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

Juvenal Henrique Veloso

Estudo das raízes de *Senna spectabilis*: Obtenção de biblioteca de fungos endofíticos para exploração racional fazendo uso da metabolômica e ferramentas quimiométricas

Araraquara 2024

Juvenal Henrique Veloso

Estudo das raízes de Senna spectabilis: Obtenção de biblioteca de fungos endofíticos para exploração racional fazendo uso da metabolômica e ferramentas quimiométricas

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

Área de Concentração: Produtos Naturais

Orientador(a): Prof. Dr. Ian Castro Gamboa

V443e

Veloso, Juvenal Henrique

Estudo das raízes de Senna spectabilis : obtenção de biblioteca de fungos endofíticos para exploração racional fazendo uso da metabolômica e ferramentas quimiométricas / Juvenal Henrique Veloso. -- Araraquara, 2024 122 f. : il.

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

1. Produtos naturais. 2. Fusarium oxysporum. 3. Microorganismos. 4. Fungos endofíticos. 5. Biofilmes. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Tradicionalmente, a pesquisa e o desenvolvimento de metabólitos secundários têm se concentrado na extração desses compostos diretamente das plantas. No entanto, essa abordagem enfrenta desafios significativos, como a variabilidade dos compostos em diferentes condições ambientais e a necessidade de grandes quantidades de material vegetal. Em contraste, os fungos endofíticos oferecem uma alternativa mais sustentável e eficiente. Estes microrganismos têm a capacidade de produzir uma vasta gama de compostos bioativos que muitas vezes são superiores aos encontrados nas plantas, devido à sua habilidade em sintetizar metabólitos em condições controladas e em menor escala. Além disso, a pesquisa mostrou um dado extremamente relevante: a capacidade dos fungos endofíticos de erradicar biofilmes. O uso de fungos endofíticos demonstrou um potencial significativo na erradicação desses biofilmes, oferecendo uma alternativa promissora e eficaz frente aos métodos tradicionais. Este achado não apenas contribui para a inovação no tratamento de infecções resistentes, mas também abre novas possibilidades para o desenvolvimento de estratégias de controle mais sustentáveis e direcionadas.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Traditionally, research and development of secondary metabolites have focused on extracting these compounds directly from plants. However, this approach faces significant challenges, such as variability of compounds under different environmental conditions and the need for large quantities of plant material. In contrast, endophytic fungi offer a more sustainable and efficient alternative. These microorganisms have the ability to produce a wide range of bioactive compounds that are often superior to those found in plants, due to their ability to synthesize metabolites under controlled conditions and on a smaller scale. Additionally, this research has revealed an extremely relevant finding: the capacity of endophytic fungi to eradicate biofilms. The use of endophytic fungi in this research has shown significant potential in eradicating these biofilms, offering a promising and effective alternative to traditional methods. This finding not only contributes to innovation in the treatment of resistant infections but also opens new possibilities for developing more sustainable and targeted control strategies.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

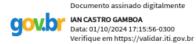


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Estudo das raízes de Senna spectabilis: Obtenção de biblioteca de fungos endofíticos para exploração racional fazendo uso da metabolômica e ferramentas quimiométricas"

AUTOR: JUVENAL HENRIQUE VELOSO ORIENTADOR: IAN CASTRO GAMBOA

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



Prof. Dr. IAN CASTRO GAMBOA (Participação Virtual)

Departamento de Bioquimica e Quimica Organica / Instituto de Quimica – UNESP – Araraquara

Prof. Dr. NORBERTO PEPORINE LOPES (Participação Virtual)
Departamento de Física e Química / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - Ribeirão Preto

Prof. Dr. MARCELO JOSÉ PENA FERREIRA (Participação Virtual) Departamento de Botânica / Instituto de Biociências - USP - São Paulo

Dra. ANA CAROLINE ZANATTA SILVA (Participação Virtual)

Departamento de Ciências Biomoleculares / Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP- Ribeirão Preto

Prof. Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS (Participação Virtual)

Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciencias Farmaceuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 01 de outubro de 2024

Dedico este trabalho aos meus pais, "In Memorian", por tudo que me ensinaram, pois sem eles este trabalho e muitos dos meus sonhos não se realizariam.

AGRADECIMENTOS

A realização desta tese de doutorado contou com importantes apoios e incentivos sem os quais não teria se tornado uma realidade e aos quais estarei eternamente grato.

Primeiramente à minha esposa Gabriela que sem seu apoio não teria conseguido passar por todo esse processo, que sempre esteve ao meu lado, dando força e por seu companheirismo que fez toda a diferença.

Agradeço também a todos os meus amigos que de forma direta ou indireta participaram deste trabalho, ajudando com algum conhecimento ou mesmo me ajudando a passar por momentos difíceis enquanto estava engajado com este trabalho.

Agradeço também ao meu orientador Prof. Dr. lan Castro Gamboa, que sempre foi muito mais que apenas meu orientador, me ajudou muito tanto no ambito profissional quanto no pessoal, participou de muitos momentos na minha vida que me marcaram pra sempre.

Meu muito obrigado a todos que de alguma forma me deram o incentivo que precisava para que conseguisse concluir mais esse capítulo da minha vida.

As professora Dra. Ilana Camargo, Dra. Carmen Lúcia Cardoso e Dra. Leticia Veras Costa Lotufo por realizarem os ensaios biológicos.

Ao prof. Dr. Marcos Antônio Soares e à profa. Dra. Marcia Regina von Zeska Kress pela identificação das linhagens fúngicas.

Ao prof. Dr. Norberto Peporine Lopes por me aceitar em seu laboratório e por toda ajuda e conhecimento compartilhado.

Aos funcionários do Instituto de Química que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão deste trabalho. Aos técnicos administrativos Dr. João Luiz Bronzel Júnior, Dr^a. Juliana Rodrigues e especialmente ao Dr. Nivaldo Boralle, pela realização das análises e pelo companheirismo durante esse período.

Ao Instituto de Química e ao grupo de pesquisa NuBBE, pelo espaço cedido e todo o suporte necessário para a realização deste trabalho.

Às agências de fomento CNPq, FAPESP.

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

No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.

Albert Einstein

RESUMO

Os produtos naturais desempenham um papel importante na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos utilizados no tratamento de enfermidades, e com isso, a busca por novas fontes de substâncias com uso terapêutico tem se intensificado. Neste contexto, muitos estudos estão sendo desenvolvidos com fungos endofíticos, encontrados em diversas espécies de plantas, que são capazes de sintetizar uma diversidade de compostos que podem apresentar inúmeras atividades biológicas. Na literatura existem diversos trabalhos que tratam da utilização de fungos endofíticos isolados das partes aéreas da espécie *Senna spectabilis*, porém, não há estudos da composição desses microrganismos presentes nas raízes.

Assim sendo, para uma compreensão adequada dessa espécie arbórea e de seus microrganismos, é importante um estudo minucioso da composição biológica e química de suas raízes. Portanto, este trabalho teve como objetivo realizar uma investigação racional da biodiversidade presente nas raízes de *Senna spectabilis* visto não haver nenhum registro dos fungos endofíticos encontrados nas raízes dessa espécie vegetal, e identificação dos compostos produzidos por estes microrganismos e estudos para avaliar a capacidade de atividades biológicos destes compostos. No total foram isoladas 14 cepas de fungos endofíticos provenientes das raízes. Dois dos fungos isolados foram identificados como *Fusarium oxysporum*, que apresentaram formas especiais. Foi realizado uma triagem dos extratos frente a diversos ensaios biológicos a fim de seguir um processo bioguiado com os extratos selecionados.

Nesse quesito foram escolhidos os extratos SSR4 e SSR14, pois apresentaram maiores atividades frente a diversas linhagens bacterianas gram-positivas. Seus extratos foram avaliados para atividades antibacterianas e erradicação de biofilme. O ensaio de erradicação de biofilme apresentou os melhores resultados, com erradicação de até 99% do biofilme formado. Visando correlacionar a atividade observada com a química destas frações foram realizados experimentos como ensaios biológicos e análise de LC-MS para caracterizar as frações e permitir a tomada de decisão sobre a necessidade ou não de isolamento. As análises permitiram anotar 14 (quatorze) compostos, sendo 8 (oito) da classe eniatina e 6 (seis) da classe beauvericina as quais foram as principais responsáveis pelas atividades biológicas observadas.

Palavras-chave: Senna spectabilis; Fusarium oxysporum; Bioatividade; Fungos endofíticos, Beauvericina.

ABSTRACT

Natural products play an important role in the discovery and development of new drugs used in the treatment of diseases, and by this means, the search for new sources of substances with therapeutic use has intensified. In this context, many studies are being developed with endophytic fungi, found in several species of plants, which are capable of synthesizing a diversity of compounds that can present numerous biological activities. In the literature, there are several studies that deal with the use of endophytic fungi isolated from the aerial parts of the species *Senna spectabilis*, however, there are no studies on the composition of these microorganisms present in the roots.

Therefore, for a proper understanding of this tree species and its microorganisms, a detailed study of the biological and chemical composition of its roots is important. Therefore, this work aimed to carry out a rational investigation of the biodiversity present in the roots of *Senna spectabilis*, since there is no record of endophytic fungi found in the roots of this plant species, and to identify the compounds produced by these microorganisms and studies to evaluate the capacity of biological activities of these compounds. A total of 14 strains of endophytic fungi were isolated from the roots. Two of the isolated fungi were identified as *Fusarium oxysporum*, which presented special forms. The extracts were screened using several biological assays in order to follow a bioguided process with the selected extracts.

In this regard, the extracts SSR4 and SSR14 were chosen, as they presented greater activities against several gram-positive bacterial strains. Their extracts were evaluated for antibacterial activities and biofilm eradication. The biofilm eradication assay presented the best results, with eradication of up to 99% of the biofilm formed. In order to correlate the observed activity with the chemistry of these fractions, a LC-MS analysis was performed to characterize the fractions and allow decision-making on the need for isolation or not. The analyses allowed the annotation of 14 (fourteen) compounds, 8 (eight) of which were from the eniatin class and 6 (six) from the beauvericin class, which were mainly responsible for the observed biological activities.

Keywords: Senna spectabilis; Fusarium oxysporum; Bioactivity; Endophytic fungi, Beauvericin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem das folhas, flores e da árvore de Senna spectabilis18
Figura 2 – Metabólitos secundários identificados de S. spectabilis19
Figura 3 – Substâncias bioativas isoladas de fungos endofíticos20
Figura 4 – Compostos isolados de fungos do gênero Fusarium2
Figura 5 – Algumas micotoxinas provenientes do Fusarium oxysporum29
Figura 6 – Representação do crescimento dos endófitos em placa de petri30
Figura 7 - Representação do crescimento fúngico nas placas de petri durante
10 dias37
Figura 8 – Início do crescimento fúngico em meio líquido, a) dia 1; b) dia 283
Figura 9 – Procedimento de partição líquido-líquido acetato de etila/água39
Figura 10 – Extratos obtidos de cada fungo
Figura 11 – Fracionamento em coluna de bancada (C18) e frações4
Figura 12 – Cromatogramas dos 14 fungos sem aplicação de pré-tratamento4
Figura 13 – Cromatogramas após a aplicação do pré-tratamento4
Figura 14 – Representação gráfica da análise de agrupamento hierárquico4
Figura 15 – Gráfico dos scores PC1 <i>versus</i> PC2, para classificação das amostras5
Figura 16 – Inibição do crescimento celular (%) das amostras SSR-1 a SSR-14 en
linhagem de carcinoma de colorretal humano (HCT116), com a
concentrações de 5 μg/mL e 50 μg/mL (média ± SEM) (n=3)5
Figura 17 – Quantidade de biofilme da S. epidermidis ATCC 35984 depois de tratade
com o extrato SS_R1 a 512 µg/mL e extratos SS_R2, SS_R4, SS_R6
SS_R12 a 512 μg/mL62
Figura 18 – Quantidade de biofilme da S. aureus ATCC 8095 depois de tratado con
o extrato SS_R1 a 512 μg/mL e SS_R2, SS_R4, SS_R6 e SS_R12 a 512
μg/mL63
Figura 19 – Identificação genética dos fungos endofíticos das raízes de S. spectabilis
6
Figura 20 – Perfil cromatográfico dos extratos de fungos endofíticos das raízes de S
spectabilis, obtidos por CLAE-DAD, no comprimento de onda de 254 nn
(20a – SSR4, 20b – SSR14)60

Figura 21	- Proposta de fracionamento para os extratos de Fusarium oxysporum a
	partir dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD, no comprimento de
	onda de 254 nm67
Figura 22	- Alinhamento dos sinais cromatográficos observados nas frações e no
	extrato bruto SSR4 e SSR1468
Figura 23	 Quantidade de biofilme da S. epidermidis ATCC 35984 depois de tratado
	com os compostos SSR4 e SSR14 a 512 mg/L71
Figura 24	 Quantidade de biofilme de S. epidermidis ATCC 35984 depois de tratado
	com as frações FR4, FR5 e FR6 do composto SSR4 a 512 mg/L73
Figura 25	 Quantidade de biofilme de S. epidermidis ATCC 35984 depois de tratado
	com as frações FR1, FR2 e FR3 do composto SSR4 a 512 mg/L73
Figura 26	– Quantidade de biofilme de S. epidermidis ATCC 35984 depois de tratado
	com as frações FR1, FR2 e FR3 do composto SSR14 a 512 mg/L74
Figura 27	 Quantidade de biofilme de S. epidermis ATCC 35984 depois de tratado
	com as frações FR4; FR5; e FR6 do composto SSR12 a 512 mg/L75
Figura 28	- Rede molecular obtida através do FBMN, verde claro: SSR4; verde
	escuro: SSR1476
Figura 29	Estrutura da eniatina e seus análogos77
Figura 30	- Cluster identificado das eniatinas e seus análogos (verde claro: SSR4;
	verde escuro: SSR14)79
Figura 31	– Padrão de fragmentação para a molécula eniatina A80
Figura 32	- Espectro de MS ² da eniatina A; A2 ou C [M + NH4]+, m/z 699,5241TR
	22,08 min81
Figura 33 -	– Espetro de MS² da eniatina A; A2 ou C [M + NH4]+,m/z 699,5256 TR 22,05
	min82
Figura 34	– Padrão de fragmentação para a molécula eniatina A183
_	 Espectros de MS² da eniatina A1 [M + H] +, m/z 668,4809, TR 21,25 min
	83
Figura 36	 Espectros de MS² da eniatina B [M + H]⁺, m/z 640,4484, TR 19,46 min
J	84
Figura 37	 Proposta de mecanismo de fragmentação para a molécula da eniatina B
G 12 2 2 2 2	85
Figura 38	 Espectros de MS² da eniatina B1 [M + H] +, m/z 654,4652, TR 20,40 min
J = 2.0	87

Figura 39	 Padrão de fragmentação para a molécula eniatina B187
Figura 40	 Espectros de MS² da eniatina A1; E; G; H; I; O1; O2; O3 [M + NH4]⁺, m/2
	685,5082, TR 21,24 min88
Figura 41	 Padrão de fragmentação para a molécula para a eniatina A1; E; G; H; I
	O1; O2; O389
Figura 42	- Espectros de MS2 da eniatina B1; B4 ou H [M + NH4]+, m/z 671,4920
	TR 20,45 min90
Figura 43	- Padrão de fragmentação para a molécula para a eniatina B1; B4 ou
	H90
Figura 44	- Espectros de MS ² da eniatina A; A2 ou C [M + H] ⁺ , m/z 682,4965, TF
	22,09 min9
Figura 45	– Padrão de fragmentação para a molécula para a eniatina A, A2 ou C9°
Figura 46	– Estrutura da beauvericina92
Figura 47	– Nodo da beauvericina e seus análogos94
Figura 48	 Padrão de fragmentação para a molécula para a Beauvericina96
Figura 49	– Espectro de MS ² da beauvericina [M + H]+, m/z 784,4577, TR 20,69 mir
	97
Figura 50	– Proposta de mecanismo de fragmentação para a molécula da
	beauvericina98
Figura 51	– Espectros de MS ² da beauvericina [M + NH4]+, m/z 801,4834, TR 20,64
	min99
Figura 52	– Espectros de MS² da beauvericina A/F [M + H]+, m/z 798,4693, TR 21,40
	min100
Figura 53	 Padrão de fragmentação para a molécula para a beauvericina A/F100
Figura 54	- Espectros de MS ² da beauvericina A/F [M + NH4]+, m/z 815,4978, TF
	21,44 min10 ²
Figura 55	– Espectros de MS² da beauvericina D [M + NH4]+, m/z 787,4675, TR 20,09
	min102
Figura 56	6 – Proposta de mecanismo de fragmentação para a molécula da
	beauvericina D103
Figura 57	– Espectros de MS² da beauvericina J [M + NH4]+, m/z 817,4771, TR 18,43
	min105
Figura 58	B – Proposta de mecanismo de fragmentação para a molécula da
	beauvericina J106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estimativa global de espécies fúngicas21
Tabela 2 – Medicamentos e produtos farmacêuticos derivados de fungos23
Tabela 3 - Exemplos de fungos endofíticos de plantas hospedeiras que produzem
compostos semelhante as do hospedeiro24
Tabela 4 – Parâmetros utilizados no fracionamento em coluna de bancada40
Tabela 5 - Inibição do crescimento celular (%) das amostras SSR-1 a SSR-14 em
linhagem de carcinoma de colorretal humano (HCT116), com as
concentrações de 5 μg/mL e 50 μg/mL (média ± SEM; n=3)54
Tabela 6 – Resultados do ensaio de triagem pontual para a enzima calicreína (KLK1).
56
Tabela 7 - Resultados dos ensaios de triagem pontual para as enzimas
acetilcolinesterase de peixe elétrico (AChEee) e butirilcolinesterase
humana (BChEhu)60
Tabela 8 - Capacidade de redução do biofilme formado por S. epidermidis ATCC
3598462
Tabela 9 - Capacidade de redução do biofilme formado por S. aureus ATCC 809562
Tabela 10 – Valores de inibição bacteriana dos novos extratos69
Tabela 11 – Redução de biofilme de $S.\ epidermidis$ ATCC 35984 pelos compostos
SSR4 e SSR14 a 512 mg/L70
Tabela 12 – Redução de biofilme de $S.$ epidermidis ATCC 35984 pelas frações do
composto SSR4 a 512 mg/L72
Tabela 13 – Redução de biofilme de $S.$ epidermidis ATCC 35984 pelas frações do
composto SSR14 a 512 mg/L74
Tabela 14 – Substituintes identificados para as eniatinas78
Tabela 15 – Anotações do cluster da eniatina e seus análogos majoritários79
Tabela 16 – Substituintes identificados para as beauvericinas93
Tabela 17 – Anotações do cluster da beauvericina passível de anotação95
Tabela 18 – Nodos sem anotação conclusiva96

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Produtos naturais	16
1.2	Espécie Senna spectabilis (sin. Cassia spectabilis)	17
1.3	Fungos	20
1.4	Fungos endofíticos como fontes de	substâncias
	bioativas	23
1.5	Fusarium oxysporum	27
1.6	Metabolômica	31
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivo geral	33
2.2	Objetivos específicos	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Materiais utilizados	34
3.1.1	Meio de cultivo	34
3.1.2	Solventes	34
3.1.3	Análises cromatográficas	34
3.1.4	Equipamentos	35
3.1.5	Obtenção da cepa fúngica	35
3.1.6	Fracionamento dos extratos SSR4 e SSR14	41
3.1.7	Identificação dos fungos endofíticos	40
3.2	Ensaios biológicos	41
3.2.1	Ensaio antibacteriano	42
3.2.2	Ensaio citotóxico	43
3.2.3	Triagem pontual de inibidores para a enzima calicreína (KLK1)	43
3.2.4	Triagem pontual de inibidores para as enzimas acetilcolinestera	ase de peixe
	elétrico (AChEee) e butirilcolinesterase	humana
	(BChEhu)	44
3.2.5	Capacidade de erradicação do biofilme formado por sta	aphylococcus
	epidermidis	46
3.3	Molecular Networking	47
4	RESULTADOS e DISCUSSÕES	47

4.1	Tratamento dos dados cromatográficos dos extratos dos fur	ngos das	
	raízes de S. spectabilis	47	
4.1.1	Análise de agrupamento hierárquico (HCA em inglês)	49	
4.1.2	Análise de componente principal (PCA em inglês)	50	
4.2	Análises biológicas52		
4.2.1	Atividade antibacteriana	52	
4.2.2	Análise de citotoxicidade em células tumorais de	colorretal	
	humano	53	
4.2.3	Triagem pontual de inibidores para a enzima	calicreína	
	(KLK1)	55	
4.2.4	Triagem pontual de inibidores para as enzimas acetilcolinesterase	de peixe	
	elétrico (AChEee) e butirilcolinesterase	humana	
	(BChEhu)	57	
4.2.5	Capacidade de redução do biofilme	60	
4.3	Critérios para seleção dos fungos	63	
4.4	Identificação genética dos fungos selecionados	64	
4.5	Perfil cromatográfico e proposta de fracionamento dos extrat	os SSR4	
	e SSR14	65	
4.6	Reanálise em ensaios biológicos dos extratos SSR4 e SSR14.	68	
4.7	Molecular Networking	75	
4.7.1	Eniatinas	76	
4.7.2	Beauvericinas	92	
5	CONCLUSÃO	107	
Referê	encias	108	

1 INTRODUÇÃO

Os fungos endofíticos, estabelecem colonização nos tecidos internos de plantas hospedeiras, representam uma fonte rica e diversificada de metabólitos secundários, destacando-se por sua ampla gama estrutural. A investigação desses compostos bioativos não apenas impulsiona a descoberta de modelos farmacofóricos inovadores, mas também oferece potencial para o desenvolvimento de novos fármacos. Tais metabólitos exibem propriedades biológicas notáveis, incluindo atividade antimicrobiana, anticancerígena, anti-inflamatória e antiviral (GAO et al., 2018; BACON; 2016).

No contexto específico da espécie *Senna spectabilis (DC.) H.S.Irwin* & *Barneby,* cujas propriedades biológicas foram extensivamente relatadas com base nos metabólitos secundários presentes, investigou-se a capacidade dos fungos endofíticos em produzir esses compostos, sem a necessidade de coletas adicionais de material vegetal (VIEGAS et al., 2004; LORENZI, 2009; SILVA et al., 2009, 2010; MELO et al, 2014; SELEGATO et al., 2017).

O crescimento fúngico, iniciado a partir de uma pequena quantidade de material vegetal, não apenas simplifica o processo, mas também promove a sustentabilidade na pesquisa.

Assim, a identificação de substâncias provenientes de fungos endofíticos não só oferecem uma via sustentável para a descoberta de candidatos a fármacos, mas também justificam a contribuição científica e tecnológica neste domínio. Dessa forma trabalhos como o realizado por Pirozynski e Malloch (1975); Selosse e Le Tacon (1998); Bacon e White (2016) buscaram explorar e compreender as interações dos endófitos com a espécie hospedeira, fornecendo *insights* valiosos sobre a interação entre fungo e hospedeiro para o desenvolvimento contínuo no campo de produtos naturais e fungos endofíticos.

Além da relevância intrínseca para a química de produtos naturais, sua pesquisa adquire um significado adicional diante dos desafios globais enfrentados pela humanidade. Problemas como degradação ambiental, poluição de recursos hídricos, perda de biodiversidade e insuficiência alimentar são cada vez mais iminentes. O aumento da resistência a drogas por agentes infecciosos, complicações em transplantes de órgãos e o aumento nas infecções fúngicas exacerbam os desafios de saúde pública. Diante desse cenário, a busca por novas substâncias

bioativas torna-se imperativa, sustentando a relevância crítica deste trabalho (STROBEL; DAISY, 2003; GOSH, 2017).

Considerando os relatos sobre a diversidade metabólica e as atividades biológicas dos compostos produzidos por microrganismos endofíticos, o objetivo desta pesquisa foi desenvolver a constituição de uma biblioteca de fungos endofíticos presentes nas raízes de *Senna spectabilis*, proporcionando uma plataforma essencial para a exploração desses compostos e potencial desenvolvimento futuro.

1.1 Produtos naturais

Os produtos naturais podem ser definidos como uma variedade de compostos químicos, não incluídos no metabolismo primário, sendo em sua maioria produzidos por rotas do metabolismo secundário de plantas, bactérias, fungos e organismos marinhos, os quais constituem uma importante fonte contínua de substâncias com propriedades bioativas desejáveis, o que os tornam atraentes no projeto e desenvolvimento de medicamentos. Os produtos naturais têm, em geral, uma maior diversidade de grupos funcionais e uma maior complexidade estrutural do que as moléculas sintéticas (PYE et al., 2017; CHÁVEZ-HERNÁNDEZ, et al., 2020; GRIGALUNAS et al., 2022).

Durante a evolução, a natureza explorou o espaço químico biologicamente relevante para originar produtos naturais, além de inspirar diversos conceitos de design molecular. Esses compostos, gerados por meio de cascatas enzimáticas, desempenham funções biológicas específicas que conferem vantagens seletivas aos organismos produtores, tanto dentro de seus próprios domínios quanto nas interações com outros seres vivos. Sob a influência das demandas ambientais e pressões seletivas, uma variabilidade notável se manifesta na produção de diferentes metabólitos, cujas estruturas distintas modulam diversas respostas biológicas (HUIGENS et al. 2013; CUNHA et al. 2020; GRIGALUNAS et al. 2022).

A presença de produtos naturais tem desempenhado um papel significativo ao longo da história da humanidade, sendo amplamente empregado na medicina e no controle de pragas. A relação intrínseca entre a humanidade e a riqueza natural tem sido fonte constante de fascínio e aprendizado, impulsionando incessantemente a descoberta de novas utilidades para esses recursos. Desde a identificação de

compostos alucinógenos até a sua incorporação como fundamentos em medicinas tradicionais, a natureza continua a revelar segredos valiosos que enriquecem nossa compreensão sobre saúde e bem-estar. Essa interação contínua, permeada pela incessante curiosidade humana, não apenas inspira inovações, mas também aprofunda a apreciação pela intrincada relação entre a humanidade e os recursos naturais (BOLZANI; VIEGAS, 2006).

Os produtos naturais são metabólitos secundários derivados de plantas, animais, insetos e micro-organismos que abrangem diversas classes de sustâncias, tais como alcaloides, terpenos, esteroides, policetídeos, quinonas, lignanas, ésteres, lactonas, dentre outros (LI et al., 2018). São compostos de baixa massa molecular, com funções específicas, produzidos como uma forma de adaptação aos estresses biótico e abiótico (NISA et al., 2015).

Dado a essa diversidade de substâncias, essa área de pesquisa ganhou importância no âmbito científico ao longo dos anos, tendo como uma das finalidades o desenvolvimento de fármacos e outros produtos bioativos.

1.2 Espécie Senna spectabilis (sin. Cassia spectabilis)

A espécie *S. spectabilis* pertence à família *Fabaceae* que é subdividida em três subfamílias, *Mimosoideae*, *Fabaoideae* e *Caesalpinioidaea*, sendo os gêneros *Senna* e *Cassia* pertencentes a subfamília *Caesalpinioideae* (PIVATTO, 2005).

O gênero *Senna* compreende cerca de 600 espécies distribuídas ao redor do mundo, sendo empregadas na medicina popular. A *S. spectabilis* é uma planta arbórea muito utilizada como planta ornamental devido ao longo período de floração (dezembro-abril). É popularmente conhecida como cássia-do-nordeste, acássia, tula-de-besouro, canafístula-de-besouro, pau-de-ovelha, entre outras, possuindo a sinonímia botânica de *Cassia spectabilis* (VIEGAS et al., 2004).

Essa espécie possuí porte médio, podendo alcançar 8 m a 10 m de altura, apresenta caule com 30 cm a 40 cm de diâmetro; suas folhas são compostas por 8 a 12 pares de folíolos pontiagudos na extremidade.

Florescem em buquês de flores amarelas, localizadas nas pontas dos ramos, e seus frutos em favas, são muito empregadas no paisagismo, sendo às vezes destinadas à recomposição de áreas degradadas. Nativa das américas central e do

sul, no Brasil é encontrada principalmente nas regiões de cerrado e de floresta tropical (VIEGAS et al., 2004)

Figura 1 – Imagem das folhas, flores e da árvore de S. spectabilis.



Fonte: https://www.biodiversity4all.org/taxa/138578-Senna-spectabilis. Acessado em 02/09/2024.

Essa espécie apresenta um perfil químico amplamente diversificado, apresentando constituintes relacionados às classes dos flavonoides, taninos, saponinas, antraquinonas, xantinas, triterpenos e alcaloides. É empregada como fonte de produtos naturais, aplicada na medicina tradicional tanto no ocidente quanto no oriente (VIEGAS et al., 2004; LORENZI, 2009; MELO et al, 2014; SELEGATO et al., 2017)

Na terapêutica ocidental é muito utilizada como laxativo, antimicrobiano, antiinflamatório e antiulcerogênico, no Brasil é utilizada para tratamento de gripe e resfriado, enquanto que em países asiáticos é utilizado no tratamento de reumatismo, dores e lesões na pele, analgésico, anti-inflamatório e antiulcerogênico, laxantes, purgativos e antimicrobianos (VIEGAS Jr. et al., 2004; SILVA et al., 2009, 2010; LORENZI, 2009; MELO et al., 2014; SELEGATO et al., 2017).

Na África a *S. spectabilis* é tradicionalmente utilizada para tratar constipação, insônia, ansiedade, epilepsia, malária, disenteria e cefaléia (BUM et al., 2010). Na Ásia, particularmente na medicina ayurvédica e tailandesa, as folhas de *S. spectabilis* são comumente utilizadas para o tratamento de febre, dores de cabeça e diversas infecções de pele, como micose, eczema e sarna, agente antiasmático e diurético, ou para melhorar a atividade visual na Medicina Tradicional Chinesa. Apresenta utilização na inibição de edema e para o tratamento da constipação, envenenamento e infecções protozoárias do intestino (MAZUNDER e t al. 2008; SINGH et al., 2013).

Estudos da química do gênero *Senna* relatam a identificação de mais de 350 moléculas incluindo 40 metabólitos secundários da espécie *S. spectabilis*, como, por

exemplo, esteróis, alcaloides, triterpenos, pironas, antraquinonas, flavonoides, dentre eles, alcaloides piperidinicos, triterpenos pentacíclicos, citocalasinas, dibenzopironas e sesquiterpenos cadinanos foram atribuídos a microrganismos que coabitam essa espécie, como por exemplo o fungo endófito *Phomopsis cassiae*, proporcionando um novo ramo para exploração dessa espécie (PIVATTO et al., 2005; SILVA et al., 2005, 2006, ZANARDI et al., 2012; PEREIRA et al., 2016; SILVA et al. 2017; SELEGATO et al., 2017).

Um estudo fitoquímico *da S. spectabilis* demonstrou a presença dos alcalóides piperinídicos: (-)-espectalina (1), leptofilina A (8), 3-O-acetil-leptofilina A (9), leptofilina B (10), (-)-espectalinina (5), carnavalina (7) e 6-iso-carnavalina (6) nas folhas desta espécie, substâncias que apresentaram atividade citotóxica seletiva em cepas de *Saccharomyces cerevisiae* com deficiência no reparo do DNA, sendo indicativo de atividade antitumoral potencial (PIVATTO, 2005). Em outro estudo realizado por Viegas Junior et al. (2004), que estudaram as flores de *S. spectabilis*, foram isolados três novos alcalóides, (-)-3-O-acetil-espectalina (4), (-)-7-hidroxi-espectalina (3) e 6-iso-espectalina (2), além da (-)-espectalina (1) (Figura 2).

Figura 2 – Metabólitos secundários identificados de S. spectabilis.

Fonte: Adaptado de PIVATTO et al., 2005 e VIEGAS et al., 2004.

1.3 Fungos

Os fungos constituem o reino fungi, distinto dos reinos animal e vegetal, sendo classificados com base em diversas características, notadamente no método de absorção de nutrientes, estrutura celular e modo de reprodução. Estes organismos eucarióticos, com estrutura uni ou multicelular, desempenham um papel crucial nos ecossistemas, contribuindo significativamente para processos vitais como decomposição, reciclagem e transporte de nutrientes em variados ambientes. Não há um consenso com relação a quantidade de espécies fúngicas conhecidas, diversos estudos apresentaram estimativas de faixa de espécies conhecidas que varia de aproximadamente 0,1 a 9,9 milhões de espécies distintas, do período de 1943 a 2017, conforme Tabela 1. A estimativa mais aceita apresenta uma quantidade de 2,2 a 3,8 milhões de espécies de fungos (ZHOU; MAY, 2023).

Os fungos representam o segundo maior grupo de seres vivos, ficando atrás apenas dos artrópodes. Essa vasta diversidade fúngica, ainda inexplorada, sugere um potencial para descobertas futuras, especialmente no contexto da interação entre fungos endofíticos e plantas como a *S. spectabilis* (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010; PADHI et al., 2013; 2014; BIASETTO, 2016).

Tabela 1 – Estimativa global de espécies fúngicas.			
Espécies estimadas (milhões)	Literatura		
0,1	BISBY; AINSWORTH 1943		
0,25	MARTIN, 1951		
2,7	PASCOE, 1990		
1,5	HAWKSWORTH, 1991		
1	HAMMOND, 1992		
1	SMITH; WALLER, 1992		
1,5	HYWEL-JONES, 1993		
1	ROSSMAN, 1994		
1,3	DREYFUSS; CHAPELA, 1994		
1,5	HAMMOND, 1995		
0,27	SHIVAS; HYDE, 1997		
0,04 - 0,07	APTROOT, 2001		
9,9	CANNON, 1997		
0,2	GUZMAN, 1998		
>1,5	FRÖHLICH; HYDE, 1999		
0,5	MAY, 2000		
>1,5	ARNOLD et al., 2000		
2,3	HAWKSWORTH, 2001		
0,06	_ DE MEEÛS; RENAUD, 2002		
0,025			
3,5 - 5,1	O'BRIEN et al., 2005		
0,17 CROUS et al., 2006			
0,72 SCHMIT; MUELLER, 2007			
0,18	DAI; ZHUANG, 2010		
5,1	BLACKWELL, 2011		
0,61	MODA ET AL 2011		
0,005	MORA ET AL., 2011		
1,5 - 3	HAWKSWORTH, 2012		
2,2 - 3,8	HAWKSWORTH; LUECKING, 2017		

Fonte: adaptado de WU et al. 2019.

Os fungos têm sido explorados pelo seu valor medicinal há mais de milhares de anos. Sua notável capacidade de produzir metabólitos secundários torna-os uma fonte importante de inovação química, conduzindo ao desenvolvimento de diversos produtos farmacêuticos que desempenharam um papel fundamental no progresso da civilização humana ao longo do tempo. O principal exemplo foi a descoberta da penicilina produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, antibiótico que revolucionou o século XX, sendo um marco na pesquisa de fungos, este foi o primeiro antibiótico β -lactâmico explorado por suas propriedades medicinais (ZHANG et al. 2006).

Baseado na estrutura desse importante metabólito, a indústria farmacêutica empreendeu o desenvolvimento de novos antibióticos, incluindo a ampicilina, amoxicilina e meticilina, expandindo significativamente o arsenal terapêutico e promovendo avanços notáveis na prática médica. Essa trajetória histórica ilustra a contribuição inestimável dos fungos para a medicina e destaca seu potencial contínuo como fonte de compostos bioativos essenciais (TAKAHASHI et al., 2017).

Os fungos desempenham uma função destacada em uma diversidade de aplicações, abrangendo desde a síntese de ácidos orgânicos, exemplificado pelo ácido cítrico, até a produção de antibióticos de relevância médica. Sua contribuição se estende à produção de enzimas de grande interesse industrial, desempenhando um papel crucial em processos biotecnológicos como por exemplo no controle de microrganismos patógenos (AZEVEDO et al., 2000).

Os fungos podem ser categorizados com base na natureza de sua associação com as espécies vegetais. Essas classificações incluem os epifíticos, que habitam a superfície do material vegetal; os fitopatógenos, responsáveis por causar doenças nas plantas; os micorrízicos, ocupam as raízes; e, por fim, os endofíticos, que colonizam o interior dos tecidos vegetais (CHAPLA et al., 2013).

Além disso, sua participação é evidente na produção de etanol e na fermentação de bebidas como cerveja e vinho, onde fungos conferem características distintivas aos produtos finais. A presença fundamental dos fungos também é ressaltada na fabricação de queijos, destacando a versatilidade e importância desses organismos em uma ampla gama de aplicações (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

A seguir, na Tabela 2, são apresentados alguns exemplos de medicamentos e produtos farmacêuticos derivados de fungos.

Tabela 2 – Medicamentos e produtos farmacêuticos derivados de fungos.

Categoria	Fungos	Produtos derivados
	Penicillium. rubens, Penicillium.	
	chrysogenum e Penicillium.	Penicilinas
	griseofulvum	
Antibacterianos	Acremonium spp.	Cefalosporinas
_	Ramularia coccinea	Ácido fusídico
	Clitanilus ann Pasidiasyasta	Peurimutilina
	Clitopilus spp., Basidiocycota	(Lefamulina)
	Leotiomycetes e Eurotiomycetes	Equinocandinas
Antifúngioss	Harmanamaan	Enfumafungina
Antifúngicos	Hormonema sp.	(Brexafemme®)
-	Penicillium spp.	Griseofulvina

Fonte: Adaptado de NIEGO, et al., 2023.

1.4 Fungos endofíticos como fontes de substâncias bioativas

Os endófitos representam um grupo polifilético de microrganismos diversos que podem residir de maneira assintomática durante todo ou parte de seu ciclo de vida nos tecidos vegetais, incluindo caules, folhas e raízes (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012). No microecossistema vegetal, são componentes naturais que afetam positivamente as atividades fisiológicas da planta hospedeira de várias maneiras, podendo incluir a produção de hormônios como o ácido indolacético; na aquisição e biossíntese de nutrientes para o crescimento e desenvolvimento da planta; secreção de metabólitos adaptadores de estresse para proteger a planta hospedeira da invasão de herbívoros; patógenos; e a melhoria da adaptabilidade do hospedeiro a estressores abióticos e em troca, recebem proteção e nutrientes (ODELADE; BABALOLA, 2019; IGIEHON; BABALOLA; CHESETO; TORTO, 2021). Esses microrganismos estão amplamente distribuídos em todos os ecossistemas terrestres e são encontrados em praticamente todas as plantas vasculares, algas marinhas, briófitas e pteridófitas, destacando a ubiquidade e a relevância desses microrganismos em diferentes contextos (CHAPLA et al., 2013).

Nas últimas décadas, os fungos endófitos vêm se destacando na produção de metabólitos bioativos, o que promoveu um maior fomento com relação a estudos

desses microrganismos. O primeiro relato de estudo com fungos endofíticos ocorreu há mais de 100 anos, quando Vogl et al., em 1898, isolou uma cepa endofítica de sementes de azevém (*Lolium temulentum L.*) (WU et al. 2019). Um dos motivos que justificam a utilização desses fungos como fonte de produção de substâncias é sua capacidade de diversificar sua produção metabólica a partir de modificações no meio em que está inserido, através de modificadores epigenéticos, o que pode levar a uma maior variação ou um aumento na produção de compostos específicos, possibilitando sua aplicação na medicina, agricultura e na indústria (SCHULZ; BOYLE, 2005; VERMA et al., 2009; BACON; WITHE, VIEGAS, 2016). Uma vasta quantidade de metabólitos secundários tem sido extraída, isolada e caracterizada a partir de fungos endofíticos, muitos dos quais são bioativos, incluindo alcaloides, esteroides, terpenóides, peptídeos, policetonas, flavonoides, quinóis e fenóis, ocorrendo também a presença de compostos clorados. (TAN; ZOU, 2001; GUNATILAKA, 2006; GUO et. al., 2008; VERMA et al., 2009).

Diversos estudos indicam que os fungos endofíticos podem biossintetizar as mesmas substâncias que as espécies hospedeiras (Tabela 3), como por exemplo, a vinblastina e vincristina, drogas usadas no tratamento de câncer, isoladas de *Catharanthus roseus*, alcaloides que também são produzidos pelo fungo endofítico *Fusarium oxysporum* identificado na mesma espécie vegetal (KUMAR et al., 2013).

Tabela 3 – Exemplos de fungos endofíticos de plantas que produzem compostos semelhante as do hospedeiro.

Fungo endofítico	Planta	Composto
Aspergillus calidoustus	Acanthospermum australe	6-epi-ophiobolin
Phomopsis sp.	Garcinia kola	Citocalacina H
Fusarium solani	Cassia alata	Naftaquinonas
Mycosphaerella sp.	Myeciaria floribunda	Miriocina
Phyllosticta elongata	Cipadessa baccifera	Camptotecina
Fusarium verticillioides	Huperzia serrata	Huperzina A
Laphiostoma sp.	Eucalyptus exserta	Escorpinona

Fonte: Adaptado de WEN, JU et al. 2022.

Outros exemplos muito conhecidos de metabólitos secundários produzidos por endófitos e seus hospedeiros são o taxol, o subglutinol A e B, o peptídeo leucinostatina, podofilotoxina e camptotecina (Figura 3). Destes, o taxol, droga anticâncer, obtido da casca de *Taxus brevifolia*, é produzido por endófitos oriundos da planta do gênero *Taxus* e de outros gêneros. A habilidade de produzir taxol e seus análogos já foi relatada em 48 microrganismos de 18 gêneros de fungos endofíticos diferentes. Devido à disponibilidade limitada dessas substâncias nas plantas, no caso do taxol encontrado na casca do teixo na ordem de 0,01 a 0,03%, tem levado algumas espécies vegetais a extinção na busca desenfreada por substâncias úteis para o tratamento de vários tipos de câncer (CHAGAS et al., 2018; UZMA et al., 2018).

Figura 3 – Substâncias bioativas isoladas de fungos endofíticos.

Fonte: Adaptado de GUO ET AL., 2008; BIASETTO, 2016; GAO ET AL., 2018; STROBEL, 2018.

1.5 Fusarium oxysporum

Os fungos pertencentes ao gênero *Fusarium*, pertencem ao filo *Ascomycota* e família *Nectriaceae*, apresentam uma ampla distribuição em diversos nichos ecológicos, sendo identificados no ar, em plantas, substratos orgânicos e, sobretudo, em solos (LI et al., 2020). Apesar de serem reconhecidos como patógenos facultativos para plantas, animais e seres humanos, esses fungos desempenham um papel fundamental na promoção da saúde de seus hospedeiros por meio de relações simbióticas, atuando como fungos endofíticos e proporcionando resistência a estresses bióticos e abióticos (WEI; WU, 2020).

Estudos do metaboloma de diferentes espécies de *Fusarium* revelaram a produção de uma variedade de metabólitos secundários, incluindo alcaloides, terpenoides, quinonas, pironas, entre outros, com potencial significativo para aplicações farmacêuticas e agrícolas. Fármacos notáveis, como a vimblastina, camptotecina, análogos do podofilotoxina e quinina, vincristina, utilizados no tratamento de câncer, viroses e malária, respectivamente, foram isolados de fermentações *in vitro* de diferentes espécies do gênero. Além disso, metabólitos secundários exclusivos desse gênero, como a fusarubina, javanicina e fusarielina, mostram-se promissores como agentes antimicrobianos (Figura 4) (TOGHUEO, 2020).

Figura 4 – Compostos isolados de fungos do gênero *Fusarium*.

Fonte: Adaptado de TOGHUEO, 2020.

O gênero *Fusarium* também ganha destaque pela produção de micotoxinas (Figura 5), substâncias consideradas tóxicas e, segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde), representam uma séria ameaça à saúde humana e animal. Esse fitopatógeno, em sua maioria, ataca plantações de grãos, tomates e bananas, contaminando alimentos e acarretando prejuízos bilionários para a agricultura. Entre as micotoxinas produzidas por este gênero, destacam-se os tricotecenos – deoxinilvalenol e a toxina T-2 – a zearalenona, o ácido fusárico e a fuminosina B1. Micotoxinas consideradas emergentes também foram isoladas de espécies desse gênero, como a fusaproliferina, beauvericina e eniatinas, apesar de sua citotoxicidade, essas micotoxicas apresentam diversos efeitos benéficos (MUNKVOLD, 2017).

Figura 5 – Algumas micotoxinas provenientes do Fusarium oxysporum.

Figura 5 – Continuação.

Fonte: Adaptado de MUNKVOLD, 2017.

Tendo em vista que o processo de isolamento de substâncias bioativas de origem vegetal enfrenta problemas como quantidades disponíveis extremamente baixas, desmatamento que afetam as plantas medicinais, dificuldades de reisolar metabólitos secundários devido às mudanças nas condições ambientais e geográficas, o estudo dos fungos endofíticos que podem produzir as mesmas substâncias que seu hospedeiro, se torna um tema muito relevante (CHAPLA et al., 2013; LI et al., 2018).

Assim a habilidade dos fungos endofíticos de produzirem as mesmas substâncias que as espécies vegetais podem contribuir para a preservação da biodiversidade através da redução da coleta de plantas raras ou de crescimento lento, considerando que muitas espécies hospedeiras encontram-se em extinção. Quando uma espécie vegetal é extinta tem como consequência uma enorme perda da diversidade endofítica, visto que existem fungos que não foram descritos e seus metabólitos ainda não serão identificados (SPENCIAN et al., 2014; NISA et al., 2015). É importante ressaltar que a pesquisa com fungos endofíticos desempenha um papel significativo na conservação ambiental, uma vez que a obtenção desses microrganismos, considerados recursos renováveis, requer apenas uma única e pequena coleta de material vegetal.

O nosso grupo de pesquisa Nubbe (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia Vegetal) do Instituto de Química da UNESP de Araraquara-SP, realizou diversos trabalhos com foco em compostos oriundos de fungos isolados de diversas partes de espécie vegetal como Afif Felix Monteiro (2017), que utilizou as folhas da *S. spectabilis* para obtenção de fungos endofíticos, Natália Carolina Vieira (2020), que utilizou fungos presentes da rizosfera de *S. spectabilis*. Outro trabalho do nosso grupo de pesquisa que utilizou fungos endofíticos isolados das raízes de *S. spectabilis* foi o da Mayara Maio Luiz (2021), que, utilizando fungos da espécie *F. oxysporum*, apresentou dados acerca da composição química de extrato provenientes de meios de cultivos distintos, avaliando a diferença que cada um pode promover na produção metabólica.

1.6 Metabolômica

Para que todas as informações dos metabólitos secundários sejam obtidas para a sua aplicação em bioensaios, é necessário trilhar um caminho que por muitas vezes é longo e tedioso, através de abordagens reducionistas (MAGUIRE, 2014). Uma alternativa é através de uma abordagem holística, que defende a importância da compreensão integrada dos fenômenos e não apenas analisar seus constituintes de forma isolada. Dessa maneira, através da combinação de bioensaios e análises metabolômicas, é possível trabalhar com um organismo inteiro, investigando todas as relações entre os constituintes de matrizes complexas. Essa abordagem compreende a identificação do maior número possível de metabólitos secundários presentes em um sistema biológico (YULIANA et al., 2013; MAGUIRE, 2014).

Metabolômica, é o estudo teórico de compostos com baixa massa molecular, abaixo de 5000 Da (IUPAC) em um sistema, que se tornou uma ciência muito importante em muitas áreas de pesquisa. As análises metabolômicas são comumente categorizadas como direcionadas ou não direcionadas (RAMAUTAR; DEMIRCI; JONG, 2006).

Essas análises são cruciais para avaliar o comportamento de compostos específicos na amostra sob condições determinadas. A metabolômica direcionada geralmente demanda um nível mais elevado de purificação e extração seletiva de metabólitos (MONTON; SOGA, 2007; CEVALLOS-CEVALLOS et. al. 2009). Por outro lado, a metabolômica não direcionada, também conhecida como abrangente, visa a

detecção de tantos grupos de metabólitos quanto possível, buscando padrões ou impressões digitais sem necessariamente identificar ou quantificar compostos específicos. Esse enfoque é particularmente útil para fenômenos complexos, como doenças em plantas.

A classificação dos estudos metabolômicos como discriminativos, informativos e/ou preditivos depende do objetivo específico da análise e da manipulação dos dados. Dado a quantidade de informações que são obtidas, é necessário desenvolver uma plataforma analítica que comporte e facilite o tratamento desses dados e, assim, a aplicação de ferramentas quimiométricas (conhecimentos de matemática e estatística para identificação de informações relevantes de um problema em estudo) (PEREIRA FILHO, 2015), visando a extração de informações importantes a partir do conjunto de dados gerados (ZAO, 2013).

Devido a quantidade de informação obtida através da metabolômica, um estudo racional de fungos endofíticos deve envolver uma abordagem sistemática e bem fundamentada para explorar o potencial biotecnológico desses microrganismos. Esse tipo de estudo não se limita à simples coleta e identificação dos fungos, mas busca maximizar a compreensão de suas características, funções e capacidades metabólicas. Essa abordagem poderia incluir os seguintes aspectos: isolamento ou identificação precisa; seleção baseada em critérios bioativos; análise metabolômica; avaliação ecológica e funcional; otimização da produção de metabólitos e potencial aplicação e sustentabilidade. Portanto, um estudo racional foca na extração do máximo de informações relevantes e práticas sobre os fungos, orientando a pesquisa de maneira eficiente, tanto para avanços científicos quanto para aplicações industriais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar a exploração racional das raízes de Senna spectabilis e, isolamento de uma biblioteca de fungos endofíticos visando a investigação lógica de sua biodiversidade, fazendo uso da metabolômica, quimiometria e técnicas espectroscópicas do estado da arte.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar o isolamento dos fungos endofíticos viáveis;
- Iniciar estudo de cultivo dos microrganismos;
- Estudar os metabólitos secundários presentes nas raízes de Senna spectabilis;
- Realizar bioensaios para as moléculas majoritárias;
- Realizar a elucidação estrutural das moléculas majoritárias provenientes dos microrganismos associados identificados nas raízes de Senna spectabilis.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais utilizados

3.1.1 Meio de cultivo

Os meios de cultivo foram preparados de acordo com as especificações em seus rótulos. A composição em g/L dos meios utilizados neste trabalho foram:

- Potato Dextrose Agar. extrato de batata (4,0), equivalente a 200 g de infusão de batata, dextrose (20,0) e ágar (15,0).
- Extrato de malte, da marca Neogen (7314A), lote 111905C, 8,4 g de meio para 200 mL de água ultrapura.

3.1.2 Solventes

Os solventes não deuterados empregados no preparo dos extratos, nos processos cromatográficos e nas etapas de partição das frações foram das marcas LiChrosolv ® e M. Tedia® em grau HPLC. A água ultrapura utilizada foi destilada e deionizada em aparelho da marca Milli-Q (resistividade mínima 18,2 MΩ.cm à 25°C).

3.1.3 Análises cromatográficas

As amostras analisadas por HPLC-DAD foram previamente submetidas a extrações em fase sólida com cartuchos de fase reversa Macherey-Nagel C18ec (3,0 mL; 500 mg, Chromabond®) e posteriormente foram centrifugadas.

Para as análises de HPLC-DAD utilizou-se uma coluna Phenomenex Luna C18 (100,0 mm x 4,6 mm, 5 μ m) com pré-coluna C18 (2,0 mm x 7,8 mm). E para as análises em UPLC-QTOF utilizou-se uma coluna de fase reversa C18 Acquity UPLC® HSS T3 Column (100,0 mm x 2,1 mm; 1,8 μ m).

Todos os processos estatísticos realizados com os dados de HPLC-DAD foram efetuados pelo *software* Matlab®, pela Dr^a Denise Selegato.

3.1.4 Equipamentos

Todas as análises realizadas nos equipamentos listados neste item, estão nas dependencias do NuBBE (Núcleo de bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais), localizado dentro do Instituto de Química de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP e no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto.

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Evaporador de amostra fluxo de nitrogênio e aquecimento;
- Balança analítica ExplorerTM Ohaus®; Autoclave vertical Phoenix Luferco; Minicentrífuga MiniSpin® Eppendorf; Evaporador rotativo Büchi® R-114 com banho de aquecimento B-480 e bomba de vácuo Büchi® V-300 e refrigeradores; Evaporador rotativo da marca Heidolph Laborata 4000 com Banho de aquecimento da marca Heidolph HB digital e bomba de vácuo Büchi® V-300 e refrigeradores; Sistema HPLC-DAD da Shimadzu® contendo os módulos de bomba LC-20AT, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, forno de coluna CTO-20A, injetor automático SIL-20A e módulo de comunicação CBM-20A.
- A aquisição dos dados de LC-MS foram feitas utilizando um HPLC da marca Shimadzu, utilizando bombas de alta pressão (LC-20AD), com degaseificador (DGU-20A3), injetor automático (SIL-20A HT), detector de arranjo de diodos (*PDA*) SPD-M20A, com módulo de comunicação CBM-20A. Esse cromatógrafo foi acoplado ao espectrômetro de massas operando em alta resolução da marca Bruker Daltonics microTOF II-IES-TOF.

3.1.5 Obtenção da cepa fúngica

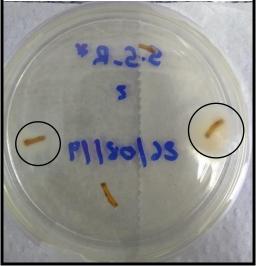
Os fungos endofíticos foram isolados das raízes saudáveis e sem nenhum machucado aparente de *S. spectabilis*, procedimento da coleta das raízes foi realizado na casa de vegetação do Instituto de Química – UNESP – Araraquara – SP em 07/2019. A identificação botânica da espécie de Senna spectabilis foi realizada pela Dra. M. C. M. Young e uma exsicata (SILVA-193) está depositada no Herbário do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, Brasil. Ainda, os

microrganismos estudados neste trabalho foram cadastrados no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado), sob o registro de número A079ACA desde o dia 04 de novembro de 2018.

Inicialmente foram preparadas placas de PDA (batata dextrose ágar) com antibiótico sulfato de gentamicina na concentração de 66,7 µg/mL. Os demais materiais como béqueres, Erlenmeyers e bisturi foram previamente autoclavados afim de evitar contaminações. Posteriormente a parte de interesse da planta foi selada com o auxílio de uma vela para não permitir a entrada de outros microrganismos.

O procedimento de assepsia do material vegetal em capela de fluxo laminar, foi adaptada de Gotz et al. (2005), onde determinou-se duas condições, sendo a primeira, a partir de solução de hipoclorito de sódio 2% (1) com imersão do fragmento de raiz por um período de 5 min, uma solução de álcool 70% (2) com imersão de 3 min, e também duas águas de lavagem (4 e 5) imersão de 5 min em cada uma. A segunda é constituída por solução de hipoclorito de sódio 1% (8 min), de álcool 70% (2 min), e também duas águas de lavagem (5 min em cada). Utilizando uma espátula e um bisturi com lâmina estéril, foram feitos cortes nas raízes selecionadas resultando em fragmentos com aproximadamente 5,0 mm, os quais foram colocados em placas de Petri para crescimento dos fungos endofíticos. A segunda água de lavagem também foi inoculada em uma placa de petri como controle.

Após 4 dias de inoculação (Figura 6) observou-se crescimento fúngico a partir das raízes.



Sel03114

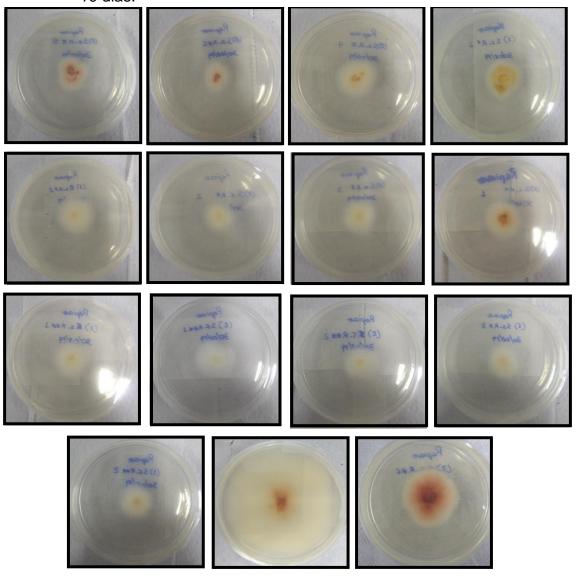
Figura 6 – Representação do crescimento dos endófitos em placa de petri.

Fonte: Do autor.

Com desenvolvimento dos fungos, foi realizado o repique dos fungos aparentes, com a finalidade de obtenção de cepas puras. Sendo realizado com base nos focos de fungos próximos aos fragmentos de raízes, nesse momento não há como identificar, visualmente, possíveis cepas diferentes. Cada foco foi colocado individualmente em placas de Petri para identificação visual de possíveis cepas distintas crescendo concomitantemente.

Após 10 dias de inoculação, período que ocorreu a tomada completa da placa, foi realizado um segundo repique. Conforme Figura 7, verificou-se o crescimento de diversas cepas, resultando em 14 placas, e seu crescimento foi acompanhado por 10 dias.

Figura 7 - Representação do crescimento fúngico nas placas de petri durante 10 dias.



Fonte: Do autor.

Com a ocupação completa da placa pelo fungo, foram produzidos os *slants*, onde alíquotas da parte mais jovem dos fungos (hifas) em PDA foram armazenadas em frascos de penicilina contendo água ultrapura para composição da biblioteca de fungos. O próximo passo foi o crescimento dos fungos isolados em meio líquido, utilizando extrato de malte como meio de cultivo, com a finalidade de obtenção do perfil cromatográfico para os extratos.

Assim, foram utilizados Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de meio de malte (Figura 8). Como o foco até esse momento era obtenção de extrato, o meio de malte foi utilizado por se tratar do meio mais rico em nutrientes, favorecendo o crescimento das linhagens fúngicas. Para cada fungo foram utilizados 5 Erlenmeyers, totalizando 70 Erlenmeyers, perfazendo um total de 14 litros de meio.

Figura 8 - Início do crescimento fúngico em meio líquido: a) dia 1; b) dia 28.

b





Fonte: Do autor.

a

Para esse processo, cada placa de petri contendo o fungo foi dividida em 3 partes iguais, e cada parte foi colocada em um Erlenmeyer, conforme Figura 8a. Essa etapa foi repetida para todos os fungos. O crescimento dos fungos no meio de malte teve duração de 28 dias, seguindo os protocolos estabelecidos pelo grupo de pesquisa do Nubbe, quando a massa micelar tomou toda a superfície do meio de cultivo, conforme Figura 8b.

Ao final desse período, foi separado o meio de malte e o micélio descartado, após aplicação de água sanitária e incidência de luz UV para que extinguisse o crescimento micelar. O volume de meio de cultivo para cada fungo foi equivalente a 1,0 L, onde foi realizado a partição líquido-líquido utilizando acetato de etila como

solvente orgânico extrator. A proporção utilizada foi de 2:1 (meio:solvente, v/v). O procedimento de extração foi realizado 3 vezes para cada extrato, conforme Figura 9.

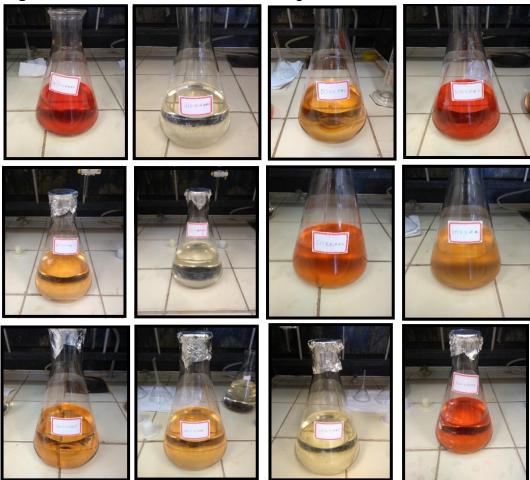
Figura 9 – Procedimento de partição líquido-líquido acetato de etila/água.





Fonte: Do autor.

Figura 10 – Extratos obtidos de cada fungo.



Fonte: Do autor.

Em seguida, todos os extratos foram concentrados, utilizando um rotaevaporador e secas a partir de um secador de amostra com fluxo de nitrogênio e aquecimento de 30°C, obtendo então os extratos brutos.

3.1.6 Fracionamento dos extratos *S. spectabilis* raízes 4 (SSR4) e *S. spectabilis* raízes 14 (SSR14)

Após selecionar os extratos de interesse através de resultados relevantes de bioensaios descritos posteriormente neste documento, obteve-se mais extrato para ambos os fungos, para subsequente fracionamento utilizando coluna de bancada contendo 15 cm de altura de C-18 como fase estacionária, com diâmetro de 5 cm e como fase móvel, foi utilizado uma solução de metanol/água, baseando-se nos perfis cromatográficos de ambos os extratos. Diante disso foi proposto um fracionamento e determinado a porcentagem de solvente orgânico para cada região de interesse (Tabela 4).

Ambos os espectros cromatográficos foram divididos em 6 frações variando a força de eluição baseada na porcentagem de solvente orgânico utilizado.

Tabela 4 – Parâmetros utilizados no fracionamento em coluna de bancada

SS	SR4	SS	R14
Frações	% metanol	Frações	% metanol
1	25	1	22
2	43	2	37
3	53	3	53
4	60	4	60
5	79	5	72
6	95	6	94

Figura 11 - Fracionamento em coluna de bancada (C18) e frações.

Fonte: Do autor

3.1.7 Identificação dos fungos endofíticos

As linhagens SSR4 e SSR14 foram selecionadas para estudo neste trabalho levando em consideração os dados obtidos através das análises de componentes principais (ACP), análises de agrupamento hierárquico e pelos resultados observados nos ensaios biológicos.

Ambas as linhagens fúngicas foram identificadas pelo método de sequenciamento da região do espaçador transcrito interno (ITS) utilizando os *primers* ITS1 e NL4. Os *amplicons* foram purificados e sequenciados pelo método Sanger, pelo Prof. Dr. Marcos Antônio Soares do Departamento de Botânica e Ecologia do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT).

3.2 Ensaios biológicos

Foram utilizados ensaios biológicos como experimento de triagem dos extratos. São procedimentos destinados a avaliar a potência de princípios ativos contidos nas matérias-primas e preparações farmacopeicas, utilizando reagentes biológicos tais como microrganismos, animais, fluídos e órgãos isolados de animais.

3.2.1 Ensaio antibacteriano

Foi realizado o ensaio de atividade antibacteriana contra as espécies Acinetobacter baumannii, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus e Staphylococcus epidermidis.

O ensaio foi realizado pela aluna: Danae Kala Rodriguez Bardají do Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular (LEMiMo) da Prof^a. Dr^a. Ilana L. B. C. Camargo.

Cada extrato foi diluído em DMSO para a preparação de uma solução estoque 100x concentrada. Posteriormente, a solução estoque foi diluída 1:100 em caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado (MHCA). A partir disso, cada composto foi testado a 512 μg/mL a 1% DMSO, ou na maior concentração em que foi possível dissolver o composto sem que houvesse precipitação, de acordo com o preconizado pelo CLSI (2017). A adição do inóculo foi realizada de acordo com CLSI (2015) para o método de microdiluição em caldo. Para os controles negativo e positivo, foram adicionados caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado 1% DMSO. No controle negativo, havia apenas o meio de cultura caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado 1% DMSO, sem bactéria, para mostrar que não houve contaminação do mesmo. No controle positivo foi adicionado bactéria sem o composto para se observar o crescimento da mesma em caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado 1% DMSO.

A incubação foi realizada a 37°C e a leitura visual dos resultados foi feita após 24h. Quando não houve crescimento bacteriano, a triagem foi considerada positiva, o que indica que houve atividade antibacteriana na concentração testada. Neste caso, a concentração inibitória mínima pode ser 512 μg/mL ou menos (≤ 512 μg/mL). Quando houve crescimento bacteriano, a triagem foi considerada negativa o que indica que não há atividade antibacteriana na concentração testada. A triagem negativa não exclui a possibilidade deste composto apresentar atividade antibacteriana em concentrações maiores, por isso, o resultado é expresso como "> 512 μg/mL". Os testes foram realizados em duplicata.

3.2.2 Ensaio citotóxico

O ensaio foi realizado pela aluna: Simone A. Teixeira do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais Marinhos da Prof^a. Dr^a. Letícia Lotufo.

Foram plaqueadas 6 x 10³ células por poço, em placas de 96 poços (3 x 10⁴ células/mL em 200 μL de meio). Após 24 horas, as substâncias foram adicionadas em concentrações de 5 μg/mL e 50 μg/mL, cada concentração em duplicata, e incubadas por 72 horas. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo e dimetilsulfóxido (DMSO) como controle negativo.

Após 72 horas de incubação, o sobrenadante foi substituído por meio de cultura contendo MTT (0,5 mg/mL). Três horas mais tarde, o sobrenadante foi removido, e após secagem da placa, o precipitado contendo azul de formazan de MTT foi dissolvido em 150 μL de DMSO, e a absorbância foi medida a 570 nm (Mosmann, 1983). Os valores de concentração inibitória média (IC₅₀) considerando intervalos de confiança de 95% foram calculados por regressão não linear usando GraphPad Prism 5.

3.2.3 Triagem pontual de inibidores para a enzima calicreína (KLK1)

O ensaio foi realizado pela aluna: Me. Daniella Romano de Carvalho no Grupo de cromatografia de bioafinidade e produtos naturais da Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso.

Os compostos foram solubilizados em metanol e foram preparadas soluções estoque de 5 mg/mL para cada composto. A triagem pontual dos compostos foi realizada à concentração fixa de 50 µg/mL.

Os compostos foram submetidos ao ensaio de inibição para a enzima calicreína KLK1 (pâncreas do porco) covalentemente imobilizada em suporte de NHS-Sepharose.

O ensaio de inibição foi realizado em microplacas pretas de 96 poços, empregando o substrato fluorogênico N-Cbz-Phe-Arg-7-amido-4-metil-cumarina H⁺. A atividade enzimática foi monitorada utilizando um leitor de microplacas com detecção por fluorescência (SpectraMax® i3x; Molecular Devices, USA). As análises foram realizadas com comprimento de onda de excitação e emissão de 380 nm e 440 nm, respectivamente, a 37 °C por 30 minutos.

As reações enzimáticas foram realizadas em tampão TRIS-HCl 50 mmol L-1, pH 8,0, na presença de substrato 20,0 μmol/L, em um volume final de 200 μL. Os compostos foram avaliados em concentração final de 50,0 μg/mL. O peptídeo Leupeptina (N-acetil-L-leucil-L-leucil-L-argininal), em concentração final de 50,0 μmol/L, foi utilizado como inibidor padrão. As análises foram realizadas em triplicata.

Em todas as reações foram incluídos controles utilizando NHS-Sepharose (sem enzima) nas mesmas condições de análise do ensaio acima citado.

Os percentuais de inibição foram obtidos de acordo com a equação:

% Inibição =
$$100 - \left[\frac{A_I}{A_0} \times 100\right]$$

Onde:

A_I = atividade enzimática na presença do inibidor;

A₀ = atividade enzimática na ausência do inibidor.

3.2.4 Triagem pontual de inibidores para as enzimas acetilcolinesterase de peixe elétrico (AChEee) e butirilcolinesterase humana (BChEhu)

O ensaio foi realizado pela aluna: Me. Daniella Romano de Carvalho no Grupo de cromatografia de bioafinidade e produtos naturais da Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso.

Soluções estoques de cada amostra foram preparadas solubilizando o conteúdo de cada *Eppendorf* em 1,0 mL de metanol. A solubilização de cada solução estoque foi auxiliada por maceração em banho de ultrassom por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, cada solução foi centrifugada por 5 min a 10.000 rpm. Soluções de trabalho (2,0 mg/mL) foram posteriormente preparadas em metanol.

As amostras foram submetidas ao ensaio de inibição para as enzimas acetilcolinesterase de peixe elétrico (AChEee) e butirilcolinesterase humana (BChEhu).

Para este ensaio foram utilizadas as enzimas AChE_{ee} (peixe elétrico) e BChE_{hu} (soro humano) imobilizadas covalentemente em capilar de sílica fundida (30,0 cm x 0,375 mm x 100,0 µm d.i.) sendo nominadas ICER (*Immobilized Capillary Enzyme Reactor*) ICER-AChE_{ee} e ICER-BChE_{hu}, respectivamente.

Os ICER-AChE_{ee} e ICER-BChE_{hu} foram utilizados como biorreatores enzimáticos acoplados individualmente entre um instrumento de cromatografia líquida de alta performance (CLAE) e um espectrômetro de massas (EM) formando um sistema *on*-

flow para a realização de ensaios de *screening* de inibidores enzimáticos. Neste sistema a reação enzimática é monitorada pela quantificação direta do produto de hidrólise enzimática *m/z* 104, utilizando a galantamina como inibidor padrão.

A triagem de inibição pontual foi conduzida da seguinte forma:

- Fase móvel: solução de acetato de amônio 15,0 mm, ph 8,0;
- Vazão de 0,05 ml/min;
- Volume de injeção: 10 μl da solução contendo 70,0 μm de acetilcolina (ach) e
 200 μg/ml do composto candidato a inibidor;
- Inibidor padrão utilizado: galantamina (100,0 μm).

A partir de cada solução estoque de cada um dos extratos (2,0 mg/mL) foram aliquotados 10 μ L (concentração final de 200 μ g/mL) e adicionados 20 μ L da solução estoque de ACh 350,0 μ M (concentração final de 70,0 μ M) e 70 μ L da solução de acetato de amônio 15,0 mM, pH 8,0. O volume final do meio reacional foi de 100 μ L. As soluções foram preparadas em triplicatas e alíquotas de 10 μ L foram injetadas no sistema CLAE-EM contendo separadamente os ICER-AChE_{ee} e ICER-BChE_{hu}.

Entre a análise de cada amostra foi realizado um controle positivo, que consiste na avaliação da atividade enzimática sem o composto candidato a inibidor, sendo o meio reacional constituído por 70 µL da solução de acetato de amônio 15,0 mM, pH 8,0, 20 µL da solução de ACh e 10 µL do solvente de solubilização dos compostos (metanol).

Também foi realizado um controle negativo, que consiste da avaliação de um branco de cada composto na presença do substrato da enzima, porém utilizando um reator sem a enzima imobilizada (capilar vazio). Esse ensaio é realizado para avaliar a interferência do composto na auto-hidrólise do substrato.

Os percentuais de inibição foram obtidos comparando-se a área da atividade da enzima na presença do inibidor (P_i) com a área da atividade da enzima na ausência de inibidor (P₀), de acordo com a equação abaixo:

% de inibição =
$$100 - \left[\left(\frac{Pi - Sb}{P_0 - Sb} \right) x 100 \right]$$

Onde:

P_i = área da atividade da enzima na presença do inibidor;

P₀ = área da atividade da enzima na ausência de inibidor;

Sb = área da colina resultante da hidrólise espontânea do substrato (para esse controle um capilar vazio foi utilizado).

Para a realização deste ensaio, são usadas duas linhagens ATCC de *S. epidermidis*. A linhagem 35984 é uma linhagem boa formadora de biofilme, enquanto a linhagem 12228, é considerada uma má formadora. A comparação da presença de biofilme entre elas apresentou diferença significativa com p<0,05, mostrando que os controles usados são significativamente diferentes, em todos os casos. A capacidade de erradicação do biofilme formado pelas linhagens *S. epidermidis* ATCC 35984 foi analisada na presença das 14 frações derivadas dos compostos SSR4 e SSR14.

Para isso, inoculou-se *S. epidermidis* ATCC 12228 (Controle negativo, má formadora de biofilme) e *S. epidermidis* ATCC 35984 (controle positivo, boa formadora de biofilme) em Caldo BHI 0,75% glicose em diversas replicatas em microplaca de 96 poços. A incubação foi feita a 37°C por 24 horas para a formação do biofilme. A capacidade de erradicação do biofilme formado foi posteriormente testada após a formação do biofilme da *S. epidermidis* ATCC 35984.

Após 24 horas a 37°C, retirou-se o meio de cultura com as bactérias planctônicas e lavou-se com solução fisiológica 0,85% para que permanecesse na microplaca apenas o biofilme. Adicionou-se cada composto à maior concentração possível, diluído em DMSO a 1% quando necessário, em meio BHI 0.75% glicose fresco nos poços onde houve formação de biofilme pela *S. epidermidis* ATCC 35984. Como controle do crescimento do biofilme, 6 poços com o controle positivo e 6 com negativo receberam apenas caldo BHI 0.75% glicose, acrescido de 1% DMSO quando necessário. Incubou-se à 37°C por mais 24 horas. Essa segunda etapa permitiu a erradicação do biofilme pelo composto.

Após as 24 horas, para quantificação do biofilme, os poços foram lavados diversas vezes e corados com cristal violeta. Após etapas de lavagens e retirada do cristal violeta em excesso, foi feita a remoção do cristal violeta com etanol:acetona (80:20) que foi transferido para uma outra microplaca para quantificação indireta do biofilme a 595 nm. O controle do ensaio foi baseado na comparação da média das absorbâncias do biofilme de *S. epidermidis* ATCC 35984 e da média das absorbâncias do biofilme de *S. epidermidis* ATCC 12228, ambos sem composto. A comparação das médias foi realizada pelo Teste-T Student, cujo valor p<0.05 prova a diferença significativa entre duas médias de duas amostras diferentes. Quanto à capacidade do composto em erradicar o biofilme, a análise dos dados foi feita com base na

comparação da produção de biofilme de *S. epidermidis* ATCC 35984 sem composto e com *S. epidermidis* ATCC 35984 com composto. Para isso, utilizou-se a média das replicatas e o desvio padrão foi feito para análise da coerência entre as replicatas. Para a análise estatística foram realizadas análises de variância (ANOVA) da média de absorbância da produção de biofilme pela linhagem *S. epidermidis* ATCC 35984 sem composto e das médias de absorbância das produções de biofilme pela *S. epidermidis* ATCC 35984 com cada composto. Quando a análise de variância tem valor de P < 0.05 indica uma diferença significativa entre as duas amostras.

3.3 Molecular Networking

Para obtenção do *Molecular Network* foi utilizado uma abordagem *Feature Based Molecular Networking* (FBMN), que envolve a organização dos dados MS/MS (espectros) em uma rede com base na similaridade dos padrões de fragmentação (NOTHIAS et al. 2020).

Cada nodo dentro da rede representa uma coleção de espectros compartilhando o mesmo íon precursor, e as relações entre os nodos são determinadas pelo grau de similaridade entre os espectros. Para isso foi utilizado a plataforma online gratuita *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS).

4 RESULTADOS e DISCUSSÕES

4.1 Tratamento dos dados cromatográficos dos extratos dos fungos das raízes de S. spectabilis

Nos dados brutos dos 14 extratos, foram realizadas análises nãosupervisionadas (PCA e HCA) com o objetivo de visualizar a tendência de agrupamento das amostras. Para tal, foi realizado um pré-processamento nos dados brutos (Figura 12) para melhorar a qualidade das análises posteriores (PCA e HCA), como por exemplo, a correção da linha de base utilizando o algoritmo *airPLS*, alinhamento com o algoritmo *CCOW*, foi determinado também que todos os picos são igualmente importantes para a análise. Para isso, foram utilizados os cromatogramas resultantes da soma de todos os comprimentos de onda (190 a 800 nm), dessa forma conserva-se os dados químicos presentes nessa faixa de comprimento de onda e diminui a complexidade e custo computacional.

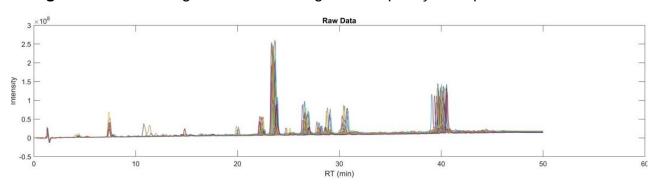


Figura 12 – Cromatogramas dos 14 fungos sem aplicação de pré-tratamento.

A figura acima apresenta a sobreposição de todos os cromatogramas (14 no total) obtidos dos extratos. Nesse ponto ainda não foi realizado nenhum tratamento. Esse tipo de pré-tratamento é útil para aumentar a capacidade de extração de informações importantes presentes nesses dados. Ele consiste em correção espectral das amostras, no intuito de suavizar possíveis variações como ruídos ou interferentes. Tem o propósito de apontar as variâncias dispostas no grupo amostral, traduzindo em um menor conjunto amostral com informações mais relevantes, reduzindo assim informações indesejáveis que poderiam interferir na construção dos modelos, os tornando mais robustos e livres de informações indesejadas (FERREIRA, 2015).

A Figura 13 mostra a mesma sobreposição de dados após a aplicação dos algoritmos já citados que melhoram a resolução dos cromatogramas facilitando a análise de agrupamento hierárquico, retirando quaisquer distúrbios que possa dificultar esse agrupamento.

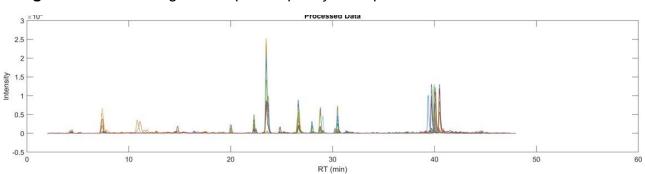


Figura 13 – Cromatogramas após a aplicação do pré-tratamento.

Analisando ambas as Figuras 12 e 13, é visível a diferença entre a qualidade dos dados antes e depois do pré-tratamento. Vale ressaltar que os tempos de retenção inferiores a 2 min e superiores a 48 min foram retirados, mantendo apenas os tempos de retenção onde se encontram as bandas cromatográficas de interesse.

4.1.1 Análise de agrupamento hierárquico (HCA em inglês)

Em seguida ao tratamento inicial dos dados, foi realizada a aplicação da análise de agrupamento hierárquico (HCA) que consiste em constatar as semelhanças entre as amostras, baseando-se nos tempos de retenção e intensidade das bandas cromatográficas na faixa de comprimento de onda de 190 a 800 nm, calculou-se a similaridade a partir da distância euclidiana entre as amostras no espaço das variáveis, resultando em um gráfico bidimensional chamado dendograma (Figura 14), onde os dados foram plotados em triplicata para que o tamanho da amostra seja maior, e maior seja sua relevância, sendo assim, menor a chance dos resultados serem apenas coincidências.

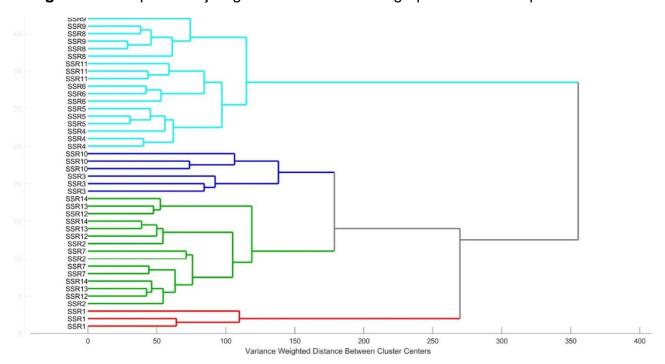


Figura 14 – Representação gráfica da análise de agrupamento hierárquico.

Analisando o gráfico é possível observar o agrupamento em 4 conjuntos distintos classificando as 14 amostras, das quais 6 amostras estão no grupo 1 representadas pelos fungos: SSR4, SSR5, SSR6, SSR8, SSR9 e SSR11, no grupo 2 constam 5 amostras, representando os fungos: SSR2, SSR7, SSR12, SSR13 e SSR14, no grupo 3 constam 2 amostras, os fungos: SSR3 e SSR10 e por fim no grupo 4 apenas o fungo SSR1. Dessa maneira foi possível observar que cada amostra presente em um grupamento possui similaridade em sua composição química.

4.1.2 Análise de Componente Principal (PCA em inglês)

Na PCA os dados multivariados foram agrupados de acordo com as similaridades observadas (perfil cromatográfico), no entanto, outros recursos matemáticos foram empregados. Os dados multivariados foram projetados em dimensões menores, através de combinações lineares das variáveis originais, formando as Componentes Principais (PC). Para isto, a matriz de dados originais foi aproximada para duas matrizes menores: as matrizes de escores e de pesos, visto que seu objetivo foi redimensionar e comprimir os dados. Assim, como resultados da PCA foram obtidos gráficos bi ou tridimensionais de escores ou pesos (Figura 15) (SOUZA et al, 2006). Cada PC (do inglês Principal Components) teve a finalidade de explicar a variância presente nas informações da matriz de dados. Assim, cada PC foi o resultado da decomposição da matriz de dados, sendo que a PC1 foi o resultado da primeira decomposição, a PC2 foi o resultado do resíduo da primeira decomposição e a PC3 foi o resultado do resíduo da segunda e assim por diante. Dessa maneira, a PC1 é a que sempre explica a maior parte das informações presentes na matriz de dados. E por consequência, a somatória das PC tendem ao 100%, que demonstra que cada componente principal conseguiu extrair o máximo de informações presentes no conjunto de dados.

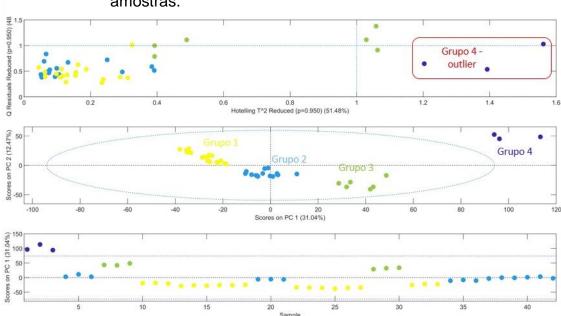


Figura 15 – Gráfico dos scores PC1 *versus* PC2, para classificação das amostras.

O gráfico de *scores* (Figura 15) apresenta a disposição espacial das amostras em relação aos seus respectivos agrupamentos, ou seja, as amostras que possuem menor variância entre si estão mais próximas, enquanto que as amostras que possuem maior variância estão mais espaçadas. Cada linha da matriz de dados (cromatogramas) é representada como um ponto no gráfico. Em termos geométricos a função das componentes principais é descrever a variação ou espalhamento entre os pontos usando o menor número possível de eixos. O PCA pode propiciar, através deste gráfico a identificação da existência de padrões de similaridade existentes em dados de um conjunto das amostras analisadas. Observou-se maior agrupamento nos grupos 1 e 2, e maior dispersão dos representantes dos grupos 3 e 4. Por meio da PC2, foi possível separar os grupos 1 e 4, dos grupos 2 e 3. Já a PC1 foi capaz de separar os grupos 3 e 4 do grupo 1.

Analisando os gráficos, identificou-se a mesma classificação presente no HCA, contendo 4 grupos, onde o grupo 4 foi classificado como *outlier* (possui menor similaridade com os demais agrupamentos).

Então, com base nas informações obtidas a partir de ambos os processamentos, foi possível identificar a presença de quatro agrupamentos fúngicos. Para aumentar a diversidade química e possibilitar um estudo mais aprofundado, dois fungos foram selecionados para a continuidade do trabalho como representantes dos isolados, com foco nos extratos que demonstraram maior atividade biológica.

4.2 Análises biológicas

4.2.1 Atividade antibacteriana

A disseminação generalizada de antimicrobianos em setores como a medicina humana, agropecuária e medicina veterinária contribuiu para o aumento alarmante de bactérias resistentes. Essa resistência representa uma ameaça significativa à saúde humana, animal e ao equilíbrio dos ecossistemas. Ambientes cruciais, como a água, frequentemente recebem resíduos provenientes de diversas fontes humanas, incluindo residências, indústrias e hospitais. Esses resíduos, por vezes, contêm concentrações elevadas de antibióticos, os quais podem ser liberados na água ou no solo, propiciando a emergência de linhagens de bactérias super-resistentes. Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), estima-se que até 2050 todos os antibióticos comumente utilizados perderão totalmente sua eficácia, causando cerca de 10 milhões de óbitos por ano decorrente da resistência antimicrobiana (RAM) (BUENO et al., 2018; BENTES et al. 2023).

Diante desse contexto, torna-se inegável a realização de pesquisas com foco na identificação de novos metabólitos que sejam capazes de combater esses microrganismos. Essa busca por soluções inovadoras é essencial para atender às demandas urgentes da sociedade, visando atenuar os impactos negativos da resistência bacteriana nos diversos setores que afetam diretamente a saúde pública e a sustentabilidade do meio ambiente.

Diante o exposto foi realizado ensaio de atividade antibacteriana contra as espécies de bactérias *S. epidermidis* (ATCC 35984); *S. aureus* (ATCC 25923); *E. faecalis* (ATCC 29212); *E. faecium* (700221); *K. pneumoniae* (700603); *E. coli* (ATCC 25922); *A. baumannii* (ATCC 19606); e *P. aeruginosa* (ATCC 27853).

Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 5, que correspondem a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), onde a concentração inibitória mínima representa a concentração mais baixa do extrato que impede o crescimento visível de uma bactéria (atividade bacteriostática) (TRIPATHI, 2018).

De acordo com esse ensaio, todos os valores superiores ou iguais a 512 μg/mL não apresentaram atividade antibacteriana, assim, avaliando os dados obtidos, o único extrato que apresentou valor ≤512 foi o fungo classificado como SSR9 frente a espécie *E. coli*, já os demais extratos não apresentaram nenhuma atividade frente às bactérias utilizadas. Esse extrato foi obtido de um fungo do gênero *Fusarium*, que na

literatura constam trabalhos evidenciando a produção de metabólitos que apresentam a capacidade de inibir o crescimento de certos tipos de bactérias, como por exemplo o peptídeo Trtesin e derivados do ácido tetrâmico (TEJESVI et al. 2013; RATNAWEERA et al. 2015).

4.2.2 Análise de citotoxicidade em células tumorais de colorretal humano

O câncer permanece uma enfermidade complexa e frequentemente letal, sendo que uma significativa proporção de agentes terapêuticos utilizados na quimioterapia e quimioprevenção origina-se de produtos naturais. Esses compostos desempenham um papel crucial no arsenal de fármacos quimioterapêuticos, podendo ser combinados de maneira sinérgica com drogas já empregadas, resultando em estratégias terapêuticas mais eficazes. A relevância contínua desses produtos naturais é destacada por diversos estudos (BISHAYEE; SETHI, 2016; CHAN, et al., 2023), sublinhando a necessidade de uma atenção substancial a essa abordagem. Assim, torna-se impreterível conduzir uma análise citotóxica dos extratos obtidos neste estudo, contribuindo para a incessante busca por novos agentes quimioterapêuticos e reforçando a importância contínua da pesquisa nessa área promissora.

Nesse contexto a Figura 16, bem como a Tabela 5, mostram os percentuais de inibição do crescimento celular das amostras testadas em linhagem de carcinoma colorretal humano (HCT116), linha escolhida por ser o terceiro tipo de câncer mais comum no mundo, representando aproximadamente 10% de todos os casos de câncer e é a segunda principal causa de mortes relacionadas ao câncer em todo o mundo, segunda a OMS. Como observado, todas as amostras demonstraram potencial de inibição com percentual superior a 75% do crescimento celular quando testadas na concentração de 50 μg/mL. Já quando os extratos foram testados na concentração de 5 μg/mL, somente as três amostras apresentaram percentuais de inibição do crescimento celular superior a 75%, sendo as amostras SSR3, SSR4 e SSR14.

Figura 16 – Inibição do crescimento celular (%) das amostras SSR1 a SSR14 em linhagem de carcinoma de colorretal humano (HCT116), com as concentrações de 5 μg/mL e 50 μg/mL (média ± SEM) (n=3).

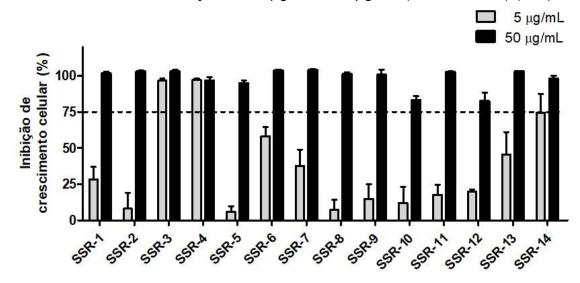


Tabela 5 - Inibição do crescimento celular (%) das amostras SSR1 a SSR14 em linhagem de carcinoma de colorretal humano (HCT116), com as concentrações de 5 μg/mL e 50 μg/mL (média ± SEM; n=3).

	Concentrações			
Amostras	5 µg	/mL	50 μg	ı/mL
-	Média	SEM	Média	SEM
SSR1	28,49	8,57	101,61	1,26
SSR2	8,05	10,96	102,91	0,80
SSR3	96,68	1,46	103,07	1,02
SSR4	97,17	0,96	96,67	2,39
SSR5	5,94	3,81	94,80	1,95
SSR6	58,13	6,39	103,63	0,70
SSR7	37,71	11,20	103,99	0,68
SSR8	7,10	7,08	101,24	1,32
SSR9	14,85	10,12	100,63	3,57
SSR10	12,09	11,18	83,06	2,91
SSR11	17,76	6,88	102,69	0,33
SSR12	19,96	1,51	82,43	5,93
SSR13	45,65	15,37	103,03	0,30
SSR14	74,35	13,17	97,98	2,13

Foi possível observar que as amostras testadas apresentaram um importante potencial de inibição de crescimento celular de linhagem HCT116. As amostras SSR3, SSR4 e SSR14 se destacaram ao apresentar mais de 75% de inibição do crescimento celular na dose de 5 µg/mL, resultado consistente com a literatura, que relata a citotoxicidade de metabólitos secundários frente a várias linhagens de células tumorais. Exemplos desses compostos incluem naftoquinonas, esteroides e depsipeptídeos, comumente produzidos por fungos do gênero Fusarium (CHOUDHARY et al., 2017; JAROLIM et al., 2017; TRINIDAD-CALDERÓN et al., 2023). Dados da literatura indicam que extratos e frações são considerados ativos quando inibem pelo menos 75% da proliferação celular e apresentam valores de CI50 inferiores a 30 µg/mL (SUFFNES & PELUZO, 1990; BOIK, 2001). Estudos apontam a presença de compostos como beauvericina e eniatina como os responsáveis pela atividade anti-câncer, como por exemplo câncer de próstata, câncer de mama (ZHAN et al. 2007). Segundo esses estudos a indução da morte das células se dá pelo acréscimo da concentração de Ca²⁺ intracelular, através carregamento pela molécula da beauvericina / eniatina. Os dados obtidos neste estudo indicam que este cenário pode ser observado nos extratos analisados em relação às células de carcinoma colorretal humano.

4.2.3 Triagem pontual de inibidores para a enzima calicreína (KLK1)

A KLK1 destaca-se como a enzima com funcionalidades mais elucidadas dentre as KLKs teciduais. Seu papel é crucial no sistema calicreína-cinina, influenciando processos vitais como inflamação, vasodilatação, contração de músculo liso, controle da pressão sanguínea, regulação do fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular. Além disso, a KLK1 está envolvida na indução de broncoconstrição e hipersecreção de muco, desempenhando funções de relevo em diversos tecidos, especialmente nos sistemas renal, cardiovascular e pancreático (ANDREAS; SEBASTIAN; PETER, 1999; KASHUBA et al., 2013; PRASSAS et al., 2015; KRYZA et al., 2016). Essa abordagem multifacetada da KLK1 sublinha sua importância em uma variedade de processos fisiológicos, consolidando-a como uma peça chave nos mecanismos de regulação e homeostase em diferentes sistemas do organismo. Alterações na expressão dessa enzima, estão relacionadas ao tumor estromal gastrounterstinal (GIST) (DOMINEK et

al., 2010), obstrução crítica da artéria carótida (PORCU et al., 2002), ateroma e doença arterial coronariana (YAO et al. 2013).

Em consequência do envolvimento dessas enzimas em patologias que afetam o ser humano, é importante a busca por moléculas que possam atuar na inibição dessas enzimas, oferecendo tratamento ou até mesmo cura para essas condições (COPELAND, 2013).

A partir desse contexto, avaliar a capacidade de inibição dessa enzima é muito importante, visando a busca por novos medicamentos de fontes naturais.

A Tabela 6 exibe os resultados obtidos para o ensaio de triagem pontual dos extratos dos fungos isolados na concentração final de 50 µg/mL.

Tabela 6 – Resultados do ensaio de triagem pontual para a enzima calicreína (KLK1).

Compostos	% inibição
Leupeptina ^a	99,4 ± 0,2
SSR1	31,1 ± 6,8
SSR2	5,6 ± 1,5
SSR3	38,3 ± 1,8
SSR4	39,5 ± 1,6
SSR5	1,0 ± 1,3
SSR6	29,1 ± 0,7
SSR7	8,2 ± 1,0
SSR8	2,7 ± 1,8
SSR9	18,3 ± 1,6
SSR10	13,8 ± 1,9
SSR11	25,2 ± 2,4
SSR12	17,9 ± 2,1
SSR13	23,4 ± 2,3
SSR14	17,9 ± 2,0

^a Inibidor padrão de calicreína.

Quando comparado os valores de inibição dos extratos com o do composto padrão leupeptina para esse tipo de ação, não é evidenciado capacidade de inibição eficiente da enzima (KLK1). Nenhum extrato promoveu uma inibição expressiva

(levando em consideração o valor apresentado pelo composto padrão), alguns extratos apresentaram percentuais de inibição próximos a 40%, como os extratos SSR1, SSR3, SRR4, que apresentaram inibição de 31,1%, 38,3% e 39,5% respectivamente, o que sugere uma baixa capacidade de inibição da enzima calicreína (KLK1) quando comparado com a leupeptina. Poucas informações foram encontradas na literatura a respeito deste ensaio. Os dados disponíveis indicam de forma geral que compostos provenientes de extratos de fungos do gênero *Fusarium* possuem potencial de inibição enzimática, conforme discutido na seção 1.5. O fungo *Fusarium oxysporum*, em particular, produz uma ampla variedade de compostos, sendo que neste estudo foi observada a predominância de ciclodepsipeptídeos, como beauvericina e eniatina. Esses compostos podem estar relacionados à capacidade de inibição de enzimas, como a calicreína. Estudos anteriores, como os de Goettig, Magdolen e Brandstetter (2010), apontam para a presença de inibidores de KLKs baseados em peptídeos, que demonstraram atividade inibitória com um valor de IC50 de 1,4 μM.

Conforme exposto por Trinidad-Calderón et al. (2023), compostos como os ciclodepsepeptídeo/depsipeptídeo apresentam capacidade de inibição de diversas enzimas, o que pode sugerir a interação entre esses compostos com a enzima calicreína. Outro trabalho apresentou informações sobre a interação tanto da beauvericina quanto da eniatina com a colesterol aciltransferase (acil-CoA) (TOMODA et al. 1992). Além destes compostos, outros como terpenóides (MONTEIRO et al. 2017; HUNG et al. 2011), esteroides (ZHANG et al. 2012) demonstram atividades inibitórias frente diversas enzimas, compostos que estão presentes nos extratos de *F. oxysporum.* Esses dados sugerem que, por ser uma matriz complexa composta por diversos compostos, o extrato pode exercer sua atividade de forma sinérgica. No entanto, mesmo em menores quantidades, esses compostos podem ser responsáveis pela atividade observada.

4.2.4 Triagem pontual de inibidores para as enzimas acetilcolinesterase de peixe elétrico (AChEee) e butirilcolinesterase humana (BChEhu)

As colinesterases compõem um grupo de enzimas esterases com a função de catalisar a hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético. Esse grupo se divide em dois tipos principais: a acetilcolinesterase (AChE) e a utirilcolinesterase (BuChE).

Ambas são glicoproteínas homólogas, compartilhando cerca de 50% de identidade sequencial, mas diferem em termos de distribuição nos tecidos, propriedades cinéticas e especificidade de substratos. (CIRIELLO; LO MAGRO; GUERRIERI, 2018). A AChE é predominantemente encontrada no sistema nervoso central, expressa por neurônios nos músculos esqueléticos e na membrana dos eritrócitos. Por outro lado, a BuChE está associada às células gliais e é predominantemente presente no plasma sanguíneo (LI; HAI; ZHOU; DONG, 2015)

Os inibidores de colinesterase são reconhecidos como tratamento oficial para a demência de Alzheimer, sendo prescritos não apenas para essa condição, mas também para distúrbios psiquiátricos e diversas doenças neurológicas, incluindo doença de Huntington, arteriopatia cerebral autossômica dominante com infartos subcorticais e leucoencefalopatia, demência frontotemporal, demência na esclerose múltipla e paralisia supranuclear progressiva (GREIG; LAHIRI; SAMBAMURTI, 2002). Durante o desenvolvimento do Alzheimer, observa-se uma diminuição nos níveis de AChE no sistema nervoso central, ao passo que a atividade da BuChE aumenta progressivamente. Como resultado, a BuChE passa a desempenhar um papel predominante na regulação da acetilcolina. Estudos realizados em modelos de camundongos com Alzheimer sugerem que a BuChE pode contribuir para a etiologia da doença, especialmente na formação de placas amilóides (GREIG; LAHIRI; SAMBAMURTI, 2002; ELDUFANI; BLAISE, 2019).

Nesse contexto, agentes que inibem tanto a AChE quanto a BuChE, conhecidos como inibidores duplos, como a rivastigmina, oferecem benefícios significativos aos pacientes com demência. Esses medicamentos atuam reduzindo o efeito compensatório da hidrólise de acetilcolina pela BuChE quando os níveis de AChE estão diminuídos, proporcionando assim uma abordagem terapêutica mais abrangente (SHARMA, 2019).

A partir disso, foram utilizados os extratos para teste de inibição das enzimas descritas. Os resultados obtidos desse ensaio de triagem pontual, utilizaram os compostos em concentração final de 200 μg/mL, que estão apresentados na tabela a seguir.

Tabela 7 - Resultados dos ensaios de triagem pontual para as enzimas acetilcolinesterase de peixe elétrico (AChEee) e butirilcolinesterase humana (BChEhu).

% Inibição		
ICER-AChE _{ee}	ICER-BChE _{hu}	
$99,3 \pm 0,9$	99,7 ± 0,1	
$51,7 \pm 3,1$	$35,9 \pm 1,8$	
$45,3 \pm 0,5$	$39,5 \pm 2,0$	
$64,1 \pm 6,1$	$42,3 \pm 2,5$	
$64,7 \pm 3,8$	$40,6 \pm 2,9$	
32.8 ± 0.7	$40,9 \pm 1,2$	
$57,3 \pm 3,3$	$38,9 \pm 2,6$	
$56,2 \pm 1,6$	$50,7 \pm 3,4$	
$54,2 \pm 1,4$	43.0 ± 0.7	
$52,8 \pm 2,0$	$49,9 \pm 1,7$	
$61,4 \pm 3,9$	$45,7 \pm 2,4$	
52,4 ± 1,7	$51,3 \pm 2,9$	
31.8 ± 1.2	$48,4 \pm 3,2$	
$71,4 \pm 1,8$	47.8 ± 3.0	
76,9 ± 1,1	$52,7 \pm 2,9$	
	% Ini ICER-AChEee 99,3 ± 0,9 51,7 ± 3,1 45,3 ± 0,5 64,1 ± 6,1 64,7 ± 3,8 32,8 ± 0,7 57,3 ± 3,3 56,2 ± 1,6 54,2 ± 1,4 52,8 ± 2,0 61,4 ± 3,9 52,4 ± 1,7 31,8 ± 1,2 71,4 ± 1,8	

a Inibidor padrão de AChEee e BChEhu

Todos os extratos foram testados para inibição das enzimas AChE_{ee} e BChE_{hu}. Conforme descrito na Tabela 7, a capacidade de inibição não foi próxima ao inibidor padrão utilizado, porém, apresentou valores que indicam uma capacidade de inibição relevante. Apenas as amostras SSR2 e SSR5 apresentaram valores abaixo de 50% de inibição das enzimas, os demais foram todos acima desse valor, com valores mais significativos nas amostras SSR3, SSR4, SSR10, SSR13 e SSR14, todos com porcentagem de inibição acima de 60 %, sendo que os extratos SSR13 e SSR14 obtiveram os resultados mais eficazes com 71,4 % e 76,9 % respectivamente. Mesmo não igualando ou superando a galantamina, por se tratar de extratos em comparação com uma substância pura, ainda assim foram resultados importantes.

Conforme descrito na discussão do ensaio de inibição da enzima calicreína, nenhum dado relevante foi encontrado sobre a avaliação de extratos de *F. oxysporum* frente a essas enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, e de mesma forma,

vale ressaltar que, com base na composição dos extratos de *F. oxysporum*, há a ocorrência de compostos que apresentam atividades frente a diversas enzimas (TOMODA et al. 1992; MONTEIRO et al. 2017; HUNG et al. 2011; ZHANG et al. 2012), e a presença de compostos polifenólicos apresentam afinidade de interação com a acetilcolinesterase (FERREIRA; SANTOS; PEREIRA, 2020) o que pode corroborar com as percentagens de inibição obtidas para este ensaio.

4.2.5 Capacidade de redução do biofilme

As infecções bacterianas representam uma ameaça à saúde pública global, com a crise agravada pela emergência e disseminação de cepas bacterianas resistentes a medicamentos (FALAGAS et al. 2005).

Um estado de crescimento proeminente para microrganismos, presente em 90% ou mais das cepas bacterianas, é o biofilme. Esses agrupamentos heterogêneos de micróbios associados à superfície formam uma matriz composta por polissacarídeos, proteínas e DNA. A detecção de quórum, um canal de comunicação bacteriana inter e intracelular, desempenha um papel significativo no desenvolvimento do biofilme, conferindo resistência adaptativa às bactérias residentes (MASÁK et al. 2014; LI; LEE, 2017).

Ao contrário das bactérias planctônicas, as que residem no biofilme apresentam uma resistência adaptativa aos antibióticos, constituindo um desafio significativo para o tratamento de infecções crônicas (MASÁK et al. 2014; LI; LEE, 2017). A matriz do biofilme atua como uma barreira física aos medicamentos, proporcionando um ambiente seguro para a sobrevivência dos microrganismos. Bactérias como *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycoplasma pneumoniae* representam sérias crises de saúde devido à sua resistência aos antimicrobianos e às respostas imunológicas (DAVIES, 2003).

O biofilme é uma congregação de microrganismos onde as células planctônicas aderem-se a uma superfície (CHEW et al. 2014). Essas colônias agregadas são geralmente revestidas por uma substância polimérica extracelular (EPS), uma matriz também conhecida como lodo (embora nem todo lodo seja considerado biofilme), composta principalmente de proteínas, sacarídeos extracelulares e DNA (DAVEY; O'TOOLE, 2000; OLIVEIRA et al. 2021). Estabeleceu-se que a morfologia dos biofilmes nas microcolônias é influenciada pelo fluxo de fluidos, composição

nutricional e moléculas mensageiras, como hormônios, utilizadas para comunicação bacteriana (DAVIES et al. 1998; HUBER et al. 2002). Os biofilmes podem se formar em superfícies vivas e não vivas, sendo comuns tanto na natureza quanto em instalações de saúde.

Diante desse cenário, é imperativo conceber novas abordagens para combater a formação de biofilmes microbianos. Pesquisas indicam que medicamentos naturais demonstram eficácia no combate à resistência a medicamentos e a doenças associadas ao biofilme (TAN; VANITHA, 2004). Além disso, produtos naturais desempenham um papel crucial na profilaxia de doenças infecciosas, com plantas chinesas como escutelária (*Scutellaria baicalensi*) e tussilago (*Tussilago farfara*) sendo frequentemente consideradas no tratamento de infecções bacterianas (LU et al., 2019). Outras estratégias incluem terapia fágica, inibidores do sistema de detecção de quorum, terapia com anticorpos, terapêutica com peptídeos antimicrobianos, materiais inteligentes responsivos a estímulos e nanotecnologia. Compostos antibiofilmes naturais recém-identificados oferecem perspectivas promissoras para o tratamento de infecções causadas por bactérias associadas ao biofilme e bactérias patogênicas.

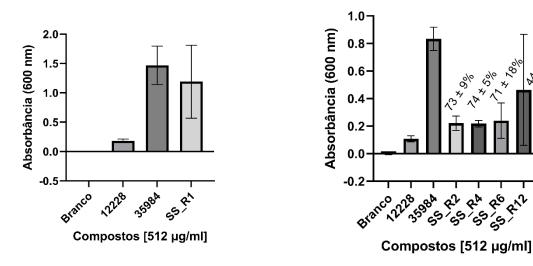
Os extratos de *F. oxysporum* foram analisados frente as espécies *S. epidermidis* ATCC 35984, *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. aureus* ATCC 8095, *S. aureus* ATCC 25923, onde as linhagens de *S. epidermidis* ATCC 35984 e *S. aureus* ATCC 8095 são eficientes formadoras de biofilme, enquanto as linhagens *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228 não são eficientes formadoras de biofilme, a comparação da formação de biofilme entre elas apresentou diferença significativa com p < 0,0001.

A capacidade de erradicação do biofilme formado pelas *S. epidermidis* ATCC 35984 e *S. epidermidis* ATCC 12228 foi analisada para 5 extratos na concentração de 512 µg/mL (Figura 17). A capacidade de erradicação do biofilme para cada composto é apresentada no valor de porcentagem acima de cada coluna do gráfico e com seu erro associado representados na Tabela 8.

Tabela 8 - Capacidade de redução	do biofilme formado por	S. epidermidis ATCC
35984	•	-

Composto	% de redução a 512 μg/ml	
SSR1	N.D.	
SSR2	73 ± 9	
SSR4	74 ± 5	
SSR6	71 ± 18	
SSR12	44 ± 54	

Figura 17 – Quantidade de biofilme da *S. epidermidis* ATCC 35984 depois de tratado com o extrato SSR1 a 512 μ g/mL e extratos SSR2, SSR4, SSR6 e SSR12 a 512 μ g/mL.

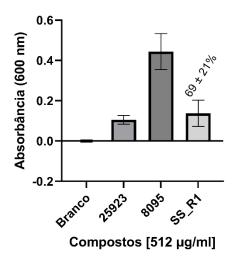


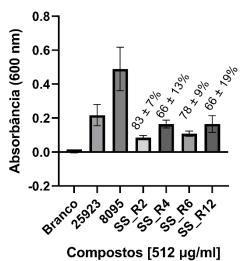
A capacidade de erradicação do biofilme formado pela *S. aureus* ATCC 8095 foi analisada para 5 extratos a 512 µg/mL (Figuras 18). A capacidade de erradicação do biofilme para cada composto é apresentada no valor de porcentagem acima de cada coluna do gráfico e com seu erro associado representado na Tabela 9.

Tabela 9 – Capacidade de redução do biofilme formado por *S. aureus* ATCC 8095

Composto	% de redução a 512 μg/ml
SSR1	69 ± 21
SSR2	83 ± 7
SSR4	66 ± 13
SSR6	78 ± 9
SSR12	66 ± 19

Figura 18 – Quantidade de biofilme da *S. aureus* ATCC 8095 depois de tratado com o extrato SSR1 a 512 μ g/mL e SSR2, SSR4, SSR6 e SSR12 a 512 μ g/mL.





Os ensaios foram realizados frente as linhagens com maior capacidade de produção de biofilmes. Para a linhagem *S. epidermidis* ATCC 35984, os extratos SSR3, SSR4 e SSR6 apresentaram percentual de erradicação de biofilme maior que 70%. Já para a linhagem *S. aureus* ATCC 8095, todos os extratos testados apresentaram porcentagem de redução de biofilme próximo ou acima de 70%. Sugere-se que esses resultados podem estar associados à presença majoritária dos compostos beauvericina e eniatina, que, segundo Juan-García et al., (2015) e Wu et al., (2018), apresentam atividade antibacteriana muito elevada, porém, em relação a atividade de erradicação de biofilme, não foi encontrado nenhum dado, sendo possível a sugerir que os compostos beauvericina e eniatina são os responsáveis por essa atividade (OLEIK et al. 2019).

4.3 Critérios para seleção dos fungos

Todas as informações constadas nas seções 4.1 e 4.2 foram utilizadas para a obtenção de informações sobre os fungos isolados como também para a determinação de qual ou quais fungos seriam utilizados para dar continuidade a investigação.

Baseando-se no agrupamento formado pela aplicação do PCA e do HCA, foi determinado que escolher fungos de agrupamentos diferentes poderiam resultar em dados distintos. Dessa forma, com os resultados iniciais dos ensaios biológicos, foi

dado prioridade aos extratos que apresentaram resultados significativos que foram os extratos SSR4 e SSR14.

Então, a partir desta seleção, foi necessário um novo crescimento para obtenção de maior massa de extrato para a realização de novas análises de ensaios biológicos, que neste caso, foram escolhidos os ensaios de erradicação de biofilme e atividade antibacteriana. Os dados que seguem são referentes somente aos extratos escolhidos (SSR4 e SSR14). Foi realizado crescimento em escala ampliada, utilizando um total de 60 Erlenmeyers para cada fungo, o que gerou aproximadamente 20,0 L de extrato bruto para cada fungo.

Vale ressaltar que até então não havia sido feita a identificação genética dos fungos isolados, dessa forma, a partir da seleção dos extratos, a sua identificação genética foi realizada.

4.4 Identificação genética dos fungos selecionados

A identificação genética dos fungos foi obtida através do software MEGA 7, por uma sequência consenso, que foi comparada com sequências obtidas do banco de dados GenBank por intermédio da ferramenta nBLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). As sequências que compartilhavam 97% ou mais de similaridade foram identificadas como a mesma espécie.

Para ambos os fungos SSR4 e SSR14, obteve-se 100% de identidade com *Fusarium oxysporum*. Ambas as linhagens fúngicas foram identificadas pelo método de sequenciamento da região do espaçador transcrito interno, ITS, utilizando os *primers* ITS1 e NL4. Os *amplicons* foram purificados e sequenciados pelo método Sanger, pelo Prof. Dr. Marcos Antônio Soares do Departamento de Botânica e Ecologia do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) (DE SIQUEIRA, 2017).

A variabilidade genética dentro da mesma espécie é muito comum em fungos e é demonstrada através das formas especiais (*formae specialis* ou f. sp.), que são variações intraespecíficas comumente associadas à diferentes expressões genéticas induzidas pela rede de interação dos fungos com seus ambientes bióticos e abióticos (ELDER-HERMANN, 2019).

Sugere-se que as linhagens fúngicas deste estudo podem ser formas especiais, devido às diferenças morfológicas observadas e resultados de atividades biológicas.

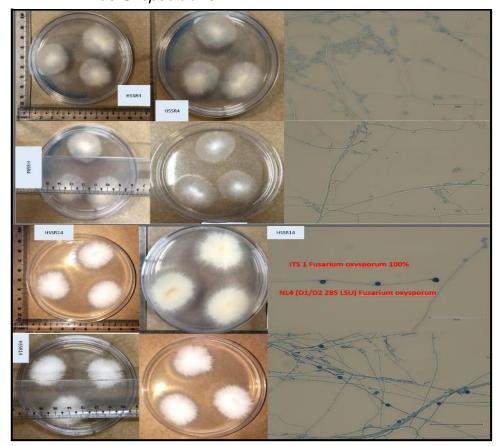
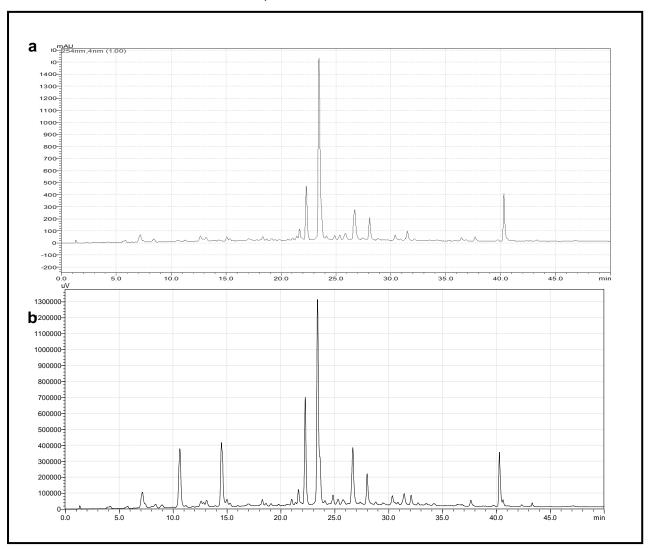


Figura 19 – Identificação genética dos fungos endofíticos das raízes de *S. spectabilis*.

4.5 Perfil cromatográfico e proposta de fracionamento dos extratos SSR4 e SSR14

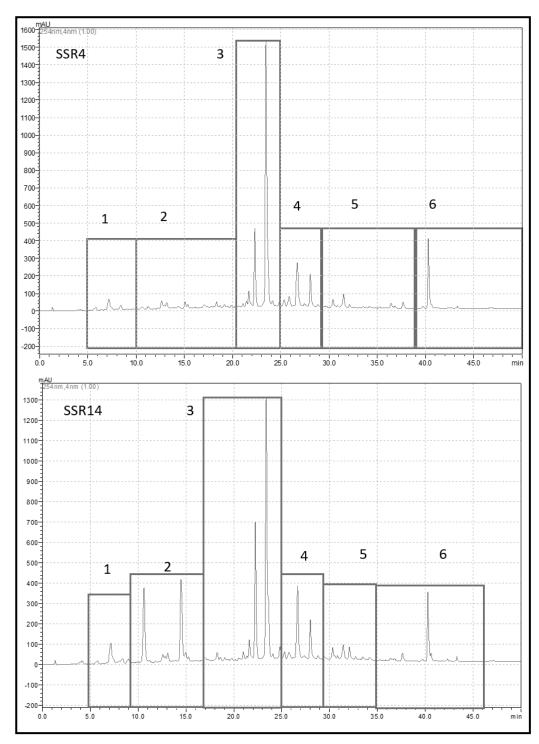
A análise dos cromatogramas de ambos os extratos evidenciou uma alta diversidade de compostos presentes, pois em todas as regiões do cromatograma apresentaram diversos sinais, corroborando a alta complexidade de extratos provenientes de microrganismos (Figura 20).

Figura 20 - Perfil cromatográfico dos extratos de fungos endofíticos das raízes de *S. spectabilis*, obtidos por CLAE-DAD, no comprimento de onda de 254 nm (20a – SSR4, 20b – SSR14).



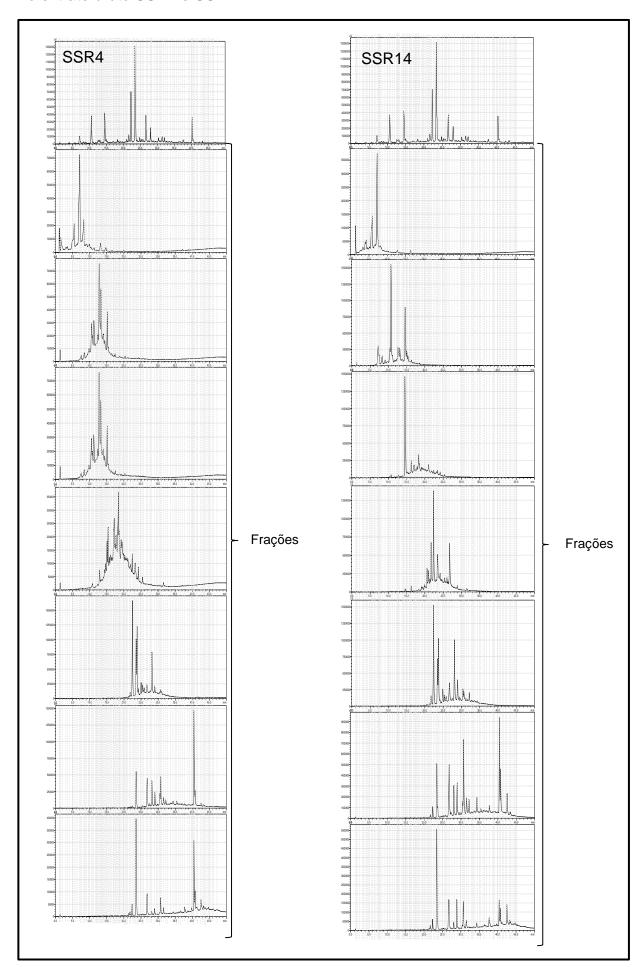
Ao obter os cromatogramas dos novos extratos (SSR4 e SSR14), decidiu-se realizar um pré-fracionamento, no qual os cromatogramas foram divididos em seções (Figura 21). Essa abordagem permitiu a obtenção de frações de menor complexidade, visando avaliar cada uma delas em ensaios biológicos. O objetivo era identificar possíveis variações na atividade biológica das frações, seja por aumento ou diminuição de potência, e, assim, determinar quais compostos poderiam ser responsáveis pelas atividades observadas nas etapas anteriores.

Figura 21 – Proposta de fracionamento para os extratos de Fusarium oxysporum a partir dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD, no comprimento de onda de 254 nm.



A partir deste pré-fracionamento, cada fração foi analisada por CLAE-DAD para obtenção do perfil cromatográfico (Figura 22) onde foi possível realizar um alinhamento entre os sinais observados nas frações, com os observados no extrato bruto.

Figura 22 – Alinhamento dos sinais cromatográficos observados nas frações e no extrato bruto SSR4 e SSR14.



Com esse alinhamento (Figura 22), fica mais evidentes quais sinais referentes às frações estão dispostos nos extratos brutos, possibilitando a visualização de qualquer sinal de interesse, como por exemplo, a confirmação de que o sinal mais intenso na porção final do extrato bruto, corresponde à fração onde tanto a beauvericina quanto a eniatina estão.

4.6 Reanálise em ensaios biológicos dos extratos SSR4 e SSR14

Após a seleção e identificação dos novos extratos (SSR4 e SSR14), ambos foram enviados para realização de novos ensaios biológicos. Assim, os extratos foram avaliados quanto à inibição bacteriana e à erradicação de biofilme.

Ao reanalisar os extratos frente às linhagens bacterianas conforme constam na Tabela 10, foi observado diferença na variedade dos metabólitos secundários presentes nesse novo extrato, comparado aos resultados anteriores, que mostrou atividade frente a diversas espécies de bactérias em comparação com os extratos iniciais.

Tabela 10 - Valores de inibição bacteriana dos novos extratos.

Linhagens bacterianas	Gram-	positivas	Gram-negati Linhagens Bacterianas		negativas
	SSR4	SSR14	Elimagens Bacterianas —	SSR4	SSR14
S. epidermidis ATCC	≤512	≤512	K. pneumoniae ATCC	>512	>512
35984			700603		
S. aureus ATCC 25923	≤512	≤512	E. coli ATCC 25922	>512	>512
S. aureus ATCC 8095	≤512	≤512	A. baumannii ATCC	>512	>512
			19606		
E. faecalis ATCC 29212	≤512	≤512	P. aeruginosa ATCC	>512	>512
			27853		
E. faecium ATCC	≤512	≤512		>512	>512
700221					

Os extratos com atividade antibacteriana foram aqueles que obtiveram resultado ≤512µg/mL. Como observado, ambos os extratos apresentaram atividade antibacteriana frente às linhagens gram positivas, porém, frente às linhagens gram negativas não apresentaram resultados positivos.

Dado às características de bactérias gram positivas, onde a organização das paredes celulares possui quantidades maiores de peptideosglicanos e ácido lipoteicóico, a maior atividade contra esse tipo de bactéria pode ser explicada pela maior produção de peptídeos pelos fungos do gênero *Fusarium*, como por exemplo as eniatinas e a beauvericina, classificadas como micotoxinas emergentes, o que tornaria sua permeabilidade frente a esse tipo de parede celular mais eficiente.

Conforme consta na literatura acerca dessas moléculas, é sabido que sua toxicidade está relacionada às suas propriedades ionóforas, pois tanto beauvericina quanto eniatina são capazes de transportar cátions monovalentes (K+) e divalentes (Ca²⁺) através da membrana celular, resultando em uma desproporção intracelular nos íons transportados, afetando a homeostase celular e diminuindo a resistência das junções intercelulares (JESTOI, 2008; FRAEYMAN et al., 2017; PROSPERINI et al., 2017; BERTERO et al., 2018; MALLEBRERA et al., 2018; HASUDA; BRACARENSE 2024).

Essa capacidade promove diversas atividades biológicas, incluindo antibiótico, antimicrobial, inseticida, anti-helmíntico, anticâncer e efeitos indutores de apoptose (CASTLEBURY et al., 1999; FUKUDA et. al., 2004; JESTOI et al., 2004; JOW et al., 2004; LIN et al., 2005; DORNETSHUBER-FLEISS et al., 2007; ZHANG et. al., 2007; MECA et al., 2011; DORNETSHUBER-FLEISS et al., 2015; PROSPERINE et. al., 2017; SOOD; SANDHU; MUKHERJEE, 2017; WU et al., 2018).

Resultados ligeiramente diferentes foram obtidos para os ensaios de erradicação de biofilme, mesmo possuindo essas características que favorecem atividades frente a bactérias gram-positivas, quando em extrato bruto, houve uma queda na atividade frente à espécie *S. epidermidis* ATCC 35984, que é uma bactéria gram-positiva (NAMVAR et. al. 2014). A Tabela 11 e a Figura 23 apresentam os valores obtidos com os novos extratos SSR4 e SSR14.

Tabela 11 – Redução de biofilme de *S. epidermidis* ATCC 35984 pelos compostos SSR4 e SSR14 a 512 mg/L.

Composto testados (512 mg/L)	Capacidade de erradicação de biofilme (%)
SSR4	69 ± 10
SSR14	60 ± 9

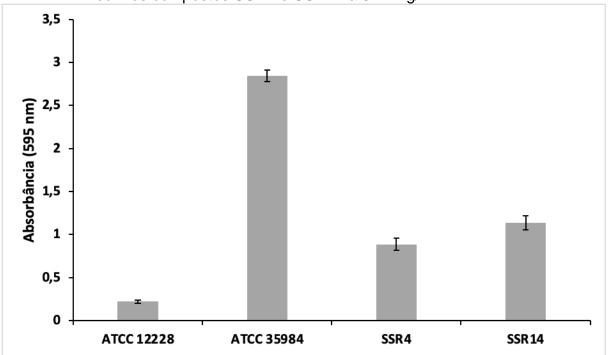


Figura 23 – Quantidade de biofilme da *S. epidermidis* ATCC 35984 depois de tratado com os compostos SSR4 e SSR14 a 512 mg/L.

Quando comparado com as análises realizadas anteriormente, quando os 14 extratos foram testados, houve uma diminuição na atividade antibacteriana exercida pelos extratos. Inicialmente o extrato SSR4 apresentou 74% de erradicação do biofilme, contra 69% nesta nova análise. Uma possível explicação pode ser que a maior dificuldade de penetração dos compostos é devido a presença da matriz, que é composta por diferentes polissacarídeos, proteínas e DNA, que funciona como uma barreira física aos medicamentos e fornece aos microrganismos um nicho ecológico seguro para a sua sobrevivência (WU et al. 2018).

Após o fracionamento dos extratos SRR4 e SRR14 utilizando coluna de bancada (seção 3.1.6), obtiveram-se as frações FR1 a FR7, sendo realizado novamente o ensaio de erradicação de biofilme, para verificar aumento ou diminuição de sua atividade. Foram testados novamente as frações de ambos os extratos frente à bactéria *S epidermidis* ATCC 35984, conforme Tabela 12 e Figura 24, e verificou-se que ao realizar esse fracionamento houve um aumento da potência dos extratos frente à erradicação de biofilme.

Tabela 12 - Redução de biofilme de *S. epidermidis* ATCC 35984 pelas frações do composto SSR4 a 512 mg/L.

Composto testados (512 mg/L)	Capacidade de erradicação de biofilme (%)
SSR4 – FR1	-13,2 ± 16,7
SSR4 – FR2	-39,1 ± 15,5
SSR4 – FR3	12 ± 14
SSR4 – FR4	91,1 ± 23,6
SSR4 – FR5	94,2 ± 27,7
SSR4 – FR6	99,4 ± 23,8
SSR4 – FR7	-7 ± 17

Não foram todas as frações que apresentaram um aumento na sua atividade, destacando-se as frações FR4, FR5 e FR6, que apresentaram uma redução de até 99,4%, que são as frações onde se encontram os compostos mais polares como a eniatina e a beauvericina.

Provavelmente o fator diluição interferiu no resultado, pois ao testar o extrato bruto, a massa adicionada representa o conjunto total de substâncias, portanto, os componentes dessas frações estarão em menor proporção no extrato. Notou-se também que nesse caso as frações FR1, FR2 e FR7, favoreceram o crescimento do biofilme (Figura 25), o que pode justificar uma atividade menor apresentados pelos extratos iniciais e que também estão numa região do cromatograma que não apresentam a presença da eniatina e a beauvericina.

Figura 24 – Quantidade de biofilme de *S. epidermidis* ATCC 35984 depois de tratado com as frações FR4, FR5 e FR6 do composto SSR4 a 512 mg/L

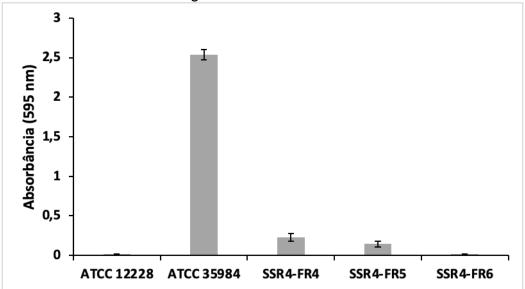
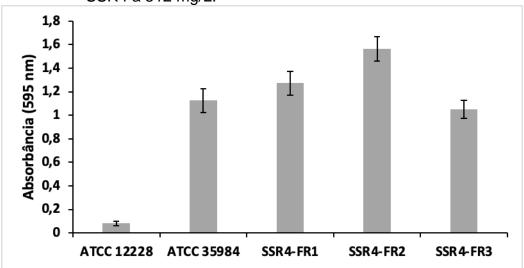


Figura 25 - Quantidade de biofilme de *S. epidermidis* ATCC 35984 depois de tratado com as frações FR1, FR2 e FR3 do composto SSR4 a 512 mg/L.

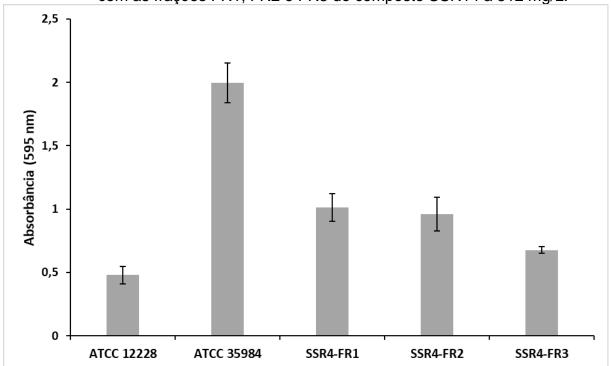


Para o extrato SSR14, houve uma melhora na atividade de erradicação de biofilme conforme mostrado na Tabela 13 e Figura 26.

Tabela 13 - Redução de biofilme de *S. epidermidis* ATCC 35984 pelas frações do composto SSR14 a 512 mg/L.

Composto testados (512 mg/L)	Capacidade de erradicação de biofilme (%)
SSR14 – FR1	49,2 ± 18,5
SSR14 – FR2	51,8 ± 21,9
SSR14 – FR3	66,1 ± 11,8
SSR14 – FR4	58,1 ± 23,6
SSR14 – FR5	60,2 ± 23,1
SSR14 – FR6	77,5 ± 24,3
SSR14 – FR7	20,7 ± 21,2

Figura 26 – Quantidade de biofilme de *S. epidermidis* ATCC 35984 depois de tratado com as frações FR1, FR2 e FR3 do composto SSR14 a 512 mg/L.



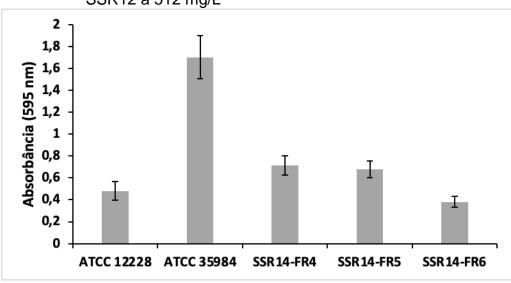


Figura 27 – Quantidade de biofilme de *S. epidermis* ATCC 35984 depois de tratado com as frações FR4; FR5; e FR6 do composto SSR12 a 512 mg/L

Pôde-se notar um aumento de atividade antibacteriana, porém não tão significativo quanto o observado para o SSR4. Nesse caso em específico, não houve nenhuma fração que favoreceu o crescimento de biofilme, todas as frações, em maior ou menor grau reduziram o biofilme.

4.7 Molecular Networking

O tratamento de dados realizado pelo GNPS foi aplicado para ambos os extratos e os compostos majoritários observados foram as eniatinas, beauvericinas e seus análogos.

Na rede molecular, é possível observar a presença de outros *cluster*s, porém, os dois mais proeminentes são os das eniatinas e beauvericinas, conforme Figura 28.

Figure 28 – Rede molecular obtida através do FBMN, verde claro: SSR4; verde escuro: SSR14

Fonte: autor

O FBMN foi eficiente em agrupar os análogos tanto da eniatina quanto da beauvericina, apresentando um *cluster* composto por 11 nodos para a eniatina e 15 nodos para a beauvericina.

Estruturalmente, a beauvericina e a eniatina são hexadepsipeptídeos cíclicos não ribossômicos que consistem em ácidos D-2-hidroxiisovaléricos e N-metil-L-aminoácidos alternados. Na beauvericina, os três resíduos de aminoácidos são N-metil-fenilalaninas aromáticas, enquanto nas eniatinas, os resíduos de aminoácidos são N-metil-valina alifática, N-metil-isoleucina ou N-metil-leucina, ou misturas desses aminoácidos. As subunidades são ligadas por ligações peptídicas e ligações ésteres intramoleculares (lactona), formando um depsipeptídeo cíclico (STRONGMAN, et al. 1988; SY-CONDERO, 2012; LIUZZI, et al. 2017).

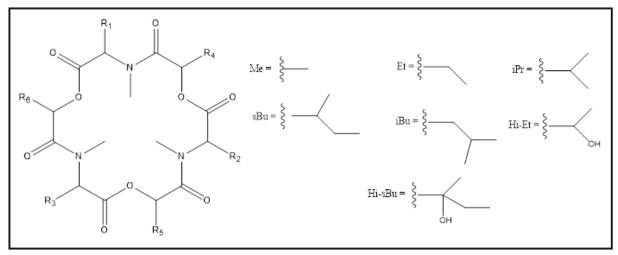
4.7.1 Eniatinas

As eniatinas são compostas geralmente de três unidade de ácidos D-hidróxicarboxílicos e três unidade de L-aminoácidos. Sua diversidade estrutural é definida pela incorporação de diferentes L-aminoácidos nas posições R1-R6, que podem ser: valina (iPr); leucina (iBu) ou isoleucina (sBu), esses aminoácidos são metilados.

As fragmentações sugerem as mesmas clivagens observadas para a beauvericina, assim como também clivagens do tipo y/b, c/z e a/x características de peptídeos, as fragmentações ocorrerão com a hidrólise das ligações dos ésteres

presentes e das ligações peptídicas. Estudos na literatura comprovaram que a abertura de anel, pode gerar a perda de um monóxido de carbono (-CO) *m/z* 28, o que para ciclodepsipeptídeos ocorre através da protonação do oxigênio da função éster, levando a formação de um peptídeo linear (NGOKA, et al. 1999; WILLIAMS, et al. 2004).

Figura 29 - Estrutura da eniatina e seus análogos.



Fonte: autor

A Tabela 14 apresenta os análogos já descritos na literatura para a eniatina, mostrando suas diferenças estruturais (SY-CORDERO; PEARCE; OBERLIES, 2012).

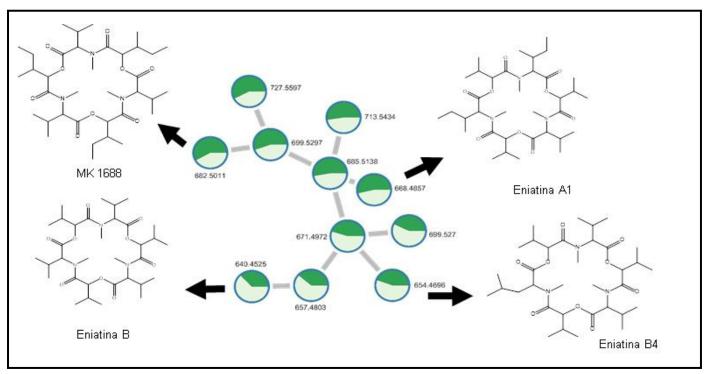
Tabela 14 – Substituintes identificados para as eniatinas.

Eniatina	R1	tes identific	R3	R4	R5	R6
Α	sBu	sBu	sBu	iPr	iPr	iPr
A 1	sBu	iPr	sBu	iPr	iPr	iPr
A2	sBu	iBu	sBu	iPr	iPr	iPr
В	iPr	iPr	iPr	iPr	iPr	iPr
B1	iPr	sBu	iPr	iPr	iPr	iPr
B2	iPr	iPr	iPr	iPr	iPr	iPr
B3	iPr	iPr	iPr	iPr	iPr	iPr
B4	iPr	iPr	iBu	iPr	iPr	iPr
С	iBu	iBu	iBu	iPr	iPr	iPr
E1	iPr	iBu	sBu	iPr	iPr	iPr
E2	iPr	sBu	iBu	iPr	iPr	iPr
F	iBu	sBu	sBu	iPr	iPr	iPr
G	iBu	iBu	iPr	iPr	iPr	iPr
Н	iPr	iPr	iPr	sBu	iPr	iPr
I	iPr	iPr	iPr	sBu	sBu	iPr
MK1688	iPr	iPr	iPr	sBu	sBu	sBu
J1	iPr	iPr	Me	iPr	iPr	iPr
J2	sBu	iPr	Me	iPr	iPr	iPr
J3	Me	iPr	sBu	iPr	iPr	iPr
K1	iPr	iPr	Et	iPr	iPr	iPr
L	iPr	iPr	iPr	iPr	iPr	Hi-sBu
M1	iPr	iPr	iPr	iPr	sBu	Hi-sBu
M2	iPr	iPr	iPr	iPr	Hi-sBu	s-Bu
N	iPr	iPr	iPr	sBu	sBu	Hi-sBu
01	iBu	iPr	iPr	sBu	iPr	iPr
O2	iBu	iPr	iPr	iPr	sBu	iPr
О3	iBu	iPr	iPr	iPr	iPr	s-Bu
P1	iPr	iPr	Hi-Et	iPr	iPr	iPr
P2	iBu	iPr	Hi-Et	iPr	iPr	iPr

Fonte: adaptado de SY-CORDERO; PEARCE; OBERLIES, 2012

A tabela 15 dispõe as relações m/z que foram anotados a partir dos espectros de MS², e a Figura 29 apresenta o *cluster* identificado para a eniatina.

Figura 30 – *Cluster* identificado das eniatinas e seus análogos (verde claro: SSR4; verde escuro: SSR14)



Através deste *cluster* foi possível anotar as formulas moleculares de diversos íons, onde dentre os compostos anotados, muitos deles foram observados contendo aduto de amônio (NH₄+). Devido a esse motivo, as análises estruturais serão realizadas a partir dos espectros de MS² da molécula com aduto, visto que tanto moléculas protonadas e com amônio, mantém um mesmo perfil de fragmentação, quando comparado com adutos de íon sódio (Na+).

Tabela 15 - Anotações do cluster da eniatina e seus análogos majoritários.

Fórmula	Massa	Massa			A dusta
molecular do íon	observada	calculada	Erro (ppm)	Anotação	Aduto
C ₃₅ H ₆₂ N ₃ O ₉	668,4795	668,4480	-4,71	Eniatina A1	-
C ₃₅ H ₆₅ N ₄ O ₉	685,5085	685,4746	-4,99	Eniatina A1	NH ₄ ⁺
C ₃₆ H ₆₇ N ₄ O ₉	699,5241	699,4902	-4,84	Eniatina A	NH ₄ +
C ₃₄ H ₆₀ N ₃ O ₉	654,4644	654,4324	-4,88	Eniatina B4	-
C ₃₃ H ₆₁ N ₄ O ₉	657,4739	657,4433	-4,65	Eniatina B	NH ₄ +
C33H58N3O9	640,4484	640,4167	-4,94	Eniatina B	-
C34H63N4O9	671,4920	671,4589	-4,92	Eniatina B1	NH ₄ ⁺
C ₃₆ H ₆₄ N ₃ O ₉	682,4957	682,4637	-4,68	MK 1688	

Levando em consideração as anotações feitas pelo GNPS, notou-se a presença de compostos bastante citados na literatura como metabólitos pertencentes ao gênero *Fusarium*, como por exemplo as eniatinas B, A e B1. Já as eniatinas B4, MK 1688 e A1, são menos citadas como metabólitos encontrados nesse gênero.

Ambos os extratos (SSR4 e SSR14) apresentaram as mesmas anotações para as eniatinas, como é possível verificar na Figura 30, onde a diferença de cores representa a quantidade de cada composto nos extratos, mesmo apresentando atividades biológicas ligeiramente diferentes, o conjunto dos compostos majoritários é muito próxima.

Como as eniatinas possuem esqueleto carbônico que se diferem apenas com os grupos substituintes da estrutura hexadepsipepitidica, seu perfil de fragmentação é bastante semelhante, variando a relação m/z dependendo do substituinte e suas posições. A Figura 30 mostra as fragmentações comuns para as eniatinas onde os fragmentos mais usuais são os que apresentam a relação *m/z* de 682; 654; 555; 455; 328 e 228.

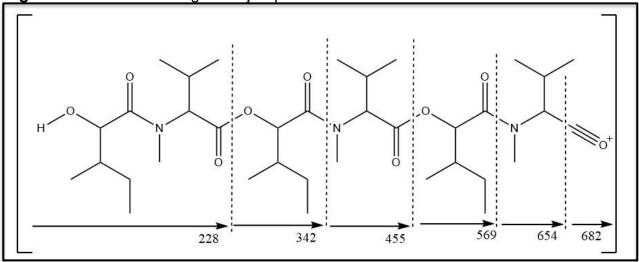


Figura 31 – Padrão de fragmentação para a molécula eniatina A.

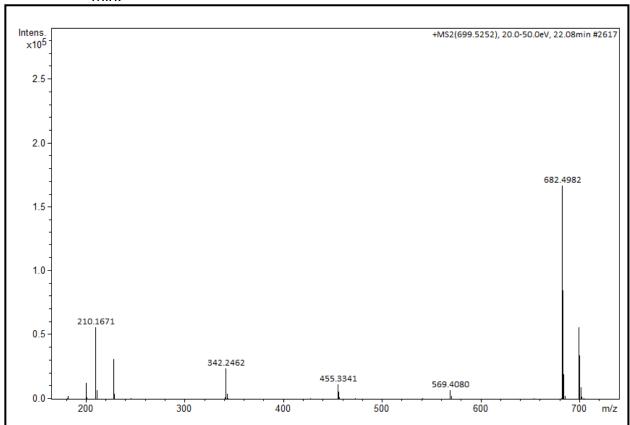
Fonte: Adaptado de SONG et al. 2008

Já analisando a Figura 32 (espectro de MS² da eniatina A experimental) é possível identificar que os fragmentos mais abundantes são análogos, levando em consideração que a substância observada contém aduto de amônio (NH₄)⁺ apresentando a relação *m/z* 699,5241.

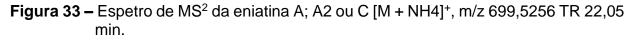
As fragmentações das eniatinas tem como característica a perda de unidades de aminoácidos e de ácidos hidroisovalérico (D-Hiv), por isso apresentam perfis

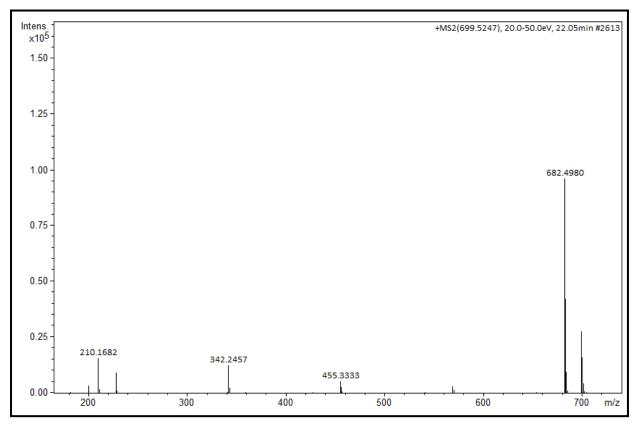
semelhantes. No caso da eniatina A, apresenta resíduos de aminoácidos N-metil-L-isoleucina.

Figura 32 – Espectro de MS² da eniatina A; A2 ou C [M + NH4]+, m/z 699,5241TR 22,08 min.



Houve a ocorrência de um outro nodo que apresentou a relação *m/z* de 699,5270 que pode indicar que seja os outros homólogos da eniatina A. A Figura 33 apresenta o espectro de MS² proveniente desse nodo, que pode indicar ser a molécula A2 ou C. Levando em consideração os tempos de retenção de ambas as moléculas, é muito difícil identificar qual eniatina pertence a esse perfil de fragmentação.





Como não houve nenhum outro caso de nodos idênticos, todos os demais serão mostrados seguindo seu espectro de MS^2 e respectivo modelo de fragmentação.

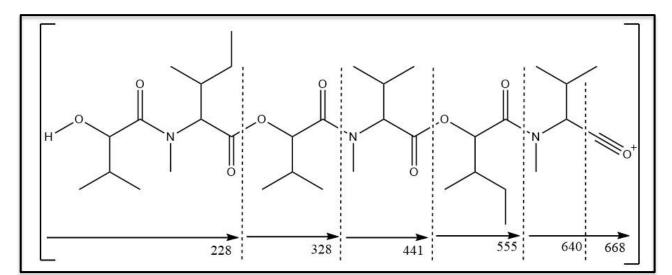


Figura 34 - Padrão de fragmentação para a molécula eniatina A1

Fonte: Adaptado de SONG et al. 2008

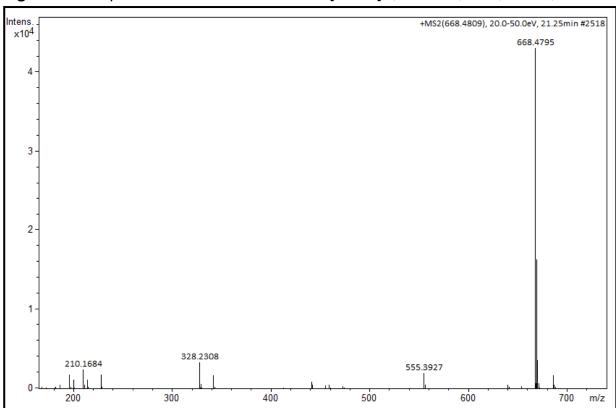


Figura 35 - Espectros de MS² da eniatina A1 [M + H] +, m/z 668,4809, TR 21,25 min.

No perfil de fragmentação da eniatina A1, pôde-se observar que é composta de dois fragmentos de N-metil-L-valina e dois de N-metil-L-isoleucina, por isso ao comparar alguns fragmentos encontrados no espectro da eniatina A1, foi observado outros fragmentos que também pode pertencer a outros análogos. O que pode ser

comprovado observando o fragmento m/z 228, que ocorre tanto na eniatina A quanto na A1.

A reação de fragmentação das eniatinas se dá primeiramente com a abertura da estrutura através da hidrólise da ligação do éster e posterior clivagens sequenciais/concorrentes dos demais resíduos. Apesar de serem bem conhecidas na literatura, não há muitos trabalhos demonstrando os mecanismos de reação completos para o perfil de fragmentação observado. Dessa maneira, foi realizado uma proposta do mecanismo de reação para a eniatina B, sendo a mais conhecida.

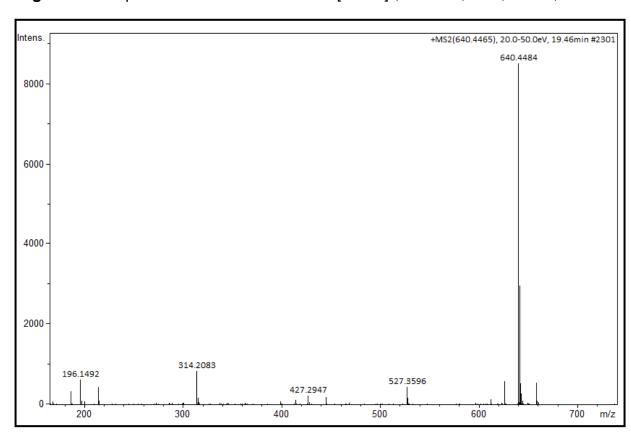


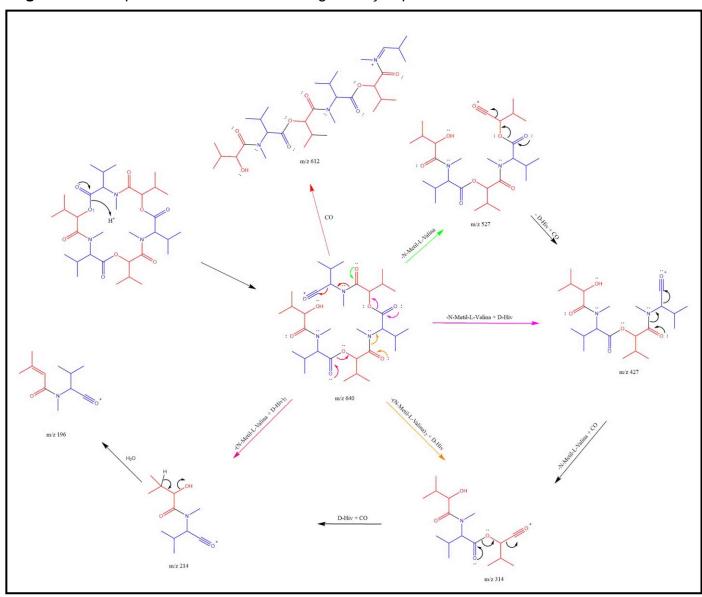
Figura 36 – Espectros de MS² da eniatina B [M + H]⁺, m/z 640,4484, TR 19,46 min.

Os fragmentos m/z 640,4484; 527,3596; 427,2847; 314,2083; 196,1492, são característicos das fragmentações da eniatina B. Os demais sinais observados em m/z 527,3596; 445,3146; 414,2626 e 186,1623 podem ser de reações por outras vias.

Na Figura 36 há um sinal de baixa intensidade com m/z 612,4505 que representa a saída do monóxido de carbono (-CO) por assistência anquimérica.

A partir da hidrólise da função éster, o que dá início então a uma cascata de reações, que promovem as eliminações via mecanismo E₂ observadas no espectro de MS² (CUOMO, 2013; SY-CONDERO, 2012).

Figura 37 – Proposta de mecanismo de fragmentação para a molécula da eniatina B.



Fonte: Do autor

Com a abertura da estrutura, pode ocorrer a saída do resíduo de *N*-metil-*L*-valina que corresponde a 113 Da que pode ocorrer a partir da reação de um próton com o nitrogênio do aminoácido, o que não é favorecido, visto a baixa reatividade do sistema de amidas e a deslocalização de seus pares de elétrons isolados, que ficam em ressonância com a carbonila, porém, dependendo das condições, essa reação

pode ocorrer conforme descrito por Daniel et al., (2016). Levando em consideração a reatividade dos derivados de ácido carboxílico, a abertura do anel é favorecida através da hidrólise da ligação éster, gerando um íon de *m/z* 527, 3596 [Íon + H]+, e de maneira semelhante, pode ocorrer a saída direta dos resíduos de N-metil-L-valina e ácido hidroxihidrovalérico (D-Hiv), gerando o fragmento m/z 427,3146. É observado também, entretanto, que ocorre a saída de forma sequenciada de do resíduo de ácido D-Hiv, levando ao mesmo fragmento m/z 427,3146 (SY-CONDERO, 2012; PROSPERINI, 2017).

Para o fragmento m/z 314,2083 observa-se os mesmos processos, podendo ser verificado uma diferença de m/z de 326, o que corresponde à saída de dois resíduos de N-metil-L-valina e um de D-Hiv, e observa-se também a perda sequencial de um resíduo de N-metil-L-valina a partir do fragmento m/z 427,3146.

O fragmento *m/z* 214,1338 aparentemente é gerado de duas formas, um sendo a saída de dois resíduos de *N*-metil-*L*-valina e dois de D-Hiv, como também a saída sequencial de um resíduo de D-Hiv a partir do fragmento 314,2083. Por fim, o fragmento *m/z* 196,1492 é referente à perda sequencial de uma molécula de água a partir do fragmento m/z 214,1492, vale ressaltar que todas as reações são regidas pela assistência anquimérica (SY-CONDERO, 2012; RICHER et al. 2014; PROSPERINI, 2017).

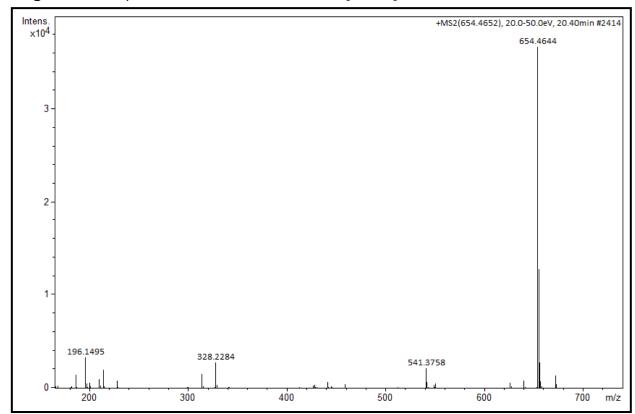
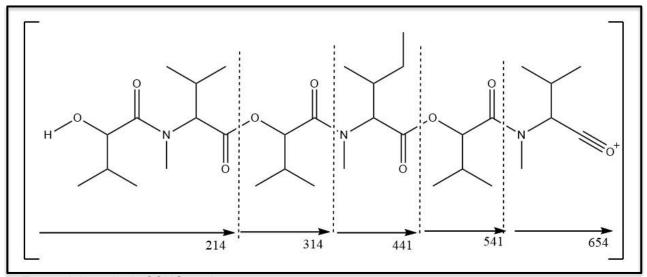


Figura 38 - Espectros de MS² da eniatina B1 [M + H] +, m/z 654,4652, TR 20,40 min.

Figura 39 - Padrão de fragmentação para a molécula eniatina B1.



Fonte: Adaptado de SONG et al. 2008

Na proposta de fragmentação para a eniatina B1, confirma as mesmas variações de resíduos de aminoácidos que a eniatina A1, porém, possuindo apenas um resíduo de N-metil-L-isoleucina em posição diferente da eniatina A1. Os fragmentos comumente encontrados para os análogos da eniatina são os m/z 441,

314, 214, o que acarreta na dificuldade de identificação absoluta dos análogos levando em consideração somente o perfil de fragmentação.

Com essa família da eniatina, todos os perfis de fragmentação seguem um padrão de eliminação, começando pelo ácido D-Hiv seguido pelos resíduos de amino ácidos característicos de cada composto. Assim, na Figura 39, inicialmente pode ser observado a eliminação de 28 Da do monóxido de carbono (-CO), gerando o fragmento 626, e saída de um fragmento de N-metil-L-leucina, obtendo o fragmento m/z 541. O fragmento m/z 314 é obtido com a eliminação de outro resíduo do ácido D-Hiv e por fim o fragmento m/z 214 é proveniente da saída de outra N-metil-L-leucina.

Figura 40 – Espectros de MS² da eniatina A1; E; G; H; I; O1; O2; O3 [M + NH4]⁺, m/z 685,5082, TR 21,24 min.

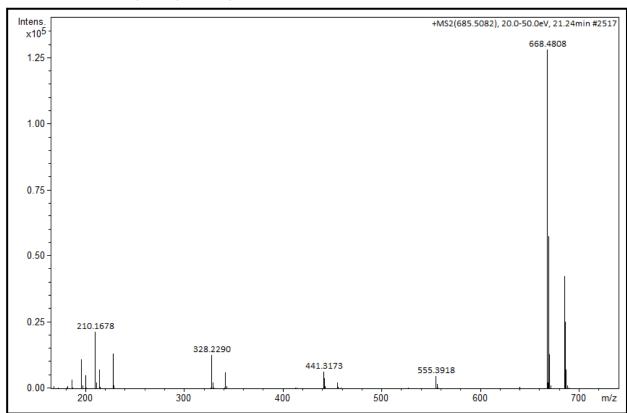
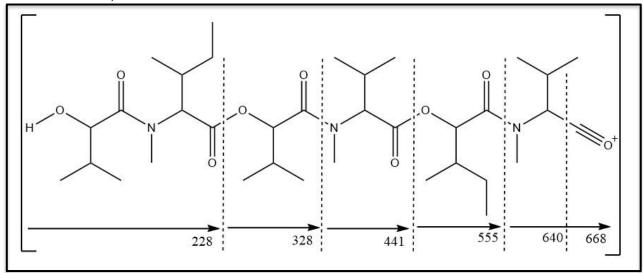


Figura 41 – Padrão de fragmentação para a molécula para a eniatina A1; E; G; H; I; O1; O2; O3.



Fonte: Adaptado de SONG et al. 2008

Analisando a Figura 40, inicialmente pôde ser observado a eliminação de 28 Da do monóxido de carbono (-CO), gerando o fragmento m/z 640, e a saída de um fragmento de N-metil-L-leucina, obtendo o fragmento m/z 555. O fragmento m/z 441 é proveniente da saída de um resíduo de N-metil-L-isoleucina, o fragmento m/z 314 é obtido com a eliminação de outro resíduo do ácido D-Hiv e por fim o fragmento m/z 214 é proveniente da saída de outra N-metil-L-isoleucina.

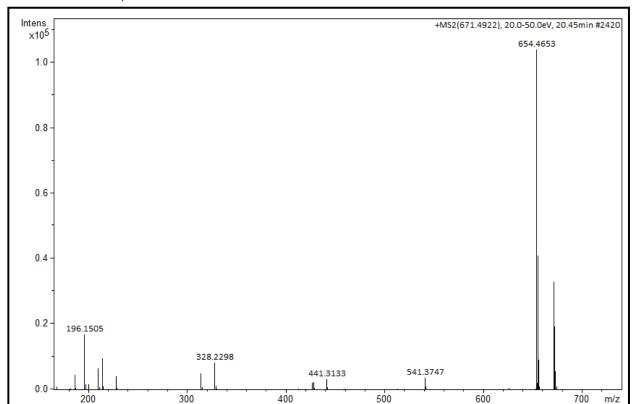
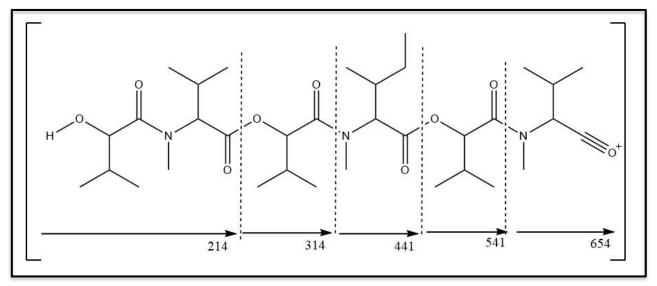


Figura 42 – Espectros de MS² da eniatina B1; B4 ou H [M + NH4]+, m/z 671,4920, TR 20,45 min.

Figura 43 – Padrão de fragmentação para a molécula para a eniatina B1; B4 ou H



Fonte: Adaptado de SONG et al. 2008

A Figura 43 apresenta o esquema de fragmentação para a eniatina B1 com aduto de amônio. Não é observado a perda de 28 Da, característico da saída do monóxido de carbono. Após a abertura da estrutura, ocorre a saída de um resíduo de N-metil-L-valina, gerando o fragmento *m/z* 541, posterior eliminação do ácido D-Hiv,

obtendo o fragmento m/z 441, e a saída de um fragmento de N-metil-L-isoleucina, gera o fragmento m/z 314 e por fim o fragmento m/z 214 é proveniente da saída de outro resíduo de ácido D-Hiv.

Figura 44 – Espectros de MS² da eniatina A; A2 ou C [M + H]⁺, m/z 682,4965, TR 22,09 min.

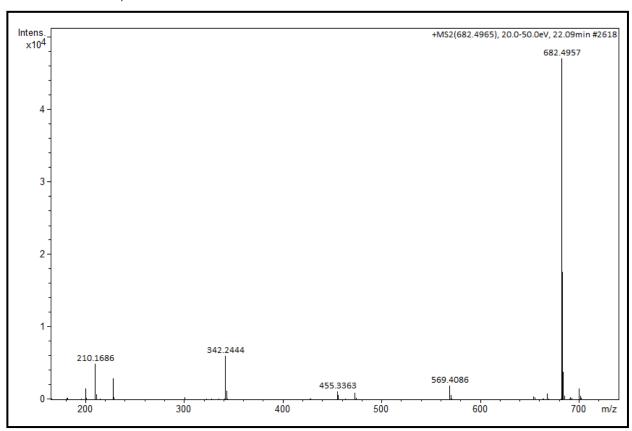


Figure 45 – Padrão de fragmentação para a molécula para a eniatina A, A2 ou C

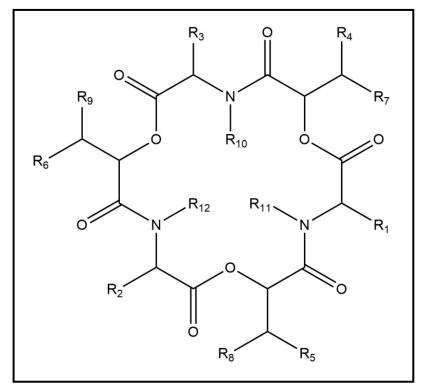
Fonte: Adaptado de SONG et al. 2008

No caso da Figura 44, o perfil de fragmentação é muito semelhante entre os análogos A; A2 e C, que apresentam os fragmentos m/z 682; 654 (saída da molécula de monóxido de carbono); m/z 569, saída de um resíduo de N-metil-L-isoleucina; m/z 455 com a saída do ácido D-Hiv, o fragmento m/z 342 é proveniente da saída de outro resíduo de N-metil-L-isoleucina.

4.7.2 Beauvericinas

As beauvericinas possuem esqueleto de carbonos muito semelhante às eniatinas, porém, diferentemente das eniatinas, elas consistem em três grupos N-metil-L-aminoácidos aromáticos alternados e até três grupos ácido D-2-hidroxisolvalérico. A Figura 46 apresenta o nodo identificado como sendo da beauvericina e seus análogos.

Figura 46 - Estrutura da beauvericina.



Fonte: Adaptado de URBANIAK et al. 2020

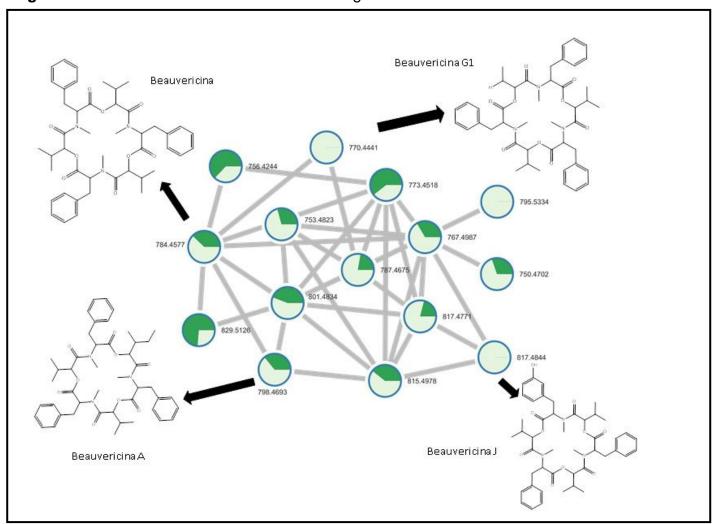
Tabela 16 - Substituintes identificados para as beauvericinas.

Composto	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12
Beauvericina	CH₂C ₆ H ₅	CH₂C ₆ H ₅	CH₂C ₆ H ₅	CH ₃	CH₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH₃	CH ₃
Beauvericina A/F	CH₂C ₆ H ₅	CH₂C ₆ H ₅	CH₂C ₆ H ₅	CH ₃	CH₃	CH ₂ CH ₃	CH₃	CH ₃				
Beauvericina B	CH₂C ₆ H ₅	CH₂C ₆ H ₅	CH₂C ₆ H ₅	CH₂CH₃	CH₂CH₃	CH ₂ CH ₃	CH ₃					
Beauvericina C	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	CH₃	CH₂CH₃	CH ₂ CH ₃	CH₃					
Beauvericina D	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	CH₂C ₆ H ₅	CH ₃	CH₃	CH₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	Н	CH ₃	CH ₃
Beauvericina E	CH₂C ₆ H ₅	CH₂C ₆ H ₅	iCH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃	CH₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH₃	CH ₃
Beauvericina J	CH₂C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₄ OH	CH ₃	CH₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
Beauvericina G1	CH ₂ C ₆ H ₅	CH₂C ₆ H ₅	CH₂C ₆ H ₅	CH ₃	CH₃	CH₃	Н	CH ₃				
Beauvericina G2	CH₂C ₆ H ₅	CH₂C ₆ H ₅	CH₂C ₆ H ₅	CH ₃	CH₃	CH ₃	Н	Н	CH ₃	CH ₃	CH₃	CH ₃
Beauvericina G3	CH₂C ₆ H ₅	CH₂C ₆ H ₅	CH₂C ₆ H ₅	CH ₃	CH₃	CH ₃	Н	Н	Н	CH ₃	CH₃	CH ₃
Beauvericina K	CH₂C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₄ OH	CH ₂ C ₆ H ₄ OH	CH ₃	CH₃	CH₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH₃	CH ₃
Beauvericina L	CH ₂ C ₆ H ₄ OH	CH ₂ C ₆ H ₄ OH	CH ₂ C ₆ H ₄ OH	CH₃	CH₃	CH₃	CH ₃					

Fonte: Adaptado de URBANIAK et al. 2020

Conforme descrito na seção das eniatinas, cada nodo dentro da rede molecular (Figura 47), representa uma coleção de espectros que compartilham o mesmo íon precursor, as relações entre esses nodos são determinadas pelo grau de similaridade entre esses espectros. Na Tabela 17, estão dispostas as relações m/z que foram anotados a partir dos espectros de MS².

Figura 47 - Nodo da beauvericina e seus análogos.



Com a aplicação dos dados de LC-MS tratados no GNPS, foram identificados 15 nodos pertencentes à família da beauvericina. Cada nosso representa uma variação das estruturas da beauvericina, podendo ser um análogo ou somente possuindo apenas adutos diferentes. No caso deste nodo, foi possível fazer anotações de cinco análogos distintos, e outros nodos sendo substâncias anotas, porém com adutos em suas estruturas.

Analisando os espectros de MS² de cada um dos nodos identificados pelo GNPS com dados presentes na literatura, não foi possível a identificação estrutural completa de todos os nodos, pois alguns compostos estavam muito diluídos no extrato que, mesmo sua massa específica condizendo com os dados da literatura, seu perfil de fragmentação não estava com resolução satisfatória para que fosse possível a visualização da estrutura de forma conclusiva. A Tabela 17, lista os compostos de algumas anotações que apresentaram dados suficientes para uma possível identificação.

Tabela 17 - Anotações do cluster da beauvericina passível de anotação.

Fórmula	Massa	Massa	Erro	Anotação	Aduto
molecular do íon	observada	calculada	(ppm)	Anotação	Addio
C ₄₅ H ₅₇ N ₃ O ₉	784,4524	784,4167	-4,55	Beauvericina	-
C45H61N4O9	801,4789	801,4433	-4,44	Beauvericina	NH ₄ +
C ₄₆ H ₆₀ N ₃ O ₉	798,4645	798,4324	-4,02	Beauvericina A	-
C ₄₄ H ₅₉ N ₄ O ₉	787,4612	787,4275	-4,28	Beauvericina D	NH ₄ +
C45H61N4O10	817,4726	817,4382	-4,20	Beauvericina J	NH ₄ +
C ₄₆ H ₆₃ N ₄ O ₉	815,4914	815,4589	-3,98	Beauvericina A/F	NH ₄ +

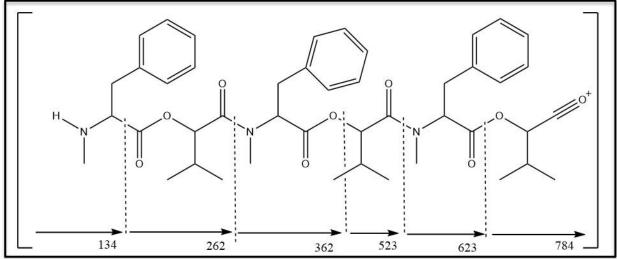
Outros nodos que não foram passiveis de anotação conclusiva, foi devido à dificuldade em determinar seus fragmentos. Mesmo possuindo fragmentos que são coerentes a esses compostos, não se obteve o perfil de fragmentação exato, ainda levando em consideração possíveis adutos à estrutura. Para esses compostos, pôdese indicar o que os dados mostraram, pois a massa exata está coerente com o encontrado na literatura (DANIEL et al. 2016; LIUZZI et a., 2017; URBANIAK et al., 2019), porém a composição dos resíduos de aminoácidos e ácido D-Hiv, não condizia com os dados encontrados neste estudo. Dessa forma, consta apenas a indicação da possibilidade de anotação. A Tabela 18 apresenta esses compostos.

Tabela 18 - N	lodos sem	anotação	conclusiva.
---------------	-----------	----------	-------------

Fórmula	Massa	Massa	Erro	Sugastão
molecular	observada	calculada	(ppm)	Sugestão
C ₄₂ H ₆₀ N ₃ O ₉	750,4642	750,4324	-4,23	Beauvericina K ou
C421 1601 13 C9	730,4042	730,4324	-4,23	Beauveniatina L
C42H60N3NaO9	773,4452	773,4221	-2,98	Beauvericina K ou
C421 1601N31NAC9	773,4432	113,4221	-2,90	Beauveniatina L
C42H63N4O9	767,4928	767,4589	-4,41	Beauvericina K ou
C42F1631 N 4C9	707,4920	707,4309	-4,41	Beauveniatina L
C ₄₆ H ₅₆ N ₃ O ₉	770,4323	770,4011	-4,05	Beauvericina G1
C43H54N3O9	756,4191	756,3854	-4,45	Beauvericina G2

Com relação às beauvericinas, em ambos os extratos analisados também apresentaram ocorrências dos mesmos compostos, porém, em proporções diferentes. Como ocorre com as eniatinas, as beauvericinas apresentam uma estrutura muito parecida, todos seus análogos se diferem apenas pelo aminoácido que está presente. A distribuição dos resíduos de L-aminoácidos (N-metil-L-fenilalanina) e o ácido D-Hiv são idênticas, tanto para as eniatinas, quanto para as beauvericinas, por esse motivo, muitos espectros de fragmentação são bem parecidos, alterando apenas o m/z decorrente da mudança do aminoácido presente. A Figura 47, apresenta a representação da fragmentação da beauvericina.

Figure 48 – Padrão de fragmentação para a molécula para a Beauvericina.



Fonte: Adaptado de SONG et al. 2008

Analisando o *cluster* formado na rede molecular que se refere à classe da beauvericina, é possível observar a presença de algumas moléculas que contém adutos de amônio (NH₄+) e sódio (Na+). Sendo assim, para demonstrar as fragmentações, foram utilizadas somente os compostos sem aduto, apenas os compostos protonados. As figuras que seguem apresentam os espectros de MS² dos compostos anotados nos nodos da rede molecular.

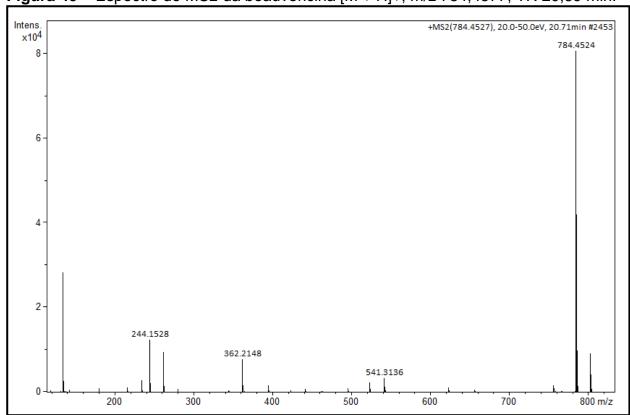


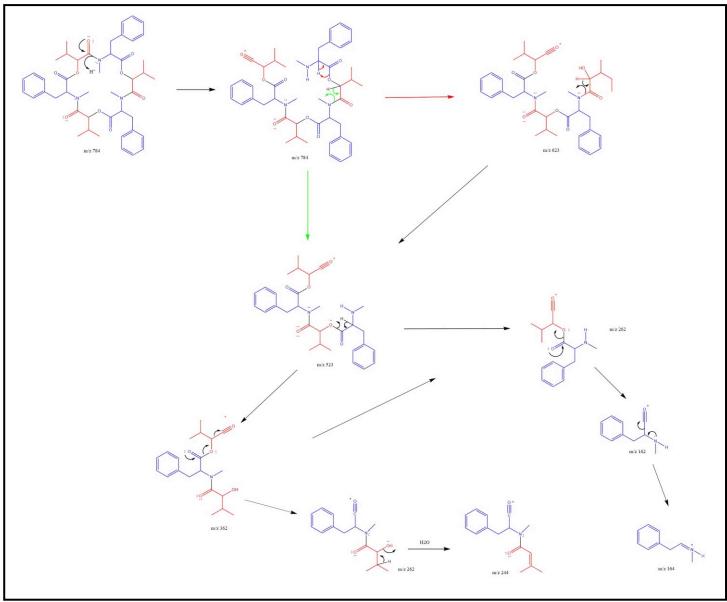
Figura 49 - Espectro de MS2 da beauvericina [M + H]+, m/z 784,4577, TR 20,69 min.

As fragmentações sugerem as mesmas clivagens observadas para as eniatinas assim como também clivagens características de peptídeos, no caso da beauvericina essa clivagem é do tipo *y/b*. Diferentemente da eniatina B, o início da fragmentação/abertura da estrutura cíclica, se dá através da clivagem da ligação peptídica e posterior clivagem da função éster (QINGGUI; LIJIAN. 2012; VIJLDER, 2017).

Decorrente da abertura da estrutura que da mesma forma que as eniatinas, configura um depspeptideo linear, favorecendo as interações que promovem a fragmentação nas ligações dos grupos ésteres e amidas. O fragmento m/z 756,4518 pode indicar a saída de uma molécula de monóxido de carbono (-CO 28 Da) de forma

semelhante ao que ocorre com as eniatinas (JOHANSSON, 2010; DANIEL et al., 2016; SELEGATO et al., 2023).

Figura 50 – Proposta de mecanismo de fragmentação para a molécula da beauvericina



Fonte: Do autor

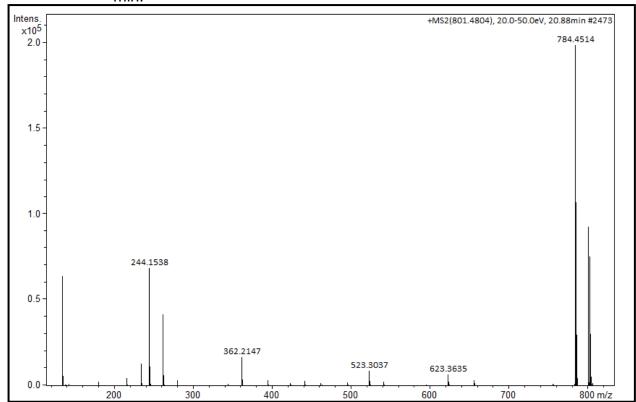
Os demais fragmentos, ao que pode ser observado, são eliminados através de um processo chamado assistência anquimérica. O fragmento m/z 623,3633, é derivado da saída de um resíduo de N-Metilfenilalanina. Já o fragmento m/z 523,3054 pode ser derivado de uma perda sequencial de um resíduo de D-Hiv. Pode ocorrer também a saída de um resíduo de N-Metilfenilalanina e um de D-Hiv gerando o íon fragmento 523,3054, entretanto, há indicativos de que pode ocorrer apenas uma

clivagem sequencial do fragmento m/z 623,3633, saindo um resíduo de D-Hiv (DANIEL et al., 2016; SELEGATO et al, 2023).

A partir do fragmento m/z 623,3633 há possibilidade de gerar dois outros íons fragmentos, o íon fragmento m/z 362,2148, com a saída de um resíduo de N-Metilfenilalanina, ou pode gerar o íon fragmento m/z 262,1636, que provém da saída de um resíduo de N-Metilfenilalanina e um de D-Hiv. Contudo, com uma fragmentação sequencial do fragmento m/z 362,2148, saindo um resíduo de D-Hiv, gera o mesmo fragmento m/z 262,1636. Analisando os fragmentos de menores m/z, 244,1676 e 134,0993, eles são obtidos através da separação dos resíduos de N-Metilfenilalanina e D-Hiv restantes gerando o fragmento m/z 134,0993 ou então através de desidratação para obtenção do fragmento m/z 244,1676 (DANIEL et al., 2016; SELEGATO et al., 2023).

Os demais compostos anotados são apresentados pelos espectros de fragmentação MS² que seguem. Somente foram mostrados as fragmentações das estruturas protonadas e para as que possuem adutos, somente o espectro MS², visto a igualdade das fragmentações.

Figura 51 - Espectros de MS² da beauvericina [M + NH4]+, m/z 801,4834, TR 20,64 min. +MS2(801.4804), 20.0-50.0eV, 20.88min #2473 x10⁵ 784.4514



A diferença neste espectro é a presença da amônia no íon fragmento, resultando numa m/z 801,4834 (Figura 50).

Analisando o perfil de fragmentação da beauvericina A, ela ocorre de forma ligeiramente diferente da beauvericina, que os fragmentos indicam eliminações em sequência dos resíduos de ácido D-Hiv e dos resíduos de aminoácidos, além de um de seus aminoácidos, mais especificamente na posição R6, sendo o N-metil-L-isoleucina.

Figura 52 – Espectros de MS² da beauvericina A/F [M + H]⁺, m/z 798,4693, TR 21,40 min.

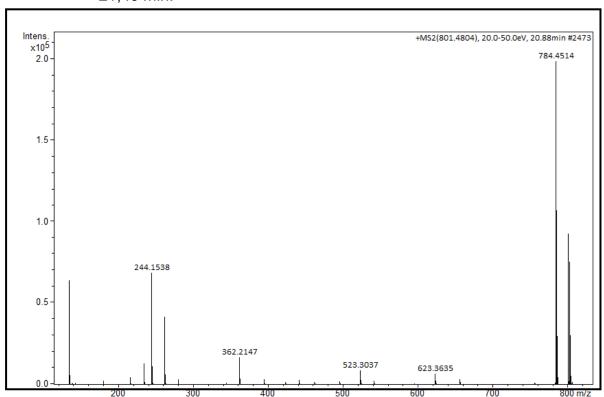


Figure 53 - Padrão de fragmentação para a molécula para a beauvericina A/F.

Quando a molécula eniatina A/F (Figuras 51) foi observada apenas na sua forma protonada, o perfil de fragmentação aparentemente segue o mesmo identificado para a beauvericina, que ao que tudo indica, ocorre inicialmente a perda de um grupo metila (-CH₃), gerando o fragmente m/z 784,4505, que corresponde à beauvericina (Figura 49) e a partir desse fragmento, são observados os fragmentos característicos de fragmentações sequenciais, obtendo os fragmentos m/z 623,3581, m/z 523,3118, m/z 362,1655 e m/z 134,0998.

Com a beauvericina A/F (Figuras 52 e 53), a partir da abertura da molécula, ocorre inicialmente a saída de um fragmento de L-metilfenilalanina obtendo o fragmento m/z 637,3794 e após essa saída, na extremidade oposta da molécula, um resíduo de ácido D-Hiv é eliminado, gerando o fragmento *m/z* 537,3226. A partir deste fragmento, a saída dos próximos resíduos serão sequenciais, resultando nos fragmentos m/z 376,2306, m/z 294,1982, que são característicos para essa estrutura, segundo Daniel et al., (2016), porém, esse perfil de fragmentação só pôde ser observado quando a molécula estava com aduto de amônio (NH₄+). Os demais fragmentos observados no espectro MS² podem ser provenientes de outra rota de fragmentação.

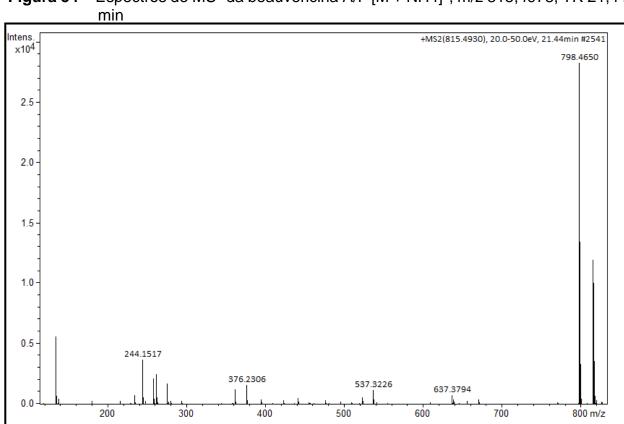


Figura 54 – Espectros de MS² da beauvericina A/F [M + NH4]⁺, m/z 815,4978, TR 21,44

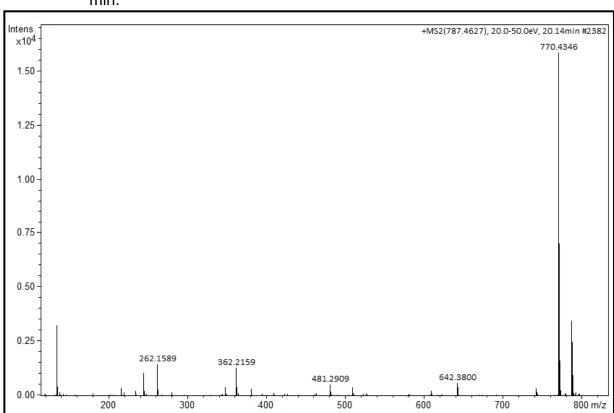
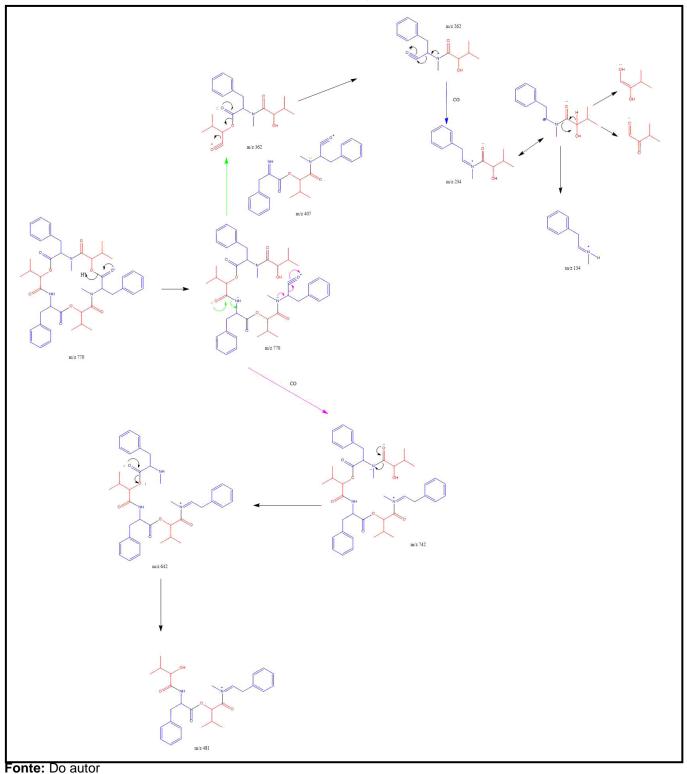


Figura 55 – Espectros de MS² da beauvericina D [M + NH4]⁺, *m/z* 787,4675, TR 20,09 min.

Analisando o perfil de fragmentação encontrado para a beauvericina D (Figura 54) e na tentativa de entender os fragmentos formados, notou-se que as quebras de ligação não seguem o padrão identificado para os outros análogos e nem para as eniatinas, onde, por meio da assistência anquimérica, as ligações peptídicas e os ésteres eram clivados, promovendo a saída dos resíduos de ácido e aminoácidos. Nesse caso, pode-se sugerir que ainda ocorrem as assistências anquiméricas, através do movimento de elétrons, mas de uma forma um pouco diferente, onde a interação com a amônia se deu no oxigênio da carbonila e não no oxigênio do éster.

Outro caso semelhante onde a fragmentação não seguiu o padrão descrito para os demais análogos, foi com a beauvericina J, conforme Figura 56 mostra que alguns fragmentos parecem ser obtidos após a interação do íon amônio com o oxigênio da carbonila, entretanto, outros fragmentos foram gerados a partir da quebra da ligação peptídica e de éster.

Figura 56 - Proposta de mecanismo de fragmentação para a molécula da beauvericina D



Analisando o perfil de fragmentação da beauvericina D (Figura 55) foi identificado que as fragmentações que ocorrem com sua estrutura não seguem um padrão sequencial como foi observado nas eniatinas. Neste caso, várias reações concorrentes ocorrem de maneira concomitante. O primeiro passo é a abertura da

estrutura, através da clivagem da ligação de éster ou a ligação peptídica, conforme já mencionado. Notou-se a saída de 28 Da, característico da eliminação da molécula de monóxido de carbono gerando o fragmento *m/z* 742.

Ocorre também a clivagem de uma ligação peptídica, dividindo a molécula praticamente ao meio, gerando os fragmentos m/z 362 e m/z 407. No espectro, o fragmento m/z 407 é de menor intensidade que o m/z 362 e a partir deste fragmento m/z 362, ocorre a eliminação de um resíduo do ácido D-Hiv, obtendo o fragmento m/z 262. Já a partir do fragmento m/z 742, ocorre a eliminação de outro fragmento de ácido D-Hiv de 100 Da, obtendo assim o fragmento m/z 642, que por sua vez, promove o rompimento da ligação peptídica, saindo um fragmento de 162 Da, gerando o íon fragmento m/z 481.

Nenhum outro fragmento foi identificado partindo do íon m/z 481. A próxima fragmentação observada parte do fragmento *m/z* 362, onde, com a saída de outra molécula de monóxido de carbono, gera o fragmento *m/z* 234, que apresenta ressonância de uma carga residual positiva entre os átomos de carbono (carbocátion secundário) e o nitrogênio, que acarreta na liberação de outro resíduo de ácido, gerando o fragmento m/z 134.

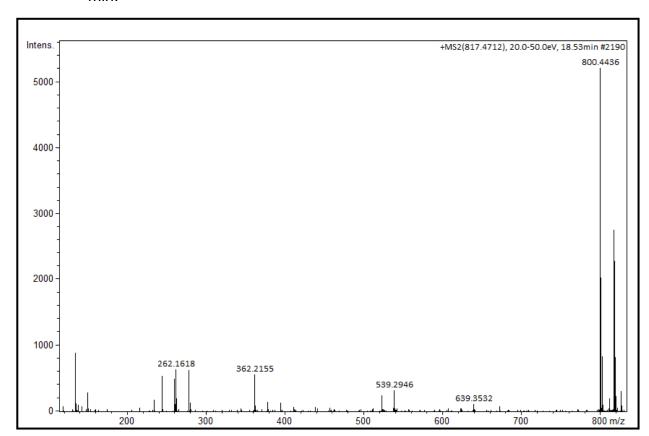


Figura 57 – Espectros de MS² da beauvericina J [M + NH4]⁺, m/z 817,4771, TR 18,43 min.

Quando analisamos o perfil de fragmentação da beauvericina J (Figura 56), foi possível observar diferenças nos padrões de fragmentação que foram indicados em seus análogos. Nesse caso em específico, ocorrem mais reações concorrentes do que as anteriores, pois anteriormente era possível verificar uma certa sequência de eliminação de resíduos de aminoácidos, já com a beauvericina J isso ocorre de maneira menos favorecida.

A Figura 57, mostra uma proposta de fragmentação baseada nos sinais mais intensos observados no espectro de MS² (Figura 56). Ao analisar esse espectro, é perceptível três rotas distintas de fragmentação a partir da abertura da estrutura.

Houve a ocorrência de um fragmento m/z 773, oriundo da eliminação de CO característico para esses compostos, que ocorre também a saída de um resíduo de N-metilfenilalanina e um do ácido D-Hiv gerando o fragmento m/z 539, ao passo que uma clivagem da ligação de éster ocorre, liberando dois fragmentos de N-metilfenilalanina e um do ácido D-Hiv, gerando o fragmento m/z 362. A partir do fragmento m/z 362, ocorre a eliminação de outro resíduo do ácido D-Hiv que gera o

fragmento *m/z* 262, que por sua vez, elimina outra molécula de monóxido de carbono, gerando um fragmento *m/z* 234. Esse fragmento, possui dois híbridos de ressonância, onde a carga positiva residual se move entre o átomo de nitrogênio e o átomo de carbono. Quando essa carga está no átomo de carbono, gerando um carbocátion secundário, ocorre a clivagem da ligação peptídica, com retenção de hidrogênio, gerando outro fragmento com m/z 134.

Figura 58 - Proposta de mecanismo de fragmentação para a molécula da beauvericina J

Fonte: Do autor

5 CONCLUSÃO

Com a obtenção dos dados referentes aos extratos selecionados (SSR4 e SSR14), foi possível identificar um grande potencial dos compostos produzidos pelo fungo *F. oxisporum*. Apesar dos extensos estudos sobre sua patogenicidade em várias culturas agrícolas, avaliou-se sua eficácia contra diversas espécies de microrganismos, demonstrando que também pode proporcionar benefícios não apenas ao seu hospedeiro.

Quanto à biblioteca de fungos das raízes de *S. spectabilis*, observou-se que a maioria dos fungos identificados neste estudo pertence ao gênero *Fusarium*, evidenciando sua capacidade de se destacar em relação a outras espécies de fungos geralmente não encontradas na rizosfera. Dos 14 fungos isolados, 6 deles foram identificados como *F. oxysporum*.

Embora não tenha sido realizado o isolamento dos compostos presentes nos extratos utilizados neste trabalho, foi possível confirmar e identificar a presença de alguns compostos como por exemplo os polipeptídeos; beauverina e eniatinas, que são os responsáveis pelas atividades de erradicação de biofilme e ação antibacteriana demonstradas nos ensaios biológicos. Isso confirma o grande potencial da utilização de fungos endofíticos como fonte de compostos bioativos.

Com a predominância dos compostos beauvericina e eniatina e, também, a presença de outras classes de compostos como terpenóides e alcaloides, os extratos apresentaram diversas atividades biológicas, em especial a capacidade de erradicação de biofilme, onde foi obtido um percentual de erradicação de 99% frente a bactérias resistentes a antibióticos. Esses dados evidenciam a importância de estudos que aplicam fungos endofíticos como fonte de produtos naturais na busca por novos fármacos.

Referências

ANDREAS, D.; SEBASTIAN, W.; PETER, D. Pharmacology and Cardiovascular Implications of the Kinin-Kallikrein System. **Japanese Journal of Pharmacology**. v. 79, n. 4, p. 403-426, 1999.

APTROOT A. Lichenized and saprobic fungal biodiversity of a single Elaeocarpus tree in Papua New Guinea, with the report of 200 species of ascomycetes associated with one tree. **Fungal Divers**. v. 6, p. 1–11, 2001.

ARNOLD A. E, Maynard Z, Gilbert GS, Coley PD, Kursar TA. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse?. **Ecology Letters**. v. 3, p. 267–274, 2000.

AZEVEDO, J.L. et al. Endophytic Microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. Electronic Journal of Biotechnology, v.3, n.1, p.40-65, 2000

BACON, C. W.; WHITE, JR. J. F. Microbial Endophytes: Evolution, Diversity, Community Functions and Regulation. In: Hurst, C. J. **Understanding Terrestrial Microbial Communities**. Springer, 2016.

BACON, C. W.; WHITE, JR. J. F. Microbial Endophytes: Evolution, Diversity, Community Functions and Regulation. In: Hurst, C. J. **Understanding Terrestrial Microbial Communities**. Springer, 2016.

BENTES, V. S. et al. Atividade antimicrobiana produzida por fungos filamentosos isolados das águas do Baixo Rio Tapalós, Pará, Brasil. **Scientia Plena**. v. 19, n. 07, 2023.

BIASETTO, C. R. Fungos endofíticos em *Eugenia brasiliensis*: prospecção química, biológica, enzimática e avaliação do co-cultivo e epigenética em *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp. 2016. 225 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

BISBY, G. R. "Geographical Distribution of Fungi." **Botanical Review**. v. 9, n. 7, 1943, p. 466–82. Disponível em: http://www.jstor.org/stable/4353291. Acesso em: 27 Fev. 2024.

BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3 . . . 5.1 million species? **American Journal of Botany**. v. 98, n. 3, p. 426–438, 2011.

CAFÊU, M. C. et al. Substâncias antifúngicas de *Xylaria sp.*, um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Quím. Nova**, v. 28, n. 6, p. 991-995, 2005.

CANNON P. F. Diversity of the Phyllachoraceae with special reference to the tropics. In: Hyde KD, ed. **Biodiversity of tropical microfungi**. Hong Kong: Hong Kong University Press; 1997. p. 255–278.

CASTLEBURY, L. A. et. al. Use of a bioassay to evaluate the toxicity of beauvericin to bacteria. **World Journal of Microbiology &. Biotechnology**. v. 15, p. 119–121, 1999.

CASTRO, A. T. et al. In vitro Evaluation of the Schitosomicidal Effect of the Extracts, Fractions and major 3-Hydroxy-2,6-Dialkyl-Substituted Piperidine Alkaloids from the Flowers of *Senna spectabilis* (Fabaceae). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.** v. 26, n. 17, p. 4197-4204, 2016.

CEVALLOS-CEVALLOS, J. M., et. al. Metabolomic analysis in food Science: a review. **Trends in Food Science & Technology**. v. 20, p. 557-566. 2009.

CHAMBERS, M. C. et al. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. **Nature Biotechnology**. v. 30, n. 10. P-918-920. 2012.

CHAN, W. J. J; et al. Interactions between natural produts and cancer treatments: underlying mechanismos and clinical importance. **Cancer chemotherapy and Pharmacology**. v. 91, p. 103-119, 2023.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: Uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. Revista Virtual de Química. v. 5, n. 3, p. 421-437. 2013.

CHÁVEZ-HERNÁNDEZ, A. L. et al. A Fragment Library of Natural products and its Comparative Chemoinformatic Characterization. **Molecular Informatics. v**. 39, n. 11, p. 1-17, 2020.

CIRIELLO, R.; LO MAGRO, S.; GUERRIERI, A. Assay of serum cholinesterase activity by an amperometric biosensor based on a co-crosslinked choline oxidase/overoxidized polypyrrole bilayer. **Analyst**. v.143, n. 4, p. 920–929, 2018.

CROUS P. W. How many species of fungi are there at the tip of Africa? **Studies in Mycology**. v. 55, p. 13–33, 2006.

CUOMO, V. et al. production of enniatins A, A1, B, B1, B4, J1 by fusarium trincinctum in solid corn culture: Structural analysis and effects on mitochondrial respiration. Food Chemistry. p. 1-10. 2013.

DAI Y. C, ZHUANG J. Y. Numbers of fungal species hitherto known in China. **Mycosystema**. v. 29, p. 625–628, 2010.

DANIEL, J.F. et. al. Larvicidal Activity of Beauveria bassiana Extracts against Aedes aegypti and Identification of Beauvericins. **Journal of Brazilian Chemical Society.** v. 0, n. 0, p. 1-11. 2016.

DE FELICE, B.; SPICER, L.J.; CALONI, F. Enniatin B1: Emerging Mycotoxin and Emerging Issues. **Toxins.** v.15, n. 383, p. 1-13. 2023.

DE MEEÛS, T; RENAUD, F. Parasites within the new phylogeny of eukaryotes. **Trends Parasitol**. v.18, p. 247–251, 2002.

DING, G. et al. Antifungal Metabolites from the Plant Endophytic Fungus *Pestalotiopsis foedan.* **Journal of Natural Products**. v. 71, p. 615-618, 2008.

DOMINEK, P. et al. Role of Human Tissue Kallikrein in Gastrointestinal Stromal Tumour Invasion. **British journal of Cancer**. n. 103, n. 9, p. 1422-1431, 2010.

DORNETSHUBER, R. et. al. Enniatin exerts p53-dependent cytostatic and p53-independent cytotoxic activities against human cancer cells. **Chemical Research in Toxicology**. v.20, p. 465–473, 2007.

DORNETSHUBER-FLEISS, R. et al. The Naturally Born Fusariotoxin Enniatin B and Sorafenib Exert Synergistic Sctivity Against Cervical Cancer in Vitro and in Vivo. Biochemical Pharmacology. v. 93, p. 318–331, 2015.

DREYFUSS M. M.; CHAPELA, I. H. Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. In: Gullo V, ed. **The discovery of natural products with therapeutic potential**. London: Butterworth Heinemann; p. 49–80, 1994.

EDEL-HERMANN, V.; LECOMTE, C. Current Status of *Fusarium oxysporum* Formae Speciales and Races. **Phytopathology**, v. 109, p. 512–530, 2019.

ELDUFANI, J.; BLAISE, G. The role of acetylcholinesterase inhibitors such as neostigmine and rivastigmine on chronic pain and cognitive function in aging: A review of recent clinical applications. **Alzheimer's Dementia: Translational Research & Clinica Interventions**. v. 5, p. 175-183, 2019.

ESPOSITO, E., AZEVEDO, J.L. Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia, 2a. ed., EDUCS:Caxias do Sul, 638p, 2010.

FERREIRA, J.; SANTOS, S.; PEREIRA, H. In Vitro Screening of Acetylchilinesterase Inhibition and Antioxidant Activity of Quercus suberCork and Corkback Extracts. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. p. 1-8, 2020.

FREITAS, T. R. et al. Mass spectrometry for characterization of homologous piperidine alkaloids and their activity as acetylcholinesterase inhibitors. **Rapid Commun Mass Spectrometry.** v. 32, p. 1303-1310, 2018.

FRÖHLICH, J.; HYDE, K. D. Biodiversity of palm fungi in the tropics: are global fungal diversity estimates realistic? **Biodiversity Conservation**. v. 8, p. 977–1004, 1999.

FUKUDA, T. et. al. New beauvericins, potentiators of antifungal miconazole activity, Produced by Beauveria sp. FKI-1366. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. **The Journal of Antibiotics**. v. 57, p. 110–116, 2004.

GAO, H. et al. Structural Diversity and Biological Activities of Novel Secondary Metabolites from Endophytes. **Molecules**, v. 23, n. 646, p. 1-31, 2018.

GREIG, N.H.; LAHIRI, D.K.; SAMBAMURTI, K. Butyrylcholinesterase: An important new target in Alzheimer's disease therapy. **International Psychogeriatrics**. v. 14, p. 77–91, 2002.

GRIGALUNAS, M., BRAKMANN, S., WALDMANN, H. Chemical Evolution of Natural Products Structure. **Journal of the American Chemical Society.** v. 114, p. 3314-3329, 2022.

GUIMARÃES, D. O. et al. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 52, p. 134-144, 2008.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Coccurrence. **Journal of Natural Products.** v. 69, p. 509-526, 2006.

GUO, B. et al. Bioactive natural Products from Endophytes: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology.** v. 44, n. 2, p. 153-158, 2008.

GUO, B. et al. Cytonic Acids A and B: Novel Tridepside Inhibitors of hCMV Protease from the Endophytic Fungus *Cytonaema* Species. **Journal of Natural Products.** v. 63, p. 602-604, 2000.

GUZMAN, G. Inventorying the fungi of Mexico. **Biodiversity Conservation**. v. 7, p. 369-385, 1998.

HAMMOND, P. M. Species inventory. In: Groombridge B, ed. **Global** biodiversitybiodiversity: status of the Earth's living resources. London: Chapman and Hall; p. 17–39, 1992.

Hammond, P. M. The current magnitude of biodiversity. In Heywood V, ed. **Global biodiversity assessment.** Cambridge Cambridge University Press; p. 113–138, 1995.

HASUDA, A. L.; BRACARENSE, A. P. F. R.L.; Toxicity of the emerging mycotoxins beauvericin and enniatins: A mini-review. **Toxicon**. v. 239, p. 1-9, 2024.

HAWKSWORTH D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**. v. 95, n. 6, p. 641-655, 1991.

HAWKSWORTH D. L.; LUECKING, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. **Microbiology Spectrum.** v.5, n.4, p. 1-17, 2017.

HAWKSWORTH, D. L. Global species numbers of fungi: are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate? **Biodiversity Conservation**. v. 21, p. 2425–2433, 2012.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research.** v.105, p. 1422–1432, 2001.

HUNG, T. M. et al. Labdane-type Diterpenoids from Leonurus heterophyllus and Their Cholinesterase Inhibitory Activity. **Phytotherapy Resaesch**. v. 25, p. 611-614, 2011.

HYWEL-JONES, N. A systematic survey of insect fungi from natural tropical forest in Thailand. In: Isaac S; Frankland, J. C.; Watling, R.; Whalley, A. J.S. ed. **Aspects of tropical mycology**. Cambridge: Cambridge University Press; p. 300–301, 1993.

IGIEHON, N. O.; BABALOLA, O. O.; CHESETO X.; TORTO, B.; Effects of rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi on yield, size distribution and fatty acid of soybean seeds grown under drought stress. **Microbiological Research**. v. 242, p. 1-16, 2021.

JESTOI, M. et. al. Presence and concentrations of the Fusarium-related mycotoxins beauvericin, enniatins and moniliformin in finnish grain species. **Food Additives & Contaminants.** v.21, p. 794–802, 2004.

JOHANSSON, Henrik A.B. Fragmentation of Amino Acids and Microsolvated Peptides and Nucleotides using Electrospray Ionization tandem Mass Spectrometry. Stockholm: Stocholm university, 2010.

JOW, G. M.; CHOU, C. J.; CHEN, B. F.; TSAI, J. H. Beauvericin induces cytotoxic effects in human acute lymphoblastic leukemia cells through cytochrome c release, caspase 3 activation: The causative role of calcium. **Cancer Letters.** v. 216, p. 165–173, 2004.

KHARWAR, R. N. et. al. Javanicin, an Antibacterial Naphthaquinone from an Endophytic Fungus of Neem, *Chloridium sp.* **Current Microbiology.** v. 58, p. 223-238, 2009.

KOZAKAI, N. et al. First Total Syntheses of Beauvericin A and *allo*-Beauvericin A. **ACS Omega**. v. 9, p. 12228-12236. 2024.

KUMAR, D. S. S. et al. Immunomodulatory compounds from *Pestalotiopsis leucothës*, an endophytic fungus from *Tripterygium wilfordii*. **Life Sciences**, v. 78, p. 147-156, 2005.

LACERDA, R. B. M. et al. Isolation, leishmanicidal evaluation and molecular docking simulations of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 26, p. 5816-5823, 2018.

LI, M. et al. Fusarium: A treasure trove of bioactive secondary metabolites. **Natural Product Reports**. v. 37, p. 1568–1588, 2020.

LI, S. J. et al. Novel natural compounds from endophytic fungi with anticancer activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 156, p. 316–343, 2018.

LI, Y.; HAI, S.; ZHOU, Y.; DONG, B.R. Cholinesterase inhibitors for rarer dementias associated with neurological conditions. **Cochrane Database of Systematic Reviews.** v. 3, p. 1-43, 2015.

Lin, H.I. et al. Involvement of Bcl-2 family, cytochrome c and caspase 3 in induction of apoptosis by beauvericin in human non-small cell lung cancer cells. **Cancer Letters.** v. 239, p. 248–259, 2005.

LIN, Z-J. et al. Penicillenols from Penicillium sp. GQ-7, an Endophytic Fungus Associated with *Aegiceras corniculatum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.56, n. 2, p. 217-221, 2008.

LIUZZI, V. C. et al. Enniatin and Beauvericin Biosynthesis in Fusarium Species: Production Profiles and Structural Determinant Prediction. **Toxins**. v. 9, n. 45. P. 1-17. 2017.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2009. v. 2, p. 384.

M. R. CUNHA, M. R. et al. Natural product inspired optimization of a selective TRPV6 calcium channel inhibitor. **Royal Society of Chemistry**. v. 11, p. 1032-1040, 2020.

Martin, G. W. "The Numbers of Fungi," **Proceedings of the Iowa Academy of Science**, v. 58, n. 1, p. 175-178, 1951.

May, R. M. The dimensions of life on earth. In: Raven, P. H.; Williams, T. ed. **Nature and human society: the quest for a sustainable world**. Washington: National Academy Press; p. 30–45, 2000.

MAZUMDER, P. M.; PERCHA, V.; FARSWAN, M.; UPAGANLAWAR, A. Cassia: um presente maravilhoso para as ciências médicas. **Internacional j. Clin. Farmacêutico**. v. 1, p. 16-38, 2008.

MECA, G. et al. Antibacterial activity of the enniatin B, produced by Fusarium tricinctum in liquid culture, and cytotoxic effects on Caco-2 cells. **Toxicology Mechanisms and Methods.** v. 21, p. 503–512, 2011.

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

MONTEIRO, A. F. et al. Biotransformation of labdane and halimane diterpenoids by two filamentous fungi strains. **Royal Society Open Cience**. v. 4, p. 1-11, 2017.

MONTON, M. R. N., SOGA, T., Metabolome analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1168, n 1-2, p. 237-246. 2007.

MORA, C. How many species are there on Earth and in the ocean? **PLoS Biology**. v. 9, n. 8, p. 1-8, 2011.

MORAES, A. M. L.; PAES, R. A.; HOLANDA, V. L. Introdução à Micologia: Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde, v. 04. **Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio**, Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

MUNKVOLD, G. P. Fusarium species and their associated mycotoxins. **Methods in Molecular Biology**. v. 1542, p. 51–106, 2017.

NAMVAR, A.E. et al. Clinical characteristics of Staphylococcus epidermidis: a systematic review. **GMS Hygiene and Infection Control.** v.9, n. 3, p. 1-10, 2014.

NGOKA, L. C. M.; GROSS, M. L.; TOOGOOD, P. L. Sodium-directed selective cleavage of lactones: a method for structure determination of cyclodepsipeptides. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 182–183, p. 289–298, 1999.

NISA, H. et al. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and others bioactive natural products: a review. **Microbial Pathogenesis**, v. 82, p. 50-59, 2015.

NISA, H. et al. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and otherbioactive natural products: A Review. **Microbial Pathogenesis.** v. 82, p. 50-59, 2015.

Nothias, L.-F., Petras, D., Schmid, R. et al. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. **Nature. Methods**. v. 17, p. 905–908, 2020.

NOTHIAS, L-F. et al. Feature-bades molecular networking in the GNPS analysis environment. **Nature Methods**. v. 17, p. 905-908, 2020.

O'Brien, H. E. et al. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 71, p. 5544–5550, 2005.

ODELADE, K. A.; BABALOLA, O. O. Bacteria, Fungi and Archaea Domains in Rhizospheric Soil and Their Effects in Enhancing Agricultural Productivity. **International Journal Environmental and Public Health**. v. 16, n. 20, p. 1-19, 2019.

OLEIK, H. et al. Comparative Structure-Activity Analysis of Antimicrobial Activity, Cytotoxicity, and Mechanism of Action of the Fungal Cyclohexadepsipeptides Enniatin and Beauvericin. **Toxins**. v. 11, n. 514, p. 1-25, 2019.

PASCOE, I. History of systematic mycology in Australia. In: Short, P. S. ed. **History of systematic botany in Australia.South Yarra**: Australian Systematic Botany Society; p. 259–264, 1990.

PEREIRA, R. M. et al. Alkaloids derived from flowers of *Senna spectabilis*, (-)-cassine and (-)-spectaline, have aniprolifertive activity on HepG2 cells for inducing cel cyle arrest in G1/S transition through ERK inactivation and downregulation of ciclin D1 expression. **Toxicology in Vitro**, v. 31, p. 86-92, 2016.

PIROZYNSKI, K. A.; MALLOCH, D. W. The origin of land plants: A matter of mycotrophism. **Biosystems.** v. 6, n. 3, p. 153-164. 1975.

PIVATTO, M. et al. Antimalarial Activity of Piperidine Alkaloids from *Senna spectabilis* and Semisynthetic Derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society.** v. 25, n. 10, p. 1900-1906, 2014.

PIVATTO, M. et al. Electrospray Ionization Mass Spectrometry Screening of Piperidine Alkaloids from *Senna spectabilis* (Fabaceae) Extracts: Fast Identification of New Constituents and Co-metabolites. **Journal of the Brazilian Chemical Society.** v. 16, n. 6B, p. 1431-1438, 2005.

PORCU, P.; et al. Reversal of Angiogenic Growth factor Upregulation by Revascularization of Lower limb Ischemia. **Circulation**. v. 105, n. 1, p. 67-72, 2002.

PRASSAS, I. et al. Unleashing the therapeutic potencial of human kralikrein-related serine proteases. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 14, n. 3, p. 183-202, 2015.

PROSPERINI, A. et al. A Review of the Mycotoxin Enniatin B. **Frontiers in Public Health**. v.16, n. 5, p. 1-11, 2017.

PYE, C. R. et al. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. **PNAS Early Edition**. v. 114, n. 22, p. 5601-5606, 2017.

QINGGUI, Wang; LIJIAN Xu. Beauvericin, a Bioactive Compound Produced by Fungi: A Short Review. **Molecules**. v. 17, p. 2367-2377. 2012.

HUIGENS, R. W. et al. A ring-distortion strategy to construct stereochemically complex and structully diverse compounds from natural products. **Nature Chemitry**. v. 5, 2013.

RAMAUTAR, R.; DEMIRCI, A.; JONG, G. J. D. Capillary electrophoresis in metabolomics. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 25, n. 5, p. 455-466, 2006.

RATNAWEERA, P. B. Antimicrobial activities of endophytic fungi obtained from the arid zone invasive plant Opuntia dillenii and the isolation of equisetin, from endophytic Fusarium sp. **BMC Complementary and Alternative Medicine.** v.15, p. 1-7, 2015.

Richter et al. Engineering of Aspergillus niger for the production of secondary metabolites. **Fungal Biology and Biotechnology**.v.1, n. 4, 2014

ROSSMAN, A. Y. Strategy for an all-taxa inventory of fungal biodiversity. In: PENG, C.I.; CHOU, C. H. ed. **Biodiversity and terrestrial ecosystems**. Taipei: Institute of Botany, Academia Sinica Monograph Series n. 14. p.169–194, 1994.

RUKACHAISIRIKUL, V. et al. Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis sp.* PSU-D15. **Phytochemistry**. v. 69, p. 783-787, 2008.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. Secondary metabolites from endophytic fungi isolated from the Chilean gymnosperm *Prumnopitys andina* (Lleuque). **World J Microbiol Biotechnol.** v. 21, p. 27-32, 2005.

SCHMID, R. et al. Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. **Nature Biotchnology**. v.41, p. 447-449. 2023.

SCHMIT, J.P.; MUELLER, G. M. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. **Biodiversity and Conservation.** v. 16, p. 99–111, 2007.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research.** v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.

SELEGATO, D. M. et al. Application of feature-based molecular networking and MassQL for the MS/MS fragmentation study of depsipeptides. **Fronstiers in Molecular Biosciences**. p. 1-16. 2023.

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

SELOSSE, M. A.; LE TACON, F. The land flora: a phototroph-fungus partnership?. **Trends in Ecology & Evolution**. v. 13, n. 1, p. 15-20. 1998.

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

SHARMA, K. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics. **Molecular Medicine Reports**. v. 20, p. 1479–1487, 2019.

SHIVAS, R. G.; HYDE, K. D. Biodiversity of plant pathogenic fungi in the tropics. In: HYDE, K. D. ed. **Biodiversity of tropical microfungi**. Hong Kong: Hong Kong University Press; p. 47–56, 1997.

SILVA, G. H. et al. Cadinane sesquiterpenoids of *Phomopsis cassia*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (*Leguminisae*). **Phytochemistry**. v. 67, p. 1964-1969, 2006.

SILVA, G. H. et al. Lactone Derivatives Produced by a *Phaeoacremorium sp.*, an Endophytic Fungus from *Senna spectabilis*. **Journal of Natural Products.** v. 80, p. 1674-1679, 2017.

SILVA, G. H. et al. New Bioactive Metabolites Produced by *Phomopsis cassiae*, an Endophytic Fungud in *Cassia spectabilis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society.** v. 16, n. 6B, p. 1463-1466, 2005.

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

SMITH, D.; WALLER, J. M. Culture collections of microorganisms: their importance in tropical plant pathology. **Fitopatologia Brasileira**. v. 17, n. 1, p. 5–12, 1994.

SOOD, S.; SANDHU, S. S.; MUKHERJEE, T. K. Pharmacological and Therapeutic Potential of Beauvericin: A Short Review. **International Journal Proteomics Bioinformatics.** v. 10, p. 18–23, 2017.

SPECIAN, V. et al. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 16, n. 4, p. 345-351, 2015.

ŠTELLEROVÁ, D.; LUKEŠ, V.; BREZA, M. On the Potential Role of the (Pseudo-) Jahn–Teller Effect in the Membrane Transport Processes: Enniatin B and Beauvericin. **Molecules**. v. 28, p. 1-11, 2023.

STROBEL G, D. B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural product. **Microbiology and Molecular Biology Review**. v. 67, n. 4, p. 491–402, 2003.

STROBEL, G. The Emergence of Endophytic Microbes and Their Biological Promise. **Journal of Fungi.** v. 4, n. 2, p. 1-19, 2018.

STRONGMAN, D.B; STRUNZ, G. M.; GIGUÈRE, P.; YU, C. M.; CALHOU, L. Enniatins from *Fusarium avenaceum* isolated from balsam fir foliage and their toxicity to spruce budworm larvae, Choristoneura fumiferana (Clem.) (Lepidoptera Tortricidae). **Journal of Chemical Ecology**. v. 14, n. 3. p. 1-12. 1988.

SY-CONDERO, A. A. et al. Revisiting the enniatins: a review of their isolation, biosynthesis, structure determination and biological activities. **The Journal of Antibiotics.** v. 65, p. 541-549. 2012.

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

WHITMARSH-EVERISS, T., OLSEN, A. H., LARAIA, L., Identification of Inhibitors of Chelesterol Transport Proteins Through the Synthesis of a Diverse, Sterol-Inspired Compound Collection. **Angewandte Chemie International Edition**. v. 60, n. 51, p. 26755-26761, 2021.

TAECHOWISAN, T. et al. Antitumot activity of 4-Arylcoumarins from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**. v. 3, n. 2, p. 86-91, 2007.

TAN, B.; Vanitha, J. Immunomodulatory and Antimicrobial Effects of Some Traditional Chinese Medicinal Herbs: A Review. **Current Medicinal Chemistry.** v. 11, p. 1423–1430, 2004.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports**. v. 18, p. 448-459, 2001.

TEJESVI, M. V. et al. An antimicrobial peptide from endophytic Fusarium tricinctum of Rhododendron tomentosum Harmaja. **Fungal Divers**. v. 60, n. 1, p. 153-159, 2013.

TOGHUEO, R. M. K. Bioprospecting endophytic fungi from Fusarium genus as sources of bioactive metabolites. **Mycology**. v. 11, p. 1–21, 2020.

TOMODA, H. et al. Inhibition of ACYL-CoA: Cholesterol Acyltransferase activity by Cyclodepsipeptide Antibiotics. **The Journal of Antibiotics**. v. 45, n. 10, p. 1626-1632. 1992.

TRINIDAD-CALDERÓN, P. A.; VARELA-CHINCHILLA, C. D.; GARCÍA-LARA, S. Depsipeptides Targeting Tumor Cells: Milestones from In Vitro to Clinical Trials. **Molecules**. v. 28, n. 670, p. 1-30, 2023.

URBANIAK, M. et al. Cyclodepsipeptide Biosynthesis in Hypocreales Fungi and Sequence Divergence of The Non-Ribosomal Peptide Synthase Genes. **Pathogens**. v. 9, n. 552, p. 1-18, 2020.

VERMA, V. C. et al. Chemical and Functional Diversity of Natural Products from Plant Associated Endopytic Fungi. **Natural Products Communications.** v. 4, n. 11, p. 1511-1532, 2009.

VIEGAS JR, C. et al. (-)-7-Hydroxycassine: a New 2,6-Dialkylpiperidin-3-ol Alkaloid and other Constituents Isolated from Flowers and Fruit of *Senna spectabilis* (Fabaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society.** v. 24, n. 2, p. 230-235, 2013.

VIEGAS JR, C. et al. New selective acetylcholinesterase inhibitors designed from natural piperidine alkaloids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v. 13, p. 4184-4190, 2005.

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

VIJLDER, T. D. et al. A tutorial in small molecule identification via eletrospray ionization-mas spectroimetry: The pratical art of structural elucidation. **Mass Spectrometry Reviews**. v. 37, p. 607-629. 2017.

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

WEI, J.; WU, B. Chemistry and bioactivities of secondary metabolites from the genus Fusarium. **Fitoterapia.** v. 146, p. 1-20, 2020.

WILLIAMS, S. M.; BRODBELT, J. S. MS n characterization of protonated cyclic peptides and metal complexes. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 15, p. 1039–1054, 2004.

WU, B. et al., Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the evironmental DNA sequences of fungi. **Mycology**. v. 10, n. 3, p. 127-140. 2019.

WU, Q. et al. A review on the synthesis and bioactivity aspects of beauvericin, a Fusarium mycotoxin. **Frontiers in Pharmacology**. v. 9, p. 1-12. 2018

WU, S-H. et al. Tem-Membered Lactones from *Phomopsis sp.*, an Endophytic Fungus aof *Azadirachta indica*. **Journal of Natural Products**. v. 71, p. 731-734, 2008.

YAO, Y. et al. Tissue kalikrein is related to the severity of coronary artery disease. **Clinica Chimica Acta**. v. 423, p. 90-98, 2013.

ZANARDI, L. M. et al. Sesquiterpenos produzidos pelo fungo endofítico *Phomopsis* cassiae comatividade antifúngica e inibidora de acetilcolinesterase. **Química Nova**. v. 35, n. 11, p. 2233-2236, 2012.

ZHANG, C-L. et al. Clavatol and patulin formation as the antagonistic principle of *Aspergillus clavatonanicus*, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. **Applied Biochemistry and Microbiology.** v. 78, p. 833-840, 2008.

ZHANG, H. et al. Effective multi-step functional biotransformations of steroids by a newly isolated Fusarium oxysporum SC1301. **Tetrahedron**. v. 69, p. 184-189, 2012.

ZHANG, H.W. et al. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**. v.23, p.753–771, 2006.

ZHANG, L. et al. High-throughput synergy screening identifies microbial metabolites as combination agents for the treatment of fungal infections. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** v. 104, n. 11, p. 4606–4611, 2007.