as análises para a busca de novos metabólitos bioativos de plantas, microrganismos, insetos e etc, a química de PN vem passando por uma revitalização através da utilização de novas ferramentas para anotação e identificação de metabólitos secundários (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015; NAMAN *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2013), no qual essas abordagens auxiliam no estudo metabolômico de matrizes complexas. Principalmente através da técnica de LC-MS de forma automatizada, onde os dados obtidos experimentalmente podem ser comparados de forma computadorizada (*in-silico*), além de utilizar algoritmos de agrupamento de substâncias da mesma classe em relação às suas semelhanças espectrais, comparando com as bases de dados (AKSENOV *et al.*, 2017), como é o caso do *Molecular Networking* disponível na plataforma a plataforma GNPS. Bem como a utilização de abordagens *in-silico* com predição de fragmentação de moléculas como o Sistema de Informação Científica, disponível da Waters Corporation, UNIFI (Discutidos na sessão 1.5 e 1.6 abaixo).

Estudo químico de fungos da rizosfera de Senna spectabilis utilizando abordagem OSMAC e ferramentas analíticas do estado da arte para anotação e caracterização de metabólitos

1.5 Rede de Interações Moleculares: *Molecular Networking* e a Plataforma GNPS

Dentro da espectrometria de massas, uma nova abordagem conhecida como *Molecular Networking* vem sendo inserida para otimizar e acelerar a anotação de metabólitos presentes em extratos brutos (WANG *et al.*, 2016). A rede molecular, do termo em inglês *molecular networking*, é uma abordagem que agrupa em *clusters* metabólitos, dentro de uma ou mais amostras, que apresentam o mesmo perfil de fragmentação frente a espectrometria de massas sequencial. Essa ferramenta pode associar as substâncias agrupadas como sendo de uma mesma classe de moléculas e ainda compara esses espectros com uma plataforma de dados de espectrometria de massas conhecida como GNPS que sugere a anotação dos metabólitos presentes, bem como torna possível prever a presença de análogos (WANG *et al.*, 2016).

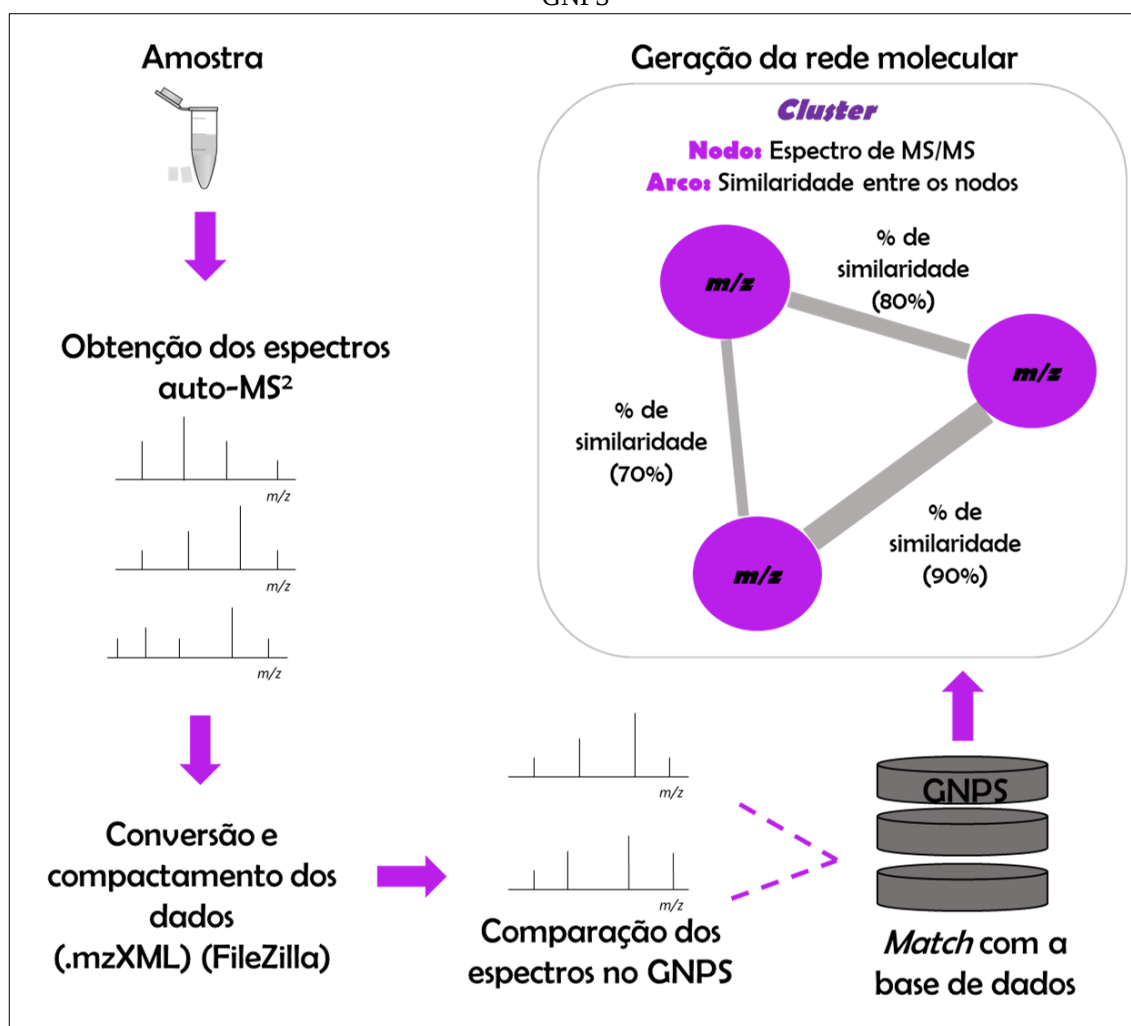
A rede molecular é representada por *clusters*, em que um *cluster* é formado por nodos e arcos: um nodo é representado por um espectro de MS/MS e os arcos, que conectam os nodos, representam a similaridade espectral de um nodo com outro (Figura 8). Os espectros das amostras são avaliados de acordo com as suas similaridades, que são geradas a partir de um cálculo de cosseno que varia de 0 a 1, (0 - espectros totalmente diferentes e 1 - espectros idênticos) e então são agrupados em *clusters*. Os espectros similares, com valores de cosseno entre 0,70 e 0,95 (valores do *default*, mas podem ser otimizados pelo usuário) são agrupados em um *cluster*. Com os valores de cosseno, o usuário pode atribuir espessuras aos arcos, onde os metabólitos mais similares apresentam maiores espessuras e vice-versa. Os espectros que apresentam alta similaridade, com valores de cosseno também definidos pelo usuário (*default* 0,95) são considerados como sendo espectros de uma mesma molécula, e dessa forma eles são agrupados em um espectro de consenso representado por um único nodo, através do algoritmo MS-Cluster, porém nesse método pode ocorrer o agrupamento de isômeros. Para contornar essa situação, novos *workflows* dentro do GNPS vêm sendo utilizados através do software MZMine (WANG *et al.*, 2019) que diferencia isômeros por tempo de retenção, como uma alternativa para o MS-Cluster. Porém as limitações da própria espectrometria de massas para enantiômeros não são aplicáveis.

Dentro da plataforma do GNPS é possível gerar o *molecular networking* e obter as informações químicas de várias amostras/extratos concomitantemente. Para gerar as informações o primeiro passo é realizar experimentos de espectrometria de massas sequencial (auto-MS²) das amostras e inserir esses dados dentro da plataforma GNPS. Assim pode ser gerada a rede molecular fornecendo a similaridade espectral da amostra bem como possíveis anotações de metabólitos (Figura 8) (WANG *et al.*, 2016). Para inserir os dados na plataforma

é necessário primeiramente converter os dados obtidos (extensões *.d*) em uma extensão compatível, como *.mzXML*. E o conjunto de dados com tamanhos maiores que 20 Mb devem ser compactados em softwares como *Filezilla* ou *WinSCP*. Só após esses procedimentos os dados podem ser carregados no GNPS. Por fim, a rede molecular gerada, pode ser visualizada no software Cytoscape (PAUL SHANNON *et al.*, 2003).

Desde 2012, até final de 2019, o GNPS contava com suporte apenas para análises por LC-MS, porém, recentemente foi disponibilizado um novo *workflow* com suporte para GC-MS. Antes de realizar os passos para formar a rede molecular, os espectros de GC-MS passam por um pré-processamento de deconvolução. Durante as análises o usuário pode incluir o índice de Kovats, que ajuda na anotação das substâncias. Esse *workflow* ainda está em processo de aprimoramento, mas apresenta um bom potencial para bons resultados, já que GC-MS é uma técnica bastante robusta.

Figura 8 - Representação da obtenção dos espectros em MS², até a geração da rede de interação molecular no GNPS



Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

1.6 UNIFI - Sistema de Informação Científica, Waters

Outra plataforma que vem sendo utilizada e apresenta bons resultados é o UNIFI, um Sistema de Informação Científica disponível da Waters Corporation. Nessa plataforma é possível integrar a separação de substâncias presentes em um extrato através de um UPLC com a aquisição de dados em Q-TOF-MS^E (E - representa a energia de colisão) e com as bibliotecas de substâncias que podem ser construídas e inseridas para comparação, gerando um relatório de informações e possíveis anotações de substâncias conhecidas presentes nas amostras.

O método de aquisição de dados, MS^E que é uma análise DIA (*data-independent acquisition*) permite atender a uma rápida busca de informações de amostras complexas, por ser um método de alta performance em detecção em MS (*full-scan*) e por fornecer informações do padrão de fragmentação de substâncias de forma rápida e com alta precisão (WHITE PAPER WATERS B, 2020).

Sendo assim, a análise por UPLC-MS^E é dividida em três estágios (Figura 9):

I) Separação de substâncias na amostra complexa por um método eficiente e que melhora a resolução, sensibilidade, e tempo de análise através do UPLC;

II) Geração de dados de MS e MS/MS simultaneamente em janelas de tempo estreitas para gerar os espectros mais rápido, mantendo a alta resolução e sensibilidade (no primeiro estágio, gera o espectro do íon precursor em uma colisão de baixa energia na cela de colisão, e no segundo estágio geram os fragmentos através de uma rampa de energia de colisão mais alta para gerar o máximo de informações dos fragmentos);

III) O alinhamento dos espectros é realizado nessa etapa, em que um algoritmo alinha os espectros do íon precursor e dos fragmentos através do tempo de retenção; e conta ainda com uma deconvolução das substâncias que co-eluem (PLUMB *et al.*, 2006; WATERS, 2020; WHITE PAPER WATERS A, 2020; WHITE PAPER WATERS B, 2020).

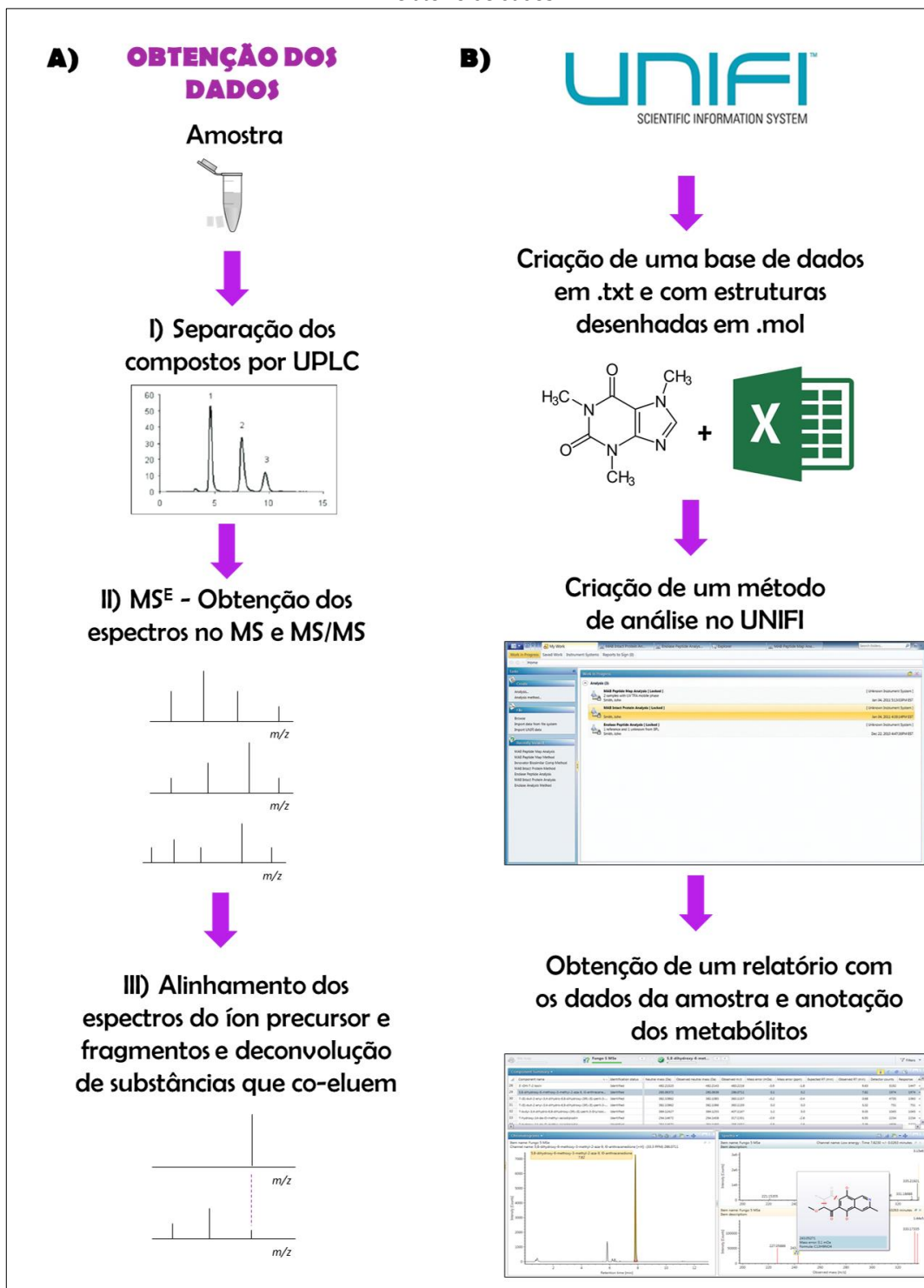
Após a realização da análise em UPLC-QTOF-MS^E, um método é desenvolvido no UNIFI, que consiste em otimizar os parâmetros para melhor sensibilidade do software em comparar os dados da amostra com as bases de dados. Sendo eles, os valores de intensidade dos espectros de alta e baixa energia (MS e MS/MS) (a fim de evitar sinais ruído), o erro em ppm tolerado, os possíveis fragmentos esperados e a adição das bases de dados para comparação (Figura 9).

A plataforma UNIFI compara as análises em MS^E com as bibliotecas de dados. O próprio sistema UNIFI contém algumas bibliotecas de substâncias inseridas, mas, também permite inserir bases de dados que o próprio usuário pode construir (em extensões .txt junto com as

substâncias desenhadas em extensões .mol) de acordo como achar conveniente para seu estudo, o que facilita encontrar a composição de cada amostra de forma mais fácil (WATERS, 2020; XU *et al.*, 2020). Dessa forma é possível obter informações da amostra em relação a massa molecular do íon precursor - podendo determinar a composição elementar, o erro em ppm comparado com os metabólitos da biblioteca e as possíveis sugestões de fragmentações geradas das estruturas inseridas em formato .mol na base de dados - permitindo uma rápida anotação de metabólitos. O UNIFI prevê os possíveis fragmentos das substâncias alvo, através do arquivo em formato .mol a partir de diferentes desconexões da estrutura molecular que produz fragmentos teóricos que são em seguida comparados com os resultados experimentais (WHITE PAPER WATERS A, 2020).

A utilização da técnica UPLC-MS^E com o UNIFI é muito atrativa, pois o UPLC melhora a separação cromatográfica em um tempo de corrida menor, facilitando a análise de várias amostras. Além da utilização de um espectrômetro de massas de tempo de voo que apresenta um alto grau de sensibilidade. E ainda permite a possibilidade de identificação de metabólitos minoritários, graças ao modo MS^E, comparando as amostras com as bases de dados de forma automatizada (DENG *et al.*, 2016).

Figura 9 - A) Obtenção de espectros em MS^E e B) Desenvolvimento de método no UNIFI até a obtenção do relatório de dados



Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

5. CONCLUSÕES

A utilização de ferramentas analíticas do estado da arte junto com novas técnicas de bioinformática, utilizadas em estudos metabolômicos, foram uma ótima escolha para avaliar os extratos de *F. solani*, *P. lilacinum* e também os extratos do co-cultivo para observar a variação metabólica fornecida pela OSMAC.

Ferramentas como *Molecular Networking* e UNIFI auxiliaram no estudo do perfil metabólico de misturas complexas (extratos) utilizando a técnica de LC-MS que foi muito eficaz na análise dos extratos de AcOEt. Além disso a técnica de GC-MS, sendo considerada extremamente robusta, também forneceu a anotação de diversos metabólitos em conjunto com a biblioteca NIST. Essas abordagens permitiram a anotação de 101 metabólitos nos 12 extratos dos fungos analisados nesse trabalho, permitindo observar como o perfil metabólico desses fungos variam de acordo com a OSMAC.

Alguns desses extratos apresentaram atividade antibacteriana e citotóxica, de forma a contextualizar essas matrizes com a importância dos estudos dessas fontes de produtos naturais.

Após a anotação dos metabólitos, foi possível direcionar o isolamento de 5 substâncias inéditas do extrato de co-cultivo PSA, sendo elas γ -pironas, α -pironas e um dipeptídeo.

Outra evidência da OSMAC é a supressão ou aumento na concentração de substâncias quando o cultivo é variado. Esse efeito foi evidenciado para uma das substâncias isoladas (substância 5). De forma que em todos os extratos de *F. solani* e de co-cultivo houve uma grande variação no teor dessa substância. Sendo o co-cultivo a forma de maior produção de acordo com o nosso estudo de quantificação.

Portanto, é possível concluir que a OSMAC demonstra de forma efetiva como tem influência na ativação ou bloqueio de genes biossintéticos desses fungos podendo induzir uma gama de metabólitos muito maiores do que quando utilizado apenas um tipo de cultivo.

O estudo metabolômico guiou o isolamento de novos metabólitos evitando a utilização de abordagens reducionistas (que acabam resultando em isolamento de substâncias conhecidas) de forma muito mais racional para esses fungos já que eles apresentam extenso estudo químico na literatura.

REFERÊNCIAS

- AKSENOV, A. A. et al. Global chemical analysis of biology by mass spectrometry. **Nature Reviews Chemistry**, v. 1, n. 0054, p. 1–20, 2017.
- ALLARD, P. M.; GENTA-JOUE, G.; WOLFENDER, J. L. Deep metabolome annotation in natural products research: towards a virtuous cycle in metabolite identification. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 36, p. 40–49, 1 fev. 2017.
- AND, E.-K. C.; JI, G.-E. Food Microorganisms that Effectively Hydrolyze O-Glycoside but Not C-Glycoside Isoflavones in Puerariae Radix. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 1, p. C25–C28, 2005.
- ANVISA. **Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017**, 2017.
- ARUNPANICHLERT, J. et al. A β -resorcylic macrolide from the seagrass-derived fungus *Fusarium* sp. PSU-ES73. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 10, p. 1633–1637, 2011.
- AVENT, A. G.; HANSON, J. R.; TRUNEH, A. The biosynthesis of nectriapyrone and vermopyrone. **Phytochemistry**, v. 31, n. 10, p. 3447–3449, 1992.
- BAKER, D. D. et al. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural Product Reports**, v. 24, n. 6, p. 1225–1244, 2007.
- BEALE, D. J. et al. Review of recent developments in GC–MS approaches to metabolomics-based research. **Metabolomics**, v. 14, n. 11, p. 1–31, 2018.
- BERNARDINI, S. et al. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. **Natural Product Research**, v. 32, n. 16, p. 1926–1950, 2018.
- BERTRAND, S. et al. Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1180–1204, 2014.
- BISHAYEE, A.; SETHI, G. Bioactive natural products in cancer prevention and therapy: Progress and promise. **Seminars in Cancer Biology**, v. 40_41, p. 1–3, 2016.
- BOGNER, C. W. et al. Bioactive secondary metabolites with multiple activities from a fungal endophyte. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 175–188, 2017.
- BONANTS, P. J. M. et al. A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne* hapla eggs. **Microbiology**, v. 141, p. 775–784, 1995.
- BOONYAKETGOSON, S. et al. Isochromanone derivatives from the endophytic fungus *Fusarium* sp. PDB51F5. **Tetrahedron Letters**, v. 56, p. 5076–5078, 2015.
- BROWN, D. W. et al. Phylogenomic and functional domain analysis of polyketide synthases in *Fusarium*. **Fungal Biology**, v. 116, p. 318–333, 2012.
- BUENO, I. et al. Systematic Review: Impact of point sources on antibiotic-resistant bacteria in the natural environment. **Zoonoses and Public Health**, v. 65, n. 1, p. e162–e184, 2018.
- C. PEDRAS, M. S.; CHUMALA, P. B. Phomapyrones from blackleg causing phytopathogenic fungi: Isolation, structure determination, biosyntheses and biological activity. **Phytochemistry**, v. 66, n. 1, p. 81–87, 2005.
- CANTÚ, M. D. et al. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: Um guia prático. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 669–675, 2008.
- CARDOSO, E.J.B.N, ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ, 2016.
- CARNEIRO, R. M. D. G. Princípios e Tendências do Controle Biológico de Nematóides com Fungos Nematófagos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, p. 113–121, 1992.
- Estudo químico de fungos da rizosfera de Senna spectabilis utilizando abordagem OSMAC e ferramentas analíticas do estado da arte para anotação e caracterização de metabólitos*

- CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021–1030, 2009.
- CHAUDHARY, N. K. et al. Banksialactones and Banksiamarins: Isochromanones and Isocoumarins from an Australian Fungus, *Aspergillus banksianus*. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 7, p. 1517–1526, 2018.
- CHEMICAL BOOK. **4'-Hydroxyacetophenone(99-93-4) 13C NMR**. Disponível em: <https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_99-93-4_13CNMR.htm>. Acesso em: 16 mar. 2020.
- CHERNIN, L. et al. Quorum-sensing quenching by rhizobacterial volatiles. **Environmental Microbiology Reports**, v. 3, n. 6, p. 698–704, 2011.
- CHRISTIE, W. W.; HAN, X. Characterization of lipids by electrospray ionization mass spectrometry. In: CHRISTIE, W. W.; HAN, X. (Eds.). **Lipid Analysis**. 4. ed. Sawston: Woodhead Publishing Limited, 2010. p. 305–338.
- DAHLIN, P. et al. Integrated control of *Meloidogyne incognita* in tomatoes using fluopyram and *Purpureocillium lilacinum* strain 251. **Crop Protection**, v. 124, p. 104874, 2019.
- DEFESA VEGETAL. **Fusarium solani**. Disponível em: <<http://www.defesavegetal.net/fusaso>>. Acesso em: 14 mar. 2020.
- DEGENKOLB, T.; VILCINSKAS, A. Metabolites from nematophagous fungi and nematocidal natural products from fungi as an alternative for biological control. Part I: metabolites from nematophagous ascomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 9, p. 3799–3812, 2016.
- DEMARQUE, D. P. et al. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: An important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 432–455, 2016.
- DENG, L. et al. Identification of chemical ingredients of peanut stems and leaves extracts using UPLC-QTOF-MS coupled with novel informatics UNIFI platform. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 51, n. 12, p. 1157–1167, 2016.
- DESHMUKH, S. K.; VEREKAR, S. A.; BHAVE, S. V. Endophytic fungi: A reservoir of antibacterials. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–44, 2014.
- DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 843–847, 2001.
- EL-ANEED, A.; COHEN, A.; BANOUB, J. Mass spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 44, n. 3, p. 210–230, 2009.
- ESCRIVÁ, L.; FONT, G.; MANYES, L. In vivo toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 78, p. 185–206, 1 abr. 2015.
- FELL, J. W. et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1351–1371, 2000.
- FENAILLE, F. et al. Data acquisition workflows in liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry-based metabolomics: Where do we stand? **Journal of Chromatography A**, v. 1526, p. 1–12, 2017.
- FORNAL, E. et al. Fast and easy liquid chromatography–mass spectrometry method for evaluation of postharvest fruit safety by determination of mycotoxins: Fumitremorgin C and verruculogen. **Postharvest Biology and Technology**, v. 131, p. 46–54, 2017.
- FRANCISCO, M. R.; SALDANHA, T.; FRAGA, M. E. Fungi as an alternative to produce essential

fatty acids. **Científica**, v. 45, n. 2, p. 123, 2017.

GEORGANTEA, P. et al. Sesquiterpenes with inhibitory activity against CDC25 phosphatases from the soft coral *Pseudopterogorgia rigida*. **Tetrahedron**, v. 72, n. 23, p. 3262–3269, 2016.

GONG, J. et al. Fusaresters A–E, new γ -pyrone-containing polyketides from fungus *Fusarium* sp. Hungcl and structure revision of fusariumin D. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 17, p. 5526–5532, 2019.

GOSWAMI, S. et al. A review on lovastatin and its production. **Journal of Biochemical Technology**, v. 4, n. 1, p. 581–587, 2012.

GROVE, J. F.; POPLER, M. Metabolic products of *Fusarium larvarum* Fuckel. The fusarentins and the absolute configuration of monocerin. **Journal of Chemical Information and Modeling**, p. 2048–2051, 1979.

GUIMARÃES, D. O. et al. A simple method for the quantitative analysis of tyrosol by hplc in liquid czapek cultures from endophytic fungi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 1, p. 188–194, 2009.

GUIMARÃES, D. O. et al. Diketopiperazines produced by endophytic fungi found in association with two Asteraceae species. **Phytochemistry**, v. 71, n. 11–12, p. 1423–1429, 2010.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Publishing Group**, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015.

HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. . **Microbiol Spectrum**, v. 5, p. 1–17, 2017.

HEWAGE, R. T. et al. One strain-many compounds (OSMAC) method for production of polyketides, azaphilones, and an isochromanone using the endophytic fungus *Dothideomycete* sp. **Phytochemistry**, v. 108, p. 87–94, 2014.

HU, L.; RYCHLIK, M. Biosynthesis of 15 N 3-Labeled Enniatins and Beauvericin and Their Application to Stable Isotope Dilution Assays. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 29, p. 7129–7136, 2012.

HUMPHREY, J. M.; CHAMBERLIN, A. R. Chemical synthesis of natural product peptides: Coupling methods for the incorporation of noncoded amino acids into peptides. **Chemical Reviews**, v. 97, n. 6, p. 2243–2266, 1997.

JAYAKRISHNAN, T.; BENJAMIN, S. *Purpureocillium lilacinum* Strain BP13 Produces Flavoglucin. **Electronic Journal of Biology**, v. 12, n. 4, p. 472–476, 2016.

JOHNSON, R. S.; MARTIN, S. A.; BIEMANN, K. Collision-induced fragmentation of (M + H)⁺ ions of peptides. Side chain specific sequence ions. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes**, v. 86, p. 137–154, 1988.

KAKEYA, H. et al. Lucilactaene, a new cell cycle inhibitor in p53-transfected cancer cells, produced by a *Fusarium* sp. **The Journal of Antibiotics**, v. 54, n. 10, p. 850–854, 2001.

KAZUSAKI, M. et al. Validation of analytical procedures by high-performance liquid chromatography for pharmaceutical analysis. **Chromatography**, v. 33, n. 2, p. 65–73, 2012.

KHARWAR, R. N. et al. A comparative study of endophytic and epiphytic fungal association with leaf of *Eucalyptus citriodora* Hook., and their antimicrobial activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 1941–1948, 2010.

KIND, T. et al. FiehnLib: Mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 24, p. 10038–10048, 2009.

Estudo químico de fungos da rizosfera de Senna spectabilis utilizando abordagem OSMAC e ferramentas analíticas do estado da arte para anotação e caracterização de metabólitos

- KONGUE TATONG, M. D. et al. Banchromene and other secondary metabolites from the endophytic fungus *Fusarium* sp. obtained from *Piper guineense* inhibit the motility of phytopathogenic *Plasmopara viticola* zoospores. **Tetrahedron Letters**, v. 55, n. 30, p. 4057–4061, 2014.
- KOPKA, J. et al. GMD@CSB.DB: The Golm metabolome database. **Bioinformatics**, v. 21, n. 8, p. 1635–1638, 2005.
- KORNSAKULKARN, J. et al. Dihydronaphthalenones from endophytic fungus *Fusarium* sp. BCC14842. **Tetrahedron**, v. 67, n. 39, p. 7540–7547, 2011.
- KWAN, J. C. et al. Lyngbyoic acid, a “tagged” fatty acid from a marine cyanobacterium, disrupts quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular BioSystems**, v. 7, n. 4, p. 1205–1216, 2011.
- LENTA, B. N. et al. Purpureone, an antileishmanial ergochrome from the endophytic fungus *Purpureocillium lilacinum*. **Zeitschrift für Naturforschung - Section B Journal of Chemical Sciences**, v. 71, n. 11, p. 1159–1167, 2016.
- LI, J. W.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, n. 5935, p. 161–165, 2009.
- LIFE. **Aspergillus terreus**. Disponível em: <<http://www.life-worldwide.org/fungal-diseases/aspergillus-terreus>>. Acesso em: 14 mar. 2020.
- LIU, X. et al. Secondary metabolites of *Fusarium* sp., an endophytic fungus in *Astragalus membranaceus*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 51, n. 6, p. 1199–1201, 2015.
- LIUZZI, V. C. et al. Enniatin and beauvericin biosynthesis in *Fusarium* species: Production profiles and structural determinant prediction. **Toxins**, v. 9, n. 2, p. 1–17, 2017.
- LOGRIECO, A. et al. Beauvericin production by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 8, p. 3084–3088, 1998.
- LUANGSA-ARD, J. et al. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 321, n. 2, p. 141–149, 2011.
- MARTINEZ, A. F. C.; MORAES, L. A. B. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry characterization of five new leucinostatins produced by *Paecilomyces lilacinus* CG - 189. **Journal of Antibiotics**, v. 68, n. 3, p. 178–184, 2015.
- MATA, R. et al. Insights in Fungal Bioprospecting in Mexico. **Planta Medica**, v. 84, n. 9–10, p. 594–605, 2018.
- MCDERMOTT, J. R.; BENOITON, N. L. N -Methylamino Acids in Peptide Synthesis. III. Racemization during Deprotection by Saponification and Acidolysis. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 51, n. 15, p. 2555–2561, 1973.
- MELO, DE A. G. M. et al. Leishmanicidal activity of the crude extract, fractions and major piperidine alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis*. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, p. 277–281, 15 fev. 2014.
- MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J. M. The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 634–663, 2013.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 25, DE 4 DE SETEMBRO DE 2019**. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-n-25-de-4-de-setembro-de-2019-215086190>>. Acesso em: 14 mar. 2020.
- MOLDOVEANU, S. C.; DAVID, V. Derivatization Methods in GC and GC/MS. In: KUSCH, P. (Ed.). **Gas Chromatography Derivatization, Sample Preparation, Application**. 1. ed. [s.l.] IntechOpen, 2019. p. 1–33.

- MOMOSE, I. et al. Leucinostatin Y: A Peptaibiotic Produced by the Entomoparasitic Fungus *Purpureocillium lilacinum* 40-H-28. **Journal of Natural Products**, v. 82, n. 5, p. 1120–1127, 2019.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.
- MULDER, K. C. L. et al. Lovastatin production: From molecular basis to industrial process optimization. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 648–665, 2015.
- MÜNGER, L. H.; BOULOS, S.; NYSTRÖM, L. UPLC-MS/MS based identification of dietary steryl glucosides by investigation of corresponding free sterols. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, p. 1–19, 2018.
- MUNKVOLD, G. P. *Fusarium* species and their associated mycotoxins. In: MORETTI, A.; SUSCA, A. (Eds.). **Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols**. 1. ed. New York: Humana Press, 2017. p. 51–106.
- NAAZ, F. et al. Anti-tubulin agents of natural origin: Targeting taxol, vinca, and colchicine binding domains. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 171, p. 310–331, 2019.
- NAMAN, C. B. et al. Integrating Molecular Networking and Biological Assays To Target the Isolation of a Cytotoxic Cyclic Octapeptide, Samoamide A, from an American Samoan Marine Cyanobacterium. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 3, p. 625–633, 2017.
- NCCLS. **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: norma aprovada**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.clsi.org>. Acesso em: 16 mar. 2020.
- NIEHAUS, E. M. et al. Genetic manipulation of the *fusarium fujikuroi* fusarin gene cluster yields insight into the complex regulation and fusarin biosynthetic pathway. **Chemistry and Biology**, v. 20, n. 8, p. 1055–1066, 2013.
- NISHIYAMA, Y. et al. A racemization-free coupling method for peptides having N-methylamino acids at the carboxy-termini. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 4, p. 576–578, 1999.
- NONAKA, K. et al. Enhancement of metabolites productivity of *Penicillium pinophilum* FKI-5653, by co-culture with *Trichoderma harzianum* FKI-5655. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, p. 769–774, 2011.
- OH, D.-C. et al. Induced Production of Emericellamides A and B from the Marine-Derived Fungus *Emericella* sp. in Competing Co-culture. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 515–520, 2007.
- PANDEY, V. V.; VARSHNEY, V. K.; PANDEY, A. Lovastatin: A Journey from Ascomycetes to Basidiomycetes Fungi. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v. 9, n. 3, p. 162–178, 2019.
- PAUL SHANNON, 1 et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. **Genome Research**, v. 13, n. 22, p. 6, 2003.
- PAVIA, D. L. et al. Espectrometria de Massas. In: **Introdução à Espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. p. 399–499.
- PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: uma revisão para químicos. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 268–277, 1996.
- PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45–61, 2002.
- PLUMB, R. S. et al. UPLC/MSE; a new approach for generating molecular fragment information for biomarker structure elucidation. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, p. 1989–1994, 2006.
- QUALITY MARINE. **Purple Frilly / Pseudopterogorgia elisabethae / Wild Coral Gorgonians -**

- Quality Marine**. Disponível em: <<http://www.qualitymarine.com/Products/Invertebrates/Wild/Coral-Gorgonians/Pseudopterogorgia-elisabethae/Purple-Frilly>>. Acesso em: 14 mar. 2020.
- RAN, X. et al. Characterization and antitumor activity of camptothecin from endophytic fungus *Fusarium solani* isolated from *Camptotheca acuminata*. **African Health Sciences**, v. 17, n. 2, p. 566–574, 2017.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.
- ROIG, M. et al. Antibacterial activity of the emerging *Fusarium* mycotoxins enniatins A, A1, A2, B, B1, and B4 on probiotic microorganisms. **Toxicon**, v. 85, p. 1–4, 2014.
- ROMANO, S. et al. Extending the “ One Strain Many Compounds ” (OSMAC) Principle to Marine Microorganisms. **Marine Drugs**, v. 16, p. 1–29, 2018.
- ROMANS-FUERTE, P. et al. Identification of the non-ribosomal peptide synthetase responsible for biosynthesis of the potential anti-cancer drug sansalvamide in *Fusarium solani*. **Current Genetics**, v. 62, n. 4, p. 799–807, 2016.
- RUSMAN, Y. et al. Soudanones A-G: Antifungal Isochromanones from the Ascomycetous Fungus *Cadophora* sp. Isolated from an Iron Mine. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 6, p. 1456–1460, 2015.
- SALAH, H. et al. Phylogenetic diversity of human pathogenic *Fusarium* and emergence of uncommon virulent species. **Journal of Infection**, v. 71, n. 6, p. 658–666, 1 dez. 2015.
- SCHMIDT, K. et al. Novel tetramic acids and pyridone alkaloids, militarinones B, C, and D, from the insect pathogenic fungus *Paecilomyces militaris*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 3, p. 378–383, 2003.
- SHABNAM SHAIKH, S. G. AND M. S. Rhizosphere Microbial Community Structure: A Review. **Vidya: A Journal of Gujrat University**, v. 1, n. 2, p. 14–28, 2016.
- SHAH, A. et al. Discovery of anti-microbial and anti-tubercular molecules from *Fusarium solani*: an endophyte of *Glycyrrhiza glabra*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 5, p. 1168–1176, 2017.
- SHARMA, A. et al. Evidence for the involvement of nematocidal toxins of *Purpureocillium lilacinum* 6029 cultured on Karanja deoiled cake liquid medium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 5, p. 1–5, 2016.
- SHEN, W. Y. et al. Two new polyhydroxysterols produced by *Fusarium solani*, an endophytic fungus from *Chloranthus multistachys*. **Natural Product Research**, v. 30, n. 19, p. 2173–2182, 2016.
- SILVA, D. H. S. et al. Spectaline, cassine and semi-synthetic analogues as potential candidate drugs for the treatment of Alzheimer disease. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 38–46, 2010.
- SILVA, R. DA; LOPES, N. P.; SILVA, D. B. Metabolomics. In: LOPES, N. P.; SILVA, R. R. (Eds.). **Mass Spectrometry in Chemical Biology: Evolving Applications**. [s.l.] Royal Society of Chemistry, 2017. p. 57–81.
- SILVA, F. DE O. et al. Evaluation of central nervous system effects of iso-6-cassine isolated from *Senna spectabilis* var. *excelsa* (Schrad) in mice. **Fitoterapia**, v. 82, n. 2, p. 255–259, 2011.
- SMITH, C. A. et al. METLIN: A metabolite mass spectral database. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 27, n. 6, p. 747–751, 2005.
- SNYDER, D. T.; COOKS, R. G. Multigenerational Broadband Collision-Induced Dissociation of Precursor Ions in a Linear Quadrupole Ion Trap. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 27, n. 12, p. 1914–1921, 2016.

- SONG, H. H. et al. Structural analysis of enniatin H, I, and MK1688 and beauvericin by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and their production by *Fusarium oxysporum* KFCC 11363P. **Food Additives and Contaminants**, v. 26, n. 4, p. 518–526, 2009.
- SORDON, S. et al. Microbial glycosylation of daidzein, genistein and biochanin a: Two new glucosides of biochanin A. **Molecules**, v. 22, n. 1, 2017.
- SY-CORDERO, A. A.; PEARCE, C. J.; OBERLIES, N. H. Revisiting the enniatins: A review of their isolation, biosynthesis, structure determination and biological activities. **Journal of Antibiotics**, v. 65, n. 11, p. 541–549, 2012.
- SZYPULA, W. et al. Determination of huperzine a in *Huperzia selago* plants from wild population and obtained in vitro culture by high-performance liquid chromatography using a chaotropic mobile phase. **Acta Chromatographica**, v. 23, n. 2, p. 339–352, 2011.
- 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, 2014.
- TANSEER, S.; ANJUM, T. Modification of C and N sources for enhanced production of cyclosporin “A” by *Aspergillus terreus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1374–1383, 2011.
- TATUM, J. H.; BAKER, R. A. Naphthoquinones produced by *Fusarium solani* isolated from citrus. **Phytochemistry**, v. 22, n. 2, p. 543–547, 1983.
- TELES, A. P. C.; TAKAHASHI, J. A. Paecilomide, a new acetylcholinesterase inhibitor from *Paecilomyces lilacinus*. **Microbiological Research**, v. 168, n. 4, p. 204–210, 6 maio 2013.
- TOGHUEO, R. M. K. Bioprospecting endophytic fungi from *Fusarium* genus as sources of bioactive metabolites. **Mycology**, p. 1–21, 2019.
- TRIPATHI, K. D. **Essentials of medical pharmacology**. 8. ed. [s.l.] Jp Medical Ltd, 2018.
- UTD JARDIM BOTÂNICO. *Senna spectabilis*. Disponível em: <https://jb.utad.pt/especie/Senna_spectabilis>. Acesso em: 14 mar. 2020.
- VALLI, M. et al. Development of a natural products database from the biodiversity of Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 3, p. 439–444, 2013.
- VAN DE VELDE, M. E. et al. Vincristine-induced peripheral neuropathy in children with cancer: A systematic review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 114, p. 114–130, 1 jun. 2017.
- VANDERMOLEN, K. M. et al. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. **AMB express**, v. 3, n. 7, p. 1–7, 2013.
- VIANT, M. R.; SOMMER, U. Mass spectrometry based environmental metabolomics: A primer and review. **Metabolomics**, v. 9, p. 144–158, 2013.
- VIEGAS, C. et al. Further Bioactive Piperidine Alkaloids from the Flowers and Green Fruits of *Cassia spectabilis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 908–910, 2004.
- VIEGAS, C. J. et al. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1279–1286, 2006.
- WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, p. 828–837, 2016.
- WANG, M. et al. MASST: A Web-based Basic Mass Spectrometry Search Tool for Molecules to Search Public Data. **bioRxiv**, p. 1–18, 2019.
- WATERS. **UNIFI Scientific Information System**. Disponível em: <https://www.waters.com/waters/en_US/UNIFI-Scientific-Information-System/nav.htm?cid=134801359&locale=en_US>. Acesso em: 16 mar. 2020.

- WHITE PAPER WATERS A. **Componentization following 3D-peak detection in the UNIFI scientific information system**. Disponível em: <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005480en.pdf>>. Acesso em: 16 mar. 2020.
- WHITE PAPER WATERS B. **An overview of the principles of MSE the engine that drives MS performance**. Disponível em: <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004036en.pdf>>. Acesso em: 16 mar. 2020.
- WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **Biomedical and environmental sciences : BES**. [s.l.] Academic Press, Inc., 1990. p. 315–322.
- WIKIPÉDIA. **Catharanthus**. Disponível em: <<https://en.wikipedia.org/wiki/Catharanthus>>. Acesso em: 18 mar. 2020.
- XU, L. et al. β -Resorcylic acid lactones from a Paecilomyces fungus. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 5, p. 885–889, 2010.
- XU, L. et al. Rapid identification of chemical profile in Gandou decoction by UPLC-Q-TOF-MSE coupled with novel informatics UNIFI platform. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 10, n. 1, p. 35–48, 2020.
- YANG, J. Y. et al. Molecular networking as a dereplication strategy. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 9, p. 1686–1699, 2013.
- YANG, S. et al. Hydrolysis of soybean isoflavone glycosides by a thermostable β -glucosidase from Paecilomyces thermophila. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1247–1252, 2009.
- ZENG, Y. J. et al. Structure and immunomodulatory activity of polysaccharides from Fusarium solani DO7 by solid-state fermentation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 137, p. 568–575, 2019.
- ZHANG, Y.-G. et al. [The study of the secondary metabolites from fungus Paecilomyces sp]. **Zhong Yao Cai**, v. 34, n. 5, p. 707–709, maio 2011.
- ZHAO, S. et al. Solid-liquid phase equilibrium and thermodynamic analysis of griseofulvin in twelve mono-solvents. **Journal of Molecular Liquids**, v. 296, p. 111861, 2019.
- ZHU, B.; JEFFREY, A. M. Fusarin C: Isolation and Identification of two microsomal metabolites. **Chemical Research in Toxicology**, v. 6, p. 97–101, 1993.