

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Instituto de Química de Araraquara

GABRIELA ANJOS DE STEFANO ESCALIANTE

Uso da metabolômica e de ferramentas quimiométricas
para a anotação de metabólitos de fungos endofíticos
isolados das raízes de *Senna spectabilis*

Araraquara

2022

GABRIELA ANJOS DE STEFANO ESCALIANTE

Uso da metabolômica e de ferramentas quimiométricas
para a anotação de metabólitos de fungos endofíticos
isolados das raízes de *Senna spectabilis*

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

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Araraquara

2022

E74u Escalante, Gabriela Anjos de Stefano
Uso da metabolômica e de ferramentas quimiométricas para a anotação de metabólitos de fungos endofíticos isolados das raízes de *Senna spectabilis* / Gabriela Anjos de Stefano
Escalante. -- Araraquara, 2022
113 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara
Orientador: Ian Castro-Gamboa

1. Produtos naturais. 2. *Fusarium oxysporum*. 3. Micotoxinas. 4. Metabólitos. 5. Quimiometria. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

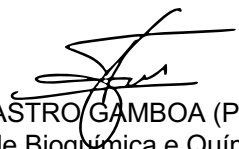
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Uso da metabolômica e de ferramentas quimiométricas para a anotação de metabólitos de fungos endofíticos isolados das raízes de *Senna spectabilis*"

AUTORA: GABRIELA ANJOS DE STEFANO ESCALIANTE

ORIENTADOR: IAN CASTRO-GAMBOA

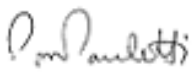
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. IAN CASTRO GAMBOA (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Ian Castro
Gamboa:213
66541871

Assinado de forma digital por Ian Castro Gamboa:21366541871
Dados: 2022.07.13 17:26:28 -03'00'


Profa. Dra. REBECA PREVIANTE MEDINA (Participação Virtual)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo - IFSP - Cubatão


Profa. Dra. PATRÍCIA MENDONÇA PAULETTI (Participação Virtual)
Universidade de Franca - UNIFRAN - Franca

Araraquara, 13 de julho de 2022

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Gabriela Anjos De Stefano Escaliente

Nome em citações científicas: Escaliente, G. A. S.

e-mail: gabriela.escaliente@unesp.br

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Departamento de Bioquímica e Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara – Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” – UNESP.

Rua Prof. Francisco Degni, 55, Bairro Quitandinha, CEP 14.800-060, Araraquara, SP, Brasil.

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2020

Graduação: Bacharelado em Química (2016 – 2020)

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” – UNESP – Instituto de Química de Araraquara – SP.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2015

Técnico em Química (08/2014-12/2015)

Instituição: Fundação Indaiatubana de Educação e Cultura (FIEC) – SP.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos

ESCALIANTE, G. A. S.; CUNHA, C. L.; NASCIMENTO, I. R. Phytochemical Analysis of *Aristolochia gigantea* Seeds using GC/MS Molecular Networking. In: ANAIS DO BRAZILIAN CONFERENCE ON NATURAL PRODUCTS, 2021, Goiânia. Anais eletrônicos... Campinas, Galoá, 2021. Disponível em: <<https://proceedings.science/bcnp-series/bcnp-2021/papers/phytochemical->

analysis-of-aristolochia-gigantea-seeds-using-gc-ms-molecular-networking?lang=en> Acesso em: 28 nov. 2021.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

8th BCNP. Phytochemical Analysis of *Aristolochia gigantea* Seeds using GC/MS Molecular Networking. 2021. (Congresso).

AGRADECIMENTOS

À minha família, por sempre me apoiar e me incentivar a seguir os meus sonhos. Por todo amor e carinho, pelos conselhos e por sempre apoiar as minhas escolhas, sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa, pela oportunidade de poder realizar esse trabalho, por toda dedicação que teve para me orientar e por todo carinho que sempre tem com todos os seus alunos.

Aos meus amigos Mayara, Thais, Flávia, Jessica, Larissa, Luiza e Thales, por todos os momentos felizes e por sempre demonstrarem seu carinho e apoio até nos momentos mais difíceis, eu não conseguiria ter chegado até aqui sem a amizade de vocês.

Aos mestrandos Mayara e Emanuel por todo apoio, ensinamentos e momentos que compartilhamos dentro e fora do laboratório.

Aos doutorandos Juvenal Henrique, Victor, Rafael, Maria e Camila, por todo os ensinamentos que me proporcionaram e por todo auxílio que me deram dentro e fora do laboratório.

A Professora Dra. Isabele Nascimento por ceder solvente para a realização das minhas análises.

A Professora Dra. Ilana L. B. C. Camargo pela realização dos ensaios biológicos.

Ao Professor Dr. Marcos Antônio Soares pela realização da identificação das linhagens fúngicas.

Aos técnicos João e Juliana por todas as análises realizadas.

A todos funcionários do Instituto de Química por estarem sempre de prontidão para nos auxiliarem no que for preciso.

Ao grupo de pesquisa NuBBE e a Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Câmpus Araraquara, por fornecer o espaço e todo o suporte indispensável para a realização deste trabalho.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP, pelo auxílio financeiro.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela bolsa concedida (Nº do processo 88887.484085/2020-00).

RESUMO

Fungos endofíticos são microrganismos que em um período do seu ciclo de vida colonizam os tecidos das raízes e da parte aérea de plantas sem causar nenhum dano aparente às mesmas, sendo responsáveis por produzirem ou levarem a planta a produzir uma vasta gama de metabólitos secundários de interesse. Diante disso, visando entender como diferentes fontes de nutrientes podem inibir ou ativar diferentes rotas biossintéticas do fungo *Fusarium oxysporum*, duas linhagens dessa espécie foram cultivadas nos meios de Czapek, Malte e PDB. Os extratos obtidos foram submetidos a ensaios de atividade antibacteriana e analisados por LC-MS utilizando-se das redes moleculares a partir da plataforma GNPS e do UNIFI (Sistema de Informação Científica – Waters Corporation) para avaliar a variação da produção de metabólitos secundários. Realizou-se um planejamento fatorial 2^2 para uma das linhagens em meio de PDB, onde analisou-se como as variáveis agitação e exposição a luz afetaram o rendimento e a diversidade química dos extratos brutos obtidos e uma curva de crescimento por 35 dias para observar o padrão de crescimento micelia. A partir dos seis extratos estudados foi possível anotar 35 metabólitos sendo eles alcaloides, derivados de naftoquinonas, peptídeos cíclicos entre outros. Dentre esses, os derivados de naftoquinonas foram produzidos quase que exclusivamente no meio de Malte, o que nos mostra a influência da OSMAC na ativação de outras rotas biossintéticas. O planejamento fatorial nos indicou a possibilidade da otimização da variável agitação visando obter maiores quantidades de determinados metabólitos. A curva de crescimento resultou em um perfil de crescimento como uma curva de segundo grau. A partir dela também se acompanhou a produção de determinadas micotoxinas, o que indicou que as enniatinas possam ser um produto de degradação da beauvericina e que essas substâncias possam ser utilizadas pelo *Fusarium oxysporum* como fonte de aminoácidos.

Palavras-chave: Produtos Naturais. *Senna spectabilis*. *Fusarium oxysporum*. OSMAC. GNPS. UNIFI.

ABSTRACT

Endophytic fungi are microorganisms that during their life cycle colonize the tissues of the roots and aerial parts of plants without causing any apparent damage to them, being responsible for producing or leading the plant to produce a wide range of secondary metabolites of interest. Therefore, aiming to understand how different nutrient sources can inhibit or activate different biosynthetic pathways of the fungus *Fusarium oxysporum*, two strains of this fungus were cultivated in Czapek, Malt and PDB culture media. The extracts obtained were submitted to antibacterial activity assays and analyzed by LC-MS using molecular networks from the GNPS platform and UNIFI (Scientific Information System - Waters Corporation) to evaluate the variation in the production of secondary metabolites. A factorial design 2^2 was performed for one of the strains in PDB medium, where it was analyzed how the variables agitation and light exposure affected the yield and chemical diversity of the crude extracts obtained, and a thirty-five-day growth curve to observe the mycelia growth pattern. From the six extracts studied it was possible to annotate thirty-five-metabolites being them alkaloids, naphthoquinone derivatives, cyclic peptides among others. Among these, the naphthoquinone derivatives were produced almost exclusively in the malt medium, which shows us the influence of OSMAC in the activation of other biosynthetic routes. The factorial design indicated the possibility of optimizing the agitation variable to obtain larger quantities of certain metabolites. The growth curve resulted in a growth profile as a second-degree curve. From this curve the production of certain mycotoxins was also followed, which indicated that the enniatins could be a degradation product of beauvericin and that these substances could be used by *Fusarium oxysporum* as a source of amino acids.

Keywords: Natural products. *Senna spectabilis*. *Fusarium oxysporum*. OSMAC. GNPS. UNIFI.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Substâncias bioativas isoladas de fungos endofíticos.....	19
Figura 2: <i>Senna spectabilis</i>	21
Figura 3: Substâncias bioativas isoladas da <i>Senna spectabilis</i>	22
Figura 4: <i>Fusarium oxysporum</i> em placa de Petri com PDA.....	23
Figura 5: Metabólitos secundários de <i>Fusarium oxysporum</i>	25
Figura 6: Esquema da obtenção de redes moleculares a partir da plataforma GNPS	28
Figura 7: Esquema da obtenção de dados em aquisição MS ^E para análise no sistema UNIFI.....	29
Figura 8: Esquema de obtenção dos extratos brutos nos meios de Malte, PDB e Czapek	35
Figura 9: Esquema dos extratos brutos para cada linhagem fúngica em diferentes meios líquidos.....	36
Figura 10: Esquema de obtenção dos extratos brutos do planejamento fatorial 2 ²	40
Figura 11: Imagens do macrocultivo e microcultivo da linhagem fúngica S.S_R3.....	43
Figura 12: Imagens do macrocultivo e microcultivo da linhagem fúngica S.S_R9.....	43
Figura 13: Comparação do perfil químico dos extratos brutos nos meios de Czapek, PDB e Malte por HPLC-DAD.....	47
Figura 14: Espectros de RMN de ¹ H dos extratos da linhagem S.S_R3 nos meios de Czapek, PDB e Malte (D ₃ COD, 14, 1 T)	48
Figura 15: Espectros de RMN de ¹ H dos extratos da linhagem S.S_R9 nos meios de Czapek, PDB e Malte (D ₃ COD, 14, 1 T)	49
Figura 16: Gráfico de scores para as linhagens S.S_R3 e S.S_R9 nos diferentes meios de cultivo	50
Figura 17: Perfil BPC das linhagens S.S_R3 e S.S_R9 por LC-ESI-(+)-IT-MS51	
Figura 18: Representação da rede molecular gerada a partir dos dados de LC-ESI-(+)-IT-MS visualizada no Cytoscape 3.9.0	52
Figura 19: Cluster das enniatinas (1-6) e suas respectivas estruturas.....	54
Figura 20: Espectros de MS ² por LC-ESI-(+)-IT-MS das substâncias 5 e 6 extraídos através do software DataAnalysis 4.3.....	55

Figura 21: Esquema do cluster contendo a substância (7) com a sua respectiva estrutura e espectro de MS ² por LC-ESI-(+)-IT-MS extraído através do software DataAnalysis 4.3	56
Figura 22: Cluster onde foram anotadas as substâncias 8 e 9 e suas respectivas estruturas	57
Figura 23: Espectro de MS ² via LC-ESI-(+)-IT-MS da substância 8.....	58
Figura 24: Proposta de fragmentação da substância 8 por ESI	58
Figura 25: Espectro de MS ² via LC-ESI-(+)-IT-MS da substância 9.....	59
Figura 26: Proposta de fragmentação da substância 9 por ESI	60
Figura 27: Estrutura da substância 10 anotada via UNIFI.....	68
Figura 28: Íons fragmentos da substância 4 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	69
Figura 29: Proposta de fragmentação por ESI para a substância 4.....	70
Figura 30: Íons fragmentos da substância 7 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	71
Figura 31: Proposta de fragmentação de íons característicos da substância 7	72
Figura 32: Estrutura dos alcaloides (11-18) anotados por UPLC-QTOF/MS ^E no modo positivo através do software UNIFI.....	73
Figura 33: Íons fragmentos das substâncias 11-14 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	74
Figura 34: Proposta de fragmentação da substância 11 por ESI	76
Figura 35: Espectro de MS ² via UPLC-QTOF/MS ^E da substância 15	77
Figura 36: Proposta de fragmentação da substância 15 por ESI	77
Figura 37: Espectro de MS ² via UPLC-QTOF/MS ^E da substância 16	78
Figura 38: Íons fragmentos da substância 17 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	78
Figura 39: Íons fragmentos da substância 18 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	78
Figura 40: Estrutura dos derivados de naftoquinona (19-27) anotados por UPLC-QTOF/MS ^E no modo positivo através do software UNIFI	80
Figura 41: Íons fragmentos da substância 19 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	81
Figura 42: Proposta de fragmentação da substância 19 por ESI	81

Figura 43: Íons fragmentos da substância 9-O-metilfusarubina por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI.....	82
Figura 44: Proposta de fragmentação da substância 22 por ESI	83
Figura 45: Íons fragmentos da substância 24 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	84
Figura 46: Íon fragmento da substância 25 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	84
Figura 47: Proposta de fragmentação da substância 26 por ESI	85
Figura 48: Íons fragmentos das substâncias 26 e 27 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	86
Figura 49: Estrutura dos terpenoides (28-31) anotados por UPLC-QTOF/MS ^E no modo positivo através do software UNIFI.....	87
Figura 50: Íons fragmentos das substâncias 28 e 29 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	88
Figura 51: Íon fragmento da substância 30 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	88
Figura 52: Íon fragmento da substância 31 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	89
Figura 53: Estrutura dos derivados de jasmonato (32 e 33) anotados por UPLC-QTOF/MS ^E no modo positivo através do software UNIFI	89
Figura 54: Íons fragmentos das substâncias 32 e 33 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	90
Figura 55: Estrutura das antraquinonas (34 e 35) anotadas por UPLC-QTOF/MS ^E no modo positivo através do software UNIFI.....	90
Figura 56: Íons fragmentos das substâncias 34 e 35 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	91
Figura 57: Gráfico das médias marginais para a resposta massa do extrato bruto	92
Figura 58: Diagrama de Pareto para os efeitos sobre a massa do extrato bruto	93
Figura 59: Perfil metabólico BPC em modo positivo os ensaios únicos P1SSR9 a P4SSSR9 de <i>F. oxysporum</i> nas diferentes condições do planejamento fatorial em LC-ESI-(+)-IT-MS	94

Figura 60: Análise de Componentes Principais (PC1xPC2) para as 4 condições de cultivo do fungo <i>F. oxysporum</i>	95
Figura 61: Curva de crescimento de <i>Fusarium oxysporum</i> no meio de PDB em 35 dias.....	97
Figura 62: Ajuste polinomial de segunda ordem da curva de crescimento de <i>F. oxysporum</i> no meio de PDB em 35 dias	98
Figura 63: Perfis cromatográficos dos extratos obtidos a cada 5 dias	98
Figura 64: Perfil químico por UPLC-ESI-QTOF-MS dos extratos brutos em diferentes períodos de cultivo para o meio de PDB	99
Figura 65: Perfil químico por UPLC-ESI-QTOF-MS do extrato bruto no meio de PDB em 28 dias de cultivo	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variáveis planejamento fatorial 2 ²	39
Tabela 2: Matriz do planejamento fatorial completo 2 ²	39
Tabela 3: Resultado da triagem inicial dos extratos a 512 µg/mL	44
Tabela 4: Valores de CIM e CBM do extrato S.S_R9-P	45
Tabela 5: Massa dos extratos brutos de cada meio para as duas linhagens fúngicas.....	46
Tabela 6: Substâncias anotadas através da plataforma GNPS para os extratos de ambas as linhagens nos diferentes meios de cultivo	61
Tabela 7: Metabólitos anotados para as duas linhagens de <i>F. oxysporum</i> nos diferentes meios de cultivo por UPLC-QTOF/MS ^E no modo positivo através do software UNIFI	64
Tabela 10: Respostas obtidas para cada um dos ensaios do planejamento fatorial completo 2 ²	91
Tabela 11: Efeitos calculados das variáveis estudadas para a massa do extrato bruto	92
Tabela 12: Média das massas das triplicatas e peso seco dos micélios de <i>F. oxysporum</i> a cada cinco dias	96
Tabela 13: Equações de regressão, valores de R ² ajustado e valores de AIC dos modelos correspondentes à produção micelial.....	97

LISTA DE APÊNDICE

Apêndice 1: Estruturas das possíveis anotações para as substâncias 5 e 6	108
Apêndice 2: Íons fragmentos da substância 2 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	109
Apêndice 3: Íons fragmentos da substância 3 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	110
Apêndice 4: Íons fragmentos da substância 27 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	111
Apêndice 5: Íons fragmentos da substância 20 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	112
Apêndice 6: Íons fragmentos da substância 21 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	112
Apêndice 7: Íons fragmentos da substância 23 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
AIC	Sigla em inglês para <i>Critério de Informação de Akaike</i>
BPC	Sigla em inglês <i>Cromatograma do Pico Base</i>
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
C18	Adsorvente de Fase Reversa tipo Octadecil Silano
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DBQO	Departamento de Bioquímica e Química Orgânica
DDA	Sigla em inglês para <i>Modo de aquisição dependente de dados</i>
DIA	Sigla em inglês para <i>Modo de aquisição independente de dados</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
D ₃ COD	Metanol deuterado
ESI	Sigla em inglês para <i>Ionização por Electrospray</i>
FOSC	Sigla em inglês para <i>Complexo da espécie Fusarium oxysporum</i>
GC-MS	Sigla em inglês para <i>Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas</i>
GNPS	Sigla em inglês <i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
HPLC	Sigla em inglês para <i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>
IT	Sigla em inglês <i>Ion trap</i>
ITS	Sigla em inglês para <i>Espaçador transcrito interno</i>
LC-MS	Sigla em inglês para <i>Cromatografia líquida acoplada a</i>

espectrometria de massas

LEMiMo	Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular
MeOH	Metanol
MHCA	Mueller hinton cátion ajustado
MS	Sigla em inglês para <i>Espectrometria de massas</i>
MS ^E	Sigla em inglês <i>Mass spectrometry (E-energy)</i>
MS ²	Sigla em inglês <i>Tandem mass spectrometry</i>
MS/MS	Sigla em inglês <i>Tandem mass spectrometry</i>
NuBBE	Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
OSMAC	Sigla em inglês <i>One Strain Many Compounds</i>
PCA	Sigla em inglês para <i>Análise de Componentes Principais</i>
PDA	Sigla em inglês <i>Potato dextrose agar</i>
PDB	Sigla em inglês <i>Potato dextrose broth</i>
Q-TOF	Sigla em inglês <i>Quadrupole time-of-flight</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
UFMT	Universidade Federal do Mato Grosso
UPLC	Sigla em inglês para <i>Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência</i>
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1.	Microrganismos como fonte de produtos naturais	18
1.2.	Fungos endofíticos	20
1.3.	<i>Senna spectabilis</i>	20
1.4.	<i>Fusarium oxysporum</i>	23
1.5.	Variação das condições de cultivo	26
1.6.	Metabolômica e desreplicação	26
2	OBJETIVOS	30
2.1	Objetivo geral	30
2.2	Objetivos específicos	30
3	PARTE EXPERIMENTAL	31
3.1	Especificações dos materiais e equipamentos	31
3.1.1	Solventes	31
3.1.2	Meios de cultura	31
3.1.3	Análises cromatográficas	31
3.1.4	Equipamentos	31
3.2	Isolamento dos fungos endofíticos	32
3.3	Identificação das linhagens	33
3.4	Cultivo dos fungos endofíticos e análises	33
3.5	Ensaio biológico de atividade antibacteriana	36
3.5.1	Determinação da Concentração Inibitória Mínima	37
3.5.2	Determinação da Concentração Bactericida Mínima	38
3.6	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i> (GNPS)	38
3.7	UNIFI	39
3.8	Planejamento Fatorial	39
3.9	Análise de Componentes Principais (PCA)	40
3.10	Curva de crescimento	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	Identificação das linhagens fúngicas	43
4.2	Ensaio biológico de atividade antibacteriana	44

4.3 Análise qualitativa dos efeitos da OSMAC	45
4.3.1 Análise de Componentes Principais (PCA)	49
4.3.2 GNPS	52
4.3.3 UNIFI	63
<u>Peptídeos cíclicos</u>	68
<u>Alcaloides (11-18)</u>	72
<u>Derivados de naftoquinona (19-27)</u>	79
<u>Terpenoides (28-31)</u>	87
<u>Derivados de jasmonatos (32 e 33)</u>	89
<u>Antraquinonas (34 e 35)</u>	90
4.4 Planejamento Fatorial Completo 2 ²	91
4.5 Curva de crescimento	96
5 CONCLUSÃO	102
REFERÊNCIAS	103
APÊNDICE	108

1 INTRODUÇÃO

1.1. Microrganismos como fonte de produtos naturais

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade há milhares de anos, sendo que as civilizações antigas ingeriam folhas e ervas para o tratamento de doenças. O avanço nos estudos de produtos naturais atingiu o auge no final do século XX com o surgimento de ferramentas de análise espectroscópica, que permitiram a obtenção de um vasto conhecimento do metabolismo secundário de organismos vivos (BERLINCK *et al.*, 2017).

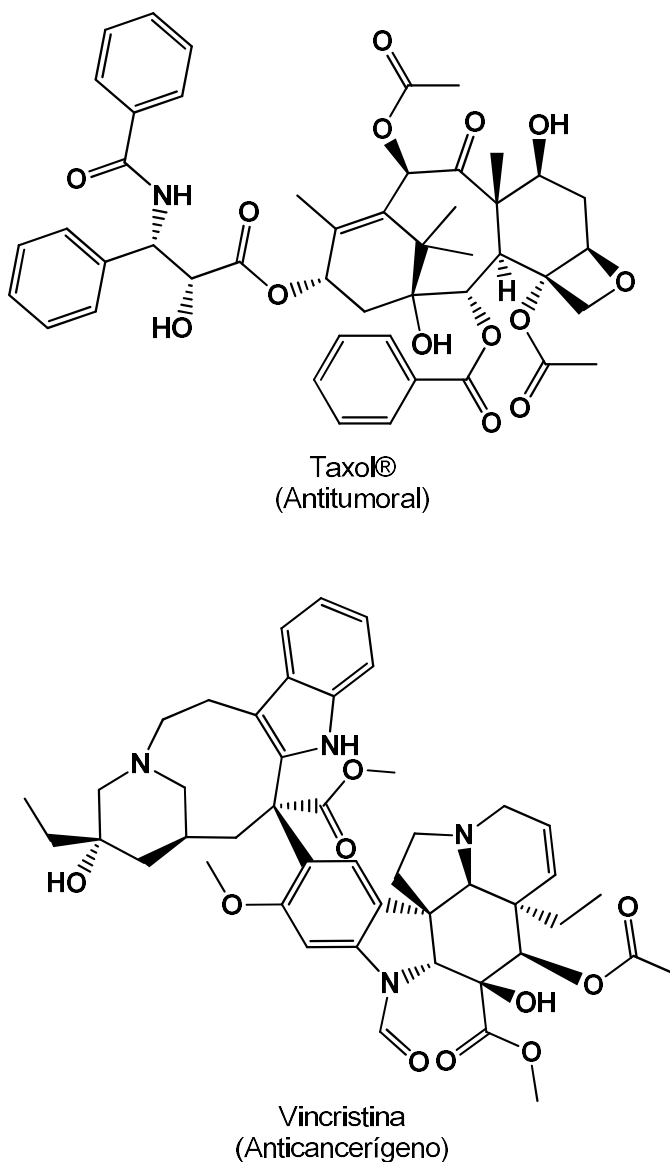
Os produtos naturais e seus derivados exercem um importante papel como fonte de novos fármacos, sendo responsáveis por quase 50% dos existentes atualmente, onde cerca de 10% desses são provenientes de microrganismos cultiváveis. Ainda assim, estima-se que atualmente apenas 5% da biodiversidade de todo o planeta tenha sido estudada (cerca de 2 milhões de espécies de plantas, animais e microrganismos), o que indica a existência de diversas fontes inovadoras de biodiversidade a serem estudadas, podendo resultar na descoberta de novos compostos com atividade biológica (SPECIAN *et al.*, 2014).

Dentre os fármacos vendidos mundialmente é possível citar diversos exemplos que têm como fonte produtos naturais e seus derivados, sendo eles a Aspirina®, morfina, penicilina, os agentes antiolesterolínicos sinvastatina e lovastatina, o agente imunossupressor ciclosporina A, o agente antitumoral Taxol®, dentre outros (CALIXTO, 2019; SILVA, 2010).

O uso de metabólitos de microrganismos endofíticos se tornou significativo a partir da descoberta da produção do diterpenoide Taxol® (paclitaxel) e compostos relacionados pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, isolado da planta *Taxus brevifolia*. O Taxol® (**Figura 1**) é um composto antitumoral que tem sido utilizado no tratamento de câncer de mama e de ovário devido a sua atividade citotóxica. Antes disso o Taxol® comercializado era proveniente da extração do mesmo de espécies de plantas do gênero *Taxus*, um método menos eficiente e que trazia consigo um custo elevado no mundo todo (SPECIAN *et al.*, 2014; STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993).

Um outro anticancerígeno importante é a vincristina (**Figura 1**) que foi isolada da planta *Catharanthus roseus*, e que recentemente foi obtida a partir do fungo endofítico *Fusarium oxysporum* presente nessa mesma planta (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013).

Figura 1: Substâncias bioativas isoladas de fungos endofíticos



Fonte: CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013.

Sendo assim, os pesquisadores têm voltado seu foco para o estudo de fungos endofíticos, uma vez que obter esses metabólitos secundários úteis à indústria farmacêutica a partir de um microrganismo ao invés de sua planta hospedeira causa menores impactos ambientais, pois é necessária uma grande quantidade de material

vegetal para se obter uma quantidade desejável desses compostos, o que pode levar a espécie a extinção (TORRES-MENDOZA; ORTEGA; CUBILLA-RIOS, 2020).

1.2. Fungos endofíticos

Fungos endofíticos são aqueles que em ao menos em um determinado período do seu ciclo de vida colonizam os tecidos das raízes e da parte aérea de plantas sem causar nenhum dano aparente às mesmas. Dentre as interações endófito-planta se observam as simbióticas, neutras e antagônicas, sendo que os mecanismos dessa relação são pouco conhecidos. No caso de uma interação simbiótica entre os endófitos e a planta, esses microrganismos são responsáveis por produzirem ou induzirem a planta a produzir metabólitos primários e secundários, como alcaloides, hormônios, enzimas e antibióticos que tornam a planta menos suscetível ao ataque de insetos e predadores herbívoros, além de proporcionar o controle de outros microrganismos patógenos. Em retorno, a planta oferece a esses microrganismos abrigo e nutrientes, além de transferi-los para as próximas gerações. (MUSSI-DIAS *et al.*, 2012)

Alguns dos compostos produzidos pelos fungos endofíticos podem apresentar certa toxicidade, como por exemplo os alcaloides que são produzidos com o objetivo de proteger a planta, porém esses efeitos prejudiciais são mínimos quando comparados aos benefícios para a planta oriundos da associação com o endófito (SOUZA *et al.*, 2004).

1.3. *Senna spectabilis*

A família Fabaceae é uma das maiores famílias de angiospermas, sendo constituída por 727 gêneros que abrangem em torno de 19.325 espécies. Se distribui nas três subfamílias: Faboideae, Mimosoideae e Caesalpinioideae e em 36 tribos. Apresenta uma distribuição cosmopolita podendo ser encontrada desde em floresta tropicais até em desertos e regiões alpinas (SILVEIRA; MIOTTO, 2013). É constituída por árvores, arbustos, ervas, lianas e subarbustos, e classificada como aquática, epífita, rupícola e terrícola de acordo com os seus substratos (FABACEAE, 2022).

Dentro dessa família se encontra o gênero *Senna* Mill., pertencente a tribo Cassieae Bronn, subtribo Cassiinae Irwin & Barneby, que consiste em 260 espécies sendo que 200 dessas se encontram no continente americano. No Brasil, este gênero é representado por 80 espécies com distribuição em todos os domínios fitogeográficos do país (SOUZA; BORTOLUZZI, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2005).

As espécies do gênero *Senna* estão amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo utilizadas na medicina popular brasileira para o tratamento de doenças infecciosas. Dentre as classes de metabólitos secundários produzidos pelas plantas do gênero *Senna* as mais frequentemente encontradas são as antraquinonas e os alcaloides piperidínicos (SILVA *et al.*, 2016; INOUE ANDRADE *et al.*, 2015).

A *Senna spectabilis* é uma árvore nativa da América do Sul e da África, podendo ser comumente encontrada no Brasil, na Colômbia e em países tropicais e subtropicais da África. No Brasil ela apresenta ocorrência confirmada em 21 estados. Essa planta é conhecida popularmente no Brasil como “cássia-do-nordeste” e “canafístula-de-Besouro” (**Figura 2**) (BORTOLUZZI *et al.*, 2022; MELO *et al.*, 2014).

Figura 2: *Senna spectabilis*

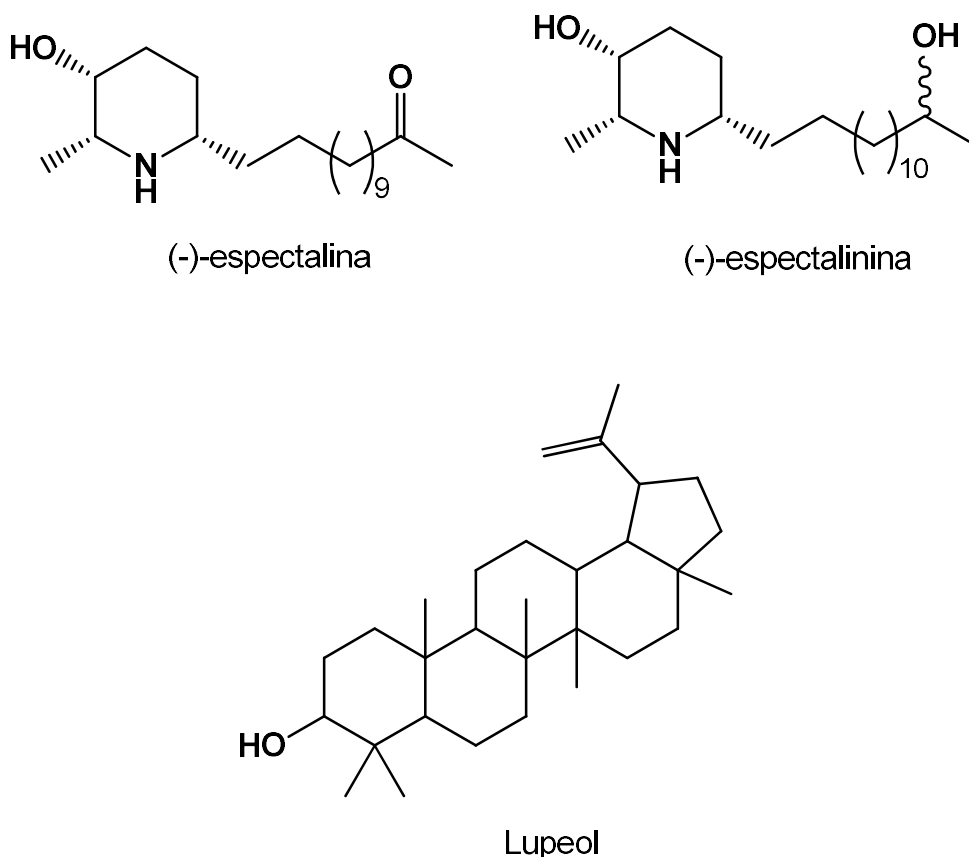


Fonte: Jardim Botânico (UTAD JARDIM BOTÂNICO).

A espécie *Senna spectabilis* é considerada uma das mais importantes dentro do gênero *Senna* e é amplamente estudada em relação a suas propriedades químicas. Essa espécie é muito utilizada pela medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças. No Brasil é utilizada no tratamento de insônia, ansiedade, constipação, epilepsia e malária, além de também serem utilizadas para o tratamento do reumatismo e lesões de pele em alguns países da Ásia (SELEGATO *et al.*, 2017; MELO *et al.*, 2014).

Foram descobertas cerca de 350 moléculas provenientes de espécies do gênero *Senna*, sendo que aproximadamente 11% dessas são metabólitos secundários da espécie *Senna spectabilis*. Em uma revisão acerca dos perfis químicos e biológicos de *S. spectabilis*, os autores mostraram a elucidação de aproximadamente 49 substâncias pertencentes a essa espécie que englobam várias classes de metabólitos secundários como alcaloides, triterpenos pentacíclicos (TPs), esteroides, pironas, antraquinonas e flavonoides. Dentre essas predominam os alcaloides de núcleo piperidínico, como a (-)-espectralina e a (-)-espectalinina que apresentam atividade antitumoral, leishmanicida, analgésica e antimicrobiana, e os TPs, como é o caso do Lupeol que foi o primeiro TP isolado de *S. spectabilis* (**Figura 3**) (SILVA, 2010; BOLZANI; GUNATILAKA; KINGSTON, 1995).

Figura 3: Substâncias bioativas isoladas da *Senna spectabilis*



1.4. *Fusarium oxysporum*

O fungo estudado nesse trabalho de pesquisa é o *Fusarium oxysporum* (**Figura 4**) (Ordem: Hypocreales; Família: Nectriaceae; Divisão: Ascomycota).

Figura 4: *Fusarium oxysporum* em placa de Petri com PDA

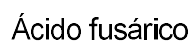


Fonte: Prof. Marcos Antônio Soares

O gênero *Fusarium* consiste em um grupo de fungos que são comumente encontrados no solo, na água ou associados a plantas e que engloba diversas espécies produtoras de micotoxinas e patógenos de plantas de importância econômica mundial (IBRAHIM *et al.*, 2021). O *Fusarium oxysporum* é um fungo filamentosso patógeno de plantas comumente encontrado no solo e é muito conhecido devido a sua capacidade de causar o apodrecimento das raízes, o processo de murchar e até necrose em uma vasta gama de plantas hospedeiras de importância econômica como a banana, o tomate e a ervilha. A patogenicidade do mesmo nos seus hospedeiros está relacionada com a produção de micotoxinas como a beauvericina, o ácido fusárico e as fumonisinas (**Figura 5**) (ZURIEGAT *et al.*, 2021).

Dentro do complexo de espécie *Fusarium oxysporum* (FOSC) se encontram linhagens patogênicas que são divididas em *formae speciales* de acordo com as plantas hospedeiras que infectam, e linhagens não patogênicas que geralmente habitam as raízes de planta sem causar nenhuma doença aparente na planta hospedeira (SON *et al.*, 2008). Existem diversos estudos onde linhagens não patogênicas de *F. oxysporum* foram usadas com o objetivo de reduzir os efeitos de infecções por linhagens patogênicas de *F. oxysporum*, como foi o caso da linhagem Fo-B2 que em condições de estufa foi capaz de diminuir os efeitos da murcha de *Fusarium* em tomate (SHISHIDO *et al.*, 2005).

Além das micotoxinas, o *F. oxysporum* é capaz de produzir uma variedade de classes de metabólitos secundários como alcaloides, peptídeos cíclicos, depsipeptídeos cíclicos, jasmonatos, xantonas, quinonas e terpenoides. Dentre eles se encontram diversos metabólitos de interesse farmacêutico como o anticancerígeno vincristina, que já foi previamente citado, o anticancerígeno vimblastina e a bikaverina, um pigmento vermelho que apresenta atividade antimicrobiana e antitumoral (**Figura 5**) (IBRAHIM *et al.*, 2021; SANTOS; MENDONÇA; BICAS, 2020).



Fonte: Ibrahim *et al.*, 2021

1.5. Variação das condições de cultivo

Os fatores ambientais, como as condições de crescimento e estresses bióticos e abióticos, influenciam na produção de metabólitos secundários por microrganismos, de modo que a mudança seletiva de meios de cultivo pode levar a uma maior diversidade de metabólitos (HEWAGE *et al.*, 2014).

Com o intuito de estudar de maneira racional a variação metabólica produzida por fungos endofíticos, utiliza-se a técnica OSMAC (*One Strain Many Compounds*), buscando diferentes metabólitos ou até mesmo o crescimento da produção de uma determinada substância. A partir dessa técnica é possível variar o meio de cultivo, bem como parâmetros físicos como a temperatura, luz, agitação, pH e diversos outros, o que diretamente leva a uma mudança na produção de metabólitos por esses fungos (VANDERMOLEN *et al.*, 2013).

Sendo assim a OSMAC se mostra como uma abordagem racional e interessante para explorar a variação metabólica nas linhagens de fungos que serão estudadas.

1.6. Metabolômica e desreplicação

A metabolômica é uma das abordagens mais abrangentes para se obter um mapeamento químico de um organismo, pois consiste na identificação da maior quantidade possível de metabólitos secundários produzidos por um determinado organismo. Ela pode ser utilizada para diversos tipos de estudo, como a busca por alterações na produção metabólica de um organismo resultante da resposta ao estresse induzido devido a alteração das condições de cultivo (luz, temperatura, pH, meio de cultivo etc.) (FUNARI *et al.*, 2013). Para isso é preciso a aplicação de ferramentas como a quimiometria, que se utiliza de métodos matemáticos e estatísticos para planejar experimentos de uma maneira otimizada de modo a fornecer a maior quantidade de informação química possível através da análise dos conjuntos de dados complexos obtidos (YULIANA *et al.*, 2013).

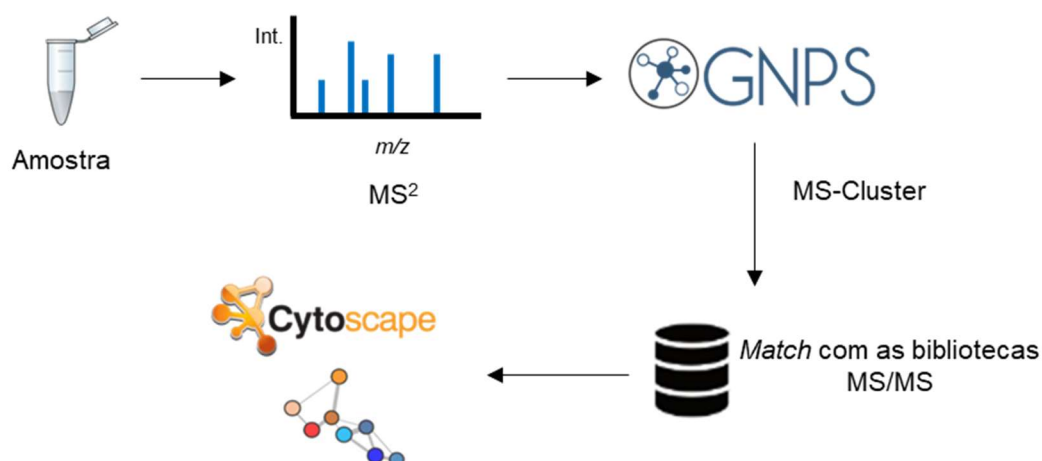
As técnicas mais comumente utilizadas para a análise metabolômica são a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) e a ressonância magnética nuclear (RMN), sendo que para escolher a técnica mais

adequada para cada caso é preciso levar em conta as vantagens e suas desvantagens (YULIANA *et al.*, 2013). Essas técnicas analíticas são as principais utilizadas para realizar a desreplicação, que se baseia na detecção e anotação de metabólitos que já são conhecidos e que estão presentes nos extratos brutos (TANG; XIAO; WANG, 2009).

Para uma análise rápida e eficiente de conjunto de dados de bibliotecas de produtos naturais, tem-se usado novas abordagens para a análise de dados de espectros de massas, como por exemplo *Molecular Networking*, que pode ser usada com análise diferencial e bases de dados online, como a plataforma GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*). Essa análise diferencial engloba diversos processos como o alinhamento, a filtração de sinais autênticos dos espectros de massas da amostra e a detecção de picos. Sendo assim os metabólitos que já são conhecidos podem ser associados aos respectivos compostos utilizando-se de uma base de dados (WANG *et al.*, 2016).

A GNPS é uma plataforma que armazena, analisa e dissemina o conhecimento de espectros de MS/MS, permitindo o compartilhamento e anotações contínuas dos dados que são armazenados. Através dessa plataforma é possível analisar um conjunto de espectros, comparando-os com todos os dados que se encontram disponíveis publicamente, de modo que é possível realizar a desreplicação online e a análise de redes de interação molecular (*Molecular Networking*), que são geradas a partir da correlação e visualização dos espectros, podendo assim agrupar moléculas relacionadas mesmo que os espectros não tenham sido atribuídos a moléculas conhecidas (WANG *et al.*, 2016) (**Figura 6**).

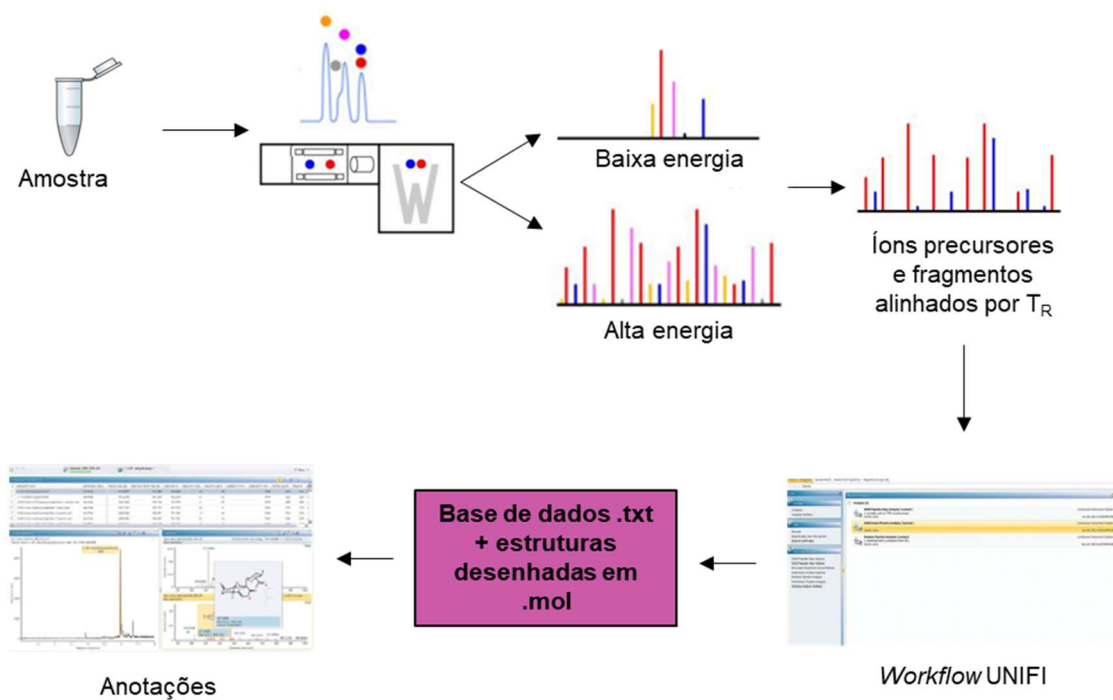
Figura 6: Esquema da obtenção de redes moleculares a partir da plataforma GNPS



Fonte: Esquema elaborado pela autora.

Além dessa plataforma, o UNIFI, um Sistema de Informação Científica da Waters Corporation, tem sido utilizado como ferramenta de desreplicação pois ele integra a separação cromatográfica por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC) das substâncias de um extrato e a aquisição de dados ESI-Q-TOF-MS no modo de aquisição MS^E . Nesse modo de aquisição os espectros de massas são gerados em condições de baixa e alta energia. Os dados em baixa energia nos fornecem a massa de alta resolução do íon precursor e os de alta energia a fragmentação desses íons precursores. Esses dados são alinhados por um algoritmo de acordo com o tempo de retenção e depois são comparados com bibliotecas de substâncias do próprio UNIFI ou criadas pelo usuário a partir de um *workflow*. O UNIFI consegue então prever possíveis fragmentos das substâncias presentes na amostra, uma vez que a partir do arquivo .mol o algoritmo consegue testar diferentes desconexões da estrutura molecular das substâncias presentes na biblioteca e depois comparar os fragmentos teóricos com os dados experimentais. Isso gera um relatório de informações e indica anotações de substâncias conhecidas de acordo com os seus padrões de fragmentação (**Figura 7**) (WHITE PAPER WATERS A, 2022; XU *et al.*, 2020).

Figura 7: Esquema da obtenção de dados em aquisição MS^E para análise no sistema UNIFI



Fonte: Esquema elaborado pela autora.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudo químico e biológico de duas linhagens de *Fusarium oxysporum* isolados das raízes de *Senna spectabilis* através da desreplicação dos metabólitos secundários produzidos pelos mesmos, bem como avaliar a bioatividade dos extratos.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Cultivar os fungos endofíticos isolados em pequena escala em diferentes meios de cultivo (Malte, PDB e Czapek) e obter seus extratos brutos;
- ✓ Obter perfis químicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), RMN de ^1H e realizar ensaios biológicos de atividade antibacteriana contra linhagens gram-positivas e gram-negativas.
- ✓ Avaliar os efeitos da OSMAC utilizando-se da estatística;
- ✓ Anotar as estruturas dos metabólitos secundários através de técnicas cromatográficas e espectrométricas pelo GNPS e UNIFI de modo a se observar o efeito da OSMAC no metabolismo das duas linhagens;
- ✓ Realizar um planejamento fatorial completo no meio de cultivo escolhido a fim de avaliar como as condições de cultivo influenciam na produção de metabólitos secundários;
- ✓ Realizar uma curva de crescimento para avaliar a variação da produção metabólica do fungo e a observar a produção de algumas micotoxinas em diferentes períodos do cultivo.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Especificações dos materiais e equipamentos

3.1.1 Solventes

Os solventes utilizados nas extrações e nas análises cromatográficas foram das marcas M.Tedia® e LiChrosolv® em grau HPLC. A água foi destilada e deionizada em aparelho da marca Milli-Q® (resistividade mínima 18,2 MΩ.cm à 25 °C). O solvente deuterado D₃COD (com pureza ≥ 99,8% para D) utilizado nos experimentos de RMN foi da marca Acros Organics®.

3.1.2 Meios de cultura

O meio de cultura sólido PDA (*Potato Dextrose Agar*) utilizado para o cultivo em placas de Petri foi da marca NEOGEN®. Já os meios líquidos de PDB (*Potato Dextrose Broth*), Czapek e Malte empregados no cultivo em pequena escala foram das marcas ACUMEDIA® e Kasvi®.

3.1.3 Análises cromatográficas

Previamente às análises por HPLC-DAD, LC-MS e UPLC-QTOF-MS^E submeteu-se as amostras a extrações em fase sólida com cartuchos de fase reversa Macherey-Nagel C18 ec (3,0 mL; 500 mg, Chromabond®). No caso das amostras analisadas por LC-MS e UPLC-QTOF-MS^E elas posteriormente foram centrifugadas por cinco minutos a 6200 rpm na minicentrífuga Eppendorf MiniSpin®, de modo a coletar-se somente o sobrenadante para a realização das análises.

3.1.4 Equipamentos

Para a concentração dos extratos utilizou-se o evaporador rotativo da Büchi® R-114 (banho de aquecimento B-480) sob pressão reduzida, com auxílio de bombas de vácuo Büchi® B-169 e sistema de refrigeração (banho ultratermostatizado MA-184 Marconi).

As amostras foram pesadas em balança analítica OHAUS Explorer®.

Após preparados, os meios de cultura foram esterilizados a 120 °C durante 20 minutos em autoclave vertical da marca Phoenix Luferco.

As análises por HPLC foram realizadas utilizando cromatógrafo Shimadzu® Prominence analítico composto pelos seguintes módulos: duas bombas LC-20AT, unidade desgasificadora DGU-20A3, auto-injetor SIL- 20A, forno de coluna CTO-20A, detector de arranjo de diodos SPD-M20A (configurado em 220, 254, 280 e 320 nm) e módulo de comunicação CBM-20^a, controlados pelo software Lab Solutions da Shimadzu®. Foi empregada coluna C18 analítica Phenomenex Luna 5µ C18(2) 100A (4,6 × 100 mm, Allcrom®) com pré-coluna C18 (2 x 7,8 mm).

As análises por LC-MS foram realizadas utilizando um Sistema LC Shimadzu® composto pelos seguintes módulos: bomba LC-20AD, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, injetor automático SIL-20AHT, forno de coluna CTO-20^a e módulo de comunicação CBM-20A, controlados pelo software HyStar® 3.2 da Bruker®. Esse sistema está acoplado a um espectrômetro de Massas da Amazon SL Bruker® com fonte de ionização por electrospray (ESI) e analisador Ion Trap (IT). Foi empregada coluna C18 analítica Phenomenex Luna 5µ C18(2) 100A (4,6 × 100 mm, Allcrom ®) com pré-coluna C18 (2 x 7,8 mm).

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em equipamento Acquity UPLC I - Class System (Waters Corporation). O sistema UPLC Waters Acquity opera com bomba do tipo *Quaternary Solvent Manager*, Detector de Arranjo de Diodos (PDA) eλ 800nm, forno de coluna FTN com injetor automático. O espectrômetro de massas Xevo G2-XS QTOF opera com fonte de ionização por ESI e analisador QToF (*Quadrupole-Time-of-Flight*). O software utilizado para o controle, aquisição e o processamento dos dados foi o Waters® Mass Lynx 4.1.

Os espectros de RMN unidimensionais (¹H) foram obtidos em um espectrômetro Bruker®, modelo Avance III HD 600 (14,1 T), com frequência de 600 MHz para o núcleo de ¹H. Todas as análises foram feitas em uma sonda criogênica de 5 mm com detecção inversa e três canais de aquisição (¹H, ¹³C e ¹⁵N) na temperatura de 23 °C.

3.2 Isolamento dos fungos endofíticos

A extração e isolamento dos fungos das raízes de *Senna spectabilis* foi realizada pelo estudante de doutorado Me. Juvenal Henrique Veloso. A identificação botânica da espécie foi realizada pela Dra. M. C. M. Young e uma exsicata (SILVA-

193) está depositada no Herbário do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, Brasil. As linhagens fúngicas puras foram preservadas em frascos com água esterilizada mantidos em temperatura ambiente e depositados na micoteca pertencente ao NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de produtos naturais) do Departamento de Bioquímica e Química Orgânica (DBQO) do Instituto de Química de Araraquara – Unesp. O código de cadastro no Sisgen da *Senna spectabilis* e das linhagens fúngicas é A079ACA.

3.3 Identificação das linhagens

A identificação (tipagem) dos fungos foi realizada pelo Prof. Dr. Marcos Antônio Soares do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), parceiro do nosso grupo de pesquisa NuBBE.

A identificação molecular foi feita por sequenciamento da região do espaçador transcrito interno, ITS, utilizando os primers ITS1 e NL4. Os amplicons foram purificados e sequenciados pelo método Sanger. Obteve-se, através do software MEGA 7.0, uma sequência consenso, que foi comparada com as sequências obtidas no banco de dados do GenBank por meio da ferramenta nBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências que compartilhavam 97% ou mais de semelhanças foram identificadas como a mesma espécie (SIQUEIRA *et al.*, 2017).

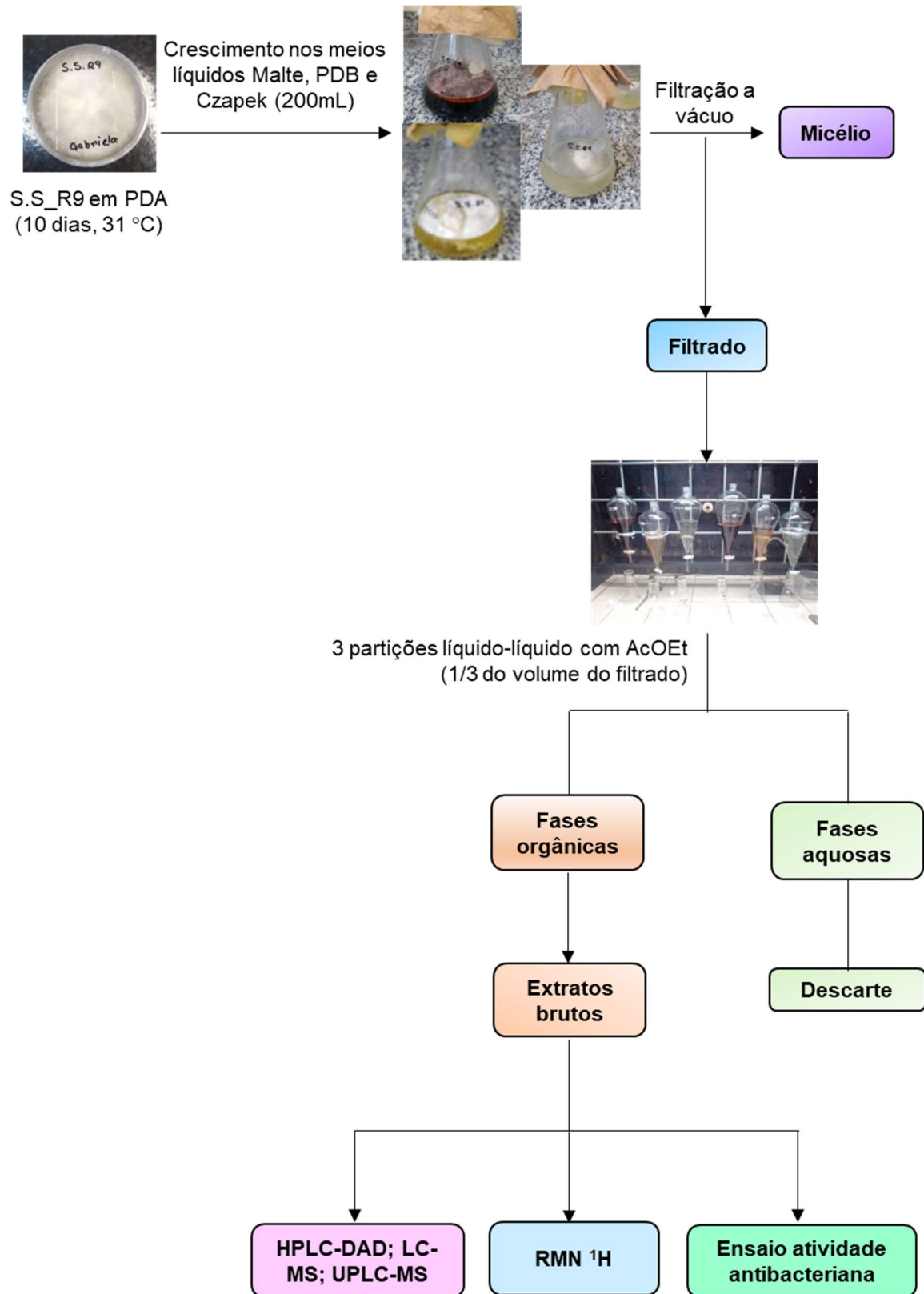
3.4 Cultivo dos fungos endofíticos e análises

As linhagens fúngicas **S.S._R3** e **S.S._R9** preservadas foram repicadas em placas de Petri contendo o meio sólido PDA (*Potato Dextrose Agar*) de modo a se obter quantidade suficiente de massa fúngica para realizar o cultivo em diferentes meios líquidos. Após 10 dias de crescimento desses fungos, cerca de um terço de micélio de cada placa de Petri foi inoculado em cada meio líquido, sendo eles Czapek, PDB (*Potato Dextrose Broth*) e Malte, e foram cultivados em modo estático por 28 dias a 25 °C de acordo com o protocolo realizado no NuBBE.

Preparou-se três frascos de erlenmeyer (boca estreita) contendo 200mL do meio líquido para cada um dos meios, utilizando água ultrapura esterilizada. Após esse período de incubação, foi feita a separação do caldo dos micélios por filtração à

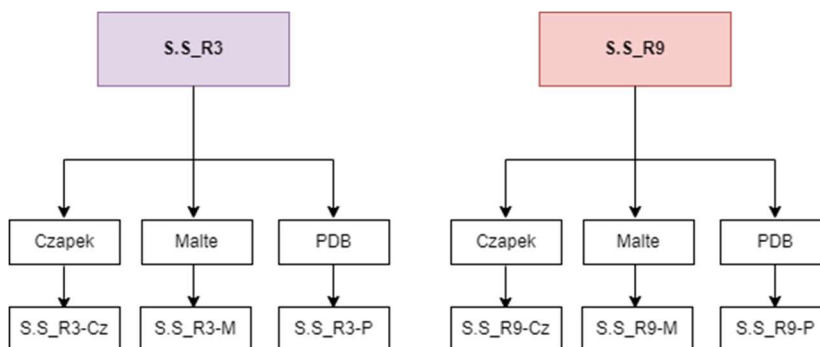
vácuo. Os filtrados foram submetidos a três partições líquido/líquido com AcOEt na proporção de 300mL de acetato de etila para 1000mL de filtrado para cada uma das partições. Posteriormente, o solvente orgânico foi evaporado à pressão reduzida de modo a se obter os extratos brutos (**Figura 8**).

Figura 8: Esquema de obtenção dos extratos brutos nos meios de Malte, PDB e Czapek



Os extratos brutos obtidos (**Figura 9**) foram submetidos a análises por RMN de ^1H e HPLC-DAD em gradiente exploratório para determinar qual o meio que leva a uma maior variação de metabólitos. Para a realização da análise por HPLC-DAD um volume de 15,0 μL de cada amostra (5,0 mg.mL^{-1}) foi injetado no cromatógrafo utilizando uma coluna analítica Phenomenex Luna C-18 com eluição em gradiente exploratório $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (0,1% CH_2O_2) 95:05 a 0:100 v/v por 45 min permanecendo nesta condição por mais 10 min, numa vazão de 1,0 mL. min^{-1} e $\lambda = 190 \text{ nm}$ a 800 nm. Os seguintes parâmetros foram utilizados para o UPLC: fase móvel A: água (0,1 % de ácido fórmico v/v), fase móvel B: metanol (0,1 % de ácido fórmico v/v); o método utilizado foi um gradiente de 5-100 % de B em 15 minutos, de 15-20 minutos permanecendo em 100% e 20-25 minutos recondicionou-se a coluna na condição inicial de 5% de B; fluxo: 0,350 mL.min^{-1} ; volume de injeção: 0,10 μL ; fase estacionária: coluna de fase reversa C18 Acquity UPLC® HSS T3 Column (1.8 μm ; 2.1 mm x 100 mm) e temperatura de 40 °C. O espectrômetro de massa operou no modo positivo com faixa de aquisição de m/z 50 Da até 1200 Da.

Figura 9: Esquema dos extratos brutos para cada linhagem fúngica em diferentes meios líquidos



3.5 Ensaios biológicos de atividade antibacteriana

A triagem e as porcentagens da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos foram realizadas pela estudante de doutorado Giovanna Costa Villefort, sob a supervisão da Prof. Dra. Ilana L. B. C. Camargo no Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular (LEMiMo) na Universidade de São Paulo (USP) – São Carlos.

Cada composto foi diluído em DMSO para a preparação de uma solução estoque 100x concentrada. Posteriormente, a solução estoque é diluída 1:100 em caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado (MHCA). A partir disso, cada composto foi testado a 512 µg/mL e a adição do inóculo foi realizada de acordo com o preconizado pelo (CLSI, 2015) para o método de microdiluição em caldo. No controle positivo é adicionado a bactéria sem o composto para se observar o crescimento da mesma em caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado. No controle negativo, há apenas o meio de cultura caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado, sem bactéria, para mostrar que não há contaminação dele.

A incubação foi realizada a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a leitura visual dos resultados foi feita após 24h. Quando não houve crescimento bacteriano, a triagem foi considerada positiva e indica que houve atividade antibacteriana na concentração testada. Neste caso, a concentração inibitória mínima pode ser 512 µg/mL ou menos ($\leq 512\text{ }\mu\text{g/mL}$). Quando houve crescimento bacteriano, a triagem foi considerada negativa e indica que não há atividade antibacteriana na concentração testada. A triagem negativa não exclui a possibilidade deste composto apresentar atividade antibacteriana em concentrações maiores, por isso, o resultado é expresso como “ $> 512\text{ }\mu\text{g/mL}$ ”. Os testes foram realizados em triplicata.

As linhagens bacterianas gram-positivas utilizadas para os testes foram: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Enterococcus faecium* ATCC 700221. Já as linhagens bacterianas gram-negativas utilizadas para os testes foram: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

3.5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Para a determinação da CIM, foram utilizadas todas as linhagens da espécie bacteriana que se mostraram sensíveis ao extrato. Cada extrato foi diluído em DMSO e preparado uma solução estoque 100x concentrada, posteriormente a solução estoque foi diluída 1:100 em caldo MHCA segundo o (CLSI, 2013). A partir disso, cada extrato foi testado em 512 µg/ml a 1% DMSO. Dos poços dos extratos a 512 µg/ml partiram as diluições seriadas (1:2) até a concentração de 0,06 µg/ml. A incubação foi feita a 35°C e a leitura visual dos resultados após 24 horas, na qual observou-se até qual concentração os extratos conseguiam inibir o crescimento do

microrganismo. Para os controles negativo e positivo foram adicionados caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado 1% DMSO. No controle positivo foi adicionado a bactéria sem o extrato para se observar o crescimento da mesma em caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado 1% DMSO. No controle negativo, há apenas o meio de cultura caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado 1% DMSO, sem bactéria, para mostrar que não há contaminação dele. Os testes foram realizados em triplicata.

3.5.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima

Após a leitura visual da CIM, inoculou-se 100 µL do conteúdo do poço equivalente a CIM, uma diluição abaixo e duas acima, em placa de MHCA-Ágar por técnica de microgota, sem estriar. A placa foi incubada em estufa a 35°C por 24 horas, quando foi feita a leitura visual para observar qual concentração não houve o crescimento bacteriano. Para a determinação da atividade como bactericida ou bacteriostática, os extratos que tiveram a razão CBM/CIM menor ou igual a quatro foram considerados bactericidas e acima disso bacteriostáticas (PANKEY; SABATH, 2004).

3.6 Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS)

Para se obter as redes moleculares as amostras foram analisadas por LC-MS onde um volume de 15,0 µL de cada amostra (1,0 mg.mL⁻¹) foi injetado no cromatógrafo utilizando uma coluna analítica Phenomenex Luna C-18 com eluição em gradiente exploratório MeOH:H₂O (0,1% CH₂O₂) 95:05 a 0:100 v/v por 45 min permanecendo nesta condição por mais 10 min, numa vazão de 1,0 mL. min⁻¹ e λ= 190 nm a 800 nm. Os espectros de massas foram obtidos em modo positivo Manual MS(n). Os dados foram exportados no formato .mzXML e através de um *Classical Molecular Networking Workflow* (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>) na plataforma GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>) uma rede molecular foi criada. A tolerância de massa do íon precursor foi de 2,0 Da e do íon fragmento foi de 0,5 Da. Na rede molecular criada os arcos que conectam os nodos foram filtrados para terem um cosseno maior do que 0,7 e um mínimo de seis picos. O tamanho máximo de uma família molecular foi definido como 100. Os espectros da rede molecular foram comparados com as bibliotecas espectrais do GNPS, sendo que os espectros da biblioteca foram filtrados do mesmo jeito que os espectros dos dados submetidos. Foram considerados *matches* todos aqueles espectros que apresentaram um

cosseno maior que 0,7 e no mínimo seis picos em comum com os espectros da biblioteca (WANG *et al.*, 2016).

3.7 UNIFI

Os extratos foram analisados por UPLC-Q-TOF-HRMS com os mesmos parâmetros mencionados no item 3.4.

Foi construída uma base de dados com metabólitos secundários já relatados para a espécie *Fusarium oxysporum* baseado em um review da literatura (IBRAHIM *et al.*, 2021) onde foi criada uma tabela em formato .txt com os nomes das substâncias e as suas estruturas foram desenhadas no ChemDraw Ultra 12.0 e salvas no formato .mol. Em seguida essa biblioteca contendo 180 metabólitos foi inserida no UNIFI. O limite de erro foi estabelecido em 5 ppm.

3.8 Planejamento Fatorial

Realizou-se um planejamento fatorial 2^2 onde as variáveis analisadas foram: exposição a luz (x_1) e agitação (x_2) para a linhagem S.S_R9 de *Fusarium oxysporum* cultivada em meio de PDB (**Tabela 1**).

Tabela 1: Variáveis planejamento fatorial 2^2

Variável codificada	Exposição a luz (h)	Agitação (rpm)
-1	0	0
1	24	50

A matriz do planejamento fatorial 2^2 foi obtida a partir do software TIBCO® Statistica 10 (**Tabela 2**). No total foram feitos 12 experimentos, sendo quatro ensaios únicos (E1-E4) e duas replicatas para cada ensaio.

Tabela 2: Matriz do planejamento fatorial completo 2^2

Ensaios	Grupos	Níveis codificados	
		x_1	x_2
1	E1	-1	-1
2	E2	-1	1
3	E3	1	-1
4	E4	1	1
5	E1	-1	-1

6	E1	-1	-1
7	E2	-1	1
8	E2	-1	1
9	E3	1	-1
10	E3	1	-1
11	E4	1	1
12	E4	1	1

Preparou-se 12 frascos de erlenmeyer com 200mL de meio de cultura de PDB e inoculou-se o fungo conforme o procedimento descrito em 3.4. Os erlenmeyers dos ensaios sem exposição a iluminação foram embrulhados com papel alumínio para impedir o contato com a luz. Todos erlenmeyers foram mantidos em uma Incubadora SHAKER Refrigerada SL-223 da marca SOLAB® de modo a se poder controlar a temperatura, que foi mantida fixa em 25,1 °C por 28 dias. Para isso, colocou-se os erlenmeyers dos ensaios sem agitação em uma prateleira fixa dentro da incubadora. Após esse período, obteve-se os extratos brutos de acordo com o procedimento descrito em 3.4. Os extratos brutos foram submetidos a análise por LC-MS com uma coluna analítica Phenomenex Luna C18 com eluição em gradiente exploratório MeOH:H₂O (0,1% CH₂O₂) 95:05 a 0:100 v/v por 50 min, onde a concentração das amostras foi de 1,0 mg.mL⁻¹ com um volume injetado de 15µL em modo positivo (**Figura 10**).

Figura 10: Esquema de obtenção dos extratos brutos do planejamento fatorial 2²



3.9 Análise de Componentes Principais (PCA)

Para realizar a Análise de Componentes Principais os dados obtidos por LC-ESI-(+)-IT-MS, tanto dos extratos da OSMAC quanto do planejamento fatorial, foram convertidos para o formato mzXML através do software Bruker® Compass® DataAnalysis 4.2. Em seguida, os dados de MS¹ foram pré-processados a partir do

software MZmine 2.53 (PLUSKAL *et al.*, 2010) utilizando-se os seguintes parâmetros:

- Detecção dos espectros de MS¹:

Centroid mass detection; nível de ruído: $1,0 \cdot 10^3$;

- Construção do Cromatograma de MS¹ a partir do ADAP Chromatogram Builder Module (MYERS *et al.*, 2017):

Filtro: MS¹; *Min. group size in number of scans*: 2; *Group intensity threshold*: $5,0 \cdot 10^4$; *Min. highest intensity*: $5,0 \cdot 10^4$; *m/z tolerance*: 0,5 Da;

- Deconvolução dos cromatogramas:

Algoritmo: *Baseline cut-off*, *Min. peak height*: $1,0 \cdot 10^5$; *Peak duration range*: 0,01 a 2,0 minutos; *Baseline*: $5,0 \cdot 10^5$; *m/z center calculation*: median; *m/z range for MS² scan pairing*: 0,5 Da; *RT range for MS² scan pairing*: 0,1 min;

- Agrupamento de isótopos:

m/z tolerance: 0,5 Da; *RT tolerance*: 0,1 min; *Maximum charge*: 2;

- Alinhamento:

m/z tolerance: 0,5 Da; *weight for m/z*: 50; *RT tolerance*: 0,1 min; *weight for RT*: 1.

Após o pré-processamento, os dados foram exportados no formato csv para a plataforma MetaboAnalyst 5.0 (PANG *et al.*, 2021) onde foram filtrados por IQR (*Interquartile Range Filter*) e normalizadas por QN (*Quantile Normalization*) e *Autoscaling* para os extratos brutos da OSMAC, e pela mediana e *Autoscaling* para os dados do planejamento fatorial.

3.10 Curva de crescimento

Inoculou-se o fungo em 200mL de meio de cultura de PDB em modo estacionário (conforme o procedimento descrito em 3.4) por um período de 35 dias a uma temperatura de 25°C, realizando-se extrações com acetato de etila e análises do peso seco (massa do micélio por volume de meio de cultura) a cada cinco dias.

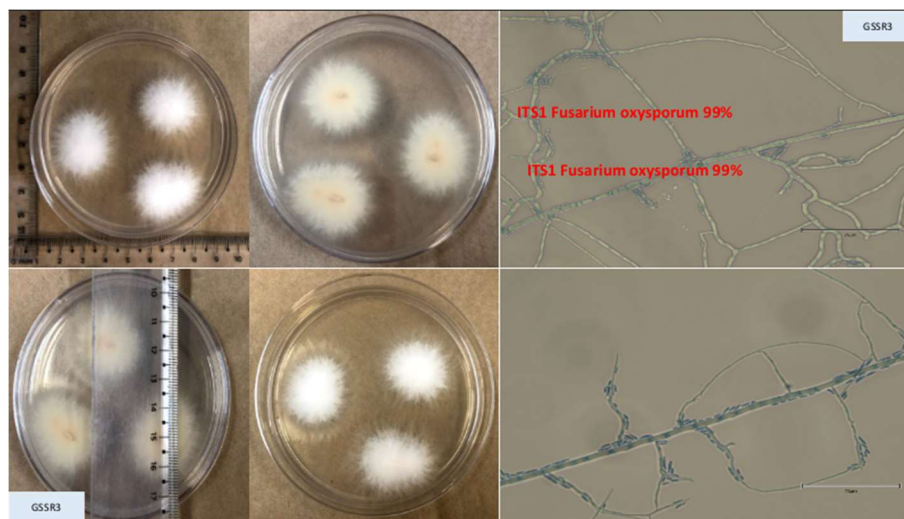
Para isso, o micélio foi separado do meio líquido por filtração a vácuo com funil de Buchner, utilizando-se papel de filtro previamente seco em estufa à 100 °C por 24 horas. O micélio foi levado a estufa a 100 °C por 24 horas e em seguida pesado para obter-se o peso seco dele. Os experimentos foram realizados em triplicatas e foram escolhidos de forma aleatória para realizar a extração a cada cinco dias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação das linhagens fúngicas

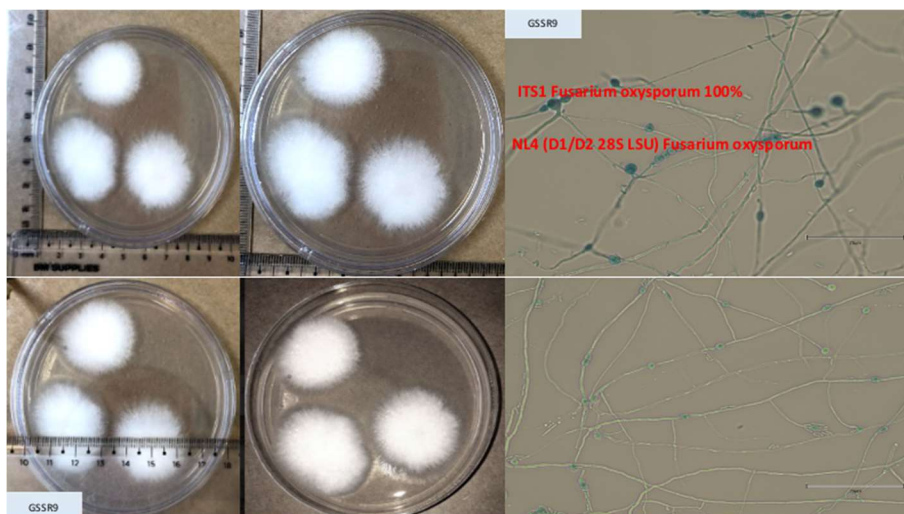
Para as linhagens S.S_R3 e S.S_R9 obteve-se 99% de identidade com *Fusarium oxysporum*, sendo que elas posteriormente serão depositadas no banco de dados do GenBank. É possível observar o macro e micro cultivo para a linhagem S.S_R3 na **Figura 11** e para a linhagem S.S_R9 na **Figura 12**.

Figura 11: Imagens do macrocultivo e microcultivo da linhagem fúngica S.S_R3



Fonte: Prof. Marcos Antônio Soares

Figura 12: Imagens do macrocultivo e microcultivo da linhagem fúngica S.S_R9



Fonte: Prof. Marcos Antônio Soares

4.2 Ensaios biológicos de atividade antibacteriana

Para a triagem dos extratos, foi possível observar que o extrato S.S_R9-P apresentou atividade antibacteriana contra as linhagens de *S. epidermidis* ATCC 35984, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 e *E. faecium* ATCC 700221, e o extrato S.S_R3-Cz apresentou atividade antibacteriana contra a linhagem *E. faecium* ATCC 700221, uma vez que os extratos que apresentam atividade antibacteriana são aqueles que obtiveram o resultado de concentração inibitória mínima ≤ 512 (**Tabela 3**).

Tabela 3: Resultado da triagem inicial dos extratos a 512 $\mu\text{g/mL}$

Linhagens bacterianas	CIM ($\mu\text{g/mL}$)					
	S.S_R3-M	S.S_R3-P	S.S_R3-Cz	S.S_R9-M	S.S_R9-P	S.S_R9-Cz
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	>512	>512	>512	>512	≤ 512	>512
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	>512	>512	>512	>512	≤ 512	>512
<i>S. aureus</i> ATCC 8095	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	>512	>512	>512	>512	≤ 512	>512
<i>E. faecium</i> ATCC 700221	>512	>512	≤ 512	>512	≤ 512	>512
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>512	>512	>512	>512	>512	>512

Uma vez que a concentração testada nessa triagem foi de apenas 512 $\mu\text{g/mL}$, a CIM pode ser 512 $\mu\text{g/mL}$ ou uma concentração menor que esta quando houver

atividade antibacteriana. Sendo assim prosseguiu-se para a determinação da CIM e da CBM dos extratos S.S_R3-Cz e S.S_R9-P.

O extrato S.S_R3-Cz, que havia apresentado atividade na concentração de 512 µg/mL na triagem em *E. faecium*, apresentou CIM >512 µg/mL. Como houve essa divergência e havia material disponível, foram realizadas duplicatas biológicas e triplicatas experimentais a partir de 1024 µg/mL para verificação do resultado. Sendo assim, determinou-se que há atividade antibacteriana do extrato S.S_R3-Cz em *E. faecium* ATCC 700221 com CIM de 1024 µg/mL, o que não é um valor significativo de CIM.

Já o extrato S.S_R9-P apresentou para *S. epidermidis* ATCC 35984, *S. aureus* ATCC 25923 e *E. faecalis* ATCC 29212 uma inibição total do crescimento bacteriano em 256 µg/mL e para *E. faecium* ATCC 700221 em 512 µg/mL, como é possível observar na **Tabela 4**. Porém, esse valor não foi significativo para CBM, de modo que o extrato S.S_R9-P apresentou atividade bactericida não determinada para as quatro linhagens testadas.

Tabela 4: Valores de CIM e CBM do extrato S.S_R9-P

Linhagens bacterianas	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CBM/CIM	Atividade
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	256	>512	>2	N.D.
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	256	>512	>2	N.D.
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	256	>512	>2	N.D.
<i>E. faecium</i> ATCC 700221	512	>512	>1	N.D.

*Atividade definida pela razão CBM/CIM. Para resultados = 4 ou < 4 a atividade é considerada bactericida (PANKEY; SABATH,2004). Logo, o extrato apresenta atividade não determinada (N.D.).

4.3 Análise qualitativa dos efeitos da OSMAC

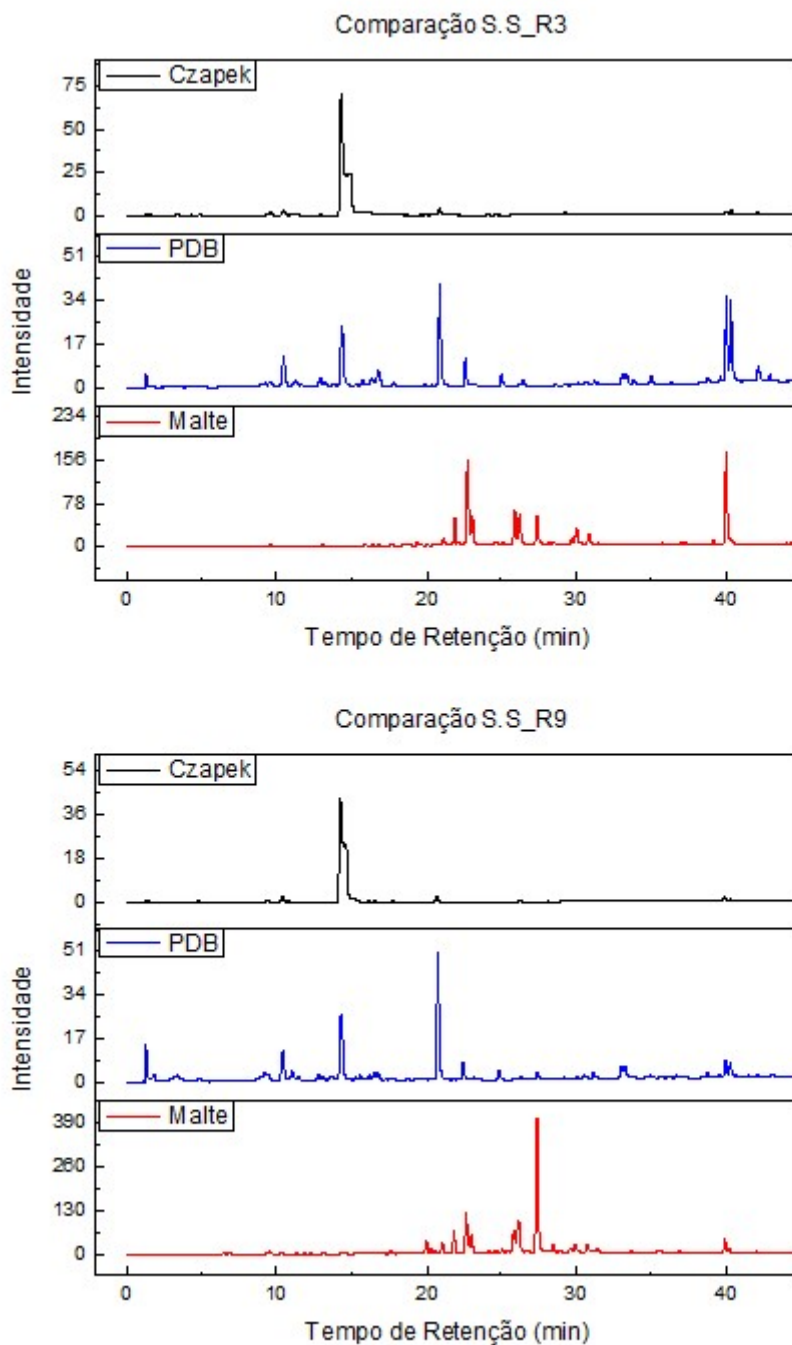
Os extratos brutos obtidos anteriormente a identificação das linhagens fúngicas (**Tabela 5**) foram submetidos a análises por HPLC-DAD e RMN ¹H, de modo a se obter os seus perfis químicos.

Tabela 5: Massa dos extratos brutos de cada meio para as duas linhagens fúngicas.

Extrato	Massa obtida (mg)
S.S_R3-Cz	16,6
S.S_R3-M	60,0
S.S_R3-P	11,2
S.S_R9-Cz	79,2
S.S_R9-M	73,6
S.S_R9-P	10,6

Para a linhagem S.S_R3 observou-se um maior rendimento em termos de massa no meio de Malte. Para a S.S_R9 o maior rendimento foi no cultivo em Czapek. De modo a se ter uma estimativa da variação metabólica das linhagens de *F. oxysporum* os extratos brutos foram então analisados por HPLC-DAD e a partir dos cromatogramas (**Figura 13**) foi possível observar que para ambas as linhagens nos meios de PDB e Czapek foram produzidas substâncias mais polares, uma vez que ficaram menos tempo retidas na coluna. Já no meio de Malte as substâncias presentes no extrato interagiram com a coluna por mais tempo o que indica que são menos polares que as produzidas nos outros dois meios. Observou-se também um maior número de picos para o extrato no meio de PDB para ambas as linhagens, mesmo com esses extratos tendo apresentado um menor rendimento em termos de massa do que os demais.

Figura 13: Comparação do perfil químico dos extratos brutos nos meios de Czapek, PDB e Malte por HPLC-DAD ($\lambda=254\text{nm}$)



Os extratos brutos também foram analisados por RMN de ^1H (**Figura 14 e 15**). Foram observados para os extratos de ambas as linhagens nos três meios sinais na região de hidrogênios aromáticos, hidrogênios metoxílicos, hidrogênios metínicos, hidrogênios metilênicos, hidrogênios metílicos, hidrogênios carbinólicos, hidrogênios carbinólicos benzílicos e hidrogênios olefinicos. Também foi possível

observar uma maior quantidade de sinais nos espectros de RMN de ^1H para os extratos obtidos do cultivo em meio de PDB para ambas as linhagens.

Figura 14: Espectros de RMN de ^1H dos extratos da linhagem S.S_R3 nos meios de Czapek, PDB e Malte (D_3COD , 14,1 T)

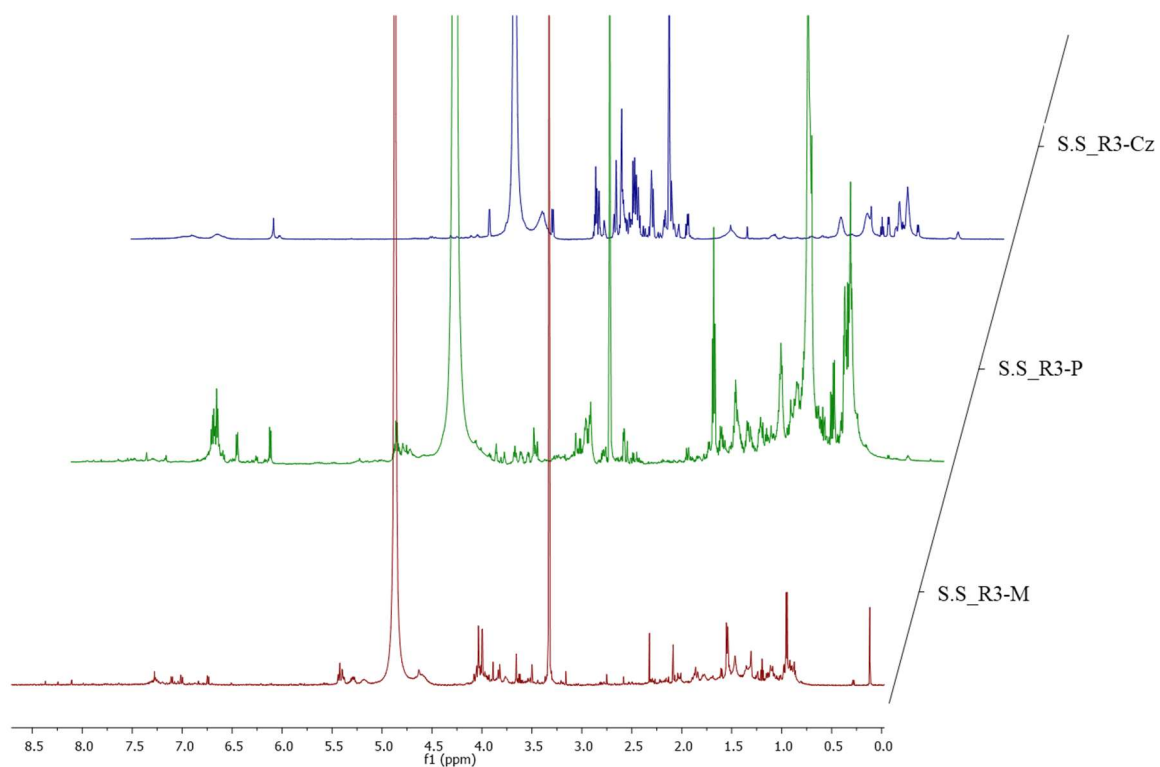
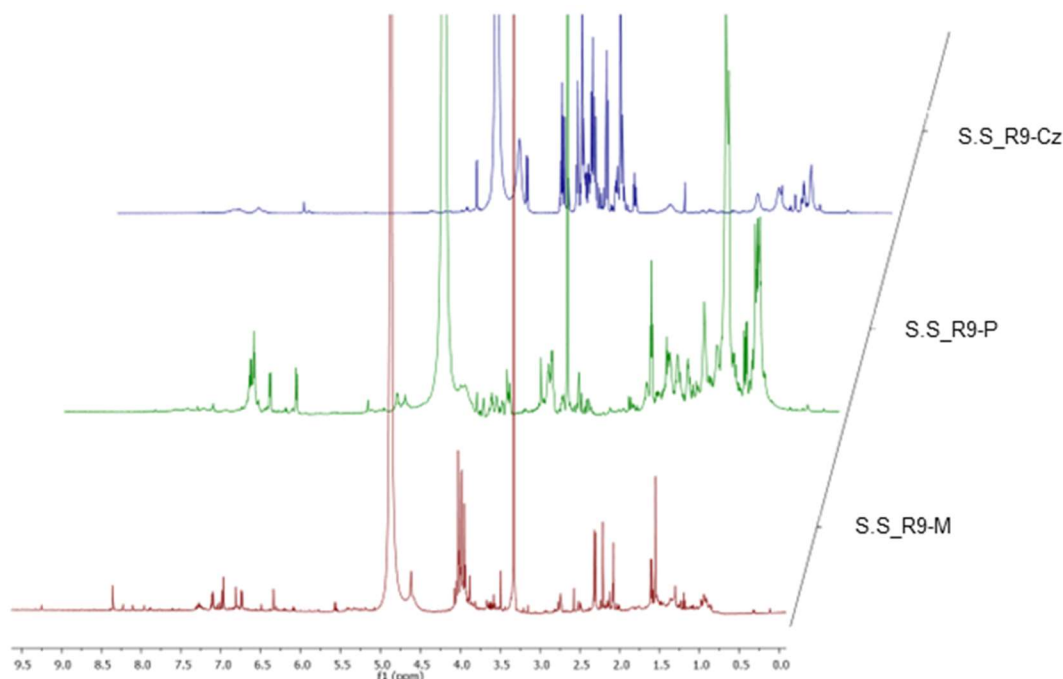


Figura 15: Espectros de RMN de ^1H dos extratos da linhagem S.S_R9 nos meios de Czapek, PDB e Malte (D_3COD , 14,1 T)

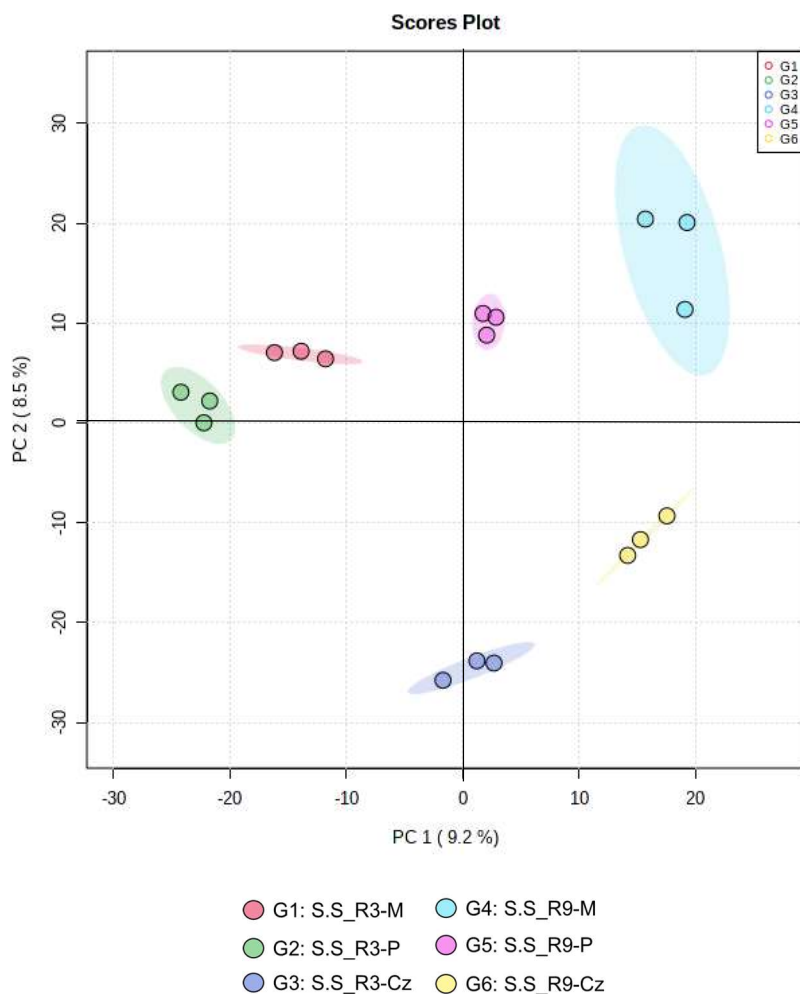


Os extratos brutos foram então submetidos a análises por LC-ESI-(+)-IT-MS no modo de aquisição dependente de dados (DDA), onde os espectros de MS são obtidos a partir do isolamento prévio dos íons precursores, e também a análises por UPLC-QTOF-MS^E no modo de aquisição independente de dados (DIA), onde não há esse isolamento prévio dos íons precursores para a obtenção dos espectros de MS. Os dados gerados no modo DDA foram então utilizados para realizar a Análise de Componentes Principais (PCA) e a geração de redes moleculares na plataforma GNPS e os dados obtidos no modo MS^E foram utilizados no UNIFI.

4.3.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise por PCA foi realizada com o intuito de observar estatisticamente a variação da produção metabólica das duas linhagens de *F. oxysporum* em diferentes fontes de nutriente. Para isso, os dados de LC-ESI-(+)-IT-MS pré-tratados através do MZmine 2 foram submetidos a plataforma MetaboAnalyst 5.0, onde foi gerado o gráfico de scores (**Figura 16**) com PC1 (9,2%) e PC2 (8,5%).

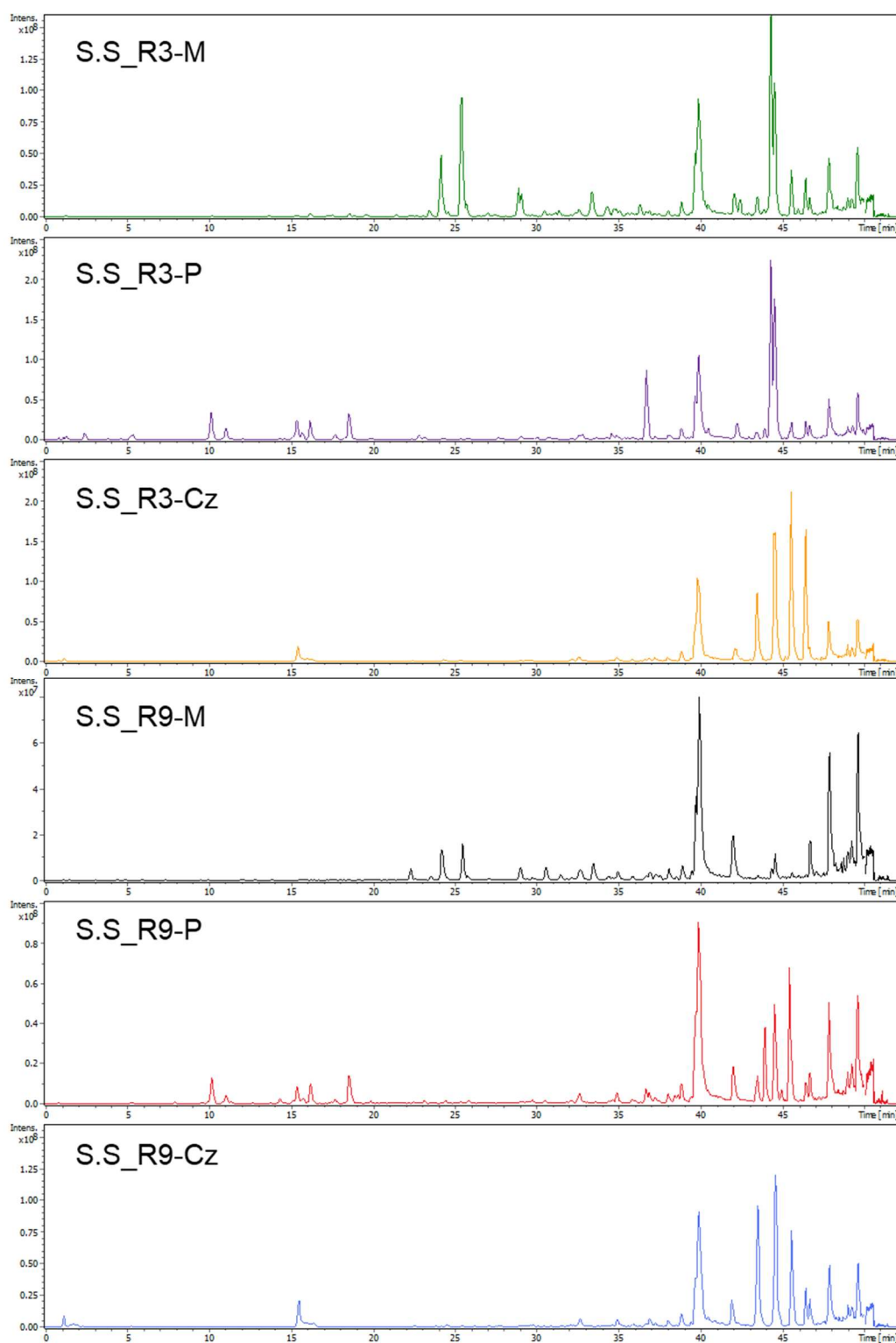
Figura 16: Gráfico de scores para as linhagens S.S_R3 e S.S_R9 nos diferentes meios de cultivo



Com relação a PC1xPC2, foi possível observar para a linhagem S.S_R3 que a variação metabólica entre os meios de Malte e PDB foi pequena, uma vez que suas triplicatas se encontram no mesmo quadrante e muito próximas. Algo parecido foi observado para a linhagem S.S_R9, uma vez que os extratos em PDB e Malte se encontram no mesmo quadrante, porém um pouco mais separados entre si, indicando uma maior diferenciação da produção metabólica entre os meios. O meio que apresentou maior variação metabólica dentre os três foi o de Czapek para ambas as linhagens. O que chama a atenção é que as duas linhagens se encontram em diferentes regiões do gráfico de *scores*, mesmo tendo ambas sido identificadas como *Fusarium oxysporum*. Isso, em adição ao fato de que apenas o extrato S.S_R9-P apresentar atividade antibacteriana, dão indícios de que as duas linhagens podem se tratar de *formas speciales* do complexo da espécie *Fusarium oxysporum* (FOSC).

Os perfis dos extratos obtidos por LC-ESI-(+)-IT-MS se encontram na **Figura 17**, podendo então se observar as diferenças de perfil e intensidade dos picos para os extratos em diferentes meios, seguindo a lógica do que foi observado na análise por PCA.

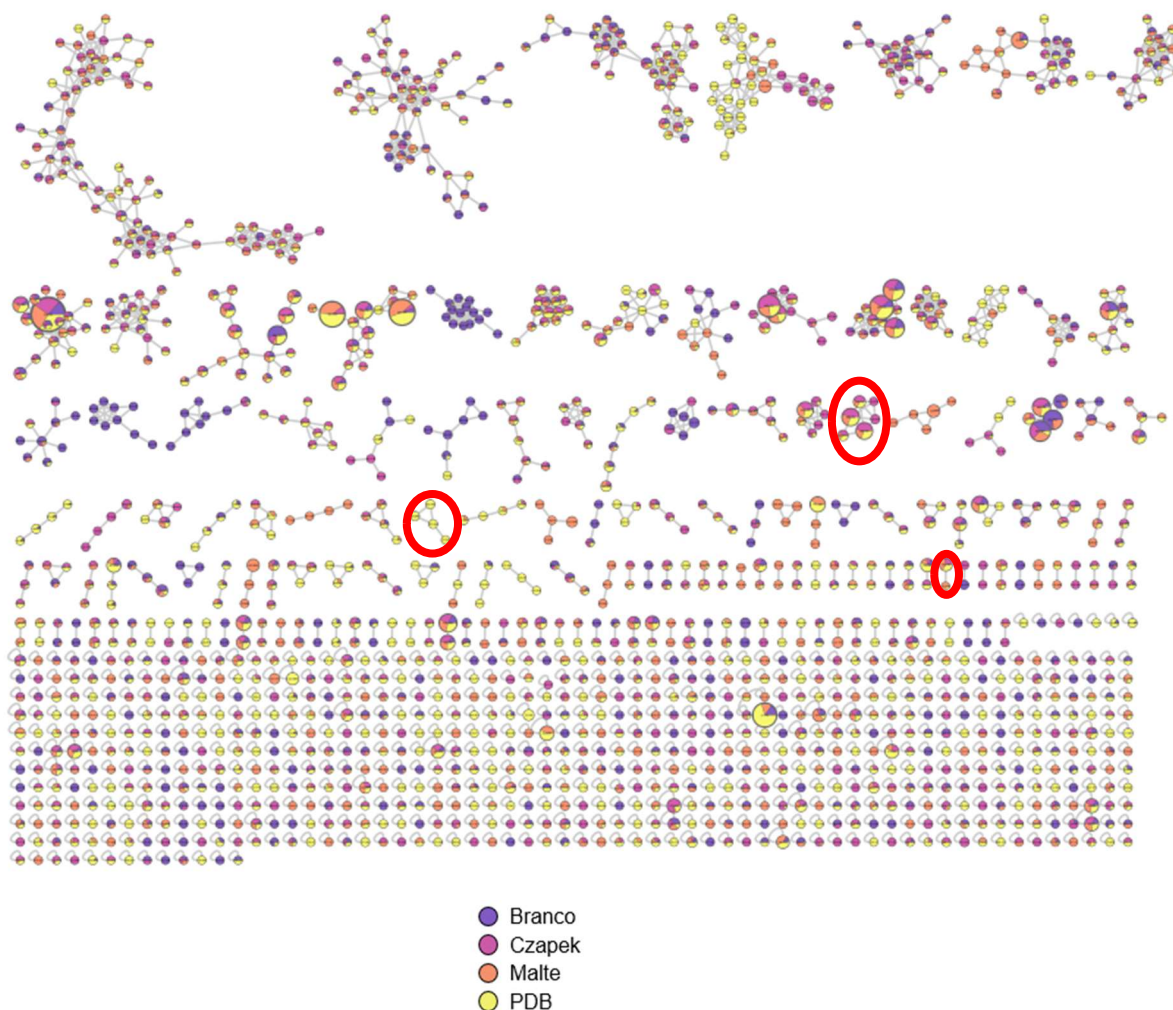
Figura 17: Perfil BPC das linhagens S.S_R3 e S.S_R9 por LC-ESI-(+)-IT-MS



4.3.2 GNPS

Foi gerada uma rede molecular com 1581 nodos e 165 *clusters* (**Figura 18**), da qual foram anotadas nove substâncias, em três diferentes *clusters*, sendo elas sete peptídeos cíclicos, um ácido graxo e um derivado de ácido graxo.

Figura 18: Representação da rede molecular gerada a partir dos dados de LC-ESI-(+)-IT-MS visualizada no Cytoscape 3.9.0



O primeiro *cluster* analisado foi o das enniatinas (**Figura 19**), todas elas com íon precursor na forma $[M+H]^+$. As enniatinas são peptídeos cíclicos que diferem entre si nas unidades de aminoácido e são produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium*. São consideradas toxinas e apresentam atividades biológicas como citotoxicidade em linhagens células humanas, fitotoxicidade e atividade antifúngica (HU; RYCHLIK, 2012). O GNPS conseguiu anotar as enniatinas B (**1**), B1 (**2**), MK 1688 (**3**) e A1 (**4**), sendo que essas foram produzidas em todos os meios, porém majoritariamente no meio de Czapek. Notou-se a presença de dois nodos

sem anotação no *cluster*, referentes a substâncias presentes somente no meio de Czapek com íons precursores $[M+H]^+$ m/z 626,514 e m/z 612,574. Ao comparar os íons precursores desses *clusters* com as massas moleculares de enniatinas na literatura e observar o padrão de fragmentação foi possível atribuir os mesmos as enniatinas B2/J2/J3/K1 (**5**) e B3/J1 (**6**) (**Apêndice 1**), respectivamente. Nos espectros de MS² notou-se a presença do íon fragmento com m/z 196 para **5** e **6** (**Figura 20**), esse um íon característico de clivagem nas ligações de amida e ester em uma enniatina (BURMEISTER; PLATTNER, 1987). Uma vez que as enniatinas B2, J2, J3 e K1 apresentam a mesma massa molecular e não tendo sido possível encontrar espectros de massas para elas na literatura, não se pode afirmar com certeza qual das quatro é a enniatina referente a esse nodo. Observou-se o mesmo com as enniatinas B3 e J1 para o outro *cluster*.

Como algumas enniatinas também foram anotadas a partir do UNIFI, a fragmentação das mesmas será discutida com mais profundidade em **4.3.3**.

Figura 19: Cluster das enniatinas (1-6) e suas respectivas estruturas

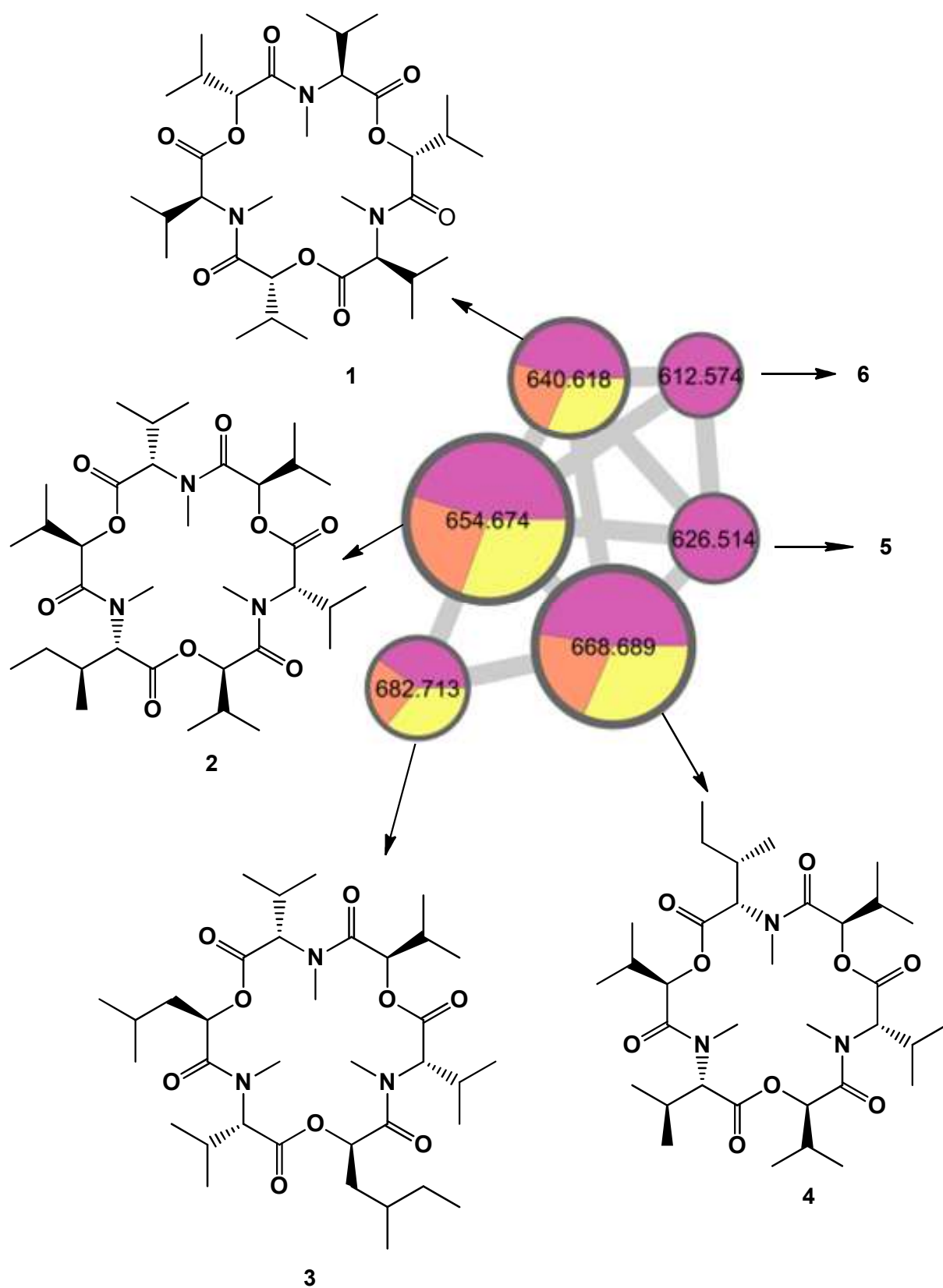
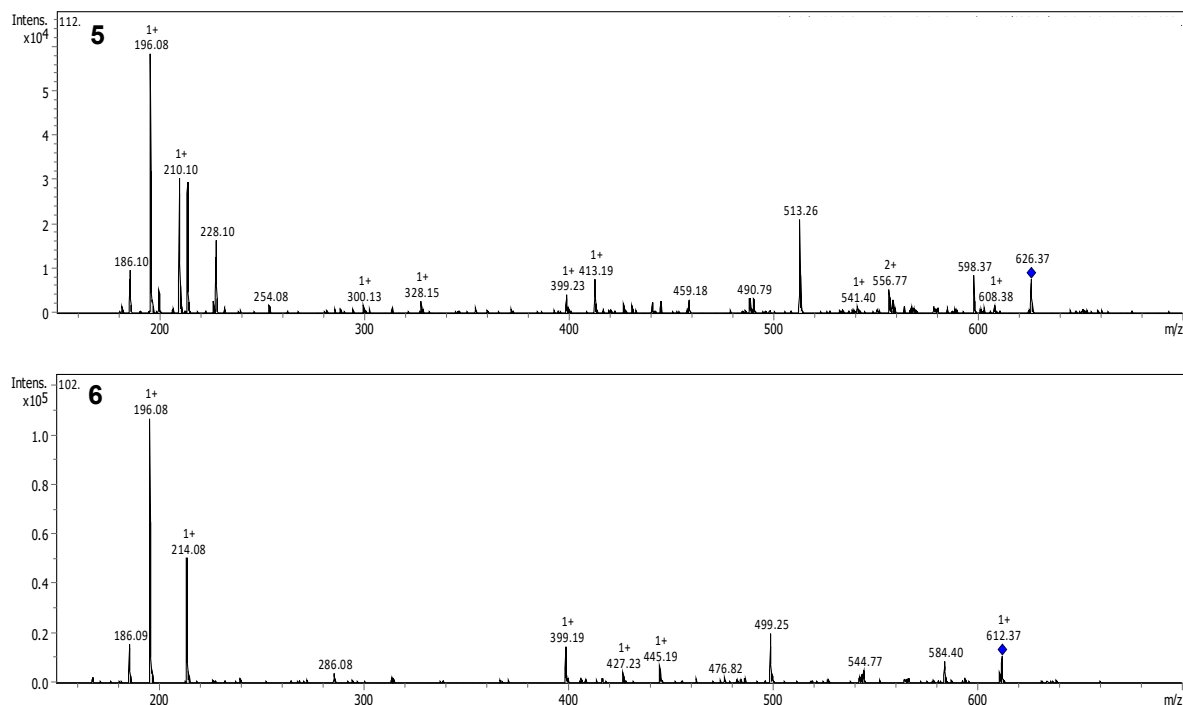
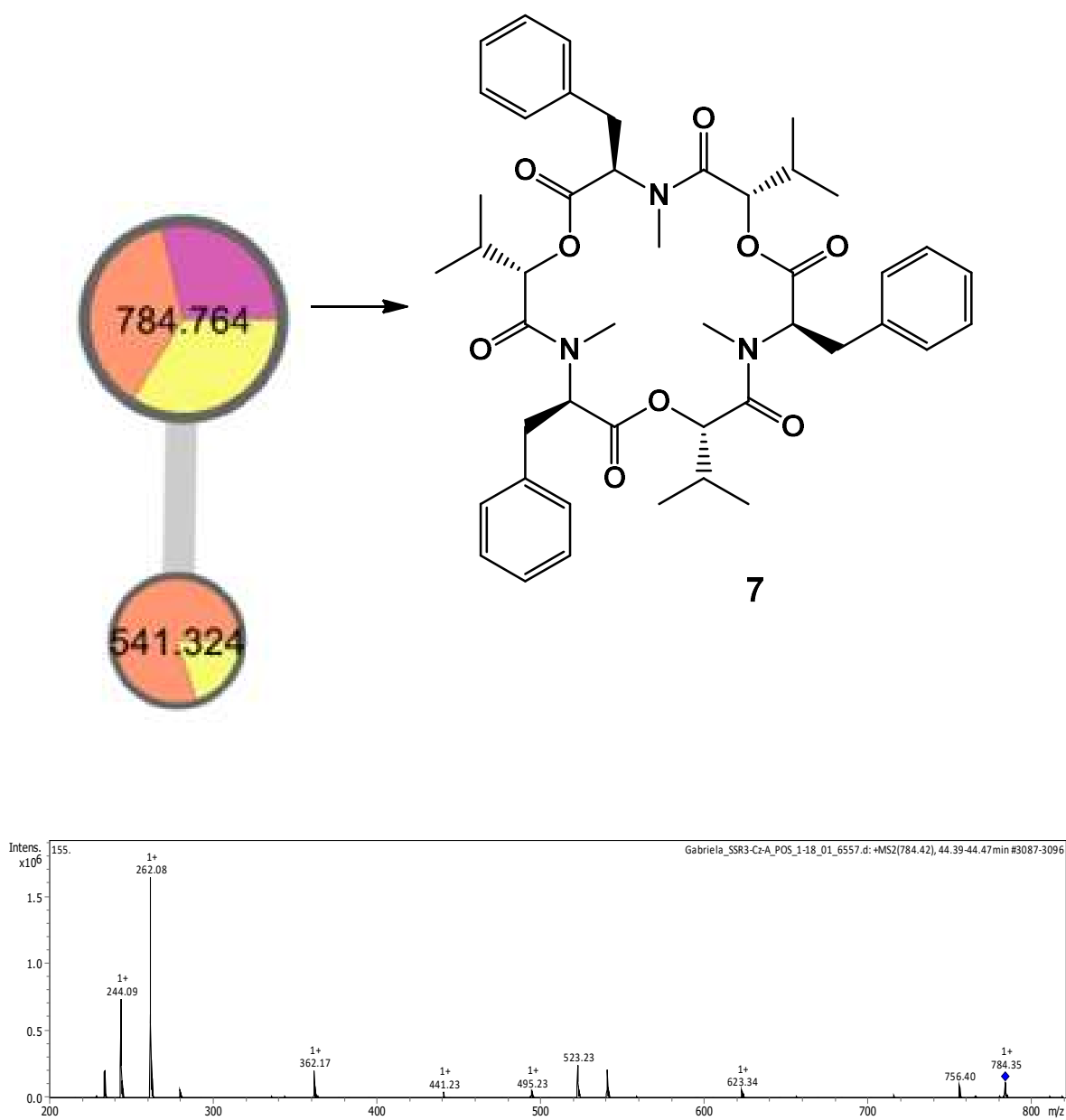


Figura 20: Espectros de MS² por LC-ESI-(+)-IT-MS das substâncias **5** e **6** extraídos através do software DataAnalysis 4.3



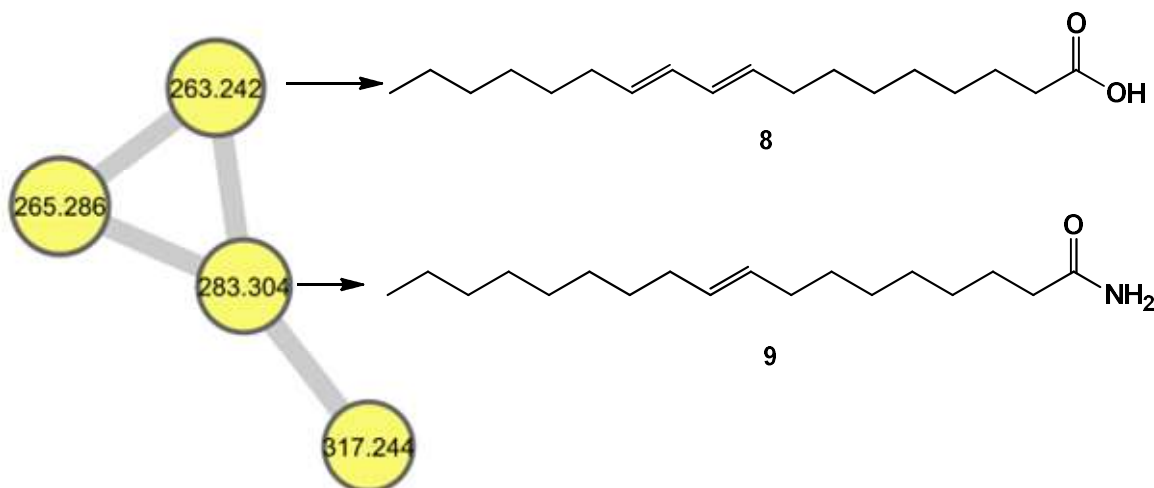
Em um *cluster* com apenas dois nodos foi anotada a beauvericina (**7**), um outro peptídeo cíclico que também é produzido por espécies do gênero *Fusarium* e é biossintetizado pela mesma enzima precursora que as enniatinas, se diferenciando por apresentar outros aminoácidos como substituintes (**Figura 21**). Ela também foi anotada pelo UNIFI com diversos fragmentos propostos, de modo que a proposta de fragmentação também foi discutida com os dados de MS^E.

Figura 21: Esquema do *cluster* contendo a substância (7) com a sua respectiva estrutura e espectro de MS² por LC-ESI-(+)-IT-MS extraído através do software DataAnalysis 4.3

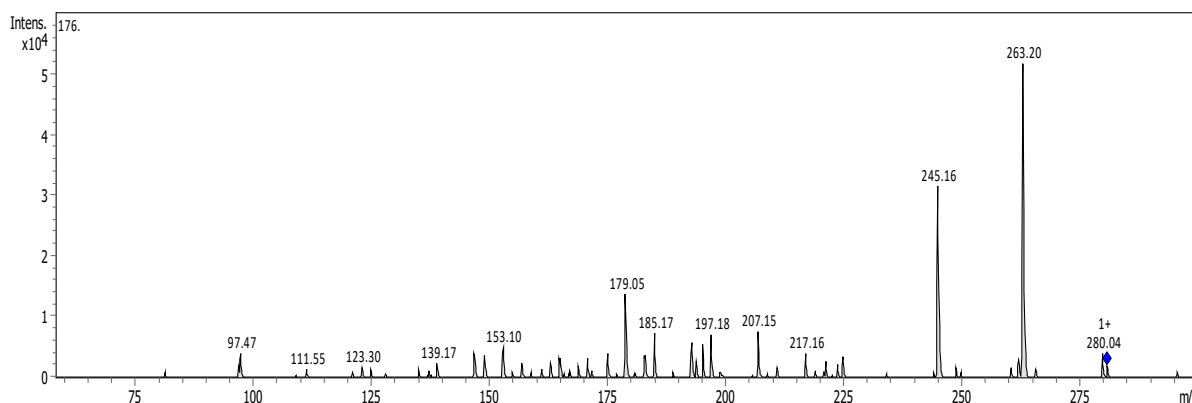
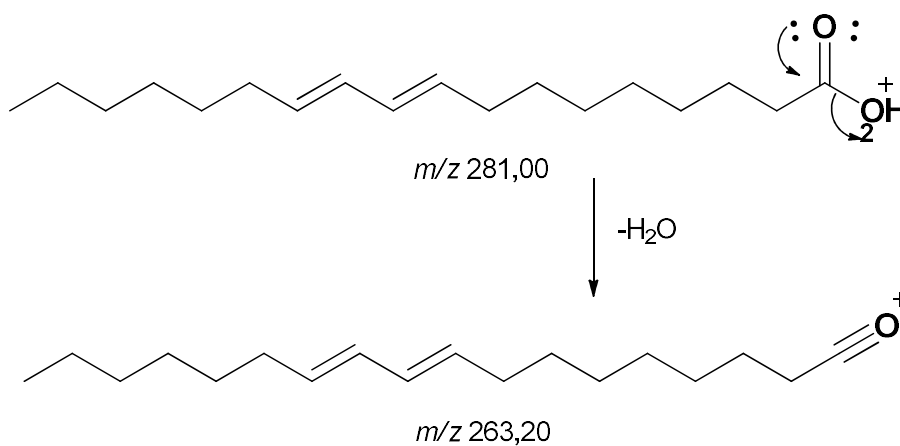


Por fim, o último cluster analisado (**Figura 22**) foi o que levou a anotação de um ácido graxo, o ácido linoleico conjugado (**8**) e um derivado de ácido graxo, a oleamida (**9**). A presença de ambos só foi observada no meio de PDB.

Figura 22: Cluster onde foram anotadas as substâncias **8** e **9** e suas respectivas estruturas



A substância **8** foi produzida por ambas as linhagens de *F. oxysporum* em PDB e observada na forma $[M+H-H_2O]^+$, onde há perda de uma molécula de água durante o processo de ionização. Por mais que a ionização do tipo ESI seja considerada uma ionização mais branda em termos de energia ainda pode ocorrer fragmentação *in-source*, como foi observado no caso da substância **8** (**Figura 23**). O íon precursor $[M+H]^+$ com m/z 281,00, identificado por um losango azul, aparece com uma intensidade muito baixa, seguido do sinal mais intenso referente ao íon fragmento *in-source* com m/z 263,24, cuja proposta de fragmentação para a sua formação se encontra na **Figura 24**.

Figura 23: Espectro de MS² via LC-ESI-(+)-IT-MS da substância **8****Figura 24:** Proposta de fragmentação da substância **8** por ESI

A última substância anotada pelo GNPS foi a **9** que foi encontrada apenas no extrato S.S_R9-P, com íon precursor $[M+H]^+$ com m/z 283,30 e íons fragmentos m/z 265,19 e 247,18 (**Figura 25**). Esses íons são característicos de ácidos graxos de amida primária, onde há uma perda de amônia seguida de uma perda de água (DIVITO *et al.*,2012). A proposta de fragmentação do mesmo se encontra na **Figura 26**.

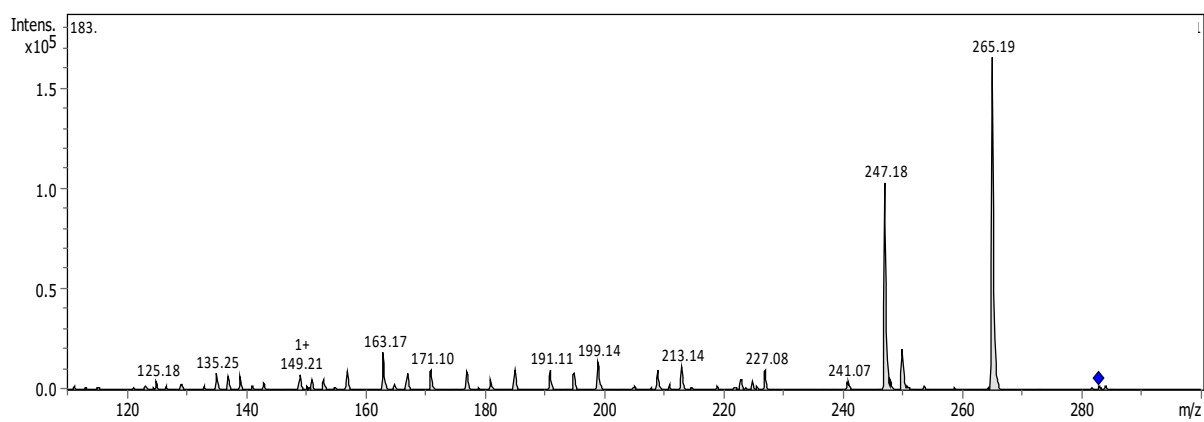
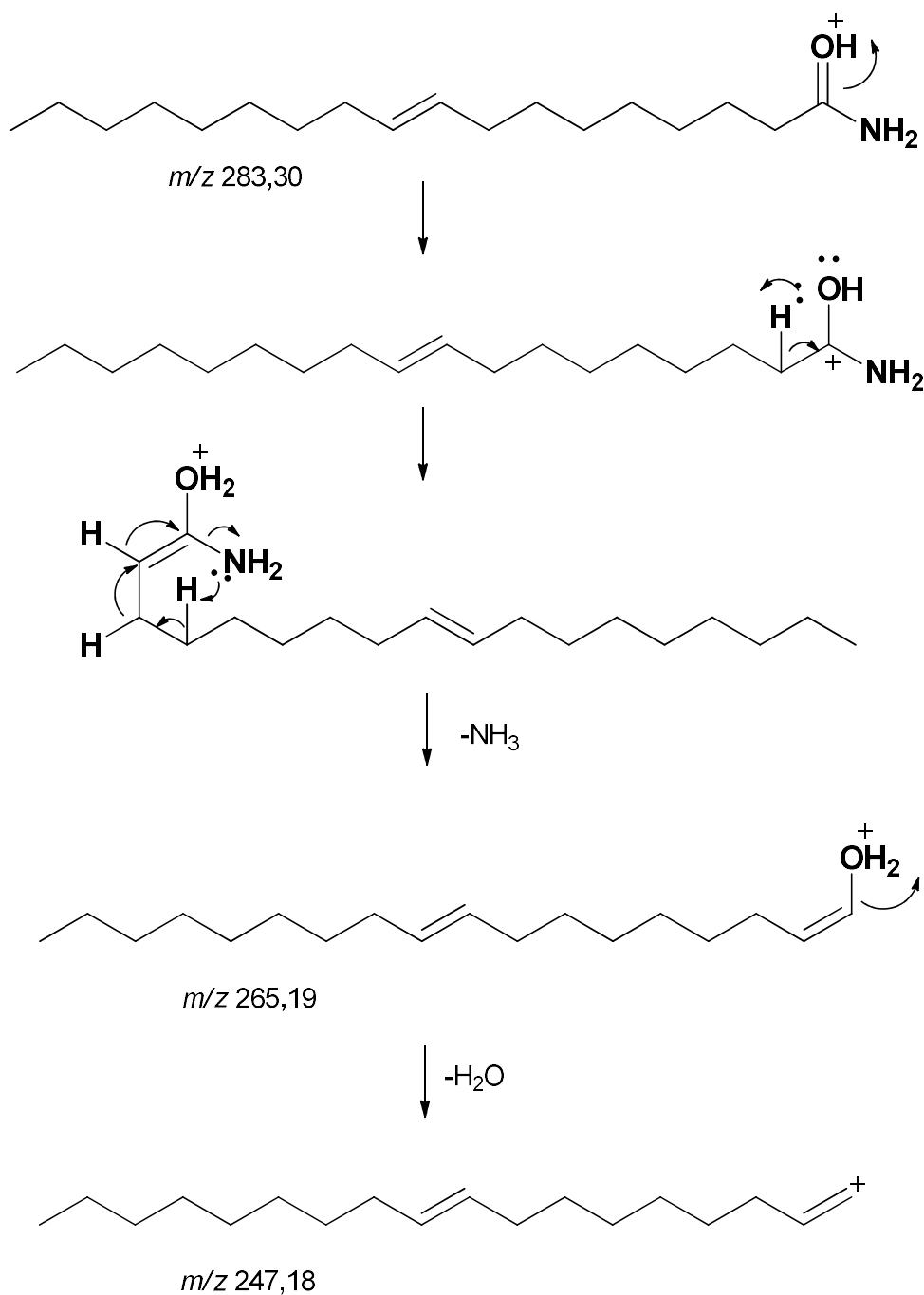
Figura 25: Espectro de MS² via LC-ESI-(+)-IT-MS da substância **9**

Figura 26: Proposta de fragmentação da substância **9** por ESI

Todas as informações obtidas a partir da plataforma GNPS sobre as substâncias anotadas e discutidas nessa seção foram organizadas na **Tabela 6**. Foram observadas poucas anotações através do GNPS, uma vez que ela compara os dados espectrais submetidos com bibliotecas públicas e nem sempre elas são tão completas para LC-MS quando se trata de fungos endofíticos.

Tabela 6: Substâncias anotadas através da plataforma GNPS para os extratos de ambas as linhagens nos diferentes meios de cultivo

N° subst.	Tr (min)	m/z íon precursor (Da)	Aduto/Mol. protonada	Nome da substância	N° de picos compartilhados	Erro (ppm)*	Cosseno	ESI (MS/MS)(m/z)	Amostras
1	43,06	640,62	M+H	Enniatina B	7	315	0,81	527,30; 427,25; 314,19; 214,10; 196,11; 182,10	S.S_R3-M; S.S_R3-Cz; S.S_R3-P; S.S_R9-M; S.S_R9-Cz; S.S_R9-P
2	44,16	654,67	M+H	Enniatina B1	10	369	0,82	541,33; 441,26; 427,24; 314,18; 228,12; 214,11; 210,12; 196,11; 186,11	S.S_R3-M; S.S_R3-Cz; S.S_R3-P; S.S_R9-M; S.S_R9-Cz; S.S_R9-P
3	46,25	682,71	M+H	MK 1688	53	361	0,74	569,35; 478,75; 342,21; 228,11; 211,11; 210,12; 200,53	S.S_R3-M; S.S_R3-Cz; S.S_R3-P; S.S_R9-M; S.S_R9-Cz; S.S_R9-P
4	45,19	668,69	M+H	Enniatina A1	9	360	0,79	555,33; 441,27; 328,18; 228,11; 214,10; 210,12; 200,54; 196,11	S.S_R3-M; S.S_R3-Cz; S.S_R3-P; S.S_R9-M; S.S_R9-Cz; S.S_R9-P
5	42,25	626,514	M+H	Enniatina B2/J2/J3/K1	-	-	-		S.S_R3-Cz; S.S_R9-Cz
6	40,89	612,574	M+H	Enniatina B3/J1	-	-	-		S.S_R3-Cz; S.S_R9-Cz
7	44,39	784,76	M+H	Beauvericina	22	442	0,85	623,32; 541,23; 523,26; 495,24; 441,21; 362,18; 263,10; 262,10; 244,57; 244,10;	S.S_R3-M; S.S_R3-Cz; S.S_R3-P; S.S_R9-M; S.S_R9-Cz;

								234,11	S.S_R9-P
8	43,91	263,24	M+H-H ₂ O	Ácido linoleico conjugado	35	22	0,88	245,18; 219,14; 217,15; 189,11; 175,16; 165,17; 147,18; 135,24; 121,29; 109,38; 95,51; 81,68	S.S_R3-P; S.S_R9-P
9	45,37	283,3	M+H	Oleamida	49	3634	0,9	265,21; 247,20; 227,12; 209,12; 199,14; 177,14; 163,19; 149,19; 139,20; 109,42; 97,49	S.S_R9-P

*Dados de massas de baixa resolução

4.3.3 UNIFI

A fim de se obter mais informações sobre metabólitos comumente produzidos pelo fungo endofítico *Fusarium oxysporum* nos diferentes meios de cultivo, utilizou-se os dados adquiridos no modo MS^E na plataforma UNIFI. Nela os dados foram comparados com uma base de dados *in house* construída pela própria autora, a partir de um review da literatura (IBRAHIM *et al.*, 2021). O algoritmo do UNIFI é capaz de testar as conexões das ligações presentes nas estruturas das substâncias da biblioteca, gerando fragmentos teóricos que posteriormente são comparados com os resultados das análises, permitindo então que ele sugira os fragmentos para as substâncias anotadas (WHITE PAPER WATERS A, 2022). A partir disso foi possível anotar 30 metabólitos (**Tabela 7**), sendo eles alcaloides, derivados de naftoquinonas, peptídeos cíclicos, terpenoides, derivados de jasmonatos e antraquinonas. Entretanto, não foi possível deduzir os mecanismos de fragmentação para todos os íons fragmentos sugeridos uma vez que não foi encontrado base para eles na literatura.

Tabela 7: Metabólitos anotados para as duas linhagens de *F. oxysporum* nos diferentes meios de cultivo por UPLC-QTOF/MS^E no modo positivo através do software UNIFI

N°	Nome da substância	t _R (min)	Aduto/Mol. Protonada	Íon precursor (m/z)	Erro (mDa)	Íons fragmentos (m/z)	Extratos
Peptídeos cíclicos							
2	Enniatina B1	15,71	+Na	676,4142	-0,1	563,3305; 541,3479; 497,2532; 463,2779; 441,2963; 350,1928; 328,2104; 228,1586; 214,1432; 210,1482; 196,1326	S.S_R3-Cz; S.S_R3-M; S.S_R3-P; S.S_R9-Cz; S.S_R9-M; S.S_R9-P
3	Enniatina MK1688	16,21	+Na	704,4457	0,5	569,3797; 511,2693; 455,3111; 371,2275; 364,2093; 342,2270; 327,2012; 283,1748; 239,1485; 228,1589; 210,1485	S.S_R3-Cz; S.S_R3-P; S.S_R9-Cz; S.S_R9-P
4	Enniatina A1	15,97	+Na	690,4302	0,2	577,3457; 555,3639; 497,2531; 441,2955; 350,1928; 328,2101; 293,1784; 228,1589; 214,1430; 210,1482; 196,1327	S.S_R3-Cz; S.S_R3-M; S.S_R3-P; S.S_R9-Cz; S.S_R9-M; S.S_R9-P
7	Beauvericina	15,58	+Na	806,3991	0,4	756,4210; 645,3148; 623,3323; 545,2618; 541,2912; 523,2801; 495,2848; 441,2382; 412,1871; 384,1776; 362,1957; 262,1434; 244,1329; 234,1481	S.S_R3-Cz; S.S_R3-M; S.S_R3-P; S.S_R9-Cz; S.S_R9-M; S.S_R9-P

10	Enniatina C	15,95	+Na	704,4461	0,4	668,4477; 577,3457; 555,3639; 497,2531; 441,2955; 350,1928; 328,2101; 214,1430; 210,1482; 196,1327	S.S_R3-M; S.S_R3-P; S.S_R9-Cz; S.S_R9-M; S.S_R9-P
Alcaloides							
11	Oxisporidinona	14,94	+Na	512,2983	0	472,3057; 454,2948; 436,2842; 314,0991; 274,1068; 256,0961; 230,0808	S.S_R3-M
12	4,6'-anidrooxisporidinona	14,89	+Na	494,288	0,3	411,2058; 361,2344; 357,1463; 343,2213; 335,1638; 319,1939; 303,2162; 225,0790	S.S_R3-Cz; S.S_R3-M; S.S_R3-P; S.S_R9-M; S.S_R9-P
13	4'-hidroxil oxisporidinona	14,65	+H	492,3318	-0,1	421,2332; 287,1585	S.S_R3-Cz; S.S_R3-M; S.S_R3-P; S.S_R9-P
14	6-desoxioxisporidinona	14,44	+H	474,3216	0,2	456,3103; 438,2999; 346,1771; 298,1041; 294,1333; 276,1220; 258,1119; 240,1015; 232,0965; 214,0858	S.S_R3-M
15	Ácido fusárico	6,79	+H	180,1018	-0,1	162,0904; 152,1078	S.S_R3-Cz; S.S_R3-P; S.S_R9-Cz; S.S_R9-M; S.S_R9-P
16	Ácido 9,10-desidrofusárico	5,37	+H	178,0874	-0,4	160,0757; 150,0912	S.S_R3-Cz; S.S_R3-P; S.S_R9-Cz; S.S_R9-P

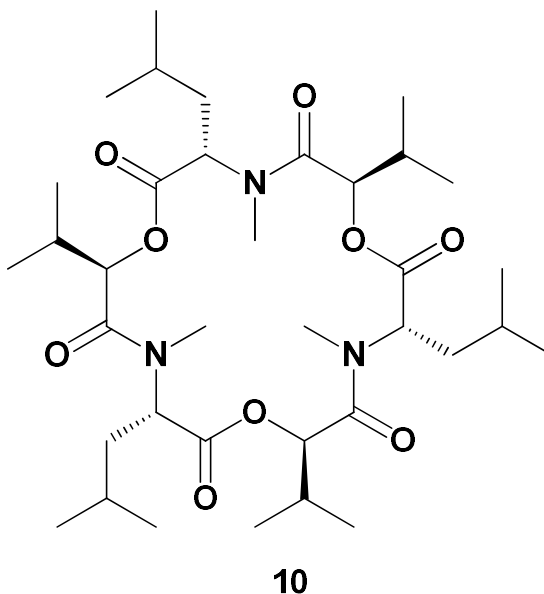
17	Fusaricato F	14,85	+NH ₄	329,1709	0,2	231,0962; 225,0790	S.S_R3-Cz; S.S_R3-M; S.S_R3-P; S.S_R9-M; S.S_R9-P
18	<i>epi</i> -tricosetina	14,99	+H	360,2173	0,4	329,1723; 175,1478	S.S_R3-Cz; S.S_R3-M; S.S_R3-P; S.S_R9-Cz; S.S_R9-M; S.S_R9-P
Derivados de naftoquinonas							
19	Anidrofusarubina	10,7	+H	289,0702	-0,4	249,0752; 245,0802; 231,0643; 189,0534	S.S_R9-M
20	9-O-metilanidrofusarubina	12,26	+Na	325,068	-0,2	288,0619; 273,0752; 261,0754; 245,0434	S.S_R9-M
21	8-O-metilbostricoidina	10,8	+Na	300,0863	-0,3	285,0622; 268,0595; 256,0598	S.S_R3-Cz; S.S_R3-M; S.S_R3-P; S.S_R9-Cz; S.S_R9-M
22	9-O-metilfusarubina	9,54	+Na	343,0783	-0,5	303,0854; 273,0383; 261,0752; 246,0515; 233,0801; 228,0406; 217,0487	S.S_R3-M; S.S_R9-M
23	3-O-metil-9-O-metilfusarubina	11,07	+Na	357,0937	-0,8	287,0545; 272,0306; 259,0593; 244,0359; 231,0644; 227,0328; 216,0408	S.S_R9-M
24	8-O-metiljavanicina	9,23	+Na	327,0836	-0,3	263,09079; 245,0800; 248,0671; 230,0564; 205,0486	S.S_R3-M; S.S_R9-M

25	8-O-metilsolaniol	10,05	+Na	329,0983	-1,3	263,0904	S.S_R3-M; S.S_R9-M
26	Nectriafurona	11,06	+Na	327,0471	-0,5	287,0545; 272,0306; 259,0593; 244,0359	S.S_R3-M; S.S_R9-M
27	Nectriafurona-8-metil éter	9,61	+Na	341,0628	-0,4	304,0565; 301,0699; 289,0334; 272,0665; 257,0437	S.S_R3-M; S.S_R9-M
Terpenoides							
28	Cosmosporasida G	12,23	+Na	555,3135	-0,5	441,2452	S.S_R3-P
29	Cosmosporasida H	12,63	+Na	569,3294	-0,2	353,1923	S.S_R3-Cz; S.S_R3-P; S.S_R9-Cz; S.S_R9-M; S.S_R9-P
30	Fusariumina C	15,51	+Na	355,2239	-0,4	283,1745	S.S_R3-M; S.S_R9-M
31	Toxina HT-2	14,86	+H	425,2149	-2,1	365,1928	S.S_R3-Cz; S.S_R9-Cz
Derivados de jasmonatos							
32	(1S,2S)-3-oxo-2-pentilciclopentano-1-ácido octanóico	14,58	+Na	319,2236	-0,8	269,2077	S.S_R9-P
33	N-(9,10-dihidro-7-iso-jasmonoil)-(S)-isoleucina	15,77	+K	364,1882	-0,3	261,1302	S.S_R3-M; S.S_R9-M
Antraquinonas							
34	1,4-naftalenodiona-3,8-dihidroxi-5,7-dimetoxi-2-(2-oxopropyl)	8,74	+Na	329,0628	-0,4	247,0594	S.S_R3-M; S.S_R9-M
35	2-acetil-3,8-dihidroxi-6-metoxi-antraquinona	11,77	+H	313,0698	-0,9	270,0515	S.S_R3-M; S.S_R9-M

Peptídeos cíclicos

Anotaram-se cinco peptídeos, onde quatro deles, as substâncias **2**, **3**, **4** e **7**, já haviam sido anotados previamente pelo GNPS. Entretanto, a enniatina C (**10**) com íon precursor $[M+Na]^+$ m/z 704,4461 (**Figura 27**) foi anotada somente pelo UNIFI.

Figura 27: Estrutura da substância **10** anotada via UNIFI



Os peptídeos cíclicos anotados foram todos com íon precursor na forma $[M+Na]^+$. O padrão de fragmentação das enniatinas é muito semelhante e envolve a clivagem da ligação peptídica resultando em diferentes resíduos de aminoácidos, de acordo com os seus substituintes. É possível observar nos íons fragmentos sugeridos pelo UNIFI para substância **4** (**Figura 28**) uma perda sequencial de hidroxisovalerato (Hiv) e *N*-metil-isoleucina (*N*-Melle), resultantes da clivagem da ligação peptídica (**Figura 29**) (SY-CORDERO; PEARCE; OBERLIES, 2012). Os íons fragmentos sugeridos pelo UNIFI para as demais enniatinas se encontram nos **Apêndices 2-4**.

Figura 28: Íons fragmentos da substância **4** por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo via UNIFI

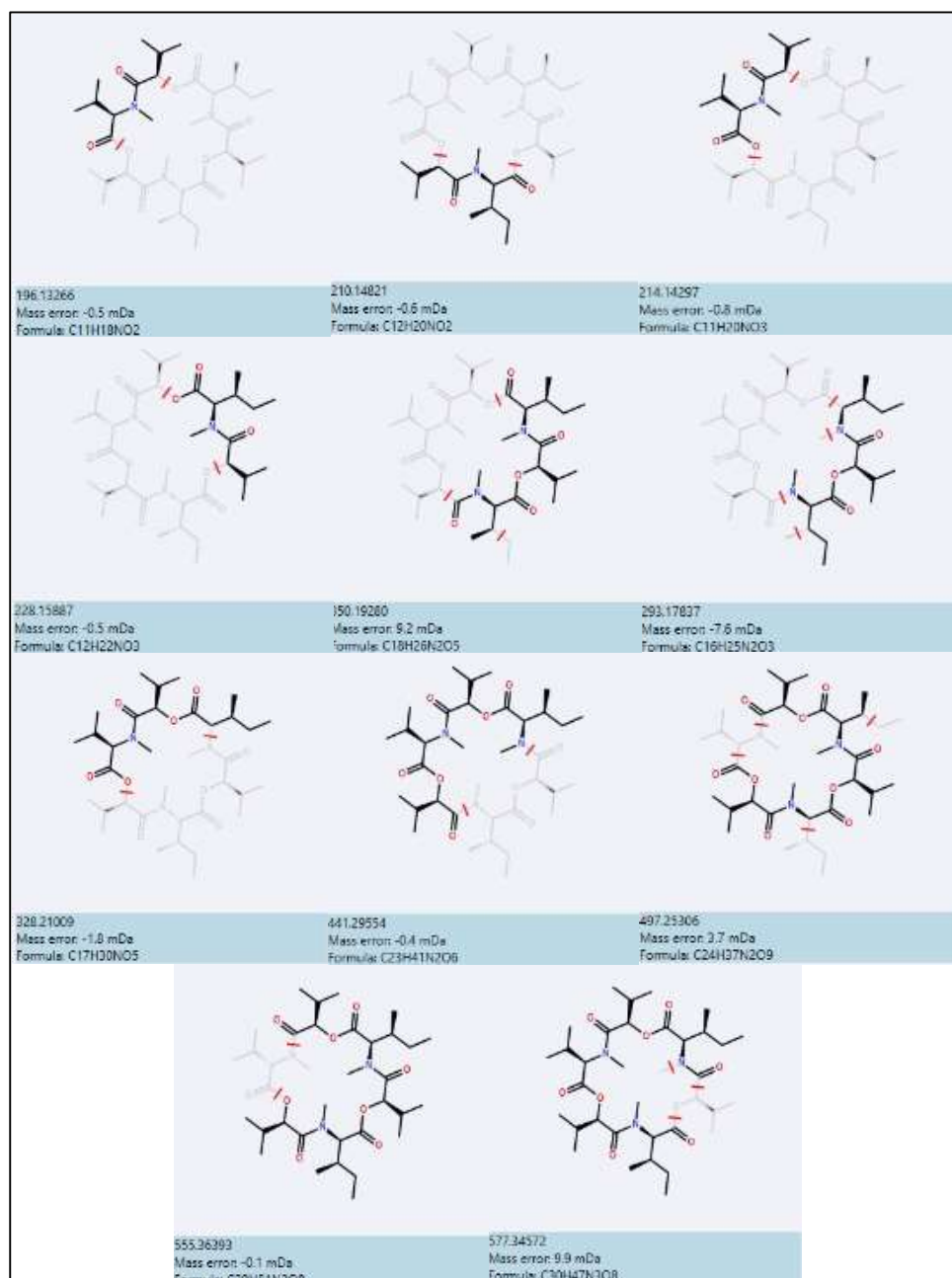
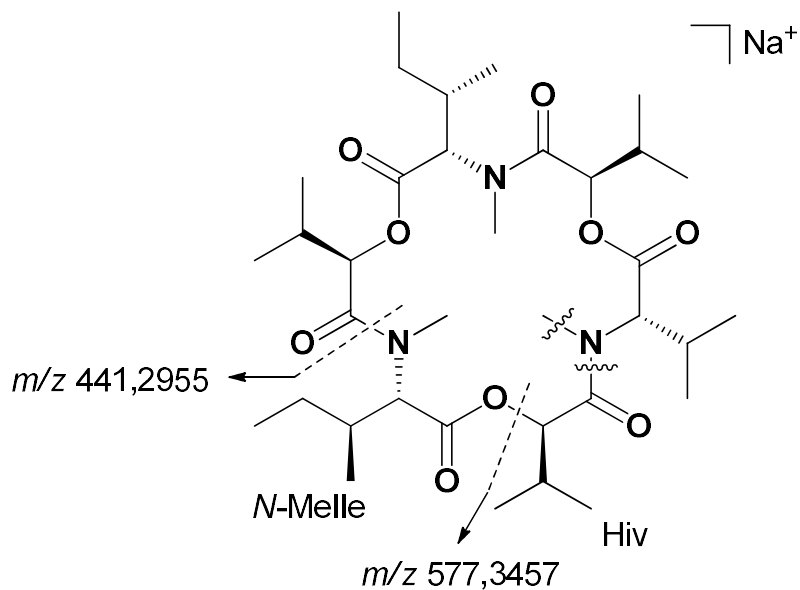


Figura 29: Proposta de fragmentação por ESI para a substância **4**

A substância **7**, com íon precursor $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 806,3991, foi observada nos extratos de ambas as linhagens nos três diferentes meios de cultivo. Os íons fragmentos sugeridos pelo UNIFI para ela podem ser observados na **Figura 30**, com ênfase nos íons de maior intensidade com m/z 262 e m/z 244, correspondentes a um fragmento com um resíduo de fenilalanina e a esse mesmo fragmento após a perda de água, respectivamente (**Figura 31**).

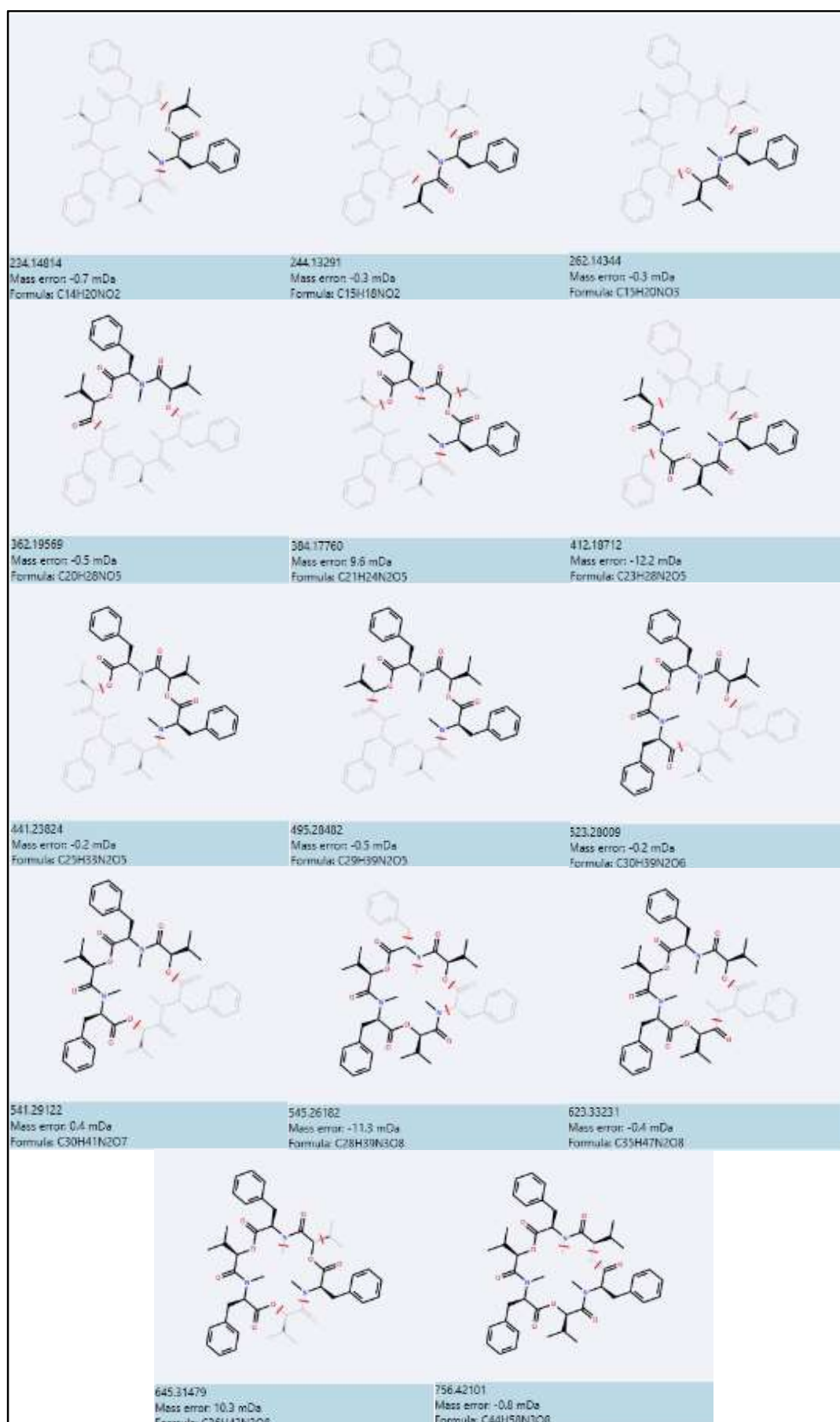
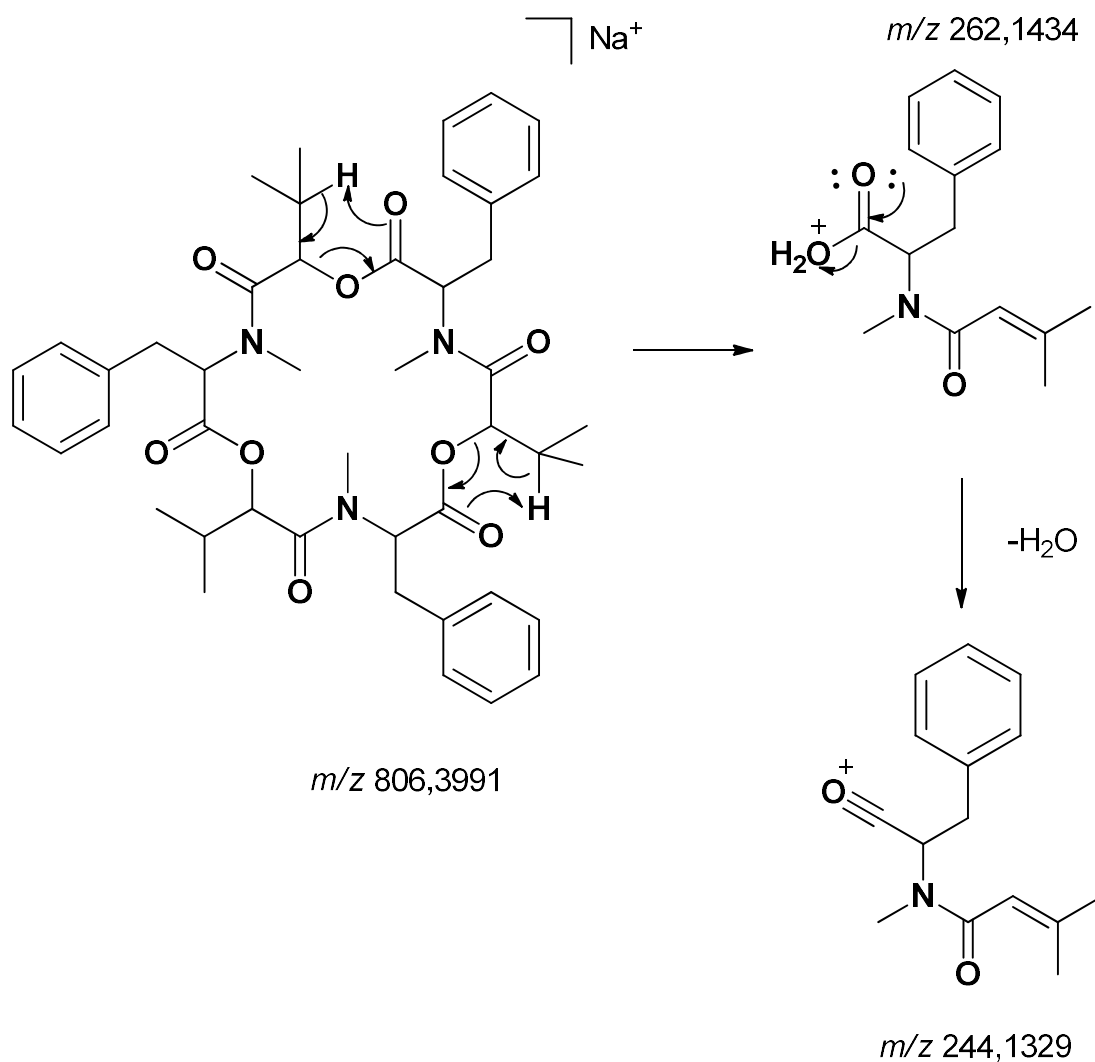
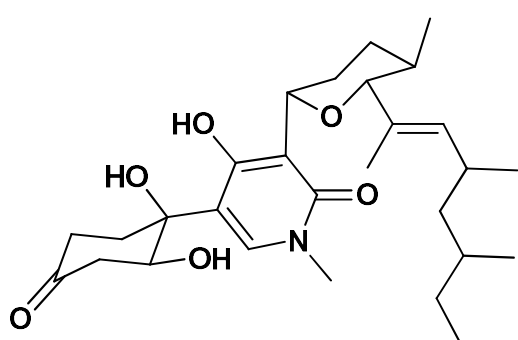
Figura 30: Íons fragmentos da substância **7** por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo via UNIFI

Figura 31: Proposta de fragmentação de íons característicos da substância 7

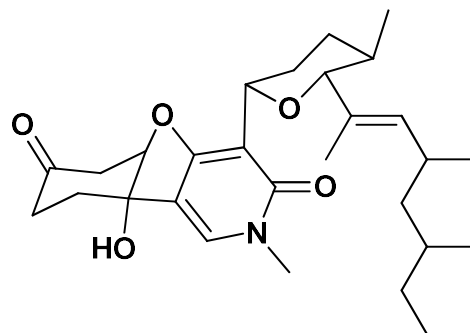
Alcaloides (11-18)

Em seguida foram anotados oito alcaloides (**Figura 32**), sendo o primeiro deles a oxisporidinona (**11**), com o íon precursor $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 512,2983, além de três análogos da mesma: a 4,6'-anidrooxisporidinona (**12**), com $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 494,2880, a 4'-hidroxil oxisporidinona (**13**), com $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 492,3318, e a 6-desoxioxisporidinona (**13**), com $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 474,3216. Os íons fragmentos sugeridos pelo UNIFI para as quatro substâncias se encontram na **Figura 33**.

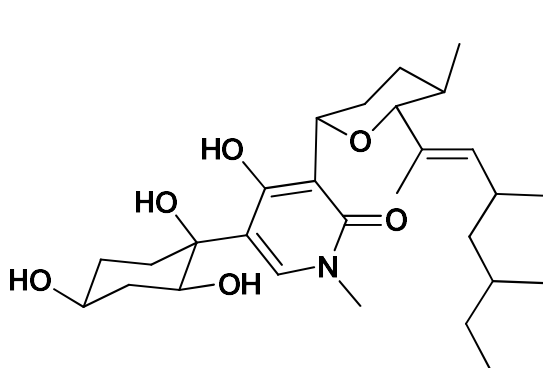
Figura 32: Estrutura dos alcaloides (11-18) anotados por UPLC-QTOF/MS^E no modo positivo através do software UNIFI



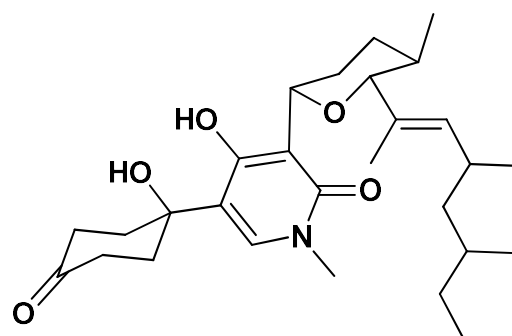
11



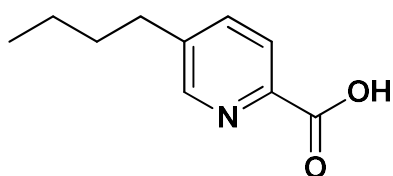
12



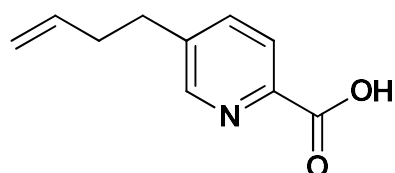
13



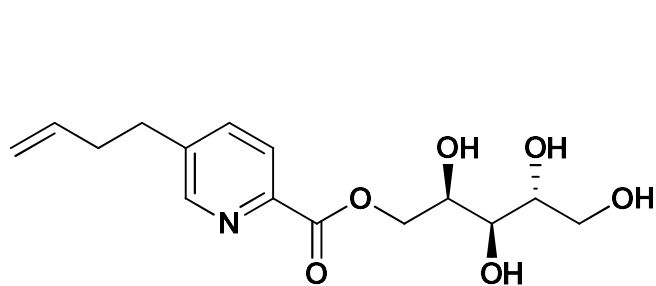
14



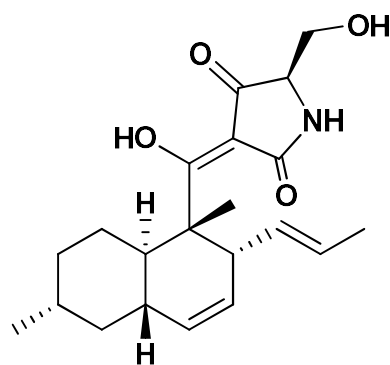
15



16



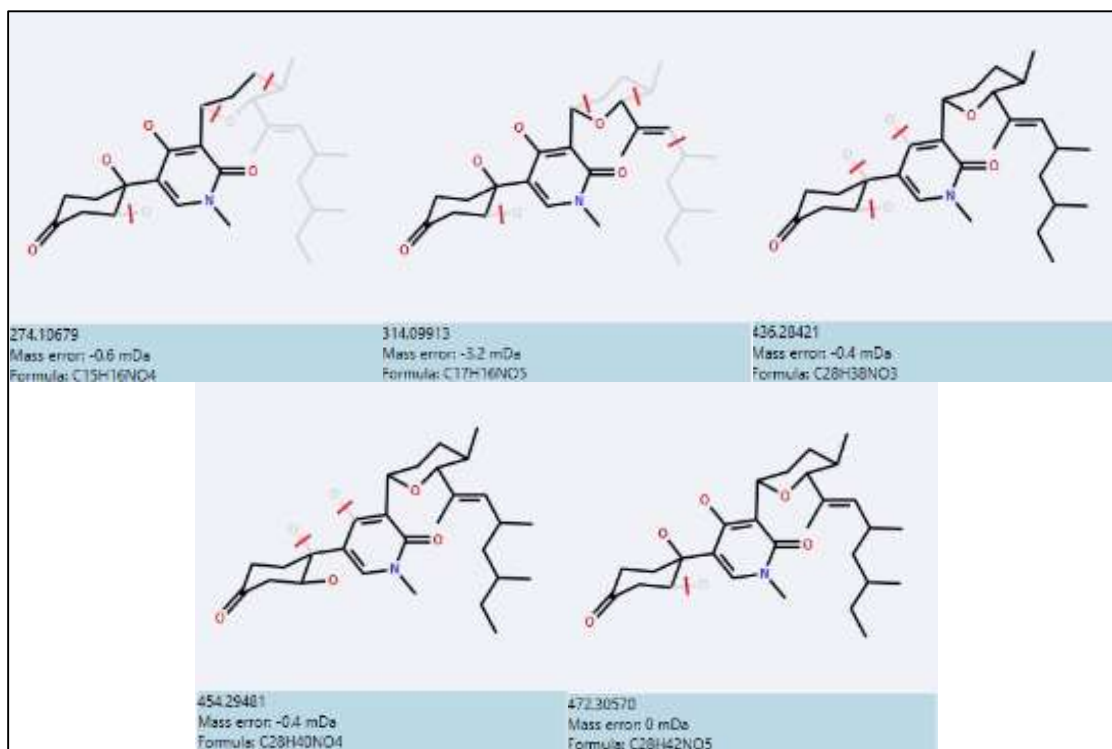
17



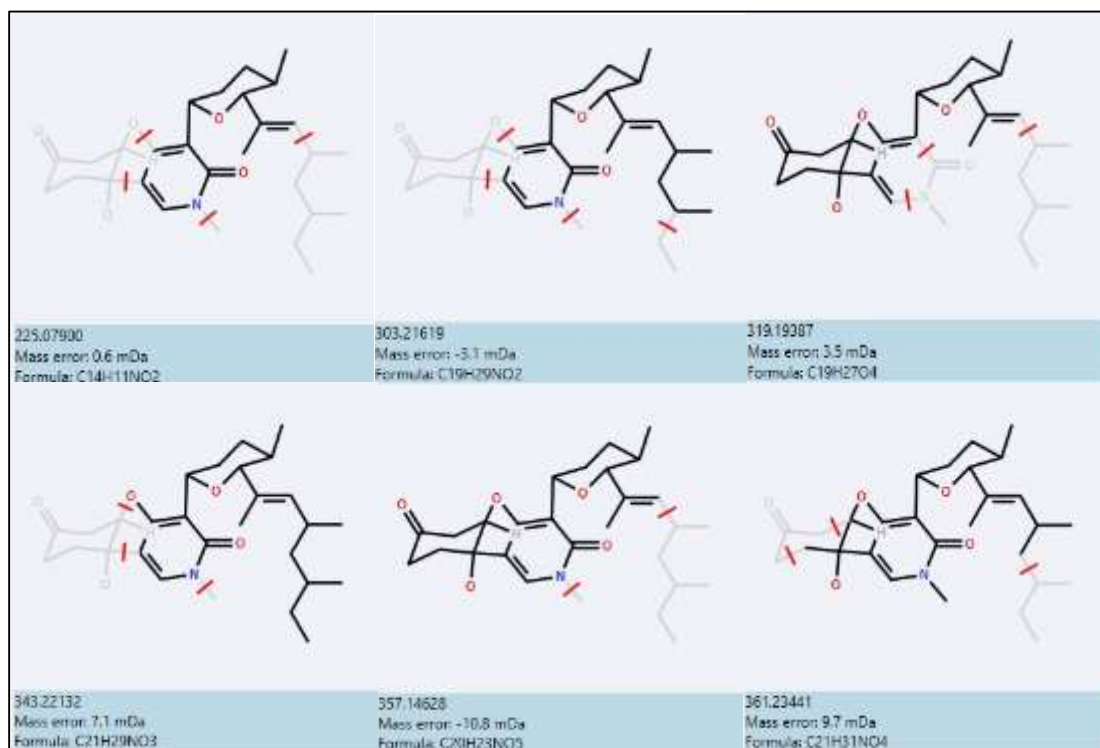
18

Figura 33: Íons fragmentos das substâncias **11-14** por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo via UNIFI

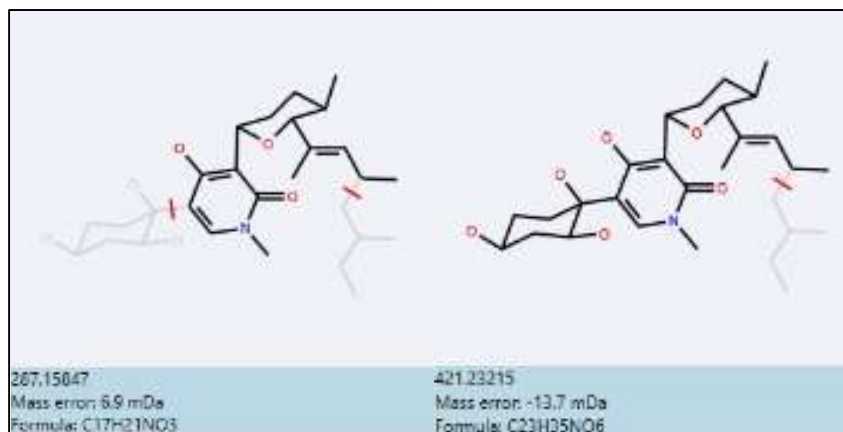
11



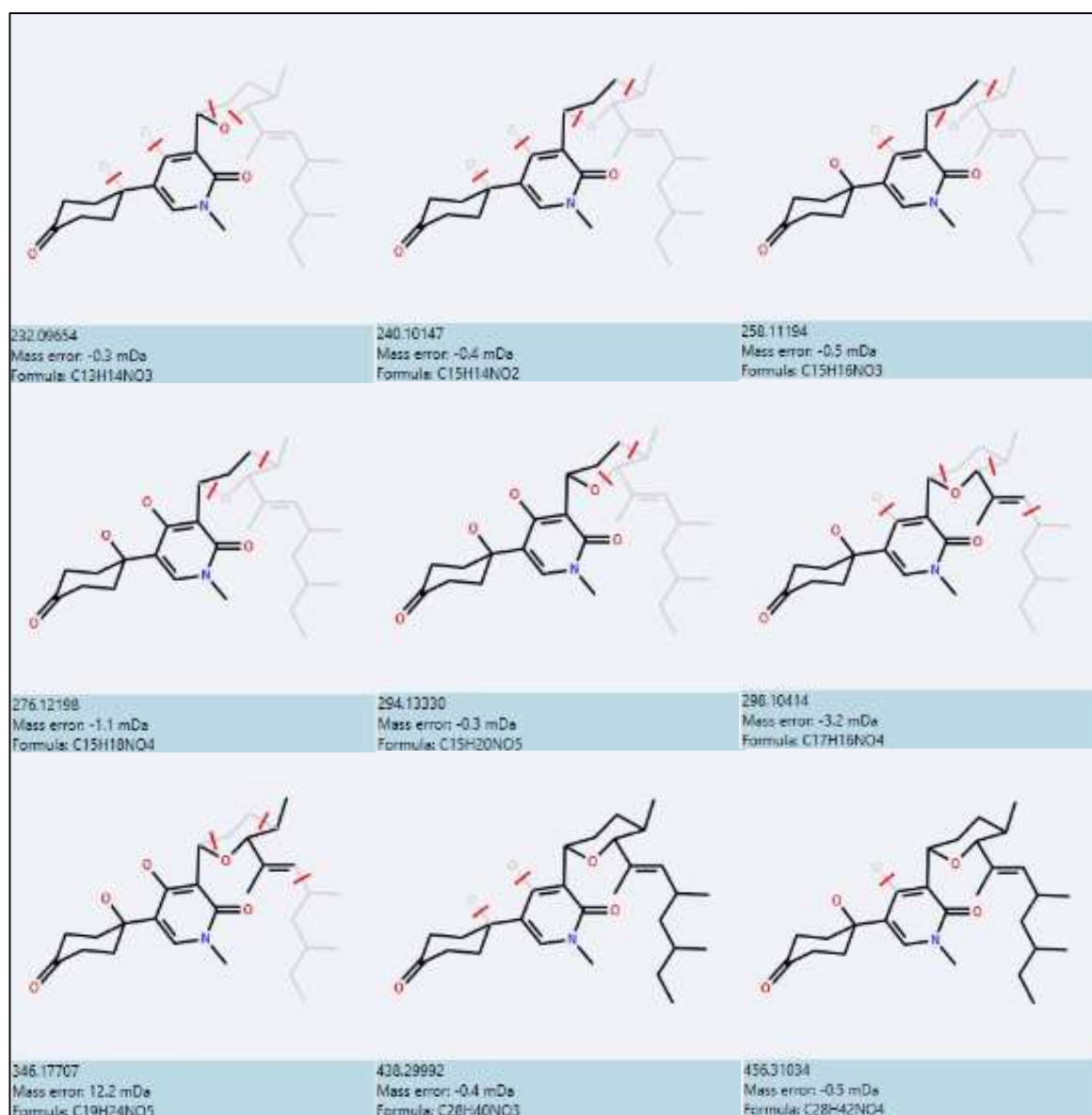
12



13

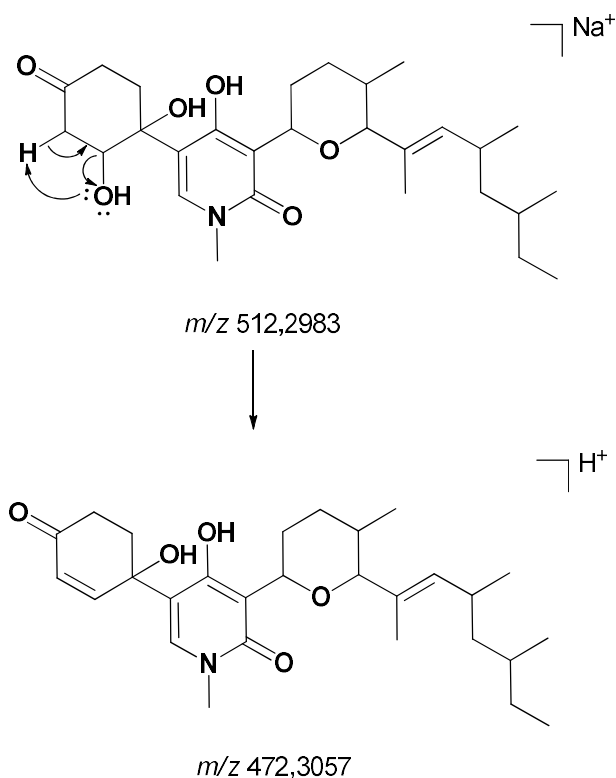


14

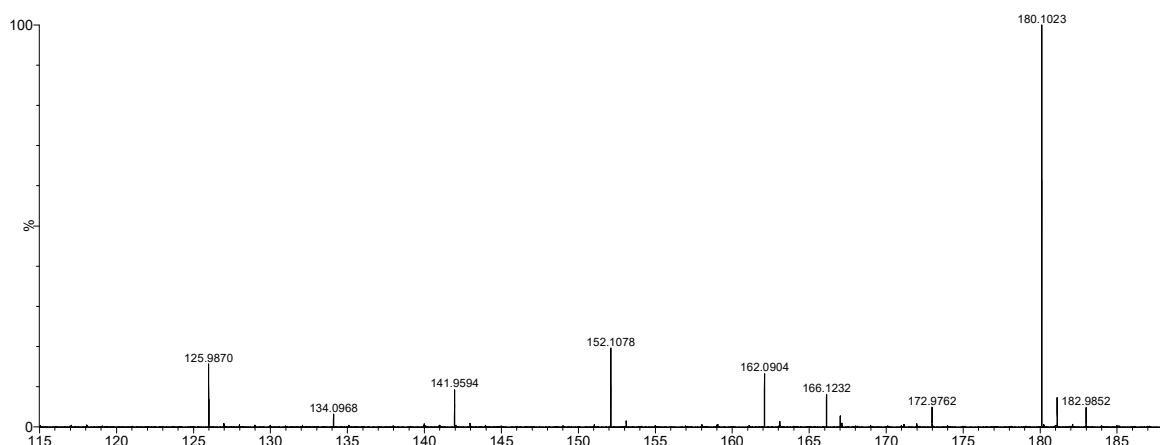
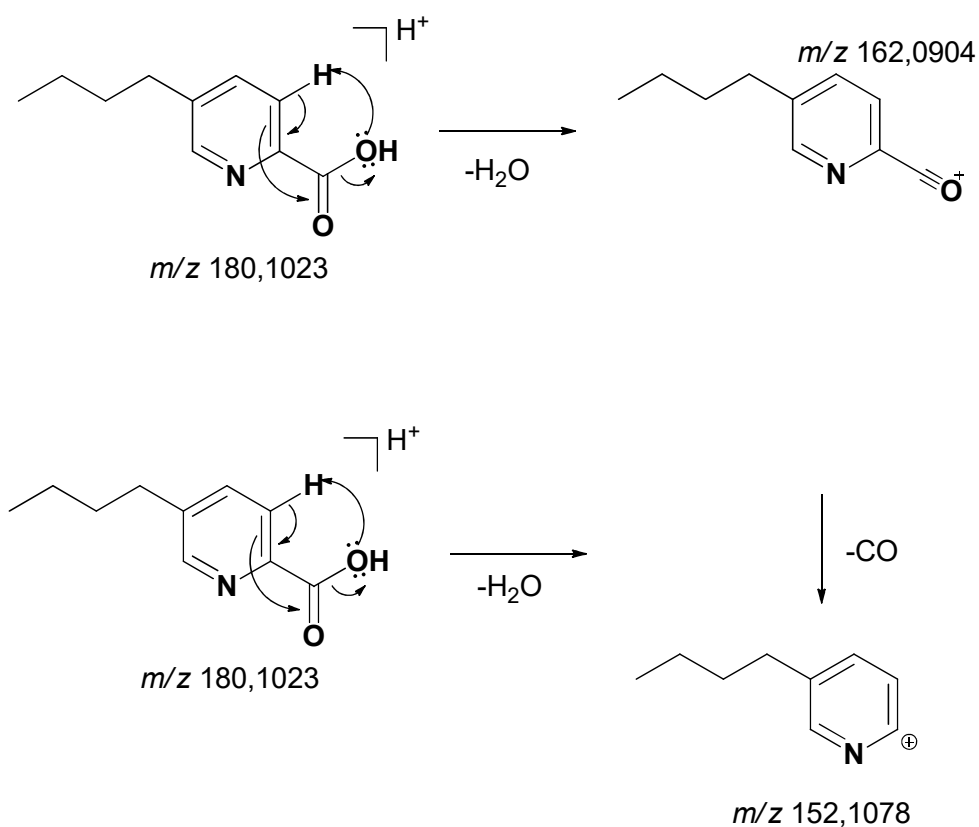


Foi possível observar perdas comuns de água tanto para a substância **11** quanto para a substância **14**, com o mecanismo de fragmentação proposto para a primeira na **Figura 34**.

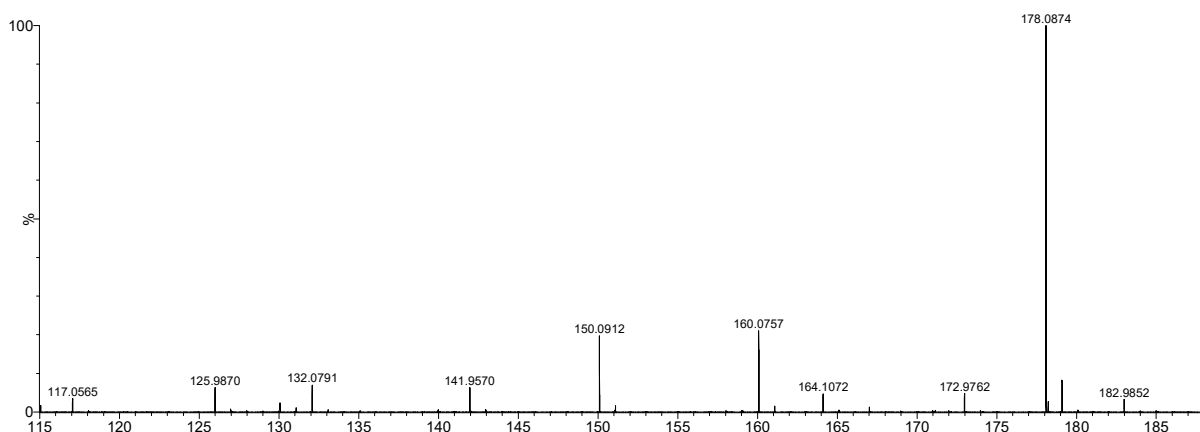
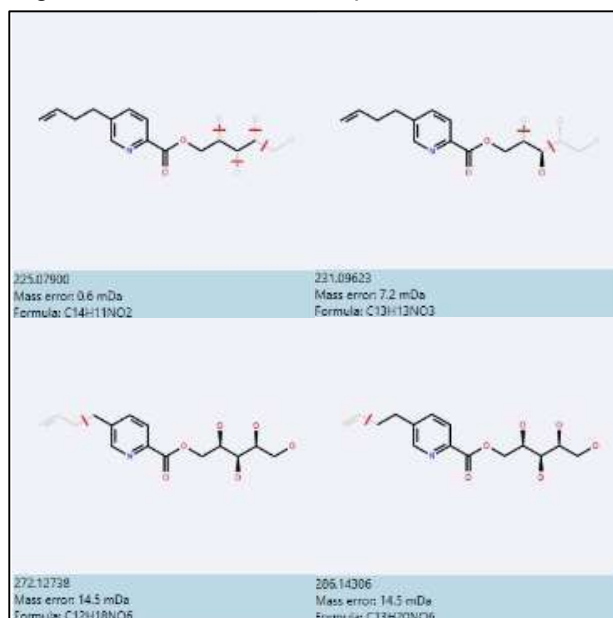
Figura 34: Proposta de fragmentação da substância **11** por ESI



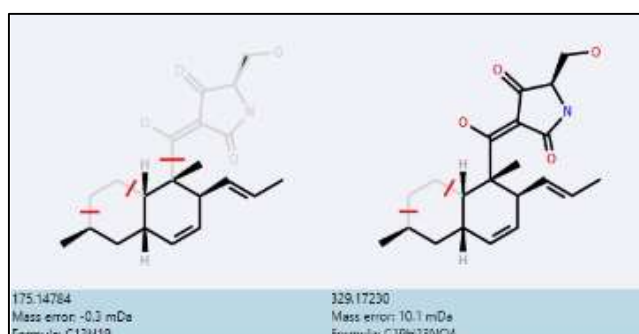
Outro alcaloide anotado foi o ácido fusárico (**15**), com o íon precursor $[M+H]^+$ m/z 180,1018. O UNIFI não sugeriu fragmentos para ele, provavelmente devido à baixa intensidade dos fragmentos gerados para essa substância. O composto (**15**) é uma micotoxina produzida por diversas espécies do gênero *Fusarium* e é tóxica para uma gama de plantas e microrganismos, além de apresentar propriedades farmacológicas (NIEHAUS *et al.*, 2014). Por ser uma substância muito estudada, foi evidenciado que ela apresenta uma perda comum de H_2O e uma perda CO . Sendo assim, extraiu-se o espectro de massas referente a essa anotação (**Figura 35**) onde foi possível propor a fragmentação dessas perdas (**Figura 36**).

Figura 35: Espectro de MS² via UPLC-QTOF/MS^E da substância **15****Figura 36:** Proposta de fragmentação da substância **15** por ESI

Também foram anotados dois derivados do ácido fusárico, o ácido 9,10-desidrofusárico (**16**), com o íon precursor $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 178,0874 e as mesmas perdas de H_2O e CO de acordo com o espectro de MS² (**Figura 37**), e o fusaricato F (**17**) com íon precursor $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ m/z 329,1709, cujos fragmentos propostos pelo UNIFI podem ser vistos na **Figura 38**.

Figura 37: Espectro de MS² via UPLC-QTOF/MS^E da substância **16****Figura 38:** Íons fragmentos da substância **17** por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo via UNIFI

O último alcaloide observado foi a *epi*-tricosetina (**18**), com [M+H]⁺ *m/z* 360,2173 e com fragmentos sugeridos podendo ser vistos na **Figura 39**.

Figura 39: Íons fragmentos da substância **18** por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo via UNIFI

Derivados de naftoquinona (19-27)

Foram anotados nove derivados de naftoquinona (**Figura 40**), onde oito deles só foram produzidos no cultivo no meio de Malte. Os derivados de naftoquinonas estão relacionados com a maioria dos pigmentos vermelhos produzidos por fungos do gênero *Fusarium*, podendo eles serem ou não fitotóxicos (STUDT *et al.*, 2012), sendo por esse motivo que os extratos brutos em meio de Malte apresentaram uma coloração vermelha intensa. A anidrofusarubina (**19**) com íon precursor $[M+H]^+$ m/z 289,0702 tem os seus íons fragmentos sugeridos pelo UNIFI na **Figura 41**, a 9-O-metilanidrofusarubina (**20**) com $[M+Na]^+$ m/z 325,068 e a 8-O-metilbostricoidina (**21**) com $[M+Na]^+$ m/z 300,0863. Todas apresentaram um padrão de fragmentação semelhante (**Apêndice 5 e 6**), com perdas comuns de metoxila e CO. As substâncias **19** e **20** estão presentes apenas no extrato de Malte da linhagem S.S_R9 de *F. oxysporum*.

Figura 40: Estrutura dos derivados de naftoquinona (**19-27**) anotados por UPLC-QTOF/MS^E no modo positivo através do software UNIFI

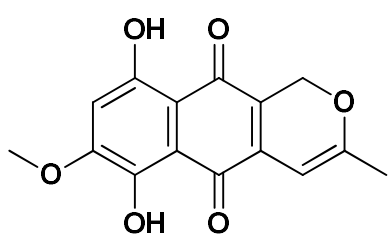
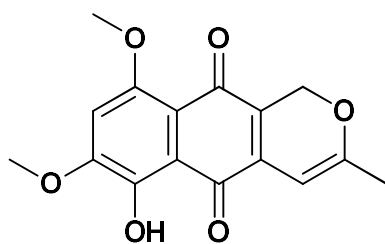
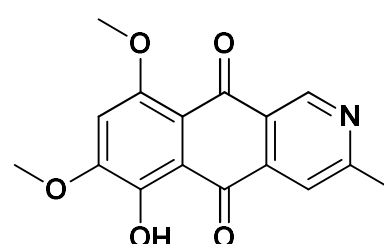
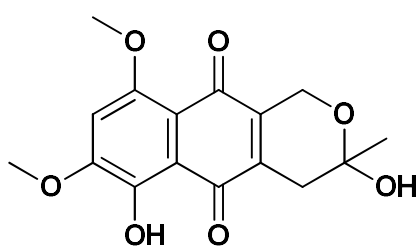
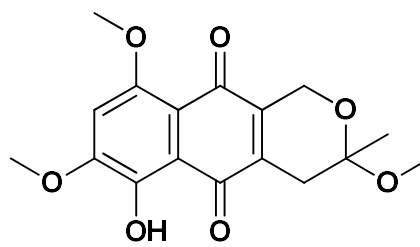
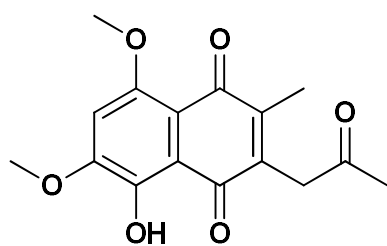
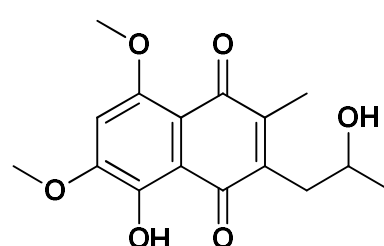
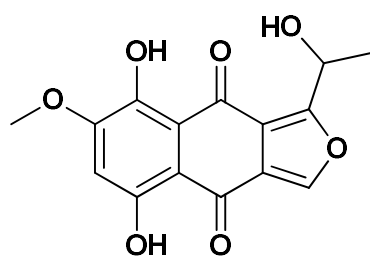
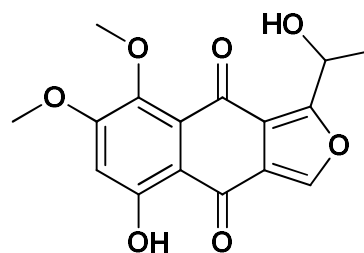
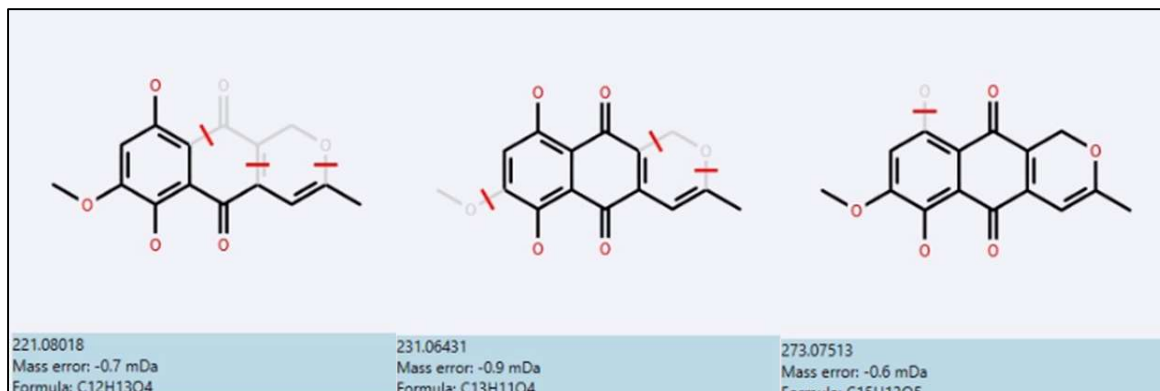
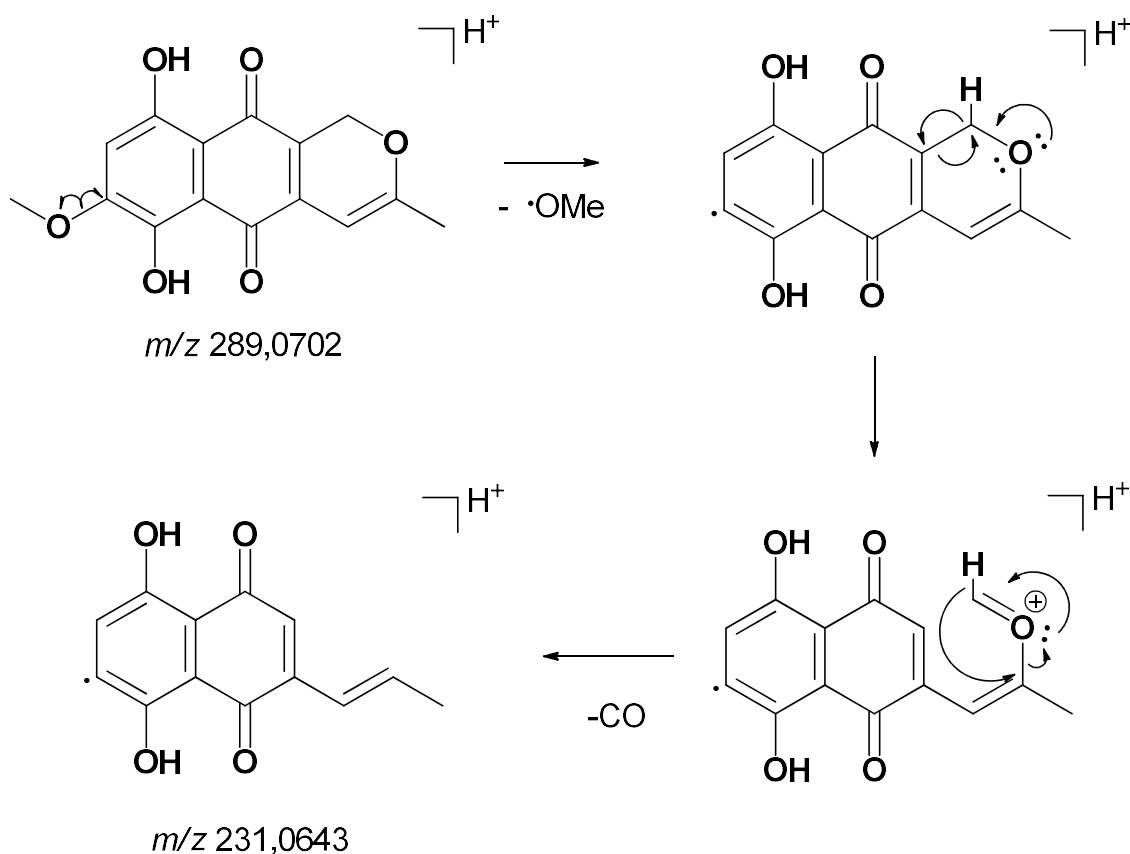
**19****20****21****22****23****24****25****26****27**

Figura 41: Íons fragmentos da substância **19** por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo via UNIFI



A fragmentação proposta para a perda radicalar de metoxila e de CO da substância **19**, resultando no íon fragmento m/z 231,0643 se encontra na **Figura 42**.

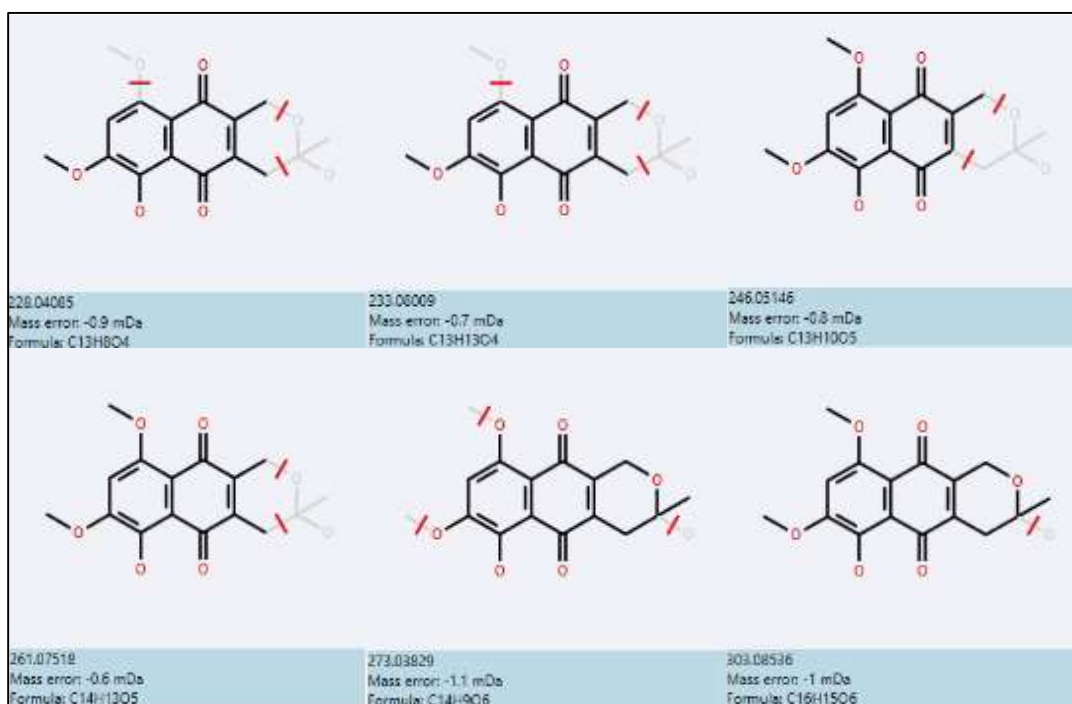
Figura 42: Proposta de fragmentação da substância **19** por ESI



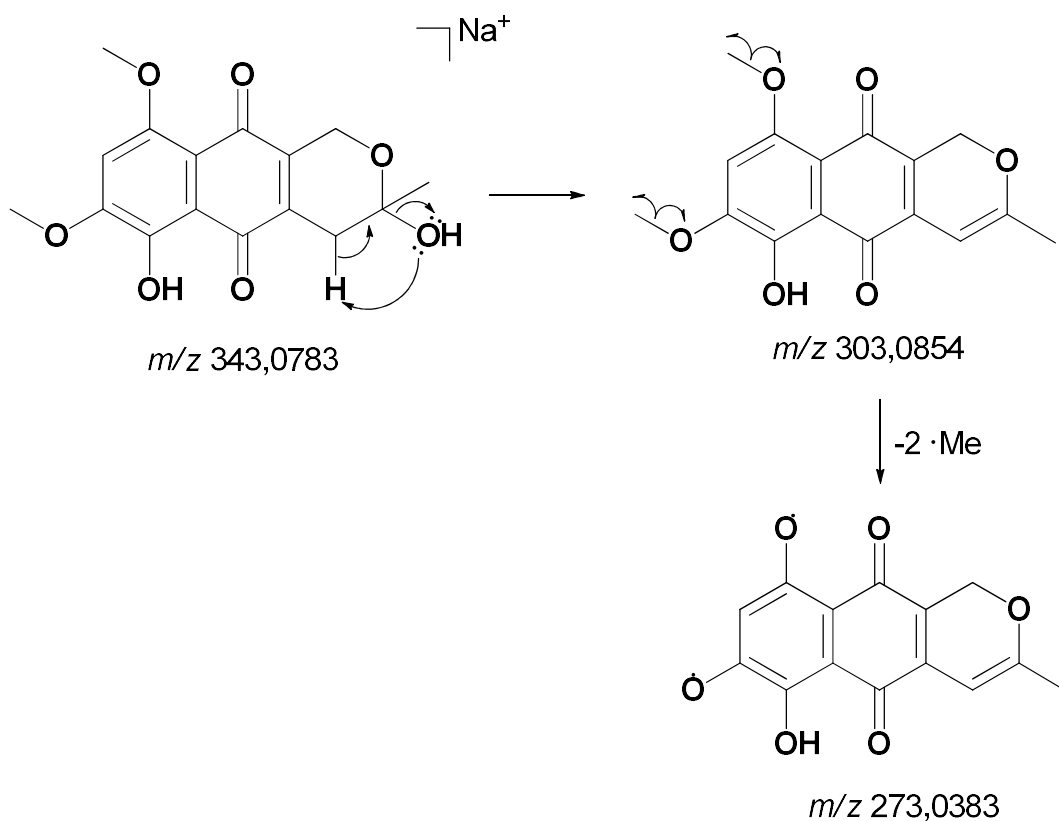
Foram anotadas a 9-O-metilfusarubina (**22**), com o íon precursor $[M+Na]^+$ m/z 343,0783 e íons fragmentos sugeridos pelo UNIFI onde pode-se observar perdas de água e metilas (**Figura 43**), e também a 3-O-metil-9-O-metilfusarubina (**23**), com

$[M+Na]^+$ m/z 357,0937 e com um padrão de fragmentação apresentando as mesmas perdas comuns da substância **22** de modo que os íons fragmentos sugeridos podem ser observados no **Apêndice 7**. Ambas estão presentes no meio de Malte, sendo que das duas, apenas a substância **23** foi observada nos extratos de ambas as linhagens nesse meio. Os compostos **22** e **23** podem ter sido produzidos pelo *F. oxysporum* ou serem derivados da fusarubina, sendo gerados então quando ela entra em contato com o metanol usado para o preparo das amostras utilizadas nas análises cromatográficas.

Figura 43: Íons fragmentos da substância 9-O-metilfusarubina por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo via UNIFI



A fragmentação proposta para a formação de alguns dos íons sugeridos pelo UNIFI da substância **22** a partir da perda de água e perda de radical metila se encontra na **Figura 44**.

Figura 44: Proposta de fragmentação da substância **22** por ESI

Observou-se também a presença da 8-O-metiljavanicina (**24**), com íon precursor $[M+Na]^+$ m/z 327,0836 e com os íons fragmentos sugeridos pelo UNIFI mostrando perdas de metila e água (**Figura 45**), além do 8-O-metilsolaniol (**25**) com $[M+Na]^+$ m/z 357,0937 onde foi possível observar apenas uma sugestão de fragmento (**Figura 46**).

Figura 45: Íons fragmentos da substância **24** por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo via UNIFI

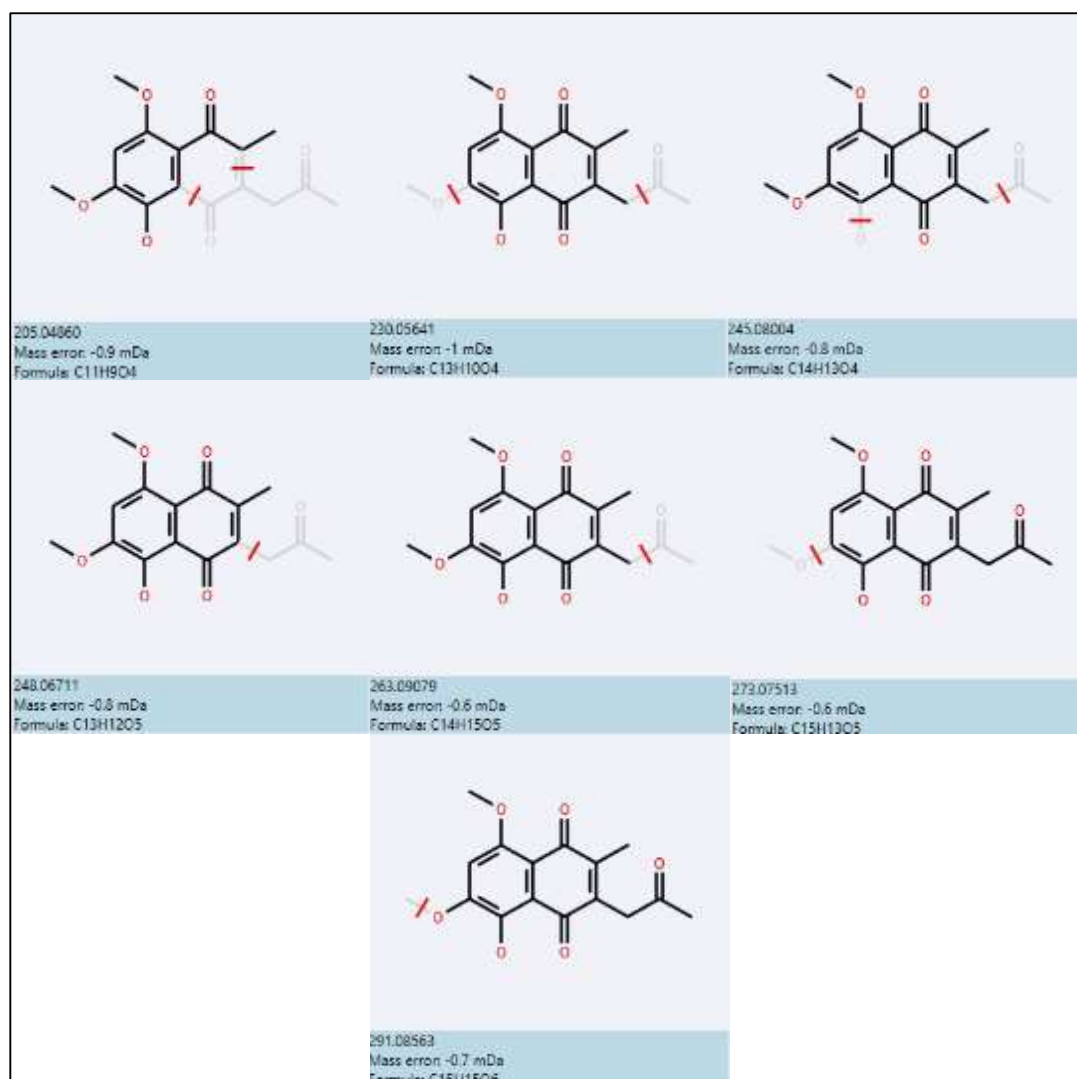
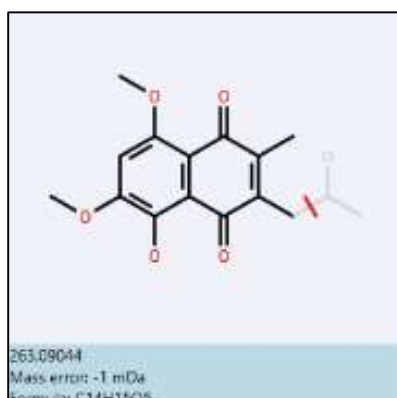


Figura 46: Íon fragmento da substância **25** por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo via UNIFI



Os últimos derivados de naftoquinona anotados foram a nectriafurona (**26**), com íon precursor $[M+Na]^+$ m/z 327,0471, e seu derivado nectriafurona-8-metil éter

(27), com $[M+Na]^+$ m/z 341,0628. Os dois apresentaram perdas de água e de metoxila, cujo mecanismo de fragmentação foi proposto na **Figura 47**. Os demais íons fragmentos sugeridos pelo UNIFI podem ser encontrados na **Figura 48**.

Figura 47: Proposta de fragmentação da substância **26** por ESI

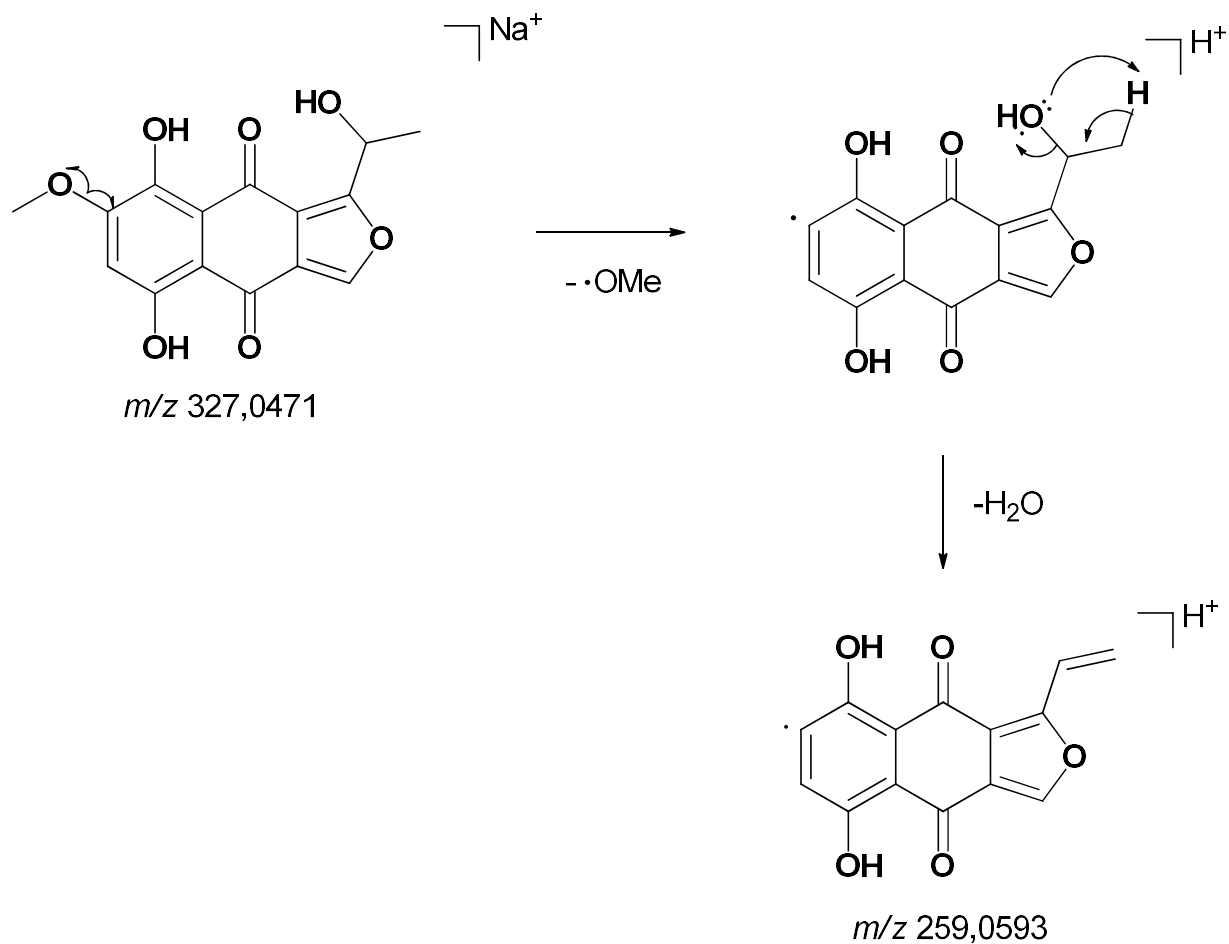
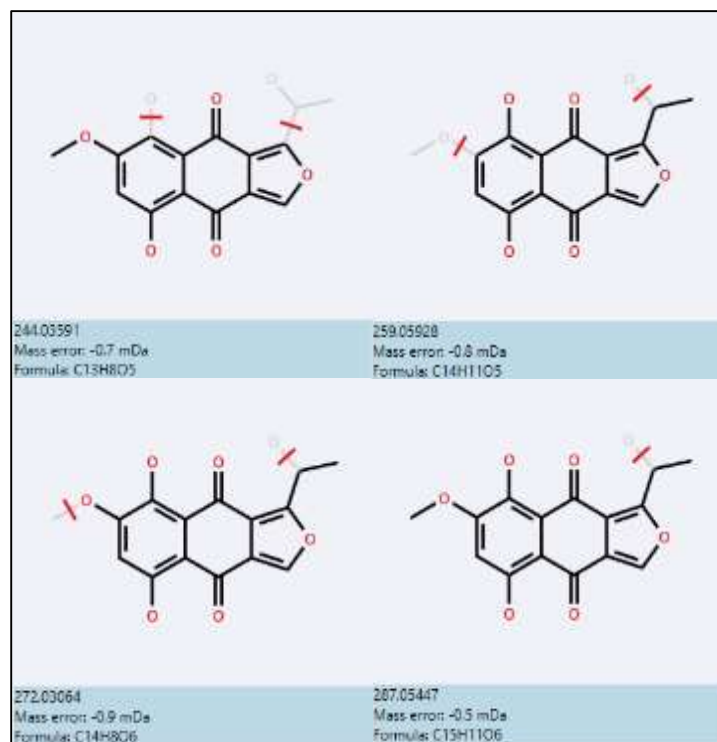
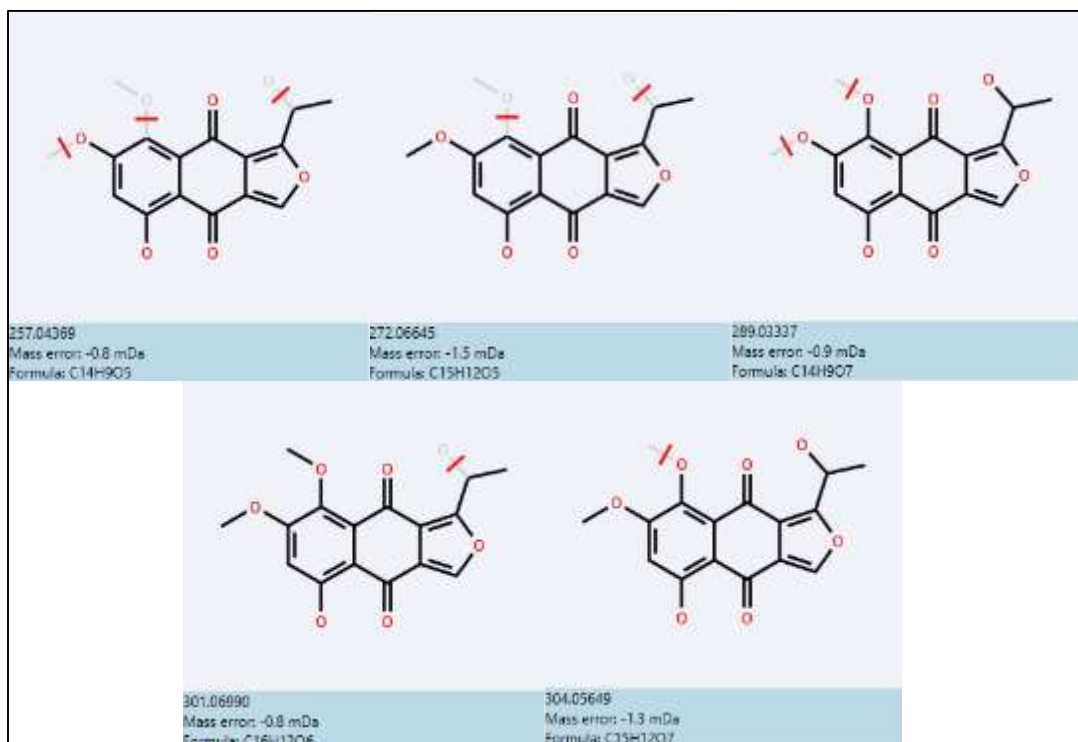


Figura 48: Íons fragmentos das substâncias **26** e **27** por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo via UNIFI

26



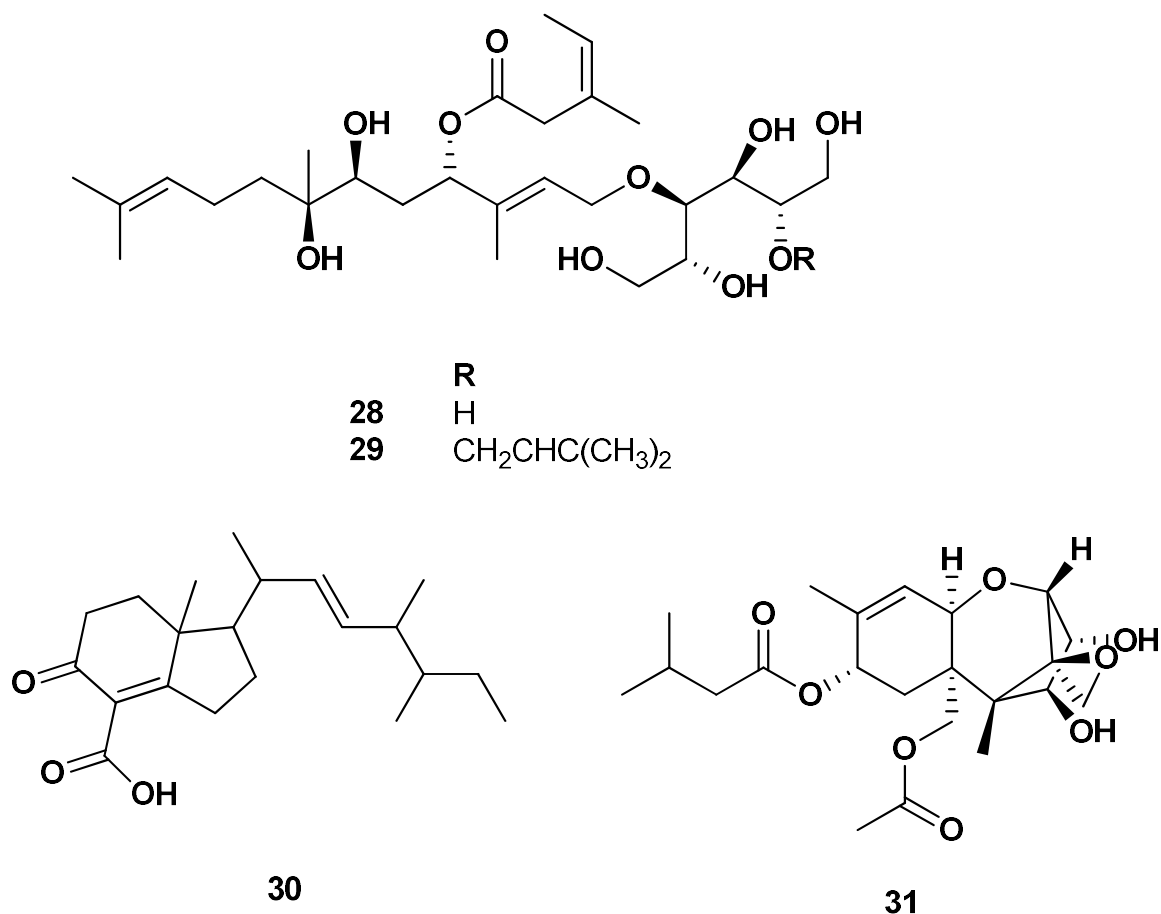
27



Terpenoides (28-31)

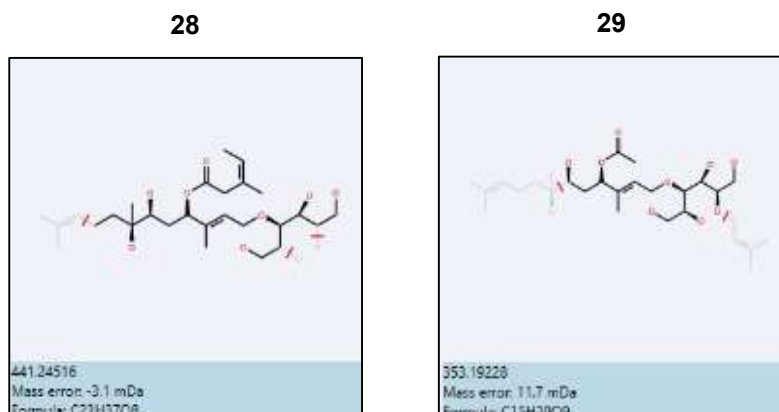
Observou-se a presença de quatro terpenoides sendo eles as cosmosporasidas G (28) e H (29), a fusariumina C (30) e a toxina HT-2 (31) (Figura 49).

Figura 49: Estrutura dos terpenoides (28-31) anotados por UPLC-QTOF/MS^E no modo positivo através do software UNIFI



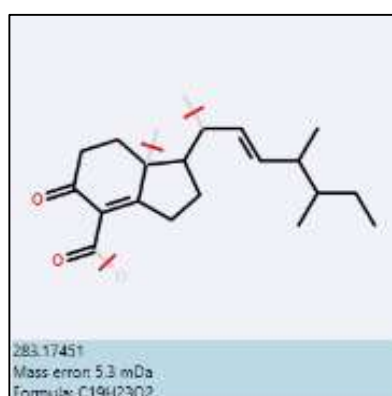
As cosmosporasidas são sesquiterpenos acíclicos conjugados produzidos por *Fusarium oxysporum* e foram anotadas com o íon precursor [M+Na]⁺ *m/z* 555,3135 para a substância 28 e *m/z* 569,3294 para a substância 29. Elas apresentaram um único íon fragmento sugerido pelo UNIFI (Figura 50), onde é possível observar uma perda comum de água para 28 e perdas de cadeias alifáticas para ambas. O composto 28 foi produzido apenas no meio de PDB da linhagem S.S_R3 de *F. oxysporum* e o 29 só não foi produzido em malte pela linhagem S.S_R3.

Figura 50: Íons fragmentos das substâncias **28** e **29** por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo via UNIFI



A fusariumina C (**30**), um meroterpeno produzido por *F. oxysporum* que apresenta atividade bactericida contra *S. aureus* (CHEN *et al.*, 2019), foi anotada com o íon precursor $[M+Na]^+$ m/z 355,2239. A substância **30** teve um íon fragmento sugerido pelo UNIFI (**Figura 51**) onde há a perda de água e etila para a formação dele. Observou-se que a substância **30** foi produzida apenas quando ambas as linhagens estudadas foram cultivadas no meio de malte.

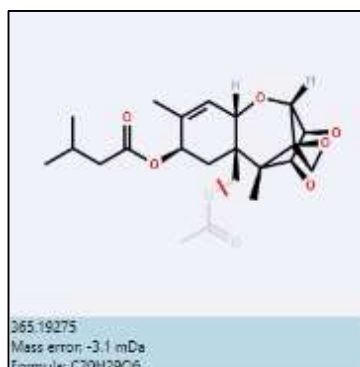
Figura 51: Íon fragmento da substância **30** por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo via UNIFI



O quarto terpenoide anotado foi a toxina HT-2 (**31**), que consiste na forma desacetilada da toxina T-2, ambas com um sistema de anel tetracíclico. Essa substância é produzida por mais de uma espécie do gênero *Fusarium* e é responsável por inibir a síntese proteica em plantas, além de causar intoxicação em animais e humanos dependendo da quantidade ingerida (NATHANAIL *et al.*, 2015). Foi anotada com o íon precursor $[M+H]^+$ m/z 425,2149 e foi observada somente nos

extratos brutos obtidos no meio de Czapek para ambas as linhagens, com um íon fragmento sugerido mostrando a perda de um grupo acetato. (**Figura 52**)

Figura 52: Íon fragmento da substância **31** por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo via UNIFI



Derivados de jasmonatos (**32** e **33**)

Dois derivados de jasmonatos foram anotados, um deles o (1S,2S)-3-oxo-2-pentilciclopentano-1-ácido octanóico (**32**) foi observado somente no extrato bruto da linhagem S.S_R9 no meio de PDB enquanto que a *N*-(9,10-dihidro-7-iso-jasmonoil)-(S)-isoleucina (**33**) foi produzida por ambas as linhagens somente no meio de Malte (**Figura 53**). Os íons fragmentos de ambos os compostos sugeridos pelo UNIFI se encontram na **Figura 54**.

Figura 53: Estrutura dos derivados de jasmonato (**32** e **33**) anotados por UPLC-QTOF/MS^E no modo positivo através do software UNIFI

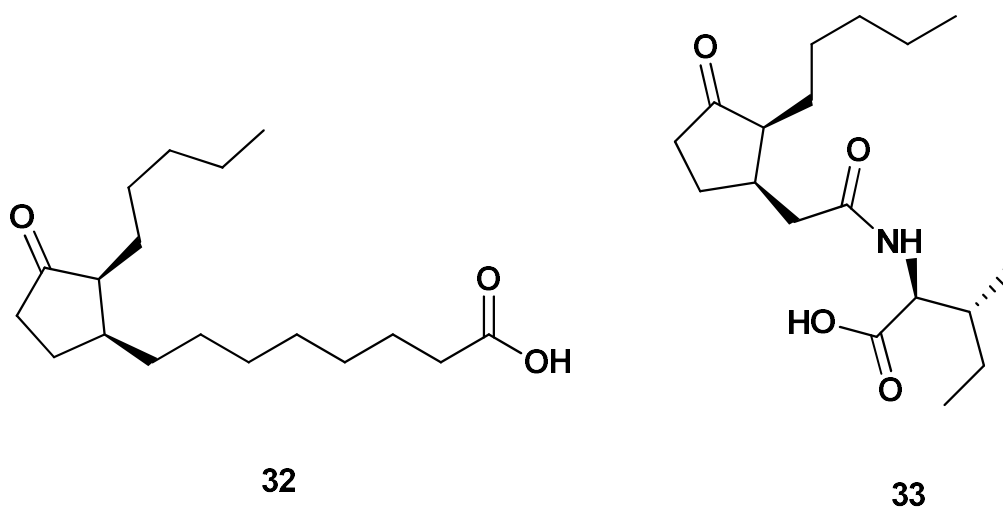
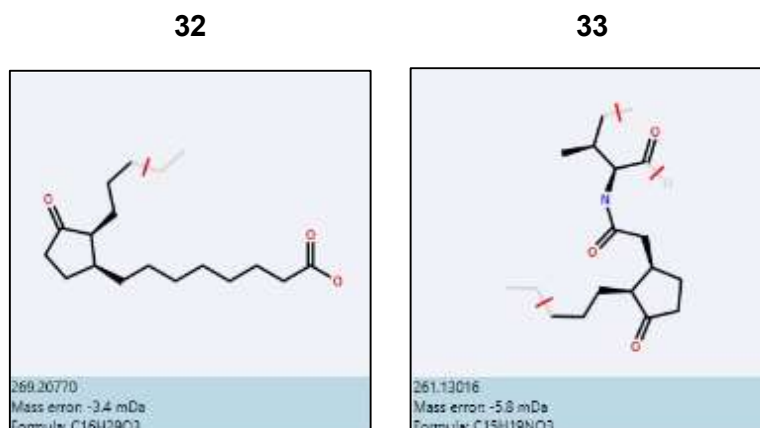


Figura 54: Íons fragmentos das substâncias **32** e **33** por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo via UNIFI



Antraquinonas (**34** e **35**)

Por fim foram anotadas duas antraquinonas nos extratos de malte, sendo elas a 1,4-naftalenodiona-3,8-dihidroxi-5,7-dimetoxi-2-(2-oxopropil) (**34**) e a 2-acetil-3,8-dihidroxi-6-metoxi-antraquinona (**35**) (**Figura 55**). As antraquinonas e seus derivados são metabólitos de interesse uma vez que diversos deles são conhecidos por apresentarem atividade antibiótica (MASI; EVIDENTE, 2020). Os íons fragmentos sugeridos pelo UNIFI para os compostos **34** e **35** se encontram na **Figura 56**.

Figura 55: Estrutura das antraquinonas (**34** e **35**) anotadas por UPLC-QTOF/MS^E no modo positivo através do software UNIFI

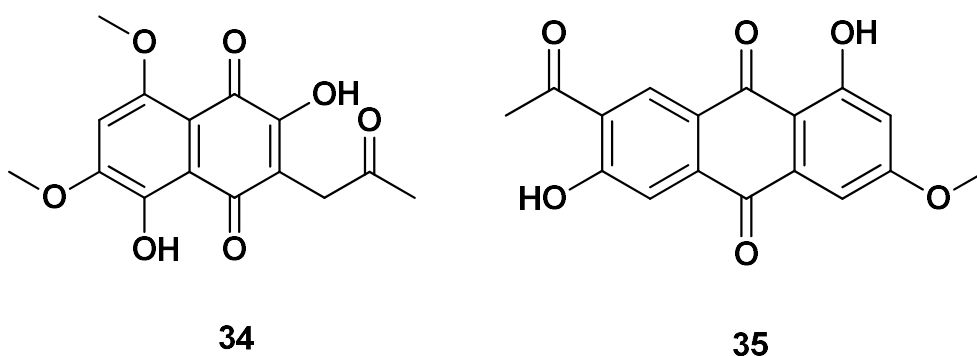
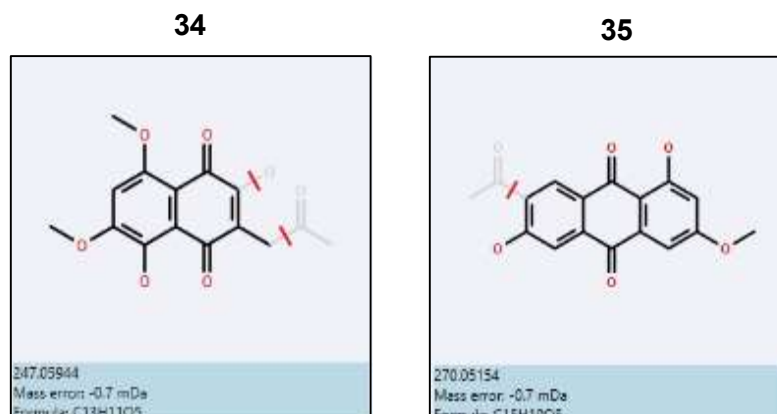


Figura 56: Íons fragmentos das substâncias **34** e **35** por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo via UNIFI



4.4 Planejamento Fatorial Completo 2²

Levando em consideração tanto o número de picos dos cromatogramas como a separação das substâncias por HPLC-DAD, além do aspecto espectral e dos resultados de atividade antibacteriana, o meio de PDB foi escolhido para prosseguir com o trabalho. Uma vez que se obteve a identificação das linhagens fúngicas como sendo ambas *Fusarium oxysporum* passou-se a trabalhar apenas com a linhagem S.S_R9, que foi a cujo extrato no meio de PDB apresentou atividade antibacteriana.

Foi realizado um planejamento fatorial completo 2² buscando otimizar o rendimento em termos de massa do extrato bruto nesse meio (**Tabela 10**). Utiliza-se esse tipo de estratégia experimental quando se busca identificar, num conjunto de variáveis, aquelas que são mais significativas sobre as respostas desejadas, no caso a massa do extrato.

Tabela 8: Respostas obtidas para cada um dos ensaios do planejamento fatorial completo 2²

Ensaio	Massa (mg)
1	7,40
2	11,7
3	7,00
4	11,4
5	8,00
6	6,30
7	10,3
8	8,10

9	22,5
10	8,60
11	11,1
12	7,50

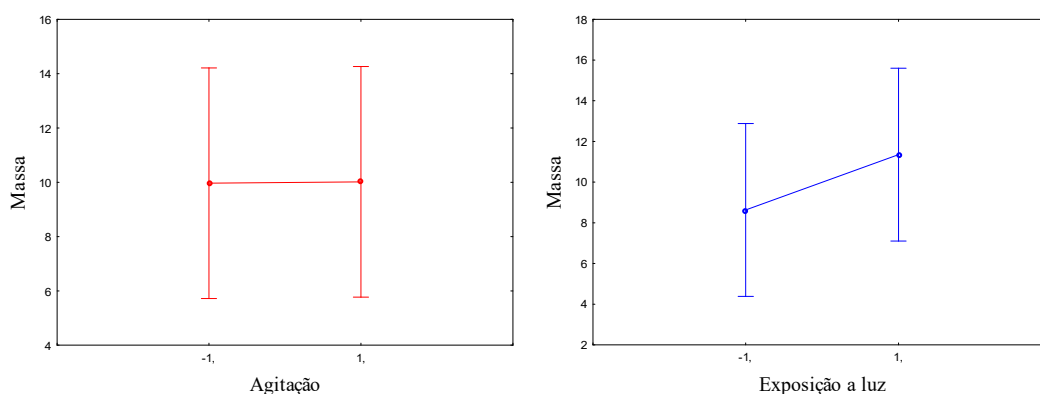
Para poder visualizar como essas variáveis afetaram a massa do extrato, calculou-se o efeito de cada uma das variáveis e o efeito da interação entre as duas variáveis utilizando o software TIBCO® Statistica 10 (**Tabela 11**).

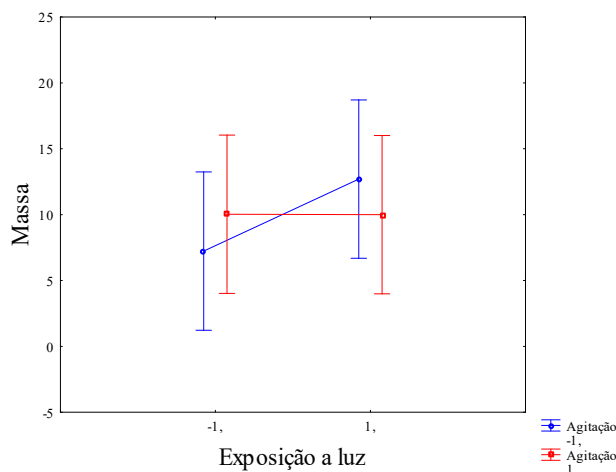
Tabela 9: Efeitos calculados das variáveis estudadas para a massa do extrato bruto

Fatores	Efeitos (mg)
Exposição a luz	2,72
Agitação	0,0500
Exposição a luz + agitação	-2,75

É possível observar que a agitação praticamente não alterou a resposta desejada ao passar do nível -1 (sem agitação) para o nível +1 (agitação de 50 rpm) e que a exposição a luz e a interação da exposição a luz e agitação foram as variáveis que tiveram um maior efeito na resposta. A massa do extrato bruto obtido na presença de luz (nível +1) foi 2,72mg maior que na ausência de luz (nível -1) e a interação entre as duas variáveis teve um efeito negativo levando a uma diminuição de 2,75mg na massa do extrato obtido quando em presença de luz e agitação ao mesmo tempo (**Figura 57**).

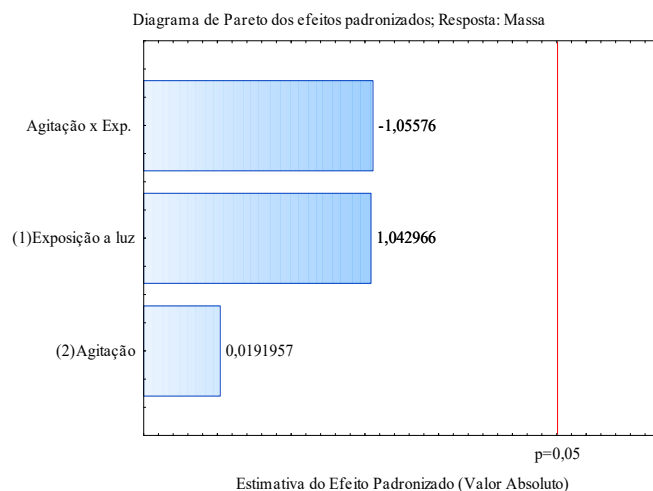
Figura 57: Gráfico das médias marginais para a resposta massa do extrato bruto





Obteve-se também o diagrama de Pareto (**Figura 58**) a partir do software TIBCO® Statistica 10, que nos mostra quais efeitos são estatisticamente significativos. Para isso é necessário que o efeito se estenda além da linha de referência. No caso das variáveis estudadas não foi possível observar isso, o que mostra que os efeitos não são estatisticamente significativos para a massa obtida de extrato bruto.

Figura 58: Diagrama de Pareto para os efeitos sobre a massa do extrato bruto



Os extratos foram submetidos a análises por LC-ESI(+)-IT-MS, sendo possível observar o perfil químico dos mesmos na **Figura 59**. De modo a se comparar estatisticamente a diferença na produção metabólica do fungo nas diferentes condições do planejamento, realizou-se a Análise de Componentes Principais (PCA) na plataforma MetaboAnalyst 5.0. Fez-se o mesmo a partir dos

dados pré-processados levando em consideração a intensidade dos picos, o que resultou no gráfico de scores da **Figura 60**.

Figura 59: Perfil metabólico BPC em modo positivo os ensaios únicos P1SSR9 a P4SSR9 de *F. oxysporum* nas diferentes condições do planejamento fatorial em LC-ESI-(+)-IT-MS

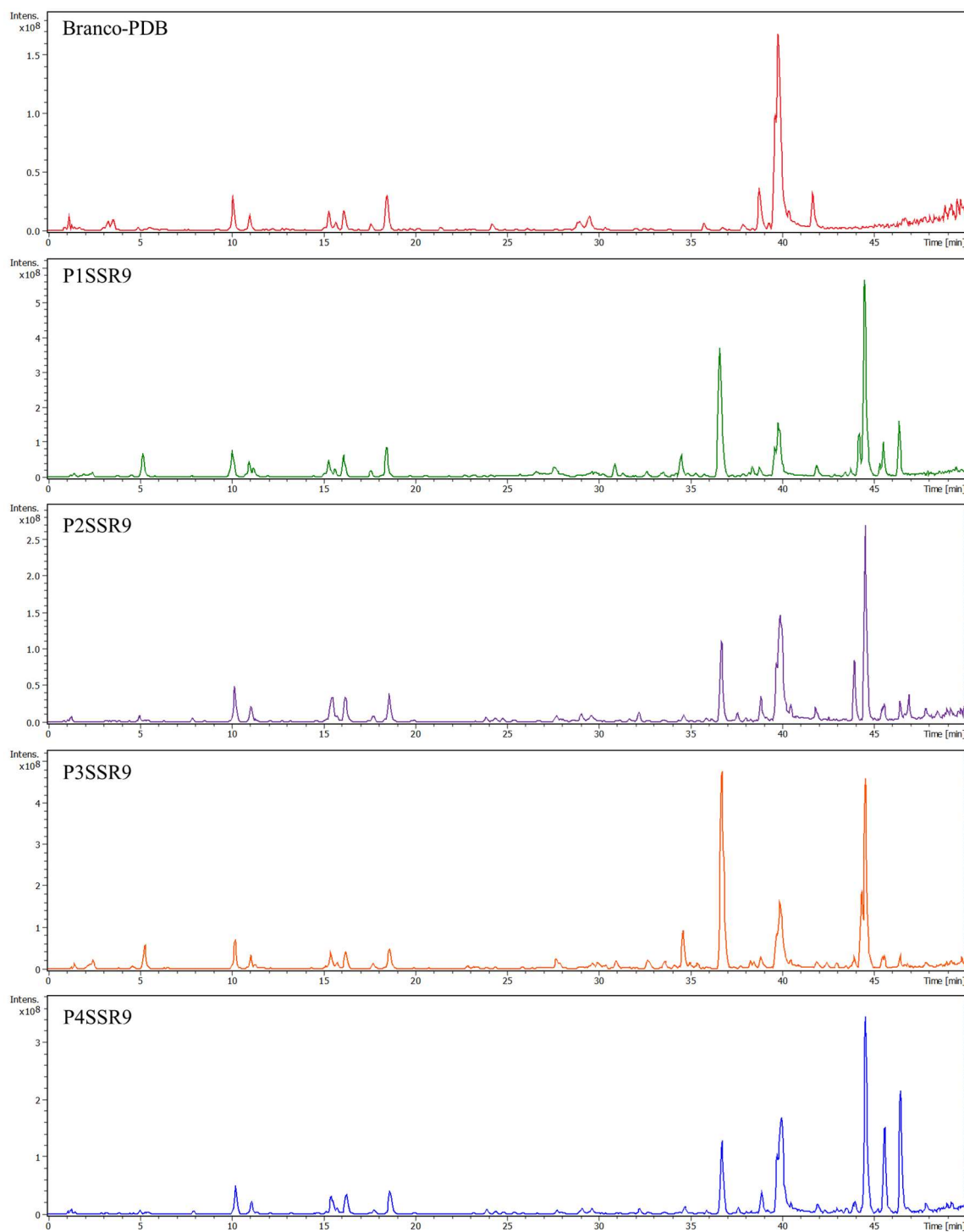
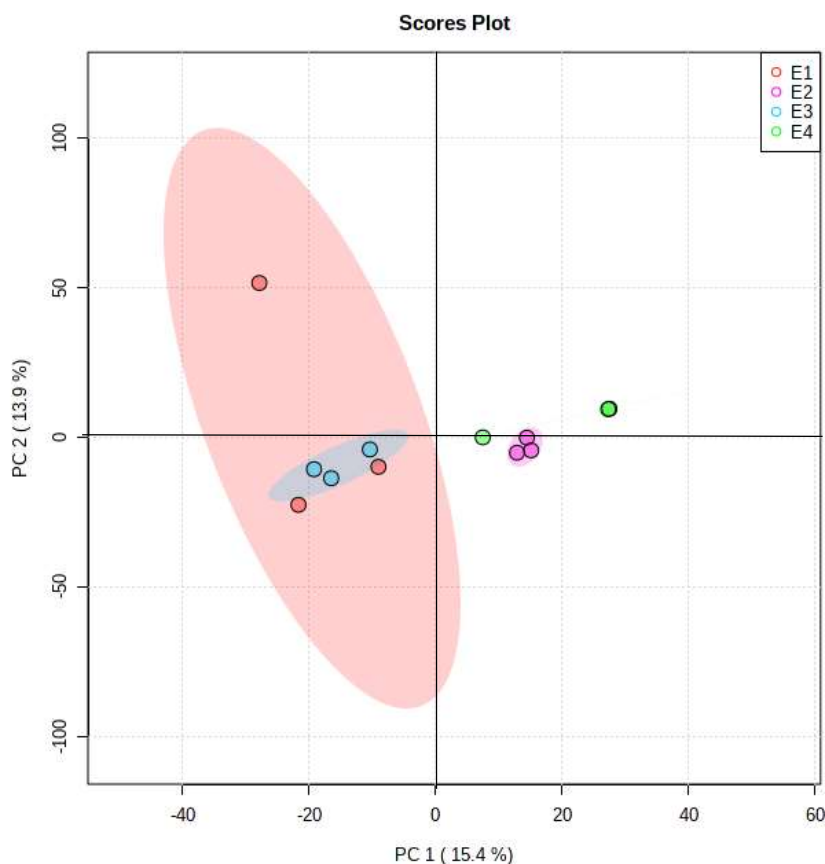


Figura 60: Análise de Componentes Principais (PC1xPC2) para as 4 condições de cultivo do fungo *F. oxysporum*



Com relação aos dados de PC1 (15,4%) e PC2 (13,9%) foram observados quatro agrupamentos, sendo eles o E1 (em vermelho) referente aos ensaios em ausência de luz e de agitação, o E2 (em rosa) referente aos ensaios em ausência luz e com agitação, o E3 (em azul) referente aos ensaios em presença de luz e sem agitação e o E4 (em verde) referente aos ensaios em presença de luz. Entre esses agrupamentos observou-se uma baixa variação entre as triplicatas das amostras em relação aos metabólitos produzidos, exceto para uma das triplicadas do agrupamento E1. Notou-se que os experimentos nos quais não há presença de agitação e somente varia-se a exposição a luz (E1 e E3) estão agrupados no mesmo quadrante. Já quando há agitação e somente varia-se a exposição a luz (E2 e E4) os agrupamentos se encontram próximos entre si na divisão entre dois quadrantes. Isso evidencia que a variável exposição a luz não teve um efeito significativo na diversidade química dos extratos, porém observa-se uma separação, mesmo que pequena, entre os experimentos com e sem agitação. Isso indica uma possibilidade para a otimização desse planejamento com valores maiores de rpm de agitação para

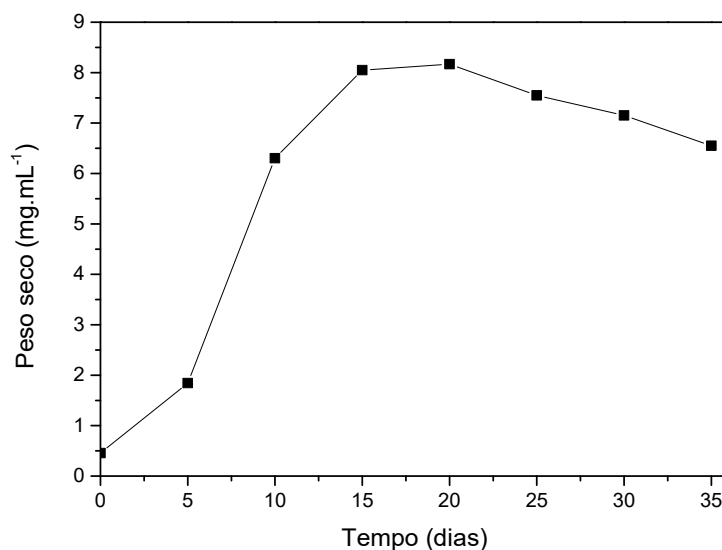
a resposta diversidade metabólica dos extratos brutos, por mais que a variável agitação não tenha tido efeito na massa obtida de extrato bruto.

4.5 Curva de crescimento

O fungo *F. oxysporum* foi cultivado pelo período de 35 dias no meio de PDB e os resultados obtidos do peso seco do micélio a cada cinco dias se encontram na **Tabela 12**. Plotou-se então a curva de crescimento a partir desses dados (**Figura 61**) onde foi observada uma fase de crescimento exponencial até o 15° dia, uma fase estacionária do 15° ao 20° dia e uma fase de destruição a partir do 20° dia.

Tabela 10: Média das massas das triplicatas e peso seco dos micélios de *F. oxysporum* a cada cinco dias

Dias	Média massa micélio (mg)	Peso seco (mg.mL⁻¹)
0	91,37	0,46
5	369,00	1,85
10	1260,33	6,30
15	1610,00	8,05
20	1633,33	8,17
25	1510,00	7,55
30	1430,00	7,15
35	1310,00	6,55

Figura 61: Curva de crescimento de *Fusarium oxysporum* no meio de PDB em 35 dias

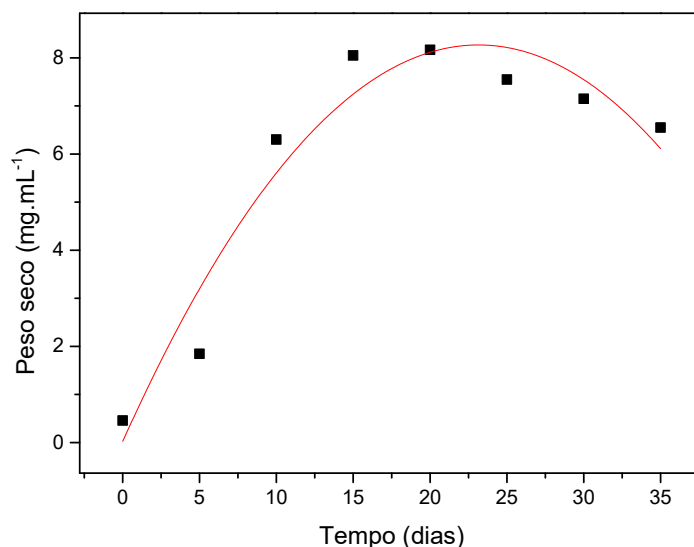
Buscou-se então ajustar os resultados a um modelo de regressão através do software OriginPro® 9, onde obteve-se as equações polinomiais de segunda e terceira ordem assim como os respectivos valores de R^2 ajustado (**Tabela 13**).

Tabela 11: Equações de regressão, valores de R^2 ajustado e valores de AIC dos modelos correspondentes à produção micelial

Equações	R^2	AIC
	ajustado	
$y = -0,01538x^2 + 0,7122x + 0,02401$	0,90866	15,68725
$y = 1,42199.10^{-4}x^3 - 0,02285x^2 + 0,80996x - 0,16263$	0,89125	33,96448

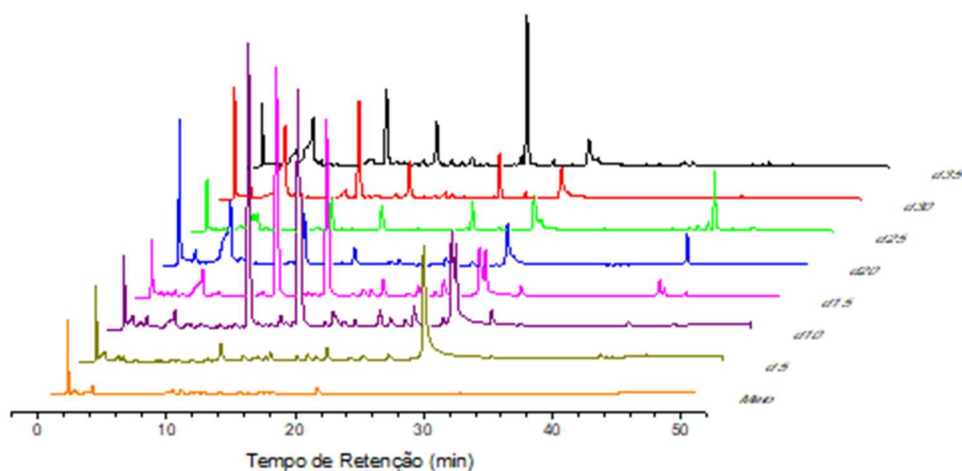
Os valores de R^2 variaram muito pouco de um modelo para o outro, de modo que para determinar qual modelo melhor descreve os dados experimentais utilizou-se o Critério de Informação de Akaike (AIC), onde o modelo que apresenta o menor valor de AIC é considerado o de melhor ajuste. Sendo assim, o modelo que melhor descreve o crescimento micelial de *F. oxysporum* no meio de PDB é uma curva de segundo grau (**Figura 62**).

Figura 62: Ajuste polinomial de segunda ordem da curva de crescimento de *F. oxysporum* no meio de PDB em 35 dias



Foram obtidos os respectivos extratos brutos a cada cinco dias e eles foram submetidos a análise em gradiente exploratório por HPLC-DAD, visando obter o perfil químico dos mesmos (**Figura 63**). É possível observar o início da fase de destruição a partir do 20º dia, quando o fungo começa a consumir algumas das substâncias previamente produzidas.

Figura 63: Perfis cromatográficos dos extratos obtidos a cada 5 dias

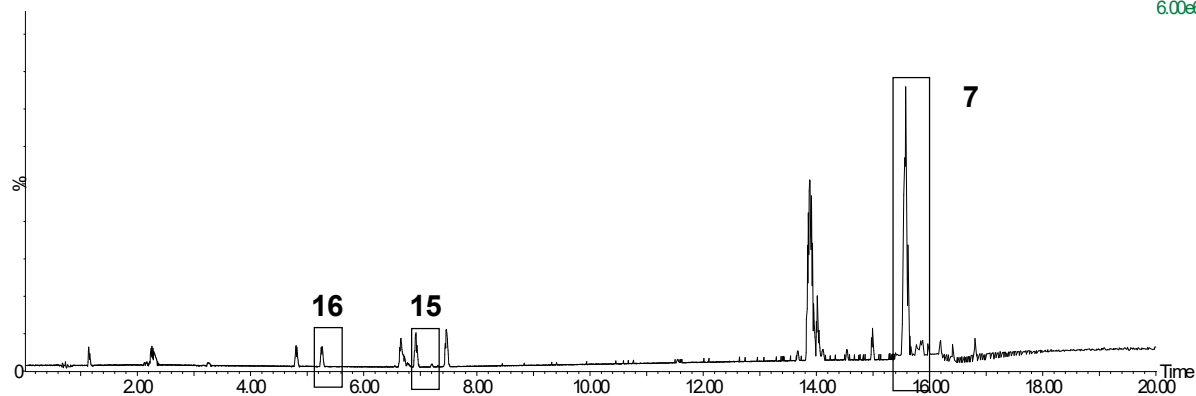


Para observar como varia a produção de determinadas micotoxinas pelo *F. oxysporum* durante esses 35 dias, a triplicata mais representativa de cada um dos extratos brutos foi submetida a análises por UPLC-ESI-QTOF-MS de modo a se comparar a presença das micotoxinas beauvericina (**7**), ácido fusárico (**15**) e ácido 9,10-desidrofusárico (**16**) nos extratos obtidos (**Figura 64**).

Figura 64: Perfil químico por UPLC-ESI-QTOF-MS dos extratos brutos em diferentes períodos de cultivo para o meio de PDB

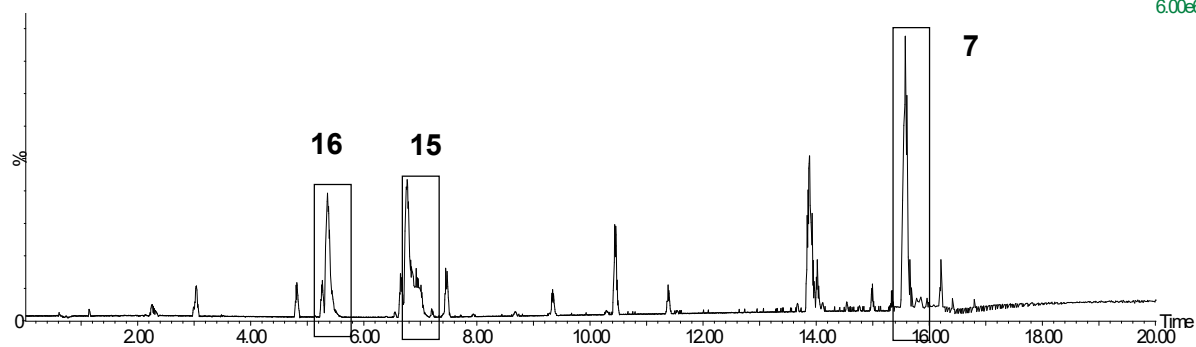
d5-PDB

1: TOF MS ES+
BPI
6.00e6



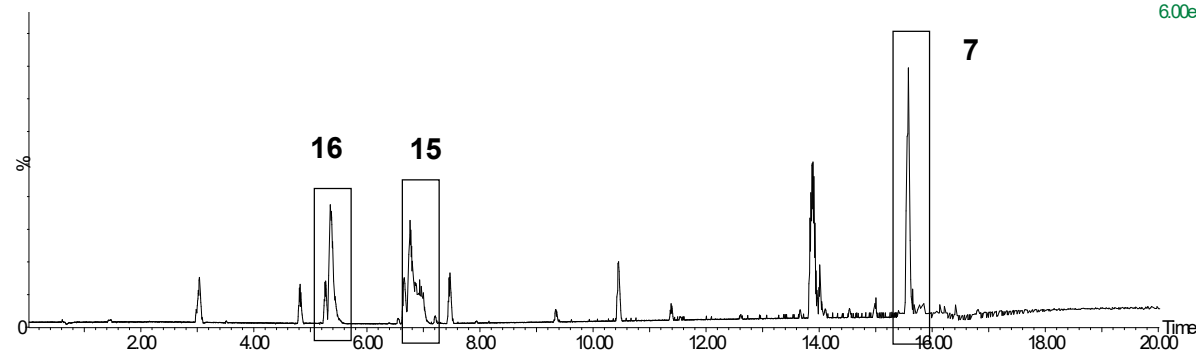
d10-PDB

1: TOF MS ES+
BPI
6.00e6



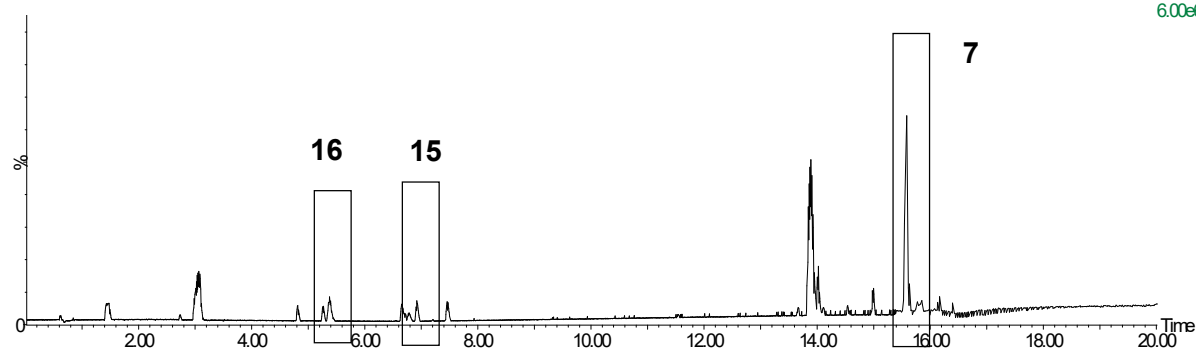
d15-PDB

1: TOF MS ES+
BPI
6.00e6



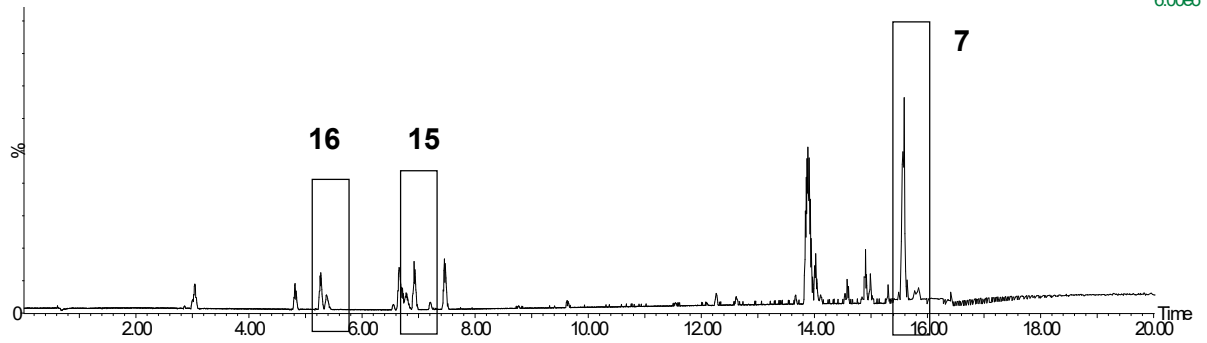
d20-PDB

1: TOF MS ES+
BPI
6.00e6



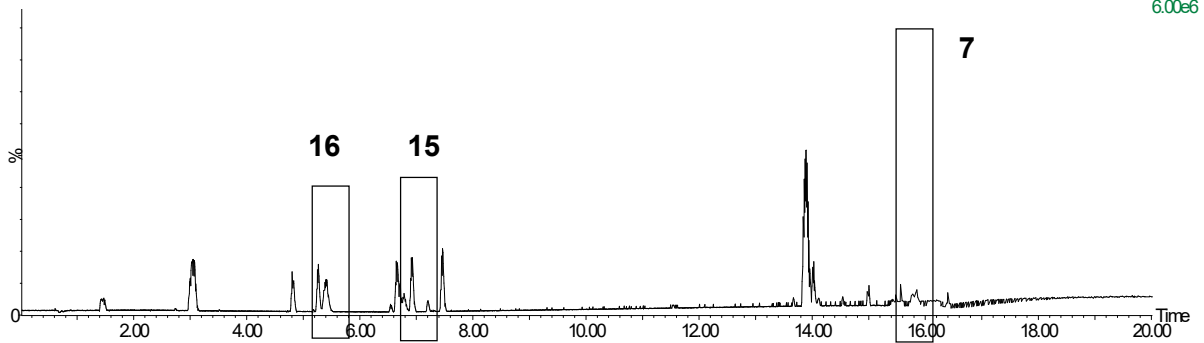
d25-PDB

1: TOF MS ES+
BPI
6.00e6



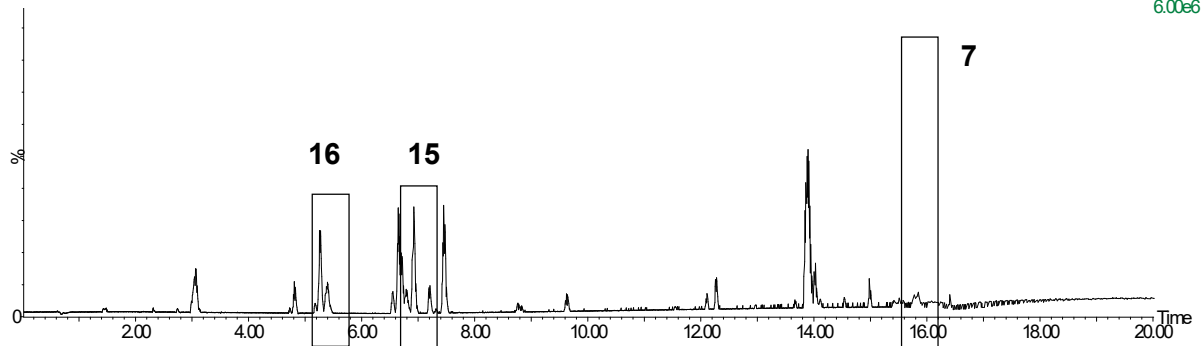
d30-PDB

1: TOF MS ES+
BPI
6.00e6



d35-PDB

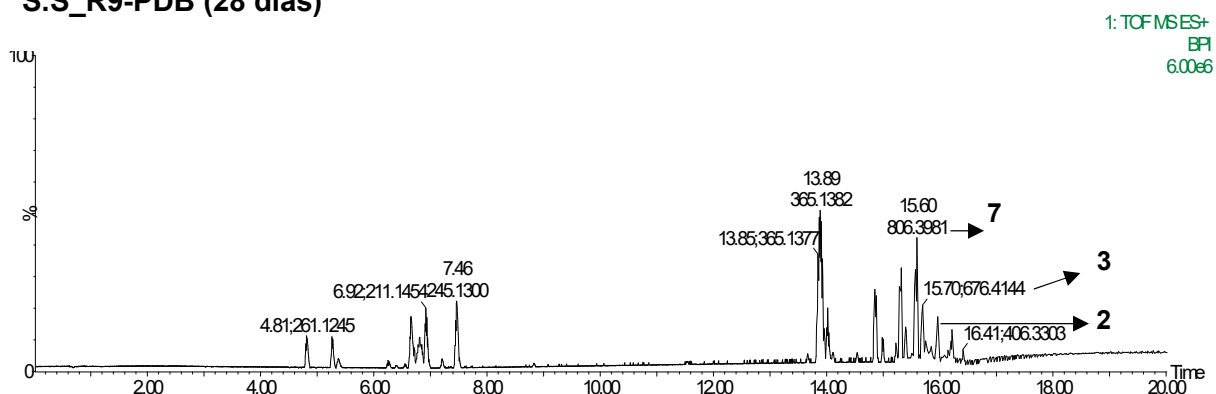
1: TOF MS ES+
BPI
6.00e6



O composto **7** foi observado logo no 5° dia com um pico bem intenso, sendo que a produção dessa micotoxina aumentou ligeiramente até o dia 20° dia, quando o fungo atinge a fase de destruição e ela começa a ser consumida até não ser mais observada no 35° dia. Ao comparar com o extrato bruto obtido em 28 dias (**Figura 65**) nota-se que ela começa a ser consumida/degradada pelo fungo quando ele começa a produzir as enniatinas B1 (**2**) e MK (**3**), podendo essas serem produtos de degradação **7** uma vez que elas apresentam o mesmo anel peptídico com diferentes substituintes de aminoácidos.

Figura 65: Perfil químico por UPLC-ESI-QTOF-MS do extrato bruto no meio de PDB em 28 dias de cultivo

S.S_R9-PDB (28 dias)



Já os compostos **15** e **16** começaram a ser produzidos no 5° dia, porém só foram notados em maiores quantidades a partir do 10°. Ambos seguiram o padrão de serem consumidos no começo da fase de destruição, entretanto a substância **15** voltou a ser produzido a partir do 30° dia o que pode ser uma resposta do fungo a situação de estresse por falta de nutriente que ele se encontra.

5 CONCLUSÃO

Os estudos metabolômicos de duas linhagens de *Fusarium oxysporum* levaram a anotação de 35 metabólitos nos seis extratos avaliados na primeira parte deste trabalho. Foi possível evidenciar, também através da estatística e de ensaios biológicos, como a OSMAC influencia na ativação de algumas vias biossintéticas ao cultivar ambas em diferentes fontes de nutrientes. Como exemplo temos o caso dos derivados de naftoquinonas, produzidos quase que exclusivamente no meio de Malte e de somente o extrato de uma linhagem no meio de PDB apresentar atividade antibacteriana. Isso nos mostra um potencial para a ativação de rotas biossintéticas do *Fusarium oxysporum* em diferentes condições de cultivo podendo levar a produção de substâncias inéditas.

Os resultados do planejamento fatorial para uma das linhagens de *F. oxysporum* cultivada em PDB nos permitiram verificar a partir da análise quimiométrica dos dados de LC-MS a possibilidade de a agitação contribuir para a diversidade química dos extratos obtidos quando otimizada, especialmente para uma produção de maiores quantidades de enniatinas, substâncias essas que apresentam diversas propriedades farmacológicas. Os resultados da curva de crescimento para essa mesma linhagem cultivada em PDB nos permitiram observar o padrão de crescimento dela além de acompanhar a variação metabólica de determinadas micotoxinas durante os diferentes dias do cultivo, o que nos levou a indicação de que as enniatinas podem resultar da degradação da beauvericina, uma vez que ambas são produzidas pela mesma enzima precursora e como provavelmente o *Fusarium oxysporum* utiliza esses peptídeos cíclicos como fonte de nutriente.

REFERÊNCIAS

- BERLINCK, R. G. *et al.* A química de produtos naturais do Brasil do século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706-710, 2017.
- BOLZANI, V. S.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I. Bioactive and other piperidine alkaloids from *Cassia leptophylla*. **Tetrahedron**, v. 51, n. 21, p. 5929-5934, 1995.
- BORTOLUZZI, R.L.C. *et al.* *Senna* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB23172>>. Acesso em: 26 mai. 2022
- BURMEISTER, H. R.; PLATTNER, R. D. Enniatin production by *Fusarium tricinctum* and its effects on germinating wheat seeds. **Phytopathology**, v. 77, p. 1483–1487, 1987.
- CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, 2019.
- CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, p. 421-437, 2013.
- CHEN, J. *et al.* Fusariumins C and D, two novel antimicrobial agents from *Fusarium oxysporum* ZZP-R1 symbiotic on *Rumex madaio* Makino. **Fitoterapia**, v. 134, p. 1-4, 2019.
- CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests For Bacteria That Grow aerobically; Approved standard, 10th Edition*. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. In: 23th Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne: 2013.
- DIVITO, E. B. *et al.* Electrospray ionization and collision induced dissociation mass spectrometry of primary fatty acid amides. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 5, p. 2388-2394, 2012.

Fabaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB115>>. Acesso em: 26 mai. 2022.

FUNARI, C. S. *et al.* Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605-1609, 2013.

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 $^{15}\text{N}_3$ -labeled enniatins and beauvericin and their application to stable isotope dilution assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 29, p. 7129-7136, 2012.

IBRAHIM, S. R. M. *et al.* Bright Side of *Fusarium oxysporum*: Secondary Metabolites Bioactivities and Industrial Relevance in Biotechnology and Nanotechnology. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 11, p. 943, 2021.

INOUE ANDRADE, F. *et al.* Chemical constituents and an alternative medicinal veterinary herbal soap made from *Senna macranthera*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

MASI, M.; EVIDENTE, A. Fungal bioactive anthraquinones and analogues. **Toxins**, v. 12, n. 11, p. 714, 2020.

MELO, G. M. de A. *et al.* Leishmanicidal activity of the crude extract, fractions and major piperidine alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis*. **Phytomedicine**, v. 21, p. 277-281, 2014.

MUSSI-DIAS, V. *et al.* Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 2, p. 261-266, 2012.

MYERS, O. D. *et al.* One step forward for reducing false positive and false negative compound identifications from mass spectrometry metabolomics data: new algorithms for constructing extracted ion chromatograms and detecting chromatographic peaks. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 17, p. 8696-8703, 2017.

NATHANAIL, A. V. *et al.* Metabolism of the *Fusarium* mycotoxins T-2 toxin and HT-2 toxin in wheat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 35, p. 7862-7872, 2015.

NIEHAUS, E. M. *et al.* Characterization of the fusaric acid gene cluster in *Fusarium fujikuroi*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 4, p. 1749-1762, 2014.

PANG, Z. *et al.* MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W388-W396, 2021.

PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 864-870, 2004.

PLUSKAL, T. *et al.* MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2010.

RODRIGUES, R. S. *et al.* O gênero *Senna* (Leguminosae, Caesalpinioideae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 1, p. 1-16, 2005.

SANTOS, M. C.; MENDONÇA, M. L.; BICAS, J. L. Modeling bikaverin production by *Fusarium oxysporum* CCT7620 in shake flask cultures. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2020.

SELEGATO, D. M. *et al.* Update: Biological and Chemical Aspects of *Senna spectabilis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 3, p. 415-426, 2017.

SHISHIDO, M. *et al.* Biological control efficiency of *Fusarium* wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo-B2 in different environments. **Phytopathology**, v. 95, n. 9, p. 1072-1080, 2005.

SILVA, E. O. Otimização das condições de cultivo e investigação das atividades citotóxica e antimicrobiana de metabólitos secundários do fungo endofítico *Drechslera ravenelii*. 2010. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade

de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010. doi:10.11606/D.60.2010.tde-08062010-161118. Acesso em: 20 mai. 2022.

SILVA, F. O. *et al.* Constituintes químicos das folhas de *Senna spectabilis* (DC) Irwin & Barneby var. *exce/sa* (Schrad.) Irwin & Barneby. **Química Nova**, v. 33, p. 1874-1876, 2010.

SILVA, J.G.A. *et al.* Chemical profile and cytotoxic activity of leaf extracts from *Senna* spp. from Northeast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 10, p. 1872-1880, 2016.

SILVEIRA, F. S.; MIOTTO, S. T. S. A família Fabaceae no Morro Santana, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil: aspectos taxonômicos e ecológicos. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 1, 2013.

SIQUEIRA, K. *et al.* Endophytism and bioactivity of endophytic fungi isolated from *Combretum lanceolatum* Pohl ex Eichler. **Symbiosis**, v.71, p. 211-222, 2017.

SON, S. W. *et al.* Bikaverin and fusaric acid from *Fusarium oxysporum* show antioomycete activity against *Phytophthora infestans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 3, p. 692-698, 2008.

SOUZA, A. Q. L. D. *et al.* Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens benth.* **Acta Amazônica**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.

SOUZA, V.C.; BORTOLUZZI, R.L.C. 2015 *Senna* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil2015.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23149>>. Acesso em: 06 jun. 2022.

SPECIAN, V. *et al.* A. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **Journal of Health Sciences**, v. 16, n. 4, 2014.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreane*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. **Science**, v. 260, p. 214-216, 1993.

STUDT, L. *et al.* Biosynthesis of fusarubins accounts for pigmentation of *Fusarium fujikuroi* perithecia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 12, p. 4468-4480, 2012.

SY-CORDERO, A. A.; PEARCE, C. J.; OBERLIES, N. H. Revisiting the enniatins: a review of their isolation, biosynthesis, structure determination and biological activities. **The Journal of Antibiotics**, v. 65, n. 11, p. 541-549, 2012.

TANG, H.; XIAO, C.; WANG, Y. Important roles of the hyphenated HPLC-DAD-MS-SPE-NMR technique in metabonomics. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 47, n. S1, p. S157-S162, 2009.

TORRES-MENDOZA, D.; ORTEGA, H. E.; CUBILLA-RIOS, L. Patents on endophytic fungi related to secondary metabolites and biotransformation applications. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 2, p. 58, 2020.

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.

WANG, M. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016.

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: 30 mai. 2022.

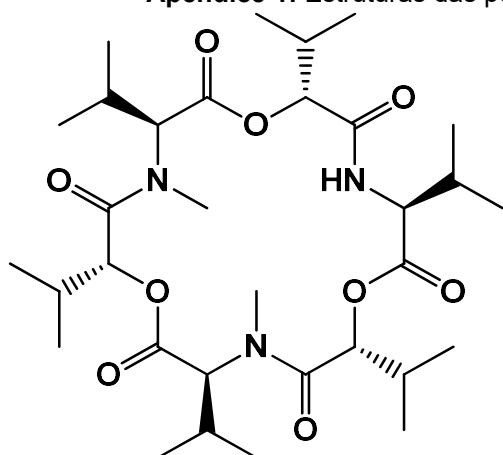
XU, L. *et al.* Rapid identification of chemical profile in Gandou decoction by UPLC-Q-TOF-MSE coupled with novel informatics UNIFI platform. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 10, n. 1, p. 35-48, 2020.

YULIANA, N. D. *et al.* Metabolomics for the rapid dereplication of bioactive compounds from natural sources. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, n. 2, p. 293-304, 2013.

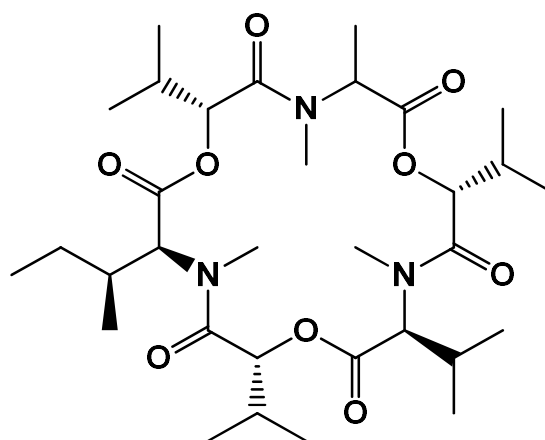
ZURIEGAT, Q. *et al.* Current progress on pathogenicity-related transcription factors in *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant Pathology**, v. 22, n. 7, p. 882-895, 2021.

APÊNDICE

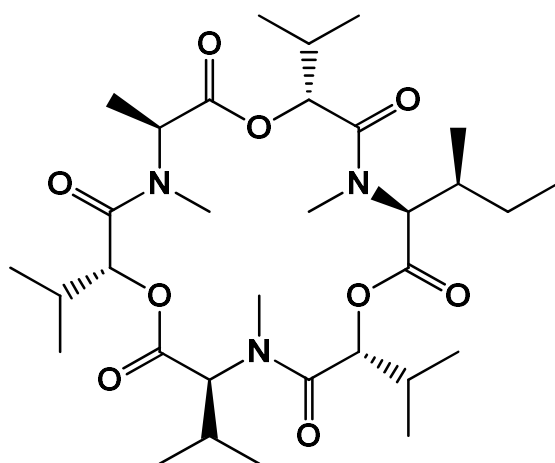
Apêndice 1: Estruturas das possíveis anotações para as substâncias 5 e 6



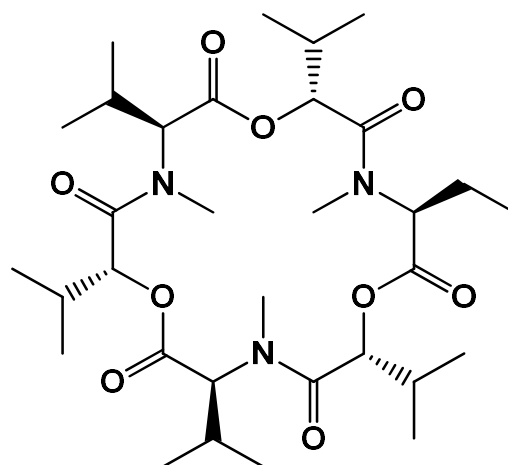
Enniatina B2 (5)



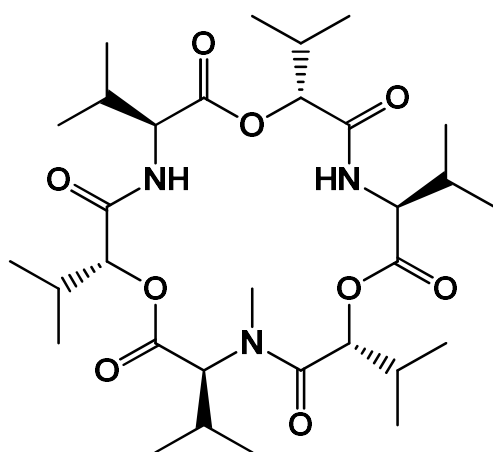
Enniatina J2 (5)



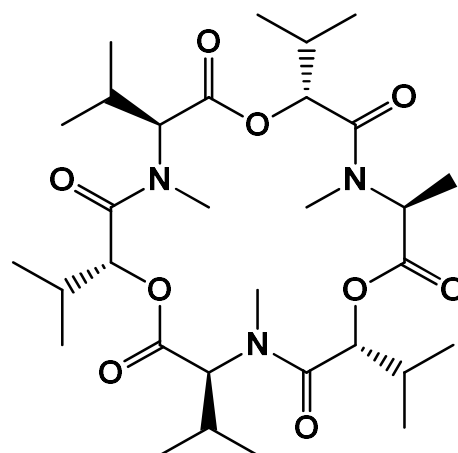
Enniatina J3 (5)



Enniatina K1 (5)

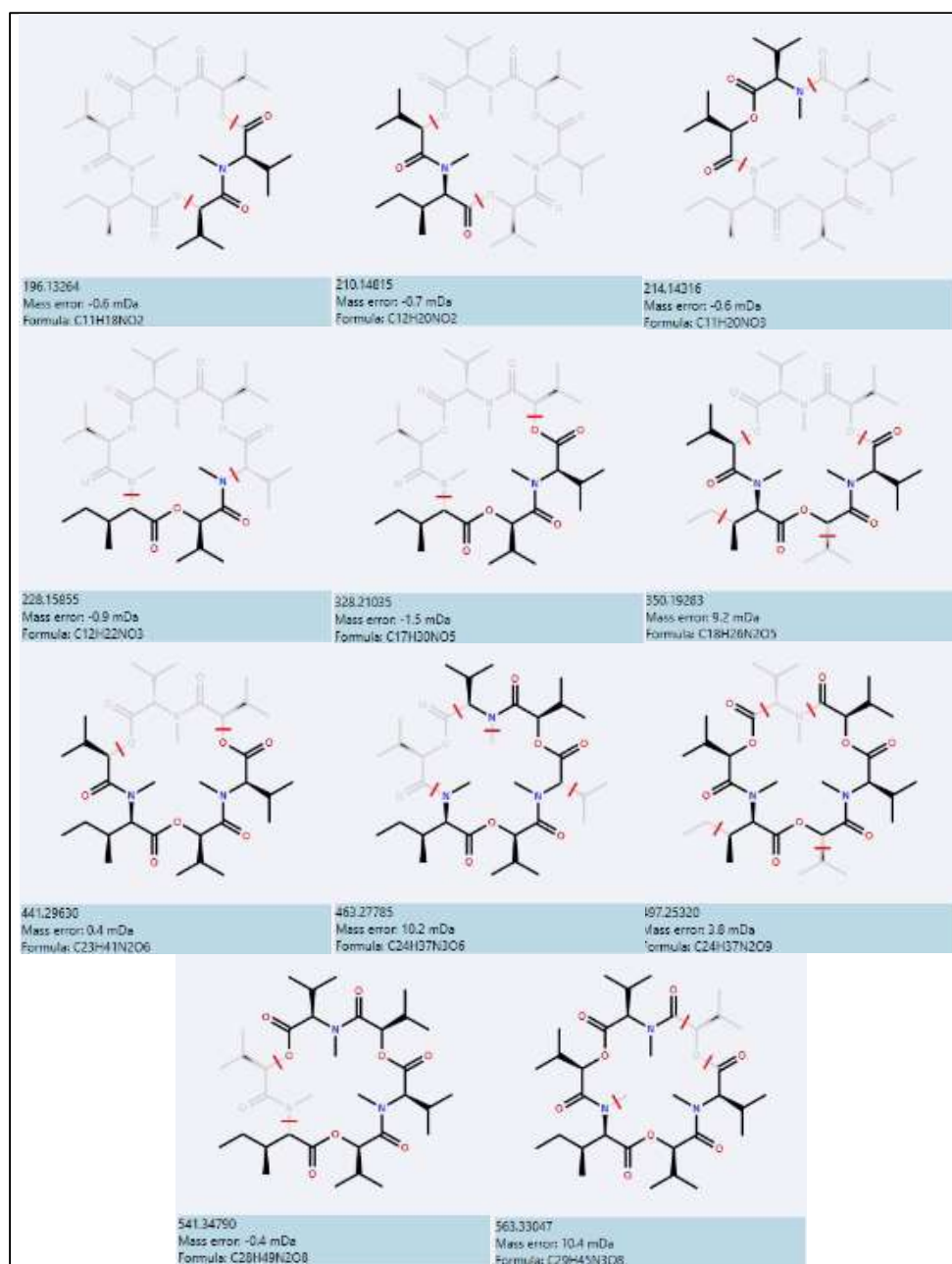


Enniatina B3 (6)

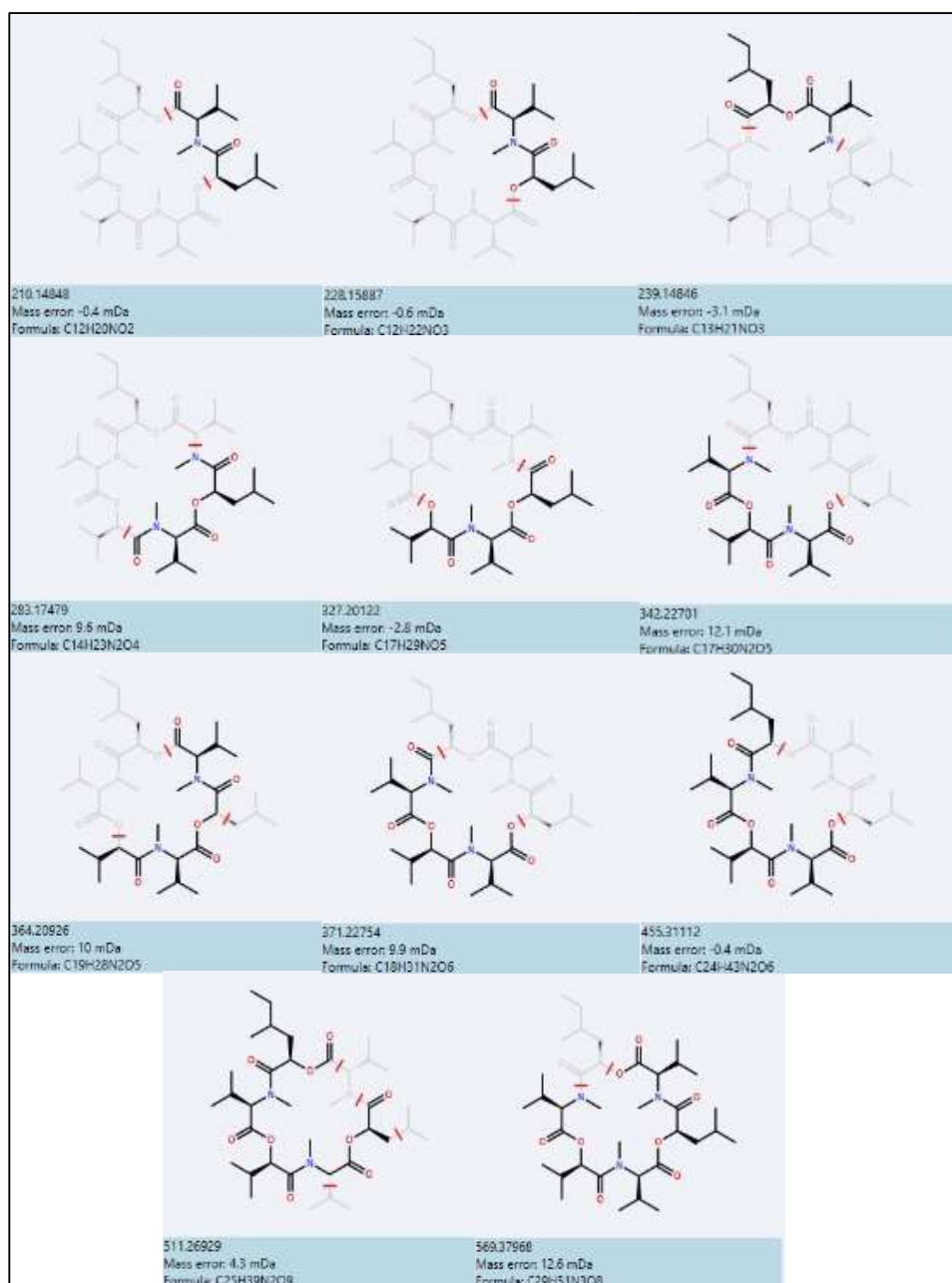


Enniatina J1 (6)

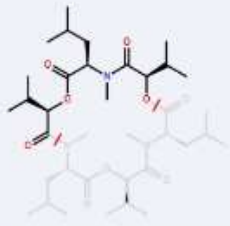
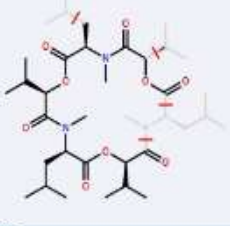
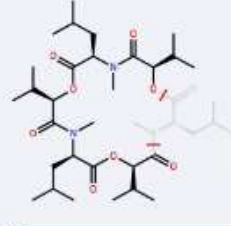
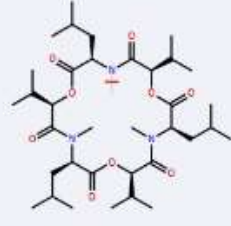
Apêndice 2: Íons fragmentos da substância **2** por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo via UNIFI



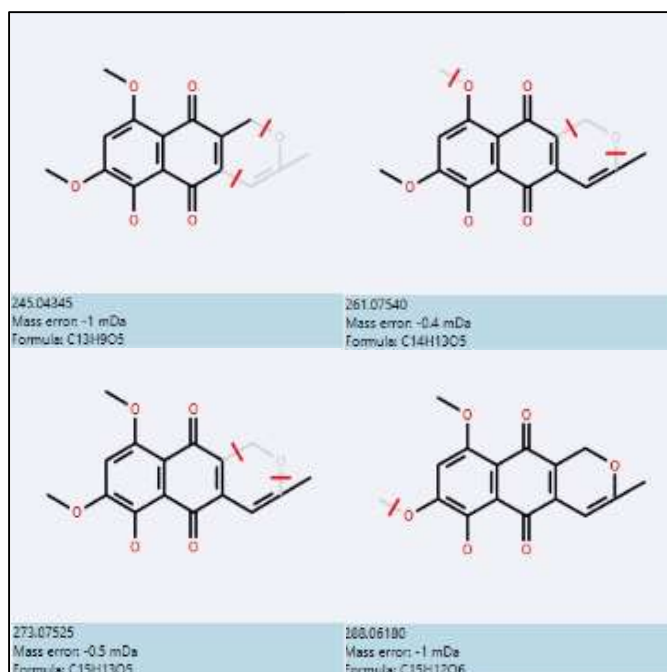
Apêndice 3: Íons fragmentos da substância **3** por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo via UNIFI



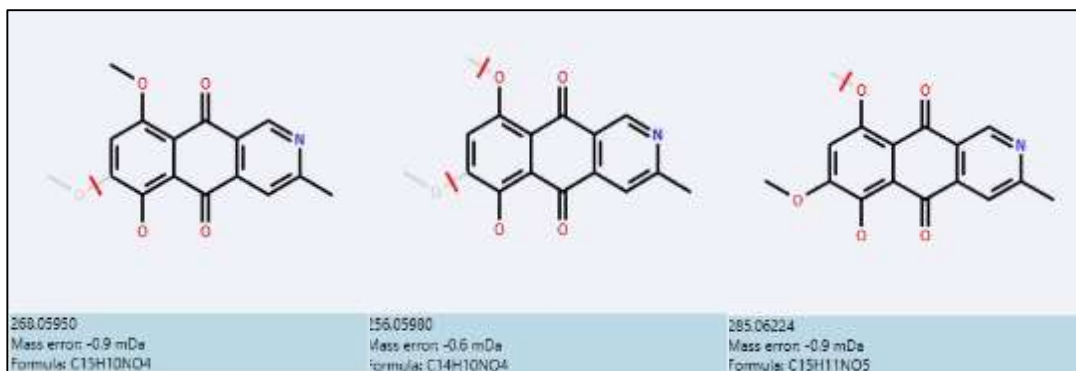
Apêndice 4: Íons fragmentos da substância **27** por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo via UNIFI

 196.13266 Mass error: -0.5 mDa Formula: C₁₃H₁₈NO₂	 210.14821 Mass error: -0.6 mDa Formula: C₁₂H₂₀NO₂	 214.14297 Mass error: 11.8 mDa Formula: C₁₀H₁₈N₂O₃
 328.21009 Mass error: -1.8 mDa Formula: C₁₇H₃₀NO₅	 350.19280 Mass error: 9.2 mDa Formula: C₁₈H₂₆N₂O₅	 441.29554 Mass error: 12.2 mDa Formula: C₂₂H₃₉N₃O₆
 497.25306 Mass error: 3.7 mDa Formula: C₂₄H₃₇N₂O₉	 555.36393 Mass error: -0.1 mDa Formula: C₂₉H₅₁N₂O₈	 577.34572 Mass error: 9.9 mDa Formula: C₃₀H₄₇N₃O₈
	 666.44772 Mass error: -0.3 mDa Formula: C₃₅H₆₂N₃O₉	

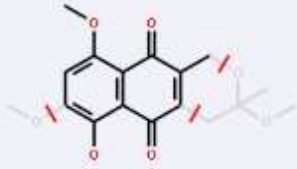
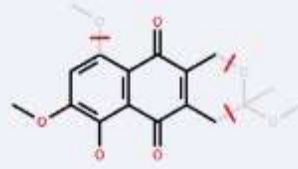
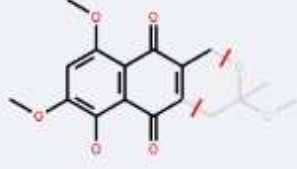
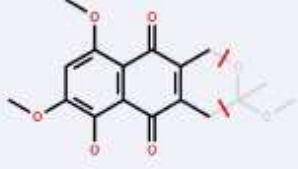
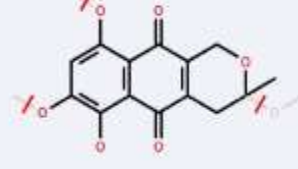
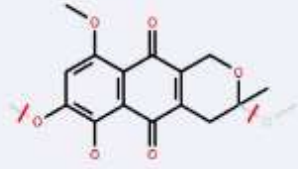
Apêndice 5: Íons fragmentos da substância **20** por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo via UNIFI



Apêndice 6: Íons fragmentos da substância **21** por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo via UNIFI



Apêndice 7: Íons fragmentos da substância **23** por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo via UNIFI

		
216.04084 Mass error: -0.9 mDa Formula: C₁₂H₈O₄	227.03275 Mass error: -1.1 mDa Formula: C₁₃H₇O₄	231.06435 Mass error: -0.8 mDa Formula: C₁₃H₁₁O₄
		
244.03591 Mass error: -0.7 mDa Formula: C₁₃H₈O₅	259.05928 Mass error: -0.8 mDa Formula: C₁₄H₁₁O₅	272.03064 Mass error: -0.9 mDa Formula: C₁₄H₁₀O₆
		
	287.05447 Mass error: -0.5 mDa Formula: C₁₅H₁₁O₆	