

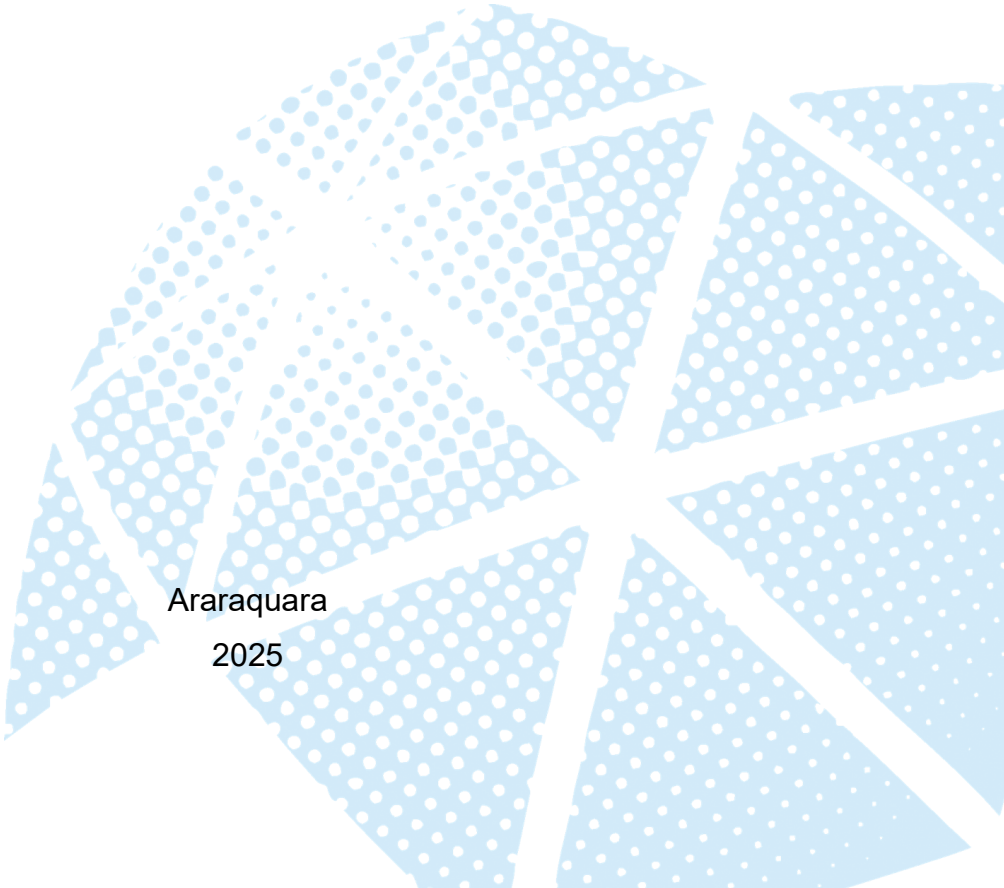
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

YAN MICHEL LOPES FERNANDES

**PROSPECÇÃO DA QUIMIODIVERSIDADE DO FUNGO *Annulohypoxylon*
atroroseum, ISOLADO DA ALGA *Dichotomaria marginata*, POR OSMAC,
ANÁLISE DE VOLÁTEIS E REDES MOLECULARES**

Araraquara

2025



YAN MICHEL LOPES FERNANDES

**PROSPECÇÃO DA QUIMIODIVERSIDADE DO FUNGO *Annulohypoxylon*
atrorseum, ISOLADO DA ALGA *Dichotomaria marginata*, POR OSMAC,
ANÁLISE DE VOLÁTEIS E REDES MOLECULARES**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena S. Silva

Araraquara
2025

F363p

Fernandes, Yan Michel Lopes

Prospecção da quimiodiversidade do fungo *Annulohypoxylon atroroseum*, isolado da alga *Dichotomaria marginata*, por OSMAC, análise de voláteis e redes moleculares / Yan Michel Lopes Fernandes.

-- Araraquara, 2025

144 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Química, Araraquara

Orientadora: Dulce Helena Siqueira Silva

1. Algas vermelhas. 2. Fungos endofíticos. 3. Produtos naturais. 4.
Metabolômica. 5. Compostos orgânicos voláteis. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Esta pesquisa contribui para a valorização da biodiversidade marinha como fonte de novos metabólitos com potencial biotecnológico. A prospecção química do fungo endofítico *Annulohypoxylon atroroseum*, isolado da alga *Dichotomaria marginata*, revelou compostos com estruturas diversas e atividade biológica relevante, como metabólitos com potencial antiproliferativo e compostos voláteis com aplicação ecológica e industrial. O uso da estratégia OSMAC, aliado a técnicas modernas de espectrometria de massas, redes moleculares no GNPS, e a análises de compostos orgânicos voláteis do fungo (COVf) permitiram acessar vias metabólicas normalmente inativas, ampliando a quimiodiversidade detectada. Os resultados reforçam a importância de microrganismos marinhos na descoberta de novos produtos naturais. A pesquisa está alinhada à Agenda 2030 da ONU e aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável, especialmente o ODS 3 (Saúde e Bem-Estar), ODS 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura) e ODS 14 (Vida na Água), ao promover o uso sustentável de recursos marinhos para fins científicos e tecnológicos.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This research contributes to the valorization of marine biodiversity as a source of new metabolites with biotechnological potential. The chemical bioprospecting of the endophytic fungus *Annulohypoxylon atroroseum*, isolated from the alga *Dichotomaria marginata*, revealed compounds with diverse structures and relevant biological activity, including metabolites with antiproliferative potential and volatile compounds with ecological and industrial applications. The use of the OSMAC strategy, combined with modern mass spectrometry techniques, molecular networking on the GNPS platform, and the analysis of fungal volatile organic compounds (fVOCs), enabled access to normally inactive metabolic pathways, thereby expanding the detected chemodiversity. The results reinforce the importance of marine microorganisms in the discovery of novel natural products. This research aligns with the United Nations 2030 Agenda and the Sustainable Development Goals, particularly SDG 3 (Good Health and Well-being), SDG 9 (Industry, Innovation and Infrastructure), and SDG 14 (Life Below Water), by promoting the sustainable use of marine resources for scientific and technological purposes.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Prospecção da quimiodiversidade do fungo *Annulohypoxylon atroroseum*, isolado da alga *Dichotomaria marginata*, por OSMAC, análise de voláteis e redes moleculares"

AUTOR: YAN MICHEL LOPES FERNANDES**ORIENTADORA: DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA**

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

Dulce Helena Siqueira
Silva:07452022840

Assinado de forma digital por
Dulce Helena Siqueira
Silva:07452022840
Dados: 2025.08.21 14:49:00 -03'00'

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

Documento assinado digitalmente
 IAN CASTRO GAMBOA
Data: 19/08/2025 19:06:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente
 ISABELE RODRIGUES NASCIMENTO
Data: 20/08/2025 09:25:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a ISABELE RODRIGUES NASCIMENTO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Documento assinado digitalmente
 TERESINHA DE JESUS AGUIAR DOS SANTOS AN
Data: 20/08/2025 11:25:30-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a TERESINHA DE JESUS AGUIAR DOS SANTOS ANDRADE (Participação Virtual)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão / Universidade Federal do Maranhão - UFMA
- Presidente Dutra

Documento assinado digitalmente
 ELIANE DE OLIVEIRA SILVA
Data: 20/08/2025 15:20:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a ELIANE DE OLIVEIRA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UFBA - Salvador

Araraquara, 19 de agosto de 2025

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO	
Nome/Data de Nascimento	YAN MICHEL LOPES FERNANDES 04/10/1994
Nacionalidade	Brasileiro
Nome em citações bibliográficas:	Fernandes, Yan. Fernandes, Y. M. L.
Endereço profissional	Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Campus de Araraquara Departamento de Química Orgânica Rua Francisco Degni, 55 Quitandinha, Araraquara – SP CEP 14800-900
Currículo Lattes	http://lattes.cnpq.br/5255418549594981
ORCID	https://orcid.org/0000-0002-5464-9660
FORMAÇÃO ACADÊMICA	
2012-2017	Bacharelado em Química Industrial Universidade Federal do Maranhão
2018-2020	Mestrado em Química Analítica Universidade Federal do Maranhão
PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	
Artigos Completos Publicados em Periódicos: FERNANDES, Y. M. L. ; MATOS, J. V. S.; LIMA, C. A.; TARDINI, A. M.; VIEIRA, F. A. P.; MAIA, J. G. S.; MONTEIRO, O. S.; LONGATO, G. B.; ROCHA, C. Q. Essential oils obtained from aerial <i>Eugenia punicifolia</i> parts: chemical composition and antiproliferative potential evidenced through cell cycle arrest. <i>Journal of the Brazilian Chemical Society</i> , v. 32, n. 7, p. 1381-1390, 2021. LIMA, A. S.; FERNANDES, Y. M. L. ; SILVA, C. R.; COSTA-JUNIOR, L. M.; FIGUEIREDO, P. L. B.; MONTEIRO, O. S.; MAIA, J. G. S.; DA ROCHA, C. Q. Anthelmintic evaluation and essential oils composition of <i>Hyptis dilatata</i> Benth. and <i>Mesosphaerum suaveolens</i> Kuntze from the Brazilian Amazon. <i>Acta Tropica</i> , v. 228, p. 106321, 2022.	

BORBA, E. R. C.; MUBÁRACK, T. C.; LUZ, T. R. S. A.; SILVEIRA, D. P. B.; SILVA, A. Z.; FIGUEIREDO, P. M. S.; MONTEIRO, O. S.; **FERNANDES, Y. M. L.**; PAULA, M. L.; VILANOVA, C. M.; COUTINHO, D. F. Características nutricionais do solo e das folhas no cultivo de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Research, Society and Development**, v. 10, p. e30810111715, 2021.

BORBA, E. R. C.; MUBÁRACK, T. C.; LUZ, T. R. S. A.; SILVEIRA, D. P. B.; SILVA, A. Z.; FIGUEIREDO, P. M. S.; MONTEIRO, O. S.; **FERNANDES, Y. M. L.**; PAULA, M. L.; VILANOVA, C. M.; COUTINHO, D. F. Características químicas e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. cultivada com adubações distintas. **Research, Society and Development**, v. 10, p. e28210111717, 2021.

BORBA, E. R. C.; FERREIRA, H. S.; MUBÁRACK, T. C.; LUZ, T. R. S. A.; SILVEIRA, D. P. B.; SILVA, A. Z.; FIGUEIREDO, P. M. S.; MONTEIRO, O. S.; **FERNANDES, Y. M. L.**; VILANOVA, C. M.; COUTINHO, D. F. Technological prospection of the biological activities of *Plectranthus amboinicus* (Loureiro) Sprengel: an integrative review. **Research, Society and Development**, v. 10, p. e30110514653, 2021.

MONTEIRO, I. N.; MONTEIRO, O. S.; OLIVEIRA, A. K. M.; FAVERO, S.; GARCIA, N. Z. T.; **FERNANDES, Y. M. L.**; JACINTO, G. S. S.; RIVERO-WENDT, C. L. G.; MATIAS, R. Chemical analysis and insecticidal activity of *Ocimum gratissimum* essential oil and its major constituent against *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Research, Society and Development**, v. 9, p. e4999119787, 2020.

SILVA LIMA, A.; MILHOMEM, M. N.; SANTOS MONTEIRO, O.; ARRUDA, A. C. P.; DE CASTRO, J. A. M.; FERNANDES, Y. M. L.; MAIA, J. G. S.; COSTA-JUNIOR, L. M. Seasonal analysis and acaricidal activity of the thymol-type essential oil of *Ocimum gratissimum* and its major constituents against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. 2017.

Capítulos de Livros Publicados:

1. **FERNANDES, Y. M. L.** Devo tentar ensinar química para estudantes trabalhadores do noturno? In: Amadeu Moura Bego; Katherine Merseth. (Org.). Estudos de casos para a formação de professores de Química. 1ed. São Paulo: Editora Unesp, 2024, v. 1, p. 93-100.

2. **FERNANDES, Y. M. L.**; MONTEIRO, O. S. A utilização de óleos essenciais: da antiguidade mística à atualidade científica. Aqui se faz ciência! Pesquisas desenvolvidas em universidades federais e suas aplicabilidades para a sociedade. 1ed. Goiânia: Editora Espaço Acadêmico, 2020, v. 1, p. 340-342.

Resumos publicados em anais de congressos:

1. **FERNANDES, Y. M. L.**; MOURA, L.; DIAS, E.; RUFINO, V. H. L.; SILVA, G. S.; SILVA, D. H. S. Bioprospecting of biologically active metabolites from the endophytic

fungus *Annulohypoxylon atroroseum* isolated from the marine alga *Dichotomaria marginata*. **9th BCNP**, Salvador, 2023.

2. FERNANDES, Y. M. L.; VIEIRA, F. A. P. ; MONTEIRO, ODAIR DOS SANTOS ; LONGATO, G. B. ; LIMA, C. A. ; MATOS, J. V. S. ; ROCHA, C. Q. . COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. In: **VII Simpósio de Plantas Medicinais do Vale do São Francisco e 1st France-Brazil Meeting on Natural Products**, 2019, Juazeiro - BA.

3. MONTEIRO, O. S.; **FERNANDES, Y. M. L.**; PAIXAO, B. L. A. ; GAMA, D. G. A. ; SILVA, M. L. C. ; FERREIRA, A. C. C. ; MONTEIRO, I. N. ; PRASERES, F. A. ; FERREIRA, A. M.; FIGUEIREDO, P. M. S. Estudo químico e avaliação da atividade microbiológica do óleo essencial das folhas de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. In: **58° CBQ**, São Luís, 2018

4. FERNANDES, Y. M. L.; PRASERES, F. A. P.; MONTEIRO, O. S.; MAIA J. G. S.; JACINTO, G. S. S.; MONTEIRO, I. N.; FONSECA, W. S.; ROCHA, E. M.; MELO, M. P. C. Inventário de composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazônia oriental no Maranhão. In: **58° CBQ**, São Luís, 2018.

5. FERNANDES, Y. M. L.; PRASERES, F. A.; MONTEIRO, O. S.; MAIA J. G. S.; MONTEIRO, I. N.; FIGUEIREDO, P. M. S.; SANTOS, A. L. P. A. Estudo químico e avaliação da atividade microbiológica do óleo essencial das folhas de *Hyptis dilatata* Benth. In: **58° CBQ**, São Luís, 2018.

PARTICIPAÇÃO EM BANCAS E ORIENTAÇÕES

Bancas de trabalhos de conclusão

VIEIRA, F. A. P.; MONTEIRO, O. S.; MONTEIRO, I. N.; **FERNANDES, Y. M. L.** Participação em banca de Flavio Augusto Praseres Vieira. **Estudo químico e avaliação da atividade microbiológica do óleo essencial das folhas de *Hyptis Dilatata* Benth.** 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) - Universidade Federal do Maranhão.

CASTRO, N. R.; VELEZ, H. A. V.; SAMPAIO, R. M.; **FERNANDES, Y. M. L.** Participação em banca de Nathalia Ribeiro Castro. **Estudos da produção de um biopolímero como material de cobertura para minério a céu aberto.** 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal do Maranhão.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

1. FERNANDES, Y. M. L.; MOURA, L.; DIAS, E.; RUFINO, V. H. L.; SILVA, G. S.; SILVA, D. H. S. Bioprospecting of biologically active metabolites from the endophytic fungus *Annulohypoxylon atroroseum* isolated from the marine alga *Dichotomaria marginata*. **9th BCNP**, Salvador, 2023.

2. FERNANDES, Y. M. L.; VIEIRA, F. A. P.; MONTEIRO, O. S.; LONGATO, G. B.; LIMA, C. A.; MATOS, J. V. S.; ROCHA, C. Q. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. In: **VII Simpósio de Plantas Medicinais do Vale do São Francisco e 1st France-Brazil Meeting on Natural Products**, 2019, Juazeiro - BA.

2. FERNANDES, Y. M. L.; MONTEIRO, O. S. ; PRASERES, F. A. ; MONTEIRO, I. N. ; MAIA J. G. S. ; FIGUEIREDO, P. M. S. ; SANTOS, A. L. P. A. . Estudo químico e avaliação da atividade microbiológica do óleo essencial das folhas de *Hyptis dilatata* Benth. **58° CBQ**, São Luís, 2018.

3. FERNANDES, Y. M. L.; MONTEIRO, O. S. ; PRASERES, F. A. ; MAIA J. G. S. ; MONTEIRO, I. N. ; JACINTO, G. S. S. ; FONSECA, W. S. ; MELO, M. P. C. ; ROCHA, E. M. Inventário de composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazônia oriental no Maranhão. **58° CBQ**, São Luís, 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Este trabalho é dedicado, com profunda saudade, à memória de Maria do Perpétuo Socorro Sousa Lopes e, com imensa alegria, à chegada de Ana Lírio Carvalho Fernandes.

AGRADECIMENTOS

Ao Gerador de Improbabilidade Infinita original, que fez inconsistentes e insistentes organismos primordiais alcançarem estágios de adaptação estáveis o suficiente para se multiplicarem e atingirem níveis cognitivos elevados o bastante para desenvolver a Ciência contemporânea – e o doce de leite.

À minha família. Em especial, aos meus pais, Camilo e Lucia, por todo amor, carinho, apoio e suporte que sempre me deram, por me entenderem como passarinho e me deixarem voar. Agradeço também por manterem o ninho sempre disponível quando preciso pousar. Aos meus irmãos Yuri Gabriel e Danyelle por também estarem sempre por perto; e às minhas tias Rosário e Socorro (*in memoriam*) por todo cuidado e carinho que desprenderam durante minha formação como indivíduo.

À Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva, minha orientadora, por quem nutro enorme admiração desde nosso primeiro contato em 2014, quando eu ainda estava na graduação na UFMA, por me receber tão bem em Araraquara e por ser a maestra que regeu essa sinfonia.

Aos demais professores do NuBBE, por todo esforço dispensado para manter a excelência do grupo e pelas brilhantes contribuições à minha formação profissional. Agradeço também aos técnicos João e Juliana, pela disponibilidade em ajudar sempre, e que foram vital importância em todas as etapas das análises realizadas.

Aos colegas de trabalho e amigos do NuBBE, em especial aos companheiros de orquestra do Grupo dos Marinhos: Ariele, Augusto, Edelson, Givaldo, Iatã, Lucas, Natasha e Victor, por todas as valiosíssimas contribuições e trocas de aprendizado, pelos momentos que compartilhamos no laboratório e fora dele.

Aos meus amigos que, felizmente, são tantos que esta seção ficaria maior do que já está, se listasse todos aqui nominalmente; mas em especial aos meus melhores amigos, Iza Luana e Waldeir Brito, por estarem tão presentes, mesmo nos anos que estive distante; e aos amigos Fran, Vagner, Lu e Bruno, por receberem tão bem a minha família na sua, por nos acolherem sempre e por todo apoio que nos deram em vários momentos cruciais em Araraquara.

Ao meu grupo de RPG, Márcio, Rony e, de novo, meu irmão Yuri, pelas várias dicas acadêmicas e profissionais e por todo apoio que recebi deles, mesmo que tenha sido apenas na intenção de que eu terminasse logo essa tese e voltar a jogar com eles.

À agência CAPES, pela bolsa concedida, e ao CNPq e à FAPESP, pelos projetos que financiaram a pesquisa descrita neste trabalho.

Agradeço a Naízy Carvalho, por todo companheirismo, força e apoio diários. Por tudo que foi necessário para que construíssemos e chegássemos juntos até aqui: uma imensidão de parceria, amor e amizade. Nada teria sido feito se não fosse por ela, que me amparou e sempre me deu o que eu precisava para não desistir nos momentos mais difíceis. Agradeço também por ter me dado o maior e melhor propósito de vida. Finalizar essa pesquisa é, acima de tudo, por elas.

E agradeço à minha filha, Ana Lírio, que nasceu na mesma semana que essa tese, por me apresentar tantos novos bons sentimentos diferentes. Agradeço para que, caso no futuro ela sinta curiosidade em ver os trabalhos do pai, fique registrado que, apesar de ela não ter sido o foco desta pesquisa, ela é o capítulo mais importante dessa etapa. E da mesma forma ela será em todas as próximas.

Por fim, agradeço a todos que resistem ao negacionismo e enfrentam os tempos sombrios sob a tocha da Ciência, e aos que tem o objetivo de conduzir a sociedade em direção à justiça social e, por consequência, ao avanço da humanidade. Venceremos!

"Hasta la victoria siempre."

A stylized, handwritten-style signature or logo in black ink, featuring a cursive 'e' with a horizontal line underneath it.

RESUMO

A diversidade química de metabólitos produzidos por microrganismos associados a organismos marinhos tem se destacado como uma das mais promissoras fontes de compostos bioativos com aplicações farmacológicas, agrícolas e industriais. Neste contexto, a presente tese teve como objetivo investigar o perfil metabólico do fungo endofítico *Annulohypoxylon atroroseum*, isolado da alga vermelha *Dichotomaria marginata*, com vistas à prospecção de metabólitos biologicamente ativos. Foram aplicadas estratégias experimentais voltadas à ampliação da quimiodiversidade, como o cultivo em cinco meios de cultivo distintos, utilizando-se da estratégia OSMAC, e a análise de compostos orgânicos voláteis fúngicos (COVf). As análises químicas foram conduzidas por técnicas cromatográficas e espectrometria de massas, com tratamento de dados por redes moleculares na plataforma GNPS. Os resultados evidenciaram significativa variação nos perfis metabólicos em função das condições de cultivo, com detecção de compostos polares e apolares distribuídos em diferentes classes estruturais, como lactonas macrocíclicas, nucleosídeos e lipídios fosfatados. A análise do volatiloma revelou a produção de 18 compostos, incluindo terpenoides, como o eucaliptol, detectado na maioria das condições, derivados de azuleno e cariofileno, cuja expressão foi modulada principalmente pelo tempo de cultivo. Ensaios citotóxicos frente à linhagem HCT-116 de adenocarcinoma de cólon revelaram inibição de 94 e 98% para os extratos obtidos a partir dos cultivos em extrato de malte e PDB, sugerindo a presença de substâncias com potencial antiproliferativo. O conjunto dos dados obtidos reforça o potencial de *A. atroroseum* como fonte de metabólitos bioativos e destaca a eficácia de abordagens integradas em bioprospecção microbiana. Este trabalho contribui com a agenda ONU 2030 e os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), especialmente o ODS 3 (Saúde e Bem-Estar), o ODS 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura) e o ODS 14 (Vida na Água), ao promover o uso sustentável da biodiversidade marinha em benefício da inovação científica e tecnológica.

Palavras-chave: endófito; *Annulohypoxylon*; OSMAC; GNPS; COVf.

ABSTRACT

The chemical diversity of metabolites produced by microorganisms associated with marine organisms has emerged as one of the most promising sources of bioactive compounds with pharmacological, agricultural, and industrial applications. In this context, the present thesis aimed to investigate the metabolic profile of the endophytic fungus *Annulohyphoxylon atroroseum*, isolated from the red alga *Dichotomaria marginata*, with a focus on the prospecting of biologically active metabolites. Experimental strategies aimed at expanding chemodiversity were applied, including cultivation in five different media using the OSMAC strategy, as well as the analysis of fungal volatile organic compounds (fVOC). Chemical analyses were conducted using chromatographic techniques and mass spectrometry, with data processing through molecular networking on the GNPS platform. The results revealed significant variation in metabolic profiles as a function of culture conditions, with the detection of both polar and nonpolar compounds distributed across different structural classes, such as macrolactones, nucleosides, and phosphorylated lipids. Volatilome analysis revealed the production of 18 compounds, including terpenoids such as eucalyptol, detected under most conditions, as well as azulene and caryophyllene derivatives, whose expression was primarily modulated by cultivation time. Cytotoxic assays against the HCT-116 colon adenocarcinoma cell line demonstrated 94% and 98% inhibition for extracts obtained from malt extract and PDB cultures, respectively, suggesting the presence of substances with antiproliferative potential. The overall findings reinforce the potential of *A. atroroseum* as a source of bioactive metabolites and highlight the effectiveness of integrated approaches in microbial bioprospecting. This work aligns with the United Nations 2030 Agenda and the Sustainable Development Goals (SDGs), particularly SDG 3 (Good Health and Well-Being), SDG 9 (Industry, Innovation, and Infrastructure), and SDG 14 (Life Below Water), by promoting the sustainable use of marine biodiversity in support of scientific and technological innovation.

Keywords: endophyte; *Annulohyphoxylon*; OSMAC; GNPS; fVOC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas das substâncias <i>morphine</i> (1), <i>penicillin</i> (2), <i>vincristin</i> (3), <i>vimblastin</i> (4), <i>paclitaxel</i> (5) e <i>artemisinin</i> (6).	28
Figura 2: Estruturas das substâncias <i>cephalosporin</i> (7), AZT (8), <i>kainic acid</i> (9), <i>trabectedin</i> (10), EPA (11) e DHA (12).	30
Figura 3: <i>Dichotomaria marginata</i> .	33
Figura 4: Desmosterois isolados de <i>Galaxaura marginata</i> (sin. <i>Dichotomaria marginata</i>) que apresentaram atividade citotóxica.	34
Figura 5: Estruturas das substâncias <i>xanthotoxol</i> (13), <i>anhydrojavanicin</i> (14), <i>fusarin</i> (15), <i>agistatin-D</i> (16), <i>gloesosporone</i> (17), <i>colletotric acid</i> (18), ciclohexadiona inédita (19) e <i>dihydrosporotriolide</i> (20).	35
Figura 6: Estrutura das substâncias penicilina (21), <i>compactin</i> (22), <i>griseofulvin</i> (23), <i>fusidic acid</i> (24), <i>emodepside</i> (25).	37
Figura 7: Estrutura das substâncias <i>oxaline</i> (26), <i>chrysazin</i> (27), <i>glycylrubropunctatin</i> (28) e <i>wentilactone B</i> (29).	39
Figura 8: Estrutura do BNT.	40
Figura 9: Estrutura das substâncias <i>viridistratins A, B e C</i> e <i>truncatones A e C</i> .	40
Figura 10: Estrutura das substâncias <i>cohaerin</i> (35), <i>minutelin</i> (36), <i>multiformin</i> (37) e <i>annulohypoxyboverin</i> (38).	41
Figura 11: Estrutura das substâncias <i>hypoxylonol C</i> (39) e <i>F</i> (40).	42
Figura 12: Estrutura da <i>annulosquamulin</i> (41).	42
Figura 13: Cultivo de <i>Annulohypoxyton atroroseum</i> em meio BDA.	43
Figura 14: Estrutura das substâncias <i>6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin</i> (42), <i>xylariphilone</i> (43), <i>scytalone</i> (44), <i>trans-3,4-dihydro-3,4,8-trihydroxynaphthalen-1(2H)-one</i> (45), <i>cis-4-hydroxyscytalone</i> (46), <i>8-hydroxyl-drimanol</i> (47), <i>pogostol</i> (48), <i>ergosterol</i> (49) e (22E,24R)-ergosta-4,7,22-trien-3-one (50).	44
Figura 15: Estrutura dos COVf 1-octen-3-ol (51), <i>chokol K</i> (52), <i>geosmin</i> (53), 5-pentyl-2-furaldehyde (54) e 6-pentyl- α -pyrone (55).	48
Figura 16: Metodologia de esterilização, isolamento e purificação dos endófitos.	58
Figura 17: Esquema de obtenção dos extratos brutos e da massa de micélios para construção da curva de crescimento.	60
Figura 18: <i>Clean-up</i> das amostras para cromatografia de alta eficiência.	61

Figura 19: Fluxograma das etapas de cultivo, obtenção e análise das amostras em meio sólido.	64
Figura 20: Frascos para análise de voláteis.	66
Figura 21: Parâmetros utilizados para construção das redes moleculares.	71
Figura 22: Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD das amostras de cultivo do fungo endofítico ao longo da curva de crescimento.	77
Figura 23: Rede molecular gerada através dos dados obtidos nas análises de UPLC-ESI-QTOF-MS/MS no modo positivo das amostras da curva de crescimento	79
Figura 24: Rede molecular gerada através da plataforma GNPS através dos dados obtidos nas análises de UPLC-ESI-QTOF-MS/MS no modo negativo das amostras da curva de crescimento de <i>Annulohypoxylon atroroseum</i>	85
Figura 25: Cromatogramas das amostras ArA	91
Figura 26: Cromatogramas das amostras ArM.....	91
Figura 27: Cromatogramas das amostras AvA.....	91
Figura 28: Cromatogramas das amostras AvM	91
Figura 29: Cromatogramas das amostras TrA	92
Figura 30: Cromatogramas das amostras TrM.....	92
Figura 31: Cromatogramas das amostras MLT	92
Figura 32: Cromatogramas das amostras PDB.....	92
Figura 33: Rede molecular gerada através da plataforma GNPS através dos dados obtidos nas análises de UPLC-ESI-QTOF-MS/MS no modo negativo das amostras obtidas através da ferramenta OSMAC.....	94
Figura 34: Ácidos benzenossulfônicos anotados a partir da plataforma GNPS.	100
Figura 35: Rede molecular gerada através da plataforma GNPS através dos dados obtidos nas análises de UPLC-ESI-QTOF-MS/MS no modo positivo das amostras obtidas através da ferramenta OSMAC.....	101
Figura 36: Comparação entre espectros da substância 67.	105
Figura 37: Comparação de espectros da substância 68.	106
Figura 38: Cromatogramas das frações hexânicas coletadas a partir dos cultivos em meios sólidos (arroz, aveia e trigo).....	108
Figura 39: Substâncias detectadas nas frações hexânicas dos cultivos em meios sólidos anotadas por similaridade de espectros com a biblioteca NIST14.....	111

Figura 40: Rede molecular gerada através da plataforma GNPS através dos dados obtidos nas análises de GC-MS das frações hexano dos cultivos em meio sólido com filtro de brancos.....	112
Figura 41: Cromatogramas dos perfis de substâncias voláteis <i>A. atroroseum</i> em diversas condições obtidos a partir de HS-SPME-GC-MS.....	121
Figura 42: Estruturas dos principais COVf produzidos por <i>Annulohypoxylon atroroseum</i> anotados a partir dos dados obtidos no planejamento experimental 2 ⁴⁻¹	122
Figura 43: Rede molecular construída a partir dos dados obtidos pelas análises de COVf por HS-SPME-GC-MS com filtro dos brancos.....	123
Figura 44: Estrutura dos COVf 1-hexene (11); <i>p</i> -hydroxyphenylacetic acid (12); δ -guaiene (15) e perillic acid (18) anotados pelo GNPS.....	125

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Tendências em novos Produtos Naturais Marinhos. As barras representam o número total de novos PNMs relatados a cada ano nos últimos cinco anos.....	31
Gráfico 2: Curva de crescimento de <i>A. atroroseum</i> (biomassa x tempo de crescimento).....	74
Gráfico 3: Curva de massa do extrato obtido a partir do cultivo de <i>A. atroroseum</i> (massa de extrato x tempo de crescimento).....	75
Gráfico 4: Nodos da rede molecular obtida pela ferramenta OSMAC para análises em modo negativo.....	95
Gráfico 5: Nodos da rede molecular obtida pela ferramenta OSMAC para análises em modo positivo.	102
Gráfico 6: Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados sobre a Produção de COV por <i>A. atroroseum</i>	119
Gráfico 7: Citotoxicidade de amostras obtidas a partir do cultivo do fungo <i>Annulohypoxylon atroroseum</i> em diferentes meios.....	127

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação taxonômica da alga vermelha <i>Dichotomaria marginata</i>	33
Quadro 2: Classificação taxonômica do fungo <i>Annulohypoxylon atroroseum</i>	43
Quadro 3: Solventes utilizados no desenvolvimento desta pesquisa.	54
Quadro 4: Meios de cultivo utilizados.	54
Quadro 5: Equipamentos utilizados.....	55
Quadro 6: Componentes do cromatógrafo utilizado para as análises.	56
Quadro 7: Variáveis e níveis determinados para o planejamento fracionário.....	66
Quadro 8: Condições dos experimentos realizados.	68
Quadro 9: Classificação das substâncias anotadas pela plataforma GNPS.	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Massa média do extrato e biomassa de <i>A. atroroseum</i> ao longo do tempo de crescimento.	74
Tabela 2: Número de nodos referentes à rede molecular obtida por UPLC-ESI-QTOF-MS/MS no modo positivo construída a partir dos dados da curva de crescimento. ..	80
Tabela 3: Compostos anotados pela plataforma GNPS através dos dados de UPLC-ESI-QTOF-MS/MS para as amostras obtidas da curva de crescimento.	82
Tabela 4: Número de nodos referentes à rede molecular btida por UPLC-ESI-QTOF-MS/MS no modo negativo a partir dos dados da curva de crescimento.....	86
Tabela 5: Compostos anotados pela plataforma GNPS através dos dados de UPLC-ESI-QTOF-MS/MS para as amostras da curva de crescimento.	87
Tabela 6: Massa dos extratos obtidos a partir das extrações realizadas a partir dos cultivos em 5 meios distintos de <i>Annulohypoxylon atroroseum</i>	89
Tabela 7: Massa das amostras obtidas através da aplicação da estratégia OSMAC para o cultivo do fungo <i>A. atroroseum</i>	90
Tabela 8: Número de nodos da rede molecular construída através do cultivo em diferentes meios.	95
Tabela 9: Compostos anotados pela plataforma GNPS através dos dados de UPLC-ESI-QTOF-MS/MS em modo negativo para as amostras adquiridas em diferentes meios de cultivo.....	98
Tabela 10: Número de nodos referentes à rede molecular construída através dos dados das análises em modo positivo do cultivo de <i>Annulohypoxylon atroroseum</i> em diferentes meios.	102
Tabela 11: Isoflavona e isocumarina anotadas pela plataforma GNPS através dos dados de UPLC-ESI-QTOF-MS/MS em modo positivo para as amostras adquiridas em diferentes meios de cultivo.	104
Tabela 12: Substâncias anotadas por similaridade de espectro de massas nas frações hexânicas dos meios de cultivo em meio sólido.....	109
Tabela 13: Número de nodos referentes à rede molecular construída através dos dados das análises das frações hexânicas de GC-MS cultivo de <i>Annulohypoxylon atroroseum</i> meios sólidos.....	113

Tabela 14: Substâncias anotadas pela plataforma GNPS através dos dados desconvoluídos das análises de GC-MS das frações hexano dos cultivos em meios sólidos do fungo <i>A. atroroseum</i>	117
Tabela 15: Resultados do planejamento experimental fracionário 2 ⁴⁻¹ . A variável de resposta foi o número de picos cromatográficos atribuídos a compostos voláteis exclusivos do fungo <i>A. atroroseum</i>	118
Tabela 16: COVs detectados nos extratos produzidos por <i>A. atroroseum</i> identificados a partir do planejamento experimental 2 ⁴⁻¹	121
Tabela 17: Número de nodos referentes à rede molecular construída a partir dos dados das análises de HS-SPME-GC-MS para determinação do perfil volátil de <i>Annulohypoxylon atroroseum</i>	124
Tabela 18: Percentual de inibição de frações e extratos de <i>A. atroroseum</i> frente a células HCT-116.....	126

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de Etila
BDA	Batata Dextrose Ágar
CE	<i>Collision Energy</i>
ChEBI	<i>Chemical Entities of Biological Interest</i>
CID	<i>Compound ID (PubChem)</i>
COVf	Compostos Orgânicos Voláteis Fúngicos
COVs	Compostos Orgânicos Voláteis
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM/EM	Espectrometria de Massas em Tandem
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
F.M.	Fórmula Molecular
GC	<i>Gas Chromatography</i>
GC-MS	<i>Gas Chromatography–Mass Spectrometry</i>
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
HCT-116	Linhagem celular de carcinoma de cólon humano
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HPLC-DAD	<i>High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector</i>
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
HS-SPME-GC-MS	<i>Headspace–Solid Phase Micro Extraction Gas Chromatography–Mass Spectrometry</i>
LC-MS	<i>Liquid Chromatography–Mass Spectrometry</i>
MeOH	Metanol
MLT	Meio de Extrato de Malte
MoNA	<i>MassBank of North America</i>
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
OSMAC	<i>One Strain–Many Compounds</i>
P.A.	Puro para Análise
PDB	<i>Potato Dextrose Broth</i>
PC	Ponto Central
PNMs	Produtos Naturais Marinhos
QTOF-MS/MS	<i>Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry/Mass Spectrometry</i>

RPM	Rotações Por Minuto
RT	Tempo de Retenção
SPME	<i>Solid Phase MicroExtraction</i>
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UPLC-ESI-QTOF-MS/MS	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry/Mass Spectrometry</i>
UPLC-HRMS	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	27
1.1. PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS.....	27
1.2. QUIMIODIVERSIDADE DE ORGANISMOS MARINHOS.....	29
1.2.1. A Alga Vermelha <i>Dichotomaria marginata</i> como fonte de PNMs e como Hospedeira Simbiótica	32
1.3. FUNGOS	35
1.3.1. Fungos endofíticos	37
1.3.1.1. Quimiodiversidade e importância biotecnológica do gênero <i>Annulohypoxylon</i>.....	39
1.3.1.1.1. <i>Annulohypoxylon atroroseum</i>	43
1.4. AMPLIANDO A PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS.....	45
1.4.1. Estratégia OSMAC	46
1.4.2. Compostos Voláteis.....	46
1.5. ANÁLISES QUÍMICAS E TRATAMENTO DE DADOS	48
1.5.1. Análises Cromatográficas.....	49
1.5.2. Análises Espectrométricas	49
1.5.2.1. GNPS e redes moleculares.....	50
2. OBJETIVOS.....	53
2.1. OBJETIVO GERAL	53
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
3. MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E MÉTODOS.....	54
3.1. MATERIAIS	54
3.1.1. Solventes e soluções.....	54
3.1.2. Meios de cultivo	54
3.2. EQUIPAMENTOS.....	54
3.2.1. Cromatografia.....	55
3.2.1.1. Cromatógrafo com analisador por arranjo de diodos (HPLC-DAD).55	55
3.2.2. Cromatógrafo com analisador Q-ToF (UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS)	56
3.2.3. Cromatógrafos a gás acoplado a espectrômetro de massas.....	56
3.2.3.1. Análises de frações hexano dos cultivos em meio sólido	56
3.2.3.2. Análises de compostos voláteis por headspace.....	57
3.3. COLETA DAS ALGAS	57

3.4. ISOLAMENTO DOS FUNGOS	57
3.5. CURVA DE CRESCIMENTO DO FUNGO <i>ANNULOHYPHONYX</i> <i>ATROROSEUM</i>	58
3.5.1. Análise dos extratos obtidos.....	60
3.5.1.1. Análises de HPLC-DAD.....	60
3.5.1.2. Análises por UPLC-ESI-QTOF-MS/MS.....	61
3.6. APLICAÇÃO DA ESTRATÉGIA OSMAC NA INVESTIGAÇÃO DE METABÓLITOS ESPECIALIZADOS.....	62
3.6.1. Extratos de Meio Líquido e Frações Metanol e Acetato	65
3.6.2. Fração Hexano	65
3.7. ANÁLISE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COVS).....	65
3.7.1. Planejamento fatorial fracionário 2 ⁴⁻¹	65
3.7.2. Análises por HS-SPME-GC-MS	68
3.7.3. Determinação da resposta do planejamento fracionário	69
3.8. PROCESSAMENTO DE DADOS E <i>MOLECULAR NETWORKING</i>	70
3.8.1. Redes moleculares das amostras obtidas na curva de crescimento.	70
3.8.2. Redes Moleculares das Amostras Obtidas Durante a Aplicação da Estratégia OSMAC	72
3.8.2.1. Análise dos Extratos Brutos e Frações Acetato e Metanol	72
3.8.2.2. Análise das Frações Hexano.....	72
3.8.3. Redes Moleculares das Análises de Voláteis	73
3.9. ENSAIO CITOTÓXICO	73
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
4.1. CURVA DE CRESCIMENTO	74
4.1.1. Análises HPLC-DAD das amostras da curva de crescimento	76
4.1.2. Redes moleculares das amostras da curva de crescimento.....	78
4.1.2.1. Rede molecular das análises em modo positivo das amostras da curva de crescimento	78
4.1.2.2. Rede molecular das análises em modo negativo das amostras da curva de crescimento	83
4.2. CULTIVO DO FUNGO <i>A. ATROROSEUM</i> EM 5 MEIOS DE CRESCIMENTO DISTINTOS	88
4.2.1. Análises HPLC-DAD das Frações AcOEt e MeOH e das Amostras PDB e MLT.....	90

4.2.2. Construção das Redes Moleculares das Frações AcOEt e MeOH e das Amostras PDB e MLT	93
4.2.2.1. Redes moleculares das análises em modo negativo.....	93
4.2.2.2. Rede molecular das análises em modo positivo.....	100
4.2.3. Análise das Frações Hexânicas por GC-MS	107
4.2.4. Redes moleculares das frações hexânicas analisadas por GC-MS	112
4.3. ANÁLISE DE VOLÁTEIS	118
4.3.1. Respostas Obtidas nos Experimentos Realizados	118
4.3.2. Análise de Efeitos Principais das Variáveis	119
4.3.3. Perfil químico volátil de <i>Annulohypoxylon atroroseum</i>	120
4.3.4. Rede Molecular de COVf produzidos por <i>Annulohypoxylon atroroseum</i> ..	123
4.4. ANÁLISE CITOTÓXICA.....	126
5. CONCLUSÃO.....	128
REFERÊNCIAS.....	130

1. INTRODUÇÃO

1.1. PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Produtos naturais desempenham um papel fundamental na descoberta e desenvolvimento desde tratamentos rudimentares derivados de conhecimento popular na antiguidade até fármacos com altíssimo grau tecnológico na contemporaneidade (Felisberto, Ramos e Moreira, 2022; Viegas Jr., Bolzani e Barreiro, 2006). Alguns dos exemplos mais relatados do uso embrionário de produtos naturais estão descritos no Papiro de Ebers, um documento do Antigo Egito datado do século XVI a.C., e no livro Pen T'Sao, um compilado chinês que descreve 365 drogas derivadas de plantas medicinais datado do século XXVI a.C. (Franke, Scholl e Aigner, 2019; Petrovska, 2012).

Esses registros antigos mostram a aplicação de produtos naturais utilizados até os dias de hoje, como as plantas medicinais babosa (*Aloe vera*), canela (*Cinnamomum verum*) e hortelã (*Mentha spicata*), derivados de plantas como mirra, óleo de rícino, ginseng e cânfora, e até produtos de origem animal como o mel e o leite (Carpenter *et al.*, 1998; Petrovska, 2012).

Desde então, o papel dos produtos naturais na descoberta de novos fármacos permanece central, embora o interesse por Produtos Naturais (PN) tenha diminuído na década de 60, quando a indústria farmacêutica apostou na química combinatória e química medicinal para o desenvolvimento de fármacos (Viegas Jr., Bolzani e Barreiro, 2006). Em seguida, houve o fortalecimento pelo interesse em PN devido à complexidade e ineditismo de moléculas bioativas de fontes naturais, que seguem inspirando os cientistas na busca por novos agentes terapêuticos. Diversos medicamentos amplamente utilizados na clínica médica moderna são oriundos direta ou indiretamente de substâncias naturais.

Alguns dos principais exemplos são a *morphine* **(1)**, utilizada amplamente como analgésico e indutor de sono, descoberta nos primeiros anos do século XIX (Ofoegbu e Ettiene, 2021); a *penicillin* **(2)**, isolada do fungo *Penicillium notatum* em 1928, um antibiótico que revolucionou o tratamento de doenças infecciosas a partir da sua disponibilidade em 1941 (Iskandar *et al.*, 2022); os alcaloides *vincristin* **(3)** e *vinblastin* **(4)** isolados de *Catharanthus roseus*, medicamentos anticâncer descobertos em 1958 (Banyal *et al.*, 2023); o *paclitaxel* **(5)**, comercializado sob o nome Taxol®, um diterpeno também anticâncer isolado da casca de *Taxus brevifolia* em 1967 (Yang, Mao e Tan,

2020); e mais recentemente, a *artemisinin* (6), isolada da planta *Artemisia annua*, que apresentou ação mais rápida que todos os medicamentos já conhecidos contra a malária, rendendo o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2015 a Tu Youyou, cientista chinesa que descobriu o composto (Tu, 2011). Na figura 1 a seguir, estão representadas as estruturas químicas dos compostos citados.

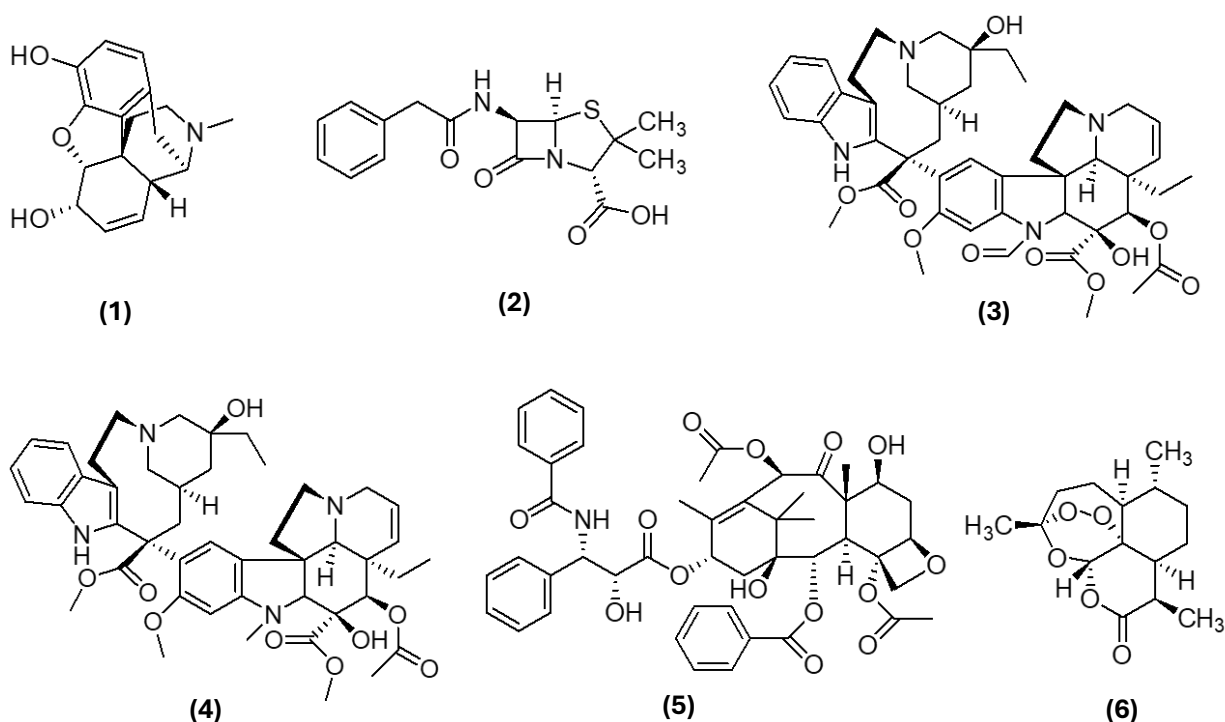


Figura 1: Estruturas das substâncias *morphine* (1), *penicillin* (2), *vincristin* (3), *vinblastin* (4), *paclitaxel* (5) e *artemisinin* (6).

Fonte: elaborado pelo autor, 2025.

Essa variedade estrutural e funcional dos compostos naturais reflete não apenas a diversidade química da natureza, mas também a adaptabilidade metabólica dos organismos produtores. Nas últimas décadas, os ecossistemas marinhos emergiram como uma fronteira especialmente promissora para a prospecção de novas substâncias bioativas, em função de sua grande biodiversidade e das condições ambientais diferentes do ambiente terrestre que podem favorecer a síntese de metabólitos distintos (Carroll *et al.*, 2024).

Organismos marinhos como algas, esponjas, moluscos e microrganismos simbiotes têm se destacado como fontes ricas de compostos com potencial terapêutico, cosmético e nutracêutico (Carroll *et al.*, 2024). Por estes motivos, a química de produtos naturais tem sido direcionada para a prospecção dessa

quimiodiversidade associada aos organismos marinhos, área de pesquisa ainda defasada, se comparada com organismos terrestres.

1.2. DIVERSIDADE QUÍMICA DE ORGANISMOS MARINHOS

Os oceanos são responsáveis por mais de 70% da cobertura da superfície do planeta Terra e foi berço dos primeiros organismos vivos terrestres, há mais de 3,5 bilhões de anos. Com o passar do tempo, a diversidade molecular foi favorecida por condições marinhas extremas como disponibilidade de oxigênio e de nutrientes, luminosidade, alta concentração de íons cloreto, sódio, sulfato e magnésio, entre outros. Nesse contexto, uma grande variedade em termos de estrutura e características funcionais de substâncias químicas é verificada entre os produtos naturais marinhos (PNM) e isto se reflete em uma incidência mais elevada de bioatividades significativas em relação a produtos naturais terrestres (Romano, 2017; Jiménez, 2018; Carroll, 2024).

Por exemplo, há fármacos utilizados atualmente cujas origens remetem a produtos naturais marinhos. Dentre eles, pode-se citar a *cephalosporin* (**7**), um antibiótico beta-lactâmico comercializado desde a década de 60 que foi extraído do fungo *Cephalosporium acremonium*, isolado de amostras de água do mar em 1948 por Giuseppe Brotzu. A investigação surgiu a partir da hipótese de que banhistas de uma praia da Sardenha raramente contraíam febre tifóide ou dermatites, mesmo com o contato direto e a ingestão da água do mar, considerada uma possível fonte de infecção (Bo, 2000; Flynn, 2013) (Figura 2). Outros exemplos são o AZT (*zidovudin*) (**8**), antiviral isolado da esponja *Tethya crypta* utilizado no tratamento contra a AIDS (Sheejin, 2024); *kainic acid* (**9**), anti-helmíntico e inseticida extraído de *Digenea simplex*, uma alga vermelha (Maeno, 2019); *trabectedin* (**10**), um alcaloide isolado do tunicado *Ecteinascidia turbinata* utilizado como medicamento anticâncer (D'Incalci, 2010); e os ácidos graxos derivados de peixes EPA (*eicosapentaenoic acid*) (**11**) e DHA (*docosahexaenoic acid*) (**12**), que podem ser comercializados como medicamentos, mas são principalmente utilizados como suplementos nutracêuticos para controle de triglicerídeos, além de possuir atividade anti-inflamatória (Von Schacky, 2021).

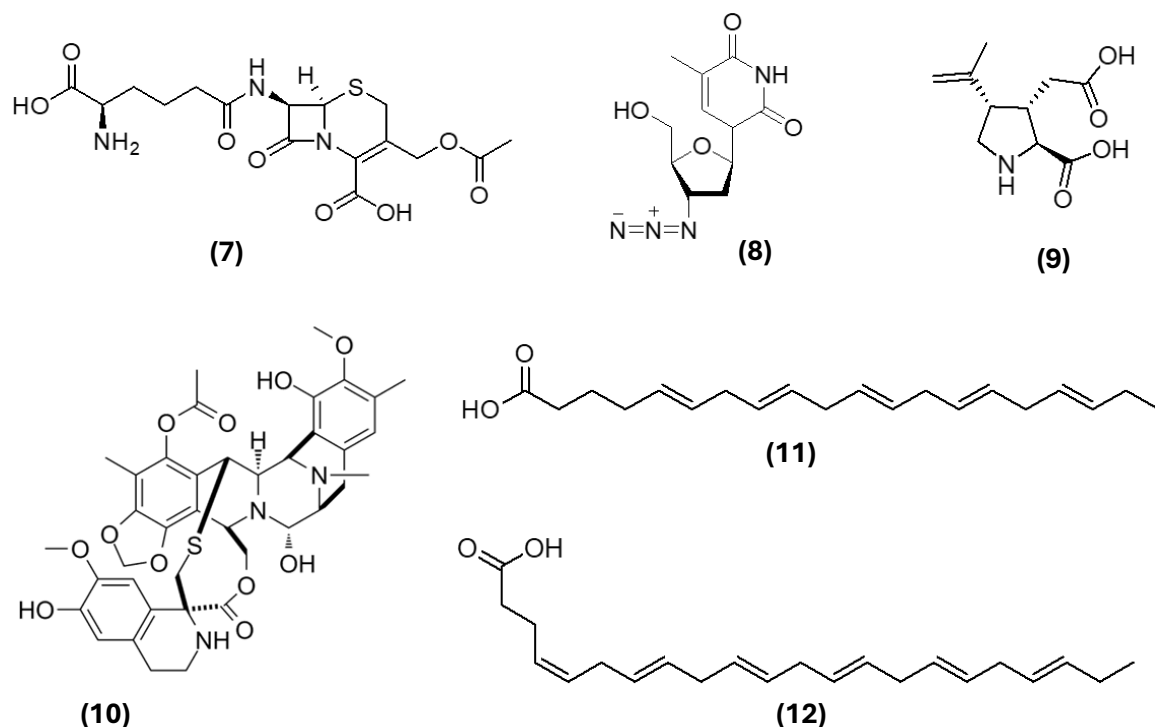


Figura 2: Estruturas das substâncias *cephalosporin* (7), *AZT* (8), *kainic acid* (9), *trabectedin* (10), *EPA* (11) e *DHA* (12).

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

A equipe coordenada por Carroll publica anualmente uma revisão das descobertas de novos produtos naturais marinhos (PNMs) nos últimos anos e em 2024 compilaram dados que refletem a diversidade biológica e o foco da pesquisa em diferentes grupos taxonômicos. O gráfico 1 a seguir demonstra a quantidade de compostos naturais inéditos isolados entre 2019 e 2023, distribuídos por diferentes fontes biológicas marinhas e costeiras. Observa-se que os fungos se destacam como os principais produtores de novas substâncias nesse período. Essa tendência corrobora a crescente atenção dada aos microrganismos que, apesar de historicamente subexplorados, vêm demonstrando elevado potencial biossintético de substâncias atrativas para o desenvolvimento de agentes terapêuticos. Além disso, organismos como esponjas e cnidários continuam sendo fontes importantes de PNM, sustentando seu papel tradicional na prospecção de produtos bioativos marinhos (Carroll *et al.*, 2024).

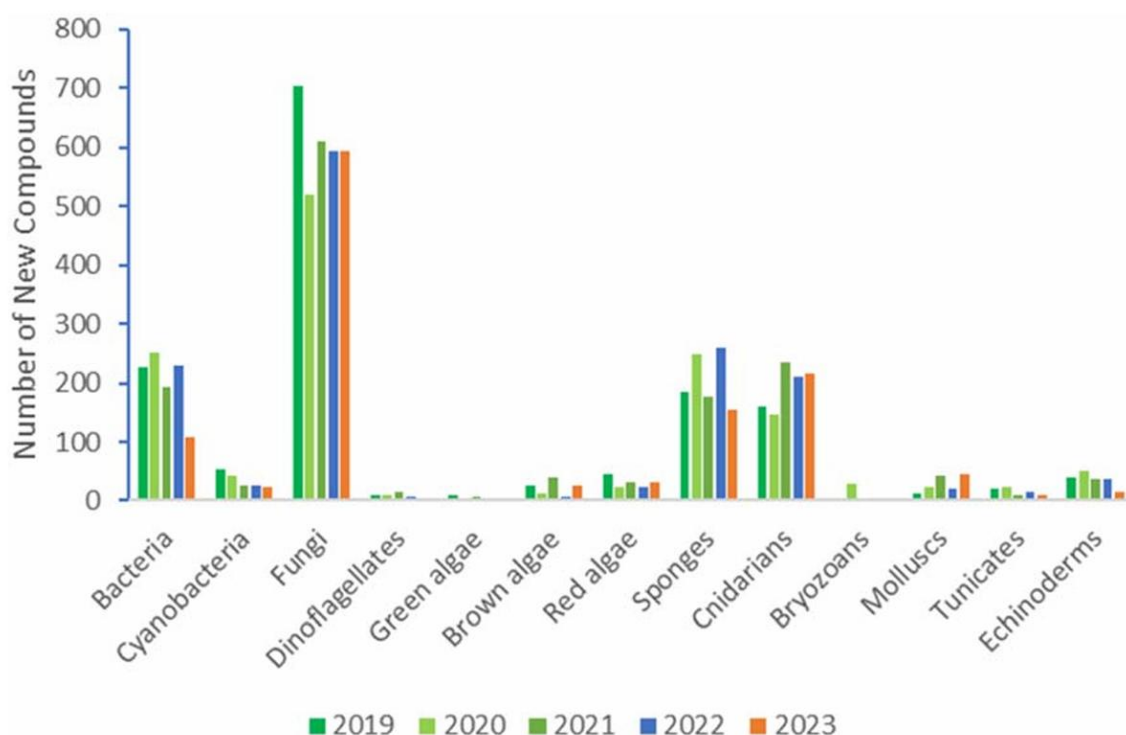


Gráfico 1: Tendências em novos Produtos Naturais Marinhos. As barras representam o número total de novos PNMs relatados a cada ano nos últimos cinco anos.

Fonte: Carroll et al., 2024.

Esses dados reforçam a relevância dos microrganismos marinhos como fontes estratégicas para a química de produtos naturais. Dentre esses microrganismos, os fungos associados a organismos marinhos ganham destaque com um número expressivo de metabólitos descritos nos últimos anos, demonstrando a importância de investigar a quimiodiversidade deste grupo.

O Brasil, por sua vez, possui uma das maiores zonas costeiras do planeta, com 7.491 km de extensão e oito ecossistemas costeiros distintos, que abrigam uma das maiores biodiversidades marinhas conhecidas, ainda amplamente subexplorada (Haddad e Araújo, 2025). Estima-se que cerca de 90% da biomassa marinha seja composta por microrganismos e que, entre as mais de 300.000 espécies de organismos marinhos catalogados, já tenham sido identificadas aproximadamente 12.000 novas substâncias químicas, muitas com potencial farmacológico (Cavicchioli *et al.*, 2019). Dentre as fontes mais relevantes para a descoberta de novos compostos bioativos, destacam-se bactérias, fungos, esponjas, corais e algas, reforçando o papel dos microrganismos simbiotes como promissores alvos na bioprospecção marinha (Brinkmann, Marker e Kurtböke, 2017).

Além da relevância científica, a prospecção de produtos naturais marinhos insere-se em um contexto de valorização da biodiversidade e da sustentabilidade oceânica. A Organização das Nações Unidas instituiu o período de 2021 a 2030 como a Década da Ciência Oceânica para o Desenvolvimento Sustentável, mobilizando esforços globais para ampliar o conhecimento sobre os ecossistemas marinhos e suas aplicações tecnológicas (UNESCO, 2021).

1.2.1. A Alga Vermelha *Dichotomaria marginata* como fonte de PNM e como Hospedeira Simbiótica

Algas são organismos autotróficos e pertencem a um dos grupos com maior diversidade de organismos em quesitos de tamanho, complexidade estrutural e morfologia. Por serem capazes de realizar fotossíntese, assumem o papel de produtores primários de energia em diversas cadeias alimentares marinhas. Entretanto, por causa de tantas diferenças morfológicas, esse grupo geralmente é subdividido em microalgas (fitoplânctons) e macroalgas (Pereira, 2021).

As macroalgas por sua vez são classificadas de acordo com os pigmentos que produzem: as algas verdes, pertencentes ao filo Chlorophyta, produzem os pigmentos clorofila A e B e carotenoides idênticos aos de plantas vasculares; as pertencentes ao filo Rhodophyta são as algas vermelhas e produzem clorofila A, ficobilinas e também alguns carotenoides; e as que pertencem ao filo Ochrophyta são as algas pardas e produzem clorofila A e B e carotenoides, predominantemente a fucoxantina (de Reviers e Franceschini, 2006; Pereira, 2021).

Entre os organismos marinhos estudados, as algas vermelhas se destacam pela diversidade morfológica e ecológica, e vêm sendo alvo crescente de prospecção microbiológica. A espécie *Dichotomaria marginata* é de interesse por sua ampla distribuição geográfica e por hospedar microrganismos simbiotes promissores do ponto de vista químico (Garcia *et al.* 2020; Honório, 2018).

A espécie *Dichotomaria marginata* (figura 3) é uma Rhodophyta cuja classificação taxonômica geral está descrita no quadro 1 a seguir:



Figura 3: *Dichotomaria marginata*.
Fonte: Foto do autor (2023).

Reino	Filo	Classe	Ordem
Plantae	Rhodophyta	Florideophyceae	Nemaliales
Família		Gênero	Espécie
Galaxauraceae		<i>Dichotomaria</i>	<i>Dichotomaria marginata</i>

Quadro 1: Classificação taxonômica da alga vermelha *Dichotomaria marginata*.
Fonte: Guiry & Guiry, 2025.

Além da sua relevância ecológica como produtora primária em ambientes marinhos e, portanto, sendo a base de várias cadeias alimentares, a alga *D. marginata* teve seu potencial de servir como bioindicador de poluições marinhas estudado por Garcia *et al.* (2020). Algumas características estruturais da alga permitem a adsorção e o acúmulo de contaminantes do ambiente marinho: sua parede celular é composta por polissacarídeos sulfatados, que contém grupos funcionais capazes de interagir eletrostaticamente com metais pesados e outros poluentes. Essa capacidade permite que seja possível identificar a qualidade da água e detectar poluentes através da análise de compostos presentes nas suas células.

Apesar de serem escassos os trabalhos focados em produtos naturais especificamente desta alga, *Dichotomaria marginata* já foi prospectada como possível fonte de substâncias bioativas em 1997, por Sheu *et al.* que descreveram a

identificação de quatro novos desmosterois oxigenados (figura 4) isolados de extratos de *D. marginata*, ainda identificada como *Galaxaura marginata* à época. Nesse estudo, os mesmos esteróis apresentaram alta atividade citotóxica frente a células P-388, KB, A-549 e HT-29 (células de leucemia linfocítica de camundongos, de carcinoma epidermoide oral humano, de adenocarcinoma de pulmão humano e células de adenocarcinoma de cólon humano, respectivamente).

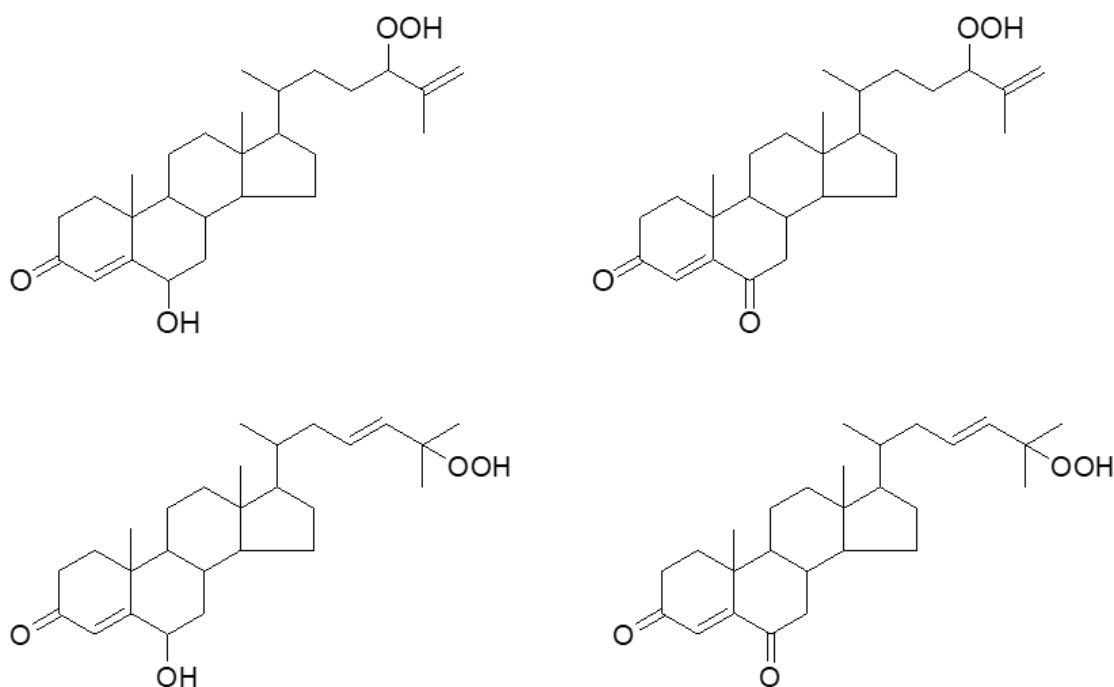


Figura 4: Desmosterois isolados de *Galaxaura marginata* (sin. *Dichotomaria marginata*) que apresentaram atividade citotóxica.

Fonte: Sheu *et al.*, 1997.

Outro estudo para avaliar bioatividades deste organismo foi conduzido por Rozas e Freitas (2007) e utilizou *D. marginata* coletada em águas rasas do canal de São Sebastião no litoral norte do Estado de São Paulo. Os autores demonstraram que o extrato de baixa polaridade desta alga possui atividade anti-inflamatória quando utilizado para tratamentos *in vivo* em camundongos.

Além destes compostos produzidos pela própria alga, espécies de microrganismos em relação mutualística com este organismo também podem ser fontes relevantes de metabólitos bioativos. Diversos fungos endofíticos isolados de *D. marginata* demonstraram potencial químico promissor. Dentre eles, destacam-se *Fusarium solani*, produtor de substâncias como *xanthotoxol* (**13**), *anhydrojavanicin* (**14**), *fusarin A* (**15**) e *agistatin-D* (**16**), com atividades citotóxicas e antimicrobianas descritas na literatura. Outro fungo isolado desta alga, *Colletotrichum gloeosporioides*,

também foi identificado como fonte de compostos como *gloeosporone* (17) e *colletotric acid* (18). Por fim, o fungo *Hypoxylon monticulosum* produziu uma ciclohexadiona inédita (19) e *dihydrosporotriolide* (20) (Honório, 2018).

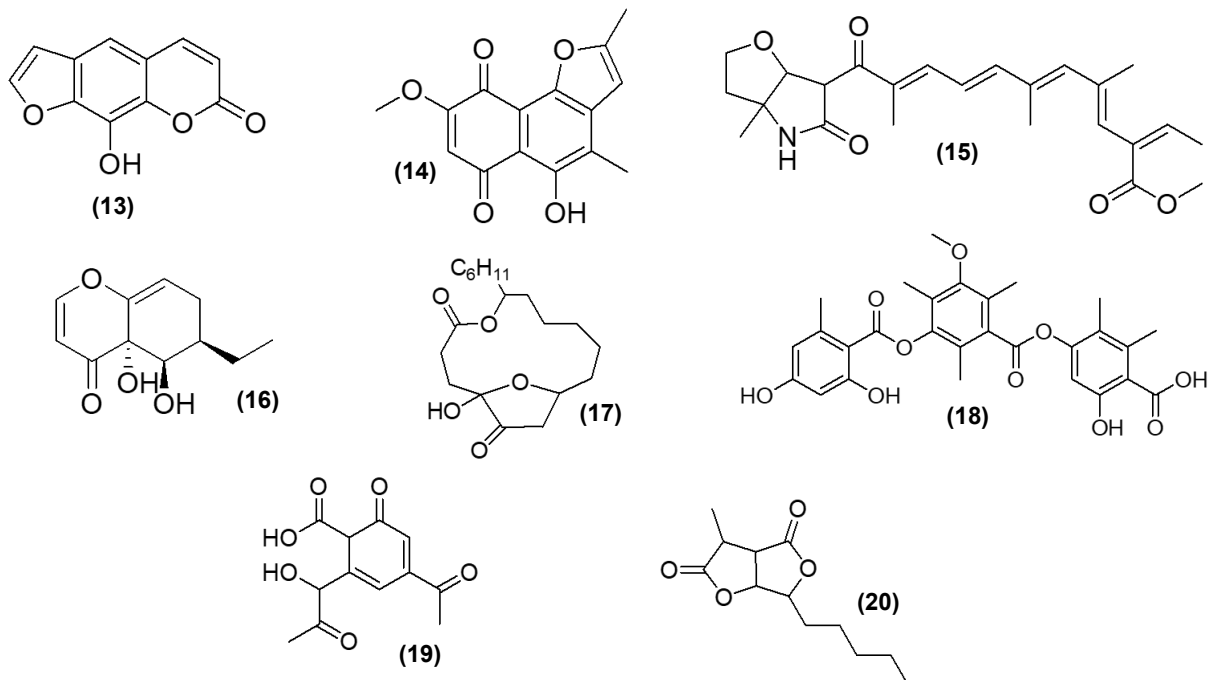


Figura 5: Estruturas das substâncias *xanthotoxol* (13), *anhydrojavanicin* (14), *fusarin* (15), *agistatin-D* (16), *gloeosporone* (17), *colletotric acid* (18), ciclohexadiona inédita (19) e *dihydrosporotriolide* (20).
Fonte: Honório, 2018.

Pode-se notar a partir das substâncias da figura 5 uma ampla diversidade de compostos oriundos de diferentes microrganismos associados à espécie *D. marginata*. Esta variedade de espécies fúngicas associadas e de compostos identificados implica na importância da prospecção de microrganismos e de substâncias bioativas utilizando esta matriz como fonte de análise.

1.3. FUNGOS

Fungos são microrganismos eucariontes que se subdividem de acordo com sua organização celular em leveduriformes (unicelulares) e filamentosos (pluricelulares). Em conjunto com as bactérias, são os seres vivos mais dispersos, sendo encontrados em quase todos os ecossistemas, até mesmo em ambientes com condições extremas. Ocupando a posição de decompositores nas cadeias alimentares, são responsáveis principalmente por decompor resíduos orgânicos, contribuindo para os ciclos de carbono e de nutrientes (Maria, Moraes & Paes, 1995).

Além de seus serviços ecológicos e ambientais, fungos também são utilizados em diversas técnicas e tecnologias pelos seres humanos durante a história da civilização. Algumas leveduras, por exemplo, principalmente as do gênero *Saccharomyces*, tem seu histórico de utilização em processos de fermentação de bebidas pelos mesopotâmios que datam de pelo menos 80 séculos atrás. Pouco depois, a aplicação se expandiu para comidas através da adição de frutas à farinha de trigo, auxiliando a fermentação e criando assim o registro dos primeiros pães. Essas técnicas de fermentação passaram por diversos processos de refinação até que se tornassem técnicas hegemônicas na área da gastronomia (Niego *et al.*, 2023).

Assim como as leveduras, fungos filamentosos também são utilizados há séculos em processos de fermentação, principalmente no continente asiático, na produção de molho shoyu e missô no Japão, e tempeh, de origem indonésia; todos produzidos a partir de fermentação de grãos de soja (Hong *et al.* 2015).

Fora suas aplicações históricas na tecnologia de alimentos que permanecem até os dias atuais, fungos atualmente são utilizados como fontes alimentares diretas e indiretas, de biomateriais e de compostos bioativos, nutracêuticos e cosmeceuticos (Badalyan *et al.*, 2022; Niego *et al.*, 2023).

A substância bioativa derivada de fungos mais amplamente difundida e utilizada é a penicilina **(21)**, antibiótico isolado de *Penicillium spp.*, descoberto por Fleming em 1929 e que revolucionou a história da medicina moderna. É possível citar também outras substâncias relevantes de origem fúngica como *compactin* **(22)**, isolada da espécie *Penicillium citrinum*, que deu origem a diversos medicamentos cardiovasculares semi-sintéticos (Niego *et al.*, 2023); *griseofulvin* **(23)**, antifúngico usado para tratar infecções de pele, cabelo e unhas, isolada de *Penicillium griseofulvum* (Gupta *et al.*, 2017); *fusidic acid* **(24)**, isolado de *Ramularia coccinea*, utilizado como antibiótico com ação principalmente contra estafilococos (Fernandes, 2016); e *emodepside* **(25)**, um antiparasitário utilizado no controle de nematoides que tem por origem metabólitos especializados de *Rosellinia sp* (Wittstein *et al.*, 2020).

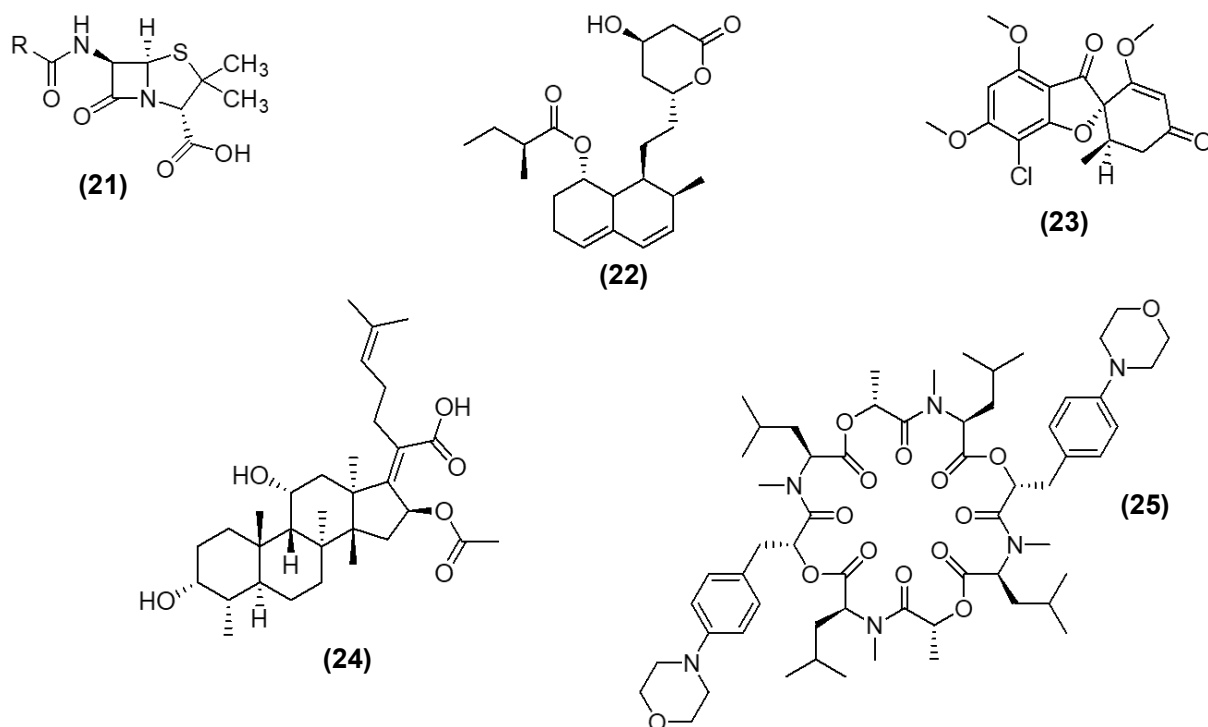


Figura 6: Estrutura das substâncias penicilina (21), *compactin* (22), *griseofulvin* (23), *fusidic acid* (24), *emodepside* (25).

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Diante da importância ecológica, econômica e biotecnológica e da diversidade de aplicações dos fungos demonstradas, amplia-se o interesse científico por grupos que habitam nichos específicos e apresentam potencial metabólico ainda pouco explorado. Dentre microrganismos que adotam tantos diferentes modos de vida, é possível destacar aqueles que habitam o ambiente marinho e aqueles capazes de colonizar os tecidos internos de outros organismos, estabelecendo interações discretas, proveitosas e duradouras. Através das diferenças na biodisponibilidade de nutrientes, essas interações fornecem aos fungos a capacidade de produzir novos compostos potencialmente úteis que ainda carecem de prospecção (Rungjindamai & Jones, 2024).

1.3.1. Fungos endofíticos

Fungos endofíticos são microrganismos que colonizam, sem causar danos, os tecidos internos de outros organismos durante, pelo menos, uma parte de seu ciclo de vida (Petrini, 1991). O fungo resiste ao sistema imunológico do hospedeiro, não causa sintomas aparentes de doenças, e estabelece com ele interações de

comensalismo ou mutualismo, consumindo nutrientes que ele produz ou absorve do ambiente externo, o que pode resultar na produção de metabólitos especializados com grande diversidade estrutural e funcional (Rajamanikyam *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2021).

Esses fungos podem colonizar uma ampla gama de hospedeiros, incluindo plantas de ambientes terrestres e organismos marinhos, como algas e esponjas (Martinez-Klimova e Rodríguez-Peña, 2017). Do ponto de vista químico, os fungos endofíticos destacam-se como fontes prolíficas de metabólitos especializados, sendo capazes de produzir compostos com alta diversidade estrutural, muitas vezes influenciada pelas condições ambientais ou pela interação com o hospedeiro (Toghueo, Sahal e Boyom, 2020).

Há uma gama de atividades biológicas que podem sugerir aplicações biotecnológicas para os metabólitos produzidos por fungos que se adaptam a este estilo de sobrevivência. Entre elas, podem ser citadas, por exemplo, a atividade anti-neuroinflamatória da *oxaline* (**26**), extraída de *Penicillium oxalicum* isolado de uma esponja marinha (Kim *et al.*, 2022); atividade antifúngica dos composto *chrysazin* (**27**), isolado do fungo *Beauveria bassiana*, também retirado de uma esponja (Yamazaki *et al.*, 2012); atividade antioxidante atribuídas à presença de subestrutura quinoide no policetídeo *glycylrubropunctatin* (**28**) isolado de *Talaromyces verruculosus*, endofítico de corais (Lebeau, 2017); e atividade citotóxica de *wentilactone B* (**29**) do fungo endofítico de alga *Aspergillus wentii* (Kamat *et al.*, 2020).

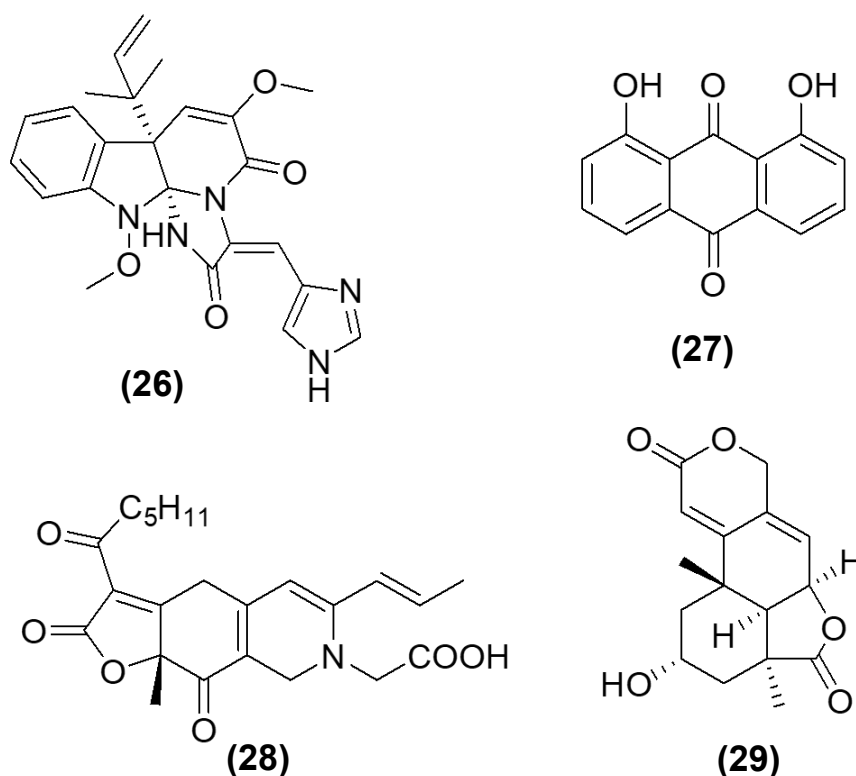


Figura 7: Estrutura das substâncias *oxaline* (26), *chrysazin* (27), *glycylobropunctatin* (28) e *wentilactone B* (29).

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

1.3.1.1. Quimiodiversidade e importância biotecnológica do gênero *Annulohypoxylon*

O gênero *Annulohypoxylon*, pertencente à família Hypoxylaceae (ordem Xylariales), é composto por mais de 40 espécies descritas, com ampla distribuição geográfica em regiões tropicais e temperadas (Sudarman *et al.*, 2016). Historicamente, as espécies deste gênero eram agrupadas dentro de *Hypoxylon*, sendo posteriormente segregadas com base em dados morfológicos, moleculares e químicos, em especial a partir dos estudos conduzidos por Hsieh e colaboradores em 2005. Tal distinção foi reforçada por abordagens quimiosistemáticas que revelaram padrões de produção de metabólitos específicos, como por exemplo a produção, por espécies do gênero *Annulohypoxylon*, de azafilonas como principal pigmentos presentes nas estruturas celulares desses fungos (Becker *et al.*, 2020).

Para a química de produtos naturais, o gênero *Annulohypoxylon* destaca-se por sua capacidade de produzir uma ampla gama de metabólitos especializados. Entre os metabólitos mais característicos do gênero estão o 1,1'-binaphthalene-4,4',5,5'-tetrol

(BNT) (figura 8), presente em várias espécies estudadas, além de seus derivados oxidados: truncatonas, as daldinonas e hipoxilonóis, compostos pertencentes à classe dos benzo[*j*]fluorantenos (Becker *et al.*, 2020).

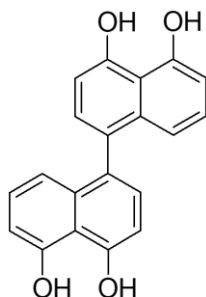


Figura 8: Estrutura do BNT
Fonte: elaborado pelo autor (2025)

Apesar de não ter sido detectado o BNT em seu estudo, Becker *et al.* (2020) isolaram e identificaram os derivados *viridistratins* A, B e C (**30**, **31** e **32**) e *truncatonas* A e C (**33** e **34**) do fungo *A. viridistratum* coletado de uma árvore não identificada em uma floresta tropical na Tailândia (Becker *et al.*, 2020). Em 2016, foram isoladas e identificadas novas truncatonas a partir do extrato de *Annulohypoxylon cf. truncatum*, ou seja, um microrganismo com características compatíveis com *A. truncatum*, porém sem confirmação definitiva de que se tratava da espécie (Sudarman *et al.*, 2016). Em ambos os estudos, os autores sugerem que as viridistratinas e as truncatonas podem ser consideradas marcadores quimiotaxonômicos dessas espécies.

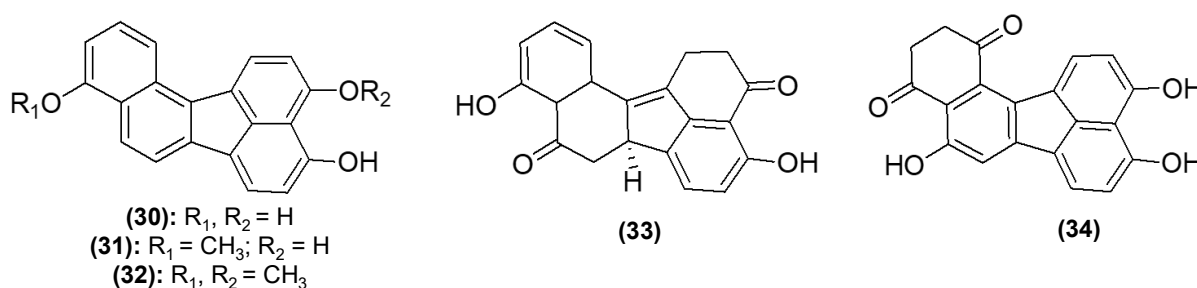


Figura 9: Estrutura das substâncias *viridistratins* A, B e C e *truncatonas* A e C.
Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Em outras pesquisas, as espécies *A. cohaerens*, *A. minutellum*, *A. multiforme* e *A. boveri* foram investigadas e registraram a produção de azafilonas, incluindo *cohaerin* (**35**), *minutelin* (**36**), *multiformin* (**37**) e *annulohypoxyboverin* (**38**) derivados de um mesmo esqueleto policetídico e considerados marcadores quimiotaxonômicos (Cheng *et al.*, 2011; Kuhnert *et al.*, 2017; Quang *et al.*, 2006; Surup *et al.*, 2013).

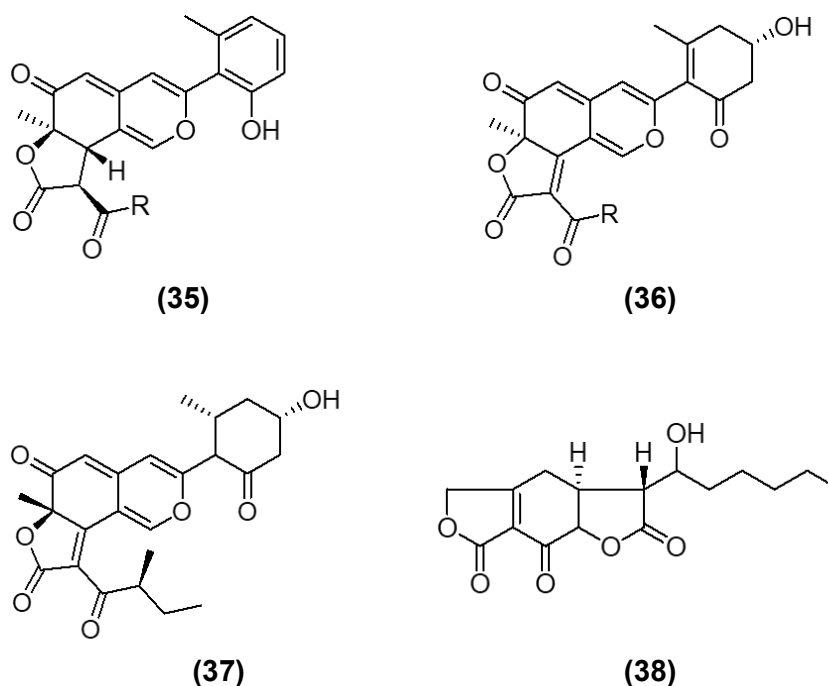


Figura 10: Estrutura das substâncias *cohaerin* (35), *minutelin* (36), *multiformin* (37) e *annulohypoxyboverin* (38).
Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Nos últimos anos, cresceu o interesse sobre 7 novas multiforminas que foram isoladas e identificadas a partir de extratos do fungo *Jackrogersella multiformis*, uma espécie que fora anteriormente caracterizada como pertencente ao gênero *Annulohypoxyton*. Pesquisas recentes demonstraram que essas substâncias são capazes de inibir a interação entre a proteína Spike do SARS-CoV-2 e o receptor ACE2 em ensaios de microarranjos de proteínas, além de reduzir significativamente a infecção de células Calu-3 por pseudovírus com proteína Spike. Esses resultados reforçam o potencial farmacológico das multiforminas, ampliando suas perspectivas para o desenvolvimento de novos agentes antivirais (Jansen-Olliges *et al.*, 2023).

Do ponto de vista biotecnológico, os compostos produzidos por *Annulohypoxyton* exibem um amplo espectro de possíveis aplicações, com destaque para citotoxicidade, atividade antifúngica, antibacteriana e efeitos antidiabéticos, como observado para o *hypoxytonol C* (39) isolado de *A. annulatum*, que demonstrou proteção celular contra danos induzidos por estreptozotocina em células INS-1 (Lee *et al.*, 2019). Em outra instância, *hypoxytonol F* (40), também produzido por *A. annulatum*, apresentou atividade de estimulação de secreção de insulina por células β -pancreáticas, com potencial uso no tratamento de diabetes (Lee *et al.*, 2019).

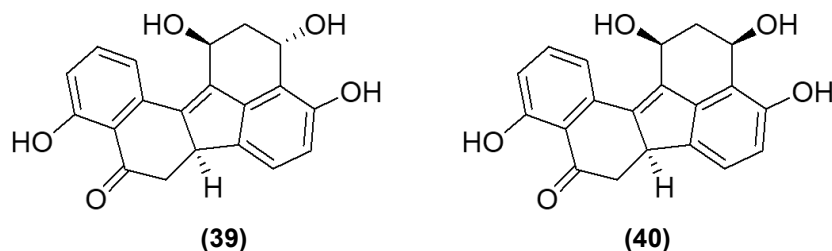


Figura 11: Estrutura das substâncias *hypoxylonol C* (39) e *F* (40).
Fonte: elaborado pelo autor (2025)

Outro composto biologicamente ativo do gênero *Annulohypoxylon* foi isolado da espécie *A. squamulosum*, proveniente de amostras de cascas de canela (*Cinnamomum sp.*), e denominado *annulosquamulin* (41). Essa substância exibiu citotoxicidade moderada frente às linhagens celulares cancerígenas MCF-7, NCI-H460 e SF-268 (Cheng *et al.*, 2012).

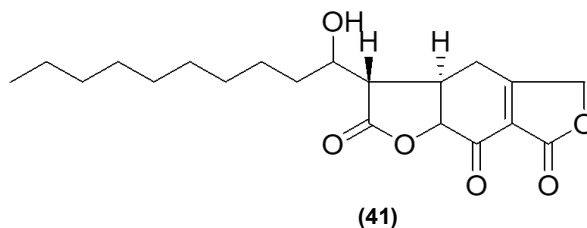


Figura 12: Estrutura da *annulosquamulin* (41).
Fonte: elaborado pelo autor.

Em termos biossintéticos, os metabólitos de *Annulohypoxylon* são majoritariamente derivados de rotas policetídicas, com a via da 1,8-dihidroxi-naftaleno (1,8-DHN) assumindo papel central na produção dos benzo[*jj*]fluoranthenos (Sudarman *et al.*, 2016). Estudos filogenômicos recentes têm reforçado a importância da quimiodiversidade como ferramenta na delimitação de espécies dentro da família Hypoxylaceae (Becker *et al.*, 2020).

A diversidade química observada no gênero não apenas reforça seu potencial para a descoberta de novas moléculas bioativas, mas também justifica a escolha de um representante deste grupo como objeto central da presente pesquisa. *A. atroroseum*, dentre as espécies do gênero, se mostra particularmente promissor por sua ocorrência em ambientes diversos e por apresentar coloração característica, que indica produção de compostos interessantes. Apesar disso, permanece pouco explorada quimicamente, o que motiva sua seleção como objeto de estudo nesta pesquisa.

1.3.1.1.1. *Annulohypoxylon atroroseum*

A espécie *Annulohypoxylon atroroseum*, objeto de estudo deste trabalho, é um fungo filamentoso amplamente distribuído em ambientes tropicais (Posta, 2023). É encontrado tanto em ambientes terrestres quanto em ambientes marinhos, podendo difundir-se independentemente ou em associação a outros organismos. *A. atroroseum* é anatomicamente similar a *A. stygium*, e ambas as espécies possuem discos ostiolares pequenos entre 0,1 e 0,2 mm de diâmetro. Sua principal diferença morfológica é a presença de estromas rosados em *A. atroroseum*, gerando a coloração que pode ser vista a olho nu e de onde deriva o seu nome (Cruz, 2020). Na figura 13 e no quadro 2 a seguir, estão uma foto do fungo cultivado em meio BDA em placa de petri e a classificação taxonômica do fungo *A. atroroseum*.



Figura 13: Cultivo de *Annulohypoxylon atroroseum* em meio BDA.

Fonte: foto do autor (2025).

Reino	Filo	Classe	Ordem
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales
Família	Gênero	Espécie	
Hypoxylaceae	<i>Annulohypoxylon</i>	<i>Annulohypoxylon atroroseum</i>	

Quadro 2: Classificação taxonômica do fungo *Annulohypoxylon atroroseum*

Fonte: Silva, Pereira e Pereira, 2020.

A quimiodiversidade de *Annulohypoxylon atroroseum* permanece pouco explorada na literatura, o que se reflete na escassez de registros e dados disponíveis sobre a espécie em repositórios acadêmicos. Ainda assim, algumas iniciativas de prospecção química envolvendo esse microrganismo têm sido conduzidas, como os exemplos discutidos a seguir.

Em estudo preliminar sobre o perfil químico desta espécie realizado por Honório (2020) mostra uma análise por CLAE-DAD do extrato bruto do fungo que apresentou registros de substâncias de baixa, média e alta polaridade; além de sinais no espectro RMN de ^1H referentes a hidrogênios metílicos, olefínicos, carbinólicos e aromáticos, bem como hidrogênios de fenóis, aldeídos e ácidos carboxílicos, consistentes com uma ampla quimiodiversidade.

Wang e colaboradores (2023) realizaram prospecção de uma cepa endófito de *Annulohypoxylon atroroseum* recuperado de folhas de *Citrus sinensis*, cultivando-o em meio de arroz. Desse cultivo, o estudo foi capaz de identificar nove compostos conhecidos: 6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin (42), xylariphilone (43), scytalone (44), trans-3,4-dihydro-3,4,8-trihydroxynaphthalen-1(2H)-one (45), cis-4-hydroxyscytalone (46), 8-hydroxyl-drimanol (47), pogostol (48), ergosterol (49) e (22E,24R)-ergosta-4,7,22-trien-3-one (50).

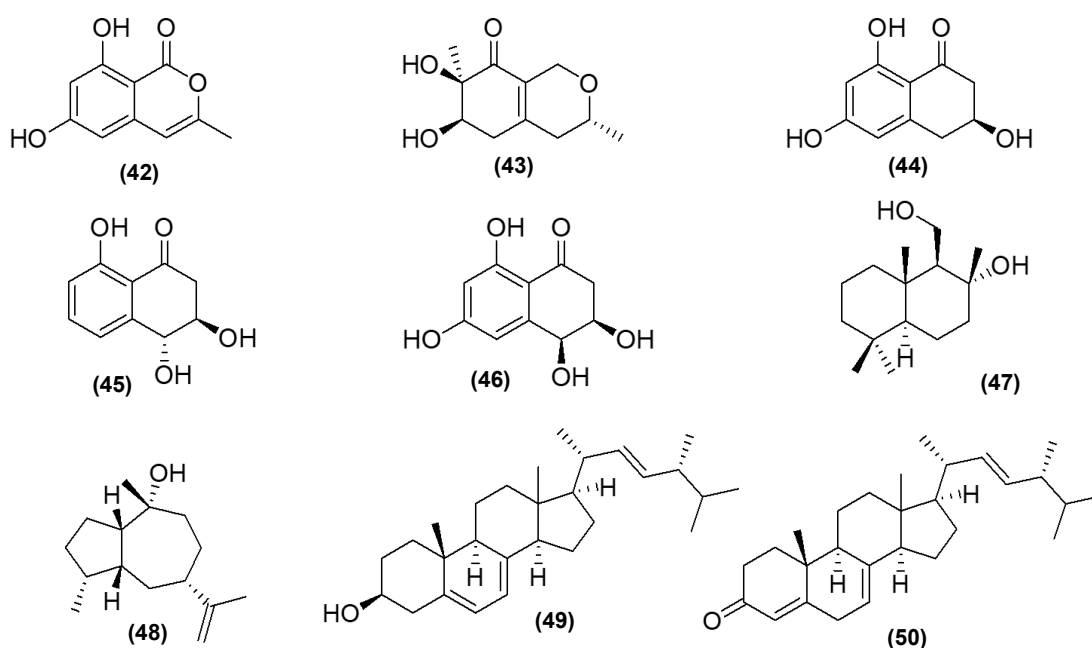


Figura 14: Estrutura das substâncias 6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin (42), xylariphilone (43), scytalone (44), trans-3,4-dihydro-3,4,8-trihydroxynaphthalen-1(2H)-one (45), cis-4-hydroxyscytalone (46), 8-hydroxyl-drimanol (47), pogostol (48), ergosterol (49) e (22E,24R)-ergosta-4,7,22-trien-3-one (50).

Fonte: Wang, 2023 (editado pelo autor).

Além de identificar estas substâncias, Wang *et al.* (2023) também testaram a atividade antibacteriana do extrato de *A. atroroseum* e das substâncias isoladas frente às bactérias *Staphylococcus aureus* (SA), *S. aureus* resistente a *methicillin* (MRSA), *Xanthomonas citri* e *Escherichia coli*. Apesar do extrato não ter apresentado atividade significativa, as substâncias **42**, **45** e **48** apresentaram efeito antibacteriano moderado para as bactérias SA, MRSA e *X. citri*.

Em um outro estudo, o extrato da cultura de *A. atroroseum* em meio de aveia demonstrou atividade antimicrobiana frente às bactérias Gram-negativas *Xanthomonas euvesicatoria* e *Ralstonia solanacearum* (Paguirigan *et al.*, 2024).

Apesar dos poucos estudos realizados especificamente com este microrganismo, os estudos apresentados e a riqueza de metabólitos produzidos pelo gênero *Annulohyphoxylon* indicam que *A. atroroseum* representa uma espécie promissora sob uma perspectiva quimiobiotecnológica, isto é, o potencial de sua quimiodiversidade em aplicações biotecnológicas.

1.4. AMPLIANDO A PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS

A prospecção de metabólitos de um organismo vivo e a elucidação completa de seu perfil químico, bem como o estudo de suas capacidades bioativas e as influências entre endófitos e hospedeiro, envolvem elevada complexidade experimental, e os resultados obtidos nem sempre refletem a totalidade do potencial do material de estudo.

A produção de metabólitos especializados segue rotas biossintéticas codificadas por genes, que ativam enzimas para a síntese dos compostos que o organismo necessita (Romano *et al.*, 2018). Fungos filamentosos possuem extensa variedade metabólica, que é restringida a depender do ambiente em que estão inseridos, já que a vizinhança de um organismo também pode afetar o desenvolvimento genômico das rotas biossintéticas citadas anteriormente (Brakhage, 2013).

Na rotina laboratorial, fungos são cultivados em ambientes controlados, em meios de cultivo com fontes de carbono simples e definidas, o que pode levar ao silenciamento gênico de algumas rotas metabólicas do microrganismo. Esse silenciamento pode afetar a total representação da quimiodiversidade de um fungo,

prejudicando assim a assimilação de seu potencial de produção metabólica (Fisch *et al.*, 2009).

Considerando essas questões, utilizar ferramentas para ampliar a investigação dos compostos produzidos por um fungo significa aprofundar o conhecimento sobre esse organismo, contribuindo para completar as lacunas silenciadas.

1.4.1. Estratégia OSMAC

Como discutido, fungos apresentam diferentes padrões de perfis metabólicos de acordo com as condições em que são cultivados. Considerando isso, a equipe do professor Dr. Axel Zeeck, do Instituto de Química Orgânica da Universidade de Göttinger, na Alemanha, desenvolveu o conceito da abordagem OSMAC (*One Strain – Many Compounds* ou Uma Cepa, Vários Compostos). Essa ferramenta se baseia na alteração sistemática de parâmetros de cultivo como composição do meio, aeração, adição de inibidores enzimáticos e até tipo de frasco de cultura com o objetivo de aumentar a diversidade de metabólitos especializados obtidos a partir de uma única fonte microbiana, ativando vias biossintéticas normalmente silenciosas (Bode *et al.*, 2002).

A alteração nas diversas condições de cultivo pretende ativar os genes que codificam as diversas rotas biossintéticas, a fim de obter um perfil metabólico mais abrangente, contendo substâncias produzidas pelas rotas adormecidas que foram, assim, ativadas (Bode *et al.*, 2002; Keller, 2019).

Essa estratégia tem sido amplamente utilizada e tem gerado aumento significativo na diversidade de metabólitos especializados de microrganismos identificados (Pan *et al.*, 2019). Carroll *et al.* (2024) apontam que a utilização dessa ferramenta pode gerar maior diversidade química de metabólitos produzidos por fungos marinhos, inclusive de compostos orgânicos voláteis, e está atrelada ao expressivo número de novos PNMs relatados no gráfico 1 (pág. 31).

1.4.2. Compostos Voláteis

Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) constituem uma porção diversa de metabólitos de baixa massa molecular e alta volatilidade, caracterizados por apresentarem elevada pressão de vapor à temperatura ambiente e por geralmente

apresentarem odor característico. Quimicamente, esses compostos englobam diferentes estruturas, como álcoois, ésteres, cetonas, terpenos, tióis e derivados aromáticos, como os fenil-propanoides, que refletem rotas biossintéticas complexas baseadas em precursores como acetato, chiquimato e mevalonato (Herrmann, 2010).

Hung, Lee e Bennett (2015) discutem que as pesquisas em COVs fúngicos (COVf) estão distribuídas em diversas áreas do conhecimento e, segundo os autores, os principais estudos sobre COVf, são conduzidos por razões econômicas.

Químicos de alimentos, por exemplo, analisam COVs de cogumelos por suas propriedades gustativas. Também há análises dos odores das comidas e bebidas fermentadas por ação de leveduras discutidas na seção 1.3. (Kinderlerer, 1989; Fraatz e Zorn, 2010).

Entre outras aplicações, há cientistas da área de construção civil que utilizam COVf como indicadores de crescimento de mofo em edificações; entomologistas os aplicam para atrair ou repelir certas espécies de insetos; e patologistas de plantações na agricultura os veem como metabólitos de estresse vegetal (Hung, Lee e Bennett, 2015).

Mais de 300 diferentes COVf de aproximadamente 100 espécies fúngicas foram compilados no banco de dados *mVOC*, criado por Lemfack *et al.* (2014) na Universidade de Rostock, Alemanha. Entretanto, pesquisadores da área enfatizam a função decompositora dos fungos no meio ambiente e sua capacidade de produção de enzimas que degradam substâncias químicas exógenas (Maria, Moraes & Paes, 1995; Hung, Lee e Bennett, 2015). Além disso, é mostrado que o perfil de COVf de cada espécie é altamente dependente do meio de cultivo empregado. Por causa disso, muitos COVf associados a uma determinada espécie não necessariamente são produzidos por processos anabólicos, mas podem ser produtos incidentais de quebras extracelulares do substrato (Hung, Lee e Bennett, 2015; Polizzi *et al.*, 2012).

Dentre as substâncias voláteis já detectadas em cultivos de fungos, é possível citar o álcool de cogumelos (*1-octen-3-ol*) (**51**), produzido por diversos tipos de fungos filamentosos, importante na indústria alimentícia e que pode ser usado como biomarcador de contaminação fúngica (Davis *et al.*, 2013); *chokol K* (**52**), produzido por *Epichle sp.*, que foi testado como atrator de insetos (Steinebrunner *et al.*, 2008); *geosmin* (**53**), que atua como sinal ecológico para diversos organismos (Stensmyr *et al.*, 2012); *5-pentyl-2-furaldehyde* (**54**), produzido por *Irpex lacteus*, que apresentou atividade antifúngica frente aos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum*

fragariae e *Botrytis cinerea* (Koitabashi *et al.*, 2004); e 6-pentyl- α -pyrone (55), produzida por *Trichoderma viride* e *T. harzianum*, que apresentou fitotoxicidade durante a formação de plântulas (El-Hasan and Buchenauer, 2009).

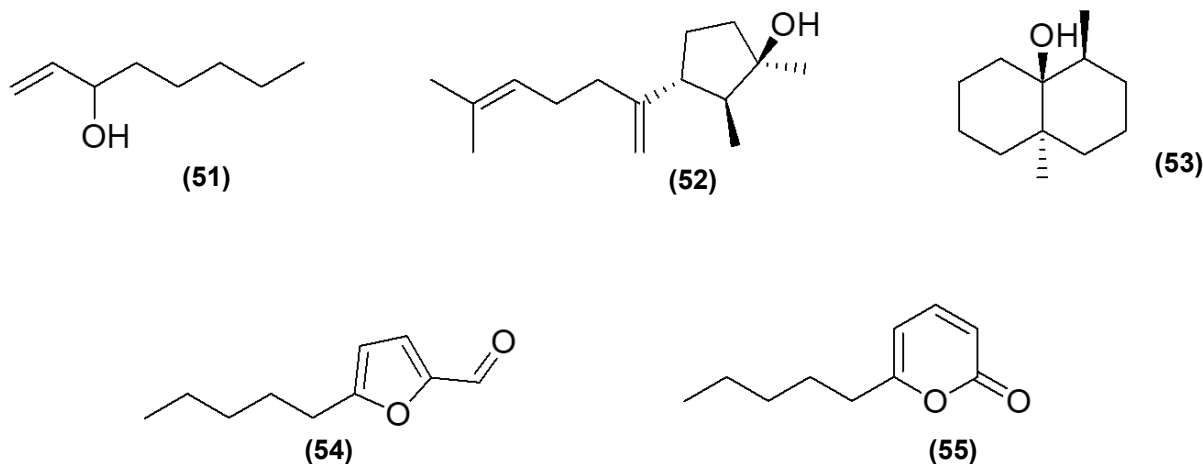


Figura 15: Estrutura dos COVf 1-octen-3-ol (51), chokol K (52), geosmin (53), 5-pentyl-2-furaldehyde (54) e 6-pentyl- α -pyrone (55).

Fonte: Hung, Lee e Bennett, 2015 (editado pelo autor).

Do ponto de vista químico, os COVf, que abrangem os componentes voláteis do metaboloma, também designado como “volatiloma”. São indicadores de rotas metabólicas específicas, refletindo substâncias que geralmente não são obtidas a partir de extrações por solvente, ou não são detectadas pelas análises convencionais desses extratos orgânicos. Sua detecção e caracterização ampliam o espectro químico acessado nos estudos com microrganismos, permitindo o reconhecimento de metabólitos que possuem relevância funcional e potencial biotecnológico. Dessa forma, a análise do volatiloma se estabelece como uma abordagem complementar em um mapeamento mais abrangente da quimiodiversidade de fungos endofíticos, de alta relevância para agregar valor aos produtos naturais de fungos e potencial para incrementar a bioeconomia.

1.5. ANÁLISES QUÍMICAS E TRATAMENTO DE DADOS

Considerando a complexidade e diversidade dos metabólitos especializados produzidos por fungos endofíticos, a caracterização química dessas substâncias requer o uso de ferramentas analíticas sensíveis e resolutivas. As seções a seguir descrevem características e potencialidades associadas a alguns dos principais métodos empregados na identificação estrutural de metabólitos, desde a separação

cromatográfica até a análise espectrométrica, incluindo abordagens modernas de interpretação de dados por redes moleculares.

1.5.1. Análises Cromatográficas

A complexidade estrutural e a baixa concentração relativa de muitos metabólitos especializados exigem estratégias analíticas capazes de promover a separação eficiente de misturas complexas. A cromatografia, nesse contexto, representa uma das ferramentas centrais no mapeamento da quimiodiversidade de extratos de fontes naturais, inclusive microbiana. Dentre as técnicas disponíveis, a cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) é amplamente utilizada na análise de extratos fúngicos, por se tratar de uma ferramenta analítica moderna, sensível e com alta resolução (Saldan *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2023).

Além de HPLC, métodos baseados em cromatografia gasosa (*Gas Chromatography* - GC), embora mais restritos à análise de compostos voláteis e termicamente estáveis, desempenham papel fundamental na investigação de COVf, para estabelecer a composição do volatiloma, como discutido anteriormente. A integração entre HPLC e GC constitui atualmente uma abordagem ampla de análise para a triagem de perfis metabólicos em extratos microbianos. A técnica de GC pode ser aplicada para auxiliar na determinação do perfil químico dos voláteis encontrados no extrato dos fungos, ou até mesmo da sua própria biomassa através do sistema de microextração em fase sólida (*Solid Phase Micro-Extraction* – SPME) e, juntamente com HPLC, desenvolver uma varredura mais ampla dos metabólitos produzidos pelo microrganismo (Li *et al.* 2023; Camele *et al.*, 2023).

Outra grande vantagem das técnicas analíticas cromatográficas é a possibilidade da hifenização da abordagem, especialmente com a Espectrometria de Massas (EM), transformando a análise metabolômica em um robusto método de separação e identificação das substâncias.

1.5.2. Análises Espectrométricas

A espectrometria de massas (*Mass Spectrometry* - MS) constitui uma das principais ferramentas analíticas utilizadas na caracterização de metabólitos

especializados de microrganismos, em especial de fungos endofíticos. Baseada na ionização das moléculas e posterior separação dos íons gerados com base em sua razão massa/carga (m/z), a técnica fornece informações valiosas sobre a massa molecular dos compostos e seus fragmentos e, em abordagens mais sofisticadas, permite a dedução de estruturas químicas por meio de padrões de fragmentação (Silverstein *et al.*, 2019)

A associação da MS com técnicas cromatográficas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (*Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry* – LC-MS) e a cromatografia a gás (*Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry* – GC-MS), discutidas na seção anterior, são amplamente empregadas nas análises de extratos complexos, por possibilitar a separação prévia dos componentes e o registro simultâneo de espectros de massas com alta resolução. Equipamentos como os analisadores do tipo quadrupolo (Q), tempo de voo (*Time of Flight* - TOF) ou orbitrap são comumente utilizados na triagem de metabólitos por sua capacidade de detectar compostos em baixíssimas concentrações com elevada precisão de massa (El-Elmat *et al.*, 2013).

No estudo de produtos naturais, a espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) é particularmente útil na determinação de fórmulas moleculares, enquanto técnicas de MS em Tandem (ou MS/MS, ou MS²) fornecem perfis de fragmentação que auxiliam na elucidação estrutural de compostos desconhecidos (Calla-Quispe *et al.* 2020). Tais abordagens são indispensáveis não apenas para a anotação de metabólitos, mas também para a construção de bancos de dados e para o posterior uso de ferramentas computacionais de análise, como redes moleculares baseadas em similaridade espectral, que contribuem para acelerar o processo de identificação ou anotação de constituintes químicos presentes nos extratos sob análise, permitindo a análise comparativa de diversas amostras de forma integrada.

1.5.2.1. GNPS e redes moleculares

A dificuldade em anotar a vasta maioria dos espectros MS/MS gerados em análises por espectrometria de massas é um dos principais gargalos da metabolômica de produtos naturais. Apenas cerca de 2% dos compostos são comumente atribuídos a estruturas conhecidas. Foi para enfrentar este problema que Wang *et al.* (2016) estruturaram e apresentaram a plataforma *Global Natural Products Social Molecular*

Networking (GNPS), desenvolvida por uma vasta equipe de pesquisadores da área de produtos naturais liderados por Nuno Bandeira e Pieter Dorrenstein.

Tradicionalmente, a comparação entre espectros era realizada manualmente, tornando o processo demorado e amplamente sujeito a erro humano (Watrous *et al.*, 2012). A aplicação de redes moleculares (ou *molecular networking*) para analisar dados de MS/MS surgiu para superar essas limitações. Utilizando esta ferramenta, é possível organizar os espectros de MS2 com base em sua similaridade, formando agrupamentos de compostos estruturalmente relacionados (Watrous *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2016).

No GNPS, os espectros de fragmentação obtidos a partir de análises de LC-MS/MS são comparados por meios de algoritmos que calculam a pontuação de cosseno entre os vetores de fragmentos. Esse cálculo é realizado utilizando o ângulo (θ) entre os vetores gerados a partir do espectro de massas dos metabólitos avaliados, resultando em um valor de cosseno que varia de 0 a 1, em que zero indica diferenciação máxima entre espectros e um indica 100% de similaridade (Pilon *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2016; Quinn *et al.*, 2017).

Durante o processamento de dados, o usuário pode definir o limite de similaridade, e uma conexão (denominadas arestas dos polígonos em construção durante o processo) será estabelecida entre nodos sempre que a pontuação de cosseno for maior ou igual a esse valor.

Pode-se considerar que arestas formadas com $\cos \theta \geq 0,7$ possuem alto grau de similaridade e, existindo várias arestas, os nodos são conectados em redes, nas quais cada nó representa um espectro de consenso (geralmente, um metabólito) e cada aresta indica similaridade espectral entre dois nós (Wang *et al.*, 2016). De forma importante, a plataforma também realiza buscas automáticas em uma biblioteca pública e colaborativa de espectros de referência, facilitando a desreplicação e anotação (rápida identificação de metabólitos já conhecidos) (Quinn *et al.*, 2017; Aron *et al.*, 2020).

Na prospecção de fungos endofíticos, o GNPS tem se mostrado uma ferramenta poderosa. A diversidade de metabólitos especializados desses microrganismos, frequentemente inéditos, torna a anotação convencional limitada. Através de um fluxo de experimentos de *untargeted metabolomics*, ou seja, sem foco prévio de compostos específicos, é possível detectar famílias de análogos estruturais mesmo que a maioria

dos compostos não esteja presente em bibliotecas espectrais (Belinato *et al.*, 2019; Pilon *et al.*, 2021).

Dessa forma, a construção de redes moleculares por meio da plataforma GNPS complementa as estratégias analíticas abordadas, oferecendo uma ferramenta eficaz para interpretar dados espectrais complexos. Sua aplicação no estudo de fungos endofíticos amplia o acesso à diversidade química dessas fontes microbianas, guiando investigações estruturais mais dinâmicas e enriquecendo a discussão sobre potenciais aplicações do conhecimento gerado a partir dos extratos fúngicos analisados. Dessa forma, a combinação entre estratégias de cultivo, análise de compostos voláteis, espectrometria de massas e ferramentas como o GNPS estabelece uma base robusta para a investigação da quimiodiversidade de *A. atroroseum*, objetivo central do presente trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o perfil químico e a atividade citotóxica de metabólitos especializados produzidos pelo fungo *Annulohypoxylon atroroseum*, isolado da alga marinha *Dichotomaria marginata*, por meio de diferentes estratégias experimentais voltadas à ampliação da quimiodiversidade.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir a curva de crescimento do fungo *A. atroroseum* em meio líquido e avaliar sua relação com a produção de metabólitos;
- Aplicar a estratégia OSMAC utilizando diferentes meios de cultivo para estimular a expressão de vias biossintéticas distintas;
- Realizar análises químicas dos extratos e frações obtidas por meio das técnicas HPLC-DAD, UPLC-QTOF-MS/MS e GC-MS;
- Processar os dados obtidos por espectrometria de massas para construção de redes moleculares com auxílio da plataforma GNPS;
- Identificar e anotar substâncias com potencial biológico a partir das análises metabolômicas;
- Avaliar o perfil químico volátil do fungo e a influência de variáveis físico-químicas sobre a produção de compostos voláteis, utilizando planejamento experimental fatorial e técnicas de HS-SPME-GC-MS;
- Discutir a diversidade metabólica observada e o potencial bioativo das substâncias detectadas;
- Avaliar a atividade citotóxica frente a células HCT-116 de extratos e frações obtidas.

3. MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Solventes e soluções

Os solventes e soluções utilizados durante o desenvolvimento desta pesquisa estão descritos abaixo no quadro 3.

Solvente	Especificação	Uso	Fabricantes
Metanol	P.A.	Extração	Êxodo Científica
Acetato de etila	P.A.	Extração	Êxodo Científica
Hexano	P.A.	Extração	Êxodo Científica
Metanol	HPLC	Análises cromatográficas	J.T. Baker/Supelco/ Sigma-Aldrich
Acetonitrila	HPLC	Análises cromatográficas	J.T. Baker/Supelco/ Sigma-Aldrich
Hexano	HPLC	Análises cromatográficas	J.T. Baker/Supelco/ Sigma-Aldrich
Água	Ultrapura	Preparo de meio de cultivo	-
Água do mar	Filtrada	Preparo de meio de cultivo	-

Quadro 3: Solventes utilizados no desenvolvimento desta pesquisa.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.2. Meios de cultivo

Os meios de cultivo utilizados estão descritos no quadro abaixo:

Meio de cultivo	Tipo	Fabricantes
BDA (batata, dextrose, ágar)	Sólido	Neogen/Millipore/Kasvi
Extrato de Malte	Líquido	Neogen
PDB (caldo batata dextrose)	Líquido	Kasvi
Arroz branco tipo 1	Sólido	Ruston Alimentos
Aveia em flocos	Sólido	Quaker
Farelo de trigo (trigo para kibe)	Sólido	Hikari

Quadro 4: Meios de cultivo utilizados.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2. EQUIPAMENTOS

No quadro 5 a seguir, estão listados os principais equipamentos utilizados no desenvolvimento desta pesquisa.

Equipamento	Modelos	Fabricante
Balanças analíticas	AG204/AY-220	Mettler Toledo/Shimadzu
Balança semi-analítica	S2202	Bel Engineering
Autoclave vertical	CS/AV-137	Primatec/Phoenix
Ultrapurificador de água	Milli-Q Direct 8	Millipore
Câmara de fluxo laminar vertical	PA-310	Alx Comercial Científica
Bomba de vácuo	OFP400-115	Thermoelectron
Evaporador rotativo	LGI-100 PRO	LGI Scientific
Estufa de secagem	MA 033	Marconi
Incubadoras <i>shaker</i>	SL 223/ NT 714	SOLAB/ Novatecnica
Incubadora com fotoperíodo	NT 718	Novatecnica
Centrífuga	Capsulefuge PMC-880	GmCLab
Banho de Ultrassom	S60H	Elma
Concentrador de amostras	SL 24/25	SOLAB
Liofilizador	Alpha 1-2 LDplus	Christ
Conjunto de micropipetas	KasviPlus	Kasvi
Cromatógrafo Líquido com Detector de diodos	Shimadzu	Shimadzu
Cromatógrafo Líquido com espectrômetro de massas	Waters	Waters
Cromatógrafo a gás com espectrômetro de massas	QP-2010	Shimadzu
Cromatógrafo a gás com espectrômetro de massas e módulo de micro-extração em fase sólida.	QP-2020	Shimadzu

Quadro 5: Equipamentos utilizados.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.1. Cromatografia

3.2.1.1. Cromatógrafo com analisador por arranjo de diodos (HPLC-DAD)

Para determinar o perfil cromatográfico das amostras obtidas, a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector por Arranjo de Diodos (*High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector* – HPLC-DAD) foi empregada. Foram analisados extratos brutos e partições obtidas a partir das metodologias aplicadas, e para realizar essas análises, foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu, com os componentes descritos no quadro 6 a seguir:

Componentes	Modelos
Bombas	LC-20AT
Auto-amostrador	SIL-20A
Detector ultravioleta	SPD-M20A
Módulo de comunicação	CBM-20A
Forno de coluna	CTO-20A
Degaseificador	DGU-20A ₃

Quadro 6: Componentes do cromatógrafo utilizado para as análises.

Fonte: elaborado pelo autor.

3.2.2. Cromatógrafo com analisador Q-ToF (UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS)

As análises de Cromatografia de Ultra Performance acopladas a Espectrometria de Massas de Alta Resolução (*Ultra Performance Liquid Chromatography coupled with High Resolution Mass Spectrometry* – UPLC-HRMS) foram realizadas em um equipamento UPLC I-Class Acquity H-Class da Waters®, que possui como módulos operacionais uma bomba quaternária (*Quaternary Solvent Manager*), um injetor automático (*Sample Manager – FTN*), um forno de coluna e um Detector de Arranjo de Diodos (DAD e λ Detector). Para as análises dos extratos e frações, uma coluna de fase reversa Waters Acquity UPLC HSS T3 1,8 μm (2,1 x 100 mm) e uma pré-coluna Waters Acquity UPLC HSS T3 1,8 μm VanGuard (2,1 x 5 mm) foram utilizadas.

Além disso, também foi utilizado um detector de massas modelo Xevo G2-XS Q-TOF, equipado com fonte de ionização por eletrospray (ESI), analisador Q-TOF (*Quadrupole – Time of Flight*) e software MassLinx®.

3.2.3. Cromatógrafos a gás acoplado a espectrômetro de massas

3.2.3.1. Análises de frações hexano dos cultivos em meio sólido

As frações hexano obtidas a partir dos cultivos em meio sólido foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), utilizando-se um equipamento Shimadzu GC-2010, equipado com um auto-injetor modelo AOC-20i. Todas as análises foram realizadas com uma coluna capilar Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), revestida com fase estacionária composta por 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano.

3.2.3.2. Análises de compostos voláteis por headspace

O perfil volátil do fungo foi realizado em parceria com o laboratório NDcom no Instituto de Química da Unesp através de micro extração em fase sólida no *headspace*, seguida de análise por GC-MS (*Headspace Solid Phase Microextraction Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry* – HS-SPME-GC-MS). O equipamento utilizado também foi um GC-MS Shimadzu® QP-2020 equipado com um auto injetor AOC-6000 e um módulo de SPME. Todas as análises foram realizadas com uma coluna capilar SH-Rtx-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm), revestida com fase estacionária composta por 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano.

3.3. COLETA DAS ALGAS

A coleta da alga *Dichotomaria marginata* foi realizada na Praia da Fortaleza, no município de Ubatuba, litoral norte do Estado de São Paulo em 2015 como parte das pesquisas realizadas no grupo de Produtos naturais da Microbiota associada a Plantas e Organismos Marinhos do IQ/Unesp. O material coletado foi encaminhado para ser identificado pela Dra. Nair Yokoya (IBot/SMA-SP) e depositado no herbário do Instituto de Botânica de São Paulo. Essa coleta foi devidamente registrada e cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), com o nº de cadastro A7ED4A6, em conformidade com a legislação vigente (Lei nº 13.123/2015).

3.4. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

Para obtenção dos fungos endófitos, o material coletado foi esterilizado em dois métodos diferentes: por imersão em solução de etanol 70% por 10 segundos ou por imersão em solução de NaOCl 1% por 6 segundos e em etanol 70% por 2 segundos. Em ambos os casos, estes procedimentos foram seguidos por dupla lavagem em água ultrapura estéril por 10 minutos (Honório, 2018).

Em seguida, partes das algas seccionadas por bisturi esterilizado foram inseridas em meio de cultura BDA preparado com adição de antibiótico gentamicina, após autoclavagem, para evitar crescimento bacteriano. A partir do crescimento de pequenas colônias de fungos, elas foram retiradas com alça esterilizada e inoculadas

separadamente em outras placas contendo meio BDA, até a obtenção de 22 linhagens de fungos isoladas de *D. marginata*, através de análise visual das placas cultivadas, levando em consideração a aparência uniforme do crescimento nas placas. Posteriormente, pequenos discos foram preservados em frascos contendo água ultrapura esterilizada (Honório, 2018; Landecker, 1996). A figura 16 a seguir demonstra as etapas deste processo.



Figura 16: Metodologia de esterilização, isolamento e purificação dos endófitos.
Fonte: Honório, 2018, p. 58.

A identificação foi realizada em parceria com o Prof. Dr. Marcos Antônio Soares (UFMT, Cuiabá, MT), por taxonomia molecular e morfológica. Dentre as oito espécies isoladas e identificadas a partir da alga *Dichotomaria marginata*, foram selecionados o fungo endofítico *Annulohypoxylon atroroseum* (DM-05).

3.5. CURVA DE CRESCIMENTO DO FUNGO *Annulohypoxylon atroroseum*

Inicialmente, o fungo *Annulohypoxylon atroroseum* foi cultivado em placas de Petri com meio de cultivo BDA, a partir dos *slants* preservados em água ultrapura preparados a partir da metodologia de isolamento anterior.

Após 7 dias de crescimento, inoculou-se 5 discos de micélios de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro provenientes de 5 placas de Petri diferentes em 21 frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio líquido Extrato de Malte preparado em concentração 2 g/L. Além destes 21 frascos inoculados, também foram preparados 3 frascos nas mesmas condições, sem inoculação do microrganismo, que foi considerado o ponto zero da curva e o branco das análises químicas.

3.5.1. Obtenção dos extratos dos cultivos da curva de crescimento

Os 21 frascos inoculados foram separados em 7 grupos de 3 frascos, cada grupo sendo referente a um dos pontos da curva de crescimento do fungo associado. O período total selecionado para a construção da curva de crescimento foi de 35 dias, sendo cada ponto da curva registrado a cada 5 dias (5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 dias).

Em cada dia definido como final do período de crescimento, o fungo foi desativado com 300 mL de acetato de etila destilado, e a suspensão foi filtrada a vácuo em funil de Buchner. O micélio remanescente no papel de filtro, pesado previamente, foi levado à estufa para secar a 100 °C por 24h sem agitação, sendo pesado após este período novamente em balança analítica, para determinar a massa do fungo naquele período de crescimento, fornecendo dados utilizados para a curva de crescimento.

O caldo filtrado com o solvente foi levado a um funil de separação, onde se aplicou a técnica de extração líquido-líquido três vezes com 300 mL de acetato de etila. Após cada extração, a fase orgânica foi lavada com água ultrapura para remoção do excesso de açúcares presentes no meio de cultivo utilizado.

Em seguida, a fase aquosa foi descartada e a fase orgânica foi levada para evaporador rotativo para remoção de solvente sob pressão reduzida. Após secagem, a massa dos extratos foi determinada para construção de uma segunda curva.

Após a obtenção dos extratos, foi realizada a análise do perfil químico de cada ponto da curva através de HPLC-DAD e de HPLC-ESI-QTOF-MS-MS para identificação e anotação das substâncias através da plataforma GNPS.

Na figura a seguir está representado o fluxograma da metodologia aplicada para a construção da curva de crescimento, seguindo para as análises cromatográficas, descritas na seção 3.5; 3.5.1 e 3.5.2.

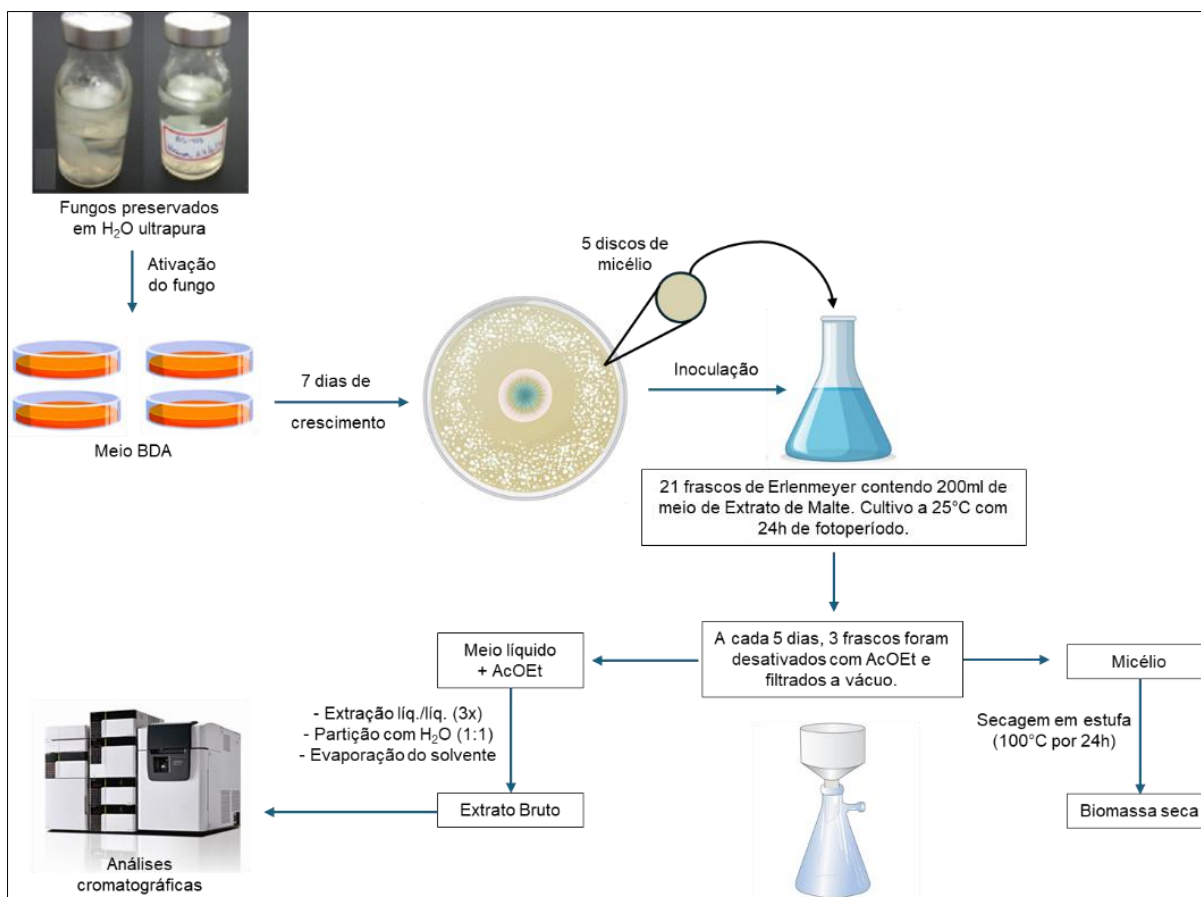


Figura 17: Esquema de obtenção dos extratos brutos e da massa de micélios para construção da curva de crescimento.

Fonte: Elaborado pelo autor

3.5.2. Análise dos extratos obtidos

3.5.2.1. Análises de HPLC-DAD

Para as análises por HPLC-DAD em modo analítico, as amostras foram preparadas em concentração de 10 mg/mL em MeOH:H₂O 95:05 (v/v) com utilização do ultrassom para auxílio na solubilização. Essas amostras passaram por um processo de *clean-up* em cartucho de extração em fase sólida (SPE) de C₁₈ (500mg). Os cartuchos foram ativados com MeOH (5 mL) e equilibrados com 5 mL de solução MeOH:H₂O 95:05 (v/v), e em seguida 500µL de cada amostra foi aplicada e eluída com 3 mL de MeOH:H₂O 95:05 (v/v), segundo ilustração a seguir.

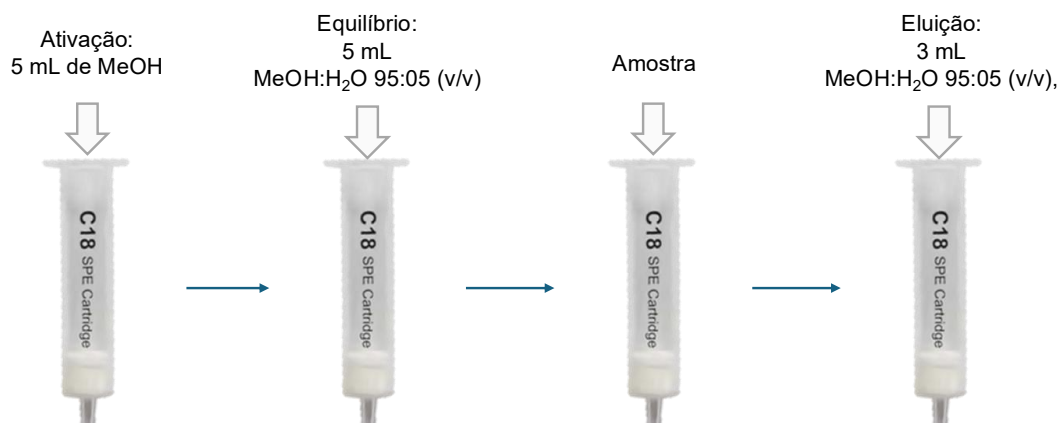


Figura 18: *Clean-up* das amostras para cromatografia de alta eficiência.
Fonte: elaborado pelo autor.

Após o *clean-up*, as amostras foram secadas em capela e em seguida re-diluídas em concentração de 1, 2 ou 5 mg/mL em MeOH grau HPLC, centrifugadas a 10.000 RPM por cinco minutos e os sobrenadantes foram preparados em *vials* de 2 mL para análise.

O método exploratório padrão para análises de perfil cromatográfico das amostras no modo analítico, consistiu em injeção de 20 µL de cada amostra para eluição em gradiente H₂O:MeOH partindo de 95:05 até 0:100, em uma corrida com tempo total de 40min, com 10 minutos de condicionamento da coluna, fluxo de 1 mL/min e observação primária no comprimento de onda 254 nm, sendo registrada a detecção também nos comprimentos de onda 220 e 320 nm. Utilizou-se uma coluna de fase reversa C₁₈ da marca Phenomenex Luna, com dimensões de 250 x 4,6 mm empacotada com partículas com granulação de 5µm.

3.5.2.2. Análises por UPLC-ESI-QTOF-MS/MS

Para as análises por UPLC-ESI-QTOF-MS/MS, as amostras foram preparadas conforme procedimento descrito na seção 3.5.1.1., incluindo a etapa de pré-tratamento de *clean-up* da figura 18. A única modificação consistiu na concentração final das amostras, ajustada para 0,25 mg/mL para os extratos e partições.

Para a realização das análises, foi utilizado um sistema binário de solventes (água e acetonitrila, ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico). O volume de

injeção foi de 0,80 µL e a vazão aplicada foi de 10 µL/min. O método cromatográfico consistiu em um gradiente de 5 a 100% de acetonitrila em 15 min.

Foi empregada também a fonte de ionização por *electrospray* nos modos positivo e negativo, e os dados foram adquiridos em uma faixa de razão massa/carga (m/z) de 100 a 1500 Da. Os parâmetros de MS utilizados foram: tensão elétrica do capilar de 2,0 kV, fluxo de cone de gás de dessolvatação de 5 a L/h, temperatura da fonte de 120°C e temperatura de dessolvatação de 350°C com cone de amostragem e deslocamento da fonte a 80°C. A fragmentação MS/MS foi alcançada com energia de colisão de rampa (CE) baixa de 10 a 40 eV e CE alta de 50 a 80 eV.

Os dados obtidos nessas análises foram posteriormente submetidos ao fluxo de trabalho clássico nativo do GNPS para a construção de redes moleculares, conforme metodologia discutida nos próximos capítulos.

3.6. APLICAÇÃO DA ESTRATÉGIA OSMAC NA INVESTIGAÇÃO DE METABÓLITOS ESPECIALIZADOS

Para avaliar variações na produção de metabólitos especializados pelo fungo *Annulohyphoxylon atroroseum*, foram empregados cinco tipos distintos de meios de cultivo. Inicialmente, o fungo isolado foi reativado a partir de *slants* preservados em água ultrapura em placas de Petri contendo meio de batata, dextrose e ágar (BDA) por 7 dias. Em seguida, foram transferidos para os cinco meios escolhidos, sendo dois meios líquidos: extrato de malte e caldo batata dextrose (PDB); e três meios sólidos: arroz, farelo de trigo e flocos de aveia comerciais.

Para os meios líquidos, as metodologias de inoculação e de extração utilizadas foram as mesmas descritas no capítulo anterior (imagem 16), em três frascos de Erlenmeyer de 500 mL identificados como replicatas. O período de crescimento do fungo foi considerado de 21 dias, conforme ponto máximo encontrado na curva de crescimento, a 25 °C e com 24h de fotoperíodo.

Para o meio de arroz, foram preparados três frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 g do cereal e 50 mL de água ultrapura (Amaral et al., 2014; Botero et al., 2020). Para o meio de farelo de trigo, também se utilizou 50 g do material e 50 mL de água ultrapura em três frascos (Chen et al., 2018). Mais três frascos de 500 mL foram preparados com 25 g de flocos de aveia e 30 mL de água ultrapura (Gubiani et al.,

2019). Todos os frascos contendo meio sólido foram autoclavados a 121 °C por 20 min duas vezes com intervalo de 24 h entre cada autoclavagem.

Após a reativação em placas de Petri e as autoclavagens, discos de 5 mm do fungo foram transferidos para tubos Falcon contendo 50 mL de água ultrapura e agitados vigorosamente para preparo de um caldo de suspensão micelial. Em cada frasco de Erlenmeyer contendo os meios de cultivo sólidos foi adicionado 10 mL deste caldo, com agitação constante para homogeneização da suspensão dos fungos no meio. O período de cultivo em meios sólidos também foi estabelecido em 21 dias a 25 °C, com 24h de fotoperíodo.

Para a extração em meio sólido, foram utilizados 300 mL de metanol destilado em contato direto com a cultura em três etapas de cinco horas cada, seguido de filtração e evaporação do solvente para obtenção do extrato metanólico. O extrato obtido foi então ressuspendido em 100 mL de solução MeOH:H₂O (4:1 v/v) e submetido à partição líquido/líquido com 100 mL de *n*-hexano destilado, três vezes consecutivas, com o objetivo de separar os compostos de baixa polaridade (fração hexano). Em seguida, a fração hidrometanólica teve o seu teor de metanol reduzido por evaporação rotativa em baixa pressão e submetida a nova partição líquido-líquido por três vezes com 50mL acetato de etila, gerando a fração hidrometanólica, nomeada como fração metanol, e a fração acetato, que em seguida tiveram seus solventes evaporados a pressão reduzida (SILVA, 2024).

Através da mesma metodologia descrita neste capítulo, excetuando-se a inoculação do fungo *A. atroroseum*, foram preparados extratos para controle (brancos) para os cinco meios de cultivo descritos. Esses extratos foram utilizados como branco para as análises químicas, com o intuito de distinguir os metabólitos inerentes aos meios de cultura e aqueles produzidos pelo microrganismo.

Após obtidos os extratos brutos dos cultivos em meios líquidos e as frações do cultivo em meio sólido, as amostras foram preparadas para serem analisadas através de técnicas cromatográficas. O fluxograma da figura 18 a seguir ilustra as etapas da extração e análise dos cultivos em meios sólidos descritos neste capítulo.

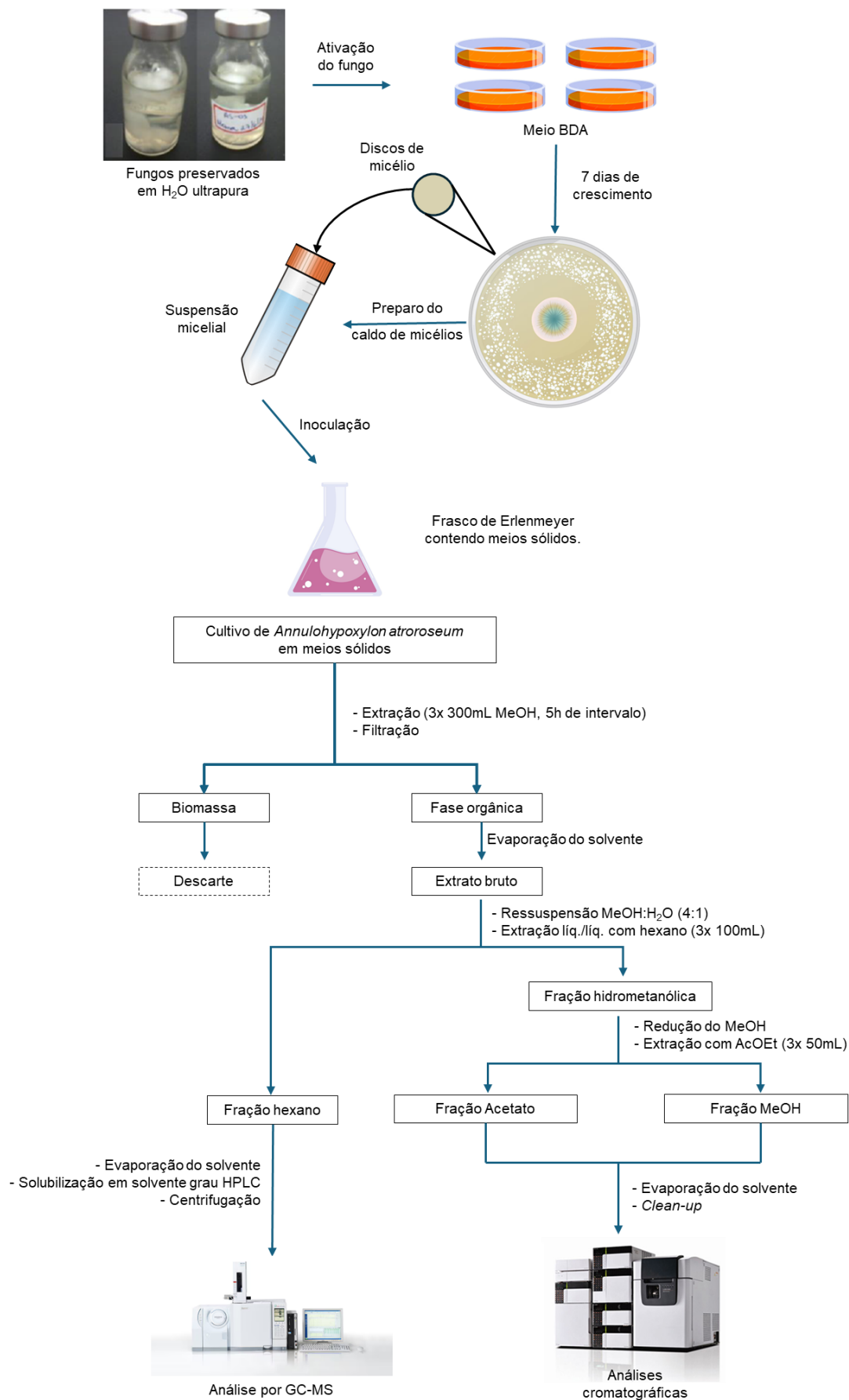


Figura 19: Fluxograma das etapas de cultivo, obtenção e análise das amostras em meio sólido.
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6.1. Extratos de Meio Líquido e Frações Metanol e Acetato

Os extratos brutos dos cultivos em meio líquido e as frações metanol e acetato dos cultivos em meios sólidos passaram pelos mesmos processos de amostragem e análise do item 3.5.1 e foram analisadas por HPLC-DAD e UPLC-ESI-QTOF-MS/MS, e foram submetidos ao fluxo de trabalho clássico nativo do GNPS para a construção de redes moleculares.

3.6.2. Fração Hexano

. As frações hexano dos cultivos em meios sólidos foram solubilizadas em hexano grau HPLC a uma concentração de 10 mg/mL e centrifugadas a 10.000 RPM por cinco minutos. Os sobrenadantes foram separados em *vials* para análise em GC-MS no equipamento descrito na seção 3.2.3.1.

O método exploratório padrão para as análises consistiu em uma rampa de temperatura partindo de 140°C, mantendo esta temperatura por 3 min e depois subindo com uma taxa de 3°C/min até 320°C e finalmente mantendo assim por mais 10 minutos, totalizando 73 minutos totais de método. A injeção foi realizada em modo split 1:20 a uma temperatura de 270°C. O forno de coluna permaneceu em temperatura de 140°C e a fase móvel (gás de arraste) utilizada foi o gás hélio, a uma pressão de 88,5 kPa e fluxo de 1 mL/min, gerando uma velocidade linear na coluna de 37,8 cm/sec.

A temperatura da interface entre o GC e o MS foi de 280°C e a da fonte de ionização (impacto eletrônico) foi de 270 °C. O detector de massas trabalhou em modo de aquisição de *scans* a cada 0,5 s registrando fragmentos no intervalo de *m/z* de 35 a 700 Da.

3.7. ANÁLISE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COVS)

3.7.1. Planejamento fatorial fracionário 2⁴⁻¹

Para avaliar o perfil de metabólitos voláteis do fungo *A. atroroseum*, foi escolhido um planejamento fatorial fracionário 2⁴⁻¹ com triplicata no ponto central (Barros Neto,

Scarminio, Bruns, 2010) com o objetivo de investigar a influência de 4 variáveis na produção destas substâncias.

As variáveis selecionadas para este propósito foram fotoperíodo (Fp), temperatura (T), tempo de crescimento (tC) e salinidade (s) da água utilizada no meio de cultura. Os níveis de variação estão descritos no quadro a seguir.

VARIÁVEIS	NÍVEIS		
	-1	0	+1
Fotoperíodo (Fp)	0 h	12 h	24 h
Temperatura (T)	20 °C	25 °C	30 °C
Salinidade (s)	0%	50%	100%
Tempo de crescimento (tC)	3 dias	5 dias	7 dias

Quadro 7: Variáveis e níveis determinados para o planejamento fracionário

Fonte: dados do autor (2024).

Para o início dos experimentos, *Annulohypoxylon atroroseum* foi inoculado em placa de Petri contendo meio BDA. Após 7 dias de crescimento do fungo na placa, discos de aproximadamente 5 mm contendo os fungos foram transferidos individualmente para *vials* de vidro de 20 mL próprios para análises de HS-SPME-GC-MS. Cada frasco continha 5 mL de meio de cultivo BDA com superfície inclinada, conforme a figura 20 abaixo, em seguida, os *vials* foram selados com tampa magnética e septo de silicone compatíveis com o auto injetor utilizado (Tabarestani et al., 2016).



Figura 20: Frascos para análise de voláteis.

Fonte: foto do autor (2024).

A variação do fotoperíodo foi controlada por meio da alocação dos experimentos em incubadoras BOD. Os experimentos submetidos à exposição contínua de luz (24h) foram mantidos em uma incubadora BOD equipada com uma lâmpada de LED acesa

durante todo o período de crescimento, com temperatura programada em 30 °C. Os ensaios no ponto central foram conduzidos em uma incubadora BOD automatizada, programada para um fotoperíodo de 12 horas mantendo temperatura de 25 °C. Para os experimentos no nível negativo de fotoperíodo, os frascos foram envoltos em papel pardo a fim de impedir a incidência de luz. Além disso, uma incubadora *shaker* também foi configurada com iluminação contínua (24h) e mantida a 20 °C.

A variação da salinidade foi determinada pelo percentual de água do mar utilizado no preparo do meio de cultivo. Para os experimentos no nível negativo, foi utilizado meio preparado com água ultrapura, enquanto no nível positivo, o meio foi formulado exclusivamente com água do mar. Nos experimentos do ponto central, o meio de cultivo foi preparado com uma mistura contendo 50% de água do mar e 50% de água ultrapura.

Além dessas condições, foram incluídos os experimentos 12, 13 e 14, correspondentes aos controles dos meios de cultivo. Esses controles foram definidos como: meio preparado com água do mar (Branco MAR), meio preparado com água ultrapura (Branco UP) e meio contendo 50% de água do mar e 50% de água ultrapura (Branco 50%). Os três *vials* continham apenas os respectivos meios de cultivo e foram mantidos em temperatura ambiente por um período de cinco dias.

O planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} foi selecionado devido à possibilidade de redução no número de experimentos quando comparado ao planejamento fatorial completo. Nesse planejamento, um dos fatores é representado como o produto dos demais três, o que permite um menor número de ensaios experimentais sem comprometer a identificação dos efeitos principais (Barros Neto, Scarminio, Bruns, 2010). Na metodologia empregada nesta análise, os níveis da variável tempo de crescimento foram estabelecidos como o produto das outras três variáveis investigadas. A descrição dos experimentos de acordo com os níveis empregados está disposta no quadro 8 a seguir.

EXPERIMENTOS	VARIÁVEIS			
	Fp	T	s	tC
Exp. 1	-1	-1	-1	-1
Exp. 2	1	-1	-1	1
Exp. 3	-1	1	-1	1
Exp. 4	1	1	-1	-1
Exp. 5	-1	-1	1	1
Exp. 6	1	-1	1	-1
Exp. 7	-1	1	1	-1
Exp. 8	1	1	1	1
Exp. 9 (PC)	0	0	0	0
Exp. 10 (PC)	0	0	0	0
Exp. 11 (PC)	0	0	0	0
Exp. 12 (PC)	0	0	0	0
Exp. 13 (Branco MAR)	1	0	1	1
Exp. 14 (Branco UP)	1	0	-1	1
Exp. 15 (Branco 50%)	1	0	0	1

Quadro 8: Condições dos experimentos realizados.

Fonte: dados do autor (2024).

3.7.2. Análises por HS-SPME-GC-MS

Após os períodos de crescimento estabelecidos para cada experimento, os *vials* contendo as amostras foram encaminhados para análise no Laboratório de Cromatografia I do NDcom do Instituto de Química da UNESP.

A análise do *headspace* dos frascos foi realizada por meio da técnica de microextração em fase sólida (SPME), utilizando o cromatógrafo a gás descrito na seção 3.2.3.2. As condições de extração por SPME foram de 90°C por 10 minutos.

O sistema de cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massas (GC-MS) foi programado com um método de rampa de temperatura. A temperatura inicial foi 40 °C, com forno da coluna a 250 °C e com injeção em modo *splitless*. A temperatura da injeção começou a 40 °C, permanecendo nessa temperatura por 3 minutos. Em seguida, a temperatura foi aumentada a uma taxa de 10 °C/min até atingir 260 °C. Após alcançar a temperatura máxima, a análise cromatográfica foi mantida por 25 minutos, totalizando um tempo de corrida de 50 minutos.

Para a análise por espectrometria de massas, a fonte de íons operou em temperatura de 240 °C com energia de ionização de 70 eV e a interface do sistema foi mantida a 260 °C. O fluxo da análise foi mantido em velocidade linear de 36 cm/s a 1 mL/min de gás hélio como gás de arraste. O equipamento realizou aquisições de *scans* a cada 0,3 segundos e a faixa de varredura foi de *m/z* 45-550 Da (Tabarestani et al., 2016).

3.7.3. Determinação da resposta do planejamento fracionário

Após as obtenções dos dados brutos das análises por HS-SPME-GC-MS, os cromatogramas obtidos para cada frasco experimental foram inspecionados visualmente por meio do software GCMSsolution® (Shimadzu). Para a determinação da resposta de cada condição experimental, foi utilizado como critério o número total de picos cromatográficos detectados em cada amostra, excluindo-se os picos presentes nos brancos correspondentes.

Os picos presentes nos cromatogramas dos controles foram considerados inerentes aos meios de cultura ou a possíveis contaminações, sendo excluídos da contagem das amostras. Para essa subtração, foram consultadas as tabelas de tempos de retenção (RT) correspondentes a cada análise. Considerou-se como sobreposição qualquer pico que apresentasse diferença de tempo de retenção inferior a 0,05 min (3 s) em relação aos picos observados nos cromatogramas dos controles correspondentes e estes picos foram desconsiderados da resposta de cada amostra.

Assim, a resposta do planejamento experimental foi definida como o número de picos não coincidentes com aqueles do controle (brancos), representando o número de compostos voláteis potencialmente produzidos pelo fungo *Annulohypoxylon atroroseum* sob as condições específicas de cultivo estabelecidas.

Essas respostas foram organizadas em uma tabela de planejamento experimental, permitindo a avaliação da influência de cada variável (fotoperíodo, temperatura, salinidade e tempo de crescimento) sobre a diversidade de compostos orgânicos voláteis produzidos. Os dados obtidos foram posteriormente analisados estatisticamente para identificação dos efeitos principais e possíveis interações entre os fatores testados.

3.8. PROCESSAMENTO DE DADOS E *MOLECULAR NETWORKING*

3.8.1. Redes moleculares das amostras obtidas na curva de crescimento.

Após as análises por UPLC-ESI-QTOF-MS/MS, foram obtidos os dados em arquivos formato .raw, próprios para o software do equipamento. Para que o processamento dessas análises pudesse ser feito para a plataforma GNPS, os arquivos foram convertidos para o formato mzXML e o software MSConvert foi utilizado para esta finalidade. Após a conversão dos arquivos, utilizou-se também o software WinSCP para seu *upload* no servidor do GNPS.

Em seguida, já na plataforma GNPS, foram utilizados os parâmetros padrões para a criação de redes moleculares no modo clássico (*Classical Molecular Networking*). Esses parâmetros são sugeridos pela própria plataforma.

Referente ao uso deste *workflow online*, foram construídas as rede moleculares referentes às amostras que foram submetidas a análises de UPLC-ESI-QTOF-MS-MS (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>) no site do GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>).

Para a construção da rede, foram utilizados parâmetros padrões de análise (*“default”*), onde os dados foram filtrados removendo-se todos os íons fragmentários de MS/MS dentro da faixa de +/- 17 Da da *m/z* do precursor. Os espectros de MS/MS foram filtrados por janela, escolhendo-se apenas os 6 principais íons fragmentários na janela de +/- 50 Da ao longo do espectro. A tolerância de massa do íon precursor foi definida em 0,02 Da, e a tolerância do íon fragmentário de MS/MS foi de 0,02 Da.

Em seguida, foi criada uma rede onde as conexões foram filtradas para manter apenas aquelas com um *escore* de cosseno acima de 0,7 e mais de 6 picos correspondentes. Além disso, a conexão entre dois nodos foi mantida na rede apenas quando ambos estavam entre os 10 nodos mais similares um do outro. Por fim, o tamanho máximo de uma família molecular foi definido como 100, e as conexões com menor pontuação foram removidas das famílias moleculares até que o tamanho da família estivesse abaixo desse limite.

Os espectros da rede foram então comparados com as bibliotecas espectrais do GNPS, que foram filtrados da mesma forma que os dados de entrada. Todas as correspondências mantidas entre os espectros da rede e os espectros da biblioteca deveriam apresentar um *escore* acima de 0,7 e pelo menos 6 picos correspondentes.

Os parâmetros descritos estão demonstrados na figura 21 a seguir, uma captura de tela da plataforma GNPS.

Basic Options

Spectrum files must be centroided and be in an open spectrum format (mzXML, mzML, or mgf)

Spectrum Files (Required): 13 files and 0 folders are selected [See here](#) for further documentation about molecular networking. [Click Here here](#) to run a demo molecular network.

Spectrum Files G2:

Spectrum Files G3:

Spectrum Files G4:

Spectrum Files G5:

Spectrum Files G6: [For custom group/attribute documentation click here](#)

Precursor Ion Mass Tolerance: Da Fragment Ion Mass Tolerance: Da

Advanced Network Options

Min Pairs Cos: Minimum Matched Fragment Ions: Maximum shift: Da

Network TopK: Minimum Cluster Size: Run MSCluster:

Maximum Connected Component Size:

Google Sheets Metadata URL (Experimental):

Metadata File: 1 file and 0 folders are selected

Group Mapping (Legacy):

Attribute Mapping (Legacy):

Advanced Library Search Options

Spectral Library: 0 files and 1 folder are selected [To import libraries for search click here](#)

Library Search Min Matched Peaks: Score Threshold:

Search Analogs: Maximum Analog Search Mass: Difference:

Advanced Filtering Options

Filter below Std Dev: Minimum Peak Intensity:

Filter Precursor Window:

Filter peaks in 50Da Window:

Filter Spectra from G6 as Blanks Before Networking:

Filter Library:

Figura 21: Parâmetros utilizados para construção das redes moleculares.
Fonte: Plataforma GNPS.

Após completado o processamento dos dados na plataforma, a rede gerada foi editada a partir do software Cytoscape.

3.8.2. Redes Moleculares das Amostras Obtidas Durante a Aplicação da Estratégia OSMAC

3.8.2.1. *Análise dos Extratos Brutos e Frações Acetato e Metanol*

O processamento de dados, construção e edição das redes moleculares referentes a estas amostras seguiu o mesmo *workflow* discutido na sessão anterior.

3.8.2.2. *Análise das Frações Hexano*

Para análises de espectrometria de massas realizadas a partir de GC-MS, o GNPS possui um *workflow* próprio, independente do *molecular networking* clássico.

As redes moleculares foram criadas utilizando os fluxos de trabalho *Data Processing – Deconvolution* e *Library Search/Molecular Networking GC* no GNPS (<https://gnps.ucsd.edu>, Wang et al. 2016), após o pré-processamento de desconvolução dos dados brutos obtidos através das análises de GC-MS. A etapa de desconvolução é necessária para atribuir tempo de retenção e espectro de fragmentação aos dados obtidos. Além disso, a desconvolução no GNPS diminui complexos de espectros de massas que possuam sinais em co-eluição e reduz a desvantagem de utilizar bibliotecas espectrais que sugerem mais de um composto para um determinado espectro, aumentando a reprodutibilidade dos tratamentos de dados ao substituir diferentes plataformas e *softwares* por um fluxo de trabalho que pode ser realizado completamente pela plataforma GNPS.

Os dados foram filtrados removendo todos os íons fragmentos MS/MS dentro da faixa de ± 17 Da correspondente ao fragmento com m/z do íon precursor. Os espectros MS/MS foram filtrados por janela, selecionando apenas os 6 principais íons fragmentos dentro de uma janela de ± 50 Da ao longo do espectro. A tolerância de massa do íon precursor foi definida como 20000 Da, e a precisão dos íons fragmentos MS/MS foi de 0,5 Da. Em seguida, foi criada uma rede molecular, na qual as conexões (arestas) foram filtradas para apresentar um escore cosseno acima de 0,7 e mais de 6 picos correspondentes. Além disso, a conexão entre dois nodos foi mantida na rede apenas quando ambos estavam entre os 10 nodos mais similares um do outro. Por fim, o tamanho máximo de uma família molecular foi definido como 100, e as conexões com menor pontuação foram removidas das famílias moleculares até que seu

tamanho ficasse abaixo desse limite. Os espectros da biblioteca foram filtrados da mesma forma que os dados de entrada. Todas as correspondências mantidas entre os espectros da rede e os espectros da biblioteca exigiram um escore acima de 0,5 e pelo menos 6 picos correspondentes. As redes moleculares foram visualizadas e editadas utilizando o software Cytoscape.

3.8.3. Redes Moleculares das Análises de Voláteis

Para a construção da rede molecular com os dados das análises obtidas por HS-SPME-GC-MS foi utilizada os fluxos de trabalho *Data Processing – Deconvolution* e *Library Search/Molecular Networking GC* mesmo fluxo de trabalho descrito no item 3.8.2.2.

3.9. ENSAIO CITOTÓXICO

Amostras selecionadas dentre os de alguns extratos e frações obtidos a partir da metodologia descrita na seção 3.6, foram submetidas a análises de citotoxicidade em células da linhagem HCT-116 (carcinoma de cólon-retal), conforme metodologia utilizada no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais Marinhos (LAFAMAR) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP).

Em cada poço, foram plaqueadas $0,2 \times 10^4$ células da linhagem escolhida, em placas de 96 poços, na concentração final de 1×10^4 cel/mL em 200 µL de meio/poço. Após 24 horas, as amostras escolhidas foram adicionadas nas concentrações de 5 e 50 µg/mL em duplicatas e incubadas pelo período de 72 horas. A doxorrubicina (0,00064 – 10 µM) foi utilizada como controle positivo e dimetilsulfóxido (DMSO - 0,05%) como controle negativo.

Após 72 horas, o sobrenadante foi removido e substituído por meio de cultura contendo MTT a 0,5 mg/mL. Depois de 3 horas, o sobrenadante foi removido e, após a secagem da placa, o precipitado contendo azul de formazan foi dissolvido em 150 µL de DMSO e a absorbância foi medida a 570 nm (Mosmann, 1983).

Foram realizados dois experimentos independentes e em duplicata para cada amostra.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CURVA DE CRESCIMENTO

A construção da curva de crescimento do fungo *Annulohyphoxylon atroroseum* foi traçada para avaliar a dinâmica de desenvolvimento do microrganismo em meio líquido de extrato de malte a 2 g/L, concentração indicada pelo fabricante. Esse estudo possibilitou determinar o período ótimo de crescimento para a produção de metabólitos especializados, auxiliando na escolha do tempo ideal de cultivo para futuras análises químicas.

Na tabela a seguir, estão os valores encontrados de massas de extrato e da biomassa seca determinadas a partir da metodologia descrita anteriormente.

Dia	Biomassa seca (g)	Massa de Extrato (g)
5	0,2103	17,6000
10	0,4721	25,2333
15	0,7883	29,3667
20	0,9401	35,8667
25	1,0791	34,3000
30	1,0982	26,8333
35	1,0579	19,1000

Tabela 1: Massa média do extrato e biomassa de *A. atroroseum* ao longo do tempo de crescimento.
Fonte: Dados do autor.

A partir destes dados, a curva do gráfico 2, que relaciona a biomassa seca em função do período de crescimento fúngico, foi construída:

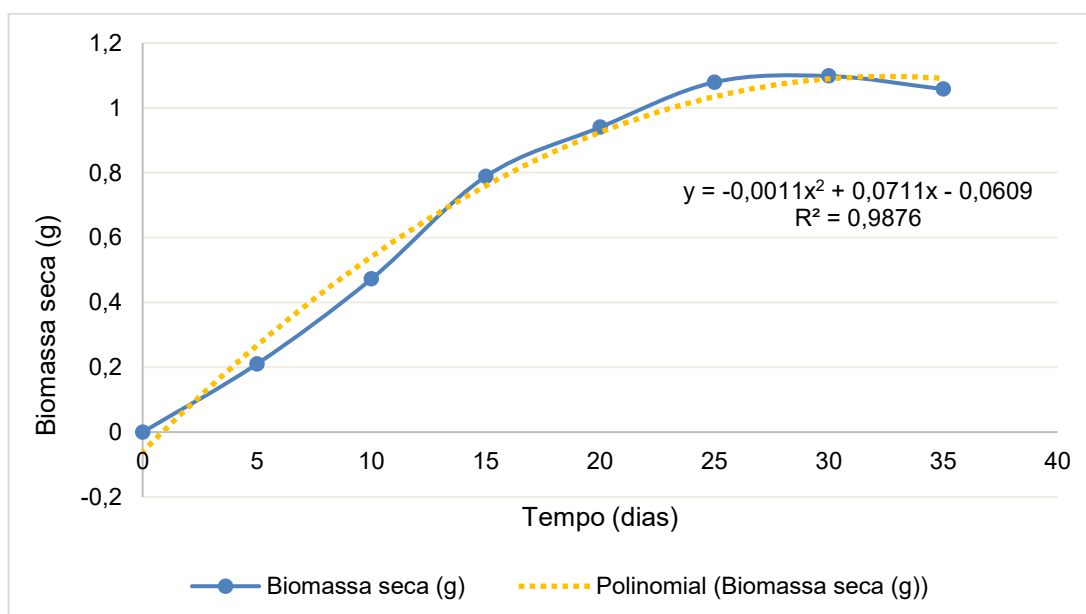


Gráfico 2: Curva de crescimento de *A. atroroseum* (biomassa x tempo de crescimento).
Fonte: Dados do autor

A equação da linha de tendência polinomial foi utilizada para determinar o ponto máximo da curva, evidenciando que o crescimento do micélio atingiu seu valor máximo aproximadamente aos 32,32 dias. Esse valor foi obtido a partir da derivada da equação ajustada, permitindo identificar o momento em que a taxa de crescimento se iguala a zero. Além disso, a redução da massa do micélio observada no dia 35 indica que, nesse período, o fungo já havia iniciado o estágio de declínio, caracterizado pela morte celular. Esse comportamento sugere que, após atingir o pico de biomassa, o fungo entrou em uma fase de redução metabólica, possivelmente devido ao esgotamento de nutrientes ou ao acúmulo de metabólitos especializados inibitórios.

Uma segunda curva foi construída a partir dos dados de massa dos extratos obtidos para cada período de cultivo, representada no gráfico 3 a seguir:

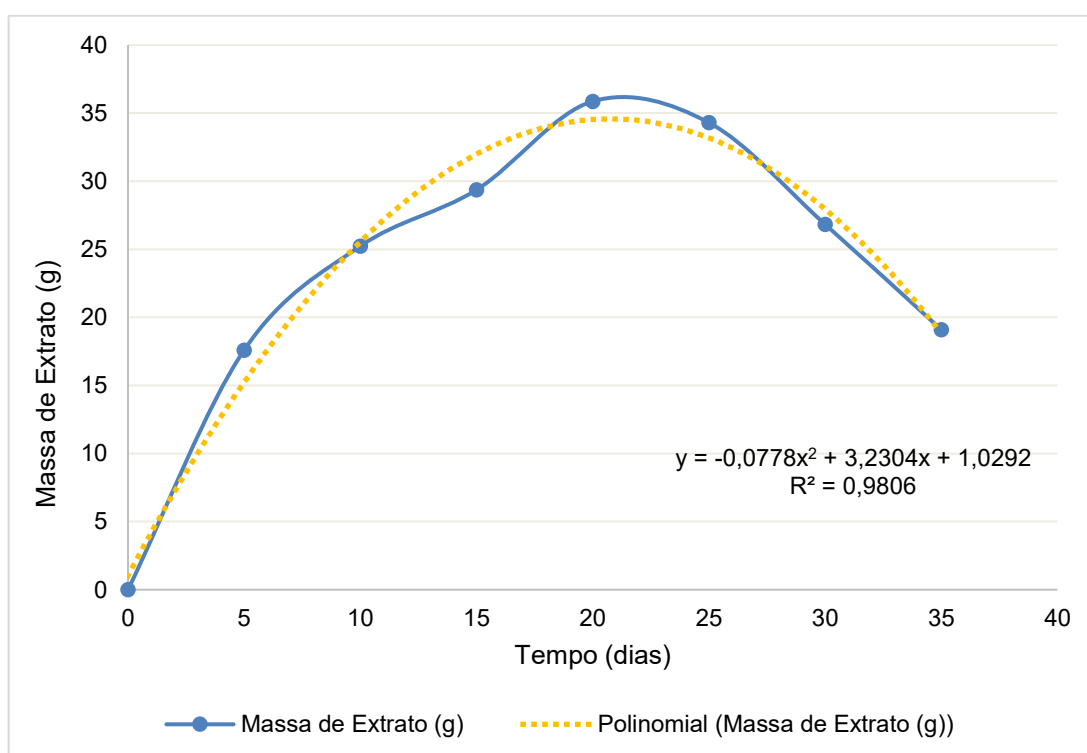


Gráfico 3: Curva de massa do extrato obtido a partir do cultivo de *A. atroroseum* (massa de extrato x tempo de crescimento)

Fonte: Dados do autor

O gráfico apresenta a curva de crescimento do fungo *Annulohypoxyton atroroseum*, mostrando a variação da massa de extrato (g) ao longo do tempo de crescimento (dias). Observa-se um crescimento inicial acelerado, seguido de uma estabilização e, posteriormente, um declínio na massa de extrato.

O ponto máximo da curva ocorre por volta do 21º dia, indicando o período em que a produção de extrato atinge seu valor mais alto. Da mesma forma que na curva anterior, este resultado foi obtido através da derivação da curva de crescimento, que permite identificar o momento em que a taxa de crescimento iguala a zero ($\approx 20,77$ dias). Após esse tempo, há uma redução na massa do extrato, o que pode estar relacionado ao esgotamento de nutrientes disponíveis no meio de cultivo, à acumulação de metabólitos inibitórios, ao consumo dos metabólitos especializados produzidos pelo fungo ou à degradação de compostos.

Esse comportamento é característico do crescimento microbiano em meio líquido, onde, após atingir a fase estacionária, há uma redução da atividade metabólica, levando ao declínio na produção de biomassa e metabólitos. Dessa forma, o tempo ideal para a extração deve ser próximo ao 21º dia, garantindo rendimento máximo antes da fase de declínio.

4.1.1. Análises HPLC-DAD das amostras da curva de crescimento

As análises cromatográficas dos extratos da curva de crescimento foram realizadas em metodologia exploratória conforme descrito no item **3.5.1.1**. A figura 22, a seguir apresenta os cromatogramas referentes aos sete pontos da curva de crescimento, além do controle (branco), correspondente ao extrato do meio de cultivo (extrato de malte) sem o crescimento fúngico. Esses perfis cromatográficos permitem visualizar a variação na produção de metabólitos ao longo do tempo.

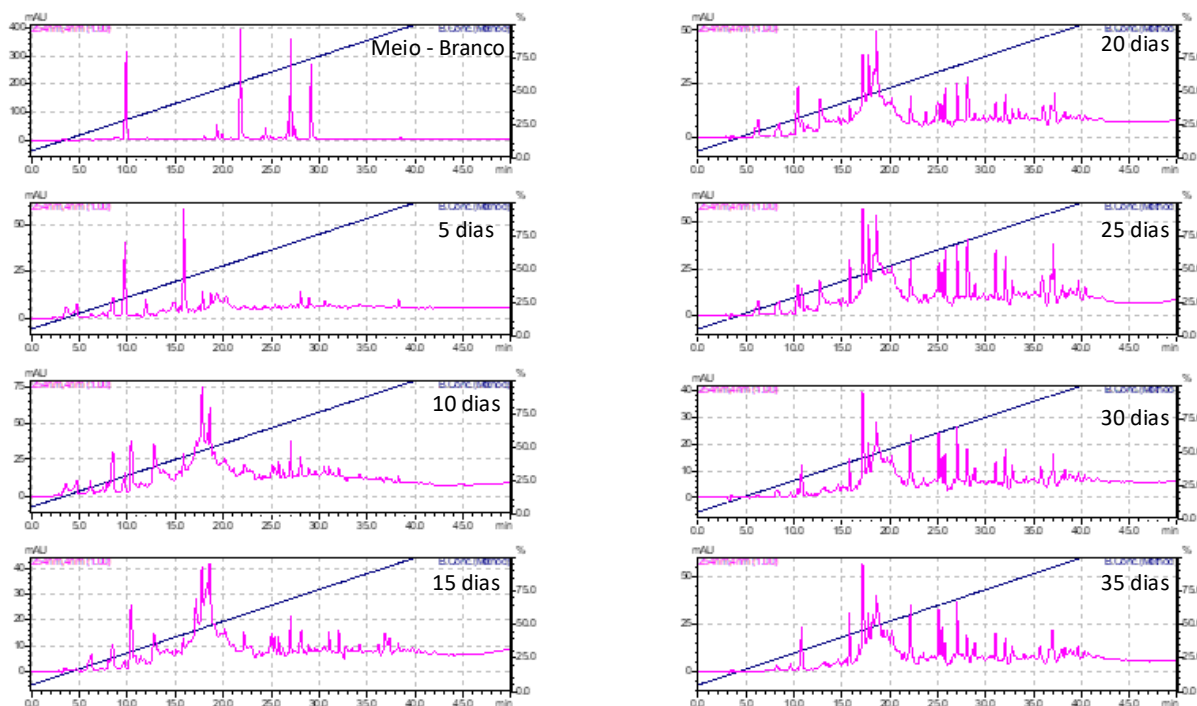


Figura 22: Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD das amostras de cultivo do fungo endofítico ao longo da curva de crescimento.

Fonte: Dados do autor.

Os cromatogramas apresentados representam a evolução na produção dos metabólitos dos diversos extratos ao longo da curva de crescimento do fungo *A. atroroseum*. O primeiro cromatograma representa o meio de cultivo sem a presença do fungo. Nota-se menor complexidade no perfil cromatográfico quando comparado com os cromatogramas dos extratos. Nos cromatogramas dos primeiros períodos de cultivo, há uma diminuição expressiva de alguns picos do extrato controle (branco), que corresponde ao consumo dos nutrientes presentes no meio de cultivo pelo fungo. Pode-se perceber também aumento gradativo da intensidade e quantidade de picos, sugerindo o início da produção de metabólitos especializados. Nos cromatogramas referentes aos períodos de cultivos de 15, 20 e 25 dias, há um aumento expressivo na intensidade e na diversidade de picos, indicando uma produção ativa de metabólitos. Esses períodos podem representar a fase de maior expressão metabólica, onde o fungo sintetiza metabólitos especializados em maior quantidade.

Nos últimos períodos de cultivo avaliados (30 e 35 dias), observa-se um leve declínio na produção de metabólitos. Além disso, é possível também a diminuição de alguns picos registrados nas amostras anteriores. Isso pode indicar que o fungo está entrando em uma fase de esgotamento de nutrientes do meio e consumindo os metabólitos produzidos.

4.1.2. Redes moleculares das amostras da curva de crescimento

As análises por UPLC-ESI-QTOF-MS/MS das amostras obtidas através do cultivo do fungo *Annulohypoxylon atroroseum* para a construção de sua curva de crescimento foram processadas na plataforma GNPS. A metodologia utilizada foi a *Classical Molecular Networking* para amostras analisadas por espectrometria de massas de alta resolução, conforme descrito na seção 3.8.1. com os parâmetros sugeridos pela plataforma, demonstrados na figura 21.

4.1.2.1. Rede molecular das análises em modo positivo das amostras da curva de crescimento

A rede molecular mostrada na figura 23 foi gerada através da plataforma GNPS (Wang, 2016) conforme descrito anteriormente e editada no software Cytoscape a partir dos dados das análises de UPLC-ESI-QTOF-MS/MS no modo positivo das amostras de extrato bruto das culturas utilizadas para a construção da curva de crescimento do fungo *A. atroroseum*.

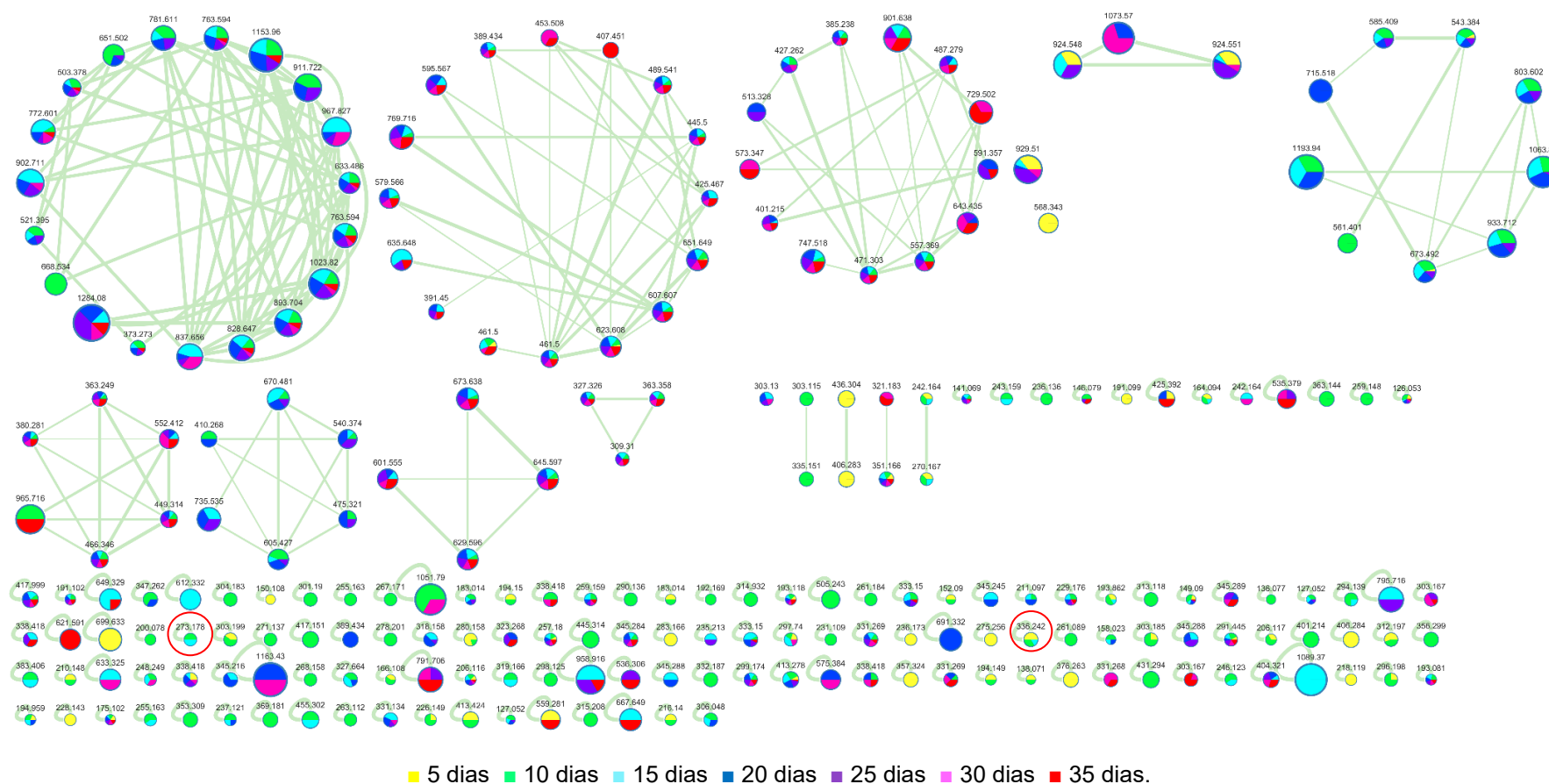


Figura 23: Rede molecular gerada através dos dados obtidos nas análises de UPLC-ESI-QTOF-MS/MS no modo positivo das amostras da curva de crescimento. Gerada no GNPS. Editada no *Cytoscape*. Etiquetas dos nodos: m/z do íon precursor. Tamanho dos nodos: proporcionais à m/z do íon precursor. Espessura das arestas: proporcionais ao escore de cosseno. Destacados em vermelho: nodos m/z 336.242 e 273.178, anotados como *Cyclopentyladenosine* e *(3Z)-3-[(4-hydroxyphenyl)methylidene]-2-methyl-6,7,8,8a-tetrahydropyrrolo[1,2- α]pyrazine-1,4-dione*, respectivamente.

Fonte: Dados do autor.

A rede molecular mostrada na figura 23 foi criada com filtro dos nodos presentes na amostra do meio de cultivo (branco). Ou seja, as espécies químicas presentes no branco que também apareceram nas análises dos pontos da curva foram descartadas para a criação de uma rede que contivesse apenas as espécies químicas geradas a partir da inoculação do fungo associado.

A tabela 2 mostra a quantidade de nodos adquiridos pelo GNPS.

Filtros	Número de nodos
Rede molecular total	374
Rede molecular com filtro do branco (figura 23)	228
Exclusivos da amostra de 5 dias	14
Exclusivos da amostra de 10 dias	49
Exclusivos da amostra de 15 dias	2
Exclusivos da amostra de 20 dias	3
Exclusivos da amostra de 25 dias	0
Exclusivos da amostra de 30 dias	0
Exclusivos da amostra de 35 dias	2

Tabela 2: Número de nodos referentes à rede molecular obtida por UPLC-ESI-QTOF-MS/MS no modo positivo construída a partir dos dados da curva de crescimento.

Fonte: Dados do autor.

Como demonstrado na tabela 2, dos 374 nodos totais, 146 nodos foram excluídos da rede molecular por estarem presente na amostra controle (branco), o que indica que são referentes a espécies químicas presentes no meio de cultivo utilizado.

Essa rede molecular mostra 228 nodos, dos quais 141 foram registrados como *singletons* (nodos que não fazem conexões com outros nodos), sendo que 14 são exclusivos da amostra do ponto de 5 dias, representando 6,14% do total. Para a amostra referente ao extrato obtido aos 10 dias de cultivo, foram mostrados 49 nodos exclusivos, ou 21,49% do total. Apenas 2 nodos (0,88%) foram exclusivos da amostra de 15 dias, representando 0,87% do total. A rede ainda registrou 3 nodos (1,31%) exclusivos para amostra de 20 dias, nenhum nodo exclusivo para as amostras de 25 dias e 30 dias e finalmente 2 nodos (0,88%) exclusivos para a amostra referente ao extrato obtido aos de 35 dias de cultivo do fungo *A. atroroseum*.

Durante a construção das redes moleculares no GNPS e a edição no Cytoscape, observou-se que os nodos correspondentes às substâncias detectadas nas amostras de controle foram excluídos completamente pelo filtro aplicado. Essa etapa não permitiu discernir se determinadas substâncias originalmente detectadas no meio

também foram produzidas ou tiveram sua concentração incrementada pelo metabolismo do microrganismo durante o cultivo. Isso implicou em que compostos de origem mista (ao mesmo tempo provenientes do meio de cultivo e produzidas pelo fungo) também foram desconsiderados nas análises das redes. Trata-se, portanto, de limitação dos métodos escolhidos, uma vez que as técnicas utilizadas não abrangeram análises quantitativas dos compostos presentes em cada amostra e que deve ser considerada na interpretação dos resultados da rede apresentada anteriormente e nas subsequentes deste trabalho.

Na tabela 3 a seguir estão descritos os detalhes que estes da anotação dos nodos destacados. A substância com m/z 336.242 foi anotada como *cyclopentyladenosine* (**56**) e aquela associada ao fragmento m/z 273.178 foi anotada como (3Z)-3-[(4-hydroxyphenyl)methylidene]-2-methyl-6,7,8,8a-tetrahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione (**57**) (THPD), sendo registrada na plataforma ChEBI (*Chemical Entities of Biological Interest*) sob ID ChEBI:182675 e na plataforma PubChem como CID 45359424 (Hastings *et al.*, 2016).

Por conta da alta complexidade das estruturas e dos nomes de alguns compostos anotados pelo GNPS nessa e nas redes moleculares subsequentes, foi determinado que suas nomenclaturas seriam mantidas na língua inglesa conforme indicados pela plataforma, para evitar perda de informações nas traduções para o português. Por essa decisão e para manter a uniformidade no trabalho, todas as substâncias químicas até aqui e no restante do trabalho também foram apresentadas com seu nome em inglês.

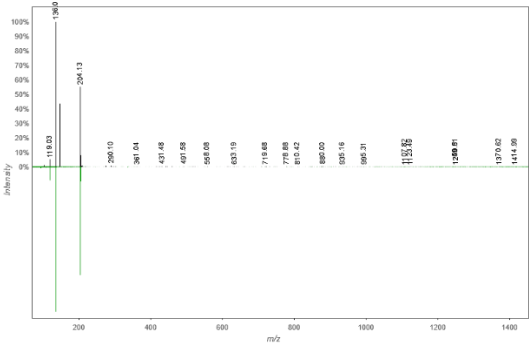
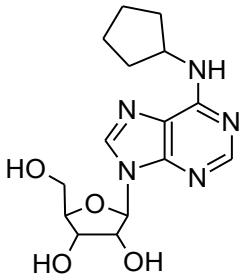
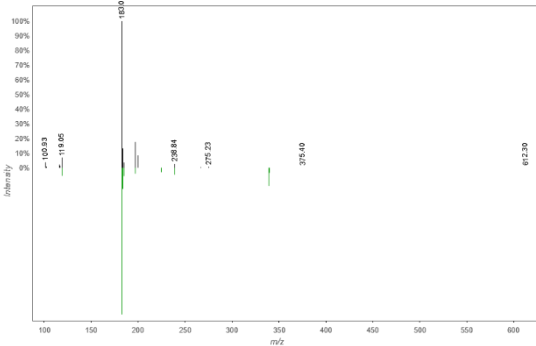
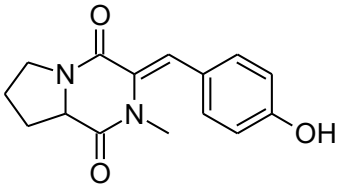
Nome (F.M.)*	Aduto	m/z do íon precursor	m/z teórica	Erro de m/z (ppm)	Comparação entre espectros	Estrutura	Pontuação de cosseno
(56) Cyclopentyladenosine (C ₁₅ H ₂₁ N ₅ O ₄)	[M-H] ⁺	336.242	336.1666	0.07 (224.20)			0.85
(57) THPD (C ₁₅ H ₁₆ N ₂ O ₃)	[M-H] ⁺	273.178	273.1233	0.05 (200.02)			0.79

Tabela 3: Compostos anotados pela plataforma GNPS através dos dados de UPLC-ESI-QTOF-MS/MS para as amostras obtidas da curva de crescimento.

Fonte: Dados do autor.

O composto **(56)** esteve presente nas amostras de 5, 10 e 15 dias, o que pode significar que foi consumido ou degradado após esse período. Seu espectro massas apresenta 7 picos compartilhados com o espectro da biblioteca, além de diferença de m/z de 0,07 e escore de cosseno 0.84, com *gold match* na biblioteca espectral do GNPS, o que significa alta similaridade nos dados.

A *cyclopentyladenosine* é um nucleosídeo que atua como agonista do receptor A_1 de adenosina e possui efeitos cardiovasculares amplamente estudados (Williams *et al.*, 1986; Laughlin *et al.*, 2024). Outro exemplo da aplicação deste nucleosídeo e de seus derivados são as análises *in vivo* de intoxicação por soman, um composto organofosforado, que determinaram que a *cyclopentyladenosine* é mais eficaz que seu análogo, *2-chloro-N6-cyclopentyladenosine*, em promover a sobrevivência dos ratos avaliados por 14 dias. Neste contexto, os autores sugerem que o agonismo do receptor A_1 é uma medida neuroprotetora promissora, que pode ser capaz de prevenir danos neurais característicos da intoxicação por soman (Meads *et al.*, 2021)

A substância **(57)** (THPD) também apresentou *gold match*, com diferença de 0.05 no valor de m/z da espécie química da amostra e da massa teórica do íon precursor. Além disso, apresentou também pontuação de cosseno 0.79 e 6 picos compartilhados nos espectros, evidenciando alto grau de similaridade. A THPD foi identificada nas amostras dos cultivos de 10 e 15 dias.

THPD é um derivado de pirrolopirazinas, de ocorrência restrita, que possui limitada bibliografia específica. Pirrolopirazinas apresentam estruturas com heterociclos nitrogenados, contendo um anel de pirrol e um anel de pirazina (Terenin *et al.* 1991). Dehnavi *et al.* (2021) publicaram uma revisão sobre derivados de pirrolopirazinas que cita propriedades antioxidantes e antimicrobianas, além de potencial antioxidante de um composto análogo, cuja diferença estrutural está associada à substituição da hidroxila no anel aromático, quando comparada à substância anotada pelo GNPS neste.

4.1.2.2. Rede molecular das análises em modo negativo das amostras da curva de crescimento

A rede molecular apresentada na figura 24 foi gerada através da plataforma GNPS (Wang, 2016) e editada no software Cytoscape a partir dos dados das análises

de UPLC-ESI-QTOF-MS/MS no modo negativo das amostras de extrato bruto das culturas utilizadas para a construção da curva de crescimento do fungo.

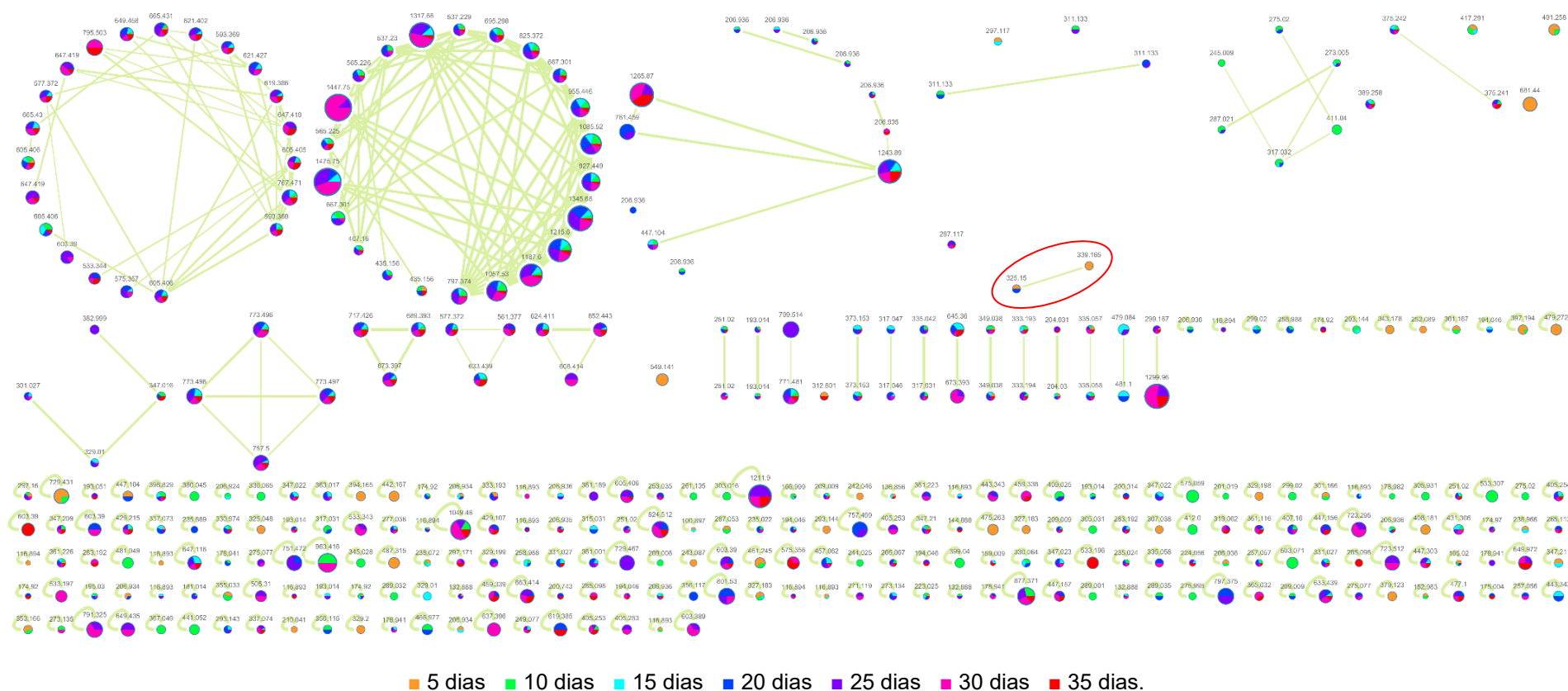


Figura 24: Rede molecular gerada através da plataforma GNPS através dos dados obtidos nas análises de UPLC-ESI-QTOF-MS/MS no modo negativo das amostras da curva de crescimento de *Annulohyphoxylon atroroseum*. Gerada no GNPS. Editada no Cytoscape. Etiquetas dos nodos: m/z do íon precursor. Tamanho dos nodos: proporcionais à m/z do íon precursor. Espessura das arestas: proporcionais ao escore de cosseno. Destacados em vermelho: nodos m/z 325.150 e 339.165, anotados como *Hydroquinidine* e *Canrenone*, respectivamente.

Fonte: Dados do autor.

Essa rede molecular foi criada com filtro dos nodos presentes na amostra do meio de cultivo (branco). Ou seja, as espécies químicas presentes no branco que também apareceram nas análises dos pontos da curva foram descartadas para a criação de uma rede que contivesse apenas as espécies químicas geradas a partir da inoculação do fungo em estudo. Além disso, as arestas entre os nodos da rede têm espessura diretamente proporcional ao escore de cosseno entre os nodos, providenciando dado complementar sobre a robustez das anotações

Na tabela 4 a seguir estão descritos os dados das quantidades de nodos adquiridos pela plataforma GNPS.

Filtros	Número de nodos
Rede molecular total	526
Rede molecular com filtro do branco (figura 24)	340
Exclusivos da amostra de 5 dias	22
Exclusivos da amostra de 10 dias	26
Exclusivos da amostra de 15 dias	1
Exclusivos da amostra de 20 dias	4
Exclusivos da amostra de 25 dias	9
Exclusivos da amostra de 30 dias	12
Exclusivos da amostra de 35 dias	3

Tabela 4: Número de nodos referentes à rede molecular obtida por UPLC-ESI-QTOF-MS/MS no modo negativo a partir dos dados da curva de crescimento.

Fonte: Dados do autor.

Como demonstrado na tabela, dos 526 nodos totais, 186 nodos foram excluídos da rede molecular por estarem presente na amostra do branco, o que indica que são referentes a espécies químicas já presentes no meio de cultivo utilizado.

A rede molecular da figura 24 contém 340 nodos, dos quais 222 foram registrados como *singletons*, 22 nodos são exclusivos da amostra do ponto de 5 dias, representando 6,47% do total. Para a amostra referente ao extrato obtido aos 10 dias de cultivo, foram mostrados 26 nodos exclusivos, ou 7,64% do total. Apenas 1 nodo foi exclusivo da amostra de 15 dias, representando 0,29% do total. A rede ainda registrou 4 nodos (1,17%) exclusivos para amostra de 20 dias, 9 (2,64%) para a amostra de 25 dias, 12 (3,52%) para a amostra de 30 dias e finalmente 3 (0,88%) nodos exclusivos para a amostra obtida aos 35 dias de cultivo do fungo *A. atroroseum*.

Na tabela 5 a seguir estão descritos os detalhes da anotação dos nodos de *m/z* 325.150 e 339.165.

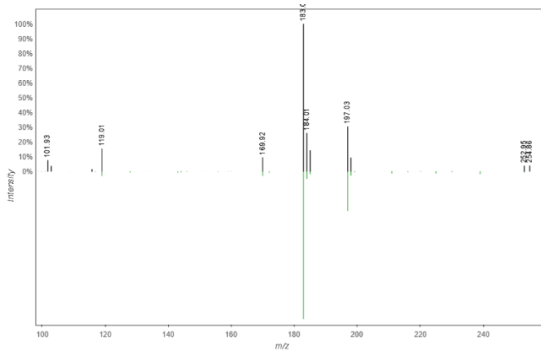
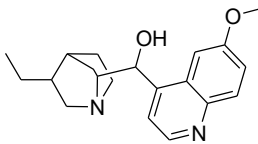
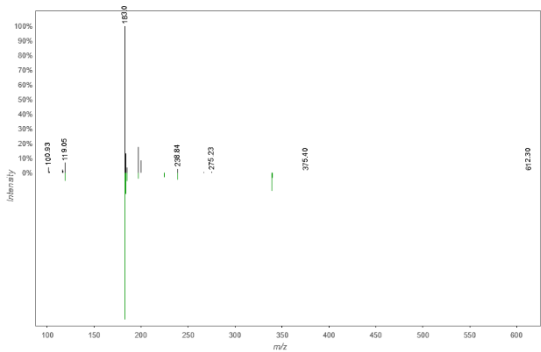
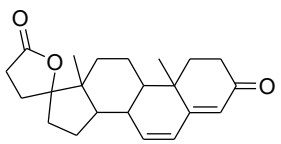
Nome (F.M.)*	Aduto	<i>m/z</i> do íon precursor	<i>m/z</i> teórica**	Erro de <i>m/z</i> (ppm)**	Comparação entre espectros	Estrutura	Pontuação de cosseno
(58) Hydroquinidine (C ₂₀ H ₂₆ N ₂ O ₂)	[M-H] ⁻	325.150	325.1921	0.04 (129.62)			0.85
(59) Canrenone (C ₂₂ H ₂₈ O ₃)	[M-H] ⁻	339.165	339.1965	0.03 (93.06)			0.91

Tabela 5: Compostos anotados pela plataforma GNPS através dos dados de UPLC-ESI-QTOF-MS/MS para as amostras da curva de crescimento.

Fonte: Dados do autor.

As duas substâncias anotadas possuem pontuação de cosseno 0.85 e 0.91, o que indica alta confiabilidade na relação com os dados da biblioteca espectral. Além disso, as três substâncias apresentaram pelo menos 6 picos em comum entre os espectros adquiridos e os espectros da base de dados. As diferenças de m/z foram de 0.04 a 0.03, o que demonstra variação na exatidão da amostra dentro dos limites aceitáveis para análises baseadas em redes moleculares.

A *hydroquinidine* (**58**) foi anotada como *bronze match* e é um alcaloide derivado da quinidina conhecido por possuir propriedades antiarrítmicas, encontrado principalmente em plantas do gênero *Cinchona* (Brembilla-Perrot, Jacquemin and Beurrier, 1997), também já foi descrito por possuir atividade anticarcinogênica inibindo o ciclo celular e estimulando a apoptose de células cancerígenas de mama e ovário (Yavuz *et al.*, 2023) e como agente antimalárico (Bekoe *et al.*, 2022).

Canrenone (**59**), também *bronze match*, é uma lactona esteroide que tem sido aplicada em testes para diagnóstico de insuficiência cardíaca (Frankenstein *et al.*, 2019). Além disso, é um antagonista de aldosterona com atividade diurética poupadora de potássio, antagonizando especificamente a aldosterona no receptor de mineralocorticoide nos rins, aumentando a excreção de sódio e inibindo a excreção de potássio (Rossi *et al.*, 2020).

4.2. CULTIVO DO FUNGO *A. atroroseum* EM 5 MEIOS DE CRESCIMENTO DISTINTOS

A aplicação da estratégia OSMAC permitiu avaliar a influência de diferentes meios de cultura na produção de metabólitos especializados pelo fungo estudado. O cultivo foi realizado conforme metodologia descrita no item 3.6, em cinco meios distintos, visando estimular a expressão de vias metabólicas variadas e, assim, maximizar a diversidade de compostos detectados.

Para identificar cada extrato dos cultivos em meio sólido, as amostras foram nomeadas em código padronizado que indica o meio de cultivo e o número da replicata. As duas primeiras letras representam o meio utilizado no crescimento do fungo: Av para aveia, Ar para arroz e Tr para trigo. Para extrato de malte e caldo batata dextrose, foram utilizados os códigos MLT e PDB, respectivamente. As amostras codificadas com zero são referentes aos controles, ou seja, extratos dos meios de cultivo sem inoculação do fungo.

Na tabela a seguir estão os valores de massa de extrato obtido em cada um dos diferentes cultivos:

Extrato	Massa (mg)	Extrato	Massa (mg)	Extrato	Massa (mg)
Ar0	877,65	Tr0	946,36	PDB0	19,68
Ar1	2635,32	Tr1	2230,76	PDB1	38,44
Ar2	2549,16	Tr2	2073,04	PDB2	53,73
Ar3	2494,99	Tr3	2361,07	PDB3	66,64
Av0	1023,47	MLT 0	12,03		
Av1	3205,83	MLT1	37,82		
Av2	3108,08	MLT2	30,61		
Av3	3424,92	MLT3	39,24		

Tabela 6: Massa dos extratos obtidos a partir das extrações realizadas a partir dos cultivos em 5 meios distintos de *Annulohypoxylon atroroseum*.

Fonte: Dados do autor (2025).

Após as partições dos extratos com hexano e acetato de etila como descrito no tópico 3.6, foi adicionado ao código das amostras uma letra que indica a fração que originou aquele extrato: H, A ou M. Por exemplo, a amostra Av3M refere-se à fração metanol da terceira replicata do cultivo em meio de aveia.

Para os cultivos em meio líquido, os extratos brutos foram identificados como MLT para cultivos em extrato de malte e PDB para cultivos em caldo batata e dextrose.

Amostra	Massa obtida (mg)	Amostra	Massa obtida (mg)
Ar0M	202,1	Av2H	773,21
Ar1M	420,24	Av3H	656,48
Ar2M	472,45	Tr0M	185,42
Ar3M	500,24	Tr1M	390,45
Ar0A	35,64	Tr2M	431,45
Ar1A	74,49	Tr3M	414,81
Ar2A	85,73	Tr0A	88,27
Ar3A	99,16	Tr1A	91,65
Ar0H	321,69	Tr2A	104,62
Ar1H	654,83	Tr3A	95,24
Ar2H	716,71	Tr0H	276,12
Ar3H	644,72	Tr1H	390,45
Av0M	158,98	Tr2H	366,19
Av1M	358,96	Tr3H	414,81
Av2M	277,3	MLT0	6,89
Av3M	302,98	MLT1	37,8
Av0A	75,84	MLT2	30,6
Av1A	125,22	MLT3	19,2
Av2A	85,72	PDB0	7,52
Av3A	125,13	PDB1	38,44
Av0H	429,21	PDB2	53,73
Av1H	662,32	PDB3	66,64

Tabela 7: Massa das amostras obtidas através da aplicação da estratégia OSMAC para o cultivo do fungo *A. atroroseum*.

Fonte: Dados do autor.

4.2.1. Análises HPLC-DAD das Frações AcOEt e MeOH e das Amostras PDB e MLT

As figuras 25 a 32 mostram os cromatogramas obtidos através das análises de HPLC-DAD com detecção no comprimento de onda 254 nm das frações acetato e metanol obtidas a partir do extrato dos cultivos em meios sólidos e dos cultivos em meios líquidos. Os cromatogramas em preto, codificadas com zero, são referentes às amostras dos extratos sem inoculação (controle).

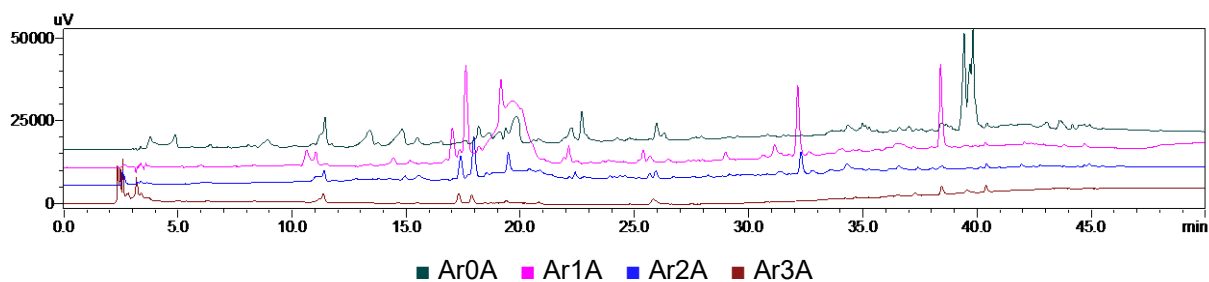


Figura 25: Cromatogramas das amostras ArA
Fonte: Dados do autor.

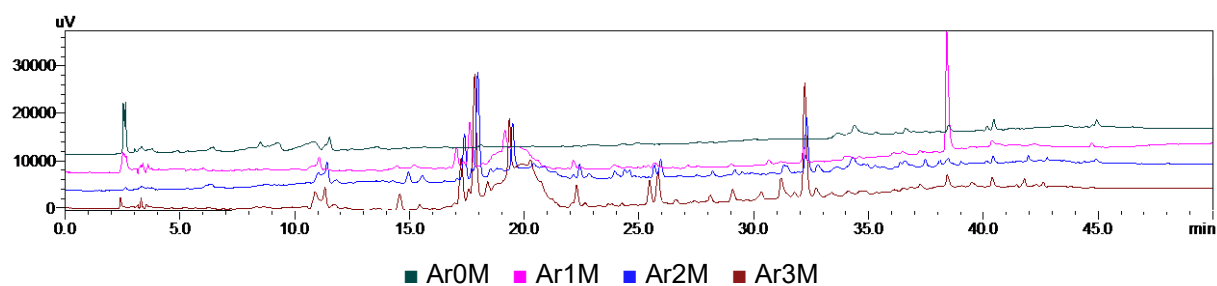


Figura 26: Cromatogramas das amostras ArM
Fonte: Dados do autor.

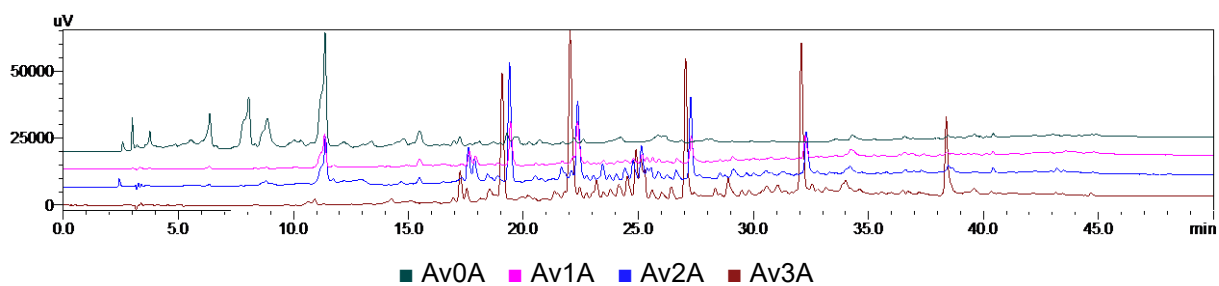


Figura 27: Cromatogramas das amostras AvA
Fonte: Dados do autor.

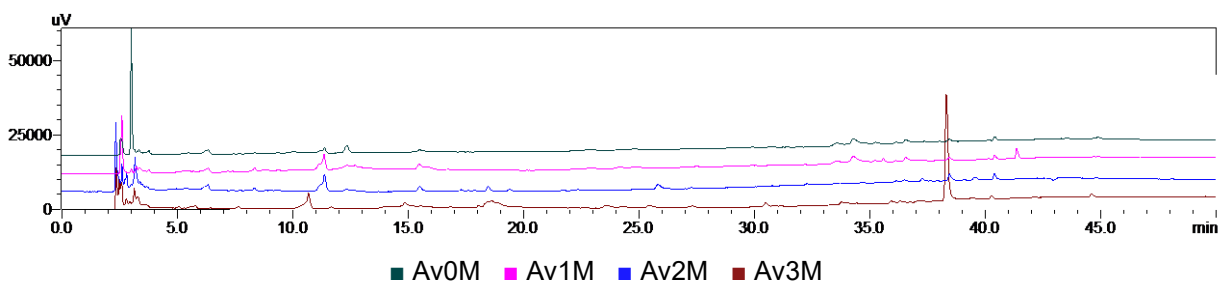


Figura 28: Cromatogramas das amostras AvM
Fonte: Dados do autor.

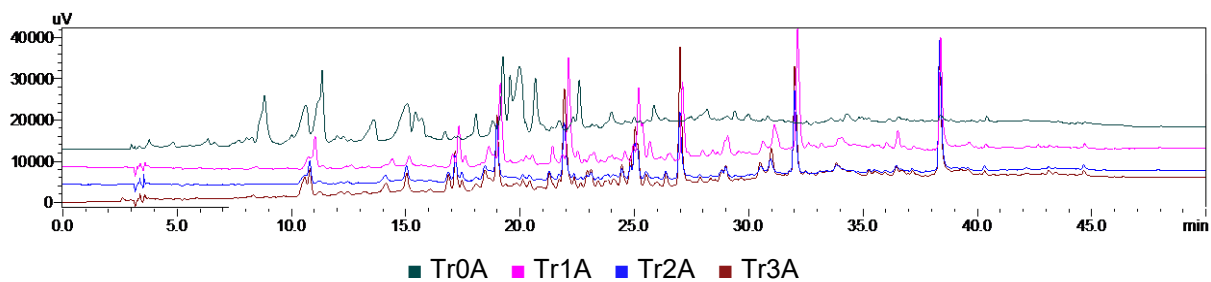


Figura 29: Cromatogramas das amostras TrA

Fonte: Dados do autor.

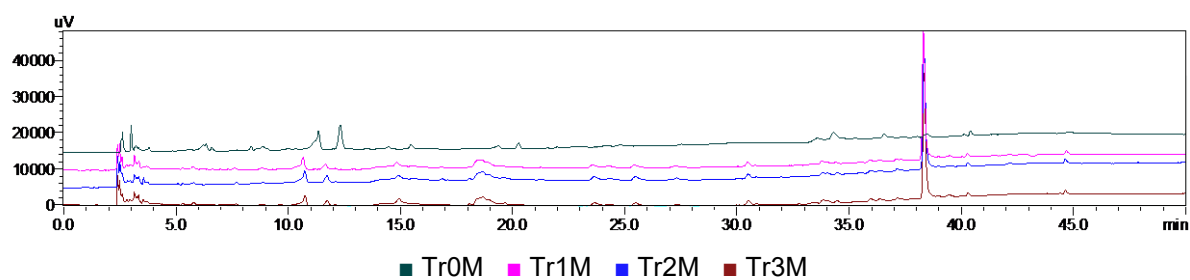


Figura 30: Cromatogramas das amostras TrM

Fonte: Dados do autor.

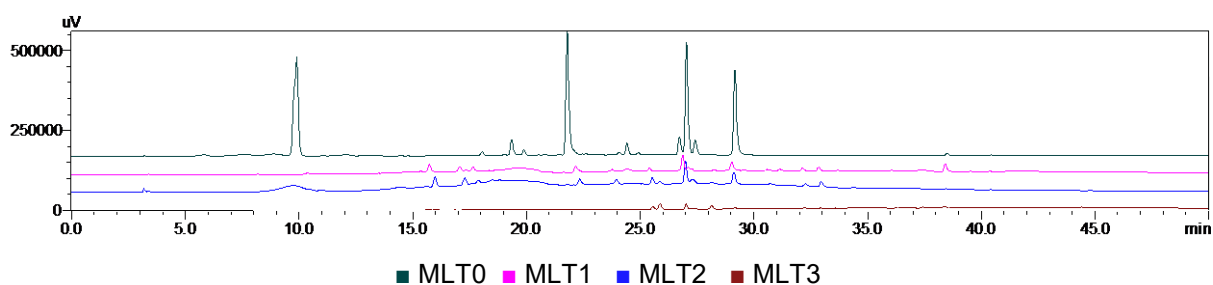


Figura 31: Cromatogramas das amostras MLT

Fonte: Dados do autor.

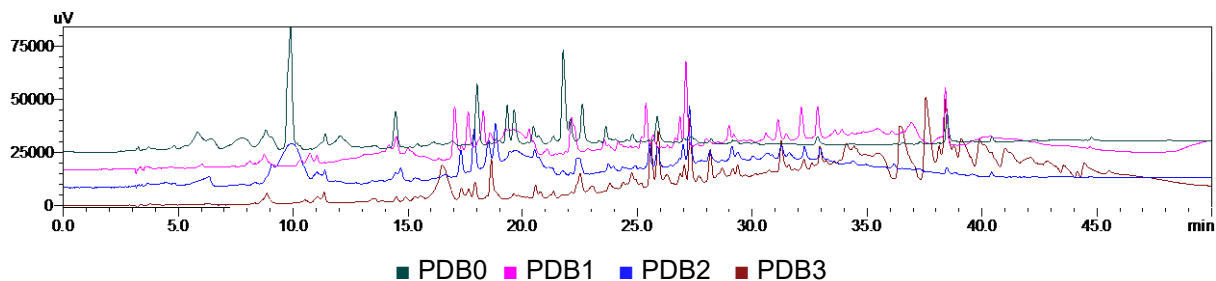


Figura 32: Cromatogramas das amostras PDB

Fonte: Dados do autor.

A partir das expressivas diferenças dos perfis cromatográficos observados nas amostras obtidas através aplicação da estratégia OSMAC pode-se inferir uma

variação relevante nos perfis metabólicos do fungo *Annulohyphoxylon atroroseum* quando cultivado em diferentes meios.

Os cromatogramas das frações acetato de etila (A) e metanólica (M) das culturas em meio sólido (Arroz, Aveia e Trigo), bem como dos extratos brutos obtidos em meio líquido (MLT e PDB), demonstraram perfis químicos distintos em complexidade, polaridade e intensidade. Em geral, as partições acetato (ArA, AvA, TrA) apresentaram picos majoritários entre 15 e 30 minutos, indicando a presença de compostos de média polaridade.

Já as frações metanólicas (ArM, AvM, TrM) concentraram sinais nas regiões iniciais (0–10 min) dos cromatogramas, compatíveis com substâncias mais polares. Além disso, os picos de baixa intensidade dessas amostras indicam presença de compostos que não absorvem luz no comprimento de onda utilizado, compatível com a presença de açúcares simples, por exemplo.

Dos cromatogramas dos cultivos em meio líquido, pode-se perceber uma maior complexidade no extrato obtido em PDB, o que indica maior variedade química produzida pelo fungo nesse meio.

Esses dados reforçam a hipótese de que a composição do meio influencia diretamente a ativação de diferentes vias biossintéticas, o que se reflete na diversidade química observada nos cromatogramas e nas redes moleculares apresentadas a seguir.

4.2.2. Construção das Redes Moleculares das Frações AcOEt e MeOH e das Amostras PDB e MLT

As redes moleculares referentes às análises de UPLC-ESI-QTOF-MS-MS foram criadas utilizando o *workflow* clássico na plataforma GNPS, conforme discutido anteriormente na seção 3.8.1.

4.2.2.1. Redes moleculares das análises em modo negativo

A figura 33 mostra a rede molecular editada no software Cytoscape a partir dos dados das análises de UPLC-ESI-QTOF-MS/MS no modo negativo das amostras das frações metanol e acetato dos cultivos em meios sólidos e dos extratos brutos dos cultivos em meios líquidos obtidas na aplicação da ferramenta OSMAC na

investigação dos metabólitos produzidos pelo fungo *A. atroroseum* em diferentes condições.

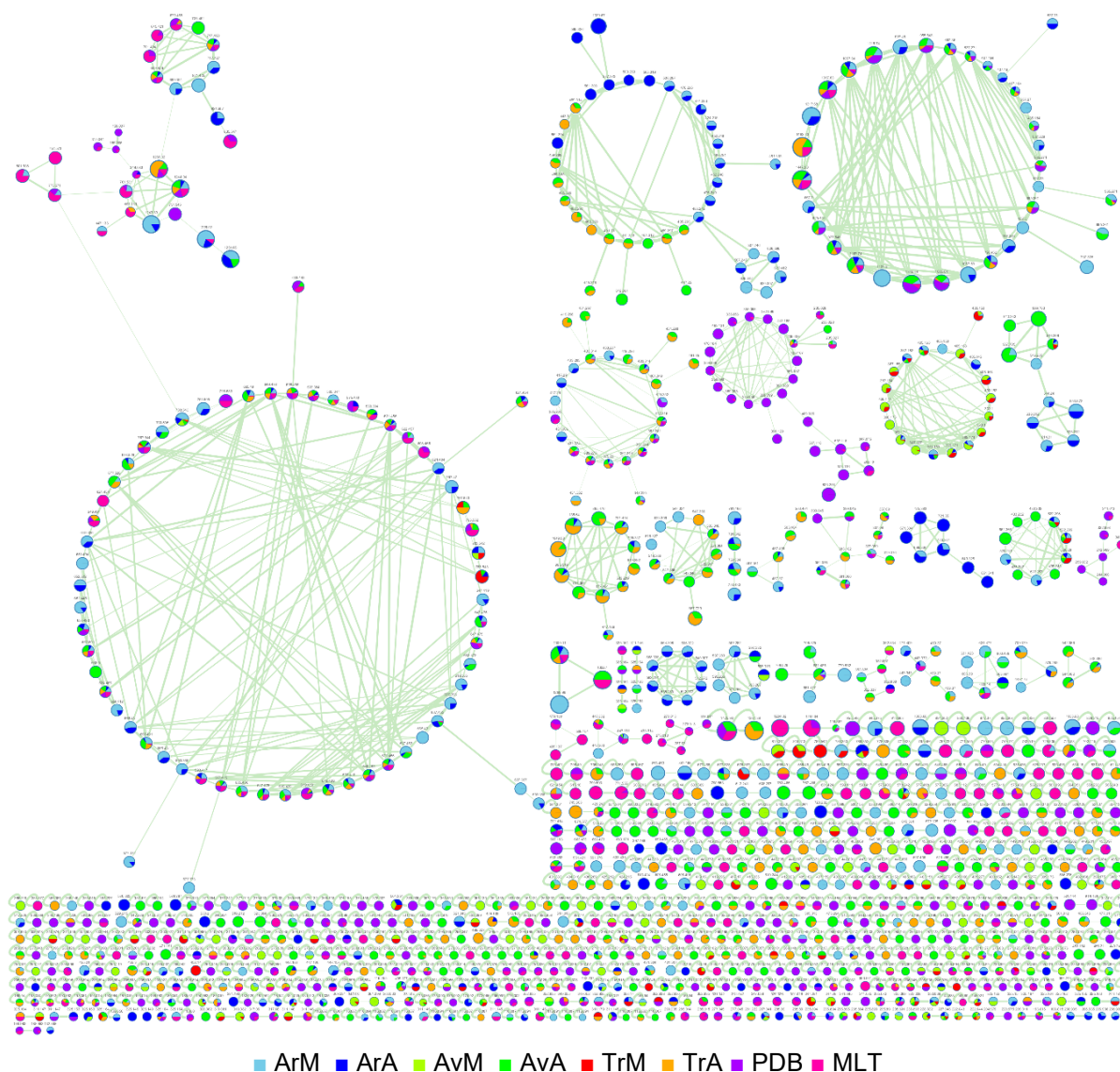


Figura 33: Rede molecular gerada através da plataforma GNPS através dos dados obtidos nas análises de UPLC-ESI-QTOF-MS/MS no modo negativo das amostras obtidas através da ferramenta OSMAC.

Gerada no GNPS. Editada no Cytoscape. Etiquetas dos nodos: m/z do íon precursor. Raio dos nodos proporcional à m/z do íon precursor. Espessura das arestas proporcional ao escore de cosseno.

Fonte: Dados do autor.

A rede molecular da figura 33 foi criada com filtro dos nodos presentes nas amostras dos meios de cultivo (branco). Ou seja, as espécies químicas presentes no branco que também apareceram nas análises dos pontos da curva foram excluídas para a criação de uma rede que contivesse apenas as espécies químicas geradas a partir da inoculação do fungo associado.

Na tabela 7 a seguir estão descritos os dados das quantidades de nodos adquiridos pela plataforma GNPS.

Filtros		Número de nodos	Número de nodos exclusivos
Rede molecular total		3132	--
Rede molecular com filtro dos brancos (figura 33)		1178	--
Arroz	Presentes em ArM	439	74
	Presentes em ArA	320	40
Aveia	Presentes em AvM	155	39
	Presentes em AvA	413	88
Trigo	Presentes em TrM	99	4
	Presentes em TrA	338	50
Presentes em PDB		371	113
Presentes em MLT		323	64
Singletons		640	--

Tabela 8: Número de nodos da rede molecular construída através do cultivo em diferentes meios.
Fonte: Dados do autor.

Para garantir a detecção de metabólitos específicos do fungo *Annulohyphoxylon atroroseum*, os nodos presentes nas amostras dos meios de cultivo sem inoculação (brancos) foram removidos. Esta etapa removeu 1954 nodos, referentes às espécies químicas encontradas nas amostras controles (brancos) e gerou a rede ilustrada anteriormente na figura 33. Ao analisar os nodos remanescentes, observa-se que a composição metabólica variou significativamente entre os diferentes meios de cultivo.

O gráfico abaixo ilustra a distribuição dos nodos em relação às amostras.

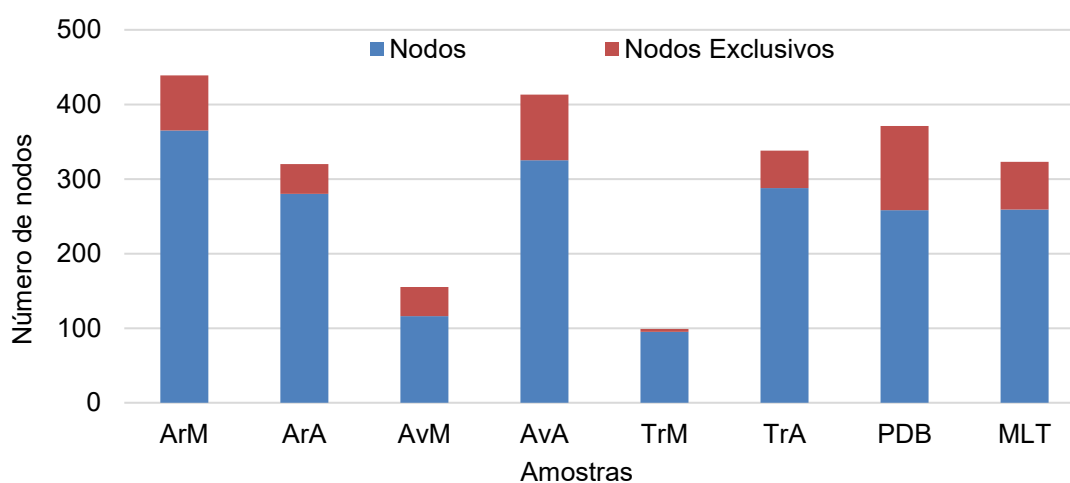


Gráfico 4: Nodos da rede molecular obtida pela ferramenta OSMAC para análises em modo negativo.
Fonte: Dados do autor.

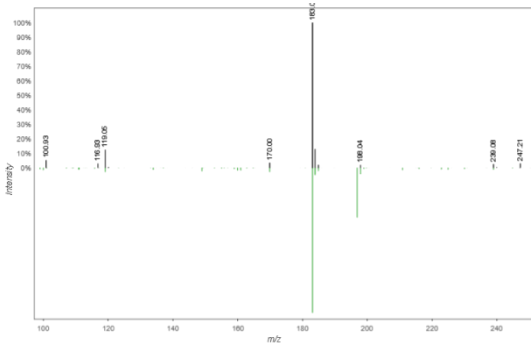
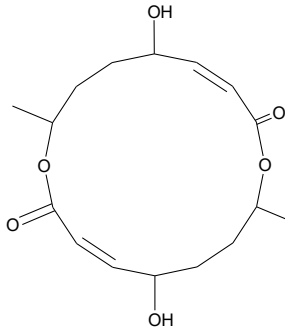
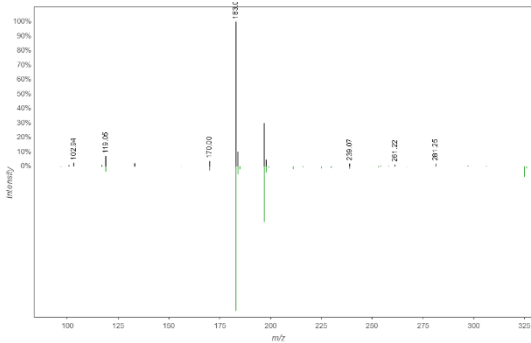
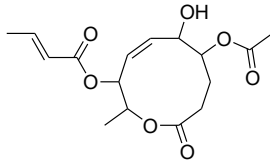
O gráfico mostra que o cultivo em meio sólido de arroz apresentou 439 nodos em amostras ArM e 320 nodos em amostras ArA, representando 37,26% e 27,16% da rede molecular criada com o filtro do branco, respectivamente. Já o cultivo em aveia registrou 155 nodos (13,15%) nas amostras AvM e 413 nodos (35,05%) nas amostras AvA. Por fim, o cultivo em trigo gerou 99 nodos (8,40%) nas amostras TrM e 338 nodos (28,69%) em TrA. Além disso, foram identificados 371 nodos (31,49%) nas amostras PDB e 323 (27,41%) nas amostras MLT. Esses resultados evidenciam a influência do meio de cultivo na diversidade química detectada. O meio de aveia, apesar de não ter sido o meio de cultivo sólido analisado que apresentou a maior diversidade metabólica, teve maior número de nodos de amostras de média polaridade (fração acetato de etila). Além disso, a cultura em PDB também foi a que gerou o maior número de nodos exclusivos (113 nós) dentre todos os meios utilizados.

A rede também registrou 640 nodos classificados como *singletons*, 54,32% do total, o que pode indicar a presença de metabólitos menos recorrentes ou exclusivos de determinadas condições experimentais.

A variação na composição dos nodos entre as amostras indica que a escolha do meio de cultivo influencia a produção de metabólitos especializados. Esse fenômeno reforça a importância da abordagem OSMAC em estudos que visam incrementar a quimiodiversidade. O fato de que diferentes meios resultaram em metabólitos distintos reforça a relevância dessa estratégia para a bioprospecção de novos metabólitos especializados, incluindo substâncias bioativas.

A comparação entre os nodos exclusivos das amostras também indica que cada meio proporciona condições distintas para o metabolismo do microrganismo, ativando diferentes vias biossintéticas. Isso destaca a possibilidade de otimizar a produção de compostos bioativos por meio do controle das condições de cultivo.

A partir da construção das redes moleculares, algumas substâncias foram anotadas pela plataforma GNPS e estão descritas na tabela a seguir, incluindo os principais dados relativos a essas anotações.

Nome (F.M.)*	Aduto	m/z do íon precursor	m/z teórica**	Erro de m/z (ppm)**	Comparação entre espectros	Estrutura	Pontuação de cosseno
(60) <i>Pyrenophorol</i> (C ₁₆ H ₂₄ O ₆)	[M-H] ⁻	311.146	311.1500	0.004 (12.89)			0.74
(61) <i>[(4E)-7-acetyloxy-6-hydroxy-2-methyl-10-oxo-2,3,6,7,8,9-hexahydrooxec in-3-yl] (E)-but-2-enoate</i> (C ₁₆ H ₂₂ O ₇)	[M-H] ⁻	325.149	325.1965	0.04 (60.66)			0.89

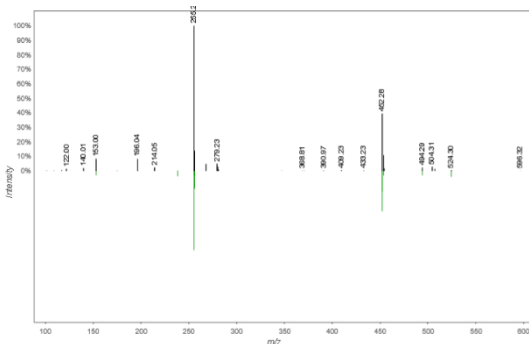
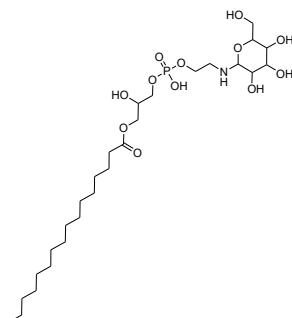
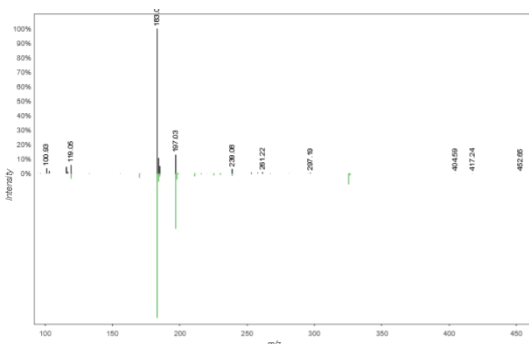
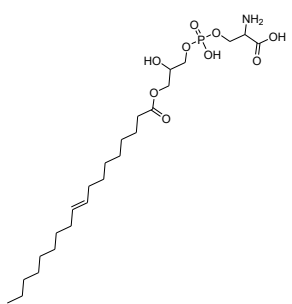
Nome (F.M.)*	Aduto	m/z do íon precursor	m/z teórica**	Erro de m/z (ppm)**	Comparação entre espectros	Estrutura	Pontuação de cosseno
(62) <i>Hexosyl LPE</i> 16:0 (C ₂₇ H ₅₄ NO ₁₂ P)	[M-H] ⁻	614.310	614.331	0.02 (34.32)			0.81
(63) <i>2-amino-3-[hydroxy-[2-hydroxy-3-[octadec-9-enoyl]oxypropoxy]phosphoryl]oxypropanoic acid</i> (C ₂₄ H ₄₆ O ₉ P)	[M-H] ⁻	522.296	522.2837	0.01 (23.47)			0.89

Tabela 9: Compostos anotados pela plataforma GNPS através dos dados de UPLC-ESI-QTOF-MS/MS em modo negativo para as amostras adquiridas em diferentes meios de cultivo.

**Obtidos através do portal *Mass Calculations: mass error and m/z from formula* da University of Warwick (Barrow, 2021).

Fonte: Dados do autor.

O nodo de m/z 311.146, *pyrenophorol* (**60**), foi anotado como *bronze match*, com escore de cosseno 0.74, e diferença de massa de 0.004. Estes valores são expressivos para uma anotação precisa através da metodologia utilizada. O *pyrenophorol* foi identificado nas amostras TrA, PDB e MLT. Essa substância é classificada como uma lactona macrocíclica e foi originalmente isolada a partir do cultivo do fungo fitopatológico *Drechslera avenae*, obtido de aveia selvagem infectada, conforme reportado em um estudo prévio (Kastanias e Chrysai-Tokousbalides, 2000). Neste mesmo estudo, *pyrenophorol* demonstrou forte efeito fitotóxico em diversas espécies vegetais, causando necrose foliar e inibição de crescimento, o que aponta sua possível utilização como um bio-herbicida natural. Essa substância teve sua síntese desenvolvida em 2011 através de mecanismos da reação de Wittig e esterificação de Yamaguchi (Oh e Kang, 2011).

Outra lactona macrocíclica anotada foi a [(4*E*)-7-acetyloxy-6-hydroxy-2-methyl-10-oxo-2,3,6,7,8,9-hexahydrooxecin-3-yl](*E*)-but-2-enoate (**61**). Anotada como *bronze match* nas amostras ArA e ArM, esta lactona apresentou escore de cosseno de 0.89 e erro de m/z 0.04. Apesar da falta de publicações descrevendo esta substância ou suas aplicações, ela está catalogada na biblioteca espectral pública MoNA (*Massbank of North America*) com código VF-NPL-QEHF001698 e na plataforma PubChem com CID 45359333 (Kim *et al.*, 2024; MoNA, 2024), o que sugere que ainda é um metabólito pouco estudado.

Hexosyl LPE 16:0 (**62**) é uma lisofosfatidiletanolamina (LPE) que contém uma hexose na sua estrutura. As LPE são produtos desacilados resultantes da hidrólise de fosfatidiletanolaminas induzida por fosfolipase A1/A2. Essas substâncias regulam diversos processos biológicos, incluindo sinalização celular, metabolismo lipídico e homeostase energética (Yamamoto *et al.*, 2022). Yang *et al.* (2024) realizaram estudo que sugere que **62** tem atividade terapêutica contra infecção por RSV (*Respiratory syncytial vírus*), um pneumovírus que pode levar a óbito principalmente crianças e idosos. Essa substância, ligada a uma hexose, foi anotada como *bronze match* pelo GNPS, com escore de cosseno 0.81 e erro de m/z 0.02, parâmetros que dão confiança para esta anotação. Hexosyl LPE 16:0 foi identificada nas amostras ArA e ArM.

Outra substância fosfatada anotada a partir da plataforma GNPS foi o 2-amino-3-[hydroxy-[2-hydroxy-3-[octadec-9-enoyl]-oxypropoxy]-phosphoryl]-oxypropanoic acid (**63**). Essa molécula pertence à classe das lisofosfatidilserinas (LPS), codificada como LPS (18:1(9E)/0:0). Diferentemente dos lipídios pró-inflamatórios, essa classe

de substâncias modulam a resposta imune, regulando as atividades dos macrófagos e interagindo com receptores que influenciam a cascata inflamatória, além de promover a fagocitose de células apoptóticas (Frasch e Bratton, 2012). Anotada como *bronze match*, com escore de cosseno 0.89 e diferença de m/z 0.01, a substância **(63)** foi identificada nas amostras ArA, ArM, TrM, AvA e AvM.

Além destas substâncias, foram anotados três ácidos benzenossulfônicos: 2-decyl-benzene sulfonic acid (DBSA) **(64)**, 4-undecyl-benzene sulfonic acid (UBSA) **(65)** e 4-dodecyl-benzene sulfonic acid (DOBSA) **(66)**. Os três ácidos estão representados na figura 34 a seguir.

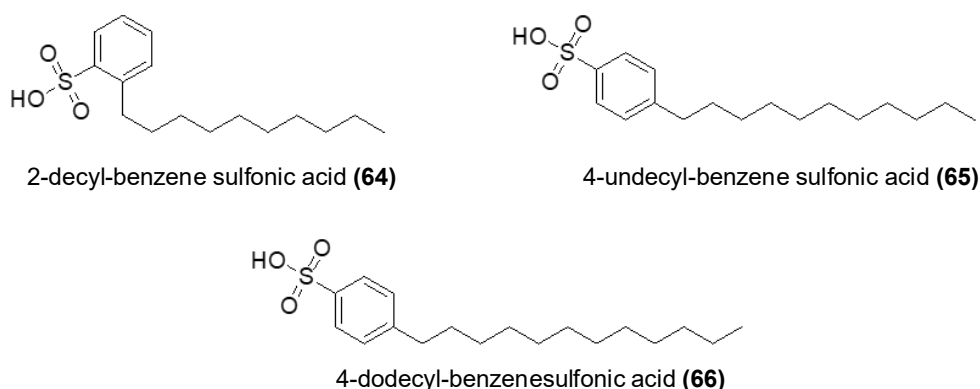


Figura 34: Ácidos benzenossulfônicos anotados a partir da plataforma GNPS.
Fonte: desenvolvido pelo autor.

Estes ácidos foram anotados como *bronze match*, com escore de cosseno 0.95, 0.84 e 0.83, respectivamente. A variação na razão m/z do íon precursor anotado e do íon precursor da biblioteca foi de 0.01 para os três. A substância **64** foi observada nas amostras PDB e AvM, enquanto **65** foi observada nas amostras MLT e AvA e, por fim, **66** foi observado nas amostras ArA e AvM.

4.2.2.2. Rede molecular das análises em modo positivo

Na figura a seguir está a rede molecular gerada sob essas condições e editada no software Cytoscape a partir dos dados das análises de UPLC-ESI-QTOF-MS/MS no modo positivo das amostras das frações metanol e acetato dos cultivos em meios sólidos e dos extratos brutos dos cultivos em meios líquidos obtidas na aplicação da

ferramenta OSMAC na investigação dos metabólitos produzidos pelo fungo *A. atroroseum* em diferentes condições.

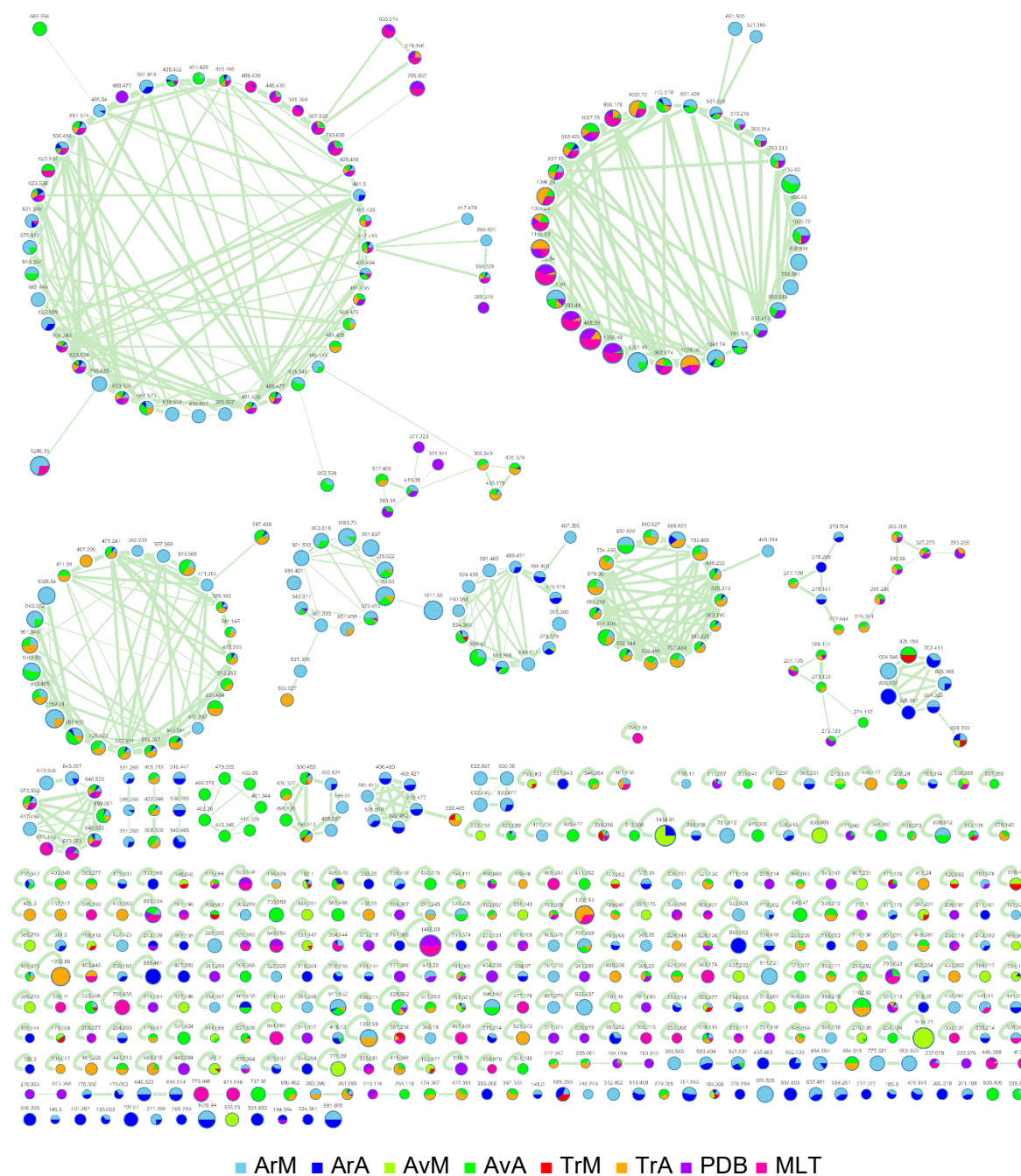


Figura 35: Rede molecular gerada através da plataforma GNPS através dos dados obtidos nas análises de UPLC-ESI-QTOF-MS/MS no modo positivo das amostras obtidas através da ferramenta OSMAC. Gerada no GNPS. Editada no Cytoscape. Etiquetas dos nodos: m/z do íon precursor. Raio dos nodos proporcional à m/z do íon precursor. Espessura das arestas proporcional ao escore de cosseno.

Fonte: Dados do autor.

A rede molecular da figura 35 foi criada com filtro dos nodos presentes nas amostras dos meios de cultivo (branco). Ou seja, as espécies químicas presentes no branco que também apareceram nas análises dos pontos da curva foram excluídas

para a criação de uma rede que contivesse apenas as espécies químicas geradas a partir da inoculação do fungo associado.

Na tabela 9 a seguir estão descritos os dados das quantidades de nodos adquiridos pela plataforma GNPS para estes experimentos.

Filtros		Número de nodos	Número de nodos exclusivos
Rede molecular total		987	--
Rede molecular com filtro dos brancos (figura 35)		543	--
Arroz	Presentes em ArM	291	68
	Presentes em ArA	208	32
Aveia	Presentes em AvM	47	19
	Presentes em AvA	225	27
Trigo	Presentes em TrM	29	0
	Presentes em TrA	184	18
Presentes em PDB		129	26
Presentes em MLT		101	62
Singletons		249	--

Tabela 10: Número de nodos referentes à rede molecular construída através dos dados das análises em modo positivo do cultivo de *Annulohypoxylon atroroseum* em diferentes meios.

Fonte: Dados do autor.

Para garantir a detecção de metabólitos específicos do fungo *Annulohypoxylon atroroseum*, os nodos presentes nas amostras dos meios de cultivo sem inoculação (brancos) foram removidos. Esta etapa removeu 444 nodos, referentes às espécies químicas encontradas nos brancos, e gerou a rede construída na figura 35.

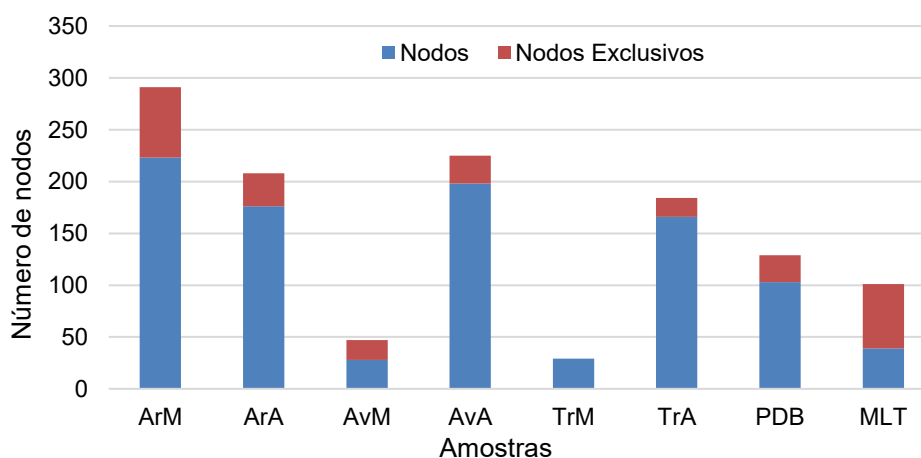


Gráfico 5: Nodos da rede molecular obtida pela ferramenta OSMAC para análises em modo positivo.

Fonte: Dados do autor.

Ao analisar os dados deste gráfico, observa-se que a composição metabólica variou significativamente entre os diferentes meios de cultivo.

O cultivo em meio sólido de arroz apresentou 291 nodos em amostras ArM e 208 nodos em amostras ArA, representando 53,59% e 38,31% da rede molecular criada com o filtro do branco, respectivamente. Já o cultivo em aveia registrou 47 nodos (8,66%) nas amostras AvM e 225 nodos (41,44%) nas amostras AvA. Por fim, o cultivo em trigo gerou 29 nodos (5,34%) nas amostras TrM e 184 nodos (33,89%) em TrA.

Além disso, para os meios líquidos, foram identificados 129 nodos (23,76%) nas amostras PDB e 101 (18,60%) nas amostras MLT.

Esses resultados evidenciam a influência do meio de cultivo na diversidade química detectada, com destaque novamente para o meio de aveia, que apresentou a maior diversidade metabólica para amostras de média polaridade (fração acetato de etila). Além disso, dentre os meios sólidos, o meio de ArM também foi o cultivo que gerou o maior número de nodos exclusivos (68 nós), valor que foi superado apenas para as amostras obtidas no meio líquido caldo batata dextrose (PDB).

A rede também registrou 249 *singletons*, o que pode indicar a presença de metabólitos menos recorrentes ou exclusivos de determinadas condições experimentais.

A variação na composição dos nodos entre as amostras indica que a escolha do meio de cultivo influencia a produção de metabólitos especializados. Esse fenômeno reforça a importância da abordagem OSMAC.

Para esta rede molecular, apenas duas substâncias derivadas do fungo foram anotadas pelo GNPS. Todos os outros *hits* com espectros de bibliotecas da plataforma foram de substâncias presentes nas amostras de controle (meio de cultivo sem inoculação).

As informações referentes a esta anotação estão descritas na tabela a seguir.

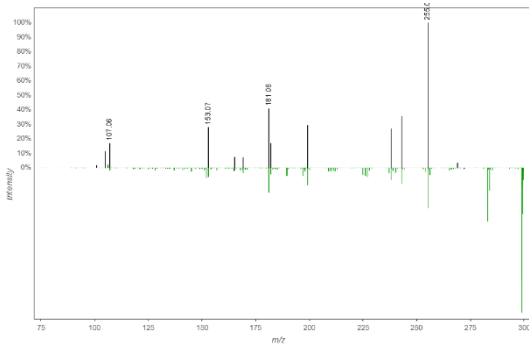
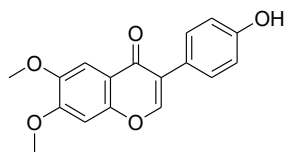
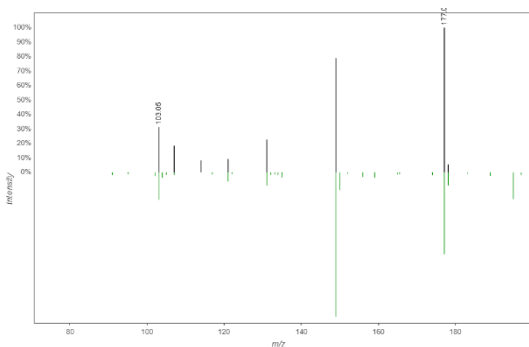
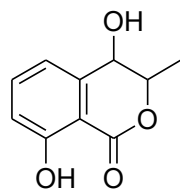
Nome (F.M.)	Aduto	<i>m/z</i> do íon precursor	<i>m/z</i> teórica**	Erro de <i>m/z</i> (ppm)**	Comparação entre espectros	Estrutura	Pontuação de cosseno
(67) 4'-hydroxy-6,7-dimethoxyisoflavone (C ₁₇ H ₁₄ O ₅)	[M+H] ⁺	299.106	299.092	0.014 (45.14)			0.74
(68) 4-hydroxymellein (C ₁₀ H ₁₀ O ₄)	[M+H] ⁺	195.059	195.066	0.007 (37.33)			0.87

Tabela 11: Isoflavona e isocumarina anotadas pela plataforma GNPS através dos dados de UPLC-ESI-QTOF-MS/MS em modo positivo para as amostras adquiridas em diferentes meios de cultivo.

**Obtidos através do portal *Mass Calculations: mass error and m/z from formula* da University of Warwick (Barrow, 2021).

Fonte: Dados do autor.

As duas substâncias anotadas tiveram ótimos parâmetros em seus *hits* com as bibliotecas espectrais do GNPS. A *4'-hydroxy-6,7-dimethoxyisoflavone* (**67**) é uma isoflavona categorizada como *bronze match*, com pontuação de cosseno 0.74 e erro de m/z 0.014 e foi identificada nas amostras de extrato de malte; enquanto a *4-hydroxymellein* (**68**) é uma isocumarina anotada como *silver match*, com pontuação de cosseno 0.87 e diferença de m/z 0.007 e foi detectada nas amostras AvA, TrA, PDB e MLT.

Estes parâmetros são considerados suficientemente precisos para anotar uma substância através da plataforma GNPS. Entretanto, como se vê no *mirror match* dos espectros da espécie química presente na amostra e da substância catalogada na biblioteca espectral, percebe-se variações no padrão de fragmentação.

A comparação entre os espectros experimental e aquele presente no banco de dados da plataforma para a substância (**67**) está detalhada na figura 36 abaixo.

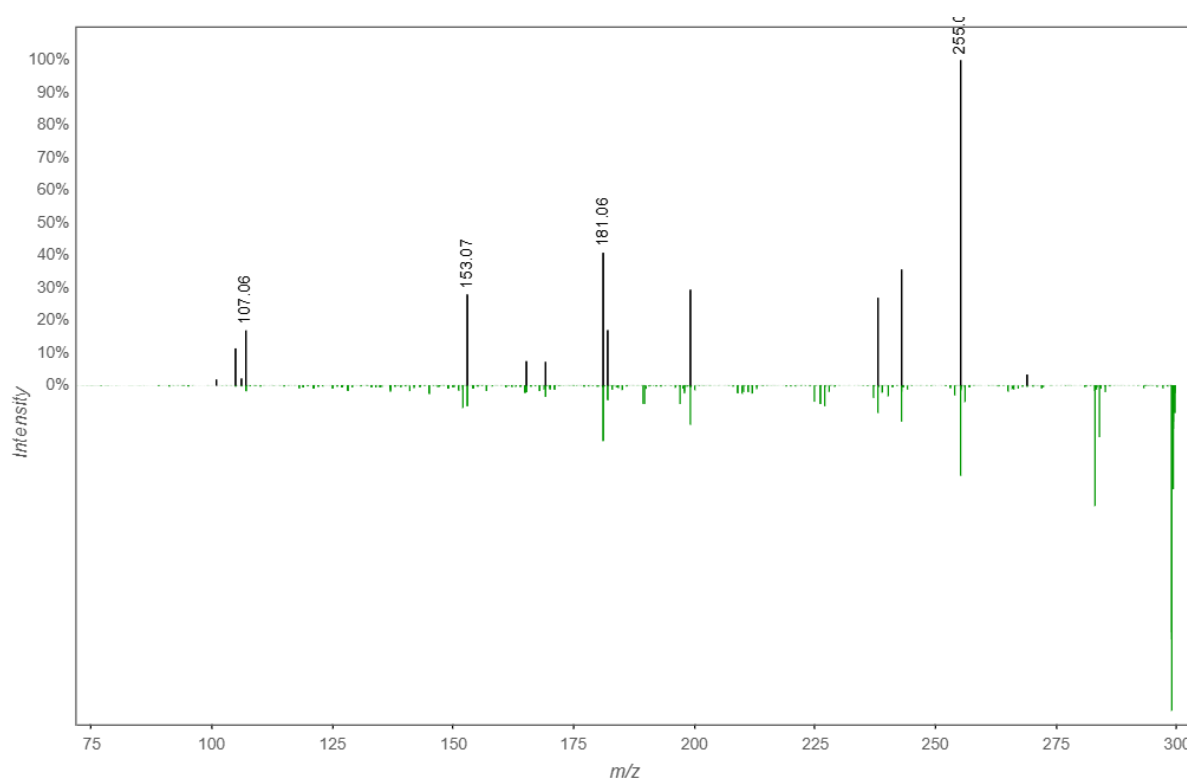


Figura 36: Comparação entre espectros da substância 67.
Fonte: Dados do autor.

Como é possível observar, os espectros de massas não são compatíveis, apesar de compartilharem alguns picos de igual m/z , como o pico 255.056. Entretanto, o pico base do espectro da biblioteca corresponde ao pico do íon molecular (m/z 299.1165),

e esse pico tem intensidade muito baixa no espectro da espécie química presente na amostra.

Isso pode significar que, apesar dos ótimos parâmetros citados anteriormente, essa é uma anotação incorreta da plataforma GNPS, ou na qual há interferência de alguma condição externa como energia de ionização, efeitos da matriz da amostra ou de compostos co-eluídos na aquisição dos dados, gerando diferenças nos espectros.

Para a substância **68**, os detalhes da comparação de espectros estão na figura a seguir.

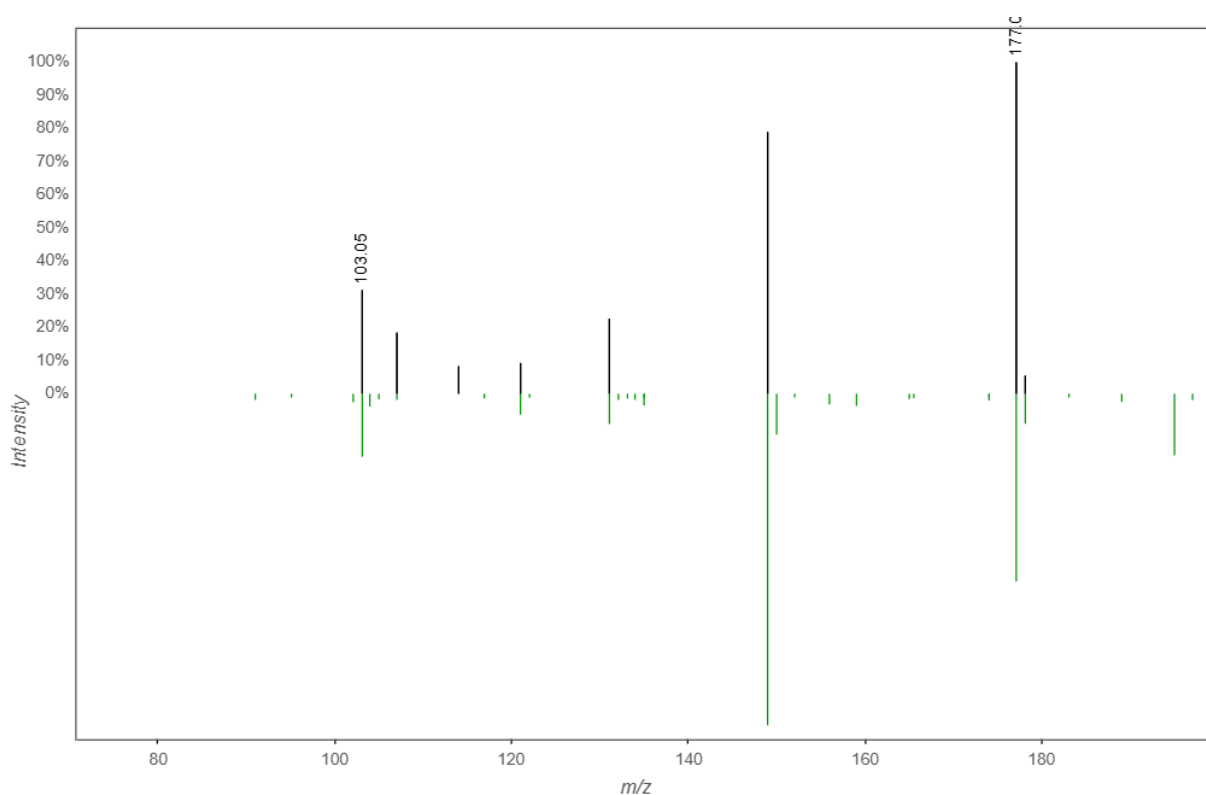


Figura 37: Comparação de espectros da substância 68.

Fonte: Dados do autor.

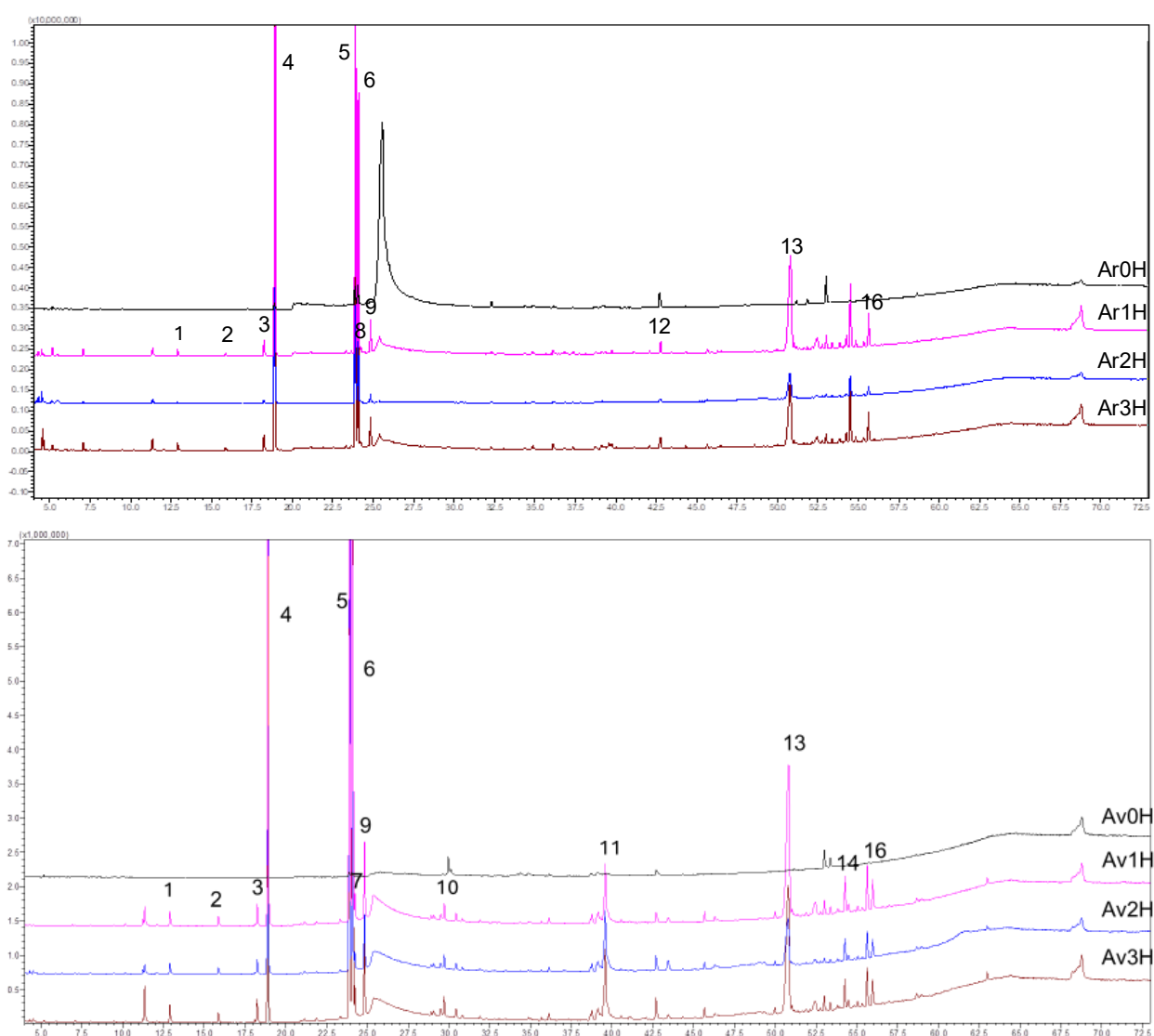
Novamente, há compartilhamento de picos, em especial os picos de m/z 177 e 149, que tem suas intensidades invertidas ao se comparar um espectro com o outro. Enquanto 177 é o pico base da espécie química presente nas amostras analisadas e 149 é o segundo pico mais intenso, para o espectro da biblioteca ocorre o inverso.

Estas diferenças indicam que esta anotação também está provavelmente incorreta. Entretanto, a semelhança na fragmentação pode significar que a espécie química identificada nas amostras é um isômero estrutural da *4-hydroxymellein*.

4.2.3. Análise das Frações Hexânicas por GC-MS

As análises cromatográficas das frações hexânicas dos extratos de cultivos em meios sólidos foram realizadas conforme metodologia descrita na seção 3.6.2 (p. 65).

A comparação dos cromatogramas das amostras dos cultivos em arroz, aveia e trigo, respectivamente, são mostradas na figura 38. Além dos cromatogramas das replicatas, estão também os cromatogramas das amostras referentes a cada meio de cultivo sem inoculação (brancos), em preto, codificada com zero,.



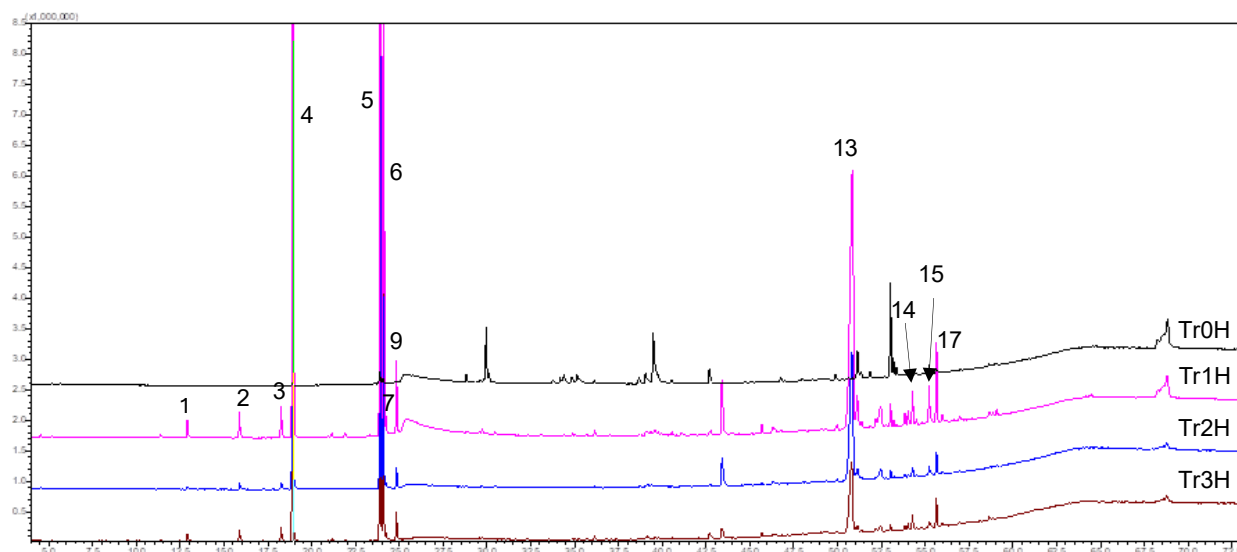


Figura 38: Cromatogramas das frações hexânicas coletadas a partir dos cultivos em meios sólidos (arroz, aveia e trigo).

Fonte: Dados do autor (2025).

Como é possível avaliar, alguns picos das amostras dos brancos apresentam menor intensidade, sugerindo que foram consumidos. Também pode-se perceber que novos picos surgiram ou ficaram mais intensos nas amostras dos três cultivos.

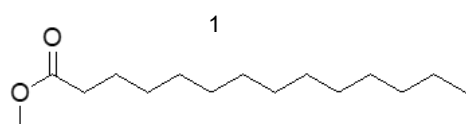
Os picos numerados nos cromatogramas são referentes a substâncias que foram anotadas através de busca e comparação de similaridade na biblioteca NIST14 (*National Institute of Standards and Technology*) (NIST, 2014). A tabela 11 e a figura 39 a seguir detalham alguns dados das anotações realizadas e a estrutura dessas substâncias.

No.	Nome	Tempo de Retenção (min) - $\bar{X}$			Ácido graxo formador	Similaridade (%) - $\bar{X}$
		Arroz	Aveia	Trigo		
1	Methyl tetradecanoate	12,933	12,883	12,892	Ácido mirístico	98%
2	Pentadecanoic acid, methyl ester	15,867	15,850	15,925	Ácido pentadecanóico	91%
3	9-Hexadecenoic acid, methyl ester, Z-	18,275	18,242	18,242	Ácido palmitoleico	95%
4	Hexadecanoic acid, methyl ester	18,908	18,908	18,917	Ácido palmítico	98%
5	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	23,867	23,917	23,883	Ácido linoleico	98%
6	9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)-	24,058	24,092	24,092	Ácido oleico	93%
7	11-Octadecenoic acid, methyl ester	--	24,250	24,250	Ácido vaccênico	96%
8	Methyl 10-octadecenoate	24,233	--	--	Ácido vaccênico	97%

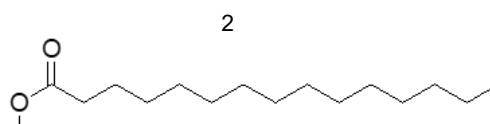
No.	Nome	Tempo de Retenção (min) - $\bar{X}$			Ácido graxo formador	Similaridade (%) - $\bar{X}$
		Arroz	Aveia	Trigo		
9	Methyl stearate	24,833	24,833	24,833	Ácido esteárico	96%
10	cis-11-Eicosenoic acid, methyl ester	--	29,608	--	Ácido cis-11- eicosenoico	91%
11	9-Octadecenoic acid, 1,2,3- propanetriyl ester	--	39,600	--	Ácido 9- octadecenoico	90%
12	Squalene	42,792	--	--	--	92%
13	Ergosterol	50,6922	50,750	50,825	--	90%
14	Ergosta-4,6,8(14),22- tetraen-3-one	--	54,258	54,267	--	89%
15	1,3-Benzenediol, 5- pentadecyl	--	--	55,242	--	90%
16	Stigmast-4-en-3-one	55,650	55,642	--	--	89%
17	γ -Sitostenone	--		55,63	--	89%

Tabela 12: Substâncias anotadas por similaridade de espectro de massas nas frações hexânicas dos meios de cultivo em meio sólido.

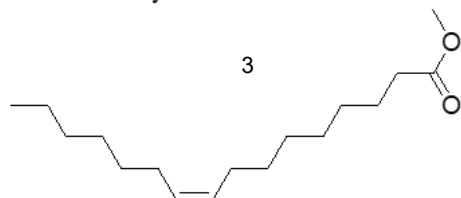
Fonte: Dados do autor.



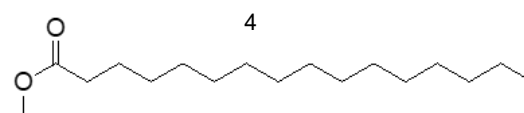
Methyl tetradecanoate



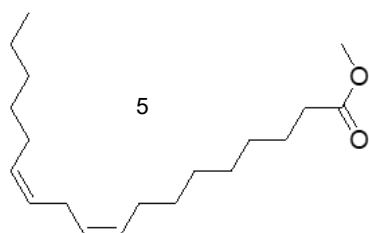
Pentadecanoic acid, methyl ester



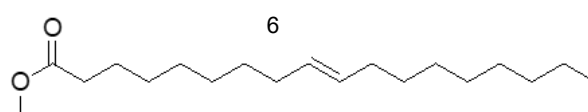
9-Hexadecenoic acid, methyl ester, Z-



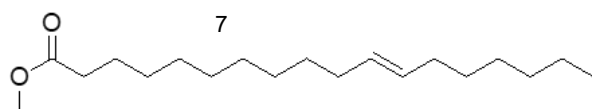
Hexadecanoic acid, methyl ester



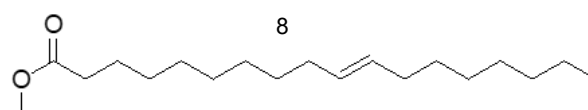
1,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester



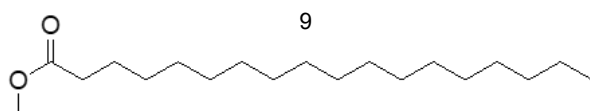
9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)-



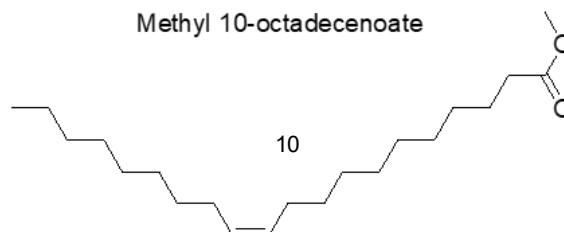
11-Octadecenoic acid, methyl ester



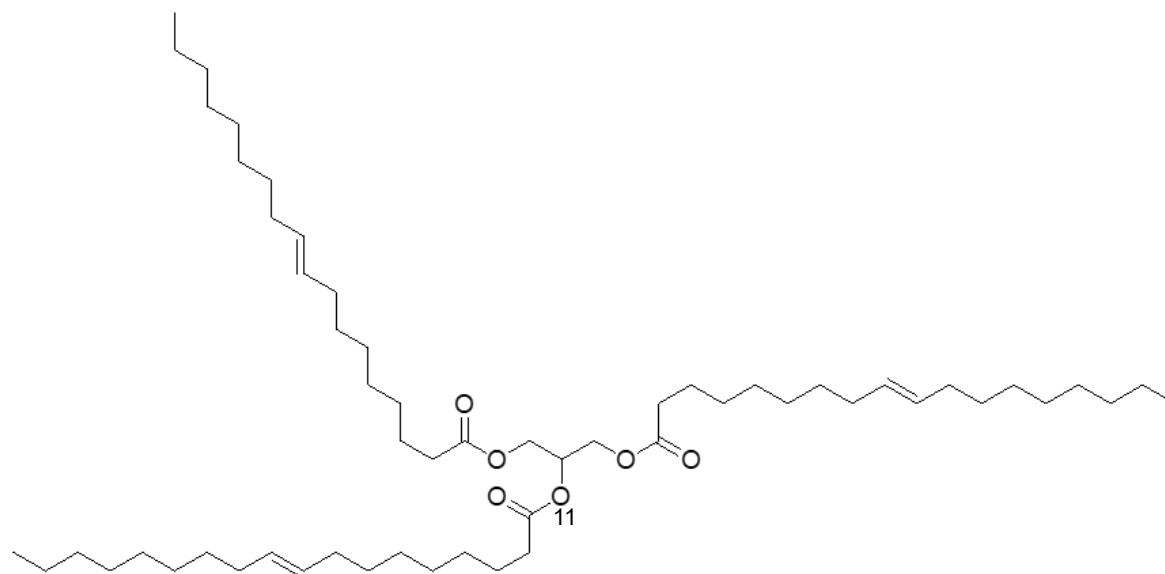
Methyl 10-octadecenoate



Methyl stearate



cis-11-Eicosenoic acid, methyl ester



9-Octadecenoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester

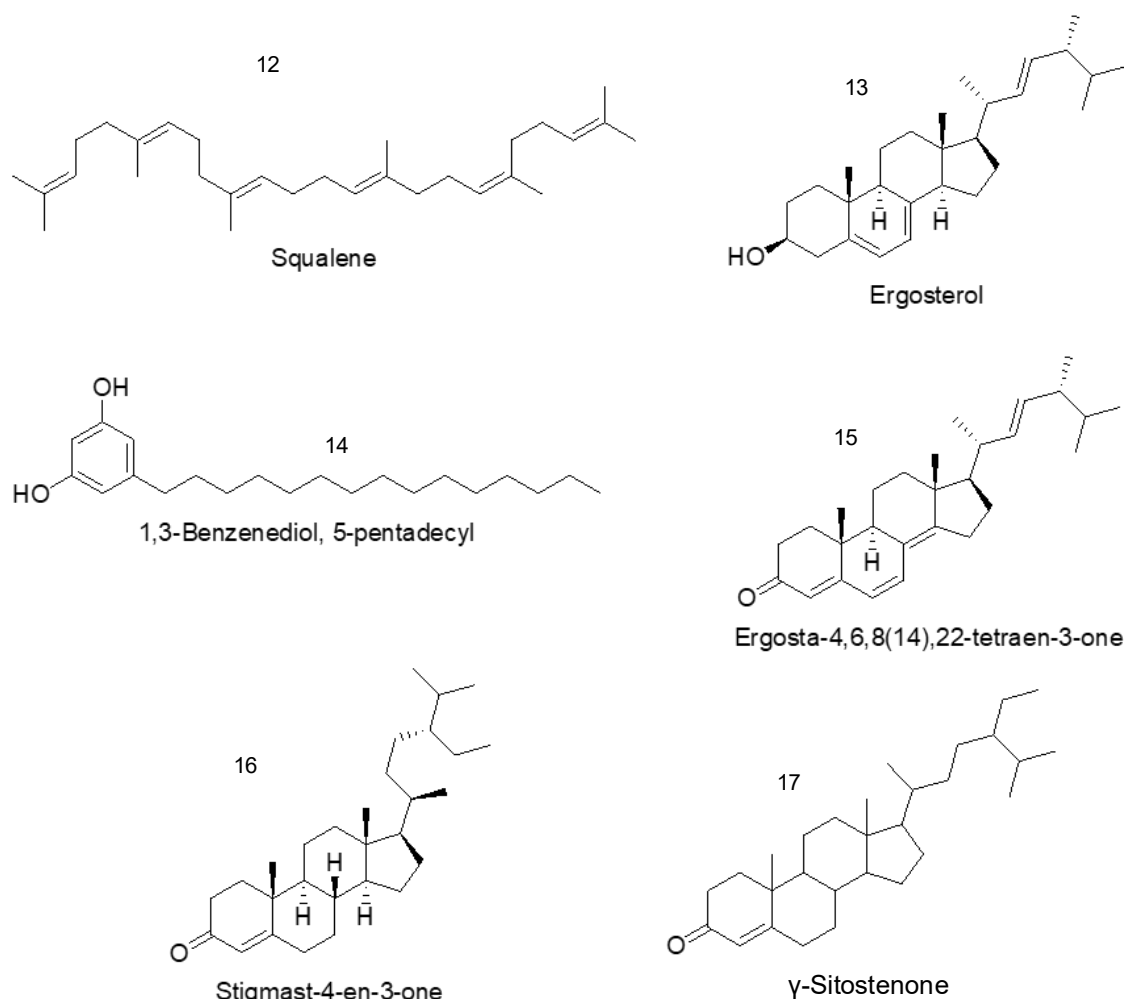


Figura 39: Substâncias detectadas nas frações hexânicas dos cultivos em meios sólidos anotadas por similaridade de espectros com a biblioteca NIST14.

Fonte: Dados do autor (2025).

A maioria das substâncias anotadas através da biblioteca NIST são ésteres de ácidos graxos (substâncias 1 a 10), comuns em óleos vegetais. Estes ésteres possivelmente são oriundos dos meios de cultivo (arroz, aveia e trigo), apesar da baixa intensidade destes picos no cromatograma do branco.

Há, nas amostras de arroz, a anotação do esqualeno, um hidrocarboneto triterpeno que funciona como precursor bioquímico de esteróides em plantas e animais. O esqualeno tem seu nome derivado da família de tubarões Squalidae e foi primariamente obtido do óleo de fígado de animais desta família, mas pesquisas recentes demonstram que este triterpeno pode ser encontrado também em microrganismos como os protistas heterotróficos *Aurantiochytrium sp.* e *Schizochytrium sp.*; a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e bactérias como *Entamoeba coli* e *Corynebacterium glutamicum* (Paramasivan e Mutturi, 2022).

Além disso, também foram anotados a stigmasta-4-en-3-one, um fitosterol derivado provavelmente do meio de cultivo, e o ergosterol, o principal esterol presente nas membranas celulares fúngicas (Choy, Gaylord e Doering, 2023).

4.2.4. Redes moleculares das frações hexânicas analisadas por GC-MS

Uma rede molecular foi criada utilizando o fluxo de trabalho *Library Search/Molecular Networking GC* no GNPS conforme descrito na seção 3.8.2.2 (p. 72).

Na figura a seguir está a rede molecular gerada sob essas condições e editada no software Cytoscape a partir dos dados desconvoluídos das análises de GC-MS das frações hexano dos cultivos em meios sólidos, obtidas a partir da aplicação da ferramenta OSMAC para investigação dos metabólitos produzidos pelo fungo *A. atroroseum* em diferentes condições.

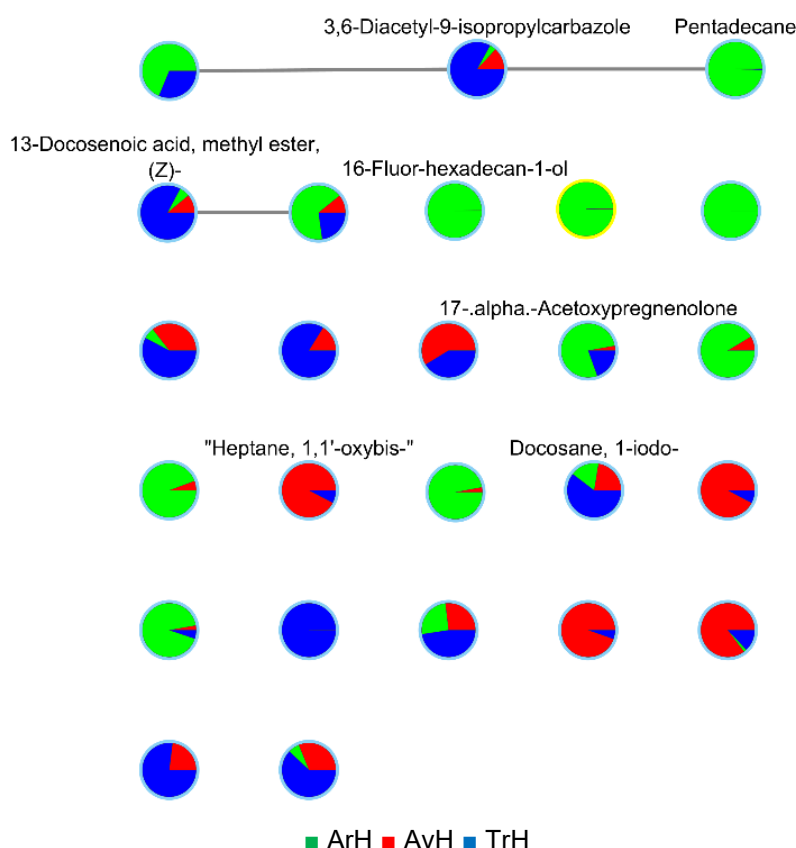


Figura 40: Rede molecular gerada através da plataforma GNPS através dos dados obtidos nas análises de GC-MS das frações hexano dos cultivos em meio sólido com filtro de brancos.

Fonte: Dados do autor.

A rede molecular da figura 40 foi criada com filtro dos nodos presentes nas amostras dos meios de cultivo (branco). Ou seja, as espécies químicas presentes no branco que também apareceram nas análises das amostras foram excluídas para a criação de uma rede que contivesse apenas as espécies químicas geradas a partir da inoculação do fungo associado. Na tabela 13 a seguir estão descritos os dados das quantidades de nodos adquiridos pela plataforma GNPS.

Filtros	Número de nodos	Nodos exclusivos
Rede Molecular Total	454	-
Rede molecular com filtro do branco	25	-
Arroz	18	1
Aveia	23	0
Trigo	20	0

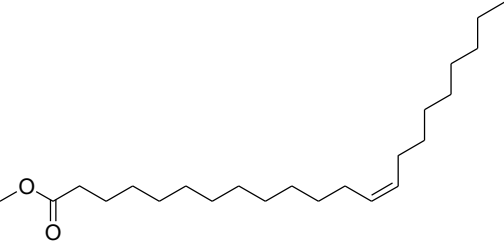
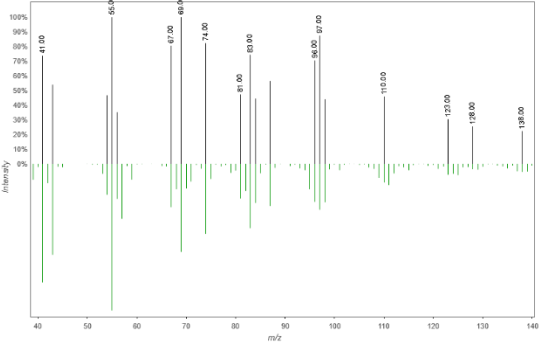
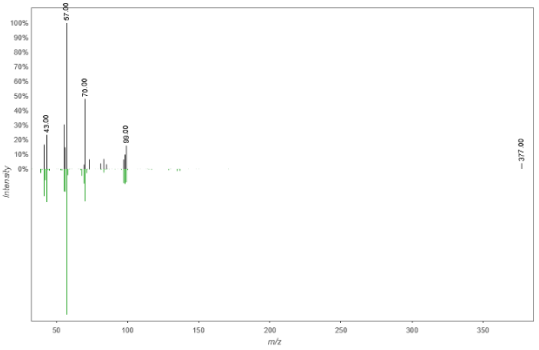
Tabela 13: Número de nodos referentes à rede molecular construída através dos dados das análises das frações hexânicas de GC-MS cultivo de *Annulohypoxylon atroroseum* meios sólidos.

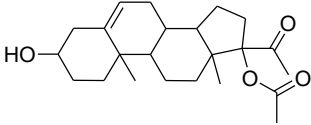
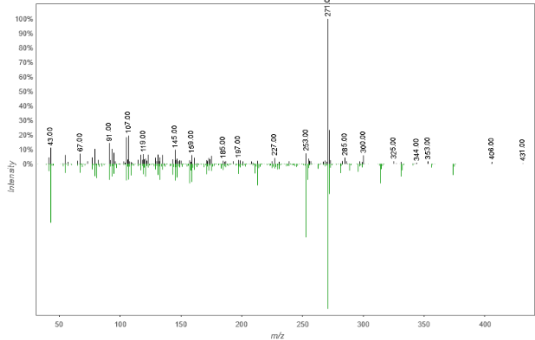
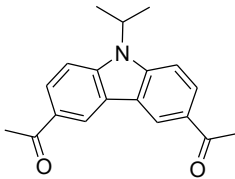
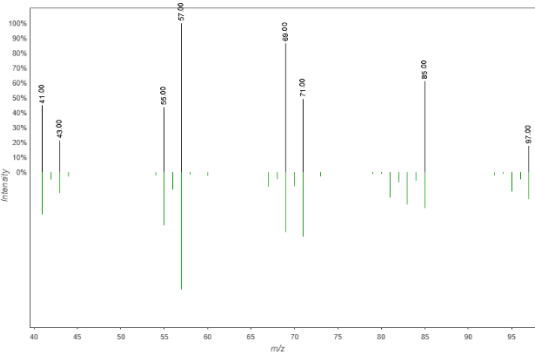
Fonte: Dados do autor (2025).

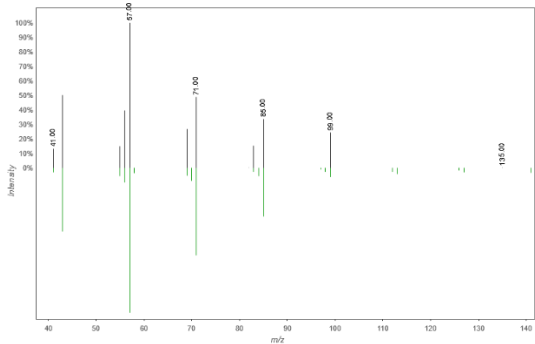
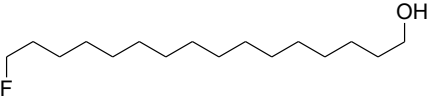
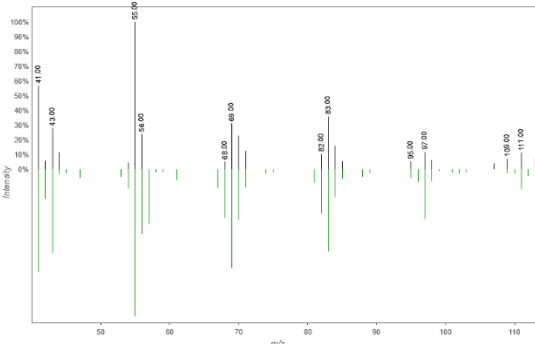
A rede construída pelo GNPS possui um total de 454 nodos, entre aqueles associados ao meio de cultivo e aqueles decorrentes de substâncias produzidas pelo fungo. Para garantir a detecção de metabólitos específicos do fungo *Annulohypoxylon atroroseum*, os nodos presentes nas amostras dos meios de cultivo sem inoculação (brancos) foram removidos. A rede molecular resultante desta operação possui 25 nodos, referentes às espécies químicas encontradas nos brancos, e gerou a rede construída na figura 40.

Dos 25 nodos específicos dos cultivos, 23 estavam presentes nos cultivos em aveia, enquanto as amostras de cultivo em trigo revelaram 20 nodos e aquelas do cultivo em arroz, 18. Apesar da menor quantidade, o cultivo em meio de arroz foi o único que apresentou um nodo exclusivo.

Nesta rede resultante da exclusão dos brancos, sete substâncias foram anotadas pela plataforma GNPS e os detalhes das anotações estão descritos na tabela a seguir.

Nome (F.M.)	Nível de Qualidade da Biblioteca	Pontuação de Cosseno	Estrutura	Comparação de Espectros
(69) 13-Docosenoic acid, methyl ester, (Z)-	Gold	0.78		
(70) Heptane, 1,1'- oxybis-	Gold	0.90		

Nome (F.M.)	Nível de Qualidade da Biblioteca	Pontuação de Cosseno	Estrutura	Comparação de Espectros
(71) 17- α -Acetoxypregnenolone	Gold	0.72		
(72) 3,6-Diacetyl-9-isopropylcarbazole	Gold	0.78		

Nome (F.M.)	Nível de Qualidade da Biblioteca	Pontuação de Cosseno	Estrutura	Comparação de Espectros
(73) Pentadecane	Gold	0.89		
(74) 16-fluorohexadecan-1-ol	Gold	0.98		

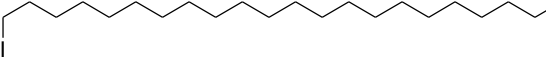
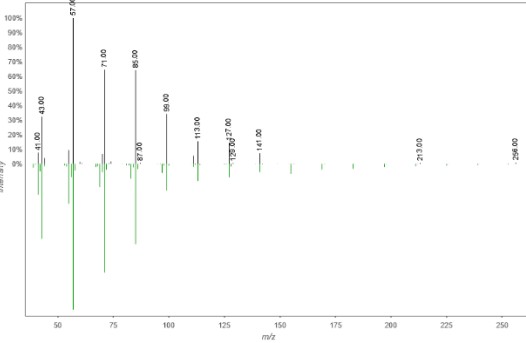
Nome (F.M.)	Nível de Qualidade da Biblioteca	Pontuação de Cosseno	Estrutura	Comparação de Espectros
(75) Docosane, 1-iodo-	Gold	0.94		

Tabela 14: Substâncias anotadas pela plataforma GNPS através dos dados desconvoluídos das análises de GC-MS das frações hexano dos cultivos em meios sólidos do fungo *A. atroroseum*.
Fonte: Dados do autor.

As sete substâncias foram anotadas com nível de qualidade *Gold*, o mais alto nível da plataforma. Este nível indica tanto a qualidade dos espectros de massas quanto a confiabilidade das anotações.

Para todas as substâncias, o escore de cosseno foi maior que 0.72, com destaque para o *16-fluor-hexan-1-ol* e para o *docosane, 1-iodo-*, com valores de 0.98 e 0.94 respectivamente.

O quadro a seguir resume a classificação das substâncias anotadas.

No.	Substância anotada	Classificação
(69)	<i>13-Docosenoic acid, methyl ester, (Z)-</i>	Éster de ácido graxo
(70)	<i>Heptane, 1,1'-oxybis-</i>	Éter
(71)	<i>17-α-Acetoxy-pregnenolone</i>	Hormônio esteróide
(72)	<i>3,6-Diacetyl-9-isopropyl-carbazole</i>	Composto heterocíclico
(73)	<i>Pentadecane</i>	Hidrocarboneto
(74)	<i>16-fluorohexadecan-1-ol</i>	Álcool graxo fluorado
(75)	<i>Docosane, 1-iodo-</i>	Haleto de alquila

Quadro 9: Classificação das substâncias anotadas pela plataforma GNPS.

Fonte: Dados do autor.

Os dados do quadro 9 mostram que há diversidade estrutural nas substâncias anotadas, desde substâncias mais simples como hidrocarbonetos de cadeia longa a compostos complexos como esteroides. Essa diversidade fortalece a eficácia da abordagem OSMAC na indução de novos perfis metabólicos.

As substâncias anotadas por similaridade de espectros com a biblioteca NIST14 discutidas no capítulo anterior também foram anotadas pelo GNPS, mas foram todas detectadas nas amostras de meio de cultivo e, portanto, foram filtradas das redes moleculares.

4.3. ANÁLISE DE VOLÁTEIS

4.3.1. Respostas Obtidas nos Experimentos Realizados

Para identificar quais variáveis experimentais influenciam a produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) por *Annulohypoxylon atroroseum*, foi conduzido um planejamento fatorial fracionário do tipo 2^{4-1} com 4 replicatas no ponto central. Esse delineamento permitiu a estimativa dos efeitos principais de quatro fatores: fotoperíodo (Fp), temperatura (T), salinidade (s) e tempo de crescimento (tC). A resposta considerada foi o número total de picos detectados nos cromatogramas, com a exclusão de picos presentes também nas análises do meio de cultivo. Essa resposta foi utilizada como medida indireta da diversidade de compostos orgânicos voláteis produzidos pelo fungo.

A tabela 15 a seguir apresenta as respostas obtidas nos experimentos realizados.

Experimentos	Variáveis				N° de Picos
	Fp	T	s	tC	
Exp. 1	-1	-1	-1	-1	46
Exp. 2	1	-1	-1	1	10
Exp. 3	-1	1	-1	1	13
Exp. 4	1	1	-1	-1	53
Exp. 5	-1	-1	1	1	20
Exp. 6	1	-1	1	-1	42
Exp. 7	-1	1	1	-1	31
Exp. 8	1	1	1	1	13
Exp. 9 (PC)	0	0	0	0	24
Exp. 10 (PC)	0	0	0	0	24
Exp. 11 (PC)	0	0	0	0	18
Exp. 12 (PC)	0	0	0	0	19

Tabela 15: Resultados do planejamento experimental fracionário 2^{4-1} . A variável de resposta foi o número de picos cromatográficos atribuídos a compostos voláteis exclusivos do fungo *A. atroroseum*.

Fp: fotoperíodo; **T:** temperatura; **s:** salinidade; **tC:** tempo de crescimento.

Fonte: dados do autor (2025).

A partir dos dados da tabela 14, é possível observar que a maior resposta (53 picos) foi observada na condição com níveis altos de fotoperíodo e temperatura; e

com baixos níveis de tempo de crescimento e salinidade. Já a menor resposta (10 picos) ocorreu na condição com nível alto de fotoperíodo e tempo de crescimento; com baixos níveis de temperatura e salinidade. As respostas obtidas para os pontos centrais apresentaram resultados intermediários e consistentes entre si (18, 19 e 24 picos), o que sugere boa reprodutibilidade do experimento e ausência de curvatura significativa no sistema.

4.3.2. Análise de Efeitos Principais das Variáveis

. A análise estatística dos efeitos foi realizada por meio de ANOVA, através do *software* Statistica 14.0 e os resultados foram representados visualmente no gráfico de Pareto a seguir (Gráfico 6), facilitando a comparação entre os efeitos padronizados e o limiar de significância adotado ($p = 0,05$).

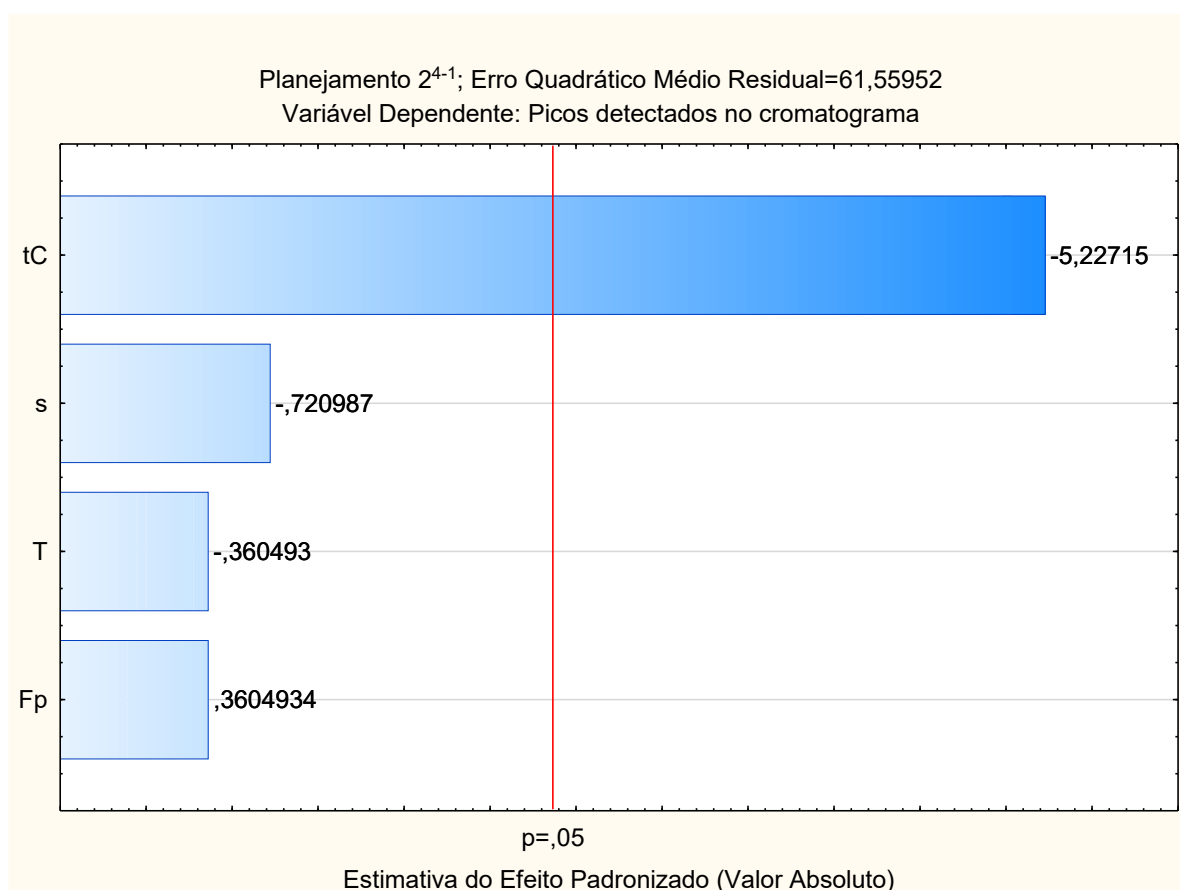


Gráfico 6: Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados sobre a Produção de COV por *A. atroroseum*.
Fonte: Dados do autor.

A análise dos efeitos padronizados revelou que apenas o fator tempo de crescimento (tC) ultrapassou o limite de significância estatística adotado ($p < 0,05$),

indicando influência significativa sobre a resposta avaliada. O sinal negativo do efeito estimado sugere que menores tempos de cultivo (nível -1, correspondente a 3 dias) favorecem a emissão de compostos voláteis, resultando em um maior número de picos cromatográficos. Esse resultado pode estar relacionado ao fato de que a produção de metabólitos voláteis ocorre de forma mais intensa nas fases iniciais do crescimento fúngico, possivelmente devido à maior atividade metabólica associada à colonização do meio. Outra possibilidade é que, apesar de vedado com septo de silicone adequado para análises de voláteis por HS-SPME, as substâncias podem ter escapado do *vial* após alguns dias de armazenamento.

Por outro lado, os fatores fotoperíodo (Fp), temperatura (T) e salinidade (s) apresentaram efeitos com magnitude inferior ao limite de significância, não sendo considerados estatisticamente relevantes nas condições e níveis testados. Contudo, as variáveis estudadas podem atuar combinadamente ou terem efeitos não lineares, que não são observados em planejamentos fatoriais com apenas dois níveis por fator.

Além disso, a comparação entre os pontos fatoriais e os quatro pontos centrais (análise de curvatura) indicou ausência de curvatura significativa no modelo testado. O valor de F obtido no teste de curvatura foi de 0,69, indicando que a diferença entre os pontos centrais e os pontos fatoriais não foi estatisticamente significativa ($p = 0,424$). Isso sugere que, no intervalo testado, a variação da resposta foi predominantemente linear, validando o uso de um modelo linear para a estimativa dos efeitos principais.

Embora o planejamento adotado não permita a determinação formal do ponto ótimo, a análise dos efeitos principais sugere que combinações com tempo de crescimento mais curto, em temperaturas moderadas e sem utilização de água do mar favorecem a emissão de compostos voláteis.

Em relação ao fotoperíodo, as condições testadas não demonstraram efeito estatisticamente significativo sobre a produção de compostos voláteis pelo fungo *A. atroroseum*. Entretanto, devido a utilização de apenas níveis extremos de luz (0h e 24h), não foi possível descartar completamente a influência dessa variável, uma vez que pode haver efeitos intermediários ou interações com outros fatores que não foram capturados no delineamento dos experimentos.

4.3.3. Perfil químico volátil de *Annulohypoxylon atroroseum*

A partir das análises por HS-SPME-GC-MS descritas na seção 3.7.2., os cromatogramas da figura a seguir foram obtidos.

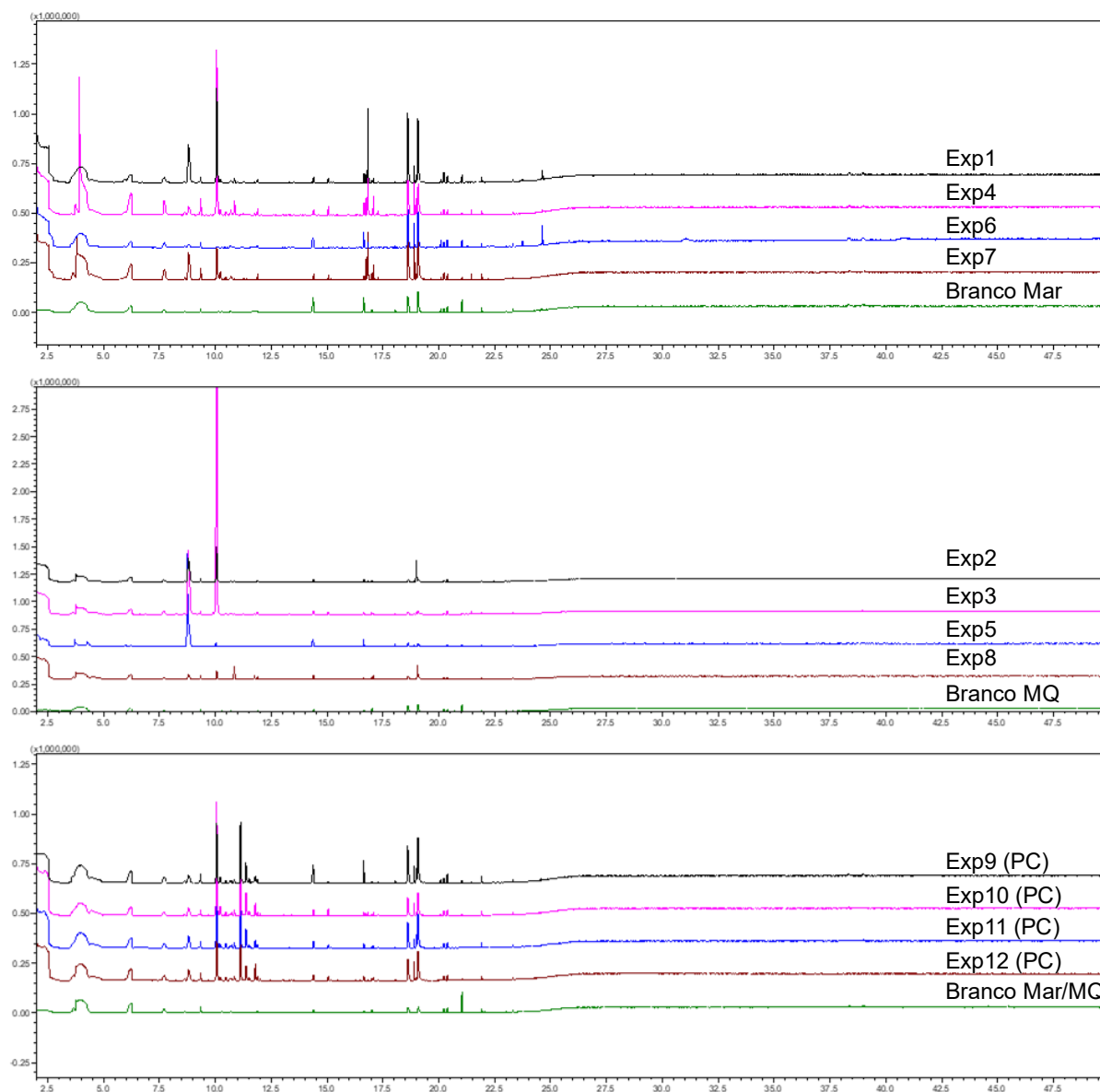


Figura 41: Cromatogramas dos perfis de substâncias voláteis *A. atroroseum* em diversas condições obtidos a partir de HS-SPME-GC-MS.

Os cromatogramas foram agrupados de acordo com os três níveis de salinidade do meio de cultivo.

Fonte: Dados do autor (2025).

Nos cromatogramas apresentados, é possível perceber maior variedade de composição química, bem como maior intensidade dos picos, nas amostras cultivadas com meio preparado com água do mar. Além disso, certos picos possuem tempo de retenção comum em quase todas as amostras, com destaque para o pico com TR = 10 min, comum a todas as análises, exceto o experimento 6.

A partir dos dados de espectrometria de massas, foi possível determinar a composição química das amostras analisadas. Nos relatórios de análises, várias substâncias foram detectadas nas amostras dos meios de cultivos e em algumas amostras experimentais. Essas substâncias foram excluídas do perfil químico de substâncias voláteis considerado para o fungo.

Além disso, foram detectadas em todas as análises plastificantes como ftalatos e derivados de silicone, como silanos e siloxanos, geralmente associadas a contaminações durante a SPME. Como por exemplo, o septo de silicone utilizado é perfurado pela agulha capilar do injetor durante a análise e resquícios desse material podem ser injetados junto com a amostra, levando à identificação de derivados como os descritos acima. Esses compostos também foram subtraídos do perfil químico volátil do fungo.

A tabela a seguir reúne as substâncias anotadas que não foram consideradas contaminações ou provenientes do meio de cultura. Os dados foram obtidos a partir da comparação das análises de massas obtidos com a biblioteca espectral NIST17.

[illegible]

N°	Nome	Tempo de Retenção (min)											
		Exp1	Exp2	Exp3	Exp4	Exp5	Exp6	Exp7	Exp8	Exp9	Exp10	Exp11	Exp12
	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)	-	16,756	-	-	16,754	-	-	-	-	-	-	-
	Bicyclo[7.2.0]undec-4-ene, 4,11,11-trimethyl-8-methylene	-	-	-	-	-	-	16,758	-	-	-	-	-
6	Caryophyllene	-	16,828	-	-	16,828	-	16,828	-	-	-	-	-
	2-Fluoro-3-(trifluoromethyl)benzamide	-	-	-	-	17,040	-	-	-	-	-	-	-
7	Azulene, 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-	17,063	17,073	-	-	-	-	17,072	-	-	-	-	-
8	Ledol	-	-	-	-	18,899	-	-	-	-	-	-	-
9	1,4-Dimethyl-7-(prop-1-en-2-yl)decahydroazulen-4-ol	-	18,900	-	18,897	-	-	18,900	-	18,895	18,895	18,896	18,895
	2(5H)-Furanone, 5-methyl-5-phenyl-	-	-	-	-	-	-	-	18,991	-	-	-	-
	2-Naphthalenol, 3-methoxy-	-	18,997	18,992	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pentane, 2,3,3-trimethyl-	20,222	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	1-Hexanol, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-	-	20,231	-	20,227	20,230	-	-	-	-	-	-	-
	1-Propene-1,2,3-tricarboxylic acid, tributyl ester	-	-	-	23,750	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 16: COVs detectados nos extratos produzidos por *A. atroroseum* identificados a partir do planejamento experimental 2⁴⁻¹.

Fonte: Dados do autor (2025).

Com base nessa tabela, foi possível traçar um panorama qualitativo dos metabólitos voláteis produzidos por *Annulohyphoxylon atroroseum* em diferentes condições de cultivo. A diversidade de substâncias inclui hidrocarbonetos aromáticos, álcoois, cetonas, mono e sesquiterpenos, derivados de furano, naftóis e lactonas. Substâncias como *eucalyptol* (**2**), *3-heptanone*, *5-ethyl-4-methyl-* (**3**) e *1,4-dimethyl-7-(prop-1-en-2-yl)decahydroazulen-4-ol* (**9**) aparecem em múltiplas amostras, indicando sua produção recorrente pelo fungo; com destaque para *eucalyptol* que foi detectado em todas as amostras, exceto o Exp6, por volta de TR = 10 min, o pico em comum nessas análises mencionado anteriormente conforme pode-se notar na figura 41.

Além disso, observou-se que certos compostos são específicos de determinadas condições experimentais. Por exemplo, *p-cymene* (**1**) e *ledol* (globulol) (**8**), foram detectados apenas em uma amostra cada, o que pode significar que sua biossíntese está condicionada a interações específicas entre os fatores avaliados. A análise integrada desses perfis revela que alterações nas condições ambientais modificam qualitativamente o volatiloma do fungo, não apenas em número de compostos, mas na natureza química das substâncias emitidas.

As estruturas químicas das 10 principais substâncias identificadas estão dispostas na figura a seguir, onde pode ser notada a variedade metabólica de COVf que *A. atroroseum* é capaz de produzir.

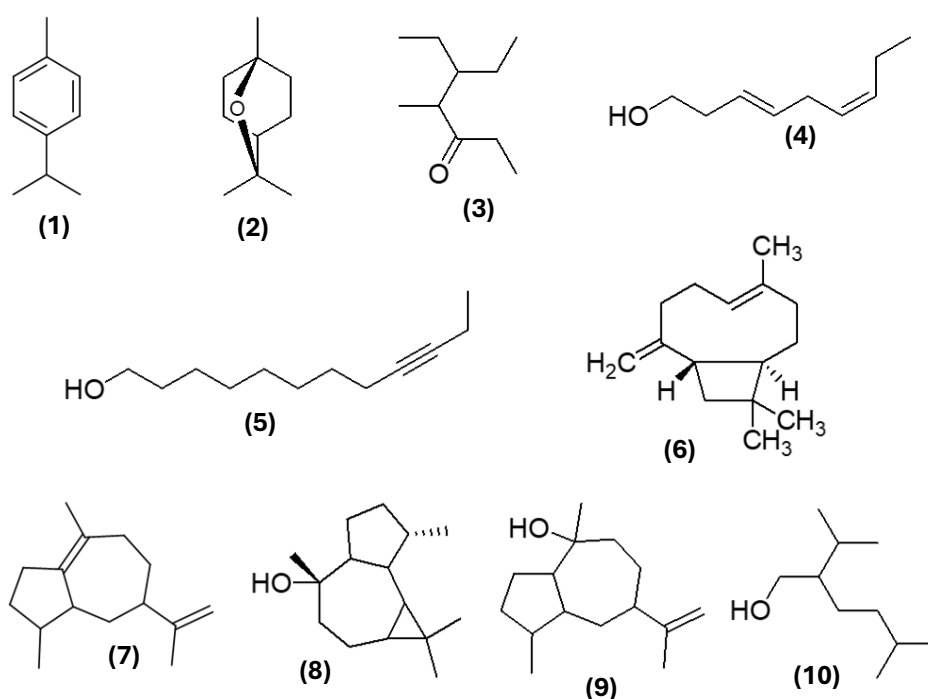


Figura 42: Estruturas dos principais COVf produzidos por *Annulohyphoxylon atroroseum* anotados a partir dos dados obtidos no planejamento experimental 2⁴⁻¹

Fonte: Desenvolvido pelo autor (2025).

4.3.4. Rede Molecular de COVf produzidos por *Annulohypoxylon atroroseum*

Além do processamento dos dados obtidos por GC-MS utilizando as buscas por similaridades na biblioteca espectral NIST17, foi empregada também a plataforma GNPS para a construção de uma rede molecular referente a esses dados.

Aplicando os procedimentos descritos no item 3.8.3., a rede da figura abaixo foi construída.

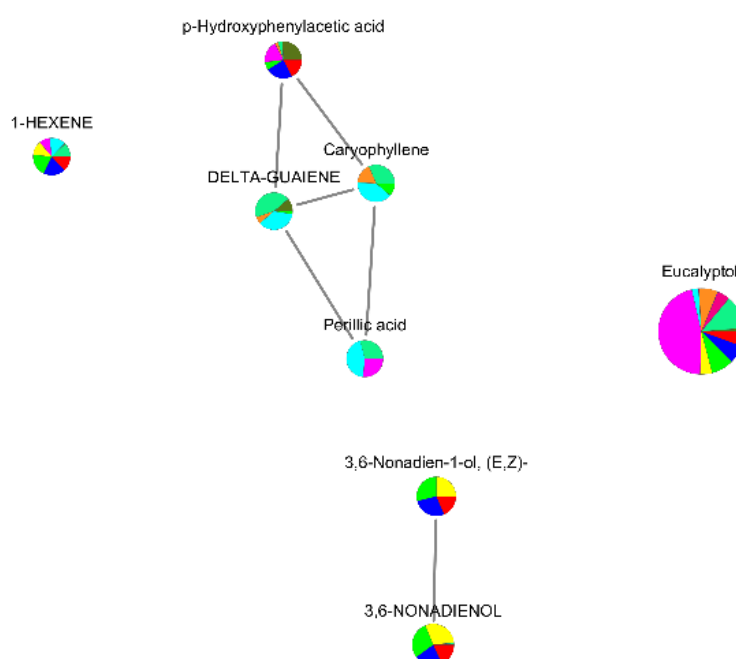


Figura 43: Rede molecular construída a partir dos dados obtidos pelas análises de COVf por HS-SPME-GC-MS com filtro dos brancos.

Fonte: Dados do autor (2025).

A rede molecular da figura 43 foi criada com o filtro dos nodos presentes nas amostras dos meios de cultivo (brancos). A rede total sem esse filtro apresentou um total de 30 nodos após o processamento, um número bem abaixo dos picos detectados nos cromatogramas avaliados. Desses 30, apenas 8 foram detectados nas amostras dos experimentos desenvolvidos e 22 estavam também presentes nos brancos.

Foram anotadas as 8 substâncias que permaneceram na rede após a aplicação do filtro, sendo elas: *1-hexene* (**11**); *p-hydroxyphenylacetic acid* (**12**); *caryophyllene*

(13); *eucalyptol* (14); δ -*guaiene* (15); 3,6-*nonadienol* (16); 3,6-*nonadienol*, (E,Z)- (17); e *perillic acid* (18).

Os compostos (16) e (17), apesar de anotados em nodos distintos, são a mesma substância. Isso pode ocorrer quando o mesmo íon precursor é fragmentado várias vezes durante o pico cromatográfico, gerando espectros quase idênticos que a plataforma GNPS tenta agrupar em um só nodo, mas que algumas vezes falha e gera múltiplos nodos para a mesma molécula.

Dentre as substâncias anotadas pelo GNPS, os compostos *caryophyllene* (13), *eucalyptol* (14), 3,6-*nonadienol* (16) e 3,6-*nonadienol*, (E,Z)- (7) foram anotados também por similaridade com os espectros da biblioteca NIST17, conforme discutido na seção anterior. O fato de serem apontados por dois métodos diferentes reforça o alto grau de confiança na anotação destes compostos.

A tabela a seguir organiza os nodos de acordo com os filtros aplicados e descreve quais substâncias foram detectadas para quais experimentos.

Filtros	Número de nodos	Substâncias Anotadas
Rede Molecular Total	30	--
Rede molecular com filtro do branco	8	(11), (12), (13), (14), (15), (16), (17), (18)
Exp1	7	(11), (12), (13), (14), (15), (16), (17)
Exp2	8	(11), (12), (13), (14), (15), (16), (17), (18)
Exp3	1	(14), (16)
Exp4	8	(11), (12), (13), (14), (15), (16), (17), (18)
Exp5	5	(11), (12), (13), (14), (15)
Exp6	1	(14)
Exp7	6	(11), (13), (14), (15), (16), (17)
Exp8	4	(11), (12), (14), (18)
Exp9	4	(11), (14), (16), (17)
Exp10	7	(11), (12), (13), (14), (15), (16), (17)
Exp11	6	(11), (12), (14), (15), (16), (17)
Exp12	5	(11), (12), (14), (16), (17)

Tabela 17: Número de nodos referentes à rede molecular construída a partir dos dados das análises de HS-SPME-GC-MS para determinação do perfil volátil de *Annulohypoxyton atroroseum*.

Fonte: Dados do autor (2025).

A partir dos dados demonstrados na tabela 16, pode-se verificar que os experimentos com maior número de nodos foram realizados em tC menor (3 dias), com exceção do Exp2 que foi realizado em tC maior (7 dias), corroborando as análises estatísticas realizadas e o efeito das variáveis descritas no gráfico 6.

Na figura a seguir estão as estruturas das quatro substâncias que não foram anotadas pelo método anterior: *1-hexene* (11); *p-hydroxyphenylacetic acid* (12); *delta-guaiene* (15) e *perillic acid* (18).

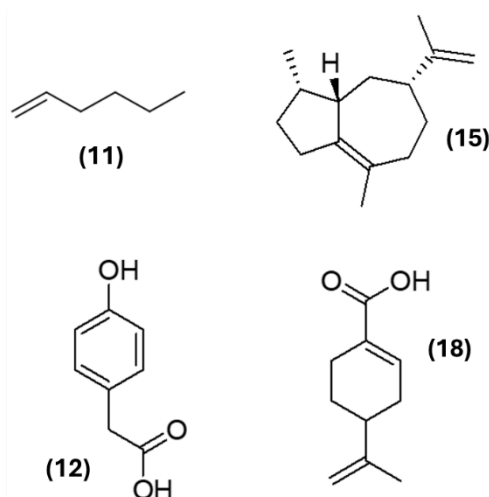


Figura 44: Estrutura dos COVf *1-hexene* (11); *p-hydroxyphenylacetic acid* (12); *delta-guaiene* (15) e *perillic acid* (18) anotados pelo GNPS.

Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Há, portanto, a detecção de uma olefina, um ácido fenólico, outro sesquiterpeno da classe dos azulenos e um ácido monoterpenoide. Essas substâncias reforçam que o fungo *A. atroroseum* consegue acessar as rotas biossintéticas do fenilpiruvato para a produção de *p-hydroxyphenylacetic acid* (12), do mevalonato para a produção de *delta-guaiene* (15) e parte da oxidação do limoneno para a produção de *perillic acid* (18).

Com os dados da tabela 16, também pode-se notar a detecção de *eucalyptol* (14) em todos os experimentos. Essa detecção contraria as informações observadas nos cromatogramas das análises, em que o Exp6 não apresenta o pico referente a esta substância no TR = 10 min e nenhum outro pico referente a um espectro de massas com perfil de fragmentação similar ao da substância em questão. Por falta de pico correspondente no cromatograma, conclui-se que essa anotação se trata de um erro de processamento do GNPS.

Mesmo com a falta dele em um dos experimentos, é possível concluir que *eucalyptol* (14) é uma substância que *A. atroroseum* produz em diferentes condições

de crescimento. Considerando as áreas dos picos dos cromatogramas da figura 41 como proporcionais à taxa de produção de COVf pelo fungo, também é possível afirmar que em certas condições *eucalyptol* é o constituinte majoritário do perfil volátil produzido pelo fungo, como é o caso do Exp3 e do Exp4, onde o pico referente a esta substância é bastante proeminente.

4.4. ANÁLISE CITOTÓXICA

A citotoxicidade foi analisada para algumas das amostras obtidas a partir dos cultivos nos 5 meios de cultivo utilizados neste estudo. Para esta finalidade, por critérios de disponibilidade de massa, foram escolhidas as frações Ar1M, Ar1A, Av2M, Av2A, Tr3M e Tr3A, provenientes de cultivos em meio sólido, e os extratos brutos MLT2 e PDB1, provenientes de cultivos em meio líquido.

A tabela abaixo reúne os resultados em percentual de inibição para as amostras nas concentrações de 5 e 50 µg/mL:

Amostras	5 µg/mL			50 µg/mL		
	% Inibição	SEM	N	% Inibição	SEM	N
Ar1A	0	-	4	30,37	12,86	4
Ar1M	0	-	4	0	-	4
Tr2A	0	-	4	39,14	2,74	4
Tr2M	0	-	4	0	-	4
Av3A	0	-	4	64,50	5,62	4
Av3M	3,99	11,35	4	0	-	4
MLT2	25,26	15,34	4	98,19	1,07	4
PDB1	0	-	4	94,39	1,95	4

Tabela 18: Percentual de inibição de frações e extratos de *A. atroroseum* frente a células HCT-116.
Fonte: Dados do autor (2025).

É possível perceber que as frações mais polares (em metanol) obtidas a partir dos cultivos em meios sólidos não apresentaram inibição relevante frente às células tumorais nas duas concentrações testadas. As frações acetato, apesar de terem inibido o crescimento das células, não alcançaram uma taxa maior que 70%, considerado o percentual mínimo para resultados significativos. Já os extratos obtidos

a partir dos cultivos em meios líquidos apresentaram percentual de inibição acima de 90% na concentração de 50 µg/mL. O gráfico a seguir demonstra os resultados demarcados pelo *threshold* para valores significativos de inibição.

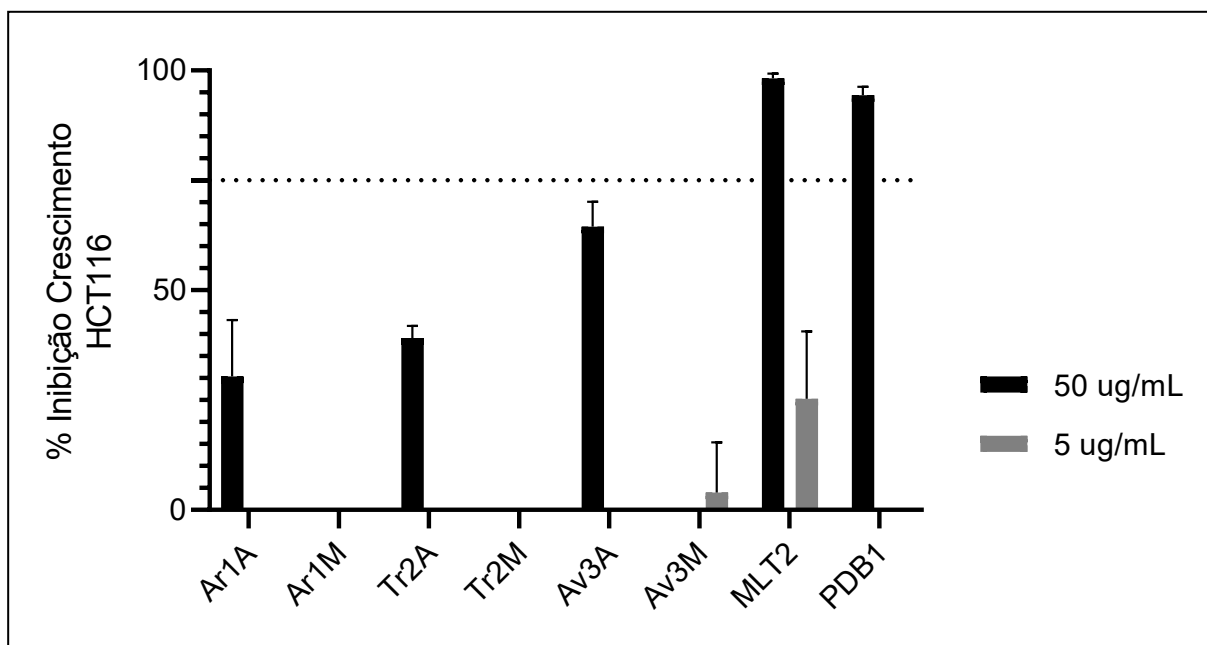


Gráfico 7: Citotoxicidade de amostras obtidas a partir do cultivo do fungo *Annulohypoxylon atroroseum* em diferentes meios.

Fonte: Dados do autor (2025).

A partir do gráfico, nota-se que apenas as duas amostras apresentaram atividades significativas (acima de 70%): MLT2 e PDB1. Também é possível notar que o erro amostral (*Standard Error of the Mean* - SEM) foi baixo, ou seja: a variação da resposta entre os experimentos realizados é pouca e os resultados podem ser considerados confiáveis.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a estratégia de prospecção aplicada foi eficaz para acessar a quimiodiversidade do fungo *Annulohypoxylon atroroseum*, isolado da alga *Dichotomaria marginata*. A construção da curva de crescimento permitiu identificar um ponto ótimo em torno de 32 dias, no qual se observou maior acúmulo de biomassa e massa de extrato, correlacionando o estágio de desenvolvimento do fungo com a produção de metabólitos especializados. Essa informação é fundamental para orientar estudos futuros de cultivo em escala, uma vez que revela a importância do tempo de crescimento na ativação de vias biossintéticas.

A aplicação da estratégia OSMAC evidenciou que as condições de cultivo impactaram diretamente a diversidade química acessada. Os cultivos em arroz, aveia, trigo, PDB e extrato de malte resultaram em perfis distintos, com variações significativas no número de nodos das redes moleculares. Entre os resultados, destacou-se o meio PDB, que apresentou o maior número de nodos exclusivos (113), reforçando o papel do meio de cultivo como modulador da expressão metabólica. Esse conjunto de dados ilustra a eficácia da variação de condições ambientais para revelar a plasticidade metabólica de microrganismos endofíticos.

As redes moleculares construídas a partir dos dados de LC-MS/MS permitiram a anotação de compostos pertencentes a diferentes classes químicas, incluindo lactonas macrocíclicas, nucleosídeos e fosfolipídios, como o Hexosyl LPE 16:0. Essa diversidade estrutural demonstra o potencial do fungo como fonte de metabólitos bioativos inéditos ou pouco explorados, ressaltando a relevância da abordagem integrativa que combina espectrometria de massas de alta resolução e ferramentas de análise de dados em rede.

A análise do volatiloma fúngico complementou os achados, revelando a produção de 18 compostos, incluindo terpenoides como eucaliptol e derivados de azuleno e cariofileno. O planejamento fatorial fracionário demonstrou que o tempo de cultivo foi a variável mais determinante para a modulação desses perfis, evidenciando a importância do controle temporal na investigação de compostos voláteis.

Por fim, os ensaios biológicos confirmaram a presença de substâncias com potencial antiproliferativo, com destaque para os extratos obtidos a partir dos cultivos em PDB e malte, que apresentaram inibição de 94% e 98% frente à linhagem HCT-

116, respectivamente. Esses resultados corroboram o valor do *A. atroroseum* como fonte promissora de metabólitos bioativos e fortalecem o papel de microrganismos marinhos na busca por novos agentes com relevância farmacológica.

Nesse contexto, esta pesquisa contribui para o avanço do conhecimento sobre a quimiodiversidade de fungos endofíticos marinhos e alinha-se diretamente à agenda da ONU sobre os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) em especial: ODS 3 – Saúde e Bem-Estar, ao fomentar a busca por novos compostos bioativos com potencial terapêutico; ODS 9 – Indústria, Inovação e Infraestrutura, ao aplicar metodologias inovadoras em bioprospecção e metabolômica para exploração sustentável da biodiversidade visando agregar valor aos produtos naturais e contribuir para a Bioeconomia; e ODS 14 – Vida na Água, ao valorizar e investigar recursos biológicos marinhos como fontes sustentáveis de inovação tecnológica associada à produção de metabólitos especializados, contribuindo para um melhor entendimento da microbiota associada a algas marinhas, suas relações ecológicas e a conservação e uso sustentável dos oceanos e seus recursos biológicos.

A abordagem adotada neste estudo pode então ser considerada um modelo de investigação de metabólitos microbianos que pode ser adaptada a outras matrizes, reforçando a importância das metodologias utilizadas e da utilização de fungos endofíticos marinhos no desenvolvimento de novas tecnologias químicas, com potencial para a promoção de avanços socioeconômicos, bem como em saúde e meio-ambiente de forma sustentável.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, L. S.; RODRIGUES-FILHO, E.; SANTOS, C. A. A.; ABREU, L. M.; PFENNING, L. H. *An HPLC Evaluation of Cytochalasin D Biosynthesis by Xylaria arbuscula Cultivated in Different Media*. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 9, 1 set. 2014.
- ARON, A. T.; GENTRY, E. C.; McPHAIL, K. L.; NOTHIAS, L.-F.; NOTHIAS-ESPOSITO, M.; BOUSLIMANI, A.; PETRAS, D.; GAUGLITZ, J. M.; SIKORA, N.; VARGAS, F.; VAN DER HOOFT, J. J. J.; ERNST, M.; KANG, K. B.; ACEVES, C. M.; CARABALLO-RODRÍGUEZ, A. M.; KOESTER, I.; WELDON, K. C.; BERTRAND, S.; ROUILLER, C.; SUN, K.; TEHAN, R. M.; BOYA, C. A.; CHRISTIAN, M. H.; GUTIÉRREZ, M.; ULLOA, A. M.; TEJEDA MORA, J. A.; MOJICA-FLORES, R.; LAKEY-BEITIA, J.; VÁSQUEZ-CHAVES, V.; ZHANG, Y.; CALDERÓN, A. I.; TAYLER, N.; KEYZERS, R. A.; TUGIZIMANA, F.; NDLOVU, N.; AKSENOV, A. A.; JARMUSCH, A. K.; SCHMID, R.; TRUMAN, A. W.; BANDEIRA, N.; WANG, M.; DORRESTEIN, P. C. *Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS*. **Nature Protocols**, v. 15, n. 6, p. 1954–1991, 2020.
- BADALYAN, S. M.; BARKHUDARYAN, A.; RAPIOR, S. *Medicinal macrofungi as cosmeceuticals: a review*. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 24, p. 1–13, 2022.
- BANYAL, A.; TIWARI, S.; SHARMA, A.; CHANANA, I.; PATEL, S. K. S.; KULSHRESTHA, S.; KUMAR, P. *Vinca alkaloids as potential cancer therapeutics: recent update and future challenges*. **3 Biotech**, v. 13, p. 211, 2023.
- BARROW, M. **Mass calculations: mass error and m/z from formula**. 2021.
Disponível em:
<https://warwick.ac.uk/fac/sci/chemistry/research/barrow/barrowgroup/calculators/mass_errors/>
- BECKER, K.; STADLER, M.; SURUP, F. *Viridistratins A–C: novel benzofluranthenes from Annulohypoxylon viridistratum and their chemotaxonomic significance*. **Biomolecules**, v. 10, n. 5, p. 805, 2020.
- BEKOE, S. O.; ORMAN, E.; ADJABUI, S. A.; BROBBEY, A. A.; OPPONG-KYEKYEKU, J.; OPUNI, K. F.-M.; KUNTWORBE, N.; ASARE-NKANSAH, S. *Development and Validation of an Ion-Pair HPLC-UV Method for the Quantitation of Quinoline and Indoloquinoline Alkaloids in Herbal and Pharmaceutical Antimalarial Formulations*. **Journal of Chemistry**, v. 2022, p. 1–11, 2 mar. 2022.
- BELINATO, J. R.; BAZIOLI, J. M.; SUSSULINI, A.; AUGUSTO, F.; FILL, T. P. *Metabolômica microbiana: inovações e aplicações*. **Química Nova**, v. 42, n. 5, p. 546–559, 2019.
- BO, G. *Giuseppe Brotzu and the discovery of cephalosporins*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6, p. 6–8, 2000.

BODE, H. B.; BETHE, B.; HÖFS, R.; ZEECK, A. *Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity*. **ChemBioChem**, v. 3, n. 7, p. 619–627, 2002.

BOTERO, W. B.; AMORIM, M. R.; CARLOS, I. Z.; POLES, M. C.; SANTOS, L. C. *Aromatic Polyketides and Macrolides from *Microsphaeropsis arundinis**. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2020.

BRAKHAGE, A. A. *Regulation of fungal secondary metabolism*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 21–32, 2013.

BREMBILLA-PERROT, B.; JACQUEMIN, L.; BEURRIER, D. *Relationships Between Heart Rate Variability and Antiarrhythmic Effects of Hydroquinidine*. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 11, n. 3, p. 493–498, 1997.

BRINKMANN, C. M.; MARKER, A.; KURTBÖKE, D. I. An overview on marine sponge-symbiotic bacteria as unexhausted sources for natural product discovery. **Diversity**, v. 9, n. 4, p. 40, 2017.

CALLA-QUISPE, E.; FUENTES-RIVERA, H. L.; RAMÍREZ, P.; MARTEL, C.; IBÁÑEZ, A. J. *Mass spectrometry: a rosetta stone to learn how fungi interact and talk*. **Life**, v. 10, n. 6, p. 89, 2020.

CAMELE, I.; SADEEK, S. A.; RACIOPPI, R.; ELSHAFIE, H. S. Antimicrobial activity of diffusible and volatile metabolites emitted by *Beauveria bassiana*: chemical profile of volatile organic compounds (VOCs) using SPME-GC/MS analysis. **Plants**, v. 12, n. 15, p. 2854, 2023.

CARPENTER, S.; RIGAUD, M.; BARILE, M.; PRIEST, T. J.; PEREZ, L.; FERGUSON, J. B. *An Interlinear Transliteration and English Translation of Portions of THE EBERS PAPYRUS Possibly Having to Do With Diabetes Mellitus*. 1998. Disponível em: <<https://www.bxscience.edu/ourpages/auto/2008/11/10/43216077/egypt%20medicine.pdf>>.

CARROLL, A. R.; COPP, B. R.; GRKOVIC, T.; KEYZERS, R. A.; PRINSEP, M. R. *Marine natural products*. **Natural Product Reports**, v. 41, p. 162, 2024.

CAVICCHIOLI, R. et al. Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, p. 569–586, 2019.

CHEN, S.; DING, M.; LIU, W.; HUANG, X.; LIU, Z.; LU, Y.; LIU, H.; SHE, Z. *Anti-inflammatory meroterpenoids from the mangrove endophytic fungus *Talaromyces amestolkiae* YX1*. **Phytochemistry**, v. 146, p. 8–15, 1 dez. 2018.

CHENG, M.-J.; WU, M.-D.; HSIEH, S.-Y.; HSIEH, M.-T.; CHEN, I.-S.; YUAN, G.-F. *Constituents of the endophytic fungus *Annulohypoxylon boveri* var. *microspora* BCRC 34012*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 94, n. 6, p. 1108–1114, 2011.

CHOY, H. L.; GAYLORD, E. A.; DOERING, T. L. *Ergosterol distribution controls surface structure formation and fungal pathogenicity*. **mBio**, v. 14, n. 3, p. e01353-23, 6 jul. 2023.

CRUZ, K. da S.; LIMA, M. C.; JESUS, M. A. de; SOUZA, A. Q. L. de; SALES-CAMPOS, C. *Annulohypoxylon* (Hypoxylaceae, Ascomycota) from Amazonian-forest of Brazil, with a description of one new species. **New Zealand Journal of Botany**, v. 59, n. 2, p. 267–284, 2021.

DAVIS, T. S.; CRIPPEN, T. L.; HOFSTETTER, R. W.; TOMBERLIN, J. K. *Microbial volatile emissions as insect semiochemicals*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 7, p. 840–859, 2013.

DEHNAVI, F.; ALIZADEH, S. R.; EBRAHIMZADEH, M. A. *Pyrrolopyrazine derivatives: synthetic approaches and biological activities*. **Medicinal Chemistry Research**, 17 set. 2021.

DE REVIERS, B.; FRANCESCHINI, I. A. **Biologia e filogenia das algas**. Porto Alegre: Artmed, 2006.

D'INCALCI, M.; GALMARINI, C. M. *A review of trabectedin (ET-743): a unique mechanism of action*. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 9, n. 8, p. 2157–2163, 2010.

EL-ELIMAT, T.; FIGUEROA, M.; EHRMANN, B. M.; CECH, N. B.; PEARCE, C. J.; OBERLIES, N. H. *High-resolution MS, MS/MS, and UV database of fungal secondary metabolites as a dereplication protocol for bioactive natural products*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 9, p. 1709–1716, 2013.

EL-HASAN, A.; WALKER, F.; SCHÖNE, J.; BUCHENAUER, H. *Detection of viridifungin A and other antifungal metabolites excreted by *Trichoderma harzianum* active against different plant pathogens*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 124, p. 457–470, 2009.

FELISBERTO, J. S.; RAMOS, Y. J.; MOREIRA, D. de L. **A biodiversidade como ferramenta para o melhoramento da saúde humana**. [S.l.]: Editora Appris, 2022.

FERNANDES, P. *Fusidic acid: a bacterial elongation factor inhibitor for the oral treatment of acute and chronic staphylococcal infections*. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 1, a025437, 2016.

FISCH, K. M.; GILLASPY, A. F.; GIPSON, M.; HENRIKSON, J. C.; HOOVER, A. R.; JACKSON, L.; NAJAR, F. Z.; WÄGELE, H.; CICHEWICZ, R. H. *Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger**. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 36, n. 9, p. 1199–1213, 2009.

FLYNN, E. H. **Cephalosporins and Penicillins: Chemistry and Biology**. Londres. Academic Press, 2013.

FRAATZ, M. A.; ZORN, H. *Fungal flavours*. Em: **Industrial Applications**. p. 249–268, ago. 2010.

FRANKE, H.; SCHOLL, R.; AIGNER, A. *Ricin and Ricinus communis in pharmacology and toxicology—from ancient use and “Papyrus Ebers” to modern perspectives and “poisonous plant of the year 2018”*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 392, p. 1181–1208, 2019.

FRANKENSTEIN, L.; SEIDE, S.; TÄGER, T.; JENSEN, K.; FRÖHLICH, H.; CLARK, A. L.; SEIZ, M.; KATUS, H. A.; NEE, P.; UHLMANN, L.; NACI, H.; ATAR, D. *Relative Efficacy of Spironolactone, Eplerenone, and cAnRenone in patients with Chronic Heart failure (RESEARCH): a systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials*. **Heart Failure Reviews**, 30 jul. 2019.

FRASCH, S. C.; BRATTON, D. L. *Emerging roles for lysophosphatidylserine in resolution of inflammation*. **Progress in Lipid Research**, v. 51, p. 199–207, 2012.

GARCIA, A. N.; STEIN, E. M.; VILLELA, L. Z.; YOKOYA, N. S.; COLEPICOLONETO, P.; CARVALHO, L. R. de. *Dichotomaria marginata* (Rhodophyta) as a bioindicator for marine pollution: an overview about its metabolites and adsorbed pollutants. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, v. 55, n. 2, p. 128–141, 2020.

GUBIANI, J. R.; OLIVEIRA, M. C. S.; NEPOMUCENO, R. A. R.; CAMARGO, M. J.; GARCEZ, W. S.; BIZ, A. R.; SOARES, M. A.; ARAUJO, Â.; BOLZANI, V. da S.; LISBOA, H. C. F.; SOUSA JR., P. T. de; VASCONCELOS, L. G. de; RIBEIRO, T. A. N.; OLIVEIRA, J. M. de; BANZATO, T. P.; LIMA, C. A.; LONGATO, G. B.; BATISTA JR., J. M.; BERLINCK, R. G. S.; TELES, H. L. *Cytotoxic prenylated indole alkaloid produced by the endophytic fungus Aspergillus terreus P63*. **Phytochemistry Letters**, v. 32, p. 162–167, 1 ago. 2019.

GUPTA, A. K.; FOLEY, K. A.; VERSTEEG, S. G. *New antifungal agents and new formulations against dermatophytes*. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1–2, p. 127–141, 2017.

GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. **AlgaeBase**. 2025. *World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway (taxonomic information republished from AlgaeBase with permission of M. D. Guiry)*. *Dichotomaria marginata* (J.Ellis & Solander) Lamarck, 1816. Accessed through: World Register of Marine Species at: <<https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=376807>>

HASTINGS, J.; OWEN, G.; DEKKER, A.; ENNIS, M.; KALE, N.; MUTHUKRISHNAN, V.; TURNER, S.; SWAINSTON, N.; MENDES, P.; STEINBECK, C. *ChEBI in 2016: Improved services and an expanding collection of metabolites*. 2016.

HERRMANN, A. (ed.). **The chemistry and biology of volatiles**. Chichester: Wiley, 432 p. ISBN: 978-0-470-77778-7. 2010.

HONG, S.-B.; KIM, D.-H.; SAMSON, R. A. *Aspergillus* associated with *Meju*, a fermented soybean starting material for traditional soy sauce and soybean paste in Korea. **Mycobiology**, v. 43, n. 3, p. 218–224, 2015.

HONÓRIO, A. E. **Avaliação química e biológica de fungos endofíticos associados às algas marinhas *Acanthophora spicifera*, *Dichotomaria marginata* e *Sargassum vulgare***. Tese de Doutorado. - Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita - UNESP, Araraquara 2018.

HADDAD, E. A.; ARAÚJO, I. F. Shades of blue: the regional structure of the ocean economy in Brazil. ***npj Ocean Sustainability***, v. 4, Article number: 15, 2025.

HSIEH, H.-M.; JU, Y.-M.; ROGERS, J. D. *Molecular phylogeny of Hypoxylon and closely related genera*. ***Mycologia***, v. 97, n. 4, p. 844–865, 2005.

HUNG, R.; LEE, S.; BENNETT, J. W. *Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems*. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, v. 99, p. 3395–3405, 2015.

ISKANDAR, K.; MURUGAIYAN, J.; HALAT, D. H.; EL HAGE, S.; CHIBABHAI, V.; ADUKKADUKKAM, S.; ROQUES, C.; MOLINIER, L.; SALAMEH, P.; VAN DONGEN, M. *Antibiotic discovery and resistance: the chase and the race*. ***Antibiotics***, v. 11, n. 2, p. 182, 2022.

JANSEN-OLLIGES, L.; CHATTERJEE, S.; JIA, L.; STAHL, F.; BÄR, C.; STADLER, M.; SURUP, F.; ZEILINGER, C. *Multiformin-type azaphilones prevent SARS-CoV-2 binding to ACE2 receptor*. ***Cells***, v. 12, n. 1, p. 83, 2023.

JIMÉNEZ, C. *Marine natural products in medicinal chemistry*. ***ACS Medicinal Chemistry Letters***, v. 9, p. 959–961, 2018.

KASTANIAS, M. A.; CHRYSAYI-TOKOUSBALIDES, M. *Herbicidal potential of pyrenophorol isolated from a Drechslera avenae pathotype*. ***Pest. Manag. Sci.***, v. 56, p.227-232, 2000.

KAMAT, S.; KUMARI, M.; TARITLA, S.; JAYABASKARAN, C. *Endophytic fungi of marine alga from Konkan Coast, India—a rich source of bioactive material*. ***Frontiers in Marine Science***, v. 7, p. 31, 2020.

KELLER, N. P. *Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery*. ***Nature Reviews Microbiology***, v. 17, n. 3, p. 167–180, 2019.

KIM, D.-C.; QUANG, T. H.; TIEN, N. T.; KIM, K.-W.; KIM, Y.-C.; NGAN, N. T. T.; CUONG, N. X.; NAM, N. H.; OH, H. *Anti-neuroinflammatory effect of oxaline, isorhodoptilometrin, and 5-hydroxy-7-(2'-hydroxypropyl)-2-methyl-chromone obtained from the marine fungal strain *Penicillium oxalicum* CLC-MF05*. ***Archives of Pharmacal Research***, v. 45, n. 2, p. 90–104, 2022.

KIM, S.; CHEN, J.; CHENG, T.; GINDULYTE, A.; HE, J.; HE, S.; LI, Q.; SHOEMAKER, B. A.; THIESSEN, P. A.; YU, B. *PubChem 2025 update*. ***Nucleic Acids Research***, v. 53, n. D1, p. D1516–D1525, 2024. DOI: 10.1093/nar/gkae1059.

KINDERLERER, J. L. Volatile metabolites of filamentous fungi and their role in food flavour. ***Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement***, v. 1989, p. 133S–144S, 1989.

KOITABASHI, M.; KAJITANI, Y.; HIRASHIMA, K. *Antifungal substances produced by fungal strain Kyu-W63 from wheat leaf and its taxonomic position*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 70, p. 124–130, 2004.

KUHNERT, E.; SURUP, F.; HALEMEIER, T.; BOLAND, W.; STADLER, M. *Minutellins A–F, azaphilone pigments from *Annulohypoxylon minutellum* and their chemotaxonomic significance within the Xylariales*. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 7, p. 2064–2073, 2017.

LANDECKER, E. M. ***Fundamental of the fungi***. 4th ed. Upper Saddle River: Prentice hall, 1996. 574 p.

LAUGHLIN, B. W.; SUGIURA, M. H.; JENKINS, M.; CHEN, C.-Y.; DREW, K. L. *N⁶-cyclohexyladenosine is better than meperidine and buspirone at suppressing metabolism during TTM32 but does not improve outcome after cardiac arrest*. **Experimental Neurology**, v. 380, p. 114891–114891, 22 jul. 2024.

LEBEAU, J.; VENKATACHALAM, M.; FOUILLAUD, M.; PETIT, T.; VINALE, F.; DUFOSSÉ, L.; CARO, Y. *Production and new extraction method of polyketide red pigments produced by ascomycetous fungi from terrestrial and marine habitats*. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 3, p. 34, 2017.

LEE, S.; KIM, J.; KIM, H.; LEE, S.; PARK, J.; SON, Y.; CHOI, G.; KIM, S.; LEE, H.; LEE, J.; YOO, J.; KIM, S.; LEE, S.; LEE, S.; CHOI, S.; CHOI, J. *Antidiabetic effects of hypoxylonol C and F isolated from *Annulohypoxylon annulatum* in INS-1 cells and streptozotocin-induced diabetic mice*. **Molecules**, v. 24, n. 17, p. 3048, 2019.

LEMFACK, M. C.; NICKEL, J.; DUNKEL, M.; PREISSNER, R.; PIECHULLA, B. *mVOC: a database of microbial volatiles*. **Nucleic Acids Research**, v. 42, Database issue, p. D744–D748, 2014.

LI, G.; JIAN, T.; LIU, X.; LV, Q.; ZHANG, G.; LING, J. *Application of metabolomics in fungal research*. **Molecules**, v. 27, n. 21, p. 7365, 2022.

MAENO, Y.; TERADA, R.; KOTAKI, Y.; CHO, Y.; KONOKI, K.; YOTSU-YAMASHITA, M. *Possible biosynthetic products and metabolites of kainic acid from the red alga *Digenea simplex* and their biological activity*. **Journal of Natural Products**, v. 82, p. 1627–1633, 2019.

MARIA, A.; MORAES, L. DE; PAES, R. D. A. Micologia. **Giornale botanico italiano**, v. 129, n. 2, p. 188–198, 1995.

MARTINEZ-KLIMOVA, E.; RODRÍGUEZ-PEÑA, K. *Endophytes as sources of antibiotics*. **Biochemical Pharmacology**, v. 134, p. 1–17. 2017.

MASSBANK OF NORTH AMERICA (MoNA). MoNA: MassBank of North America. Disponível em: <https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>. Acesso em: 2024.

- MEADS, K. L.; THOMAS, T. P.; LANGSTON, J. L.; MYERS, T. M.; SHIH, T.-M. *Evaluation of adenosine A1 receptor agonists as neuroprotective countermeasures against Soman intoxication in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology***, v. 416, p. 115466–115466, 22 fev. 2021.
- NIEGO, A. G. T.; LAMBERT, C.; MORTIMER, P.; THONGKLANG, N.; RAPIOR, S.; GROSSE, M.; SCHREY, H.; CHARRIA-GIRÓN, E.; WALKER, A.; HYDE, K. D.; STADLER, M. *The contribution of fungi to the global economy. **Fungal Diversity***, v. 121, p. 95–137, 2023.
- OFOEGBU, A.; ETTIENNE, E. B. Pharmacogenomics and morphine. ***The Journal of Clinical Pharmacology***, v. 61, n. 9, p. 1149–1155, 2021.
- OH, H.-S.; KANG, H.-Y. *Synthesis of (-)-Pyrenophorol. **Bull. Korean Chem. Soc.*** 2, v. 32, n. 8, p. 2869–2870, 2011.
- PAGUIRIGAN, J. A. G.; JEONG, E.; KANG, K. B.; HUR, J.-S.; KIM, W. Investigation of antimicrobial compounds produced by endolichenic fungi in different culture media. ***The Plant Pathology Journal***, v. 40, n. 5, p. 559–567, 2024.
- PAN, R.; BAI, X.; CHEN, J.; ZHANG, H.; WANG, H. *Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: A literature review. **Frontiers in Microbiology***, [s. l.], v. 10, n. FEB, p. 1–20, 2019.
- PARAMASIVAN, K.; MUTTURI, S. *Recent advances in the microbial production of squalene. **World Journal of Microbiology and Biotechnology***, v. 38, p. 91, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03273-w>
- PEREIRA, L. *Macroalgae. **Encyclopedia***, 1, 177–188. 2021.
- PETRINI, O. ***Fungal Endophytes of Tree Leaves***. In: Andrews, J. H., Hirano, S. S. (eds) *Microbial Ecology of Leaves*. Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. Springer, New York, NY. 1991.
- PETROVSKA, B. *Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews***, v. 6, n. 11, p. 1, 2012.
- PILON, A. C.; VIEIRA, N. C.; AMARAL, J. G.; MONTEIRO, A. F.; SILVA, R. R. da; SPÍNDOLA, L. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; LOPES, N. P. Redes moleculares: uma análise sobre anotações e descoberta de novos ativos. ***Química Nova***, v. 44, n. 9, p. 1168–1179, 2021.
- POLIZZI, V.; ADAMS, A.; DE SAEGER, S.; VAN PETEGHEM, C.; MORETTI, A.; DE KIMPE, N. *Influence of various growth parameters on fungal growth and volatile metabolite production by indoor molds. **Science of the Total Environment***, v. 414, p. 277–286, 2012.
- QUINN, R. A.; NOTHIAS, L.-F.; VINING, O.; MEEHAN, M.; ESQUENAZI, E.; DORRESTEIN, P. C. *Molecular networking as a drug discovery, drug metabolism,*

and precision medicine strategy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 2, p. 143–154, 2017.

RAJAMANIKYAM, M. et al. *Endophytic Fungi Therapeutics as Novel Resources of nature*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, n. December, p. 1–26, 2017.

ROMANO, G.; COSTANTINI, M.; SANSONE, C.; LAURITANO, C.; RUOCCO, N.; IANORA, A. *Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules*. **Marine Environmental Research**, v. 128, p. 58–69, 2017.

ROMANO, S.; JACKSON, S. A.; PATRY, S.; DOBSON, A. D. W. *Extending the “one strain many compounds” (OSMAC) principle to marine microorganisms*. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 1–29, 2018.

ROSSI, G. P.; CEOLOTTO, G.; ROSSITTO, G.; MAIOLINO, G.; CESARI, M.; SECCIA, T. M. *Effects of Mineralocorticoid and AT1 Receptor Antagonism on The Aldosterone-Renin Ratio In Primary Aldosteronism—the EMIRA Study*. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 105, n. 6, p. 2060–2067, 18 fev. 2020.

RUNGJINDAMAI, N.; JONES, E. B. G. *Why are there so few Basidiomycota and basal fungi as endophytes? A review*. [S.l.]: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2024.

SALDAN, N. C.; ALMEIDA, R. T. R.; AVÍNCOLA, A.; PORTO, C.; GALUCH, M. B.; MAGON, T. F. S.; PILAU, E. J.; SVIDZINSKI, T. I. E.; OLIVEIRA, C. C. *Development of an analytical method for identification of Aspergillus flavus based on chemical markers using HPLC-MS*. **Food Chemistry**, v. 241, p. 113–121, 2018.

SHEEJIN, S.; HARKHANI, K.; SHARMA, A. K. *Marine bioactive compounds and their potential antiviral properties*. **Advances in BioResearch**, v. 15, n. 1, p. 366–377, 2024.

SHEU, J.-H.; HUANG, S.-Y.; WANG, G.-H.; DUH, C.-Y. *Study on cytotoxic oxygenated desmosterols isolated from the red alga Galaxaura marginata*. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 900–903, 1997.

SILVA, C. S. da; PEREIRA, M. B.; PEREIRA, J. *New accounts on Hypoxylaceae and Xylariaceae from Brazil*. **Rodriguésia**, v. 71, p. e03012018, 2020.

SILVA, G. S. **Potencial Biológico e Quimiodiversidade de Fungos Endofíticos Das Espécies *Annulohypoxylon stygium* e *Annulohypoxylon Yungensis* Associados à Alga Marinha *Asparagopsis taxiformis***. Tese—Unesp. 285p. 2024.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J.; BRYCE, D. L. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. **Editora LTC**. 8ª Edição. 2019.

STEINEBRUNNER, F.; SCHIESTL, F. P.; LEUCHTMANN, A. *Ecological role of volatiles produced by Epichloë: differences in antifungal toxicity*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 64, n. 2, p. 307–316, 2008.

STENSMYR, M. C.; DWECK, H. K. M.; FARHAN, A.; BECHER, P. G.; SEKI, Y.; HANSSON, B. S. *A conserved dedicated olfactory circuit for detecting harmful microbes in Drosophila*. **Cell**, v. 151, n. 6, p. 1345–1357, 2012.

SUDARMAN, E.; KUHNERT, E.; HYDE, K. D.; SIR, E. B.; SURUP, F.; STADLER, M. Truncatones A–D, benzo[j]fluoranthenes from *Annulohypoxylon* species (Xylariaceae, Ascomycota). **Tetrahedron**, v. 72, p. 6450–6454, 2016.

SURUP, F.; MOHR, K. I.; JANSEN, R.; STADLER, M. *Cohaerins G–K, azaphilone pigments from Annulohypoxylon cohaerens and absolute stereochemistry of cohaerins C–K*. **Phytochemistry**, v. 95, p. 252–258, 2013.

SURUP, F.; WIEBACH, V.; KUHNERT, E.; STADLER, M. *Truncaquinones A and B, asterriquinones from Annulohypoxylon truncatum*. **Tetrahedron Letters**, v. 57, n. 20, p. 2183–2185, 2016.

TERENIN, V. I.; KABANOVA, E. V.; FEOKTISTOVA, E. S. *Synthesis and properties of pyrrolo[1,2-a]pyrazines (review)*. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 27, n. 10, p. 1037–1048. 1991.

TOGHUEO, R. M. K.; SAHAL, D.; BOYOM, F. F. *Recent advances in inducing endophytic fungal specialized metabolites using small molecule elicitors including epigenetic modifiers*. **Phytochemistry**, v. 174, 2020.

TU, Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. **Nature Medicine**, v. 17, p. 1217–1220, 2011.

UNESCO. A década das Nações Unidas da Ciência Oceânica para o Desenvolvimento Sustentável (2021–2030). Paris: Comissão Oceanográfica Intergovernamental da UNESCO, 2021. Disponível em: <https://www.oceandecade.org>. Acesso em: 28 fev. 2025.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. DA S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, abr. 2006.

VON SCHACKY, C. *Importance of EPA and DHA blood levels in brain structure and function*. **Nutrients**, v. 13, n. 4, p. 1074, 2021.

WANG, H.; LIU, Z.; DUAN, F.; CHEN, Y.; QIU, K.; XIONG, Q.; LIN, H.; ZHANG, J.; TAN, H. Isolation, identification, and antibacterial evaluation of endophytic fungi from Gannan navel orange. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1172629, 2023.

WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; PENG, Y.; NGUYEN, D. D.; WATROUS, J.; KAPONO, C. A.; LUZZATTO-KNAAN, T.; PORTO, C.; BOUSLIMANI, A.; MELNIK, A. V.; MEEHAN, M. J.; LIU, W. T.; CRÜSEMANN, M.; BOUDREAU, P. D.; ESQUENAZI, E.; SANDOVAL-CALDERÓN, M.; KERSTEN, R. D.; PACE, L. A.; QUINN, R. A.; DUNCAN, K. R.; HSU, C. C.; FLOROS, D. J.; GAVILAN, R. G.; KLEIGREWE, K.; NORTEN, T.; DUTTON, R. J.; PARROT, D.; CARLSON, E. E.; AIGLE, B.; MICHELSEN, C. F.; JELSBK, L.; SOHLENKAMP, C.;

PEVZNER, P.; EDLUND, A.; MCLEAN, J.; PIEL, J.; MURPHY, B. T.; GERWICK, L.; LIAW, C. C.; YANG, Y. L.; HUMPH, H. U.; MAANSSON, M.; KEYZERS, R. A.; SIMS, A. C.; JOHNSON, A. R.; SIDEBOTTOM, A. M.; SEDIO, B. E.; KLITGAARD, A.; LARSON, C. B.; BOYA, C. A. P.; TORRES-MENDOZA, D.; GONZALEZ, D. J.; SILVA, D. B.; MARQUES, L. M.; DEMARQUE, D. P.; POCIUTE, E.; O'NEILL, E. C.; BRIAND, E.; HELFRICH, E. J. N.; GRANATOSKY, E. A.; GLUKHOV, E.; RYFFEL, F.; HOUSON, H.; MOHIMANI, H.; KHARBUSH, J. J.; ZENG, Y.; VORHOLT, J. A.; KURITA, K. L.; CHARUSANTI, P.; MCPHAIL, K. L.; NIELSEN, K. F.; VUONG, L.; ELFEKI, M.; TRAXLER, M. F.; ENGINE, N.; KOYAMA, N.; VINING, O. B.; BARIC, R.; SILVA, R. R.; MASCUCH, S. J.; TOMASI, S.; JENKINS, S.; MACHERLA, V.; HOFFMAN, T.; AGARWAL, V.; WILLIAMS, P. G.; DAI, J.; NEUPANE, R.; GURR, J.; RODRÍGUEZ, A. M. C.; LAMSA, A.; ZHANG, C.; DORRESTEIN, K.; DUGGAN, B. M.; ALMALITI, J.; ALLARD, P. M.; PHAPALE, P.; NOTHIAS, L. F.; ALEXANDROV, T.; LITAUDON, M.; WOLFENDER, J. L.; KYLE, J. E.; METZ, T. O.; PERYEA, T.; NGUYEN, D. T.; VANLEER, D.; SHINN, P.; JADHAV, A.; MÜLLER, R.; WATERS, K. M.; SHI, W.; LIU, X.; ZHANG, L.; KNIGHT, R.; JENSEN, P. R.; PALSSON, B.; POGLIANO, K.; LININGTON, R. G.; GUTIÉRREZ, M.; LOPES, N. P.; GERWICK, W. H.; MOORE, B. S.; DORRESTEIN, P. C.; BANDEIRA, N. *Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. Nature Biotechnology*, [s. l.], v. 34, n. 8, 2016.

WATROUS, J. ROACH, P. ALEXANDROV, T.; DORRESTEIN, P. C. *Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 109, n. 26, p. 1743–1752, 2012.

WILLIAMS, M.; BRAUNWALDER, A.; ERICKSON, T. J. *Evaluation of the binding of the A-1 selective adenosine radioligand, cyclopentyladenosine (CPA), to rat brain tissue. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 332, n. 2, p. 179–183, 1986.

WITTSTEIN, K.; CORDSMEIER, A.; LAMBERT, C. et al. *Identification of Rosellinia species as producers of cyclodepsipeptide PF1022A and resurrection of the genus Dematophora as inferred from polythetic taxonomy. Studies in Mycology*, v. 96, p. 1–16, 2020.

YAMAMOTO, Y.; SAKURAI, T.; CHEN, Z.; INOUE, N.; CHIBA, H.; HUI, S.-P. *Lysophosphatidylethanolamine affects lipid accumulation and metabolism in a human liver-derived cell line. Nutrients*, v. 14, n. 3, p. 579, 2022.

YAMAZAKI, H.; ROTINSULU, H.; KANEKO, T.; MURAKAMI, K.; FUJIWARA, H.; UKAI, K.; NAMIKOSHI, M. *A new dibenz[b,e]oxepine derivative, 1-hydroxy-10-methoxy-dibenz[b,e]oxepin-6,11-dione, from a marine-derived fungus, Beauveria bassiana TPU942. Marine Drugs*, v. 10, p. 2691–2697, 2012.

YANG, Y.-H.; MAO, J.-W.; TAN, X.-L. *Research progress on the source, production, and anti-cancer mechanisms of paclitaxel. Chinese Journal of Natural Medicines*, v. 18, n. 12, p. 890–897, 2020.

YAVUZ, M. et al. *Hydroquinidine Displays a Significant Anti-carcinogenic Activity in Breast and Ovarian Cancer Cells via Inhibiting Cell-cycle and Stimulating Apoptosis. Turkish Journal of Biology*, v. 47, n. 1, p. 44–60. 2023.

ZHENG, R.; LI, S.; ZHANG, X.; ZHAO, C. *Biological activities of some new secondary metabolites isolated from endophytic fungi: A review study*International. *Journal of Molecular Sciences*. 2021.