



UNESP- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA - ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MAYARA MAIO LUIZ

Exploração racional, utilizando abordagem OSMAC (*One Strain, Many Compounds*), ferramentas metabolômicas e quimiométricas dos fungos endofíticos isolados das raízes de *Senna spectabilis*

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Araraquara

2022

MAYARA MAIO LUIZ

Exploração racional, utilizando abordagem OSMAC (*One Strain, Many Compounds*), ferramentas metabolômicas e quimiométricas dos fungos endofíticos isolados das raízes de *Senna spectabilis*

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

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Araraquara

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

L953e	Luiz, Mayara Maio Exploração racional, utilizando abordagem OSMAC (One Strain, Many Compounds), ferramentas metabolômicas e quimiométricas dos fungos endofíticos isolados das raízes de <i>Senna spectabilis</i> / Mayara Maio Luiz. -- Araraquara, 2022 143 f. : il. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara Orientador: Ian Castro Gamboa 1. Produtos naturais. 2. Fungos endofíticos. 3. <i>Fusarium oxysporum</i>. 4. Micotoxinas. 5. Bactericidas. I. Título.
-------	---

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Exploração racional, utilizando abordagem OSMAC (*One Strain, Many Compounds*), ferramentas metabolômicas e quimiométricas dos fungos endofíticos isolados das raízes de *Senna spectabilis*"

AUTORA: MAYARA MAIO LUIZ

ORIENTADOR: IAN CASTRO GAMBOA

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



Prof. Dr. IAN CASTRO GAMBOA (Participação Virtual)

Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Ian Castro
Gamboa:21
366541871

Assinado de forma
digital por Ian Castro
Gamboa:21366541871
Dados: 2022.08.26
16:54:38 -03'00'



Prof. Dr. GEISON MODESTI COSTA (Participação Virtual)

Departamento de Química / Pontificia Universidad Javeriana - PUJ - Bogotá, Colombia



Dr. ALAN CESAR PILON (Participação Virtual)

Departamento de Química / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - Ribeirão Preto

Araraquara, 26 de agosto de 2022

DADOS CURRICULARES

Identificação

Nome: Mayara Maio Luiz

Nome em citações bibliográficas: Luiz, M. M.

Formação acadêmica

2016-2019

Graduação em Bacharelado em Química

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

Disciplinas cursadas durante o mestrado

1. Segurança em Química, conceito A
2. Planejamento Experimental, conceito A
3. Química Orgânica Avançada, conceito A (cursada na UFSCar)
4. Estereoquímica e Reatividade de Compostos Orgânicos, conceito A
5. Métodos espectrométricos I, conceito A

Publicações em revistas científicas

Costa, M. F.; Luiz, M. M.; de Souza, L. C.; Tempone, A. G.; Lago, J. H. G.; Nascimento, I. R. Phenylanthralic anhydrides from water hyacinth (*Pontederia crassipes* Mart.). **Phytochemistry Letters**, v. 46, p. 1-5, 2021.

*Dedico este trabalho aos meu pais, **Sueli e Luiz**, por sempre me apoiarem e, em um momento tão difícil, escolherem acreditar na ciência. Vocês me inspiram, e me motivam.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, por acreditarem em mim e me ajudarem a concretizar esse sonho. Além de todo amor, carinho e incentivo recebido durante essa jornada árdua.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa, pela sua dedicação e confiança durante a orientação.

Aos companheiros de laboratório do NuBBE, especialmente Juvenal, Rafael, Givaldo, Maria, Lucas e Victor, Camila e Mayra por todos os momentos de aprendizados e risadas. E em especial à Gabriela, por ter compartilhado a bancada comigo durante todo o mestrado.

Aos meus queridos amigos, pela oportunidade de convívio e pela troca de conhecimentos durante todos esses anos, além das risadas e histórias compartilhadas. Em especial à Flávia, Gabriela, Isabela, Thais e Thales. E em especial ao meu namorado Gabriel, por sempre me apoiar e depositar confiança em mim.

À professora Dra. Isabele Nascimento pelo solvente cedido para a realização do projeto.

Às professora Dra. Ilana Camargo e Dra. Carmen Lúcia Cardoso 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.

Aos funcionários do Instituto de Química que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão deste trabalho. Em especial aos técnicos João, Juliana e Dr. Nivaldo Boralle, pela realização das análises.

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 e, em especial, à CAPES pelo auxílio financeiro (nº 88887.498062/2020-00).

“Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade”

(Marie Curie)

RESUMO

Fungos endofíticos, que colonizam espécies vegetais de forma assintomática, ainda são pouco explorados quando comparados com plantas, representando uma fonte natural com vasto potencial para descobertas de novas substâncias bioativas. Diante disso, este trabalho tem como alvo de estudo, duas linhagens fúngicas identificadas como *Fusarium oxysporum* isoladas das raízes de *Senna spectabilis*. Um estudo OSMAC (*One Strain Many Compounds*) foi realizado com ambas as linhagens, visando determinar a variação metabólica destes fungos nos meios de cultivo de czapek, malte e PDB. Os extratos obtidos foram submetidos a ensaios biológicos antibacteriano e acetilcolinesterásico. Os dados provenientes das análises dos extratos por UPLC-QTOF-MS foram analisados utilizando as ferramentas GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*) e UNIFI (Sistema de Informação Científica – Waters Corporation). Foram anotados 45 metabólitos relatados na literatura para *F. oxysporum*, de diferentes classes como naftoquinonas, alcaloides, depsipeptídeos cíclicos, entre outros. Os extratos de *F. oxysporum* (S.S_R10) em meio de PDB e de *F. oxysporum* (S.S_R13) em meio de malte se mostraram bactericidas a bactérias gram-positivas. Um planejamento fatorial 2² foi realizado para *F. oxysporum* (S.S_R10) em meio de czapek, e as variáveis avaliadas foram agitação e exposição à luz. Na resposta massa de extrato, as variáveis foram estatisticamente insignificativas, enquanto na análise dos cromatogramas obtidos por UPLC-QTOF-MS, a agitação se mostrou estatisticamente significativa nas intensidades dos picos de ácido fusárico, da beauvericina, eniatinas A1 e B1, importantes micotoxinas produzidas por fungos deste gênero. Uma curva de crescimento foi realizada para *F. oxysporum* (S.S_R10) em meio de czapek, onde observou-se que este fungo segue o crescimento similar ao previsto para microrganismos. E análise dos extratos desta etapa mostra que as micotoxinas, citadas acima, possuem são produzidas em maior quantidade quando a massa micelial é menor, o que nos leva a concluir que estas substâncias possuem sua produção associadas a possíveis estresses.

Palavras-chave: Produtos Naturais, Fungos endofíticos. *Fusarium oxysporum*, Micotoxinas, Bactericidas.

ABSTRACT

Endophytic fungi, which colonize plant species asymptotically, are still considered underexplored when compared to plants, representing a source with vast potential for discoveries of new bioactive substances. Therefore, this work aims to study two fungal strains, identified as *Fusarium oxysporum*, isolated from the roots of *Senna spectabilis*. An OSMAC (One Strain Many Compounds) study was carried out with both strains, aiming to determine the metabolic variation of these fungi in different culture media: czapek, malt, and PDB. Data from the analysis of extracts by UPLC-QTOF-MS were analyzed using the GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) and UNIFI (Scientific Information System – Waters Corporation) tools. Forty-five metabolites of different classes such as naphthoquinones, alkaloids, and cyclic depsipeptides, among others were recorded. The extracts of *F. oxysporum* (S.S_R10) in the PDB medium and *F. oxysporum* (S.S_R13) in the malt medium proved to be bactericidal against gram-positive bacteria. A 2² factorial design was performed for *F. oxysporum* (S.S_R10) in czapek medium, and the variables evaluated were agitation and light exposure. The response extract yield, the variables were statistically insignificant, whilst in the analyses of the chromatograms obtained by UPLC-QTOF-MS, the agitation was statistically significant in the intensities of the peaks of fusaric acid, beauvericin, enniatins A1 and B1, important mycotoxins produced by *Fusarium* sp.. A growth curve for 35 days, was performed for S.S_R10 in czapek medium, and the curve follows a growth similar to that predicted for microorganisms. The production of the important mycotoxins cited above was observed, and the results showed that they are produced in greater amounts when the mycelial mass is lower, which lead us to conclude that these substances have their production associated with possible stresses.

Keywords: Natural Products, Endophytic fungi, *Fusarium oxysporum*, mycotoxins, bactericidals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Substâncias bioativas co-produzidas por plantas e seus endofíticos.....	22
Figura 2 – Flores e folhas de <i>Senna spectabilis</i>	23
Figura 3 - Substâncias bioativas isoladas de fungos do gênero <i>Fusarium</i>	25
Figura 4 – Substâncias produzidas exclusivamente por fungos do gênero <i>Fusarium</i>	26
Figura 5 - Micotoxinas isoladas de espécies <i>Fusarium</i>	27
Figura 6 - Esquema da formação da rede molecular pelo GNPS.	31
Figura 7 - Esquema simplificado da utilização do UNIFI.	32
Figura 8 - Esquema da obtenção dos extratos brutos em diferentes meios de cultura.	37
Figura 9 - Códigos utilizados para os extratos de cada linhagem fúngica nos diferentes meios de cultivo.	39
Figura 10 - Esquema resumido do estudo realizado em <i>F. oxysporum</i> (S.S_R10) em meio de czapek.	45
Figura 11 - Shaker orbitalar e distribuição dos erlenmeyers no equipamento.	47
Figura 12 - Preparação e obtenção dos extratos brutos da curva de crescimento para linhagem fúngica S.S_R10 em meio de czapek.	48
Figura 13 - Imagens do macrocultivo (superiores) e microcultivo (inferiores) das linhagens fúngicas: a-e S.S_R13 e f-j S.S_R10.	50
Figura 14 - Crescimento dos fungos em plaquinhas de Petri contendo meio de PDA (<i>Potato Dextrose Agar</i>): a. S.S_R10 e b. S.S_R13.	51
Figura 15 - Cromatogramas em modo gradiente dos extratos da linhagem fúngica S.S_R10 em diferentes meios de cultivo ($\lambda = 254$ nm).	56
Figura 16 - Cromatogramas em modo gradiente dos extratos da linhagem fúngica S.S_R13 em diferentes meios de cultivo ($\lambda = 254$ nm).	57
Figura 17 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos de czapek em CD_3OD (600 MHz).	59
Figura 18 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos de malte em CD_3OD (600 MHz).	60
Figura 19 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos de PDB em CD_3OD (600 MHz).	61
Figura 20 - Gráfico de scores, PC1 x PC2, obtidos dos dados de RMN de ^1H para S.S_R10 e S.S_R13 nos diferentes meios de cultivos.	62

Figura 21 - Proposta de fragmentações do software UNIFI para a oxisporidinona (1), a partir dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS ^E (+).....	64
Figura 22 - Estrutura química dos análogos da oxisporidinona (2-6) anotados dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS ^E (+).	65
Figura 23 - Proposta de fragmentação do software UNIFI para a tricosetina (7), dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS ^E (+).	66
Figura 24 - Estruturas químicas do ácido fusárico (8) e análogos (9-10), anotados dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS ^E (+).	67
Figura 25 - Espectro de EM ² do ácido fusárico (8) em UPLC-QTOF-MS ^E extraída do software <i>MassLynx</i>	68
Figura 26 - Proposta de mecanismo de fragmentação do ácido fusárico (8) em UPLC-QTOF-MS-ESI (+).....	68
Figura 27 - Estrutura química da fusarubina (11) e análogos (12-16), anotados dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS ^E (+).	69
Figura 28 - Proposta de fragmentação do software UNIFI para a fusarubina (11), a partir dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS ^E (+).....	70
Figura 29 - Proposta de mecanismo de fragmentação M-18 para a fusarubina (11) em UPLC-QTOF-MS-ESI (+).	70
Figura 30 - Estrutura química das naftoquinonas 17-19 anotadas dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS ^E (+).	71
Figura 31 - Propostas de fragmentações sugeridas pelo software UNIFI para a substância 18, a partir dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS ^E (+).....	72
Figura 32 - Estruturas químicas das substâncias 20-22, anotadas dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS ^E (+).	73
Figura 33 – Propostas de fragmentações sugeridas pelo software UNIFI para a substância 20, a partir dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS ^E (+).....	74
Figura 34 - Proposta de mecanismo de fragmentação da metila radicalar para a substância 20 analisada por UPLC-QTOF-MS-ESI (+).....	74
Figura 35 - Estrutura química da beauvericina (23), anotada dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS ^E (+).....	75
Figura 36 - Fragmentações propostas pelo software UNIFI para a beauvericina (23), a partir dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS ^E (+).....	76
Figura 37 - Proposta de fragmentação da beauvericina (23) em UPLC-QTOF-MS-ESI (+).	76

Figura 38 - Estrutura química eniatinas (24-27) anotadas dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS ^E (+).	78
Figura 39 - Propostas de fragmentações do software UNIFI para as eniatinas: a. A1, b. B1, c. C e d. MK, a partir dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS ^E (+).	79
Figura 40 - Padrão de fragmentação eniatina B1 (25) por UPLC-QTOF-MS-ESI (+).	79
Figura 41 - Estruturas químicas derivados do jasmonato (28-32), anotados dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS ^E (+).	80
Figura 42 - Fragmentações propostas pelo software UNIFI para a substância 32, dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS ^E (+).	81
Figura 43 - Estrutura química dos cerebrosídeos (33-34), anotados dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS ^E (+).	82
Figura 44 - Fragmentos propostos pelo software UNIFI para fusarusida (33), a partir dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS ^E (+).	83
Figura 45 - Estrutura química dos tricotecenos (35-36), anotados dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS ^E (+).	84
Figura 46 - Fragmentações sugeridas pelo software UNIFI para substância 36, a partir dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS ^E (+).	85
Figura 47 - Proposta de fragmentação da substância 36 por UPLC-QTOF-MS-ESI (+).	86
Figura 48 - Estrutura química das cosmosporasidas (37-38), anotadas dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS ^E (+).	87
Figura 49 - Fragmentações sugeridas pelo software UNIFI para cosmosporasida H (38), dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS ^E (+).	88
Figura 50 - Estruturas químicas das substâncias (39-42) anotadas dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS ^E (+).	89
Figura 51 - Fragmentações propostas pelo software UNIFI da fumonisina C ₃ (40), dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS ^E (+).	90
Figura 52 - Proposta de fragmentação sugerida pelo UNIFI para a substância 41, a partir dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS ^E (+).	91
Figura 53 - Fragmentações propostas pelo software UNIFI para a substância 42, a partir dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS ^E (+).	92
Figura 54 - Representação da rede molecular obtida dos diferentes extratos estudados visualizada no Cytoscape 3.9.0.	97

Figura 55 - Produção das eniatinas nos diferentes meios de cultivo na forma $[M+Na]^+$ observada na rede molecular.	99
Figura 56 - Diferenciação das eniatinas anotadas pelo GNPS.	100
Figura 57 - Produção da beauvericina (23) nos diferentes meios de cultivo na forma $[M+Na]^+$ observada na rede molecular.	101
Figura 58 - Espectros de massas substâncias 46 extraído dos dados obtidos por UPLC-QTOF-MS/MS.	102
Figura 59 - Produção do ácido fusárico (8) e dehidrofusárico (9) nos diferentes meios de cultivo na forma $[M+H]^+$ observada na rede molecular.	102
Figura 60 - Gráfico dos efeitos principais e interações do planejamento fatorial obtidos pelo software TIBCO® <i>Statistica</i> 10.	106
Figura 61 - Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados (resposta: massa de extrato) obtido pelo software TIBCO® <i>Statistica</i> 10.	108
Figura 62 - Códigos dos experimentos realizados no planejamento experimental.	109
Figura 63 - Perfil metabólico BPC da linhagem S.S_R10C em diferentes cultivos em LCMS-ESI-IT modo positivo.	110
Figura 64 - Gráficos de Pareto dos efeitos padronizados (resposta: intensidade dos picos) obtidos através do software TIBCO® <i>Statistica</i> 10.	112
Figura 65 - <i>Cluster</i> das eniatinas, aduto $[M+Na]^+$, nos diferentes ensaios do planejamento experimental.	113
Figura 66 - <i>Cluster</i> da beauvericina e análogos, aduto $[M+Na]^+$, nos diferentes ensaios do planejamento experimental.	114
Figura 67 - Crescimento micelial de S.S_R10 em meio de czapek nos diferentes dias.	116
Figura 68 - Curva de crescimento, no período de 35 dias, da linhagem fúngica S.S_R10 em meio de czapek.	118
Figura 69 - Gráfico de comparação dos valores médios de massa de extratos com os valores médios de massa seca de micélio (em mg).	119
Figura 70 - Perfil cromatográfico obtido por HPLC-DAD dos extratos da curva de crescimento em $\lambda = 254$ nm.	121
Figura 71 - <i>Cluster</i> das eniatinas $[M+Na]^+$ obtidos pelo GNPS para os dados de UPLC-QTOF-MS/MS.	122
Figura 72 - Nodo da beauvericina $[M+Na]^+$ obtidos pelo GNPS para os dados de UPLC-QTOF-MS/MS.	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Meios de cultivos utilizados neste trabalho.	34
Tabela 2 - Equipamentos utilizados neste trabalho.....	36
Tabela 3 - Variáveis do planejamento experimental codificadas.	45
Tabela 4 - Matriz do planejamento fatorial.	46
Tabela 5 - Massa de cada extrato obtido a partir da variação do meio de cultivo das linhagens fúngicas em escala reduzida.....	52
Tabela 6 - Resultados dos ensaios de triagem pontual para as enzimas acetilcolinesterase de peixe elétrico (AChE _{ee}) e butirilcolinesterase humana (BChE _{hu}).	52
Tabela 7 - Resultado da triagem inicial dos extratos a 512 µg.mL ⁻¹	53
Tabela 8 - Resultado da CIM e CBM do extrato da linhagem fúngica S.S_R13 em meio de malte.	54
Tabela 9 - Resultado da CIM e CBM do extrato da linhagem fúngica S.S_R10 em meio de PDB.	55
Tabela 10 - Metabólitos anotados para as linhagens fúngicas nos diferentes meios de cultivo via UPLC-QTOF-MS ^E em modo positivo utilizando o software UNIFI.....	93
Tabela 11 - Metabólitos anotados para as linhagens fúngicas nos diferentes meios de cultivo via UPLC-QTOF-MS/MS em modo positivo utilizando a plataforma GNPS.	104
Tabela 12 - Massas dos extratos brutos em mg obtidos nos experimentos do planejamento.	105
Tabela 13 - Estimativas dos efeitos e coeficiente de regressão para resposta de massa de extrato.	107
Tabela 14 - Intensidade dos picos dos extratos obtidos de LC-ESI-IT-MS em modo positivo após pré-tratamento no MZmine 2.53.	111
Tabela 15 - Massas secas miceliais, em mg, obtidas nos diferentes dias de extração.	117
Tabela 16 - Polinômios da curva de crescimento e seus respectivos valores de R ² e AICS obtidos através do Origin®.	118
Tabela 17 - Massas dos extratos em mg obtidos da curva de crescimento.	119

LISTA DE APÊNDICE

Apêndice 1 - Parâmetros utilizados no pré-processamento dos dados no MZmine 2.53.....	133
Apêndice 2 - Cromatograma HPLC-DAD do fungo S.S_R10 em meio de czapek ($\lambda = 254$ nm).....	133
Apêndice 3 - Cromatograma HPLC-DAD do fungo S.S_R10 em meio de malte ($\lambda = 254$ nm).....	134
Apêndice 4 - Cromatograma HPLC-DAD do fungo S.S_R10 em meio de PDB ($\lambda = 254$ nm).....	134
Apêndice 5 - Cromatograma HPLC-DAD do fungo S.S_R13 em meio de czapek ($\lambda = 254$ nm).....	134
Apêndice 6 - Cromatograma HPLC-DAD do fungo S.S_R13 em meio de malte ($\lambda = 254$ nm).....	135
Apêndice 7 - Cromatograma HPLC-DAD do fungo S.S_R13 em meio de PDB ($\lambda = 254$ nm).....	135
Apêndice 8 - Cromatograma HPLC-DAD do meio de cultivo de czapek ($\lambda = 254$ nm).	135
Apêndice 9 - Cromatograma HPLC-DAD do meio de cultivo de malte ($\lambda = 254$ nm).	136
Apêndice 10 - Cromatograma HPLC-DAD do meio de cultivo de PDB ($\lambda = 254$ nm).	136
Apêndice 11 - Espectro de RMN ^1H de S.S_R10C (CD_3OD , 600 MHz).	137
Apêndice 12 - Espectro de RMN ^1H de S.S_R10M (CD_3OD , 600 MHz).	137
Apêndice 13 - Espectro de RMN ^1H de S.S_R10P (CD_3OD , 600 MHz).....	138
Apêndice 14 - Espectro de RMN ^1H de S.S_R13C (CD_3OD , 600 MHz).	138
Apêndice 15 - Espectro de RMN ^1H de S.S_R13M (CD_3OD , 600 MHz).	139
Apêndice 16 - Espectro de RMN ^1H de S.S_R13P (CD_3OD , 600 MHz).....	139
Apêndice 17 - Espectro de RMN ^1H do meio de czapek (CD_3OD , 600 MHz).	140
Apêndice 18 - Espectro de RMN ^1H do meio de malte (CD_3OD , 600 MHz).....	140
Apêndice 19 - Espectro de RMN ^1H do meio de PDB (CD_3OD , 600 MHz).	141
Apêndice 20 - Estrutura química das eniatinas.	141
Apêndice 21 - Tabela ANOVA para a resposta intensidade do pico de ácido fusárico.	142

Apêndice 22 - Tabela ANOVA para a resposta intensidade do pico de beauvericina.
..... 142

Apêndice 23 - Tabela ANOVA para a resposta intensidade do pico de eniatina A1.
..... 143

Apêndice 24 - Tabela ANOVA para a resposta intensidade do pico de eniatina B1.
..... 143

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE _{ee}	Enzima acetilcolinesterase de peixe elétrico
ACP	Análise de componentes principais
AcOEt	Acetato de etila
AF	Ácido fusárico
AIC	Critério de Informação de Akaike
ANOVA	Análise de variância
BEA	Beauvericina
BChE _{hu}	Enzima butirilcolinesterase humana
BPC	Sigla em inglês para <i>Base peak chromatogram</i>
CBM	Concentração bactericida mínima
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CIM	Concentração inibitória máxima
C18	Adsorvente de fase reversa tipo Octadecil Silano
δH	Deslocamento químico de hidrogênio
DAD	Sigla em inglês para <i>Diode-Array Detection</i>
DDA	Sigla em inglês para <i>Data dependente acquisition</i>
DIA	Sigla em inglês para <i>Data-independent acquisition</i>
DNA	Sigla em inglês para <i>deoxyribonucleic acid</i>
EM	Espectrometria de massas
EN	Eniatina
ESI	Sigla em inglês para <i>Electrospray ionization</i>
GNPS	Sigla em inglês para <i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
ICER	Sigla em inglês para <i>Immobilized Capillary Enzyme Reactor</i>
IT	Íon - trap
ITS	Sigla em inglês para <i>Internal transcribed spacer</i>
LCMS	Sigla em inglês para <i>Liquid chromatography coupled mass spectrometry</i>
MeOH	Metanol

MHCA	Mueller Hinton cátion ajustado
MHz	Mega Hertz
MS	Sigla em inglês para <i>Mass spectrometry</i>
MS ^E	Sigla em inglês para <i>Mass spectrometry (E-energy)</i>
MS/MS	Sigla em inglês para <i>Tandem mass spectrometry</i>
min.	Minutos
<i>m/z</i>	Razão massa-carga
NuBBE	Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
OMS	Organização Mundial da Saúde
OSMAC	Sigla em inglês para <i>One Strain, Many Compounds</i>
PC	Sigla em inglês para <i>Principal component</i>
PCR	Sigla em inglês para <i>Polimerase Chain Reaction</i>
PDA	Sigla em inglês para <i>Potato dextrose agar</i>
PDB	Sigla em inglês para <i>Potato dextrose broth</i>
PN	Produtos naturais
ppm	Parte por milhão
Q-TOF	Sigla em inglês para <i>Quadrupole time of flight</i>
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
T	Tesla
TIC	Sigla em inglês para <i>Total Ion chromatogram</i>
TUB	Sigla em inglês para <i>Bipartite Transcription Factor</i>
UPLC	Sigla em inglês para <i>Ultra-performance liquid chromatography</i>
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Produtos naturais: uma breve introdução	20
1.2. Fungos endofíticos	21
1.3. Espécie vegetal hospedeira.....	23
1.4. Gênero <i>Fusarium</i> Link	24
1.5. OSMAC: Variação dos meios de cultivo	27
1.6. Metabolômica e o uso de ferramentas de desreplicação	28
1.6.1. Metabolômica	28
1.6.2. GNPS e UNIFI	30
2. OBJETIVO	33
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	34
3.1. Especificações dos materiais e equipamentos	34
3.1.1. Meios de cultivo	34
3.1.2. Solventes	34
3.1.3. Análises cromatográficas.....	35
3.1.4. Equipamentos	35
3.2. Estudo das linhagens fúngicas em diferentes meios de cultivo	37
3.2.1. Identificação dos fungos endofíticos	38
3.2.2. Cultivo dos fungos	39
3.2.3. Obtenção dos extratos dos fungos endofíticos	39
3.2.4. Perfil químico dos extratos brutos dos fungos endofíticos	40
3.2.5. Ensaio biológico.....	40
3.2.6. UPLC-QTOF-MS	43
3.3. Estudo da linhagem fúngica S.S_R10	44
3.3.1. Planejamento fatorial 2 ²	45

3.3.2. Curva de crescimento.....	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1. Identificação dos fungos.....	49
4.2. Crescimento dos fungos.....	51
4.3. Atividades biológicas.....	52
4.4. Perfil metabólico- HPLC-DAD	55
4.5. Perfil metabólico- RMN de ¹ H.....	57
4.6. UPLC/MS: uso do UNIFI para desreplicação	63
4.6.1. Alcalóides (1-10)	63
4.6.2. Naftoquinonas (11-19).....	68
4.6.3. Naftopiranos e antraquinona (20-22)	72
4.6.4. Depsipeptídeos cíclicos (23-27).....	74
4.6.5. Derivados de jasmonato (28-32).....	80
4.6.6. Cerebrosídeos (33-34)	81
4.6.7. Terpenos (35-38).....	83
4.6.8. Outros metabólitos anotados (39-42)	89
4.7. Análise das redes moleculares através do GNPS	96
4.8. Planejamento fatorial	105
4.8.1. Resposta: massa de extrato em mg	105
4.8.2. Avaliação do perfil metabólico por LCMS dos extratos brutos do planejamento	109
4.9. Curva de crescimento	116
5. CONCLUSÃO	124
REFERÊNCIAS	126
APÊNDICE	133

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produtos naturais: uma breve introdução

Desde a antiguidade, os humanos buscam na natureza suprimentos para suas necessidades básicas – plantas, microrganismos e animais são utilizados como fontes de substâncias com potencial farmacológico, inseticida, alucinógeno, entre outros. Na Grécia Antiga, por exemplo, extratos vegetais eram ingeridos em rituais para execuções. Já nas civilizações indígenas, se observa o uso da bixina como corante para fins religiosos, estéticos e de proteção, bem como o uso de espécies de *Strychnos* e *Chondodendron* na obtenção dos curares. Além disso, há relatos da utilização de ópio pelos sumérios, extraído dos bulbos da papoula (*Papaver somniferum*), como sonífero e analgésico. Dessa espécie vegetal foi isolada a morfina, analgésico utilizado até hoje em caso de dores severas¹.

As substâncias derivadas de fontes naturais são denominadas Produtos Naturais (PN's). Os metabólitos secundários, substâncias que não são essenciais ao crescimento e desenvolvimento, mas garantem vantagens na sobrevivência do organismo, possuem uma alta complexidade e diversidade molecular, além de uma grande especificidade e seletividade nas atividades biológicas. Devido a essas características, os produtos naturais, provenientes principalmente de plantas, contribuíram com o avanço da medicina².

O isolamento da morfina em 1804 foi o marco para descoberta de drogas a partir de plantas e o marco da descoberta de uma nova classe de substâncias: os alcaloides. A descoberta de compostos como o agente anti-inflamatório ácido acetilsalicílico derivado dos salicilatos, encontrados nas plantas *Salix* sp e a artemisinina, isolada da *Artemisia annua*, protótipo-natural antimalárico são exemplos do avanço dos estudos voltados aos produtos naturais³.

A descoberta acidental da penicilina, uma substância com atividade antibacteriana produzida pelo fungo *Penicillium notatum*, em 1928 por Alexander Fleming, despertou interesse de pesquisadores no isolamento de produtos naturais (PN's) provenientes de fontes microbianas. Durante a Segunda Guerra Mundial, a procura por substâncias com atividade antibiótica promoveu um avanço científico e

financeiro para programas de pesquisas de PNs, possibilitando o descobrimento de outros fármacos derivados de fungos, como os redutores de colesterol, mevastatina e lovastatina e os imunossupressores como a ciclosporina e rapamicina^{4,5}.

Apesar dos inúmeros produtos sintéticos presentes no mercado, os produtos naturais provenientes de plantas e outros organismos vivos permanecem sendo alvos de estudos⁶. Estima-se que há aproximadamente 1,5 milhões de espécies diferentes de fungos, sendo que nem 5% dessas foram descritas na literatura. Nesse sentido, os metabólitos secundários provenientes de fungos representam uma área com vasto potencial para a descobertas de novas substâncias bioativas aplicáveis na indústria farmacêutica e/ou agrícola⁵.

1.2. Fungos endofíticos

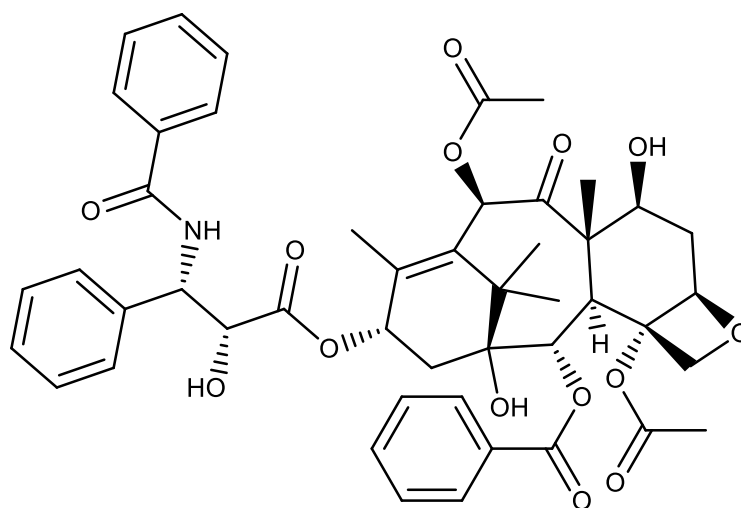
Os fungos, pertencentes ao Reino Fungi, são seres heterotróficos e eucarióticos, e podem ser classificados quanto a sua associação a espécies vegetais - endofíticos e epifíticos. Em 1866, De Bary caracterizou o termo “endofítico” como quaisquer organismos que colonizam as regiões intracelulares e intercelulares das plantas (exemplo: folhas, raízes, ramos, vasos condutores) em um determinado período do seu ciclo de vida, de forma assintomática, enquanto os epifíticos colonizam a superfície vegetal⁷.

Os fungos endofíticos (FEs) estão presentes em plantas encontradas sob condições climáticas e geográficas diferentes - do Ártico à Antártica - e de algas marinhas, musgos às samambaias. Os FEs podem ser específicos a determinadas plantas, e as interações desses microrganismos com seus hospedeiros podem variar de simbióticas a antagonistas, de acordo com as condições ecológicas e geográficas do mesmo. No caso de uma relação simbiótica (mutualista) o hospedeiro fornece proteção e nutrientes, sendo uma fonte de substâncias orgânicas para os microrganismos, que por vez, ajudam na resistência desses hospedeiros frente a estresses bióticos (insetos e outros microrganismos patógenos) e abióticos (pH, salinidade, temperatura etc.)^{8,9}.

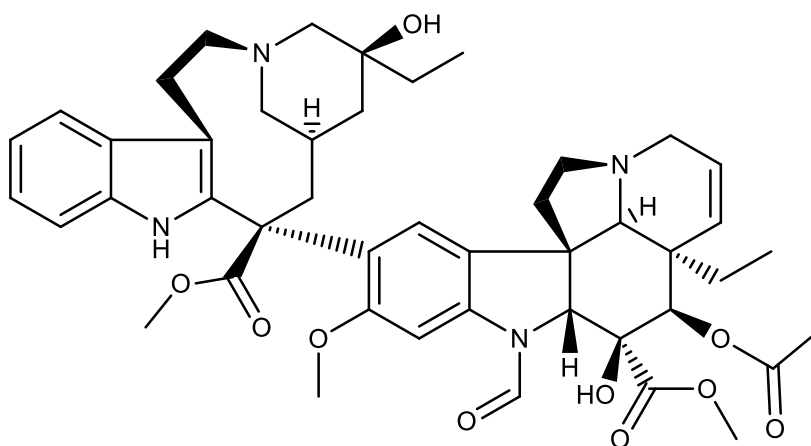
A capacidade dos FEs em biossintetizar metabólitos originalmente característicos da planta hospedeira e pode estar relacionada a recombinações

genéticas provenientes do processo de evolução dos organismos envolvidos na relação simbiótica. A produção desses fitoquímicos por microrganismos reduz a coleta de plantas de crescimento lento e raras, preservando a biodiversidade. Dentre as substâncias bioativas co-produzidas por plantas e seus endofíticos associados temos: o paclitaxel (I), Taxol®, fármaco anticancerígeno isolado de plantas da espécie *Taxus brevifolia* e do fungo *Taxomyces andreanae* e a vincristina (II), Oncovin®, anticancerígeno isolado da planta *Catharanthus roseus* e do fungo endofítico *Furasium oxysporum* (Figura 1)^{5,8}.

Figura 1 - Substâncias bioativas co-produzidas por plantas e seus endofíticos.



I



II

Na literatura, produtos naturais de diferentes classes como alcaloides, terpenos, esteroides, quinonas, ácidos fenólicos, entre outros, foram identificados em fungos endofíticos. Esses metabólitos apresentam ampla variedade de atividades biológicas, sendo utilizados não apenas na indústria farmacêutica, como também na indústria alimentícia e na agricultura⁹.

1.3. Espécie vegetal hospedeira

A espécie vegetal *Senna spectabilis* (**Figura 2**), é popularmente conhecida como Cássia do Nordeste, Acássia, Tula-de-Besouro, Pau-de-Ovelha e Canafístula-de-Besouro. Destaca-se por ser uma das espécies mais importantes do gênero *Senna*, que dentro da família Fabaceae (antigamente denominado Leguminosae), é considerado uma importante fonte de substâncias, que possuem grande diversidade estrutural. Nativa da América Central e do norte da América do Sul, é encontrada no Brasil em regiões de cerrado e florestas tropicais. Devido a suas flores amareladas e rápido crescimento, se tornou uma planta ornamental, e em função disso se encontra distribuída em outras regiões, como no continente Africano^{10,11}.

Figura 2 - Flores e folhas de *Senna spectabilis*.



Fonte: Site Flora do Brasil 2020.

Na medicina tradicional há relatos do uso dessa espécie no tratamento de gripes e resfriados, além de relatos do uso no tratamento de micose e doenças da pele em países asiáticos, como na Tailândia. Estudos também relatam suas propriedades antimicrobianas, laxativas, anti-inflamatórias, analgésicas e antiulcerogênicas¹².

Estudos de identificação e isolamento dos metabolitos secundários dessa espécie vegetal identificaram compostos como triterpenos pentacíclicos, antraquinonas, alcaloides, esteroides, pironas e flavonoides¹². Além de estudos a respeito da constituição fitoquímica, há estudos na literatura de fungos endofíticos associados a essa planta. Em 2014 Chapla e colaboradores¹³ investigaram a fração de acetonitrila de fungos endofíticos *Phomopsis* sp. e isolaram alternariol e citocalasinas, com potentes atividades biológicas. Também foram isolados fungos das espécies *Phaeocremonium* sp., *Furasium* sp. e *Xylaria* sp., que levaram ao isolamento de sesquiterpenos cadalenos, calamenenos e lactonas^{13,14}.

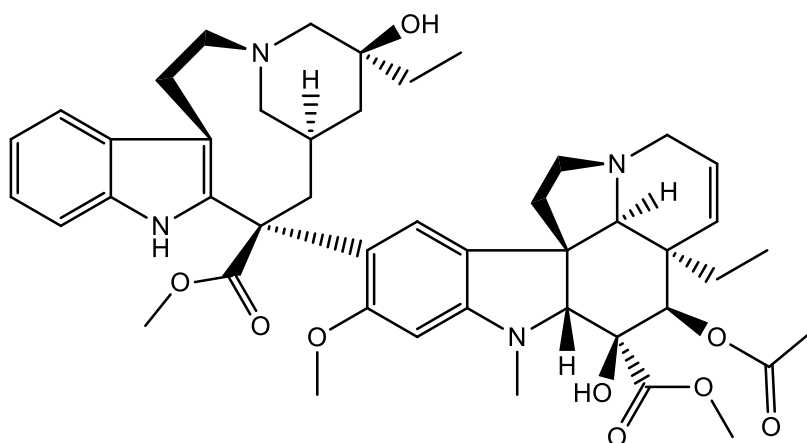
Apesar das plantas serem amplamente investigadas como fontes de substâncias bioativas, há poucos estudos sobre sua micologia. Normalmente dezenas de fungos endofíticos estão presentes em uma única planta, consequentemente a grande maioria desses microrganismos ainda são inexplorados, os tornando uma fonte promissora de substâncias biologicamente ativas².

1.4. Gênero *Fusarium* Link

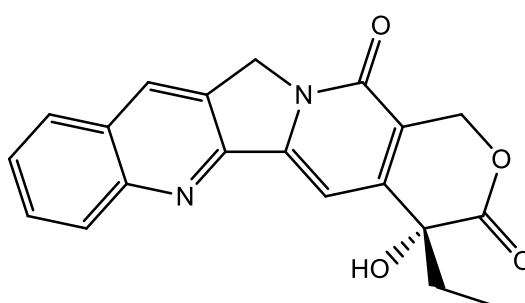
Os fungos do gênero *Fusarium* Link (filo Ascomycota e família Nectriaceae) são ubíquos a diferentes nichos ecológicos, sendo encontrados no ar, plantas, substratos orgânicos e principalmente em solos¹⁵. Apesar dos fungos deste gênero serem conhecidos como patógenos facultativos às plantas, animais e aos humanos, eles também auxiliam os hospedeiros - na relação simbiótica como fungo endofítico - frente a estresses bióticos e abióticos, exercendo um papel ecológico importante¹⁶.

Estudos do metaboloma de diferentes espécies de *Fusarium*, mostraram a produção de metabólitos secundários de diferentes classes, como alcaloides, terpenoides, quinonas, pironas e dentre outros, com potencial para uso farmacêutico e agrícola. Fármacos como o Taxol® (**I**), vimblastina (**III**), camptotecina (**IV**) e análogos, podofilotoxina (**V**) e quinina (**VI**), utilizados no tratamento de câncer, viroses e malária, respectivamente, foram isolados de fermentações *in vitro* de diferentes espécies do gênero (**Figura 3**). Ademais, metabólitos secundários produzidos unicamente por este gênero como a fusarubina (**VII**), javanicina (**VIII**), e a fusarielina (**IX**) se mostram promissores como agentes antimicrobianos (**Figura 4**)¹⁷.

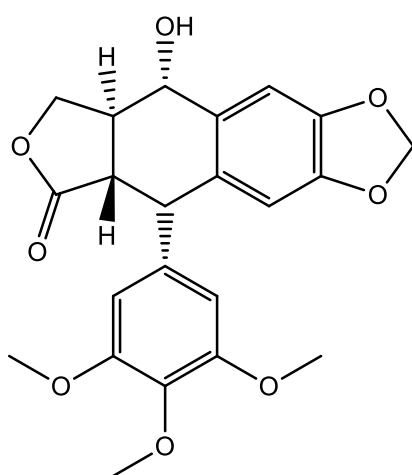
Figura 3 - Substâncias bioativas isoladas de fungos do gênero *Fusarium*.



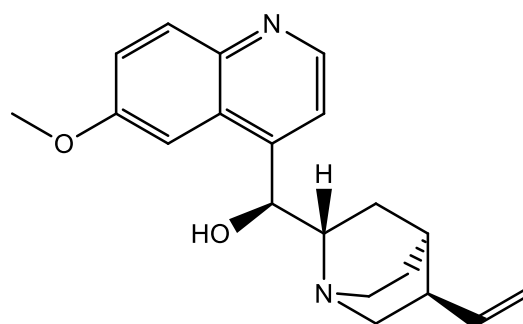
III



IV

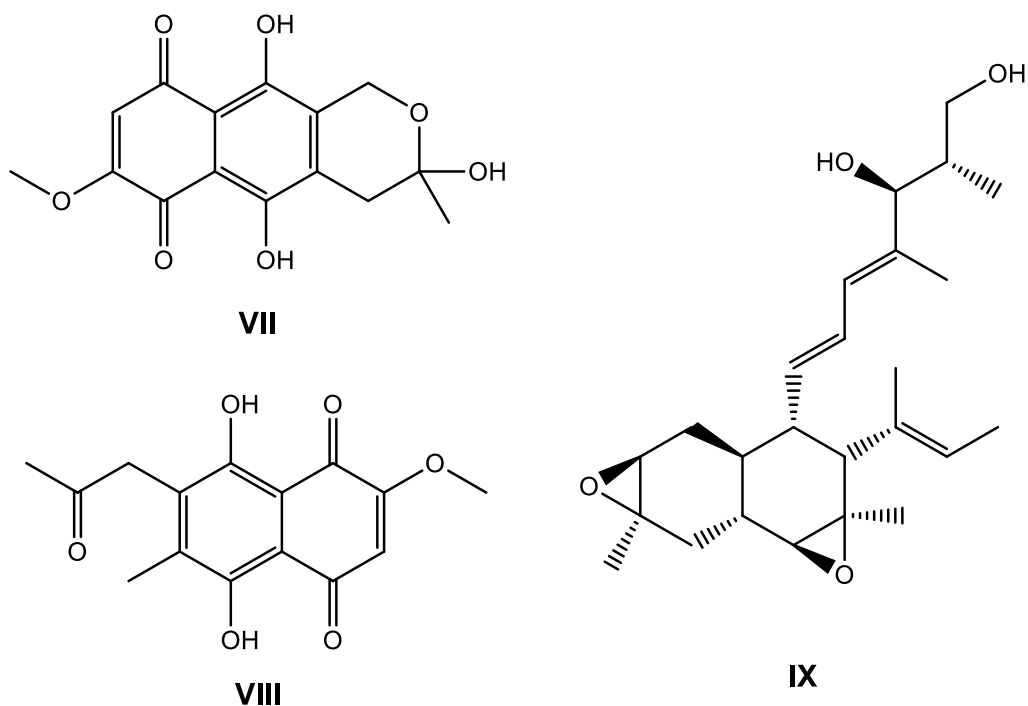


V

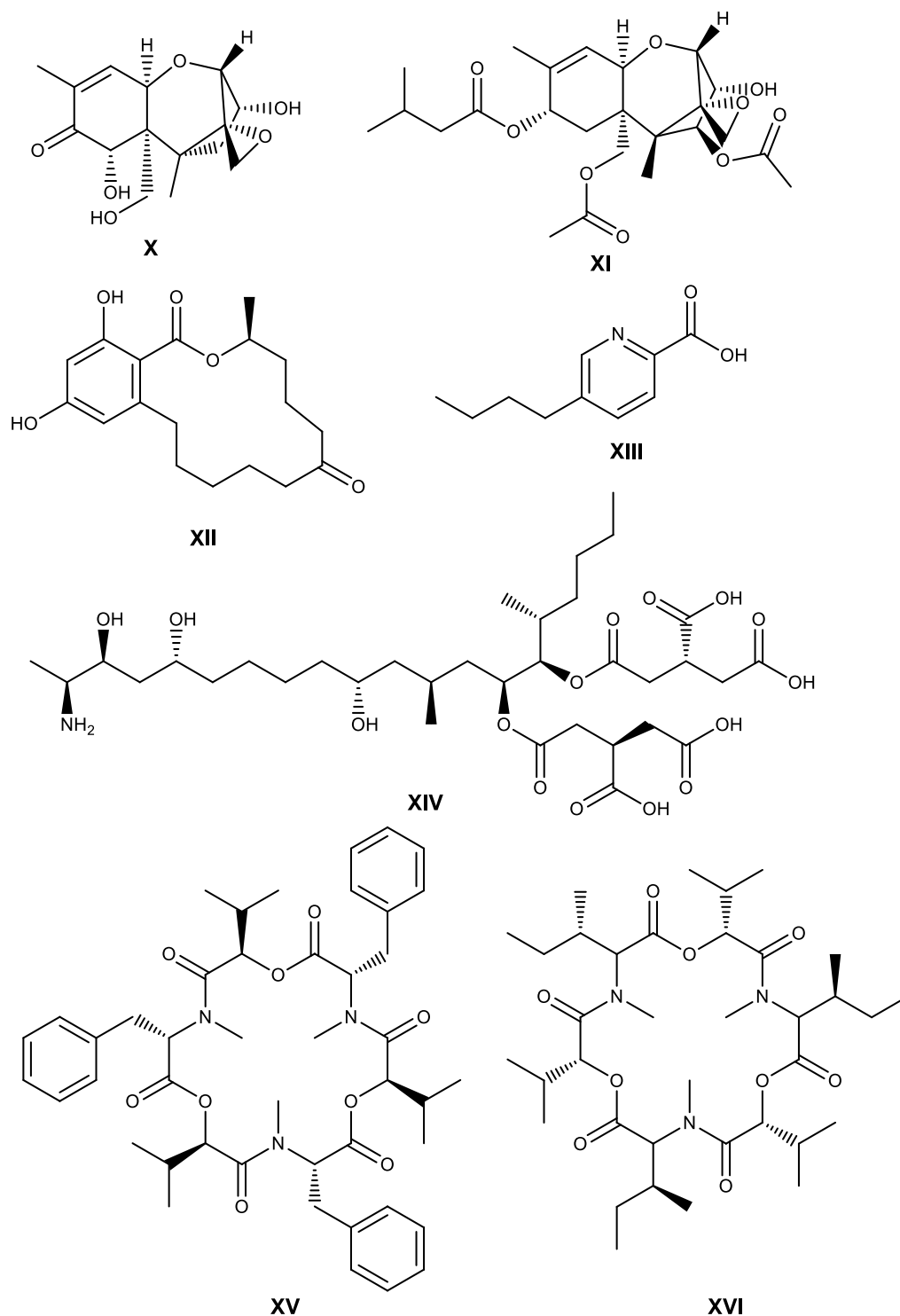


VI

Figura 4 – Substâncias produzidas exclusivamente por fungos do gênero *Fusarium*.



O gênero *Fusarium* também é conhecido pela produção de micotoxinas (**Figura 5**), substâncias consideradas tóxicas e que segundo a OMS (WHO) representam uma séria ameaça à saúde humana e animal. O fitopatógeno ataca, principalmente, plantações de grãos e culturas de tomates e bananas, contaminando os alimentos e impossibilitando-os de serem consumidos, causando prejuízos de bilhões para a agricultura. Entre as micotoxinas produzidas por este gênero, as mais importantes são os tricotecenos - deoxinilvalenol (**X**) e a toxina T-2 (**XI**)— a zearalenona (**XII**), o ácido fusárico (**XIII**) e a fumosina B1 (**XIV**). Micotoxinas consideradas emergentes também já foram isoladas de espécies deste gênero, como a fusaproliferina, a beauvericina (**XV**) e as eniatinas (**XVI**)¹⁸.

Figura 5 - Micotoxinas isoladas de espécies *Fusarium*.

1.5. OSMAC: Variação dos meios de cultivo

Os cultivos de fungos realizados *in vitro* não são capazes de reproduzir o ambiente natural no qual eles vivem, de modo que a alteração dos perfis de

metabólitos pode ocorrer devido a diferença de nutrição e aspectos físicos naturais¹⁹. Visando estudar a diversidade metabólica de um microrganismo, a técnica OSMAC (*One Strain, Many Compounds*) surge como uma maneira efetiva de ativar vias metabólicas silenciadas ou pouco expressas em cultivos usuais²⁰.

A variação do meio de cultivo, de forma racional, possibilita o isolamento de diferentes metabolitos, assim como o aumento da produção de uma substância alvo. A manipulação dos nutrientes do meio de cultivo, assim como a dos parâmetros físicos (temperatura, pH, agitação, luz etc.) alteram diretamente a diversidade de metabólitos secundários produzidos por esses microrganismos²¹.

Com isso, a técnica OSMAC apresenta-se como uma ferramenta com potencial para elucidação de metabólitos secundários silenciados nas linhagens fúngicas estudadas neste trabalho.

1.6. Metabolômica e o uso de ferramentas de desreplicação

1.6.1. Metabolômica

A abordagem metabolômica surge como uma ciência “ômica” capaz de investigar o metaboloma – metabolismo primário e secundário – de um sistema biológico de forma abrangente e quantitativa²². Normalmente são utilizadas duas abordagens nas investigações metabolômicas: a análise alvo (*Targeted*), que consiste na investigação quantitativa de um metabólito ou classes de metabólitos pré-selecionado frente a dado estímulo, e a análise global (*Untargeted*), que consiste numa análise qualitativa do maior número possível de metabólitos²³.

O metabolismo de um organismo é altamente complexo, logo a identificação de seus todos os seus metabólitos pode ser um trabalho árduo. As técnicas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e de espectrometria de massas (EM) são as mais utilizadas no estudo de composição metabólica, ou seja, do metaboloma de um sistema²⁴.

- A EM é um método altamente sensível, que fornece informações de massa molecular e de padrões de fragmentações de diversas

substâncias. No entanto é uma técnica destrutiva, pouco reprodutível - existem variações nas condições de ionização, assim como com as preferências dos instrumentos - e para a análise dos dados se faz necessário o uso de padrões, que nem sempre estão disponíveis, sobretudo para substâncias desconhecidas²⁵.

- A espectroscopia de RMN é uma técnica reprodutível e não seletiva, que nos permite a obtenção da conectividade atômica, e subsequentemente, da estrutura da molécula utilizando métodos bidimensionais. Contudo, é uma técnica de baixa sensibilidade para baixas concentrações, e ademais em matrizes complexas pode haver sobreposição de sinais, o que dificulta a elucidação estrutural de substâncias pouco abundantes^{23,26}.

De forma individual as técnicas analíticas como cromatografia, espectroscopia e espectrometria não são capazes de determinar todos os metabólitos, se fazendo necessário o acoplamento dessas técnicas de separação e detecção. Dentre essas abordagens acopladas, a mais comum é a de separação cromatográfica de alta performance, seja líquida (CL) ou gasosa (CG), acoplada a detectores de ultravioleta (UV) ou espectrometria de massas (EM). Apesar da dificuldade em acoplar a espectroscopia de ressonância magnética (RMN) às técnicas analíticas de separação, a mesma tem sido amplamente utilizada nos estudos metabolômicos, seja para identificação de substâncias isoladas e purificadas, quanto para extratos de alta complexidade²⁷.

A combinação dessas técnicas analíticas de separação e detecção possibilitam a obtenção de padrões rápidos e eficazes na elucidação estrutural de compostos, além da reunir as vantagens de cada técnica, superando suas desvantagens quando utilizadas isoladamente. Essa abordagem técnica pode fornecer informação compreensiva sobre os metabólitos em extrato bruto, auxiliando na decisão de continuidade de um processo de isolamento^{23,26}.

Os dados adquiridos por estas técnicas analíticas devem passar uma etapa de pré-tratamento, que tem como objetivo principal transformá-los em uma matriz capaz de eliminar variações que ocorrem na amostra e no equipamento, de forma a melhorar os sinais e diminuir os ruídos, para que seja possível uma comparação dos dados

entre si. A análise dos dados pré-processados pode ser feita por desreplicação e/ou análises quimiométricas²⁸.

A desreplicação é uma análise qualitativa dos extratos brutos, visando a detecção e anotação rápida de metabólitos conhecidos²⁹. Normalmente, os estudos de desreplicação são baseados através de comparação entre dados provenientes de técnicas cromatográficas e espectrométricas obtidos de bibliotecas ou banco de dados (tais como ChemSketch, PubChem, Dictionary of Natural Products, NuBBE_{DB} e GNPS)³⁰.

1.6.2. GNPS e UNIFI

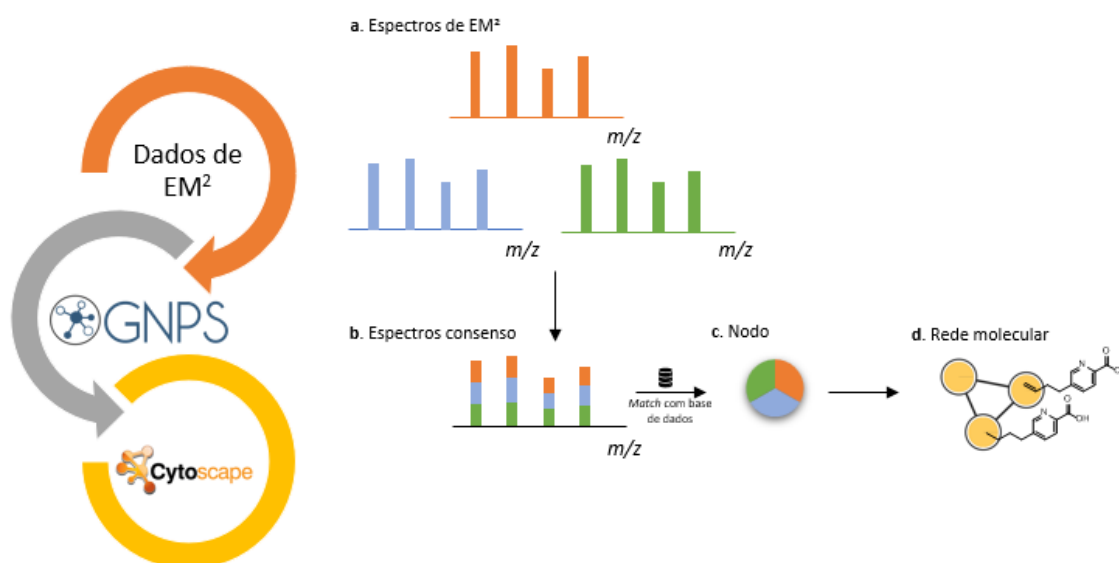
A rede molecular (*molecular networking*) é uma estratégia computacional, que auxilia na visualização e organização dos íons fragmentados e detectados em uma análise de EM² com base nas similaridades espectrais, que podem inferir em moléculas estruturalmente semelhantes. Nas análises EM/EM (*Tandem MS* em inglês), os íons percussores são formados e detectados, EM¹, e numa segunda etapa esses íons são fragmentados, EM²³¹.

A GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*) é uma plataforma online e gratuita de armazenamento, análise e anotação de substâncias de dados provenientes de espectros de EM/EM com aquisição em modo DDA (*Data Dependent Acquisition*). Algoritmos da plataforma permitem a construção de redes moleculares a partir dos dados espectrais³⁰.

Inicialmente, para a construção da rede é necessário realizar o agrupamento de todas as fragmentações de uma mesma substância, que será representado por um espectro consenso (**Figura 6, a e b**). Esses espectros são transformados em vetores em um espaço multidimensional, em que cada dimensão corresponde a intensidade (dados provenientes de análises de CL) e razão massa/carga (dados provenientes de EM). A rede molecular é gerada a partir dos valores de cosseno (*cosines scores*), calculados a partir dos vetores, entre os espectros das amostras analisadas e os espectros de referência presentes na biblioteca da plataforma. Os valores de cosseno podem variar de 0-1, onde 1 significa 100% de similaridade entre os espectros. A visualização da rede (**Figura 6, d**) é feita através de nodos (*node*) e arestas (*edges*):

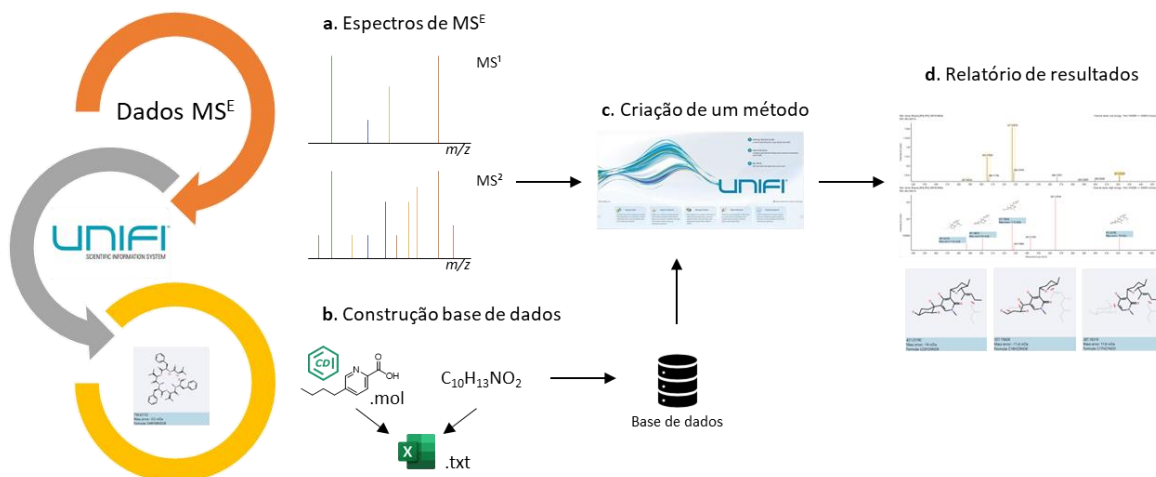
os nodos representam o espectro consenso de cada substância (**Figura 6, c**), enquanto as arestas conectam os nodos com similaridades espectrais^{28,32,33}.

Figura 6 - Esquema da formação da rede molecular pelo GNPS.



O UNIFI, Sistema de Informação Científica da *Waters Corporation*, também tem sido utilizado em estudos de desreplicação. Para a utilização deste sistema, os dados devem ser adquiridos através de cromatografia líquida de ultra eficiência, UPLC acoplada a um quadrupolo com tempo de voo, Q-TOF-MS^E, onde E representa energia de colisão. No método de aquisição em MS^E as colisões ocorrem em baixa e alta energia. Nas colisões de baixas energias obtêm-se informações a respeito dos íons precursores, enquanto nas colisões de alta energia é possível visualizar as fragmentações desses íons e informações de perda neutra. O software promove uma integração dos dados adquiridos com bibliotecas de dados presentes nele ou que podem ser inseridas pelo usuário^{34,35}.

Figura 7 - Esquema simplificado da utilização do UNIFI.



Essas plataformas possibilitam um estudo de desreplicação de alto rendimento. Além de promoverem a interação entre grupos de pesquisas de diferentes áreas e localidades através da oportunidade de construção de bibliotecas públicas, que permitem a difusão do conhecimento.

Com o intuito de estudar os fungos endofíticos das raízes de *Senna spectabilis*, o MSc. Juvenal Henrique Veloso, durante o desenvolvimento do seu trabalho de doutorado, isolou microrganismos desse órgão vegetal. Dois microrganismos deste isolamento, escolhidos de acordo com os resultados de atividades biológicas, foram escolhidos para estudos metabolômicos neste trabalho.

2. OBJETIVO

Avaliar o perfil químico e atividade biológica dos extratos obtidos dos fungos endofíticos isolados das raízes de *Senna spectabilis* utilizando a estratégia OSMAC, fazendo uso de técnicas de separação e abordagens metabolômicas, quimiométricas e de desreplicação para determinação/anotação de substâncias. Para isto, os objetivos específicos são:

- ✚ Cultivar os fungos endofíticos previamente isolados de *S. spectabilis* alternando os meios de cultivos (Czapek, Malte e PDB) e obter seus extratos brutos.
- ✚ Obter os perfis químicos HPLC-DAD e RMN de ^1H . Realizar os bioensaios *in vitro* das atividades anticolinesterásica e antibacteriana.
- ✚ Anotar as estruturas dos metabólitos secundários utilizando os dados obtidos por UPLC-QTOF-MS pelas plataformas UNIFI e GNPS, de modo a se observar a efetividade da OSMAC.
- ✚ Avaliar a influência das diferentes condições de cultivo propostas para a obtenção de massa e metabólitos secundários de uma linhagem fúngica em meio de czapek através da metodologia de planejamento fatorial.
- ✚ Avaliar a produção de metabólitos frente a diferentes tempos de cultivo e construir uma curva de crescimento.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Especificações dos materiais e equipamentos

3.1.1. Meios 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:

- ✚ *Czapek Dox Broth*: nitrato de sódio (2,0), sulfato de magnésio (0,5), cloreto de potássio (0,5), sulfato ferroso (0,01), difosfato de potássio (1,0) e sacarose (30,0).
- ✚ *Potato Dextrose Agar*: extrato de batata (4,0), equivalente a 200 g de infusão de batata, dextrose (20,0) e ágar (15,0).
- ✚ *Potato Dextrose Broth*: extrato de batata (4,0), equivalente a 200 g de infusão de batata e dextrose (20,0).

Tabela 1 - Meios de cultivos utilizados neste trabalho.

Meios de cultivo	Marca	Referência	Lote
<i>Czapek Dox Broth</i>	Kasvi	K25-610072	062317502
<i>Czapek Dox Broth</i>	Kasvi	K25-610072	062317501
<i>Malt Extract</i>	Neogen	7341A	111905C
<i>Potato Dextrose Agar</i>	Neogen	NCM0018A	US111393B
<i>Potato Dextrose Broth</i>	Neogen	NCM0157A	US112738B

3.1.2. Solventes

O solvente deuterado, CD₃OD (com pureza ≥ 99,8% para D) utilizado nos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi da marca Sigma-Across Organics™. 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 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, LCMS e UPLC-QTOF-MS 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 e LCMS utilizou-se uma coluna Phenomenex Luna C18 (100 x 4,6 mm, 5µm) com pré-coluna C18 (2 x 7,8 mm). E para as análises em UPLC-QTOF-MS utilizou-se uma coluna de fase reversa C18 Acquity UPLC® HSS T3 Column (1.8 µm; 2.1 mm x 100 mm).

3.1.4. Equipamentos

As análises realizadas em todos os equipamentos, citados **na Tabela 2**, foram realizadas no NuBBE (Núcleo de bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais), no Instituto de Química de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

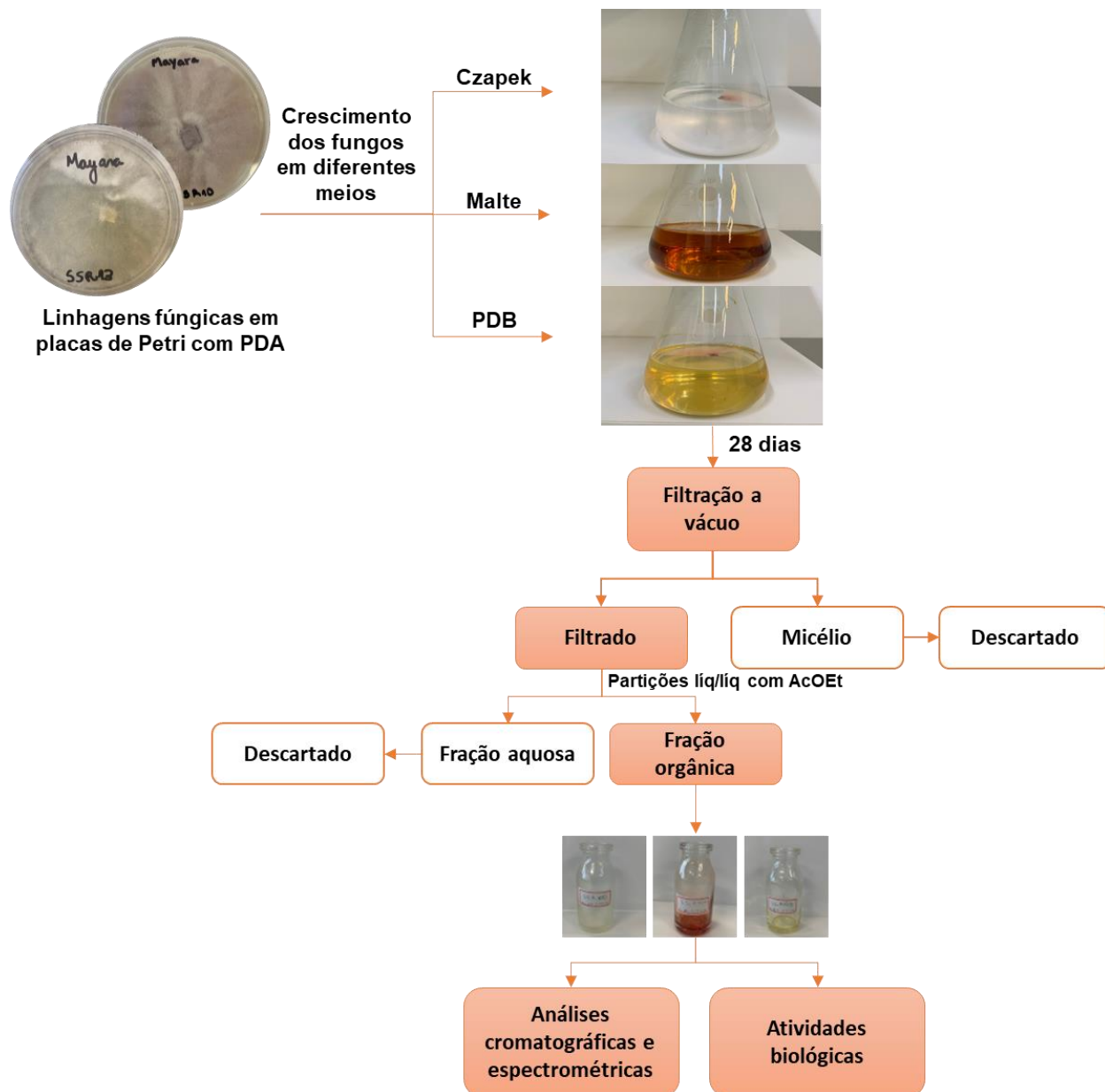
Tabela 2 - Equipamentos utilizados neste trabalho.

Equipamento/Marca	
Balança analítica Explorer™ Ohaus®	
Incubadora BOD TE-371 Tecnal®	
Incubadora Shaker Refrigerada SL-223 Solab	
Autoclave vertical Phoenix Luferco	
Minicentrífuga MiniSpin® Eppendorf	
Equipamento/Marca	Módulo
Evaporador rotativo Büchi® R-114	Banho de aquecimento B-480; Bomba de vácuo Büchi® V-300 e refrigeradores
Evaporador rotativo Heidolph Laborata 4000	Banho de aquecimento Heidolph HB digital Bomba de vácuo Büchi® V-300 e refrigeradores
Sistema HPLC-DAD Shimadzu®	Bomba: LC-20AT Detector de Arranjo de Diodos: SPD-M20A Forno de coluna: CTO-20A Injetor automático: SIL-20A Módulo de Comunicação: CBM-20A
Espectrômetro Bruker® Avance III HD 600 (14,1 T)	Sonda criogênica de 5 mm com detecção inversa e três canais de aquisição (¹ H, ¹³ C e ¹⁵ N)
	LCMS:
Sistema LC Shimadzu®	Bomba: LC-20AD Detector de Arranjo de Diodos: SPD-M20A Forno de coluna: CTO-20A Injetor automático: SIL-20AHT Módulo de Comunicação: CBM-20A
Sistema EM (MS) Amazon SL Bruker®	Fonte de ionização: eletrospray (ESI) Analisador: ÍonTrap
UPLC-MS Acquity UPLC I – Class System (Waters Corporation)	
Sistema UPLC	Bomba: <i>Quaternary Solvent Manager</i> Detector de Arranjo de Diodos: λ 800 nm Forno da coluna: FTN Injetor automático
Sistema EM (MS) Xevo G2-S QTOF	ESI-Q-TOF-MS, em modo positivo de ionização Voltagem do capilar ajustada para cada uma das amostras Faixa de aquisição de <i>m/z</i> 50-1200 Da

3.2. Estudo das linhagens fúngicas em diferentes meios de cultivo

Nesta etapa do trabalho foram analisados os perfis metabólicos de duas linhagens fúngicas frente a variações nos meios de cultivo de líquidos. A **Figura 8** mostra de forma resumida a preparação dos extratos obtidos.

Figura 8 - Esquema da obtenção dos extratos brutos em diferentes meios de cultura.



3.2.1. Identificação dos fungos endofíticos

Os fungos endofíticos das raízes de *Senna spectabilis* foram previamente isolados pelo MSc. Juvenal Henrique Veloso e conservados na micoteca do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE). A identificação botânica da espécie foi realizada pela Dra. M. C. M. Young e uma exsicata (SILVA-193) está depositada no Herbário do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, Brasil. 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.

As linhagens **S.S_R10** e **S.S_R13** (S.S_R: *S. spectabilis* raízes) foram escolhidas para estudo neste trabalho de acordo com as Análises de componentes principais (ACP) e Análises de agrupamento hierárquico, realizadas pela Dr.^a Denise Selegato.

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)³⁶.

A linhagem fúngica S.S_R10 foi submetida a uma nova identificação baseada na amplificação por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) de parte do gene TUB do microrganismo, seguida pelo sequenciamento de ácidos nucleicos pelo método de Sanger, no aparelho ABI3100 *Fluorescence Futomated Frequencer* (Applied Biosystems). A sequência de DNA gerada em cada reação de sequenciamento foi comparada com sequências depositadas no banco de dados no NCBI utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Esta identificação foi realizada pela Profa. Dra. Marcia Regina von Zeska Kress do Laboratório de Expressão Gênica e Proteômica de Fungos Filamentosos (LEGPFF) da Universidade de São Paulo (USP).

3.2.2. Cultivo dos fungos

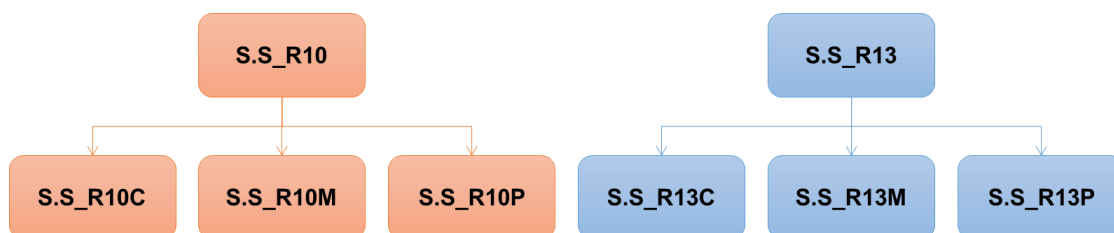
Inicialmente, os fungos foram cultivados em Placas de petri em meio sólido PDA (*Potato Dextrose Agar*) em incubadora DOB (Demanda Química de Oxigênio) por 10 dias, à 32,1°C. Posteriormente, as linhagens fúngicas foram submetidas a repicagens em placas de Petri contendo PDA. Após o crescimento, aproximadamente um terço de micélio de cada placa foi inoculado em cada meio líquido, sendo eles czapek, malte e PDB (*Potato Dextrose Broth*), em modo estático por 28 dias a temperatura ambiente, de acordo com o protocolo realizado no NuBBE.

Os meios líquidos foram preparados seguindo o método descrito no rótulo do produto utilizando água pura esterilizada - utilizou-se 3 erlenmeyers de boca estreita contendo 200 mL de cada meio. Após o preparo, os meios foram autoclavados em autoclave vertical de acordo com o protocolo do laboratório (1 atm por 21 minutos). Fez-se o mesmo para os brancos (contendo apenas os meios de cultura).

3.2.3. Obtenção dos extratos dos fungos endofíticos

Após o período de incubação, o caldo foi separado do micélio por filtração a vácuo e o filtrado foi submetido à três partições líquido-líquido com acetato de etila na proporção de 300 mL de solvente para 1.000 mL de filtrado. Posteriormente, o extrato foi concentrado em pressão reduzida usando o evaporador rotativo, fornecendo os extratos brutos (**Figura 9**) de cada fungo. Subsequentemente, os extratos foram solubilizados em MeOH:H₂O (95:05) e submetidos a etapa de *clean-up* (C18).

Figura 9 - Códigos utilizados para os extratos de cada linhagem fúngica nos diferentes meios de cultivo.



3.2.4. Perfil químico dos extratos brutos dos fungos endofíticos

Os extratos brutos foram submetidos à HPLC-DAD e RMN de ^1H com o intuito de obter os perfis químicos, e foram avaliados também frente a bioensaios, *in vitro*.

Após a etapa de *clean-up*, os extratos foram diluídos em MeOH (100%) para uma concentração de 5 mg.mL^{-1} , foram centrifugados e os sobrenadantes foram armazenados em frascos para injeção. O sistema utilizado para análise em HPLC-DAD foi coluna analítica C-18, com injeção de $15,0 \mu\text{L}$ e eluição em gradiente exploratório $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (0,1% CH_2O_2) 95:05 a 0:100 v/v por 50 min., fluxo de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$ e λ inicial de 190 até 800 nm.

Para os experimentos de RMN, as amostras de 4 mg foram solubilizadas em $200 \mu\text{L}$ de solvente deuterado CD_3OD (com pureza $\geq 99,9\%$ para D) e transferidas para tubos de RMN de 3 mm. Como referência interna utilizou-se TMS.

3.2.5. Ensaios biológicos

Com o intuito de avaliar a bioatividade dos extratos obtidos em diferentes meios, foram realizados ensaios biológicos para a avaliação de atividade antibacteriana e anticolinesterásica. Todos os ensaios foram realizados em parceria, sendo que os procedimentos descritos foram realizados por estes parceiros em seus respectivos laboratórios de pesquisa.



Acetilcolinesterase e butirilcolinesterase

A triagem de inibidores para as enzimas acetilcolinesterase de peixe elétrico (AChE_{ee}) e butirilcolinesterase humana (BChE_{hu}) foi realizada no Grupo de Cromatografia de Bioafinidade e Produtos Naturais (GCBPN) na Universidade de São Paulo (USP), campus de Ribeirão Preto, sob orientação da Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso, seguindo a metodologia descrita abaixo.

Soluções estoques de cada amostra foram preparadas solubilizando o conteúdo de cada frasco com metanol (volumes variáveis a cada amostra para ajuste da concentração final de 2 mg.mL^{-1}). Posteriormente, cada solução foi centrifugada por 5 min a 10.000 rpm. A solubilização de cada solução estoque foi auxiliada por maceração em banho de ultrassom por 5 min a temperatura ambiente.

As amostras foram submetidas ao ensaio de inibição para as enzimas acetilcolinesterase de peixe elétrico (AChE_{ee}) e butirilcolinesterase humana (BChE_{hu}). Para este ensaio foram utilizadas as enzimas AChE_{ee} e BChE_{hu} imobilizadas covalentemente em capilar de sílica fundida (30 cm x 0,375mm x 100 µm) sendo nominadas ICER (*Immobilized Capillary Enzyme Reactor*) ICER-AChE_{ee} e ICER-BChE_{hu}, respectivamente³⁷⁻³⁹.

Os ICER-AChE_{ee} e ICER-BChE_{hu} foram utilizados como biorreatores enzimáticos acoplados individualmente entre um instrumento de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) 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 com solução de acetato de amônio 15mM, pH 8,0 para a fase móvel, em uma vazão de 0,05 mL.min⁻¹, volume de injeção de 10 µL da solução contendo 70 µM de acetilcolina (ACh) e 200µg/mL da amostra candidata a inibidor. O inibidor padrão utilizado foi a galantamina (100 µM).

A partir de cada solução estoque de cada um dos compostos (2 mg.mL⁻¹) foram alíquotados 10 µL (200 µg.mL⁻¹ concentração final) e adicionados 20 µL da solução estoque de acetilcolina (ACh) 350 µM (70 µM concentração final) e 70 µL da solução de acetato de amônio 15 mM, pH 8,0. O volume final do meio reacional foi de 100 µL. As soluções foram preparadas em triplicatas e alíquotas de 10 µL foram injetadas no sistema LCMS 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 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 na 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 (P_0), de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ de inibição} = 100 - \left[\left(\frac{P_i - Sb}{P_0 - Sb} \right) \times 100 \right]$$

Onde Sb representa a área da colina resultante da hidrólise espontânea do substrato, para esse controle um capilar vazio foi utilizado.



Atividade antibacteriana

A triagem e as porcentagens de CIM e CBM dos extratos foi realizada no Laboratório de Epidemiologia e Micrologia Moleculares (LEMiMo) na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), sob orientação da Profa. Dra. Ilana L. B. C. Camargo, seguindo a metodologia descrita abaixo.

Para a triagem inicial, os extratos foram diluídos em DMSO para obtenção de uma solução estoque, que posteriormente foi diluída em caldo de Mueller Hinton Cátion Ajustado (MHCA) (BD) na proporção 1:100. Os extratos foram testados a $521 \mu\text{g.mL}^{-1}$ segundo o protocolo CLSI⁴⁰. Foram preparadas duas amostras controles: a positiva, a qual a bactéria foi inoculada em caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado, e a negativa, sem inóculo de bactéria, apenas o caldo. A incubação foi realizada a $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. A triagem positiva indica que houve atividade antibacteriana na concentração testada ($\leq 512 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A triagem negativa indica que não há atividade antibacteriana. Os testes foram realizados em triplicatas.

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), foram utilizadas todas as linhagens da espécie bacteriana que se mostraram sensíveis aos extratos. Os extratos foram diluídos em DMSO para preparação de uma solução estoque, que, posteriormente, foi diluída em caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado (MHCA) (BD) segundo o CLSI⁴¹, na concentração 1:100. A partir disto, os extratos foram testados em $512 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a 1% DMSO, ou na maior concentração possível sem que houvesse precipitação. Os experimentos foram realizados em triplicata. Dos poços do extrato a

512 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ partiram as diluições seriadas (1:2) até a concentração de 0,06 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. A incubação foi feita a 35 °C e a leitura visual dos resultados após 24 horas, na qual observou-se até qual concentração o extrato conseguia inibir o crescimento do microrganismo. Os testes foram realizados em triplicata.

Para determinação da concentração bactericida mínima inoculou-se 100 μL do conteúdo do poço equivalente a CIM, uma diluição abaixo e duas acima, em placa de MHCA-Ágar por técnica de microgota, sem estriar. A placa foi incubada em estufa a 35°C por 24 horas, quando foi feita a leitura visual para observar qual concentração não houve o crescimento bacteriano. Para a determinação da atividade como bactericida ou bacteriostática, os compostos que tiveram a razão CBM/CIM menor ou igual a quatro foram considerados bactericidas e acima disso bacteriostáticas⁴².

3.2.6. UPLC-QTOF-MS

Os extratos brutos foram submetidos à UPLC-QTOF-MS com modos de aquisições dependente dos dados (DDA) e independente (DIA). Na análise em modo dependente, os íons precursores mais intensos são selecionados em uma primeira etapa, e por fim são fragmentados em uma segunda etapa (EM/EM). Enquanto em modo independente, MS^E , todos os íons em uma determinada janela m/z são submetidos à fragmentação, ou seja, não há uma seleção.

Devido a sensibilidade do instrumento, os extratos nesta etapa foram diluídos em MeOH (100%) para uma concentração de 0,5 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$, foram centrifugados e os sobrenadantes foram armazenados em frascos para injeção. O sistema utilizado para análise foi coluna de fase reversa Acquity UPLC® HSS T3 Column (1,8 μm ; 2,1 mm x 10 mm), com injeção de 0,1 μL e eluição em gradiente exploratório $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (0,1% CH_2O_2) 95:05 a 0:100 v/v por 20 min., fluxo de 0,4 $\text{mL}.\text{min}^{-1}$.

O software utilizado para processamento e visualização dos dados foi o Waters® *Mass Lynx* 4.1. Os dados obtidos em modo DDA foram utilizados na plataforma GNPS, e os dados em DIA no sistema UNIFI.



UNIFI

Uma base de dados *in-house* com metabólitos isolados de *Fusarium oxysporum* foi construída com base em um review da literatura⁴³, contendo 185 substâncias. Para análise no UNIFI, todas as substâncias catalogadas foram desenhadas no ChemDraw Professional 17.1 e salvas em formato “.mol”. Esta base foi inserida no UNIFI.

Para a anotação de substâncias através do UNIFI, utilizou-se uma margem de erro de 5 ppm e intensidade dos picos em alta e baixa energia de colisão, respectivamente de 500 a 1000 unidades de intensidade.



GNPS

Para análise dos dados pela plataforma GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>), foi realizado uma conversão dos dados .raw para .mzML utilizando o aplicativo MSConvert. Em seguida os dados foram pré-processados a partir do software MZmine 2.53, os parâmetros estão detalhados no **Apêndice 1**. Os dados pré-processados foram exportados nas extensões .mgf e .cvs para uma análise FBMN (*Feature-Based Molecular Networking*) no GNPS^{44,45}.

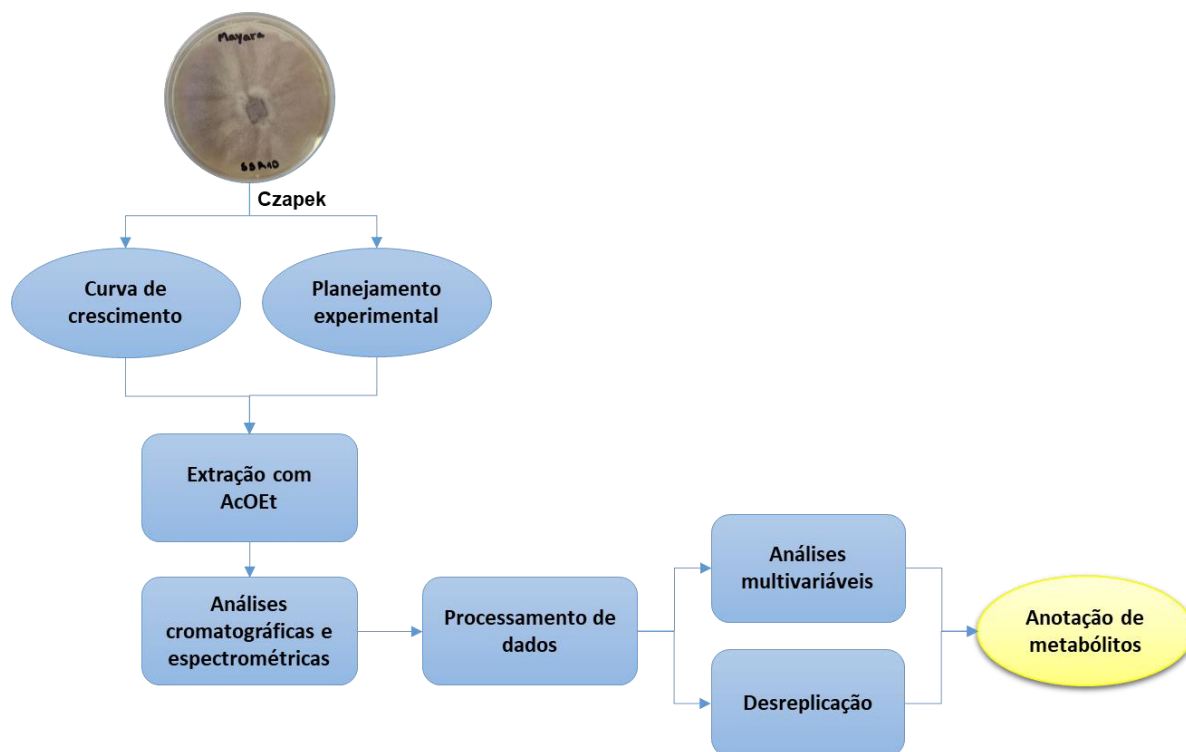
A tolerância de massa do íon precursor foi ajustada para 0,02 Da e a tolerância do íon fragmento para 0,2 Da. Para a formação da rede molecular, as arestas foram filtradas para terem um cosseno maior que 0,6 e mínimo de quatro picos correspondentes. O tamanho máximo de uma família molecular foi definido como 100. Os dados submetidos foram comparados com dados das bibliotecas espectrais da plataforma³⁰.

3.3. Estudo da linhagem fúngica S.S_R10.

Após estudo dos resultados da etapa anterior, foram selecionados a linhagem fúngica S.S_R10 e o meio de cultivo de czapek para investigação do perfil metabólico do mesmo frente a variação de parâmetros físicos e quanto ao seu crescimento.

A obtenção dos extratos brutos nessa etapa foi igual ao item 3.2.3., sendo que a etapa diferente foi o cultivo, a qual será descrita. A **Figura 10** mostra resumidamente o estudo feito nessa etapa.

Figura 10 - Esquema resumido do estudo realizado em *F. oxysporum* (S.S_R10) em meio de czapek.



3.3.1. Planejamento fatorial 2²

Visando otimizar as condições de cultivo e a produção metabólica do fungo S.S_R10, foi realizado um planejamento experimental completo com duas variáveis em dois níveis. A codificação dos níveis foi feita através da utilização de +1 para os níveis altos e -1 para os níveis baixos, sendo que aqueles de nível alto foram considerados, por convenção, com a presença do efeito e o nível baixo com ausência do mesmo (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Variáveis do planejamento experimental codificadas.

Variável	Nível alto (+1)	Nível baixo (-1)
Agitação (rpm)	50 (com)	0 (sem)
Exposição à luz (h)	24 (com)	0 (sem)

Para saber o número de ensaios a serem realizados toma-se o número de níveis elevado ao número de variáveis escolhidas, portanto será realizado 2², que é

igual a 4 experimentos diferentes que devem ser executados. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

A matriz do planejamento (**Tabela 4**) foi gerada através do TIBCO® *Statistica* 10 – software de metodos estatisticos, desenvolvido pela empresa *StatSoft*.

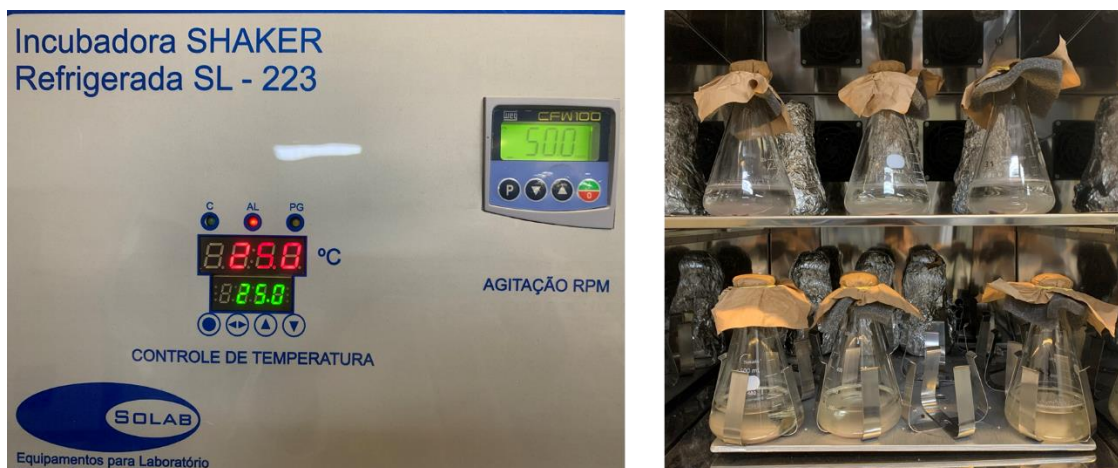
Tabela 4 - Matriz do planejamento fatorial.

Ensaio	Agitação	Luz
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	-1	-1
6	+1	-1
7	-1	+1
8	+1	+1
9	-1	-1
10	+1	-1
11	-1	+1
12	+1	+1

Aproximadamente um terço de micélio das placas foi inoculado nos erlenmeyers contendo 200 mL de meio de cultivo czapek. O tempo de incubação de todos os ensaios foi de 28 dias e a extração foi realizada conforme metodologia descrita no item 3.2.3.

Todos os experimentos foram conduzidos em Shaker Orbitalar (**Figura 11**), para que não houvesse variação da incidência de luz e para que a temperatura fosse controlada em 25°C. Os ensaios em modo estático foram mantidos na prateleira superior do equipamento, a qual não agitava e os ensaios com agitação foram conduzidos na prateleira com agitação. E para os ensaios com ausência de luz utilizou-se papel alumínio em volta dos erlenmeyers.

Figura 11 - Shaker orbital e distribuição dos erlenmeyers no equipamento.



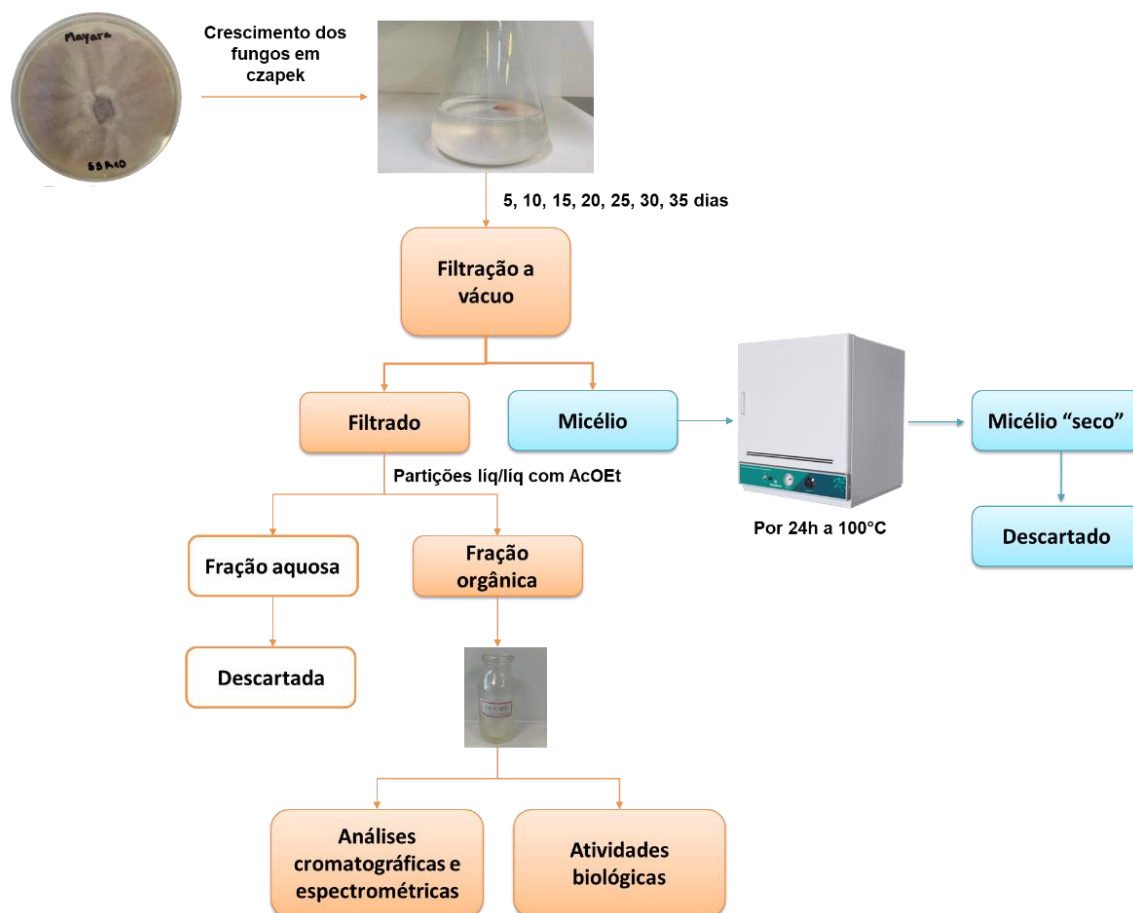
A massa de extrato de cada experimento foi o parâmetro considerado como resposta do planejamento, portanto, os extratos foram pesados em balança analítica. Para análise do perfil metabólico, os extratos foram submetidos a etapa *clean-up* (C18), centrifugados e diluídos em MeOH (100%) para uma concentração de 1 mg.mL^{-1} e submetidos a LCMS em gradiente exploratório $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (0,1% CH_2O_2) 95:05 a 0:100 v/v por 50 min., fluxo de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$ e λ inicial de 190 até 800 nm.

3.3.2. Curva de crescimento

Após o crescimento dos fungos nas placas de Petri contendo PDA, cinco discos de micélio ($0,9 \times 0,9 \text{ cm}$) foram inoculados em frascos de erlenmeyers contendo 200 mL de meio líquido de czapek, que foi preparado conforme rótulo da embalagem utilizando água ultrapura esterilizada. Os experimentos foram conduzidos em modo estático e na presença de luz.

Durante o período de incubação foram retirados ao acaso três erlenmeyers a cada cinco dias. O procedimento repetiu-se por 35 dias. Antecedentemente ao processo de filtração, os papéis filtros utilizados eram mantidos em estufa a 100°C por 24h e pesados. O caldo foi separado do micélio por filtração a vácuo. O filtrado foi submetido a metodologia descrita no item 3.2.3 para obtenção dos extratos brutos, enquanto o micélio foi recolhido junto ao papel filtro e mantido na estufa a 100°C por 24 h. Após esse tempo, o micélio foi pesado e descartado (**Figura 12**).

Figura 12 - Preparação e obtenção dos extratos brutos da curva de crescimento para linhagem fúngica S.S_R10 em meio de czapek.



A curva de crescimento foi construída a partir dos valores de massa seca do micélio por quantidade de meio de cultura (mg. 200 mL⁻¹) versus o tempo de incubação em dias. E com a finalidade de estudar a diversidade metabólica do fungo em diferentes tempos de incubação submeteu-se os extratos a análises cromatográficas em gradiente exploratório, conforme descrito no item 3.2.4.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação dos fungos

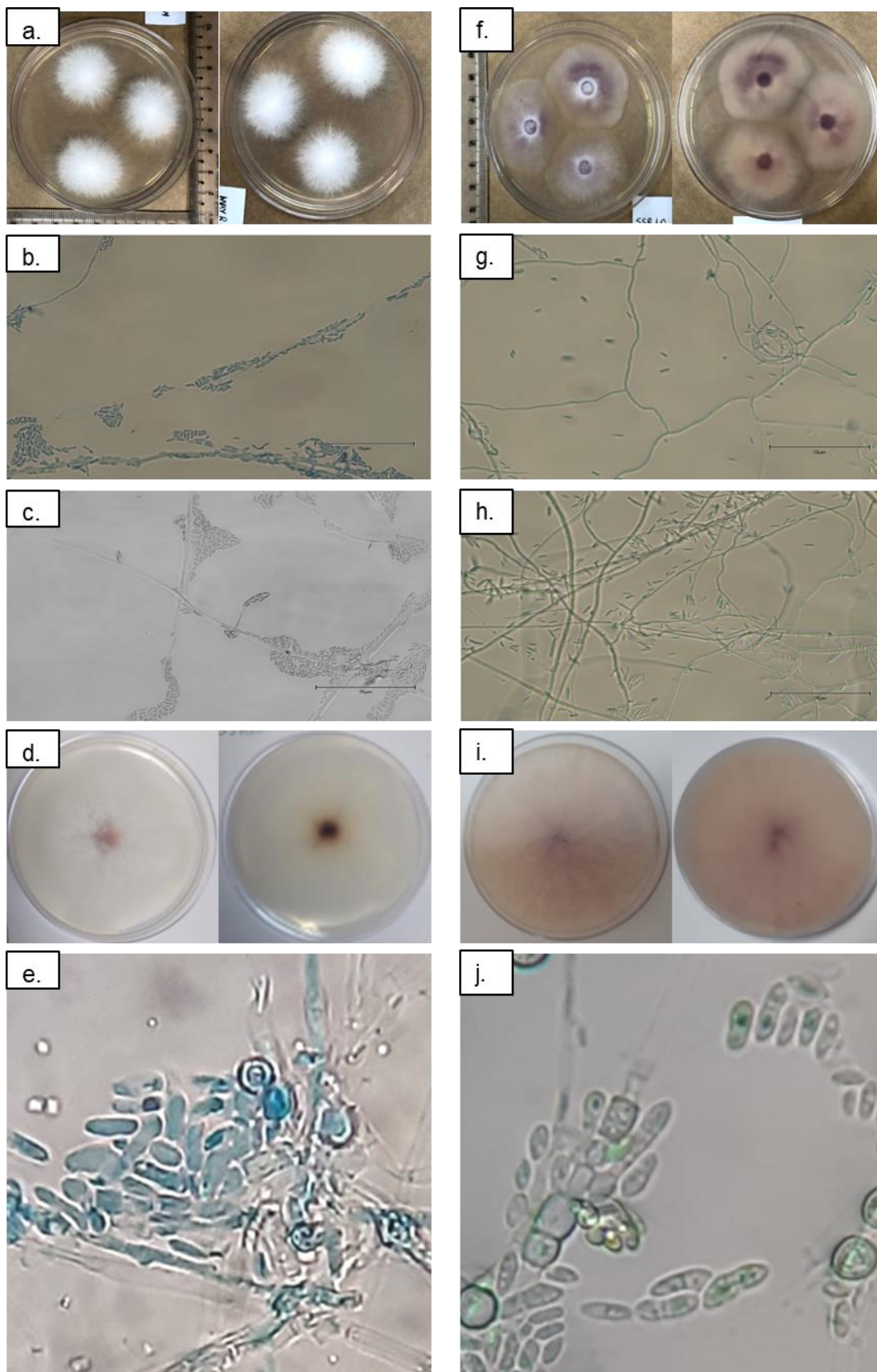
Obteve-se, através do software MEGA 7, uma sequência consenso, que foi comparada com as sequências obtidas no banco de dados do GenBank por meio da ferramenta nBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências que compartilhavam 97% ou mais de semelhanças foram identificadas como a mesma espécie.

Para o fungo S.S_R13 obteve-se 99% de identidade com *Fusarium oxysporum*. Para o fungo S.S_R10, no entanto, obteve-se uma semelhança menor que 97%, sendo identificado, inicialmente, como *Fusarium* sp..

Como a linhagem S.S_R10 obteve uma identificação inferior a 97% na identificação realizada pelo Prof. Dr. Marcos Antônio Soares, as linhagens fúngicas foram enviadas ao laboratório da Profa. Dra. Marcia Regina von Zeska Kress. E a identificação indicou 100% de similaridade com *Fusarium oxysporum* para ambas as linhagens.

A **Figura 13a** mostra do lado esquerdo a frente e do lado direito o verso do macrocultivo de S.S_R13, enquanto na **Figura 13b e c**, temos o microcultivo, realizados pelo Prof. Dr. Marcos Antônio Soares. A **Figura 13d** mostra no lado esquerdo a colônia gigante de S.S_R13 e o verso no lado direito, enquanto a **Figura 13e** mostra o microcultivo realizados pela Profa. Dra. Marcia Regina von Zeska Kress. A mesma sequência ocorre para a **Figura 13f a j**, sendo que o macro e microcultivo nestas imagens fazem referência a linhagem fúngica S.S_R10.

Figura 13 - Imagens do macrocultivo (superiores) e microcultivo (inferiores) das linhagens fúngicas: a-e S.S_R13 e f-j S.S_R10.



Fonte: Prof. Dr. Marcos Antônio Soares e Profa. Dra. Marcia Regina von Zeska Kress

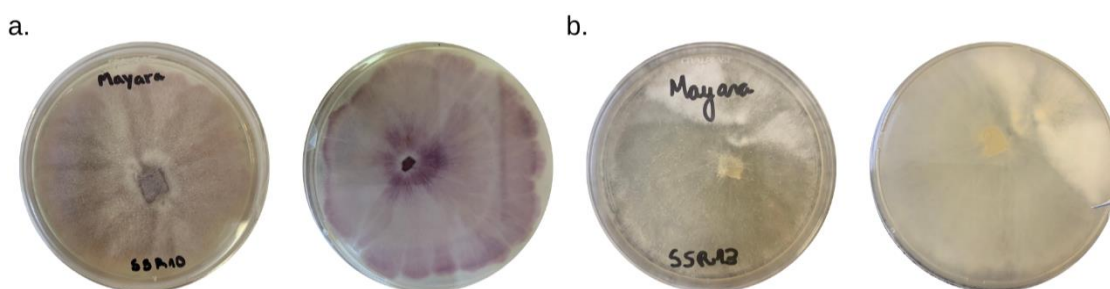
A variabilidade genética dentro da mesma espécie é muito comum em fungos, e é demonstrada através das formas especiais (*formae specialis* ou f. sp.), que são variações intraespecíficas comumente associadas à diferentes expressões genéticas induzidas pela rede de interação dos fungos com seus ambientes bióticos e abióticos⁴⁶.

Acredita-se que as linhagens fúngicas deste trabalho podem ser forma especiais, devido as diferenças morfológicas observadas no macro e microcultivo apresentados na **Figura 13**.

4.2. Crescimento dos fungos

As linhagens fúngicas cultivadas em placas de petri contendo o meio sólido PDA (*Potato Dextrose Agar*) apresentaram colorações diferentes, a S.S_R10 apresentou uma coloração roxa, enquanto a S.S_R13 apresentou coloração branca (**Figura 14**).

Figura 14 - Crescimento dos fungos em plaquinhas de Petri contendo meio de PDA (*Potato Dextrose Agar*): a. S.S_R10 e b. S.S_R13.



As linhagens fúngicas foram cultivadas em diferentes meios de cultivos com o intuito de analisar os efeitos da OSMAC. A **Tabela 5** mostra a massa de extrato bruto obtida para cada um dos meios preparados em escala reduzida. Houve uma grande variância de massa de extrato de uma linhagem fúngica para outra, sendo que a linhagem S.S_R13 foi a que teve maior rendimento, obtendo uma massa de 91,6 mg no meio de cultivo de czapek, enquanto para S.S_R10, o cultivo que apresentou maior rendimento foi o de malte, obtendo 15,3 mg.

Tabela 5 - Massa de cada extrato obtido a partir da variação do meio de cultivo das linhagens fúngicas em escala reduzida.

Linhagem fúngica	Czapek (mg)	Malte (mg)	PDB (mg)
S.S_R10	10,9	15,3	13,5
S.S_R13	91,6	36,3	16,4
Branco	11,2	9,4	79,6

Esse cultivo em pequena escala foi realizado com o intuito de realizar análises espectroscópicas e cromatográficas, além de ensaios de atividade biológica, que serão discutidos a seguir.

4.3. Atividades biológicas

Os extratos obtidos neste trabalho tiveram a atividade inibitória de AchE_{ee} e BChE_{hu} avaliadas *in vitro*. Os resultados obtidos do ensaio de triagem pontual com os compostos em concentração final de 200 µg.mL⁻¹ são demonstrados na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Resultados dos ensaios de triagem pontual para as enzimas acetilcolinesterase de peixe elétrico (AchE_{ee}) e butirilcolinesterase humana (BChE_{hu}).

Extratos	% Inibição	
	ICER-AChE _{ee}	ICER-BChE _{hu}
Galantamina*	96,80 ± 0,3	91,7 ± 3,0
S.S_R13M	11,05 ± 2,4	3,7 ± 0,2
S.S_R10M	21,31 ± 7,2	20,3 ± 1,5
S.S_R13P	11,05 ± 2,4	24,1 ± 2,1
S.S_R10P	29,55 ± 1,0	16,2 ± 3,6
S.S_R13C	3,66 ± 1,2	5,7 ± 1,3
S.S_R10C	4,63 ± 2,8	12,6 ± 0,9

* Inibidor padrão de AChE_{ee} e BChE_{hu}; S.S_R13: *Fusarium oxysporum*; S.S_R10: *Fusarium oxysporum*; C: czapek; M: malte; P: PDB

Todos os extratos apresentaram atividade inibitória fraca quando comparadas ao inibidor padrão para ambas as enzimas. Os extratos em PDB foram os que apresentaram as maiores porcentagens de inibição para ambas as enzimas, no

entanto, em linhagens fúngicas diferentes, *F. oxysporum* (S.S_R10) para AChE_{ee} e *F. oxysporum* (S.S_R13) para BChE_{hu}.

Os seis extratos foram testados contra as bactérias gram-positivas *S. epidermidis* (ATCC 35984), *S. aureus* (ATCC 25923), *S. aureus* ATCC (8095), *E. faecalis* ATCC (29212), *E. faecium* (ATCC 700221), e gram-negativas *K. pneumoniae* (ATCC 700603), *E. coli* (ATCC 25922), *A. baumannii* (ATCC 19606) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853).

Os resultados da triagem inicial são demonstrados na **Tabela 7**. Os extratos com atividade antibacteriana são aqueles que obtiveram resultado $\leq 512 \mu\text{g.mL}^{-1}$, destacados em negrito na tabela. Os extratos obtidos em meio de czapek foram os únicos a não apresentaram atividade frente a nenhuma bactéria. Nos meios de malte e PDB, ambas as linhagens fúngicas apresentaram atividade antibacteriana para bactérias gram-positivas. Destacam-se os extratos de malte da linhagem fúngica S.S_R13 e de PDB de S.S_R10, os quais apresentaram atividades, nesta triagem inicial, contra maioria das bactérias gram-positivas.

Tabela 7 - Resultado da triagem inicial dos extratos a $512 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Linhagens bacterianas	S.S_R 13M	S.S_R 13P	S.S_R 13C	S.S_R 10M	S.S_R 10P	S.S_R 10C
<i>S. epidermidis</i>	≤ 512	> 512	> 512	> 512	≤ 512	> 512
<i>S. aureus</i> ^a	≤ 512	≤ 512	> 512	≤ 512	≤ 512	> 512
<i>S. aureus</i> ^b	≤ 512	> 512	> 512	> 512	≤ 512	> 512
<i>E. faecalis</i>	≤ 512	> 512	> 512	> 512	≤ 512	> 512
<i>E. faecium</i>	≤ 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512 ^c
<i>K. pneumoniae</i>	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512
<i>E. coli</i>	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512
<i>A. baumannii</i>	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512
<i>P. aeruginosa</i>	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512

a. ATCC 25923; b. ATCC 8095; S.S_R13: *Fusarium oxysporum*; S.S_R10: *Fusarium oxysporum*; C: czapek; M: malte; P: PDB

Os extratos S.S_R13P e S.S_R10M apresentaram, inicialmente atividade na concentração de $512 \mu\text{g.mL}^{-1}$ na triagem de *S. aureus* ATCC 25923. No entanto ao

realizar novamente os testes, apresentaram CIM $\geq 512 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e devido a incoerência destes resultados e a disponibilidade de massa de extrato, o experimento foi refeito para concentrações entre 1024 e $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Para ambos os extratos, a CIM foi determinada como $1024 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

A determinação da concentração mínima inibitória (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada para os extratos S.S_R13M e S.S_R10P. As linhagens testadas foram as bactérias gram-positivas da triagem inicial. A atividade antibactericida é determinada pela razão CIM/CBM, e resultados ≤ 4 indicam que o extrato é bactericida⁴².

O extrato de S.S_R13 em meio de malte, não se mostrou bactericida em apenas uma linhagem testada (**Tabela 8**), enquanto o extrato da linhagem fúngica S.S_R10 em meio de PDB apresentou atividade bactericida contra todas as linhagens testas (**Tabela 9**).

Tabela 8 - Resultado da CIM e CBM do extrato da linhagem fúngica S.S_R13 em meio de malte.

Linhagens bacterianas	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM/CIM	Atividade
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	128	256	2	Bactericida
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	128	512	4	Bactericida
<i>S. aureus</i> ATCC 8095	256	512	2	Bactericida
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	256	>512	>2	N.D.
<i>E. faecium</i> ATCC 700221	128	512	4	Bactericida

CIM: Concentração Inibitória Mínima, CBM: Concentração Bactericida Mínima.

Tabela 9 - Resultado da CIM e CBM do extrato da linhagem fúngica S.S_R10 em meio de PDB.

Linhagens bacterianas	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CBM/CIM	Atividade
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	256	256	1	Bactericida
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	512	512	1	Bactericida
<i>S. aureus</i> ATCC 8095	512	512	1	Bactericida
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	256	256	1	Bactericida

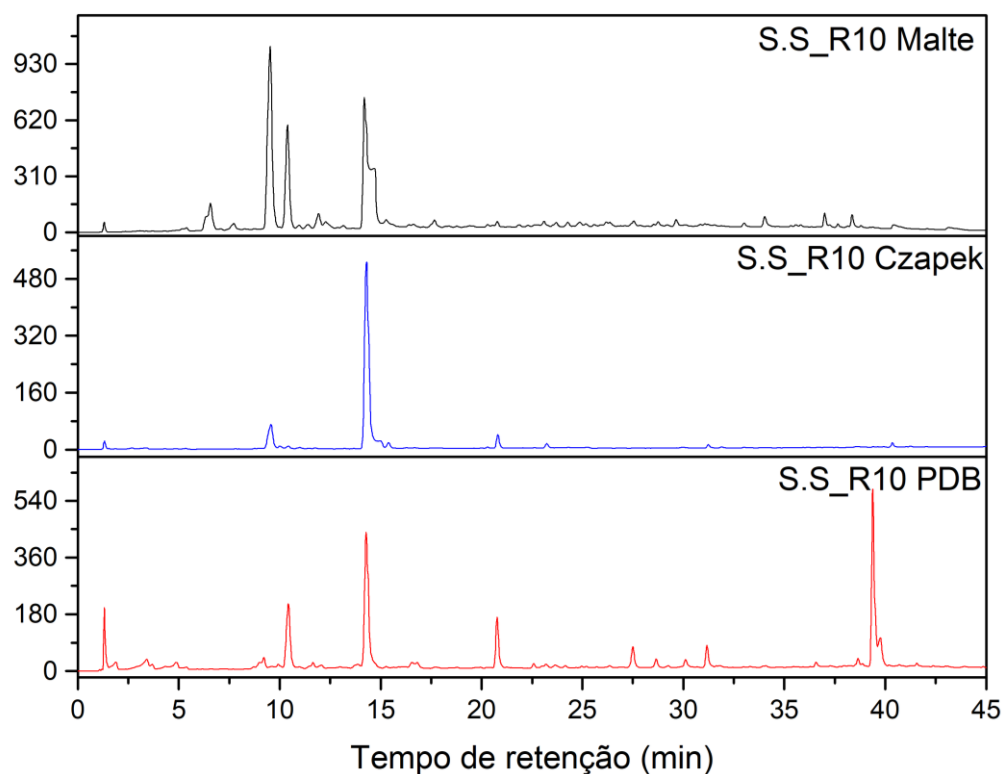
CIM: Concentração Inibitória Mínima, CBM: Concentração Bactericida Mínima

Os resultados obtidos comprovam a importância do gênero *Fusarium* para descoberta de substâncias bioativas, além de evidenciarem a diferença de produção metabólica em diferentes meios de cultivo, visto que nem todos os extratos apresentaram atividades biológicas.

4.4. Perfil metabólico- HPLC-DAD

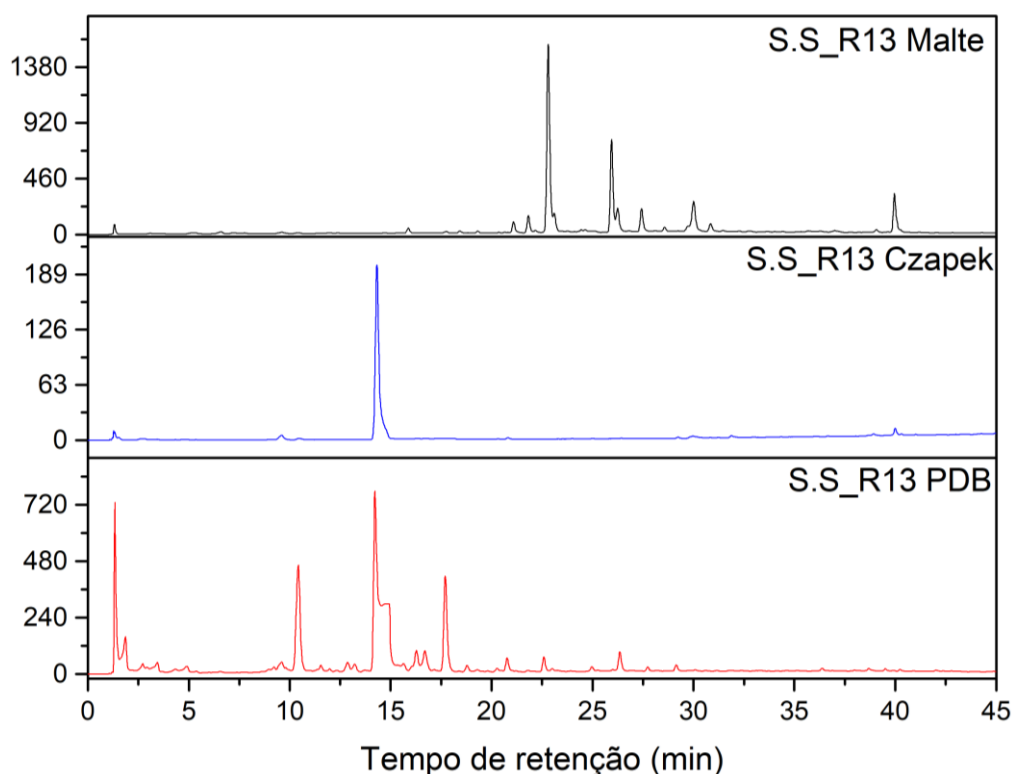
A análise dos cromatogramas dos três diferentes meios de cultura indicou que diferentes meios levam a alterações na produção de metabólitos secundários. Para a linhagem S.S_R10 os meios de malte e de PBD – meios eutróficos, ou seja, ricos em carboidratos- foram o que apresentaram a maior quantidade de picos (**Figura 15**). No extrato em meio de malte, os picos se concentraram na região de alta polaridade (menor tempo de retenção) e no extrato em meio de PDB nota-se picos distribuídos por todas as regiões - alta, média e baixa polaridade. Enquanto em meio de czapek – meio oligotrófico, ou seja, pobre em nutrientes- nota-se a presença de um pico muito intenso em $t_R = 14,28$ min, e outros picos menos intensos em regiões de alta e média polaridade.

Figura 15 - Cromatogramas em modo gradiente dos extratos da linhagem fúngica S.S_R10 em diferentes meios de cultivo ($\lambda = 254$ nm).



Para S.S_R13 (**Figura 16**), no meio de cultivo de malte nota-se picos nas regiões de média a baixa polaridade e a ausência de picos na região de alta polaridade (tempo de retenção menor), que estão presentes no branco (**Apêndice 2-10**), sendo um indicativo de consumo dessas substâncias pelo fungo. O meio de czapek apresentou novamente o pico intenso em $t_R = 14,0$ min. E por fim o meio de PDB foi o que apresentou um perfil cromatográfico mais variado, com picos nas regiões de baixa, média e alta polaridade.

Figura 16 - Cromatogramas em modo gradiente dos extratos da linhagem fúngica S.S_R13 em diferentes meios de cultivo ($\lambda = 254$ nm).



Comparando o perfil químico obtido para ambas as linhagens fúngicas em meio de malte, podemos notar uma diferença na produção de metabólitos. A linhagem fúngica S.S_R10 apresentou sinais mais intensos, principalmente, entre 5 e 20 minutos, enquanto o S.S_R13 apresentou sinais intensos na região de 20 a 30 minutos. Estes resultados corroboram com a hipótese de que as linhagens fúngicas S.S_R10 e S.S_R13 são formas especiais do complexo *Fusarium oxysporum*.

4.5. Perfil metabólico- RMN de ^1H

Os espectros de RMN de ^1H obtidos para os diferentes meios de cultivos corroboram com os cromatogramas, mostrando uma produção metabólica diferente de um mesmo fungo em diferentes meios de cultura. O espectro de RMN ^1H (**Figura 17**) do meio de czapek apresentou muitos sinais nas regiões de hidrogênios carbinólicos (δ 3,0-4,0 ppm) e olefínicos (δ 4,5-6,0 ppm), e sinais discretos na região de hidrogênios aromáticos (δ 6,5-8,0 ppm). Comparados ao branco (**Apêndice 11-19**)

nota-se que os sinais na região de δ 3,0 a 4,5 ppm ficaram mais intensos, indicando a produção de metabólitos.

Os espectros de RMN ^1H (**Figura 18**) do meio de malte apresentaram sinais em todas as regiões, evidenciando a presença de hidrogênios metilênicos e metílicos, carbinólicos, olefínicos e aromáticos. Na região dos hidrogênios aromáticos temos a presença de picos característicos de anéis *para*-dissubstituídos. Ao comparar com o branco notamos que houve uma variação do metabolismo, produzindo variados metabólitos – tanto com hidrogênios metilênicos quanto com hidrogênios aromáticos. Nos espectros de RMN (**Figura 19**) do meio de PDB é possível perceber que também houve a produção de metabólitos aromáticos, devido a presença de sinais na região de hidrogênios aromáticos, e o aumento de sinais na região de hidrogênios metilênicos e metílicos.

Comparando todos os meios e linhagens fúngicas temos que o meio em que os fungos obtiveram um perfil diferente foi o de czapek, que apresentou sinais baixos nas regiões de aromáticos enquanto para os meios de malte e PDB tivemos sinais intensos nessa região. O meio de czapek também foi o que apresentou mais sinais nas regiões de hidrogênios carbinólicos e olefínicos, enquanto os meios de malte e PDB apresentaram mais sinais nas regiões de hidrogênios metilênicos e metílicos.

Figura 17 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos de czapek em CD_3OD (600 MHz).

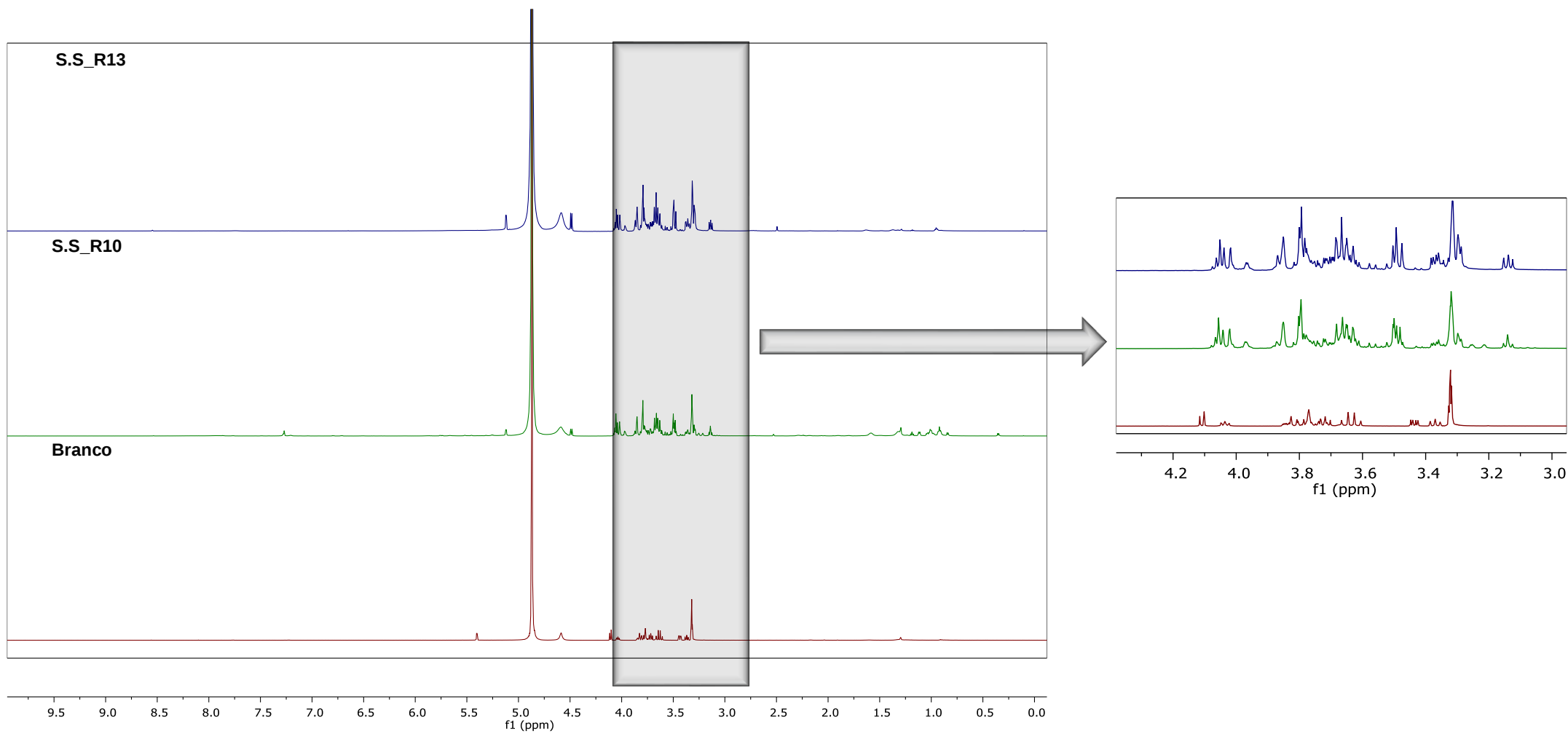


Figura 18 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos de malte em CD_3OD (600 MHz).

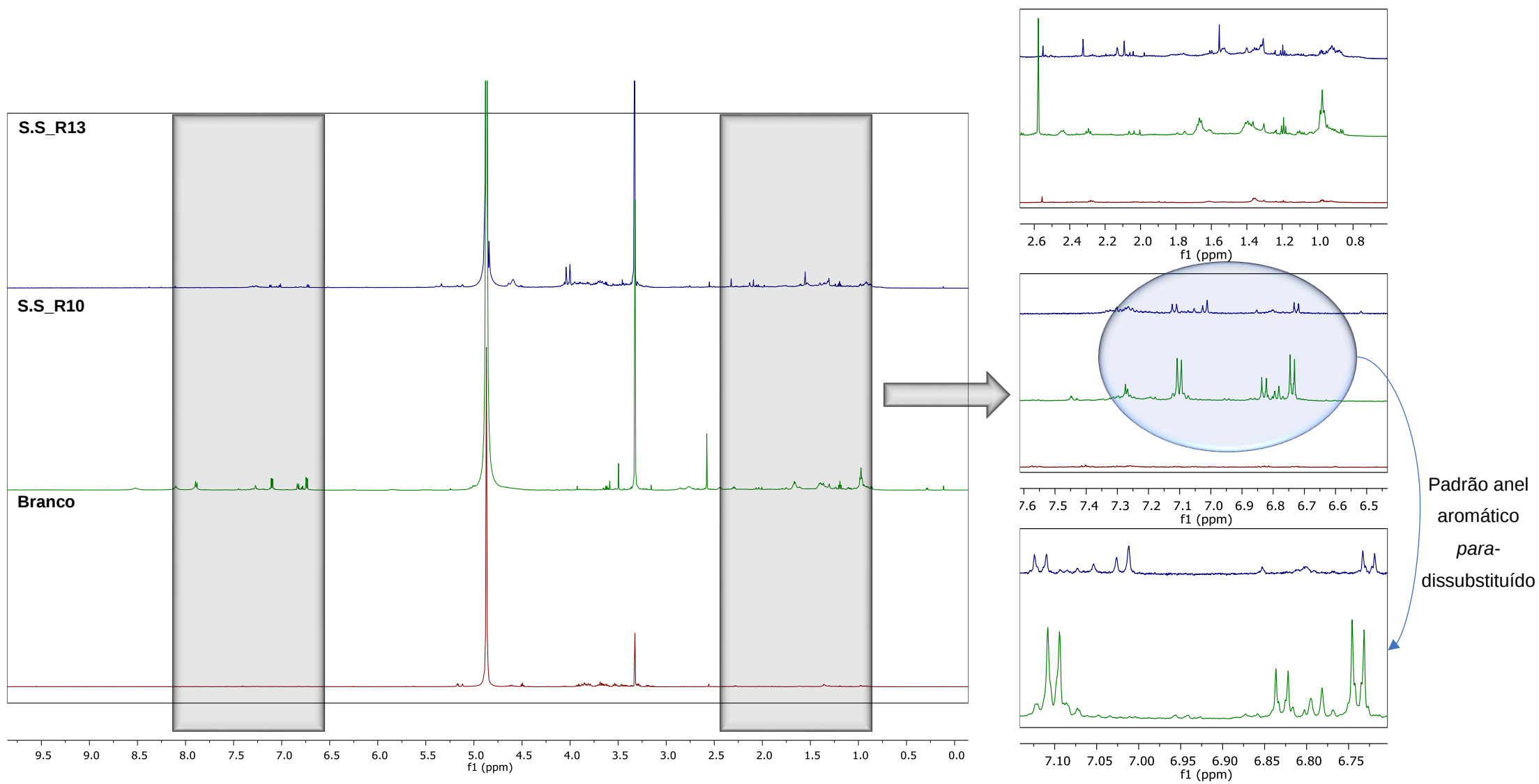
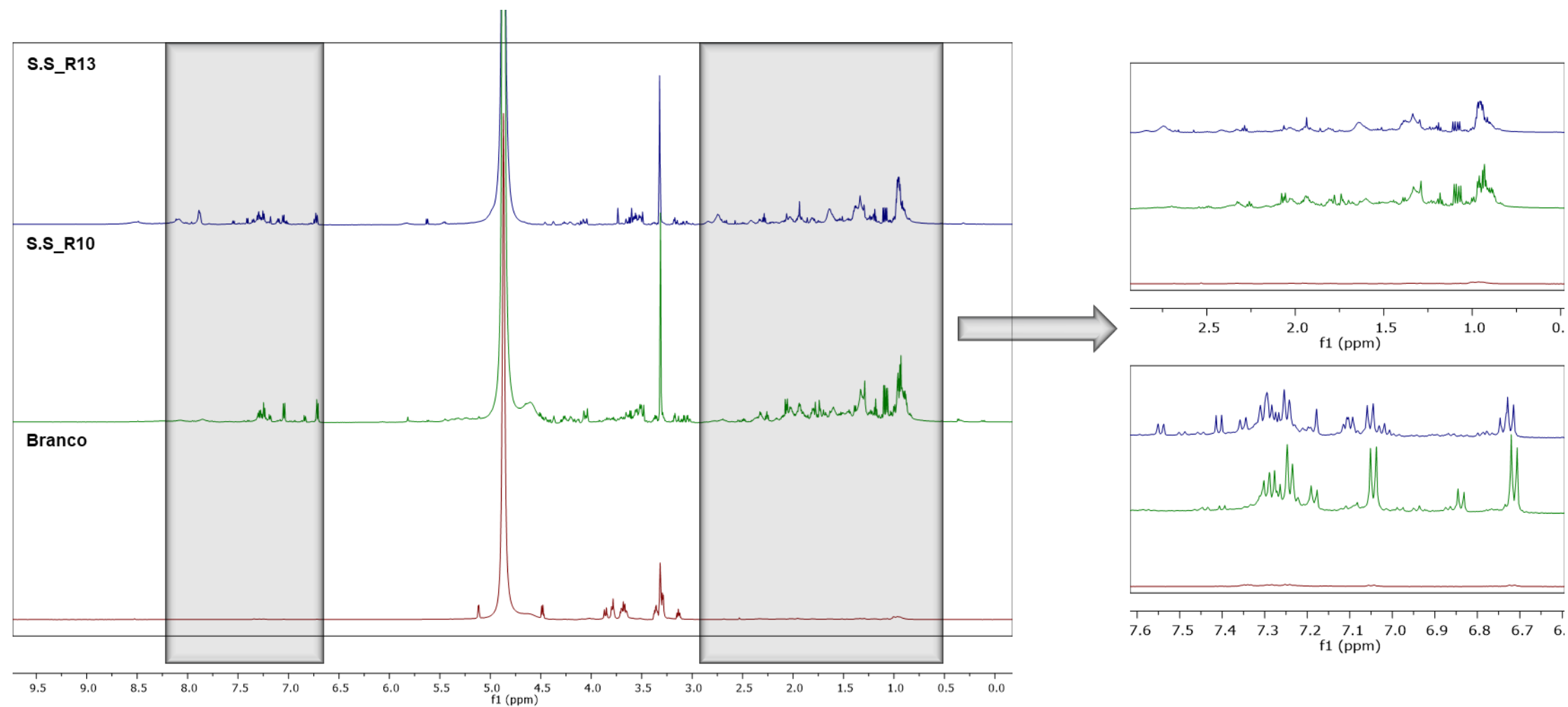
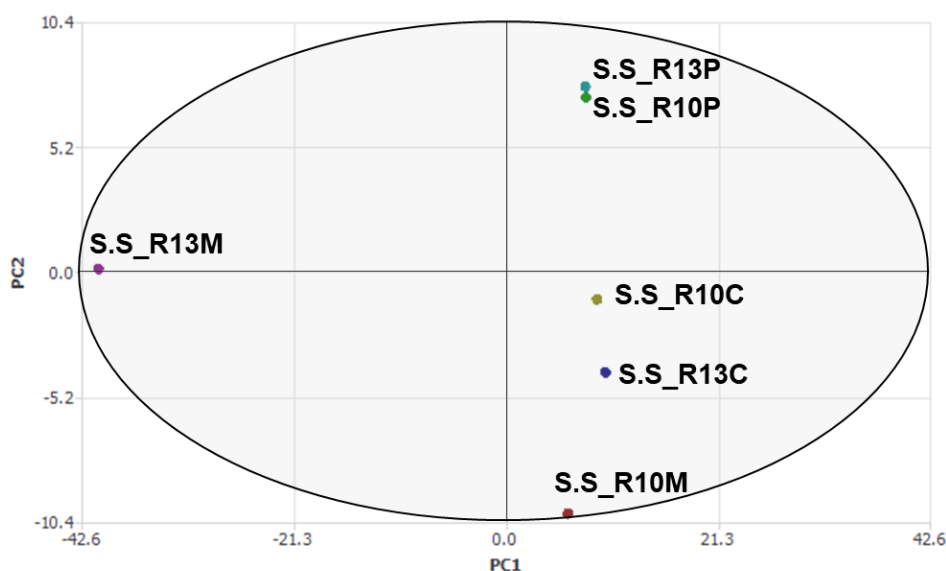


Figura 19 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos de PDB em CD_3OD (600 MHz).



A fim de se observar, estatisticamente, a variação metabólica das linhagens fúngicas nos diferentes meios, todos os espectros de RMN de ^1H foram agrupados no software MestreNova® 9.0, da MestreLab Research, para a Análise de Componentes Principais (ACP). No gráfico de scores gerado (**Figura 20**), os eixos PC1 e PC2 explicam os valores de variância, sendo que o PC1 explica em 80,60% esses valores, enquanto o PC2 explica em 9,20%.

Figura 20 - Gráfico de scores, PC1 x PC2, obtidos dos dados de RMN de ^1H para S.S_R10 e S.S_R13 nos diferentes meios de cultivos.



Meios de cultivo, C: czapek, M: malte, P: PDB

Pelo gráfico de scores podemos notar que os extratos de czapek de ambos os fungos e o extrato de malte do fungo S.S_R10 se encontram no mesmo quadrante, indicando uma similaridade nas características químicas, assim como os extratos de ambos os fungos em PDB apresentaram similaridade entre eles. O único que demonstrou uma diferença de todos os outros extratos foi o de S.S_R13 em malte, estando em um quadrante diferente dos demais, corroborando com os dados obtidos por cromatografia.

Novamente, a diferença observada neste gráfico de scores para o meio de malte, junto as diferenças observadas nos cromatogramas e nos resultados de atividades biológicas, dão indícios de que S.S_R10 e S.S_R13 podem ser *formas especiais* do complexo da espécie *Fusarium oxysporum*.

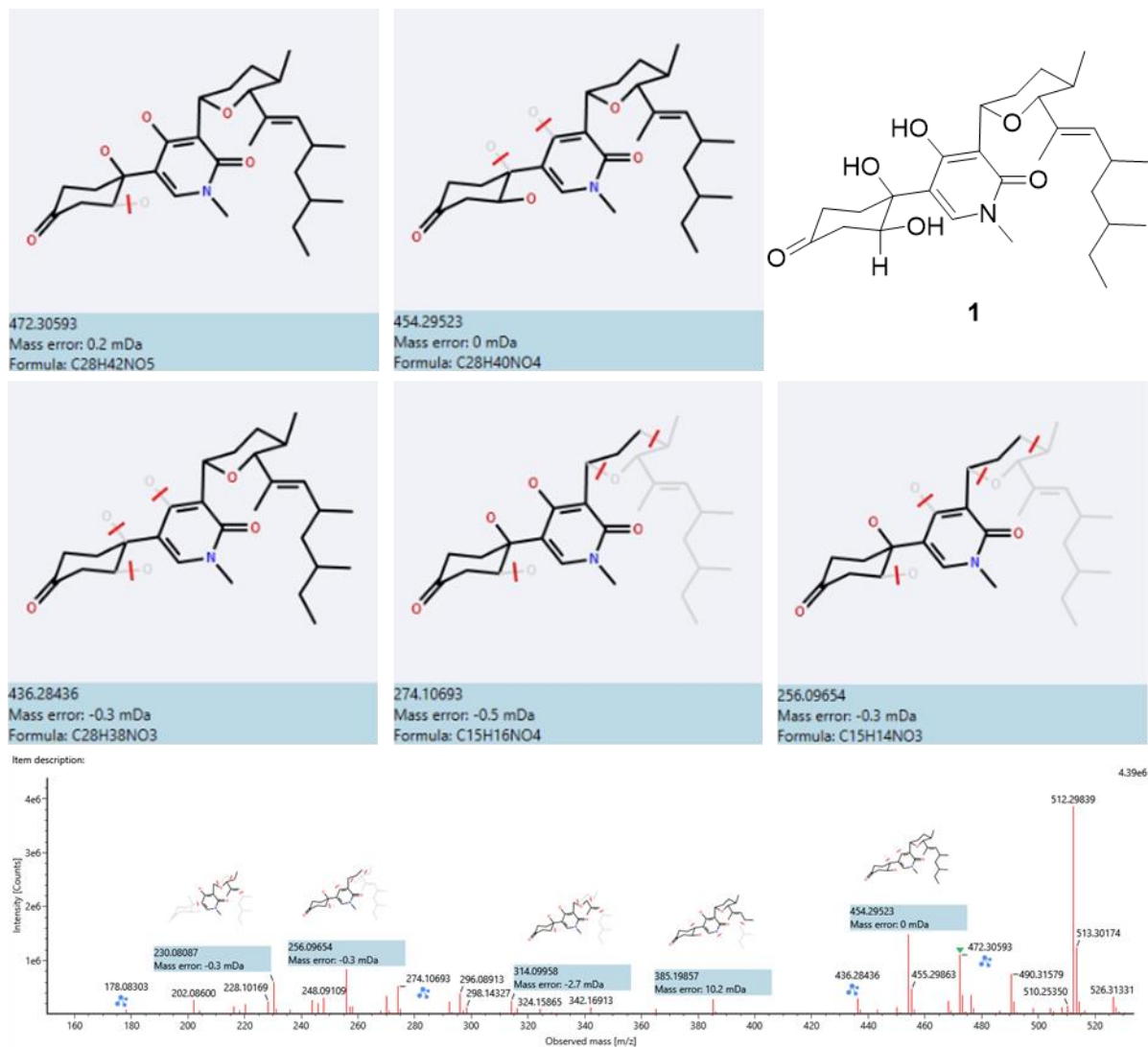
4.6. UPLC/MS: uso do UNIFI para desreplicação

Foram anotadas 42 substâncias (**Tabela 10**) a partir dos dados obtidos pelo UNIFI – junção da base de dados *in-house* e dos perfis de fragmentações propostos pelo algoritmo do programa - sendo elas, alcaloides, naftoquinonas, peptídeos cíclicos, derivados de jasmonatos, dentre outros.

4.6.1. Alcalóides (**1-10**)

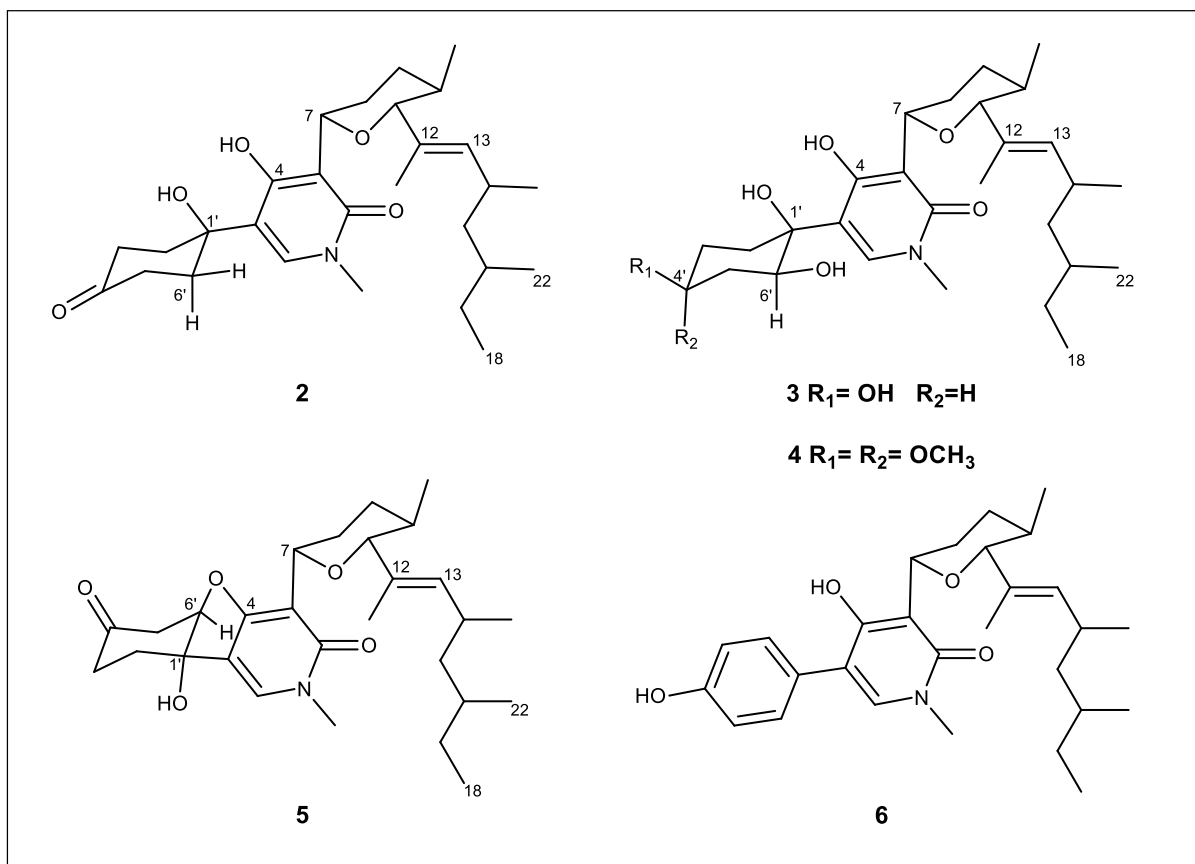
A oxisporidinona (**1**), alcaloide piridínico com presença de um núcleo 2-piridona, foi anotada com $[M+H]^+$ m/z 490,3163. Os fragmentos gerados m/z 472, 454, 436 correspondem as perdas de $[M-H_2O]^+$ dos grupos hidroxilas das posições C-1', C-6' e C-4, como demonstrado nos fragmentos propostos pelo UNIFI na **Figura 21**. Também foram observados outros fragmentos m/z 274, 256 e 178 referentes a ruptura do anel dissustituído tetraidropirano. Estudos na literatura mostram que esta substância apresenta atividade fungistática contra *Aspergillus fumigatus*, um fungo oportunista responsável por infecções pulmonares⁴⁷.

Figura 21 - Proposta de fragmentações do software UNIFI para a oxisporidinona (**1**), a partir dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS^E (+).



Outros cinco análogos da oxisporidinona (**Figura 22**), *N*-metil-4-hidroxi-2-piridinona, foram anotados: (-)-6-deoxioxisporidinona (**2**), 4'-hidroxioxisporidinona (**3**), dimetil cetal de oxisporidinona (**4**) e (-)-4,6'-anhidrooxisporidinona (**5**). Os análogos **2-4** apresentaram fragmentos similares ao de oxisporidinona, como a perda comum de água $[M-H_2O]^+$, seguido da abertura do anel tetraidrofurano. O análogo **4**, exibiu fragmento característico da perda do grupo metoxila.

Figura 22 - Estrutura química dos análogos da oxisporidinona (**2-6**) anotados dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS^E (+).



O análogo **5** apresentou a fragmentação da perda de água, no entanto, o perfil de fragmentação obtido foi diferente quando comparado aos demais, visto que a substância possui um anel de cinco membros, formado através das ligações em C-6'-O-C-4.

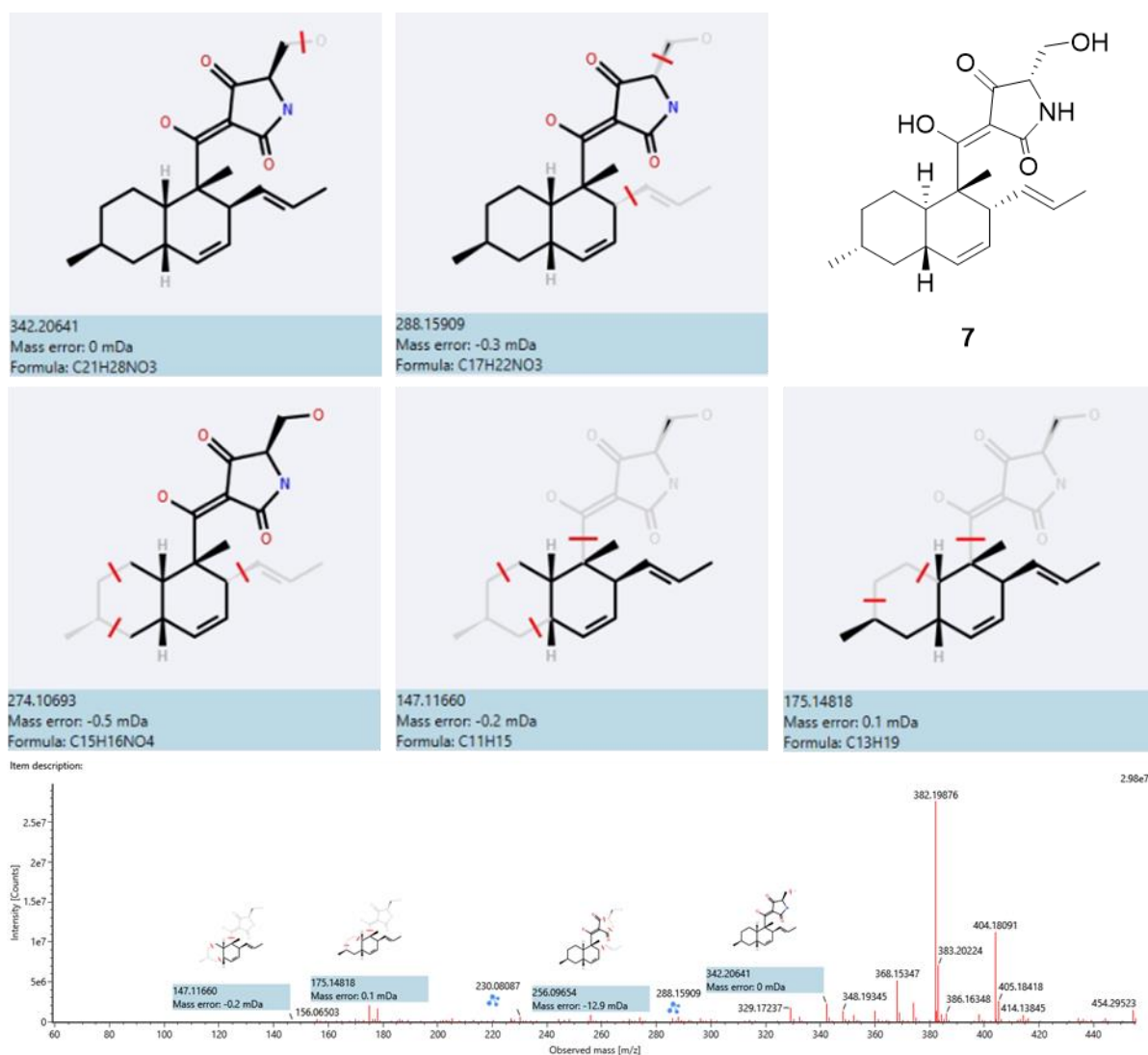
O análogo **6**, que possui um substituinte fenólico na posição C-5, foi anotado como sendo a sambutoxina, conhecida por ser uma micotoxina relacionada a doenças em batatas. No espectro de massas, este metabólito foi evidenciado pela presença do íon precursor $[M+H]^+$ m/z 454,2952 e as fragmentações observadas em m/z 436, 296 e 256 já foram relatadas na literatura⁴⁸.

Todos esses metabólitos foram produzidos pela linhagem fúngica S.S_R13 em meio de malte, sendo que a oxisporidona, a 6-deoxisporididona, o dimetil cetil de oxisporidinona e a sambutoxina foram exclusivamente produzidas neste meio. A 4,6'-anhidrooxisporidinona e a 4'-hidroxiloxisporidinona foram produzidas pela linhagem

S.S_R10 nos meios de malte e czapek, sendo que a 4,6' também foi anotada no extrato de PDB de S.S_R13.

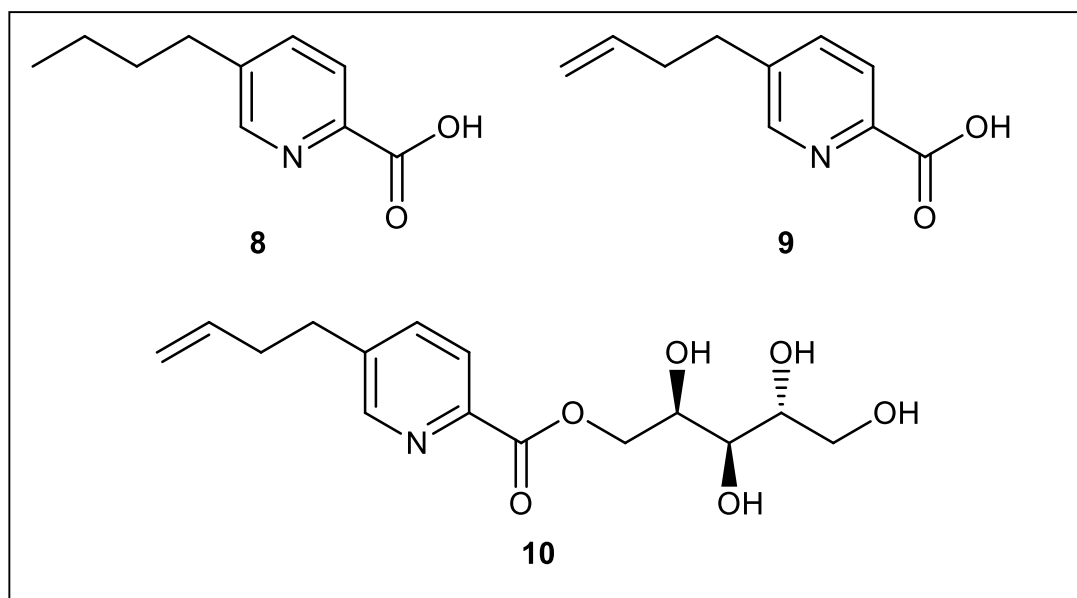
Outro alcalóide anotado foi a tricosetina (**7**), um heterocíclico com núcleo pirrolidino-2,4-diona, com íon precursor $[M+Na]^+$ m/z 382,1991. Os fragmentos sugeridos pelo UNIFI, (**Figura 23**), apresentam perda de água em m/z 342, e clivagens entre o núcleo de hidrocarboneto e o grupo carbonila via retro-Diels-Alder e clivagem α , em m/z 175 e 156, respectivamente. Na literatura é possível observar essas fragmentações para a equisetina, que se difere de **7** por ser um ácido *N*-metil tetrâmico⁴⁹.

Figura 23 - Proposta de fragmentação do software UNIFI para a tricosetina (**7**), dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS^E (+).



O ácido fusárico (**8**), micotoxina produzida exclusivamente por fungos do gênero *Fusarium*, foi anotado com o íon precursor $[M+H]^+$ m/z 180,1019. O UNIFI não propôs fragmentações para esta substância, devido à baixa intensidade dos picos. O ácido 9,10-dehidrofusárico (**9**) e o fusaricato F (**10**), derivados do ácido picolínico, também foram anotados com íons precursores de $[M+H]^+$ m/z 178,0865 e $[M+H]^+$ m/z 329,1721, respectivamente (**Figura 24**).

Figura 24 - Estruturas químicas do ácido fusárico (**8**) e análogos (**9-10**), anotados dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS^E (+).



De acordo com o espectro de EM² extraído do *MassLynx* (**Figura 25**), o ácido fusárico possui fragmentos em m/z 162 e 134 referentes a perda de uma molécula neutra de água e de monóxido de carbono. Os derivados do ácido (**9-10**) seguem o mesmo perfil de fragmentação e o mecanismo foi proposto abaixo (**Figura 26**).

Figura 25 - Espectro de EM² do ácido fusárico (**8**) em UPLC-QTOF-MS^E extraída do software *MassLynx*.

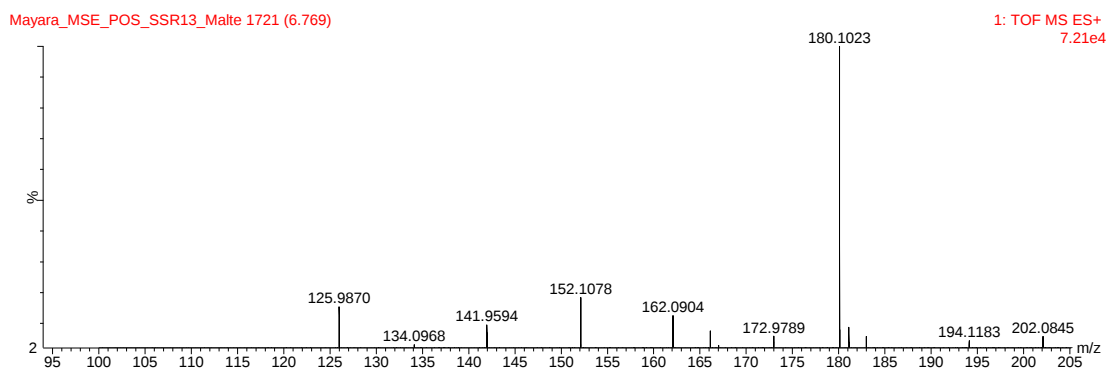
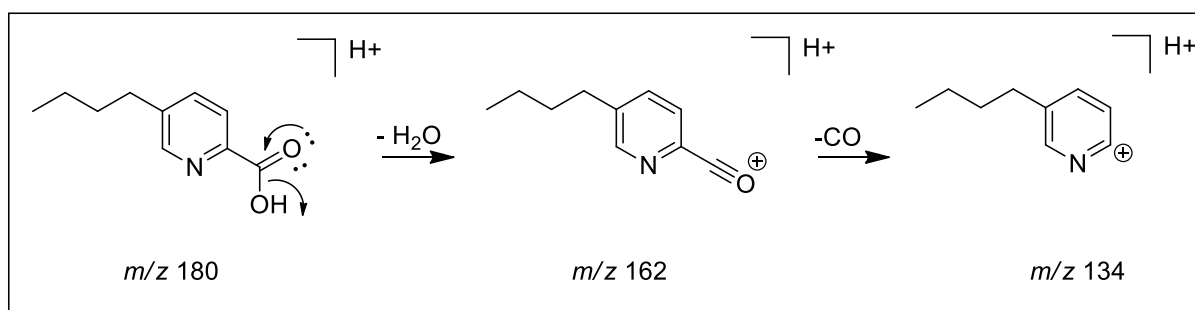


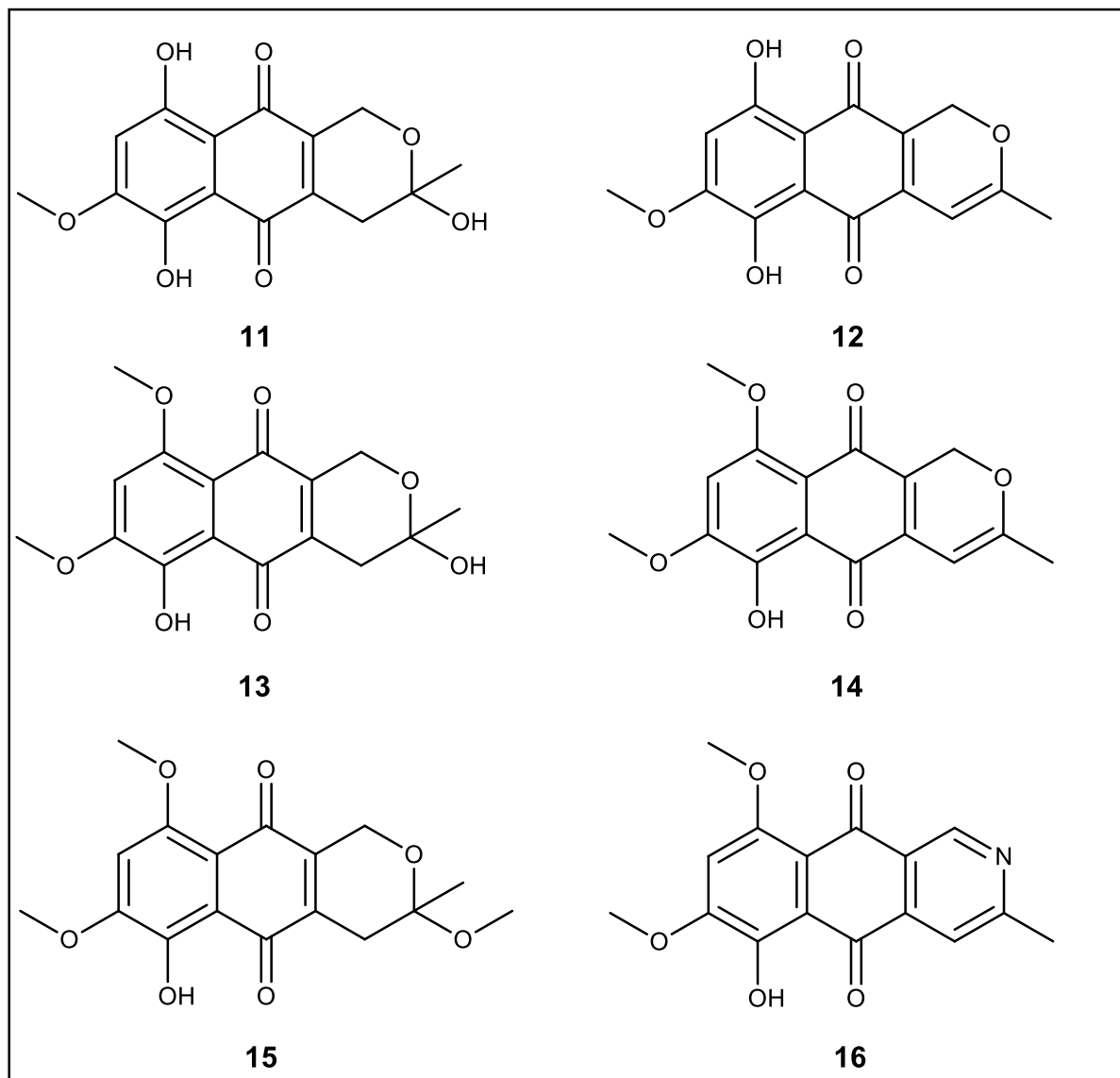
Figura 26 - Proposta de mecanismo de fragmentação do ácido fusárico (**8**) em UPLC-QTOF-MS-ESI (+).



4.6.2. Naftoquinonas (**11-19**)

A fusarubina (**11**) e seus derivados anidrofusarubina (**12**), 9-*O*-metil fusarubina (**13**), 9-*O*-metil-anidrofusarubina (**14**), 3-*O*-metil-9-*O*-metilfusarubina (**15**) foram anotadas pelo UNIFI. A bostricoidina (**16**), que é biossintetizada pela mesma rota que a fusarubina, também foi anotada (**Figura 27**).

Figura 27 - Estrutura química da fusarubina (**11**) e análogos (**12-16**), anotados dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS^E (+).



A fusarubina (**11**) foi anotada com o íon precursor $[M+Na]^+$ m/z 329,0624 e $[M+H]^+$ m/z 307,0624 e apresentou fragmentações em m/z 289, 279 e 265 referentes, respectivamente, a perda neutra de H₂O, demonstrada na **Figura 29**, abertura do anel perdendo CO e a perda de uma metila radicalar (**Figura 28**).

Figura 28 - Proposta de fragmentação do software UNIFI para a fusarubina (**11**), a partir dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS^E (+).

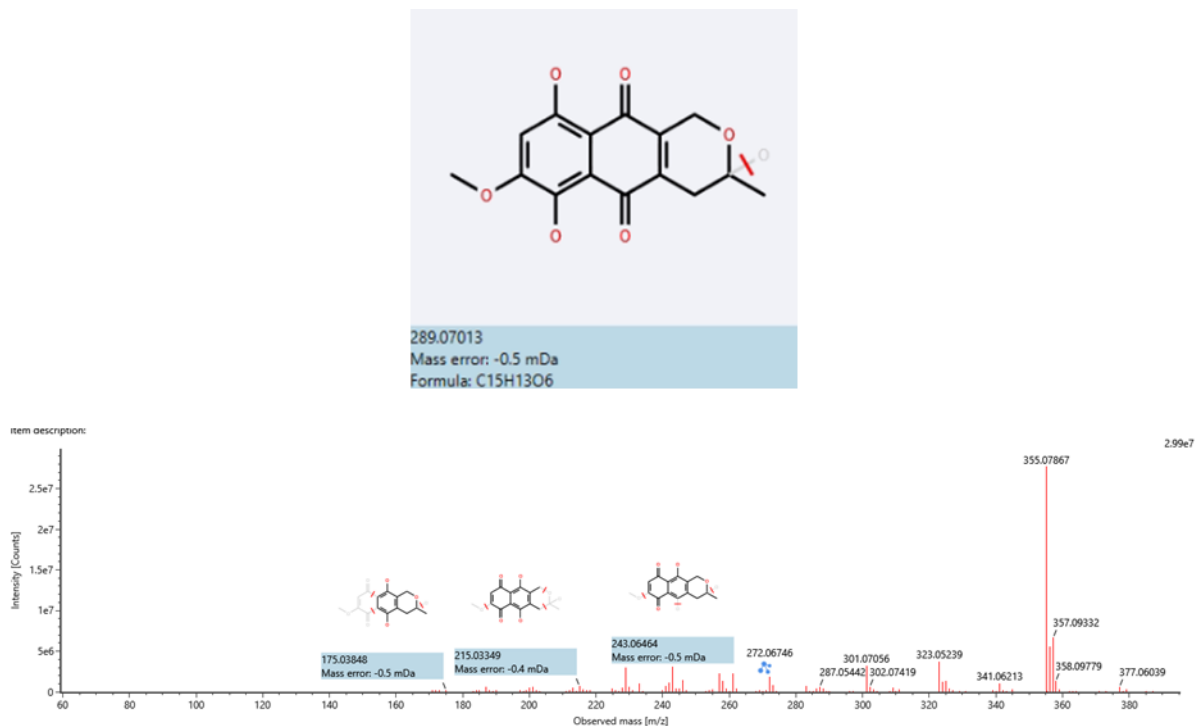
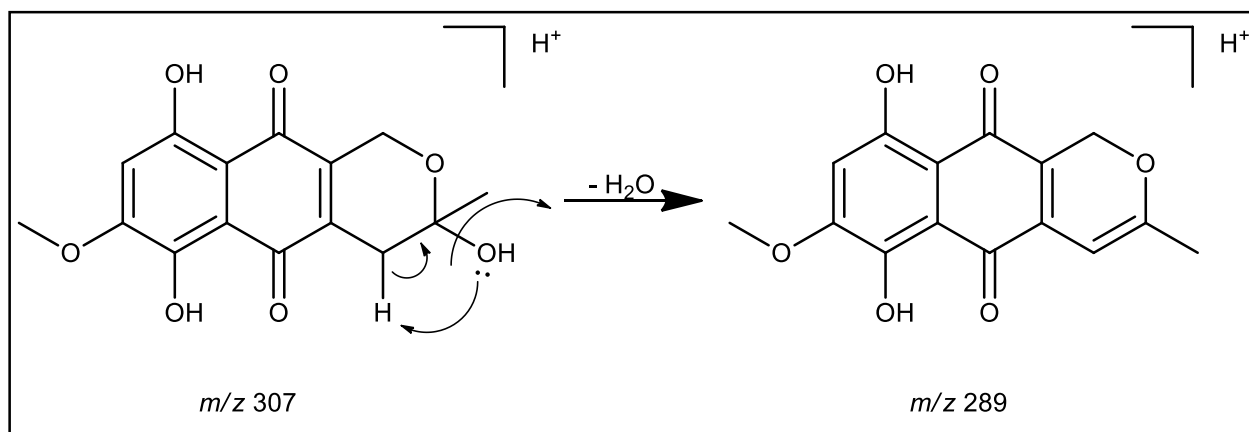


Figura 29 - Proposta de mecanismo de fragmentação M-18 para a fusarubina (**11**) em UPLC-QTOF-MS-ESI (+).

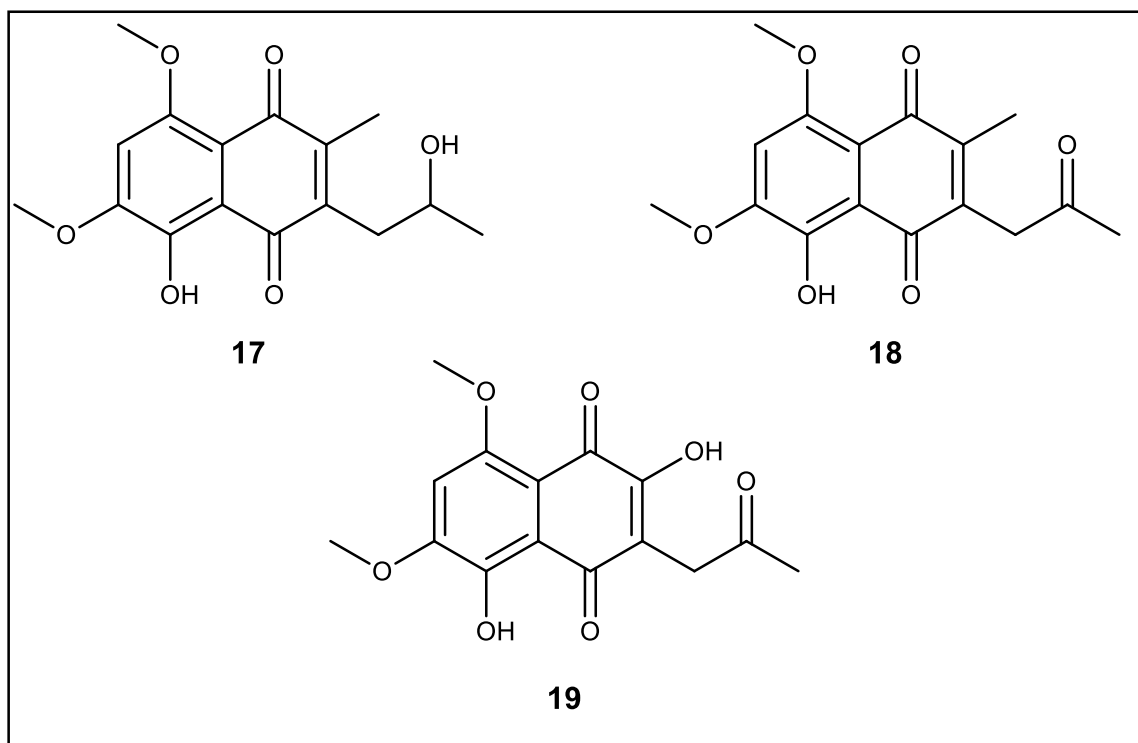


As perdas de água, monóxido de carbono e metila radicalar também foram observadas nos derivados **12-15** e além destas, observou-se a eliminação de metoxilas. Na literatura, esses derivados foram observados devido ao uso de solventes como MeOH e AcOEt, que também foram utilizados neste trabalho, sendo possível, que os mesmos foram formados como um artefato. Para a substância **16**,

que foi anotada com $[M+H]^+$ m/z 300,0866 observou-se apenas perdas de metila radicalar, m/z 285, e eliminação de metoxila, m/z 268.

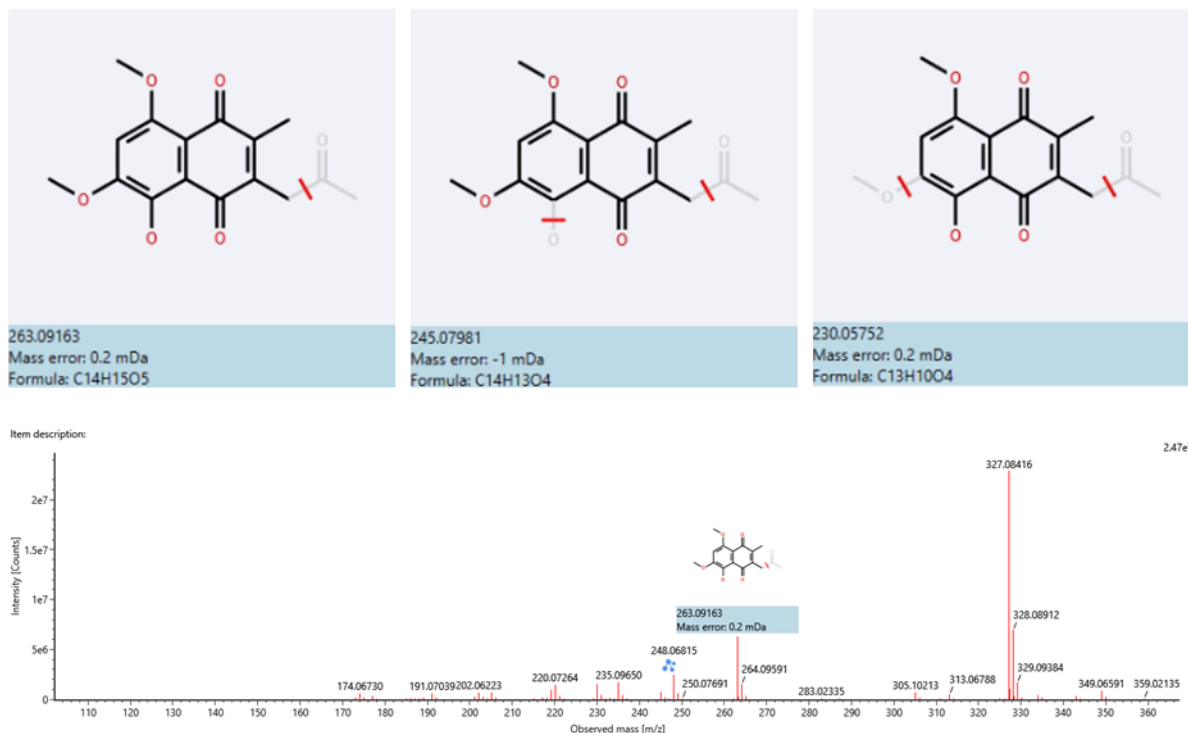
Outras três naftoquinonas foram anotadas, 8-*O*-metilsolaniol (**17**), 8-*O*-metiljavanicina (**18**) e 1,4-naftalenodiona-3,8-dihidroxi-5,7-dimetoxi-2-(2-oxopropil) (**19**) com íons precursores $[M+Na]^+$ m/z 327,0836, m/z 329,099 e m/z 329,0630 (**Figura 30**).

Figura 30 - Estrutura química das naftoquinonas **17-19** anotadas dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS^E (+).



As fragmentações propostas pelo UNIFI para as três substâncias sugeriram a perda de água M-18, do grupo metoxila M-31 e da cadeia lateral, para as substâncias **18** e **19**, que possuem um grupo cetona, sendo a perda M-43 comum a substâncias que possuem essa função orgânica (**Figura 31**).

Figura 31 - Propostas de fragmentações sugeridas pelo software UNIFI para a substância **18**, a partir dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS^E (+).

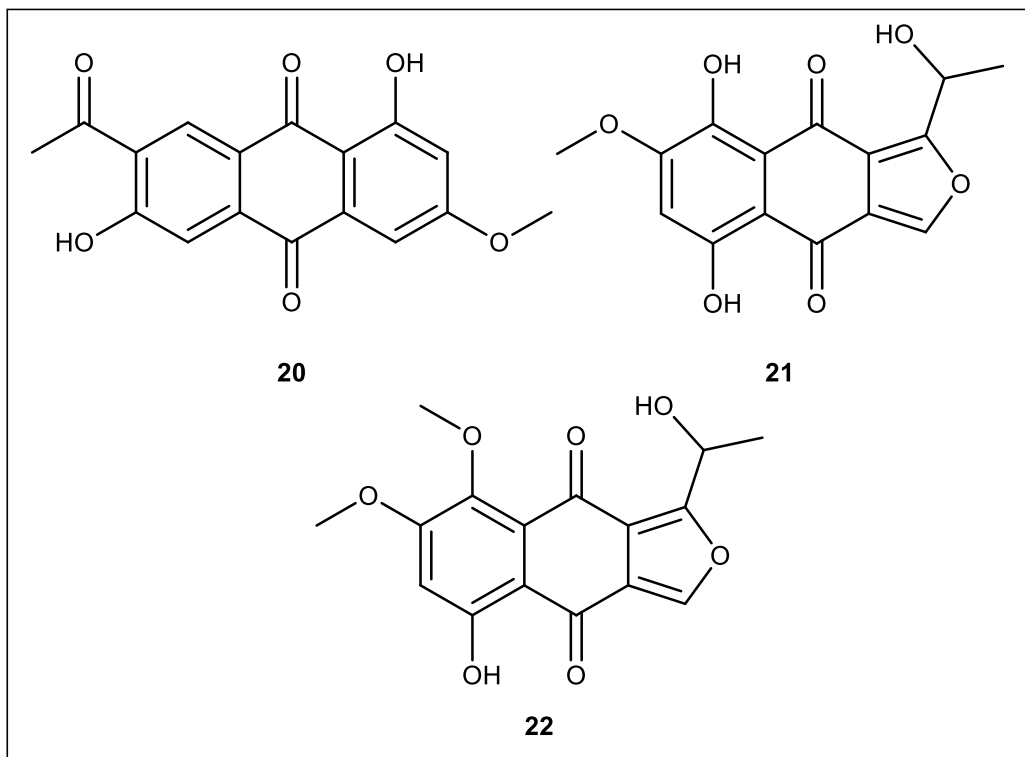


Das nove naftoquinonas anotadas, oito foram identificadas exclusivamente no extrato de malte de S.S_R13. A substância **16** apenas não foi produzida por S.S_R10 em meio de czapek.

4.6.3. Naftopiranos e antraquinona (**20-22**)

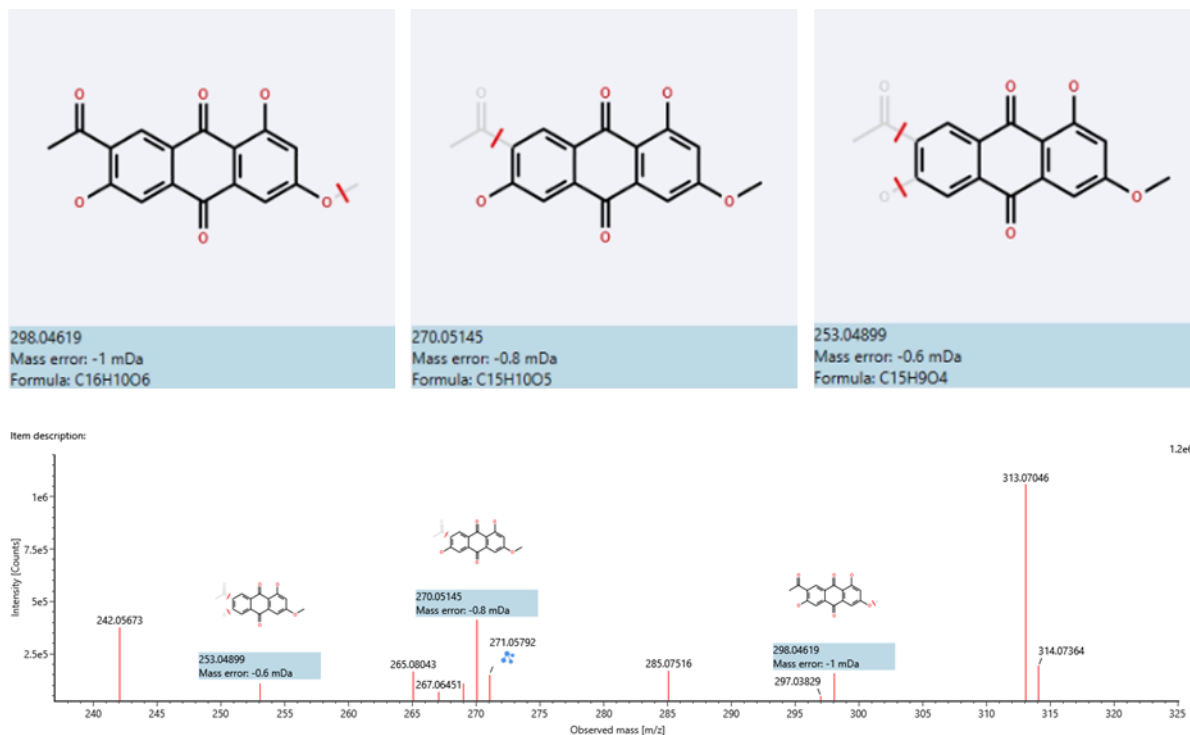
A antraquinona, 2-acetil-3,8-dihidroxi-6-metoxi-antraquinona (**20**) foi anotada com íon precursor [M+H]⁺ *m/z* 313,0705 no extrato de malte de S.S_R13. A nectriafurona (**21**), também foi observada neste extrato e seu metil éter (**22**) além deste extrato, também foi observado no extrato de malte de S.S_R10 (**Figura 32**).

Figura 32 - Estruturas químicas das substâncias **20-22**, anotadas dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS^E (+).



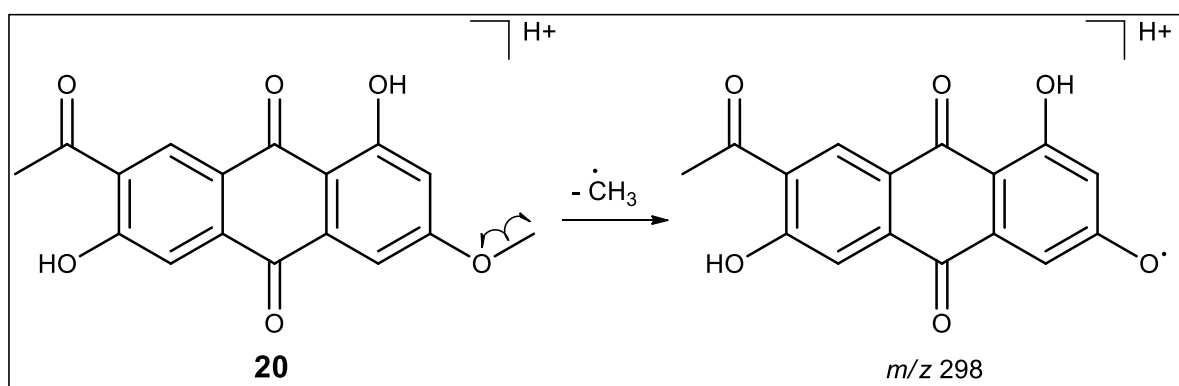
Os fragmentos propostos pelo UNIFI para a substância **20** (**Figura 33**) em m/z 298, 270 e 253, são referentes a perda de uma metila radicalar e do grupo cetônico seguido da perda de água. As substâncias **21** e **22** também apresentaram estas mesmas perdas, além da perda do grupo substituinte do anel furânico.

Figura 33 – Propostas de fragmentações sugeridas pelo software UNIFI para a substância **20**, a partir dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS^E (+).



Como a perda radicalar de um grupo metila foi comum a todas as substâncias, propôs-se um mecanismo para a substância **20**, demonstrado na **Figura 34**.

Figura 34 - Proposta de mecanismo de fragmentação da metila radicalar para a substância **20** analisada por UPLC-QTOF-MS-ESI (+).

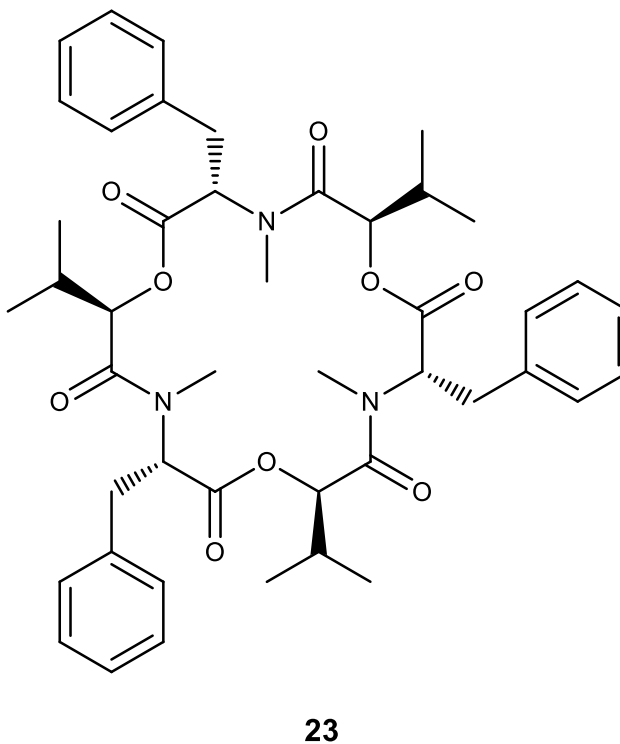


4.6.4. Depsipeptídeos cíclicos (**23-27**)

A beauvericina, BEA, (**23**), uma micotoxina produzida por fungos *Fusarium*, conhecida, principalmente, por contaminar plantações de milho, também possui um

espectro de atividades biológicas como antibacterianas e antifúngicas⁵⁰. Pelo UNIFI foi anotada com íon precursor $[M+Na]^+$ m/z 806,3987 e foi observada em todos os extratos (**Figura 35**).

Figura 35 - Estrutura química da beauvericina (**23**), anotada dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS^E (+).



Os íons fragmentos m/z 523, 262 e 244 (**Figura 36**) são comuns a esta substância, e correspondem a formação de resíduo do aminoácido fenilalanina, por um rearranjo de McLafferty, seguido de uma desidratação, como demonstrado na **Figura 37**⁵¹.

Figura 36 - Fragmentações propostas pelo software UNIFI para a beauvericina (**23**), a partir dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS^E (+).

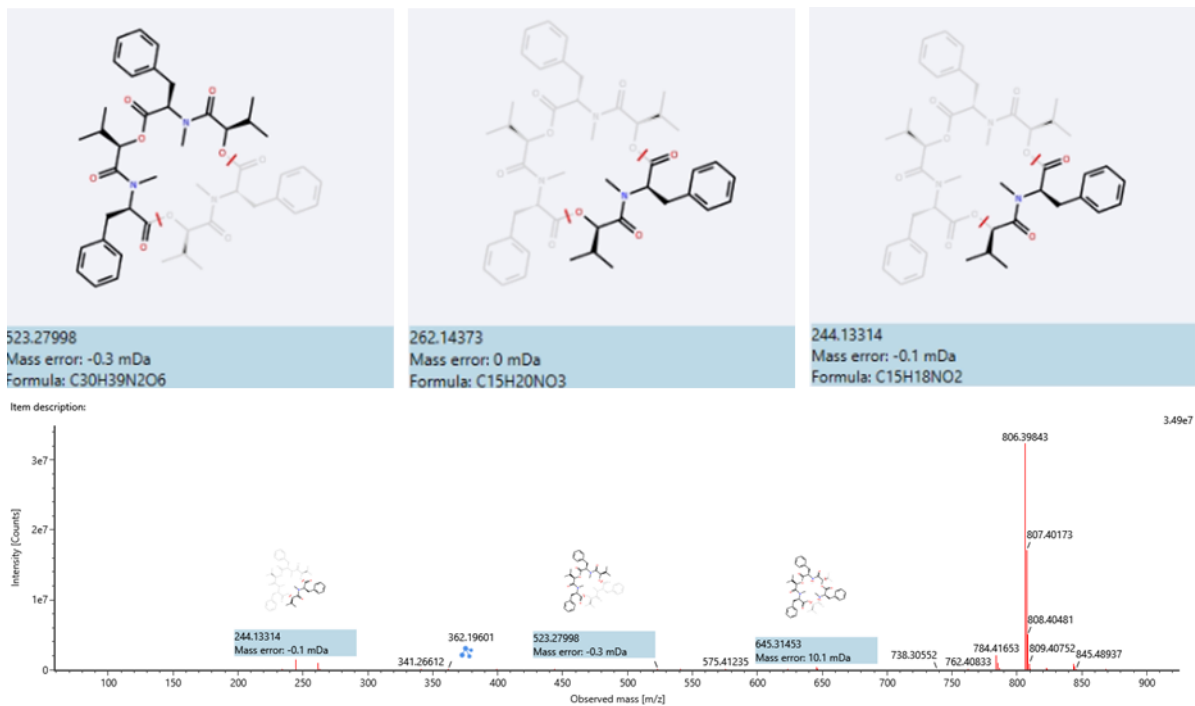
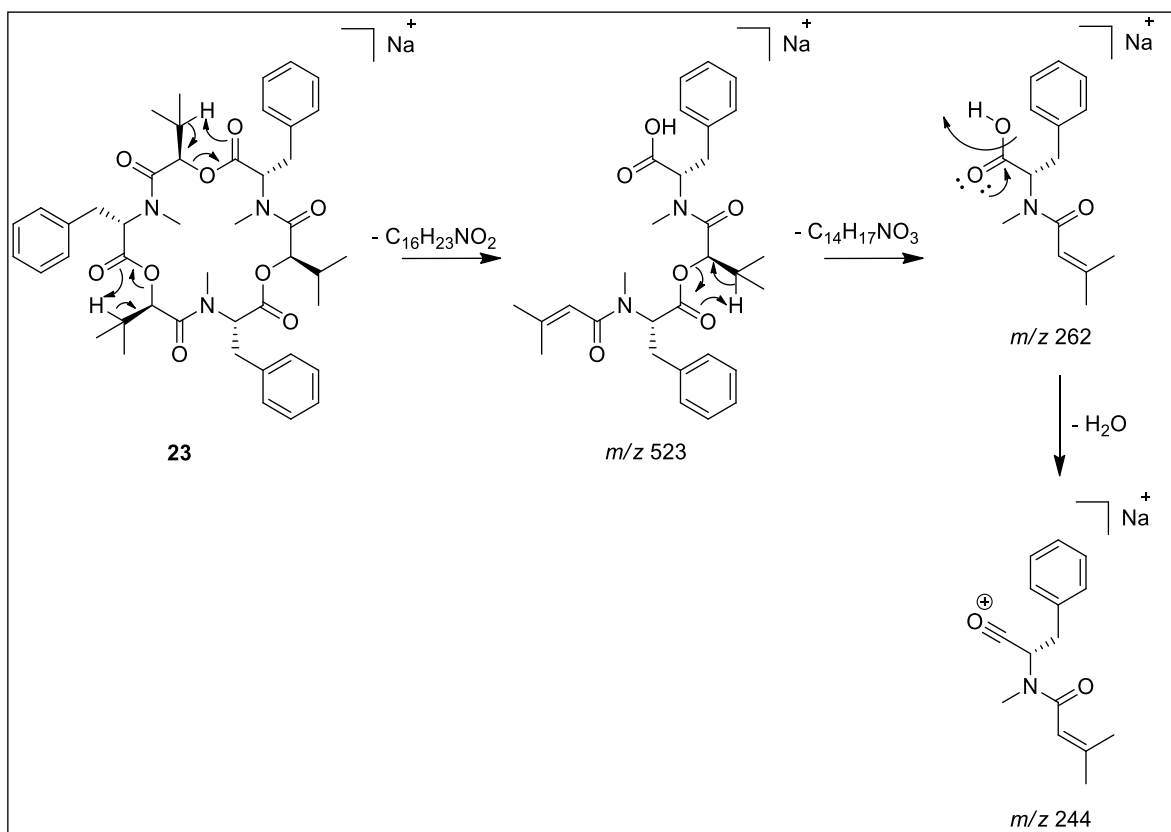
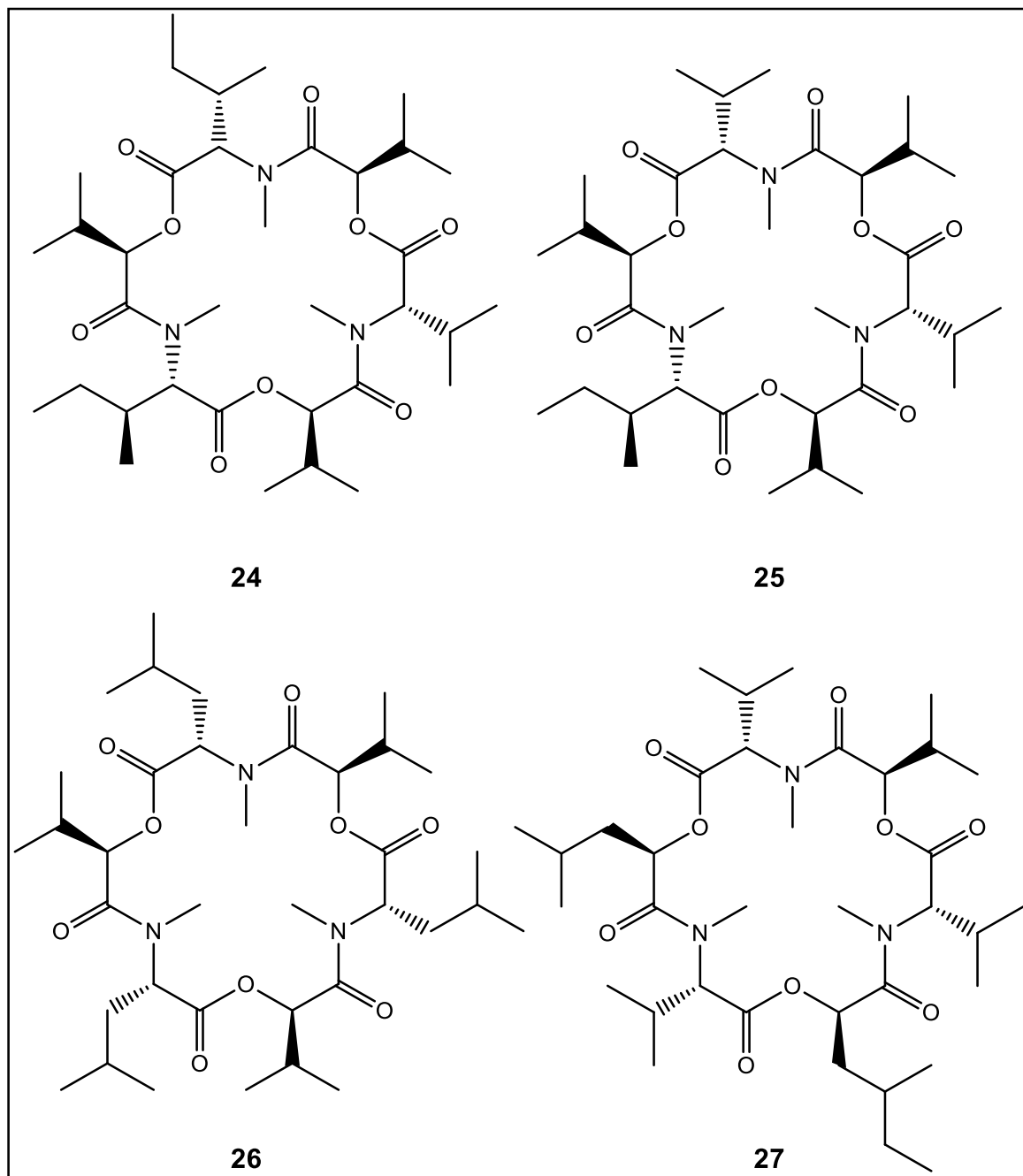


Figura 37 - Proposta de fragmentação da beauvericina (**23**) em UPLC-QTOF-MS-ESI (+).



Diferentemente da beauvericina, as eniatinas, ENs, (**Figura 38**) possuem em sua estrutura resíduos de três diferentes *N*-metil-*L*-aminoácidos, que geralmente são valina, leucina e isoleucina. Estas substâncias também são conhecidas por serem fitotóxicas e por apresentarem atividades antibióticas, inseticida e foram considerados inibidores potentes e específicos da atividade de acil-CoA⁵². As eniatinas A1 (**24**) e B1 (**25**) foram anotadas em todos os extratos com os respectivos íons precursores $[M+Na]^+$ m/z 690,4301 e m/z 676,4144, enquanto a eniatina C (**26**), $[M+Na]^+$ m/z 704,4466, foi identificada em todos os extratos, exceto o de S.S_R13 em meio de malte e a eniatina MK (**27**), $[M+Na]^+$ m/z 704,4454, foi identificada nas linhagens fúngicas crescidas apenas em meio de malte.

Figura 38 - Estrutura química eniatinas (**24-27**) anotadas dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS^E (+).



As fragmentações propostas pelo UNIFI (**Figura 39**) sugerem as mesmas clivagens observadas para a beauvericina (**23**), assim como também clivagens do tipo *y/b*, *c/z* e *a/x* características de peptídeos. Estudos na literatura comprovaram que a abertura de anel, que gera a perda de um monóxido de carbono (-CO), para ciclodepsipeptídeos ocorre através da protonação do oxigênio da função éster, levando a formação de um peptídeo linear^{53,54}. Em seguida, ocorrem as perdas

sequenciadas de resíduos de aminoácidos, como por exemplo a perda de 113 Da correspondente ao resíduo *N*-metil-*L*-valina na eniatina B1, formando o íon m/z 541 (Figura 40).

Figura 39 - Propostas de fragmentações do software UNFI para as eniatinas: a. A1, b. B1, c. C e d. MK, a partir dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS^E (+).

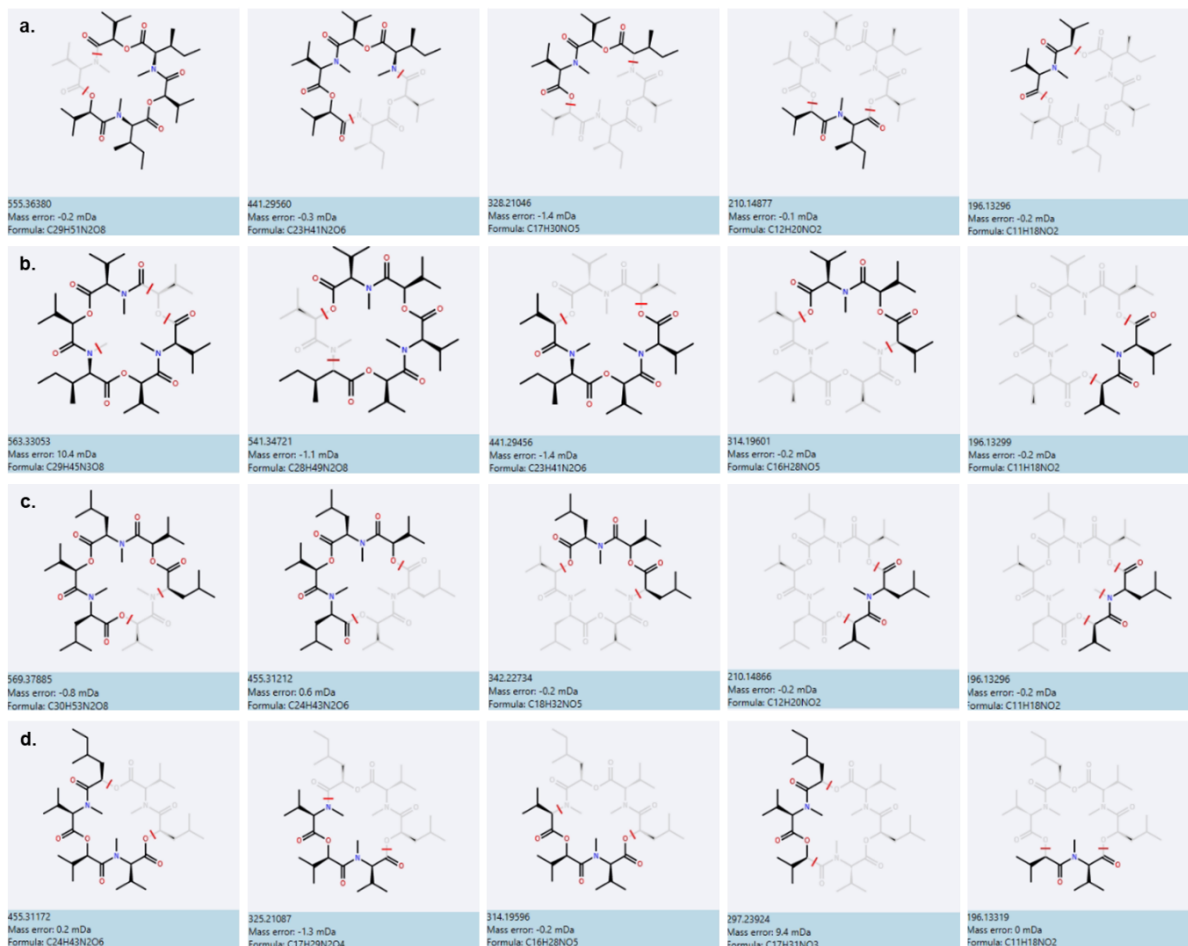
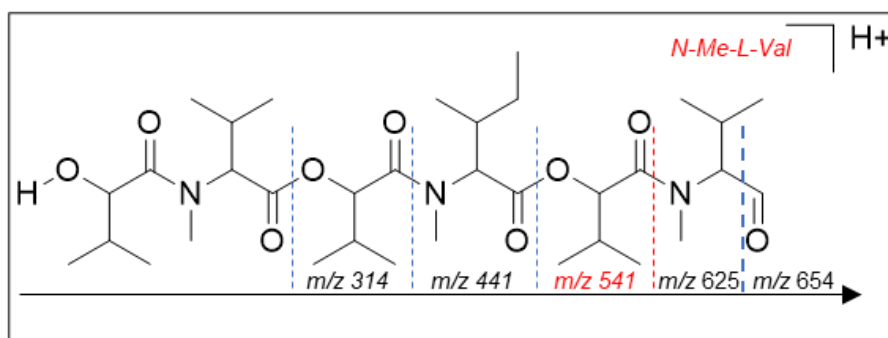


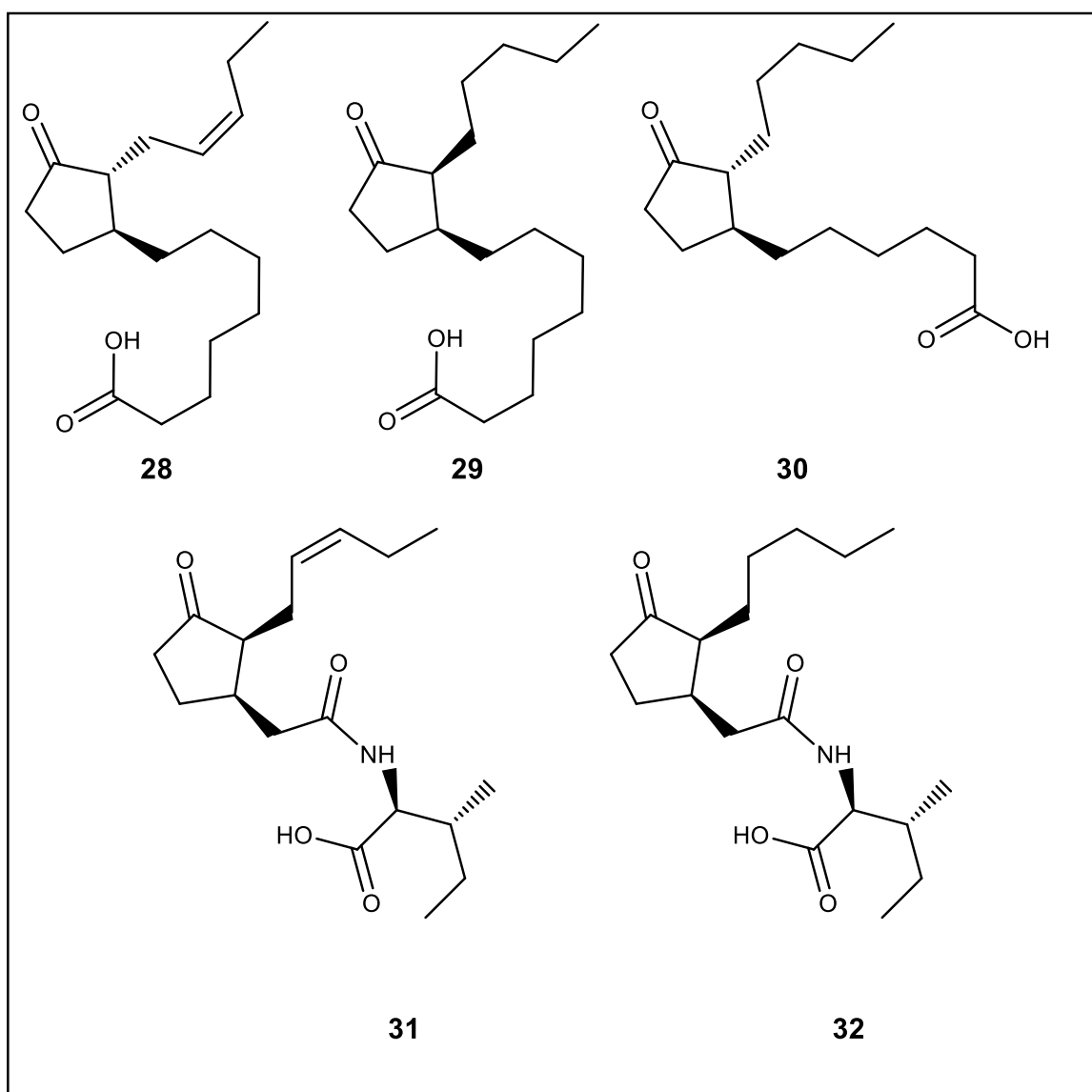
Figura 40 - Padrão de fragmentação eniatina B1 (25) por UPLC-QTOF-MS-ESI (+).



4.6.5. Derivados de jasmonato (**28-32**)

Os compostos: ácido 8-((1*S*, 2*R*)-3-oxo-2-((*Z*)-pent-2-en-1-il)ciclopentil) octanóico (**28**), ácido (1*S*, 2*S*)-3-oxo-2-pentilciclopentano-1-octanóico (**29**), ácido (1*S*, 2*R*)-3-oxo-2-pentilciclopentano-1-hexanóico (**30**), *N*-[(+)-7-*iso*-jasmonoil]-(*S*)-isoleucina (**31**) e *N*-[(9,10-dihidro-7-*iso*-jasmonil)]-(*S*)-isoleucina (**32**) foram anotados nos extratos de malte da linhagem S.S_R13, dos quais **28-30** também foram produzidos por S.S_R10 em extrato de PDB (**Figura 41**).

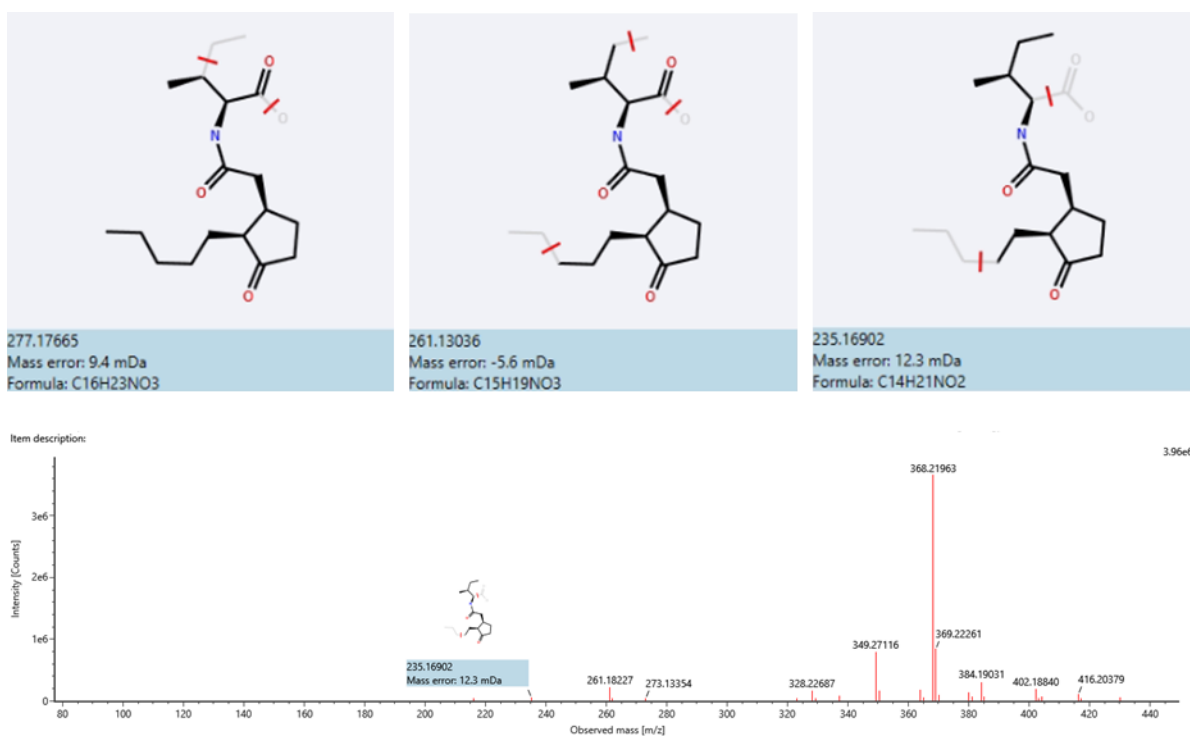
Figura 41 - Estruturas químicas derivados do jasmonato (**28-32**), anotados dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS^E (+).



As substâncias **28-30** formaram adutos com sódio, $[M+Na]^+$. De acordo com a literatura, as fragmentações ocorrem nas cadeias laterais com as perdas da cadeia pentil $[M-C_5H_{10}]^+$ e dos grupos hexanoico e octanoico $[M-(CH_2)_nCO_2]^+$, além disto para a substância **28** pode ser observado um fragmento $[M-C_5H_7O]^+$ referente a perda do anel ciclopentanona⁵⁵.

As substâncias **31** e **32** formaram adutos com potássio, $[M+K]^+$ e os fragmentos do UNIFI sugerem perdas de água, acetaldeído e das cadeias laterais saturadas (**Figura 42**).

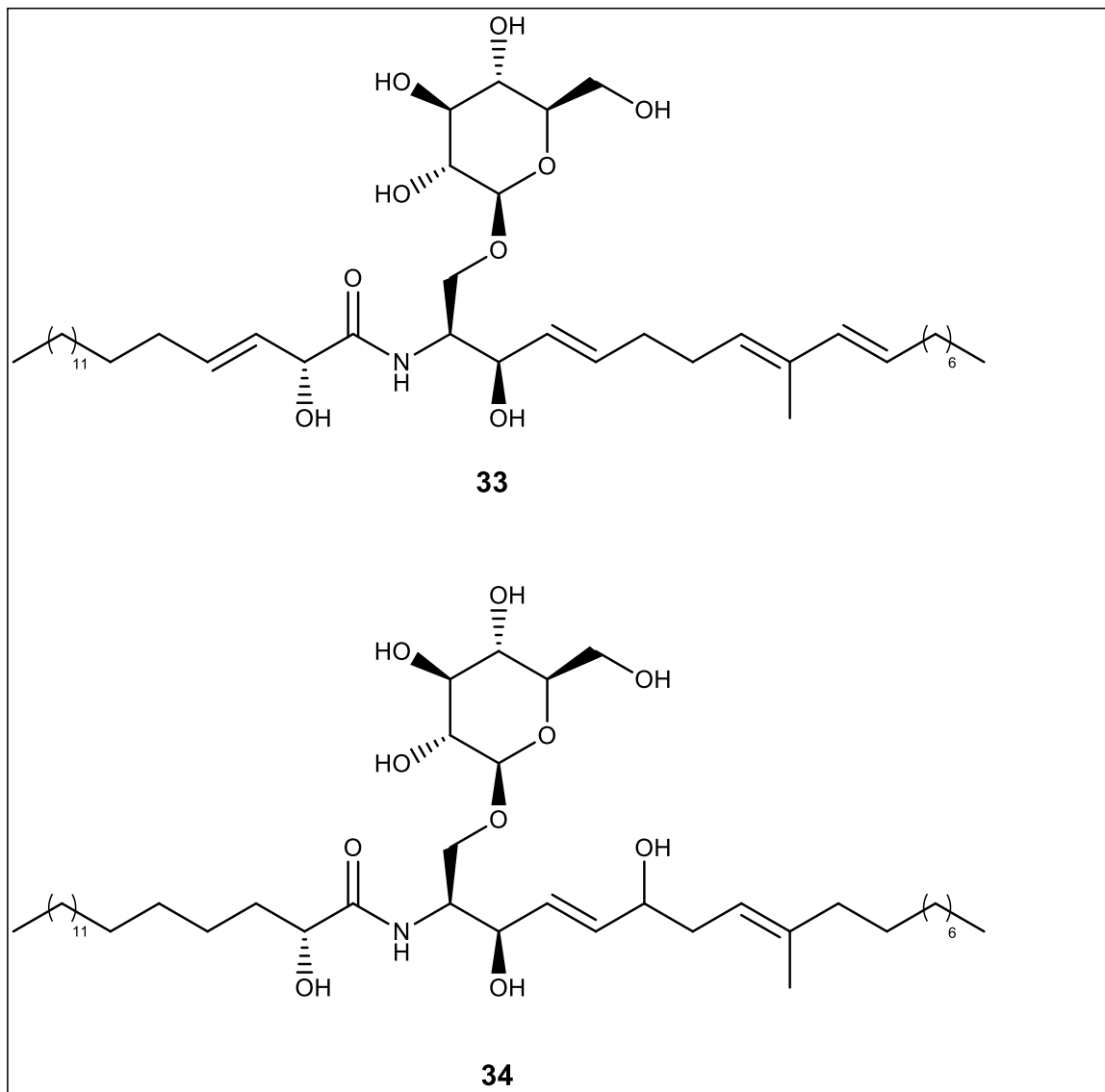
Figura 42 - Fragmentações propostas pelo software UNIFI para a substância **32**, dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS^E (+).



4.6.6. Cerebrosídeos (**33-34**)

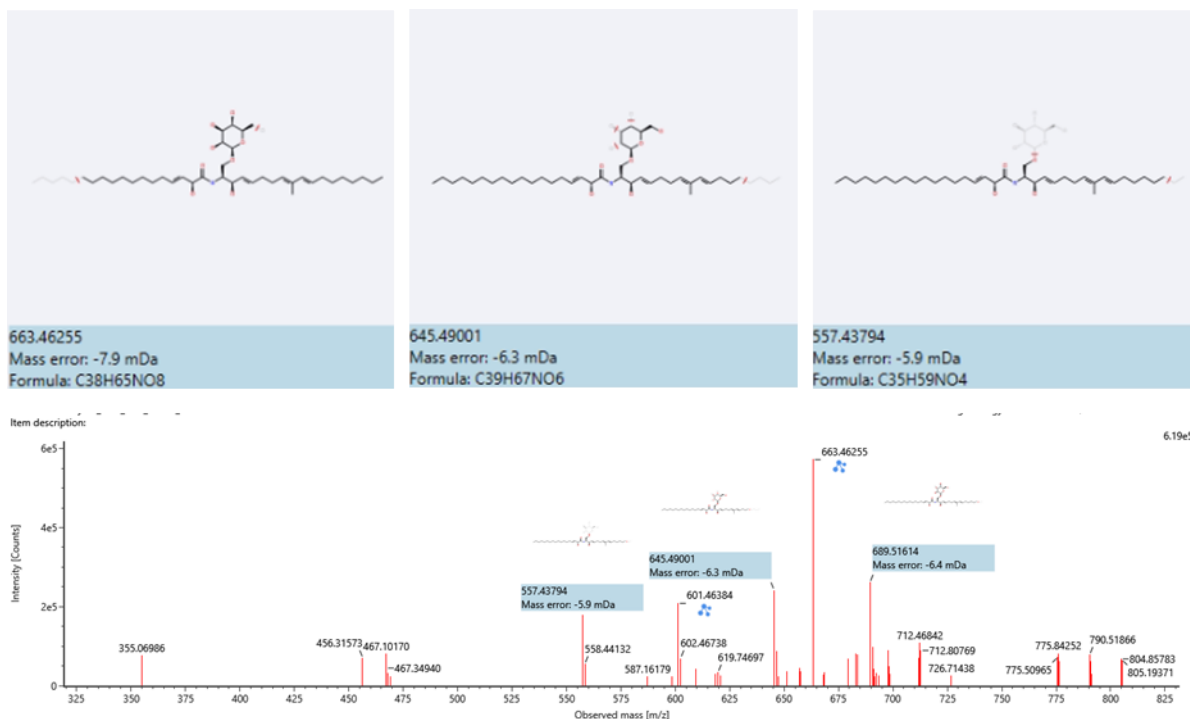
O fusarusídeo (**33**) foi anotado no extrato de malte de S.S_R13 e a *N*'2-hidroxi-octadecanoic-1-β-*D*-glucopiranosil-9-metil-4-hidroxi-4,8-esfingadienina (**34**) foi anotada no extrato de PDB de S.S_R10 (**Figura 43**).

Figura 43 - Estrutura química dos cerebrosídeos (**33-34**), anotados dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS^E (+).



As fragmentações geradas pelo UNIFI, de ambas as substâncias, sugerem clivagem entre a hexose e a ceramida, perdas de água referentes aos grupos hidroxilas presentes nas duas partes da estrutura e perda de hidrocarbonetos saturados (**Figura 44**).

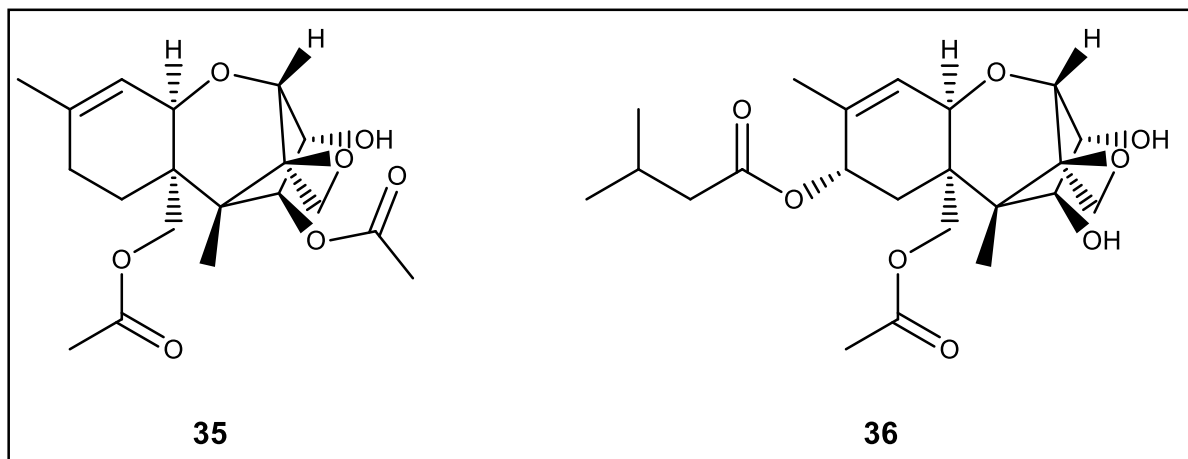
Figura 44 - Fragmentos propostos pelo software UNIFI para fusarusida (**33**), a partir dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS^E (+).



4.6.7. Terpenos (**35-38**)

Os tricotecenos, micotoxinas produzidas por fungos *Fusarium*, são sesquiterpenóides tetracíclicos com um anel epóxido característico (em C12-C13). Tricotecenos do tipo A, diacetoxiscirpenol (DAS) (**35**) e toxina HT-2 (**36**), foram anotados nos diferentes cultivos deste trabalho, sendo que a substância **35** foi produzida apenas pela linhagem S.S_R13 em meio de malte e a **36** por S.S_R10 nos meios de czapek e PDB (**Figura 45**).

Figura 45 - Estrutura química dos tricotecenos (**35-36**), anotados dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS^E (+).



A substância **35** foi observada com íon precursor $[M+NH_4]^+$ m/z 384,2028 e fragmentações em m/z 277, 247 e 219. Enquanto a substância **36** foi observada com íon precursor $[M+H]^+$ m/z 425,2149 e fragmentações em m/z 382, 374, 365 e 352. De acordo com a literatura, tricotecenos do tipo A apresentam perdas características referentes ao ácido isovalérico (-102 Da), ácido acético (-60 Da), formaldeído (-30 Da) e da água (-18 Da)⁵⁶. Os fragmentos obtidos pelo UNIFI (**Figura 46**), sugerem perdas referentes ao ácido acético e acetaldeído, além das perdas de água e rearranjos do anel cicloalcano. A perda de ácido acético para toxina HT-2 foi proposta na **Figura 47**.

Figura 46 - Fragmentações sugeridas pelo software UNIFI para substância **36**, a partir dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS^E (+).

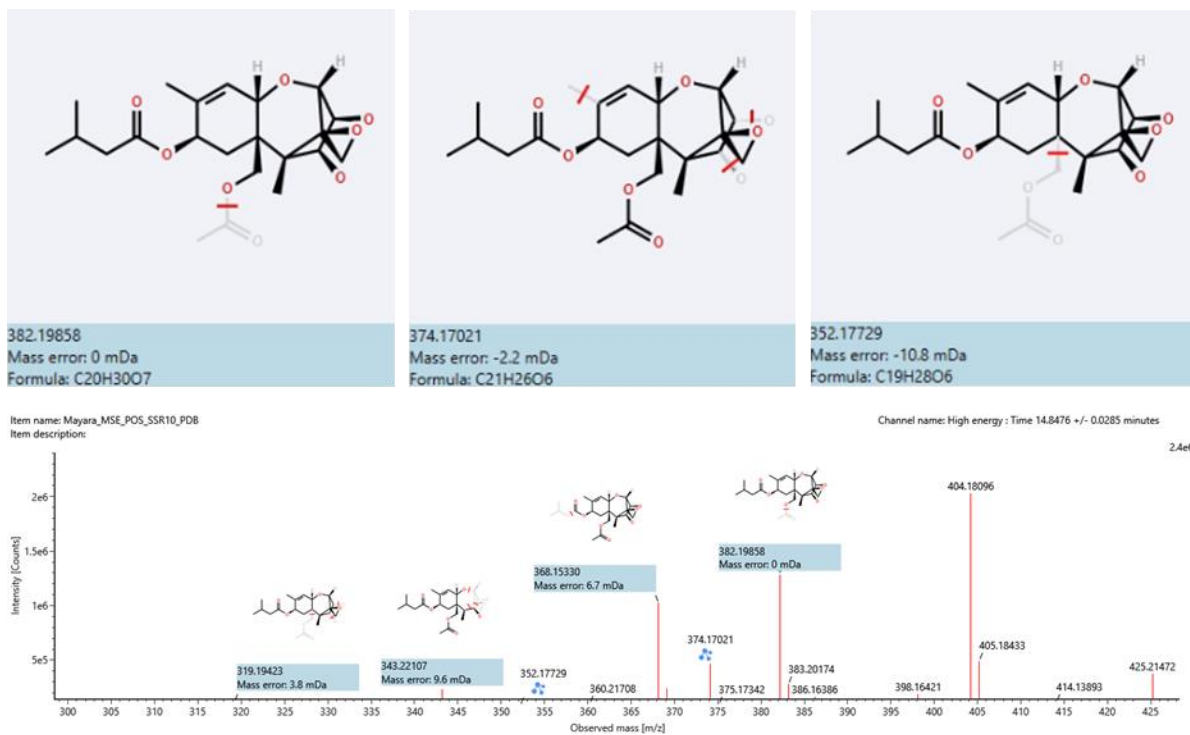
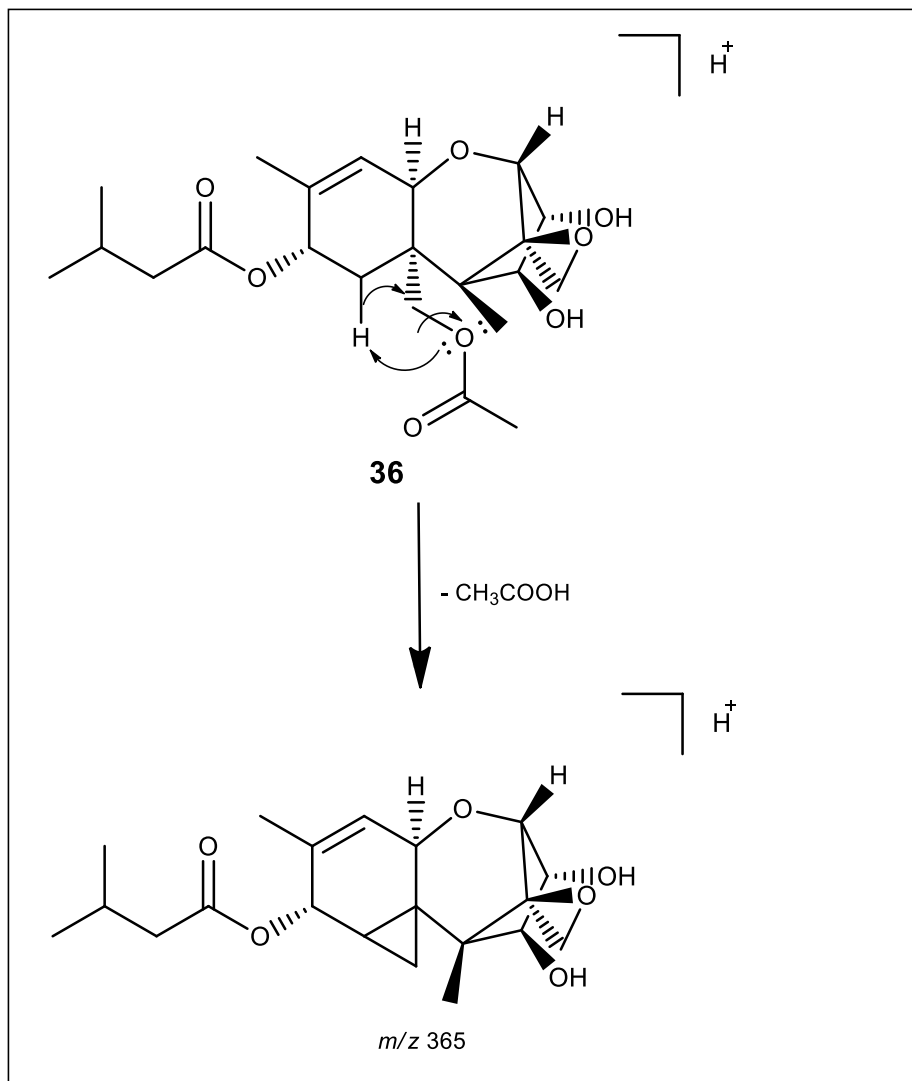
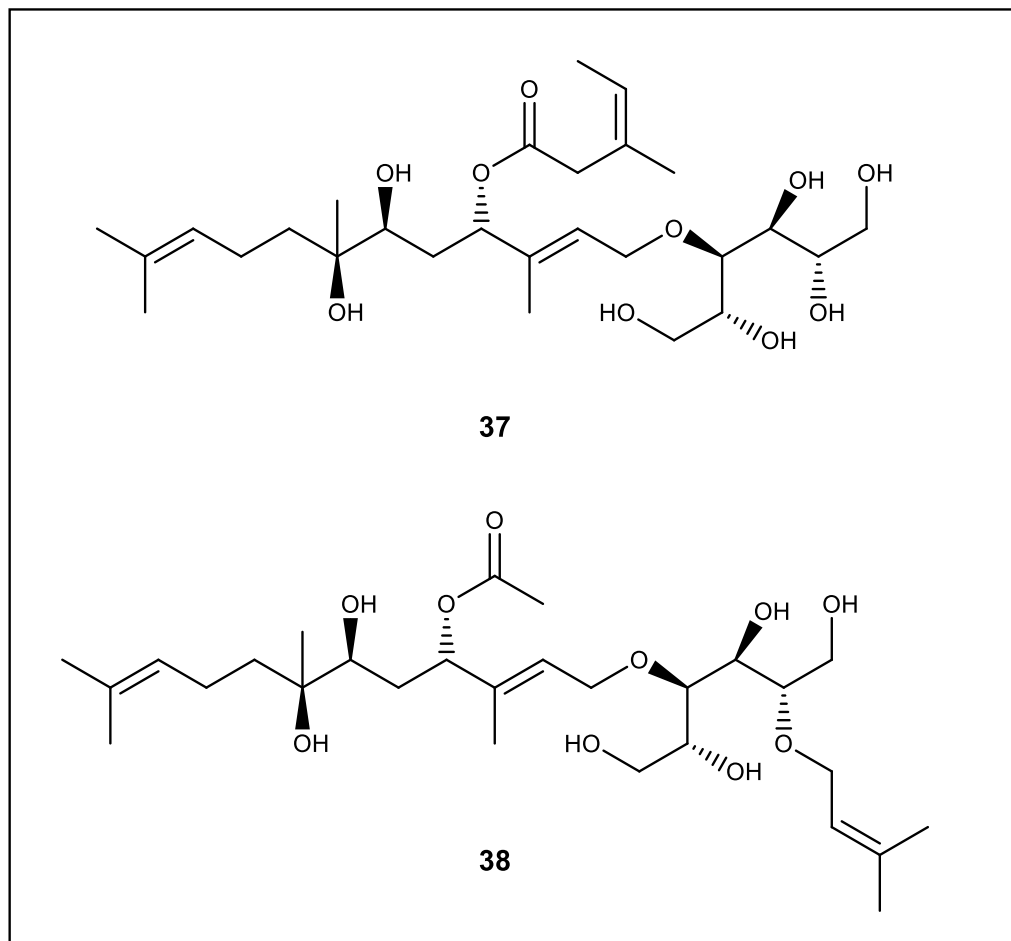


Figura 47 - Proposta de fragmentação da substância **36** por UPLC-QTOF-MS-ESI (+).



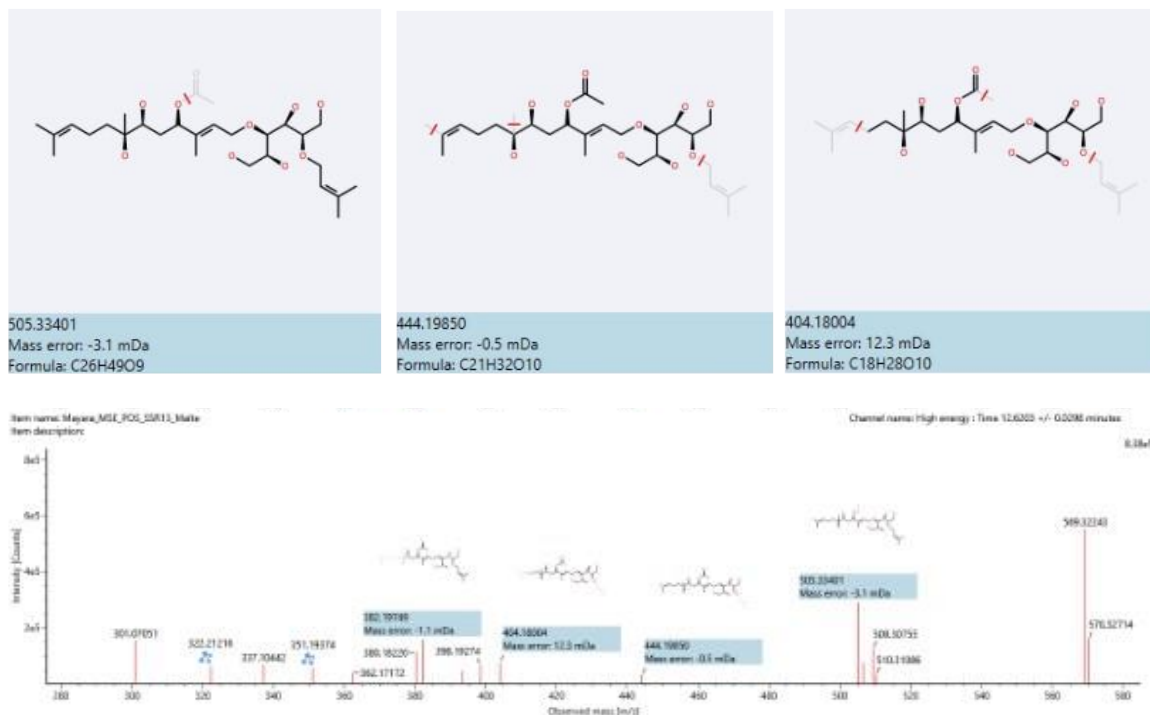
Dois sesquiterpenóides acíclicos também foram anotados, as cosmosporasidas G (**37**) e H (**38**) com íons precursores $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 555,3141 e 569,3291, respectivamente (**Figura 48**).

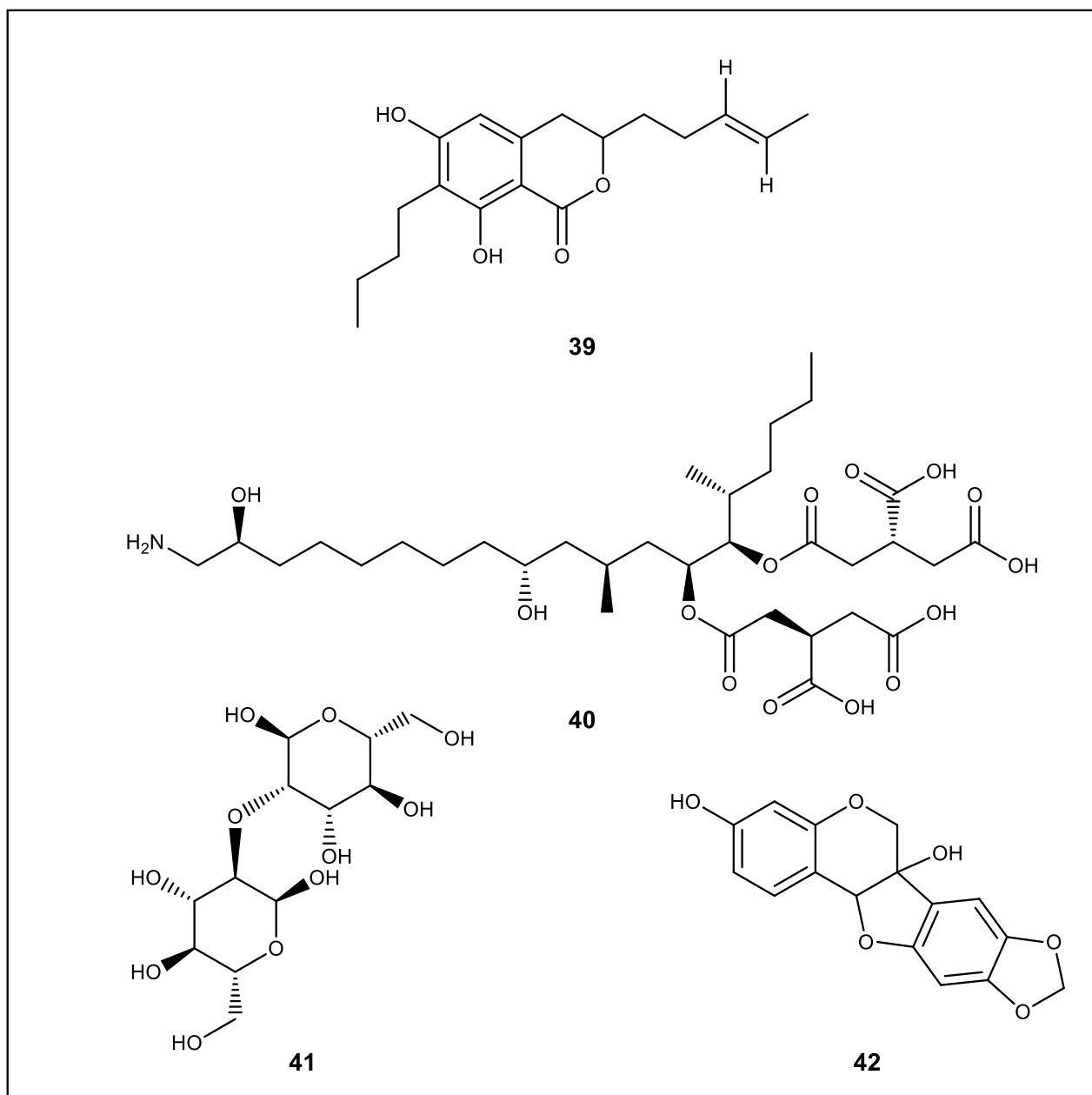
Figura 48 - Estrutura química das cosmosporasidas (**37-38**), anotadas dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS^E (+).



Para ambas as substâncias, as fragmentações observadas foram referentes a consecutivas perdas das cadeias laterais olefínicas, de água e acetaldeído como demonstrados na **Figura 49**.

Figura 49 - Fragmentações sugeridas pelo software UNIFI para cosmosporasida H (**38**), dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS^E (+).

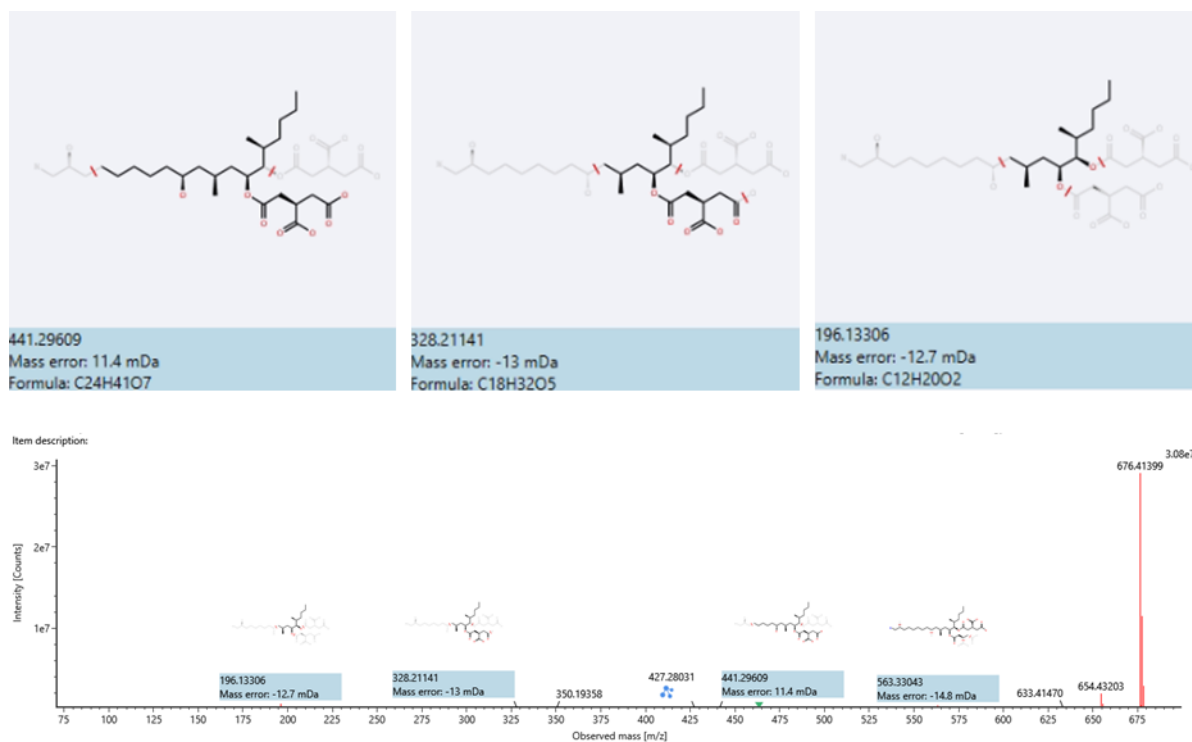


4.6.8. Outros metabólitos anotados (**39-42**)**Figura 50** - Estruturas químicas das substâncias (**39-42**) anotadas dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS^E (+).

Uma dihidroisocumarina (**39**) foi anotada com íon precursor $[M+Na]^+$ m/z 327,1567 nos extratos de malte de ambas as linhagens fúngicas. O espectro apresentou uma fragmentação em m/z 287, referente a uma desidratação. Ainda no extrato de malte de S.S_R10, foi anotada a fumonisina C3 (**40**), uma toxina comumente produzida por fungos deste gênero. Como reportado na literatura, a

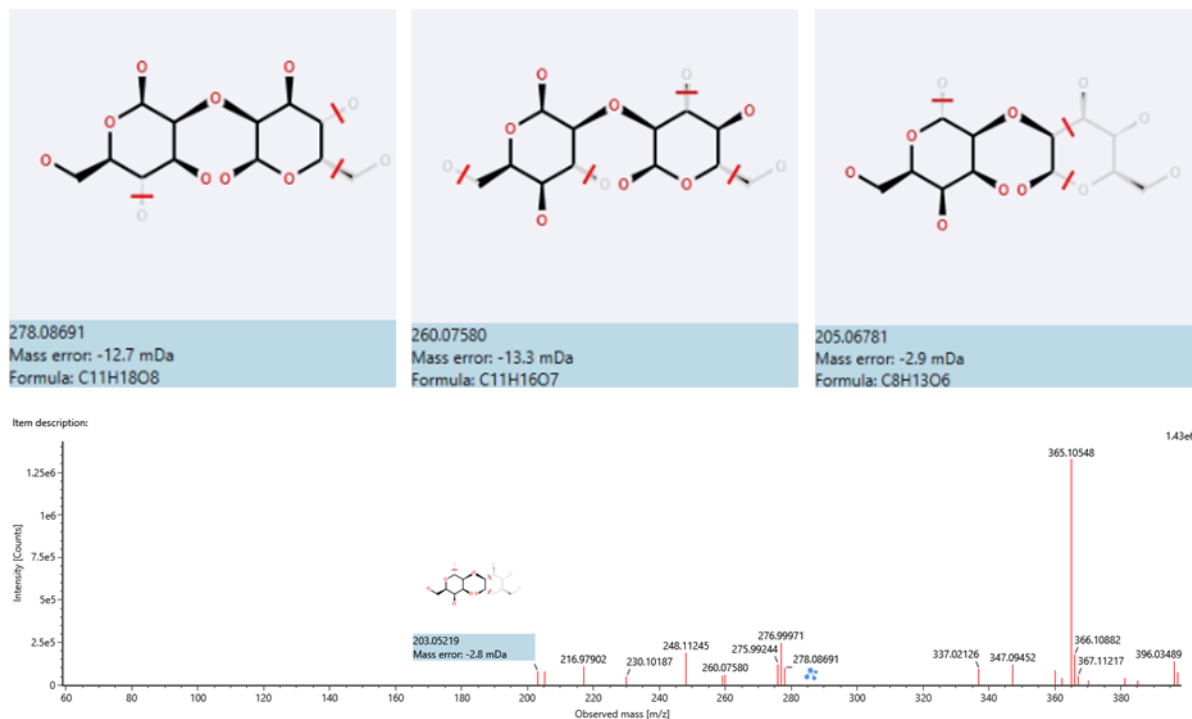
fumonisina C₃, sucessivas perdas de água e ácido tricarboxílico, como demonstrado na **Figura 51**⁵⁷.

Figura 51 - Fragmentações propostas pelo software UNIFI da fumonisina C₃ (**40**), dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS^E (+).



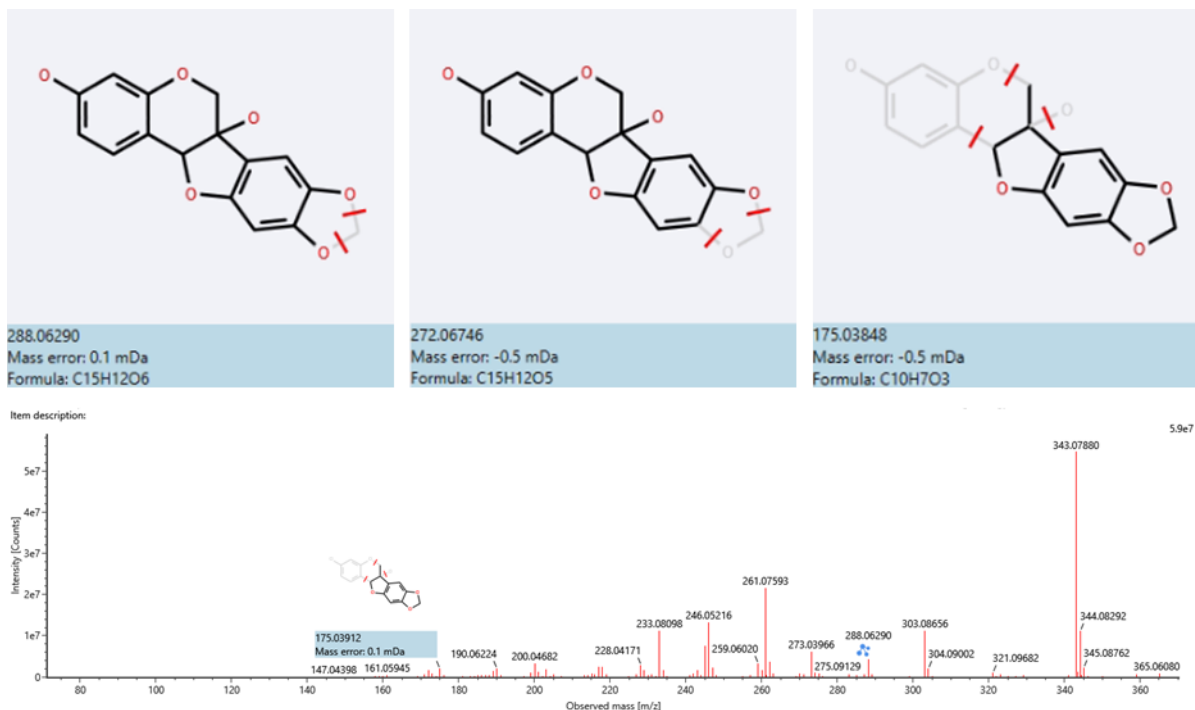
O derivado de açúcar α -D-manopiranosil-(1→2)- α -D-glucopiranosil (**41**), anotado nos extratos de czapek e malte de S.S_R13, com íon precursor $[M+Na]^+$ m/z 365,1057, apresentou fragmentos referentes sucessivas desidratações e abertura da hexose (**Figura 52**).

Figura 52 - Proposta de fragmentação sugerida pelo UNIFI para a substância **41**, a partir dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS^E (+).



No extrato de malte de S.S_R13 foi anotada a 6 α -hidroximaackiain (**42**), um derivado de isoflavonóide, com íon precursor $[M+H]^+$ m/z 301,0707 e fragmentações em m/z 288, 272 e 175 (**Figura 53**). A fragmentação em m/z 175 é referente a desidratação e a reação de Retro-Diels-Alder que ocorre no anel C como relatado na literatura⁵⁸.

Figura 53 - Fragmentações propostas pelo software UNIFI para a substância **42**, a partir dos dados obtidos via UPLC-QTOF-MS^E (+).



A anotação das substâncias utilizando o software UNIFI permitiu uma análise qualitativa dos metabólitos nos extratos a partir de uma biblioteca *in-house*. Apesar dos inúmeros estudos acerca de microrganismos, as bases de dados de metabólitos isolados destas fontes ainda são inferiores quando comparadas as plantas, logo a utilização de uma base de dados específica para este tipo de organismo, favorece a anotação de metabolitos.

Tabela 10 - Metabólitos anotados para as linhagens fúngicas nos diferentes meios de cultivo via UPLC-QTOF-MS^E em modo positivo utilizando o software UNIFI.

Nº	Substância	Extratos	tR (min)	Aduto/Molécula Protonada	Erro (mDa)	Íon precursor (m/z)	Fragmentos (m/z)
Alcalóides							
1	oxisporidinona	10M, 13M	14,40	H	0,0	490,3163	456, 438,4 21, 294, 276, 258, 232, 214
2	6-deoxioxisporidinona	13M	14,42	H	0,2	474,3216	456, 438, 398, 366, 350, 346, 314, 294, 276, 258, 240, 232
3	4'-hidroxioxisporidinona	10C, 13M	14,43	H	0,3	492,3323	474, 456, 421, 346, 276,258
4	dimetil cetil de oxisporidinona	13M	15,54	Na	0,0	558,3401	490, 487, 468, 443, 424, 385, 345, 270
5	4,6'-anidrooxisporidinona	10C, 10M, 13M, 13P	14,88	Na	0,4	494,2881	454, 357, 317
6	sambutoxina	13M	14,93	H	0,0	454,2952	436, 342, 296, 292, 256, 230, 228, 202
7	<i>epi</i> -tricosetina	10C, 10P, 13M	14,98	Na	0,3	382,1991	342, 288, 274, 147, 175
8	ácido fusárico	Todos	6,78	H	0,0	180,1019	162, 152, 134
9	ácido 9,10-dehidrofusárico	10C, 10P, 13M, 13P	5,37	H	0,2	178,0865	160, 150
10	fusaricato F	13M	14,84	NH ₄	-0,3	329,1721	231, 225
Naftoquinonas							
11	fusarubina	13M	11,41	Na	0,0	329,0624	289, 279, 265, 250, 247, 237, 221, 219, 207, 193
12	anidrofusarubina	13M	10,70	H	-0,3	289,0706	273, 261, 246, 245, 240, 226
13	9-O-metilfusarubina	13M	9,23	Na	0,1	343,0772	303, 288, 273, 261, 233
14	9-O-metilanidrofusarubina	13M	10,90	Na	0,1	325,0692	286, 273, 270, 257, 245, 243, 233
15	3-O-metil-9-O-metilfusarubina	13M	10,03	H	0,2	335,1127	301, 277, 263, 235, 207
16	8-O-metilbostricoidina	10M, 10P, 13C, 13M, 13P	10,79	H	0,0	300,0866	285, 283, 268, 256

17	8-O-metilsolaniol	13M	10,05	Na	-0,5	329,099	277 ,263, 243, 235, 207, 192
17	8-O-metiljavanicina	13M	10,14	Na	-0,3	327,0836	263, 249, 230, 219
19	1,4-naftalenodiona-3,8-dihidroxi-5,7-dimetoxi-2-(2-oxopropil)	13M	8,74	Na	-0,1	329,0631	247, 232, 219, 209
Antraquinonas							
20	2-acetil-3,8-dihidroxi-6-metoxi-antraquinona	13M	11,76	H	-0,2	313,0705	298, 270, 253
Naftofuranos							
21	nectriafurona	13M	11,06	Na	-0,2	327,0473	287, 275, 272, 259, 245
22	nectriafurona-8-metil éter	10M, 13M	10,54	Na	0,0	341,0632	301, 289, 286, 272, 257, 245
Depsipeptídeos cíclicos							
23	beauvericina	Todos	15,58	Na	0,0	806,3987	645, 523, 362, 262, 244
24	eniatina A1	Todos	15,96	Na	0,1	690,4301	555, 441, 328, 210, 196
25	eniatina B1	Todos	15,70	Na	0,0	676,4144	563, 541, 441, 314, 196
26	eniatina C	Todos	16,21	Na	0,9	704,4466	569, 455, 342, 328, 210, 196
27	eniatina MK	10M, 13M	16,20	Na	-0,2	704,4454	455, 325, 314, 297, 196
Derivados de jasmonato							
28	ácido 8-((1S, 2R)-3-oxo-2-((Z)-pent-2-en-1-il)ciclopentil) octanóico	10P, 13M	14,52	Na	-0,7	317,208	269
29	ácido (1S,2S)-3-oxo-2-pentilciclopentano-1-octanóico	10P, 13M	14,58	Na	-0,8	319,2235	269
30	ácido (1S,2R)-3-oxo-2-pentilciclopentano-1-hexanóico	10P; 13M	13,95	Na	-0,5	291,1926	176

31	<i>N</i> -[(+)-7- <i>iso</i> -jasmonoil]-(S)-isoleucina	13M	12,45	K	-0,5	362,1751	310, 254
32	<i>N</i> -[(9,10-dihidro-7- <i>iso</i> -jasmonil)]-(S)-isoleucina	13M	12,91	K	0,2	364,188	277, 261, 235, 233
Cerebrosídeos							
33	fusarusídeo	13M	17,32	K	-3,1	790,5199	689, 663, 609, 601, 557, 497
34	<i>N</i> '2-hidroxi-octadecanoic-1- β -D-glucopiranosil-9-metil-4-hidroxi-4,8-esfingadienina	10P	17,72	NH ₄	0,4	789,6203	465, 449
Terpenos							
35	diacetoxiscirpenol (DAS)	13M	8,75	NH ₄	1,1	384,2028	277, 247, 219, 209
36	toxina HT-2	10C, 10P	14,85	H	-2,1	425,2149	382, 374, 368, 352, 319
37	cosmosporasida G	10P	12,22	Na	0,1	555,3141	441
38	cosmosporasida H	10C, 10P, 13M, 13P	12,62	Na	-0,5	569,3291	505, 444, 404, 398, 382, 380, 362, 351, 322
Outros							
39	3-(R)-7-butil-6,8-dihidroxi-3-pent-11-enilisocroman-1-ona	10M, 13M	12,95	Na	0,0	327,1567	287
40	fumonisina C3	10M	15,70	H	1,1	692,3862	
41	α -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-glucopiranosil	13C, 13M	0,79	Na	0,3	365,1057	325, 278, 260, 203
42	6 α - hidroximaackiain	13M	9,55	H	0,0	301,0707	288, 272, 175

13: *Fusarium oxysporum* S.S_R13; 10: *Fusarium oxysporum* S.S_R10; C: czapek; M: malte; P: PDB

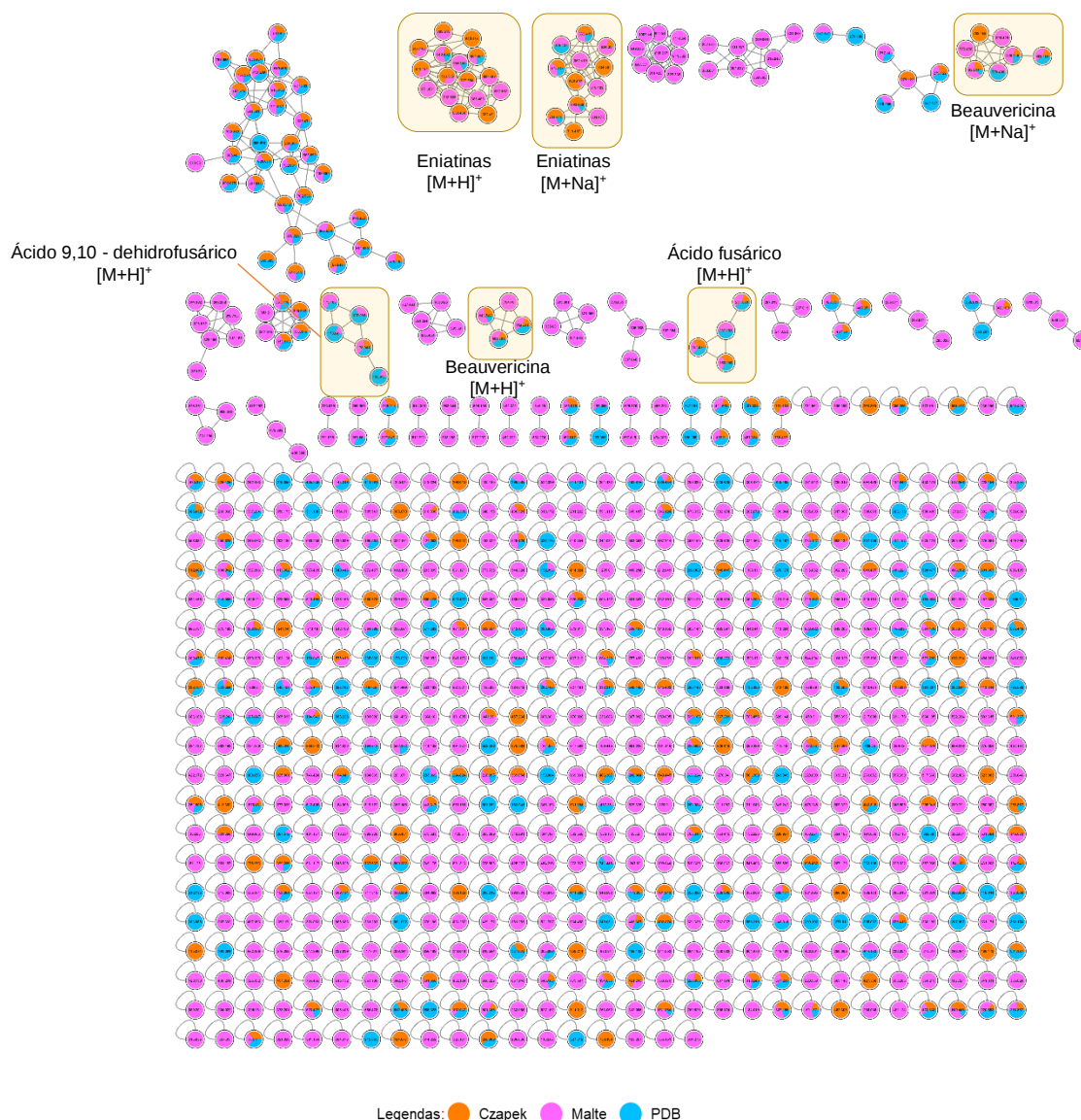
4.7. Análise das redes moleculares através do GNPS

A rede de interações moleculares (*Molecular Networking*) foi criada através da plataforma GNPS. Os espectros obtidos nas análises de UPLC-QTOF-MS/MS em modo DDA (*data-dependent acquisition*) foram convertidas para .mzML através do aplicativo MSConvert e submetidas a um *workflow* na plataforma do GNPS, no modo clássico.

Para a visualização das redes moleculares utilizou-se o programa *Cytoscape* 3.9.0. Diferentes cores foram atribuídas aos nodos para diferenciação dos extratos, assim como o tamanho dos mesmos foram atribuídos à intensidade relativa dos picos. Enquanto a largura das arestas está associada aos valores de cosseno, logo quanto maior a largura, maior a similaridade espectral.

A rede molecular apresentou 761 nodos e 38 *clusters* (**Figura 54**). Apesar da formação de inúmeros nodos, os *matches* observados foram referentes as eniatinas, beauvericina, e ácido fusárico. O GNPS permitiu a anotação de mais três depsipeptídeos cíclicos (**Tabela 11**).

Figura 54 - Representação da rede molecular obtida dos diferentes extratos estudados visualizada no Cytoscape 3.9.0.



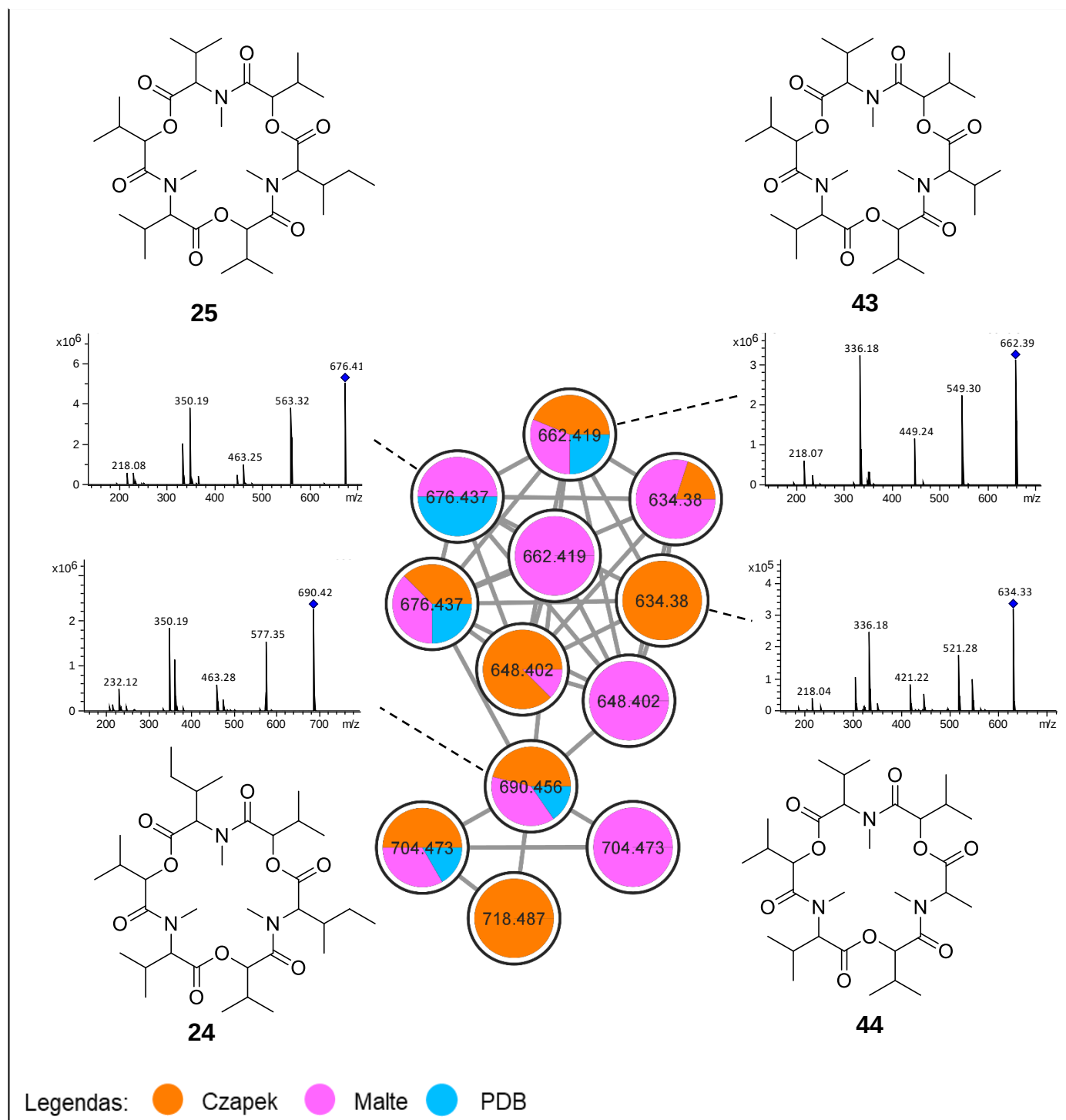
Foi possível observar que os extratos obtidos em meio de malte, apresentaram mais *clusters* únicos quando comparados com os obtidos nos meios de czapek e PDB, mostrando que houve uma variabilidade de produção metabólica nos diferentes extratos. E que assim como visualizado nos resultados anteriores, o meio de malte foi o que produziu mais substâncias exclusivas.

As eniáticas foram observadas em dois *clusters* com formação de adutos diferentes. A **Figura 55** representa a rede molecular com íons precursores $[M+Na]^+$, onde foram anotadas as eniáticas A1 (24), B (43), B1 (25) e J1 (44).

Analisando a produção das eniatinas nos diferentes meios de cultivo, conclui-se que em meio de PDB houve uma menor produção, enquanto em meio de czapek houve maior produção, além disto a eniatina J1 (**44**) foi anotada apenas nos extratos em meio de czapek e malte. Também houve variação de produção das eniatinas entre as linhagens fúngicas, sendo que a **44** foi produzida apenas pela linhagem S.S_R10.

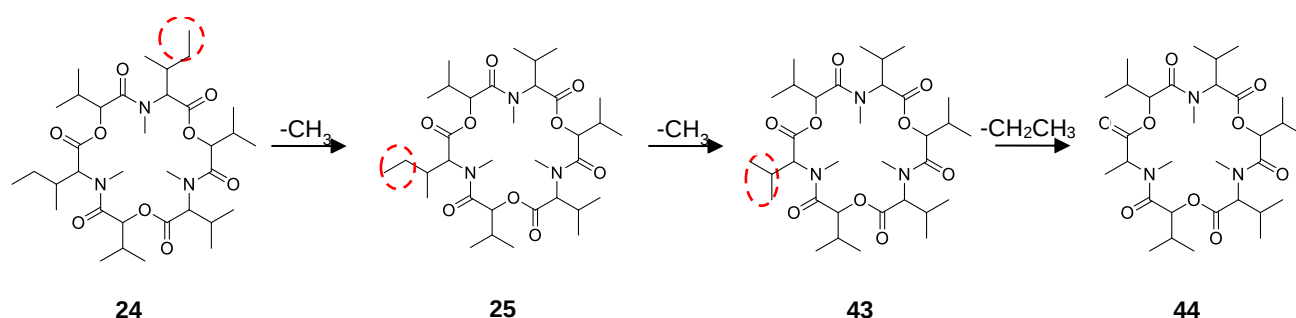
As eniatinas **43** e **44** seguem o mesmo padrão de fragmentação das discutidas no item 4.6. Como é possível observar nos espectros na **Figura 55**, todas possuem a perda de 113 Da correspondente ao resíduo *N*-metil-*L*-valina.

Figura 55 - Produção das eniatinas nos diferentes meios de cultivo na forma $[M+Na]^+$ observada na rede molecular.



As eniatinas anotadas se diferem entre si pelos resíduos de aminoácidos que as constituem, neste caso sempre associada a perda de grupos metilas. Os diferentes tamanhos das cadeias alifáticas, fazem com que estas substâncias possuam lipofilicidades distintas. Este comportamento pode ser observado nos tempos de retenções de cada uma das substâncias, que aumentam conforme o aumento desta cadeia (**Figura 56**).

Figura 56 - Diferenciação das eniatinas anotadas pelo GNPS.

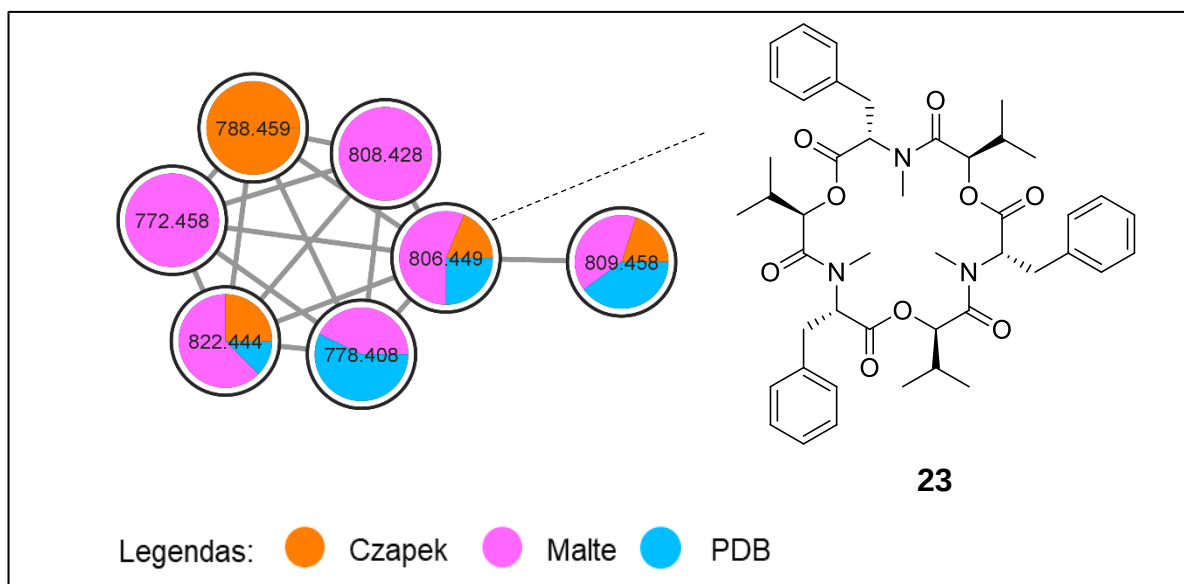


Ao comparar os valores de íons precursores dos nodos $[M+Na]^+$ m/z 648 e 704 com a literatura temos correspondência com as eniatinas B2/J2/J3 e eniatinas A/A2/MK/C, respectivamente^{52,59}. Não é possível confirmar qual análogo foi produzido, devido à falta de espectros de massas disponíveis na literatura. No **Apêndice 20** estão demonstradas as estruturas destas substâncias.

Apesar da eniatina J1 (**44**) ter sido anotada neste estudo, na literatura não há relatos da produção da mesma por *Fusarium oxysporum*, apenas em outras espécies do gênero *Fusarium*. Como as eniatinas possuem valores similares de massas molecular, é possível que se trate de outro análogo, no entanto, para confirmações seria necessário o isolamento e caracterização das mesmas⁶⁰.

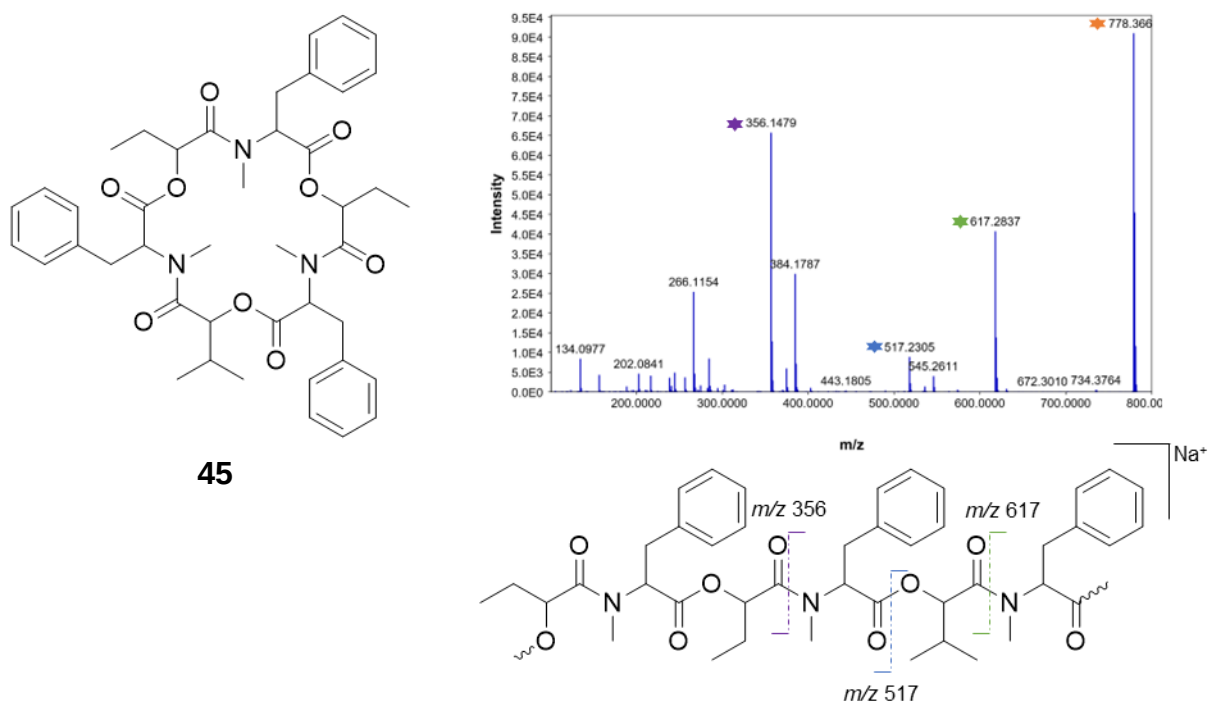
Dois *clusters* foram observados, com íons precursores protonados com hidrogênio e adutos de sódio, como sendo da beauvericina (**23**) (**Figura 57**). Foi anotada com íon precursor $[M+Na]^+$ e apesar de ter sido identificada nos extratos de todos os meios de cultivo, a sua maior produção foi em meio de malte, seguido de PDB e por fim czapek, além disto ambas as linhagens fúngicas metabolizaram este metabólito.

Figura 57 - Produção da beauvericina (**23**) nos diferentes meios de cultivo na forma $[M+Na]^+$ observada na rede molecular.



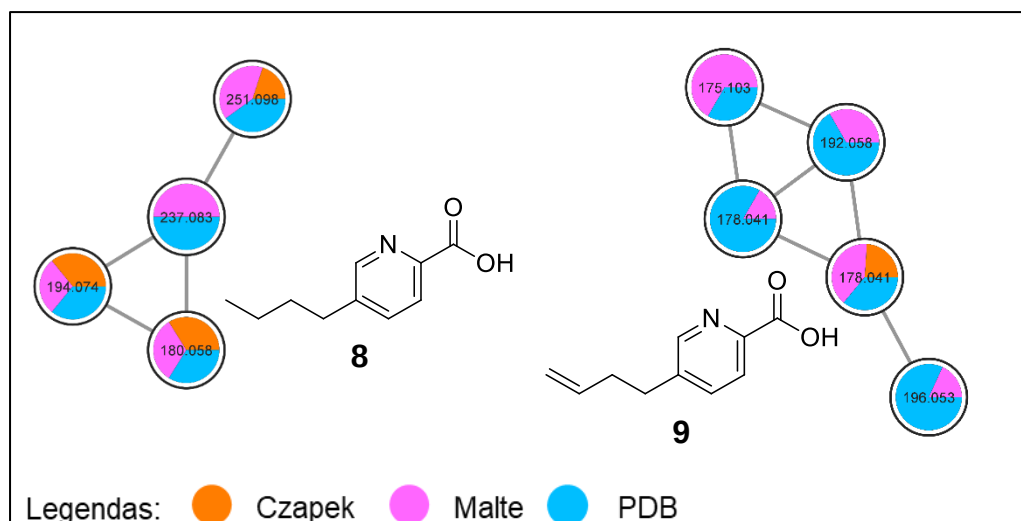
Na literatura, análogos da beauvericina (**23**) já foram isolados de *Beauveria bassiana* e sintetizados a partir de modificação no cultivo⁶⁰. Ao comparar os fragmentos do íon precursor $[M+Na]^+$ m/z 778 com os análogos da literatura, foi possível identificá-lo como sendo a beauvericina G2 (**45**), que foi produzida apenas nos meios de malte e PDB. Na **Figura 58** é possível observar o espectro, que foi extraído do software MZmine 2.53, para esta substância.

Figura 58 - Espectros de massas substâncias **46** extraído dos dados obtidos por UPLC-QTOF-MS/MS.



Também foi observado um *cluster* para o ácido fusárico (**8**), produzido em todos os meios e por ambas as linhagens fúngicas, com íon precursor $[M+H]^+$ m/z 180, e análogos. O ácido 9,10 – dehidrofusárico (**9**) com íon precursor $[M+H]^+$ m/z 178 também foi observado, no entanto, em outro nodo (**Figura 59**). A fragmentação para **8** foi discutida no item 4.6.

Figura 59 - Produção do ácido fusárico (**8**) e dehidrofusárico (**9**) nos diferentes meios de cultivo na forma $[M+H]^+$ observada na rede molecular.



Outras substâncias apresentaram *matches* com a biblioteca do GNPS, no entanto, além de estarem presentes nas amostras obtidas através da inoculação dos fungos, também estão presentes nos brancos de meio de cultura, mostrando que não houve consumo delas, portanto, não foram discutidas neste trabalho.

Tabela 11 - Metabólitos anotados para as linhagens fúngicas nos diferentes meios de cultivo via UPLC-QTOF-MS/MS em modo positivo utilizando a plataforma GNPS.

Nº	Substância	Extratos	tR (min)	Aduto/Molécula Protonada	Cosseno score	Íon precursor (m/z)	Fragmentos (m/z)	Referência
Depsipeptídeos cíclicos								
43	eniatina B	Todos	15,41	Na	0,78	662,419	553, 414, 399, 314, 214, 196	60
44	eniatina J1	10C, 10M	14,66	Na	0,78	634,380	314, 286, 314, 196	60
45	beauvericina G2	10M,10P, 13M, 13P	15,36	Na	-	778,408	734, 672, 617, 517, 356, 266	60

13: *Fusarium oxysporum* S.S_R13; 10: *Fusarium oxysporum* S.S_R10; C: czapek; M: malte; P: PDB.

4.8. Planejamento fatorial

Apesar dos meios de malte e PDB apresentarem uma variação maior dos perfis metabólicos, indicando uma produção de metabólitos secundários variados, foi escolhido o meio de czapek para este trabalho, a fim de estudar se a manipulação de parâmetros físicos ativará vias biossintéticas silenciadas, levando a produção de mais substâncias.

Visando estudar a variação no cultivo através da técnica OSMAC, utilizou-se a ferramenta de Design de Experimentos (DoE) para avaliação do efeito dos diferentes parâmetros na produção de novos metabólitos. Para esse procedimento, foi utilizado um planejamento fatorial completo 2². As respostas foram a massa dos extratos brutos (em mg) obtidos de cada experimento, que contém respostas sobre crescimento do fungo e a intensidade de picos de substâncias previamente anotadas no item 4.6 e 4.7, que contém respostas sobre a produção das mesmas pelo fungo.

Trabalhos em nosso grupo de pesquisa demonstraram que a agitação, a presença de luz e o meio de cultivo são variáveis significativas na obtenção de massa de extrato no estudo do fungo endofítico *Xylaria* sp.⁶¹. Baseado nisso, para este trabalho foram escolhidas as variáveis: agitação e exposição à luz.

4.8.1. Resposta: massa de extrato em mg

As massas de extrato bruto variaram entre 16,0 e 82,3 mg (**Tabela 12**). A maior massa foi obtida na triplicata do ensaio 1, com ausência de luz e em modo estático, enquanto a menor massa foi obtida na triplicata do ensaio 4, com a presença de luz (24 h) e sob agitação (50 rpm).

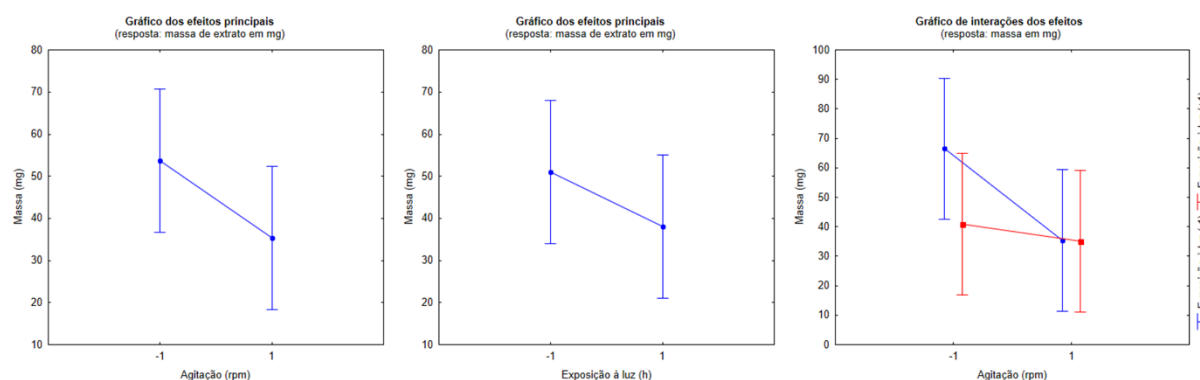
Tabela 12 - Massas dos extratos brutos em mg obtidos nos experimentos do planejamento.

Ensaio	Agitação (rpm)	Exposição à luz (h)	Massa (mg)			Massa média (mg)
1	0	0	63,8	82,3	53,3	66,47
2	50	0	22,9	43,5	39,9	35,43
3	0	24	35,7	69,3	17,7	40,90
4	50	24	46,7	16,0	42,8	35,17

De acordo com a **Tabela 12**, nos ensaios sem luz (1 e 2) ao elevarmos a agitação de 0 a 50 rpm, temos uma diminuição de massa média do extrato de 46,7%, enquanto nos ensaios sob luz (3 e 4) essa perda é de apenas 14%. Esses resultados nos mostram que o efeito da agitação depende do nível da exposição à luz, e vice-versa. Nos ensaios sem agitação (1 e 3), temos que ao incidir luz no sistema a massa média do extrato diminui em 35,0% e sob agitação (2 e 4) a massa média de extrato diminui em menos de 1%.

As diferentes massas de extrato obtidas nos diferentes ensaios são ilustradas no gráfico dos efeitos principais (**Figura 60**). Inicialmente analisando o gráfico do efeito da agitação temos que quando a agitação passa do nível -1 (ensaios 1 e 3) para o nível +1 (ensaios 2 e 4), a massa de extrato diminui. Para calcular, portanto, o efeito da agitação basta fazer a diferença entre as médias das respostas nos diferentes níveis. Ademais, a inclinação da reta nos diz se houve diminuição ou aumento da resposta conforme mudamos do nível -1 para o +1, e neste caso, a inclinação da reta é negativa, corroborando com os resultados e indicando que há diminuição da resposta. O mesmo ocorre com o gráfico de exposição à luz.

Figura 60 - Gráfico dos efeitos principais e interações do planejamento fatorial obtidos pelo software TIBCO® Statistica 10.



O gráfico de interações dos efeitos nos mostra o efeito da agitação quando passa de um nível inferior para um superior quando está sob luz (+1) e sem luz (-1). Quando as retas estão paralelas, ou seja, possuem inclinações parecidas, não existe o efeito de interação, no entanto, quando possuem diferenças nos valores

de inclinação há um indício de que existe um efeito de interação entre os efeitos podendo ser significativos ou não.

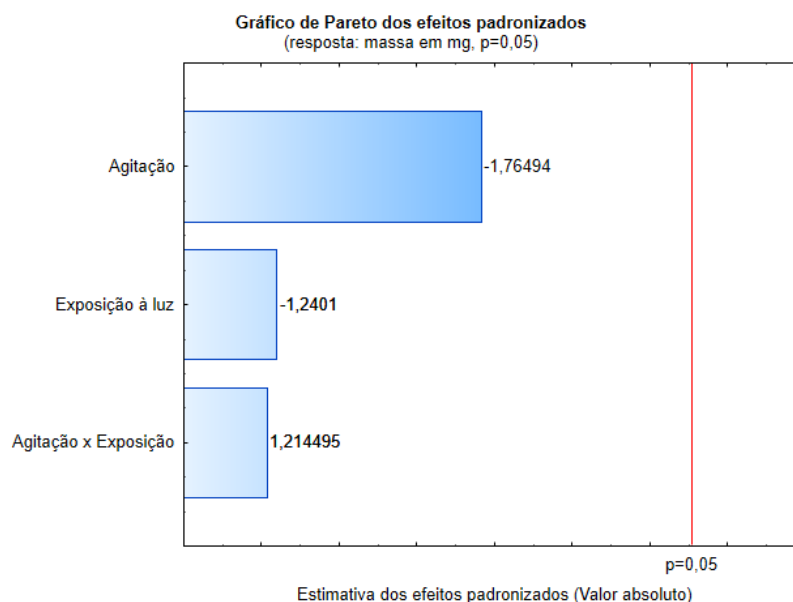
A **Tabela 13** mostra os valores dos efeitos e coeficientes de regressão seguidos dos valores do teste t de *Student* e da probabilidade (P). As significâncias dos efeitos foram verificadas por esses testes, sendo todos estatisticamente não significativos.

Tabela 13 - Estimativas dos efeitos e coeficiente de regressão para resposta de massa de extrato.

Fatores	Efeitos	Coef. de Regressão	t-student	p
Constante	44,49	44,49	8,54	0,000027
Agitação	-18,39	-9,19	-1,76	0,115574
Exposição à luz	-12,92	-6,46	-1,24	0,250078
Agitação x Luz	12,65	6,32	-1,21	0,259188

No gráfico de Pareto (**Figura 61**) são representados os valores absolutos padronizados de cada fator e das interações correspondentes aos valores do teste t de *Student* calculado para cada variável independente. Aqueles fatores cujos valores são superiores a 2,31 ($p=0,05$) – localizados a direita da linha vermelha – são considerados significativos, enquanto os inferiores, a esquerda da linha vermelha, são estatisticamente insignificativos.

Figura 61 - Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados (resposta: massa de extrato) obtido pelo software TIBCO® *Statistica* 10.



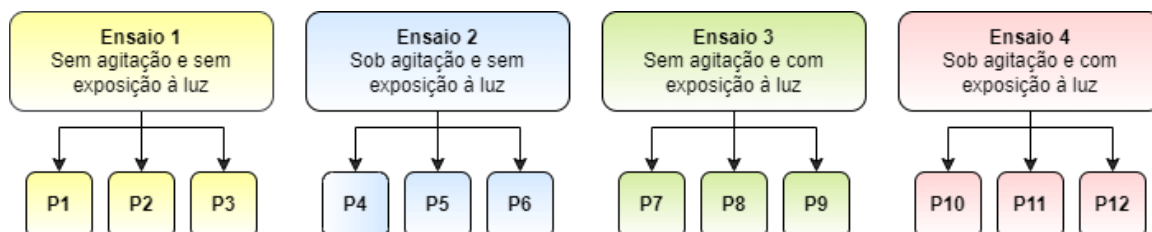
Os sinais negativos indicam que houve uma diminuição da massa de extrato obtida, portanto, analisados independentemente as variáveis diminuem a massa de extrato obtida. No entanto, quando olhadas em conjunto, a interação agitação x luz causa um aumento da massa do extrato, mas através da análise do gráfico de Pareto é possível concluir que nenhum dos efeitos se mostraram estatisticamente significativos.

Apesar dos fatores serem estatisticamente insignificativos é interessante notar que, avaliados independente, os fatores apresentaram valores negativos, ou seja, ao expor o fungo a luz e a agitação, a massa do extrato diminui. Esperava-se que ao submeter o fungo a condições abióticas diferentes daquelas do ambiente que ele foi extraído, dado que na raiz temos pouca incidência de luz e baixa agitação, teríamos um aumento da produção de substâncias como mecanismo de defesa do mesmo, no entanto, os resultados de massa se mostraram contrários a expectativas.

4.8.2. Avaliação do perfil metabólico por LCMS dos extratos brutos do planejamento

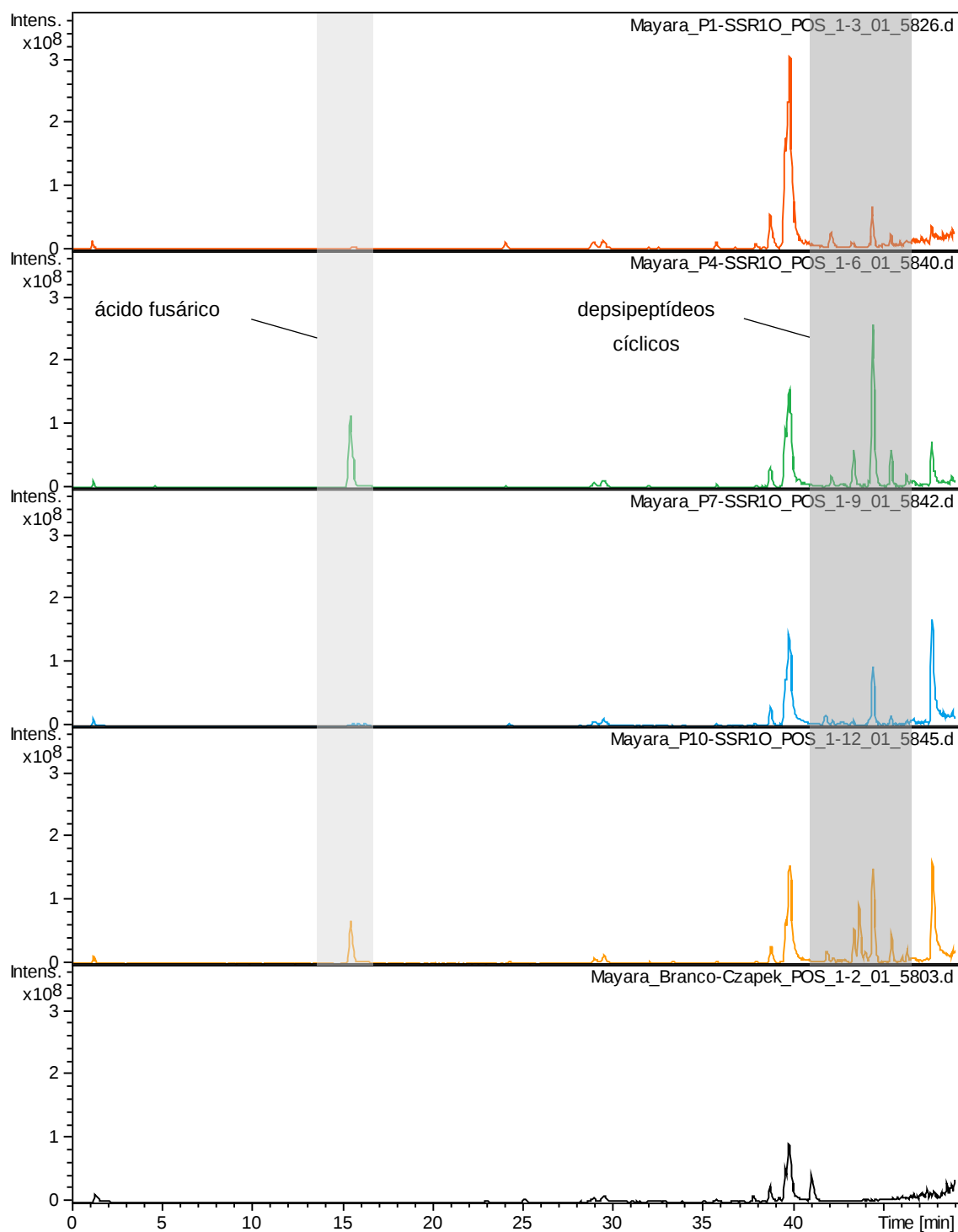
Os extratos brutos foram submetidos a análise por LCMS para avaliar se houve variação do perfil metabólico. Os ensaios e suas triplicatas foram renomeados através de códigos para facilitar a visualização (**Figura 62**).

Figura 62 - Códigos dos experimentos realizados no planejamento experimental.



Na **Figura 63** são demonstrados os cromatogramas representativos de cada ensaio. Foi possível concluir que houve uma diferença na intensidade dos picos nos diferentes ensaios realizados. A presença de picos em tempos de retenção maiores (menos polares) no ensaio 1 são referentes a substâncias presentes no meio de czapek, evidenciando que nos experimentos realizados em modo estatístico e sem exposição à luz, não houve consumo das mesmas, ao contrário do que ocorre naqueles com agitação e exposição à luz.

Figura 63 - Perfil metabólico BPC da linhagem S.S_R10C em diferentes cultivos em LCMS-ESI-IT modo positivo.



Para comparar estatisticamente as intensidades dos picos nas diferentes condições de cultivo fez-se o pré-processamento dos dados, utilizando o programa MZmine 2.53. As intensidades dos picos referentes ao ácido fusárico

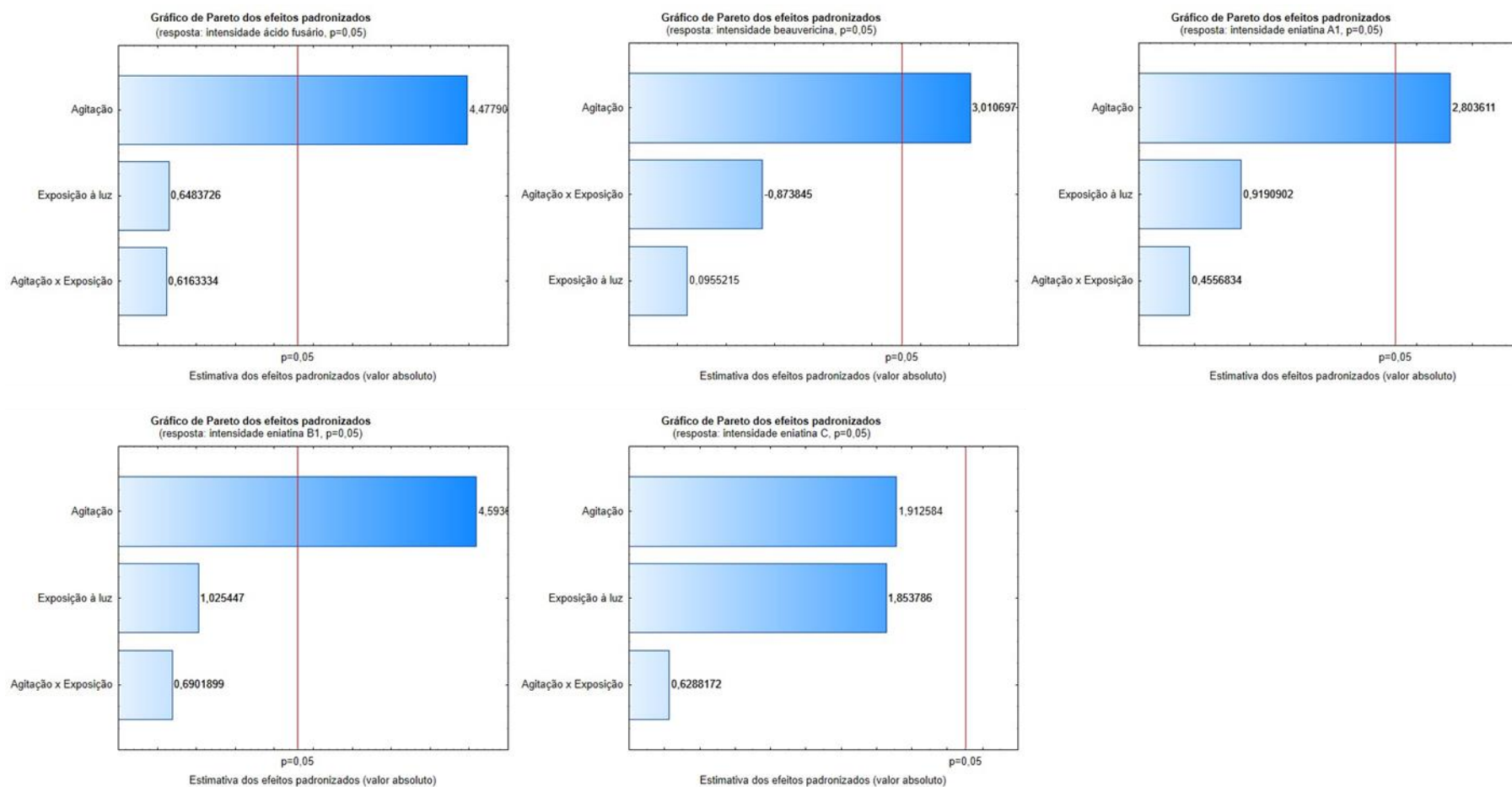
(8), beauvericina (23) e eniatinas (24-26), que foram previamente identificados através das ferramentas de desreplicação (item 4.6), foram escolhidos para estudo. Na **Tabela 14** estão os valores de intensidade dos picos para cada uma das substâncias analisadas.

Tabela 14 - Intensidade dos picos dos extratos obtidos de LC-ESI-IT-MS em modo positivo após pré-tratamento no MZmine 2.53.

Ensaio	Ácido fusárico	Beauvericina	Eniatina A1	Eniatina B1	Eniatina C
P1	2,70E+06	6,70E+07	2,50E+07	1,30E+07	1,30E+07
P4	1,10E+08	2,50E+08	6,10E+07	8,80E+07	2,10E+07
P7	3,80E+06	9,30E+07	1,60E+07	1,40E+07	9,20E+06
P10	6,70E+07	1,50E+08	4,60E+07	6,40E+07	2,40E+07
P2	3,60E+06	1,30E+08	2,90E+07	2,30E+07	1,40E+07
P5	3,70E+07	2,00E+08	3,60E+07	7,70E+07	1,20E+07
P8	3,30E+06	7,50E+07	1,30E+07	8,30E+06	8,00E+06
P11	7,60E+07	1,80E+08	1,10E+08	1,50E+08	6,00E+07
P3	2,70E+06	5,40E+07	1,10E+07	1,10E+07	3,70E+06
P6	9,10E+07	3,50E+08	1,20E+08	1,30E+08	3,70E+07
P9	3,80E+06	2,20E+08	6,60E+07	4,60E+07	5,10E+07
P12	1,70E+08	3,60E+08	1,50E+08	1,90E+08	6,20E+07

Os gráficos de Pareto de cada resposta foram obtidos no software TIBCO® *Statistica* 10 e estão apresentados na **Figura 64**. Aqueles fatores cujos valores são superiores a 2,31 ($p=0,05$) – localizados a direita da linha vermelha- são considerados significativos, enquanto os inferiores, a esquerda da linha vermelha, são estatisticamente insignificativos.

Figura 64 - Gráficos de Pareto dos efeitos padronizados (resposta: intensidade dos picos) obtidos através do software TIBCO® Statistica 10.

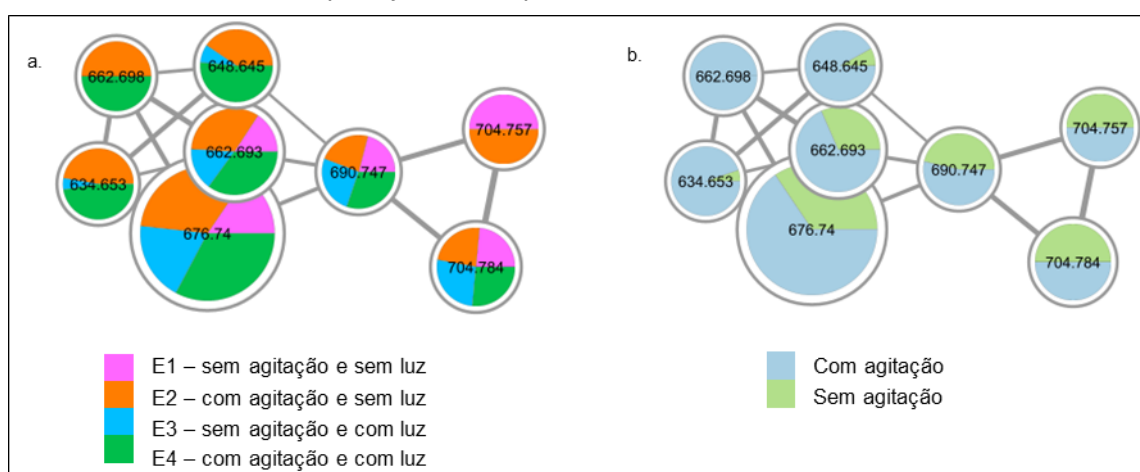


O efeito agitação se mostrou estatisticamente significativo na intensidade dos picos de ácido fusárico (AF), beauvericina (BEA), eniatinas A1 (ENA1) e B1 (ENB1). Os valores positivos indicam que quando o sistema estava sob agitação houve um aumento de intensidade dos picos, e consequentemente um aumento da concentração da substância no extrato, sendo que a intensidade está relacionada a concentração “relativa” da substância. A luminosidade e a interação entre os fatores não se mostraram estatisticamente significativos nas respostas avaliadas.

Para visualizar graficamente a influência da agitação na produção de BEA e das ENs, os dados foram submetidos ao GNPS e uma rede molecular foi construída utilizando o *Cytoscape* 3.9.0. Os *clusters* referentes as substâncias estudadas foram coloridas levando em consideração os diferentes ensaios e os experimentos realizados com e sem agitação.

Para a visualização da influência da agitação na produção das eniatinas foi escolhido o *cluster* $[M+Na]^+$ representado abaixo na **Figura 65**. Temos que as ENs A1 (m/z 690), B1 (m/z 676) e C (m/z 704,784) foram produzidas em todos os ensaios (**Figura 65a**). E a partir da análise da **Figura 65b** é possível concluir que nos experimentos realizados sob agitação houve uma produção maior dessas substâncias.

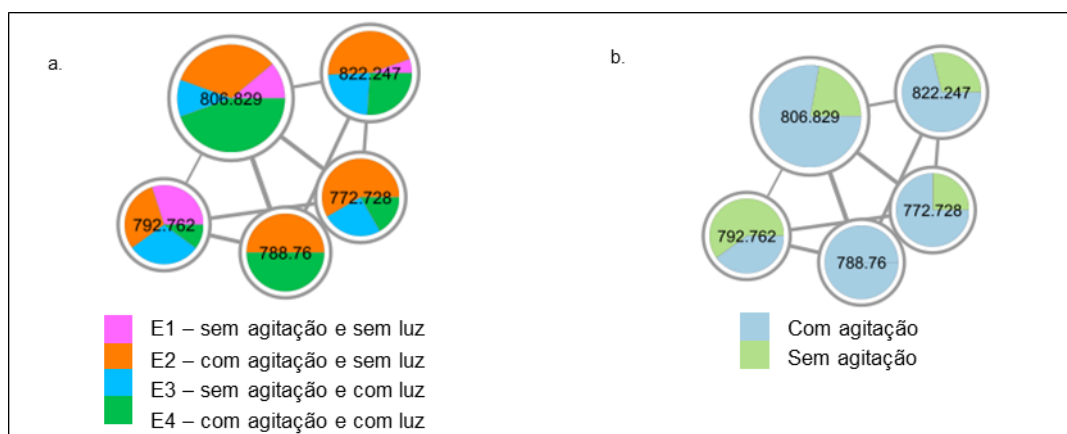
Figura 65 - *Cluster* das eniatinas, aduto $[M+Na]^+$, nos diferentes ensaios do planejamento experimental.



Ademais, as ENs de íons precursores $[M+Na]^+$ m/z 648 e 634 foram observadas em todos os experimentos, exceto naqueles sem agitação e exposição à luz, além de terem sido produzidas majoritariamente nos experimentos sob agitação. A eniatina $[M+Na]^+$ m/z 704,757, que foi produzida apenas nos experimentos sem exposição à luz, foi identificada como sendo a eniatina MK (27), que inicialmente foi observada apenas nos extratos de malte.

A BEA foi produzida em todos os experimentos realizados (**Figura 66a**), e a sua produção foi maior naqueles realizados sob agitação (**Figura 66b**). Diferentemente do que ocorre com os demais, o análogo $[M+Na]^+$ m/z 792, foi produzido, predominantemente, nos ensaios sem agitação, enquanto o análogo $[M+Na]^+$ m/z 788 foi produzido exclusivamente nos ensaios sob agitação.

Figura 66 - Cluster da beauvericina e análogos, aduto $[M+Na]^+$, nos diferentes ensaios do planejamento experimental.



Considerando todos os fatores, os modelos estatísticos representados pelo planejamento fatorial, que teve como respostas as intensidades dos picos de AF (**Eq. 1**), BEA (**Eq. 2**), ENA1 (**Eq. 3**) e ENB1 (**Eq. 4**) são demonstrados abaixo, onde nas equações a agitação é representada pela letra A, a exposição à luz pela letra B e a interação dos fatores por AB.

$$AF = 4,76 \times 10^7 + 8,85 \times 10^7 A + 1,28 \times 10^7 B + 1,22 \times 10^7 AB \quad \text{Eq. 1}$$

$$BEA = 41,77 \times 10^8 + 1,42 \times 10^8 A + 4,50 \times 10^6 B - 4,12 \times 10^7 AB \quad \text{Eq. 2}$$

$$ENA1 = 5,69 \times 10^7 + 6,05 \times 10^7 A + 1,98 \times 10^7 B + 9,83 \times 10^6 AB \quad \text{Eq. 3}$$

$$ENB1 = 6,79 \times 10^7 + 9,73 \times 10^7 A + 2,17 \times 10^7 B + 1,46 \times 10^7 AB \quad \text{Eq. 4}$$

O modelo linear foi validado estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) com teste F (**Apêndice 21-24**). Os efeitos cujo valores p são menores que 0,05, ou seja, são estatisticamente significantes são considerados na regressão, enquanto aquelas com valores maiores são adicionados a “falta de ajuste”.

Comparando as médias quadráticas por um teste F , temos que para que exista uma relação linear entre as variáveis, o valor de $F_{\text{calculado}}$ deve ser ao menos cinco vezes maior que o F_{tabelado} , e dentre as condições investigadas, nenhuma das respostas obteve esse resultado, mostrando que a relação linear não é significativa. Estes resultados indicam que apesar do parâmetro agitação ser significativo, é necessário realizar uma otimização dos valores escolhidos.

4.9. Curva de crescimento

O crescimento de microrganismos é descrito por uma curva caracterizada por quatro fases: latência (lag), exponencial (log), estacionária e por fim, morte. Na fase de latência o microrganismo está se adaptando ao meio ao qual foi inserido, e é influenciada pelos parâmetros físicos como pH, oxigenação, composição do meio, dentre outros. Após o período de adaptação, ou seja, quando os microrganismos encontram as condições propícias para sua reprodução, ocorre a fase logarítmica (exponencial), que é dada pelo crescimento acelerado das células. Nesta etapa ocorrerá um aumento populacional e consequentemente um esgotamento dos nutrientes, o que leva a fase estacionária, onde as células mais velhas e mais resistentes estão presentes e por fim a fase de destruição^{62,63}.

A linhagem fúngica S.S_R10 foi crescida pelo período de 35 dias em meio de cultura líquido de czapek, sendo que a cada cinco dias foram retirados 3 erlenmeyers ao acaso para extração do micélio e caldo. As massas secas dos micélios (**Figura 67**) são demonstradas na **Tabela 15**.

Figura 67 - Crescimento micelial de S.S_R10 em meio de czapek nos diferentes dias.

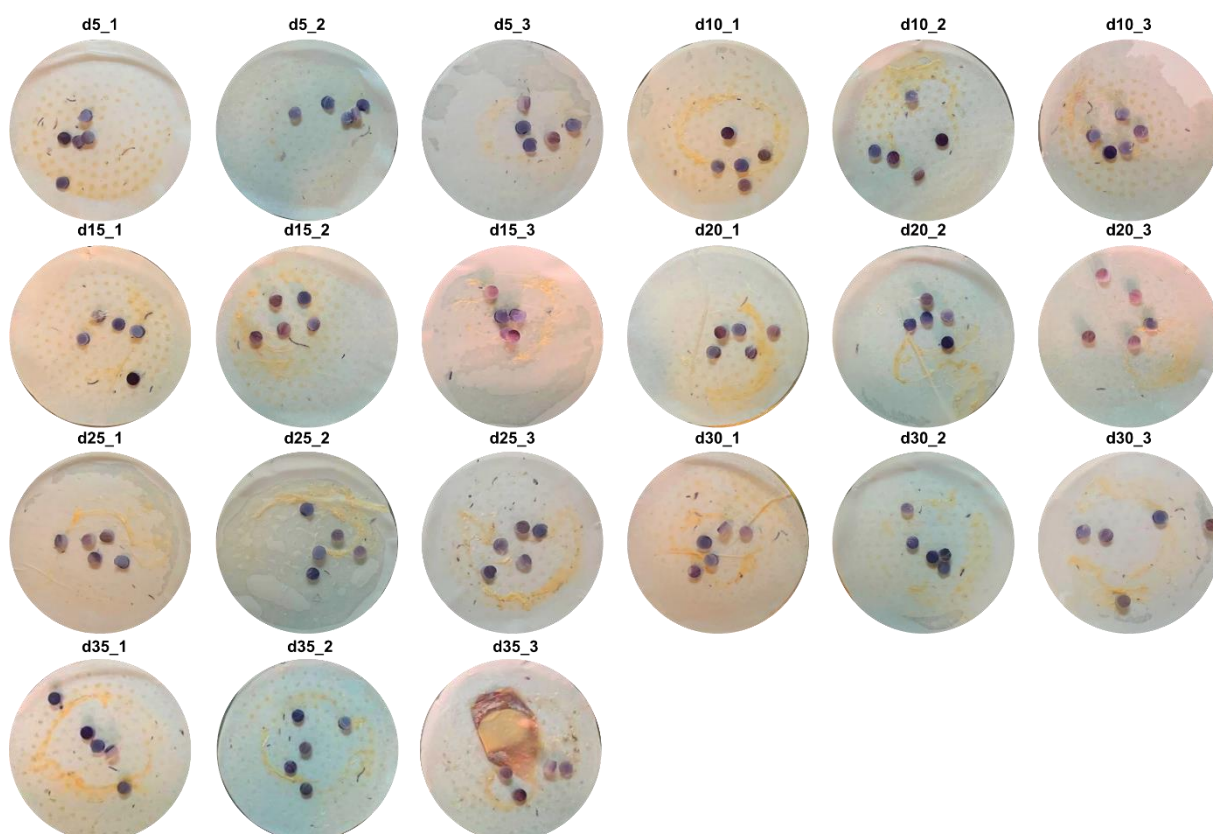


Tabela 15 - Massas secas miceliais, em mg, obtidas nos diferentes dias de extração.

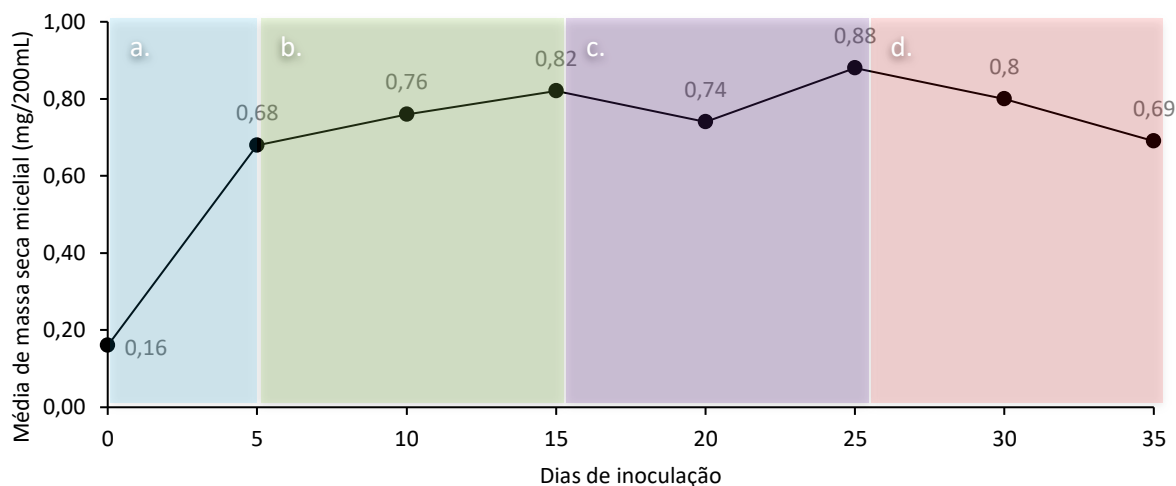
Dias	Massa seca de micélio (mg)			Massa média (mg)
0	32,20	30,10	30,80	31,03
5	120,90	140,70	144,30	135,30
10	152,00	153,60	148,60	151,40
15	157,70	177,30	157,40	164,13
20	152,00	148,50	140,70	147,07
25	171,40	177,90	179,80	176,37
30	166,30	149,70	166,90	160,97
35	140,50	135,50	291,70*	189,23

(*desconsiderado no cálculo da média)

Uma curva de crescimento (**Figura 68**), de dias de inoculação versus média de massa seca micelial por quantidade de meio líquido (200 mL), foi construída a partir dos dados obtidos. Os valores do dia zero correspondem a massa inicial de fungo que foi inoculada em meio líquido. Em cinco dias, o fungo cresceu em média 104,27 mg, sendo o período de maior crescimento, considerado a fase de latência de S.S_R10. (**Figura 68, a.**). No período de 5 a 15 dias (**Figura 68, b.**), observou-se um aumento de massa micelial, caracterizado pela fase de crescimento. Em 20 dias (**Figura 68, c.**), a média de massa diminuiu, neste momento, já pode ter iniciado o esgotamento de nutrientes proveniente do meio e o fungo passou a consumir substâncias produzidas por ele mesmo, sendo que isso também pode explicar o aumento de massa em 25 dias. Por fim, no período de 25 a 30 dias (**Figura 68, d.**) começa a fase de destruição, onde notamos a diminuição de crescimento do micélio.

De acordo com a **Figura 68** e o valor de massa seca do micélio em 35 dias na triplicata d35_3, é possível concluir que houve um crescimento diferente quando comparado aos demais dias.

Figura 68 - Curva de crescimento, no período de 35 dias, da linhagem fúngica S.S_R10 em meio de czapek.



Os resultados foram ajustados, com o intuito de encontrar a função que melhor descreve a curva de crescimento de S.S_R10. Para isso utilizou-se o programa Origin® 9.0 da OriginLab, onde obteve-se as funções dos polinômios de 2° e 3° grau, com seus respectivos valores de R² ajustados (**Tabela 16**).

Tabela 16 - Polinômios da curva de crescimento e seus respectivos valores de R² e AICs obtidos através do Origin®.

Modelo matemático	R ² ajustado	AICs
$y = 0,28 + 0,05501x - 0,00126x^{2o}$	0,76	-17,61
$y = 0,21 + 0,08987x - 0,00392x^2 + 5,0707 \times 10^{-5}x^3$	0,81	-2,87

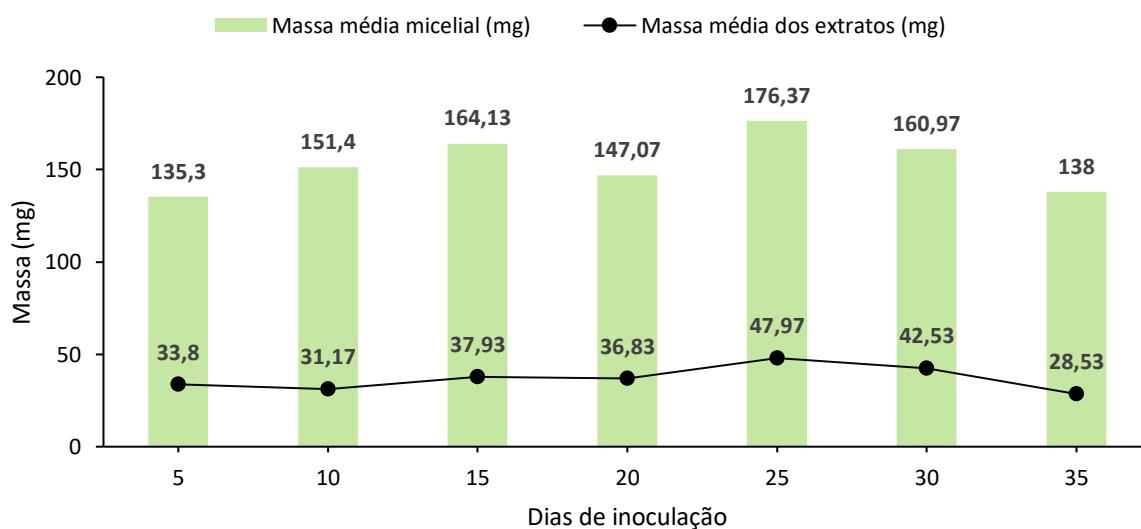
O critério de informação de Akaike (AIC) mensura a qualidade do modelo estatístico, e quanto menor este valor, menos informações foram perdidas, tornando-o melhor. Apesar do valor de R² ajustado ser mais próximo de 100% para o modelo polinomial de 3° grau, quando comparado com o polinomial de 2° grau pelo teste *F* e pelo AIC, temos que este último descreve melhor a curva de crescimento.

O filtrado foi utilizado para obtenção dos extratos brutos, a **Tabela 17** mostra os valores de massas obtidas para cada dia e suas respectivas triplicatas.

Tabela 17 - Massas dos extratos em mg obtidos da curva de crescimento.

Dias	Massa de extrato (mg)			Massa média (mg)
5	26,10	29,00	46,30	33,80
10	25,80	27,90	39,80	31,17
15	27,00	36,20	50,60	37,93
20	37,20	21,80	51,50	36,83
25	37,50	53,90	52,50	47,97
30	29,70	46,30	51,60	42,53
35	37,80	23,90	23,90	28,53

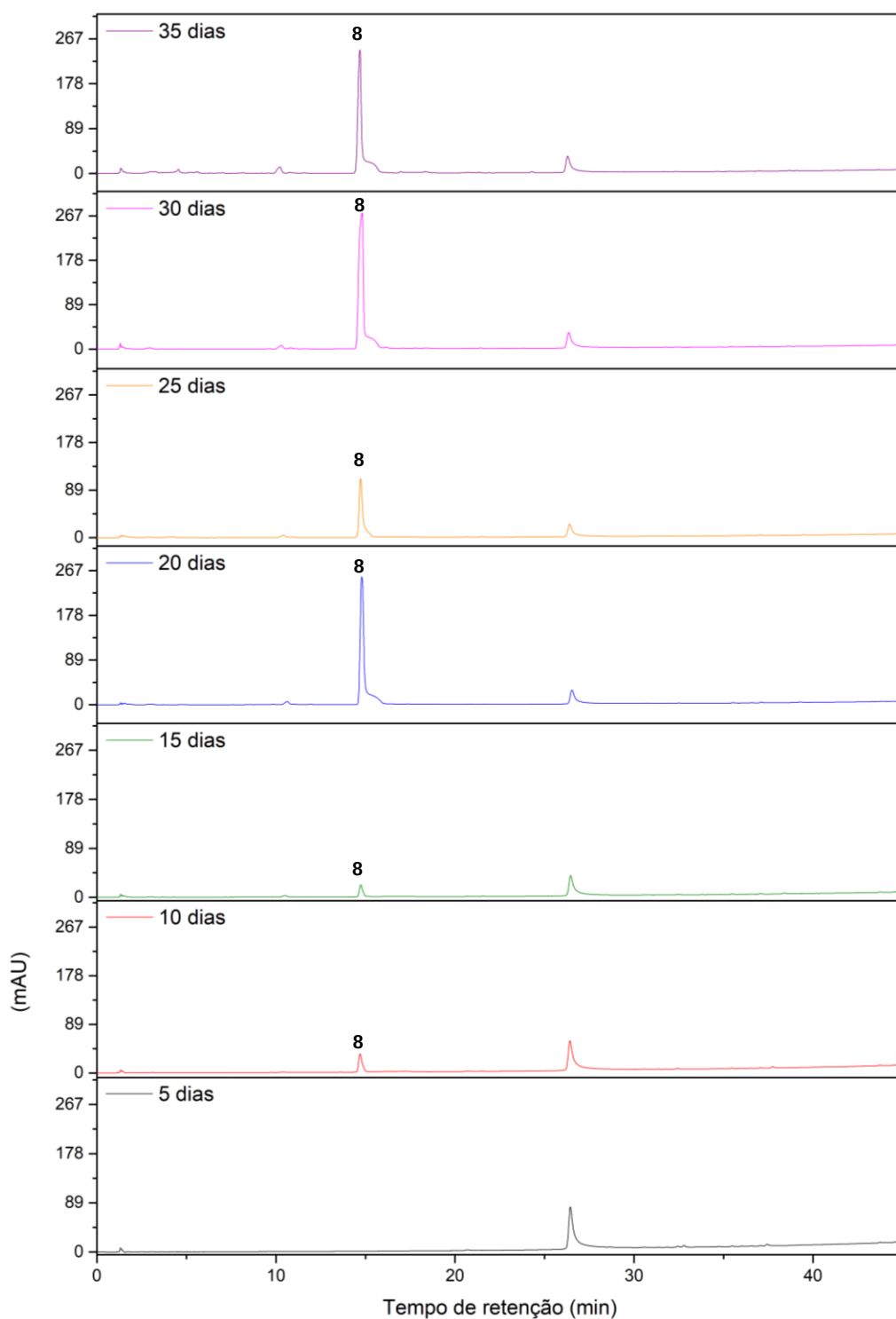
O maior rendimento médio de extrato foi observado em 25 dias de inoculação, seguido de 30 e 20 dias. Enquanto o menor rendimento foi em 35 dias. Correlacionando os valores médios de massa de extratos com os valores médios de massa seca de micélio (**Figura 69**), podemos observar que exceto pela variação de 5 a 10 dias, os gráficos possuem o mesmo comportamento, sendo que os maiores valores médio de massas foram obtidas em 25 dias.

Figura 69 - Gráfico de comparação dos valores médios de massa de extratos com os valores médios de massa seca de micélio (em mg).

Os extratos foram submetidos à HPLC-DAD e UPLQ-QTOF-MS para avaliar se houve variação na produção de metabólitos nos diferentes dias. Cromatogramas representativos, obtidos por HPLC-DAD, de cada dia foram escolhidos e estão apresentados na **Figura 70**. Nesta análise é possível observar a produção de ácido fusárico (**8**) nos diferentes dias.

Em 5 dias não houve produção metabólica, os sinais observados estão presentes no branco de Czapek. A partir de 10 dias ainda é possível observar sinais referentes ao branco e o início da produção de ácido fusárico (**8**) em $t_r \approx 14$ min. Em 15 dias houve um ligeiro aumento na intensidade do pico, e em 20 dias a produção aumentou significativamente. Já em 25 dias observou-se uma queda da produção, que pode ser devido a um estresse ou consumo desta substância. E por fim, apesar de ser considerada a fase de destruição, o período de 30 a 35 dias foi marcado por um aumento da produção desta substância, sendo que a maior produção foi observada em 30 dias.

Figura 70 - Perfil cromatográfico obtido por HPLC-DAD dos extratos da curva de crescimento em $\lambda = 254$ nm.



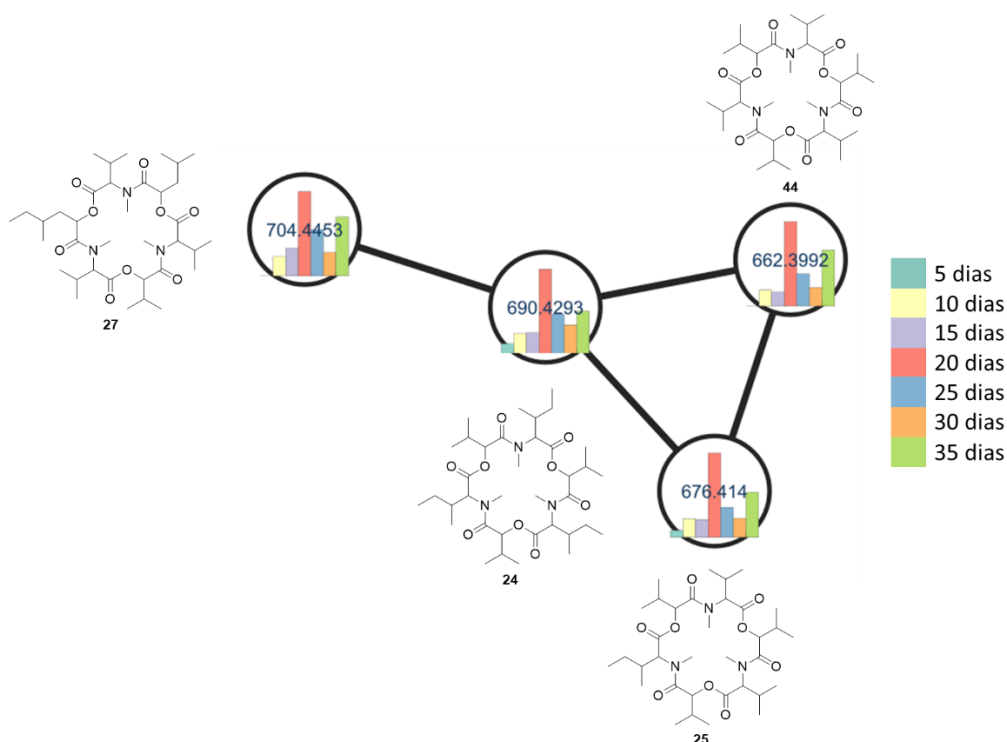
Como a beauvericina (**23**) e as eniatinas (**24-27**) são detectadas em valores menores de comprimento de onda, entre $\lambda = 192$ e 209 nm, não foi possível observá-

las nos cromatogramas apresentados na **Figura 70**. Para estudar a produção destas micotoxinas, os dados obtidos por UPLC-QTOF-MS/MS foram submetidos a um pré-tratamento no programa MZmine e a um workflow na plataforma GNPS, como descrito no item 3.2.6.

Para a discussão a visualização da rede molecular pelo programa *Cytoscape* 3.9;0 foi modificada, ao invés de utilizar gráficos de setores, optou-se por um gráfico de barras. No gráfico, as barras representam os diferentes dias e a altura de cada barra é proporcional a intensidade dos picos.

Na **Figura 71** é apresentado o cluster das eniatinas A1 (**24**), B (**44**), B1 (**25**) e MK (**27**). A análise dos gráficos de barras, nos permite concluir que a produção máxima das eniatinas ocorreu em 20 dias. A produção das ENB e ENMK, quando comparadas com as demais, foram inexpressivas em 5 dias. Com exceção da ENB, que decresce de 10 a 15 dias, é possível observar que houve um aumento da intensidade dos picos neste período. Após a máxima de 20 dias, as intensidades decrescem até 30 dias e em 35 dias é possível observar um grande aumento.

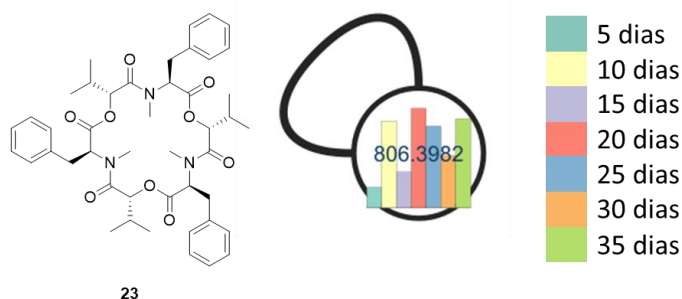
Figura 71 - Cluster das eniatinas $[M+Na]^+$ obtidos pelo GNPS para os dados de UPLC-QTOF-MS/MS.



Relacionando estes dados com os dados da curva de crescimento, temos que em 20 e 35 dias teve-se uma diminuição de massa micelial e um aumento de produção das eniatinas, portanto, estas substâncias podem ter sua produção associada a mecanismos de defesas contra possíveis estresses.

O nodo observado da beauvericina (**23**) (**Figura 72**), demonstra que esta substância foi produzida em todos os dias. Similar as ENs, a maior produção de BEA foi observada em 20 dias. Ao comparar a produção de BEA nos extratos de 5 e 10 dias, temos um aumento da intensidade do pico, seguido de uma diminuição em 15 dias. Nota-se que no período de 20 a 30 dias, a produção de BEA caiu gradativamente, e em 35 dias aumentou.

Figura 72 - Nodo da beauvericina $[M+Na]^+$ obtidos pelo GNPS para os dados de UPLC-QTOF-MS/MS.



Assim como na curva de crescimento, ao analisar os extratos de 5 e 10 dias, é possível concluir que houve uma fase de crescimento, em que a produção da BEA teve um grande aumento. E novamente, igual as ENs, a BEA teve um aumento na produção em 20 e 35 dias, que na curva de crescimento apresentaram diminuição da massa micelial.

5. CONCLUSÃO

A variação de fonte de nutrientes para as linhagens fúngicas deste trabalho levaram a diferentes produções metabólicas. Dentre os meios estudados, o meio de malte e PDB se destacaram não somente pela produção de diferentes substâncias como naftoquinonas e derivados de jasmonatos, mas também pela atividade antibactericida constada para bactérias gram-positivas. As atividades biológicas observadas para ambos podem estar relacionadas com as diferentes substâncias produzidas ou pela sinergia de todo o extrato.

Na análise qualitativa dos extratos utilizando ferramentas como o UNIFI e GNPS, foram anotadas 45 substâncias, que variaram em diferentes classes. Estas ferramentas auxiliaram na identificação destes metabólitos, se mostrando promissoras nas análises de extratos complexos, sem o uso excessivo de extratos e solventes. Das anotações, destaca-se os depsipeptídeos cíclicos, que apesar de serem consideradas toxinas emergentes, também têm sido estudadas quanto a suas atividades biológicas.

A OSMAC também se mostrou uma ferramenta promissora na obtenção de substâncias. Na análise da produção metabólica nos diferentes meios de cultivos, observou-se que determinadas substâncias foram produzidas apenas em determinados meios, como as naftoquinonas, produzidas majoritariamente pela linhagem fúngica S.S_R13 em meio de malte. Nos resultados do planejamento experimental, observamos que ao introduzirmos a variável agitação no cultivo do fungo S.S_R10 as intensidades dos picos das micotoxinas aumentam. Logo, a utilização da OSMAC demonstra como a linhagem fúngica responde, produzindo diferentes metabólitos, à diferentes condições.

A construção da curva de crescimento possibilitou observar como a linhagem fúngica S.S_R10 varia seu crescimento e sua produção metabólica a cada cinco dias. No crescimento micelial, é possível concluir que o S.S_R10 segue o crescimento previsto para microrganismos e que o aumento da produção de micotoxinas podem estar associadas a estresses vivenciados pelo fungo.

Os depsipeptídeos cíclicos, identificados na curva de crescimento, possuem atividades fitotóxicas, antifúngicas e inseticidas. Estas atividades indicam que estas substâncias são produzidas como mecanismo de defesa do fungo endofítico.

Portanto, o estresse causado pela escassez de nutrientes em 35 dias, por exemplo, na fase de destruição do fungo, leva a uma produção maior destas substâncias como um possível mecanismo de defesa da mesma.

Por fim, a integração dos dados obtidos por técnicas analíticas, como LCMS, com a bioinformática, auxiliou a interpretação dos extensivos dados, visto que estas ferramentas organizaram e permitiram que as informações sejam visualizadas de diferentes formas, como no caso das redes moleculares, além de promover a integração da comunidade científica, pois os bancos de dados espectrais podem ser compartilhados entre diferentes grupos de pesquisas.

REFERÊNCIAS

1. 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**.
2. PINTO, A. C. *et al.* Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, **2002**.
3. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670–3695, **2013**.
4. BERNARDINI, S.; TIEZZI, A.; LAGHEZZA MASCI, V.; OVIDI, E. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. **Natural Product Research**, v. 32 (16), p. 1926–1950, **2018**.
5. CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Endophytic fungi: An unexplored and sustainable source of new and bioactive natural products. **Revista Virtual de Quimica**, p. 421–437, **2013**.
6. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v.83, p. 770–803, **2020**.
7. NISA, H. *et al.* Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 82, p. 50–59, **2015**.
8. PATIL, R. H.; PATIL, M. P.; MAHESHWARI, V. L. Bioactive Secondary Metabolites From Endophytic Fungi: A Review of Biotechnological Production and Their Potential Applications. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 49, p. 189–205, **2016**.
9. SPECIAN, V. *et al.* Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **Journal of Health Sciences**, v. 16, p. 341-351, **2014**.
10. JOTHY, S. L. *et al.* *Cassia spectabilis* (DC) Irwin et Barn: A Promising Traditional Herb in Health Improvement. **Molecules**, v. 17, p. 10292–10305, **2012**.

11. NEVES, A. M. *et al.* Chemical Characterization and the Antimicrobial Potential of Species of the Genus *Senna* Mill. (Fabaceae). **Revista Virtual de Química**, v. 9, p. 2506–2538, **2017**.
12. SELEGATO, D. *et al.* Update: Biological and Chemical Aspects of *Senna spectabilis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 3, p. 415-426, **2016**.
13. CHAPLA, V. M. *et al.* Bioactive Secondary Metabolites from *Phomopsis* sp., an Endophytic Fungus from *Senna spectabilis*. **Molecules**, v. 19, p. 6597–6608, **2014**.
14. SILVA, G. H. *et al.* New bioactive metabolites produced by *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus in *Cassia spectabilis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1463–1466, **2005**.
15. LI, M. *et al.* *Fusarium*: A treasure trove of bioactive secondary metabolites. **Natural Product Reports**, v. 37, p. 1568–1588, **2020**.
16. WEI, J.; WU, B. Chemistry and bioactivities of secondary metabolites from the genus *Fusarium*. **Fitoterapia**, v. 146, **2020**.
17. TOGHUEO, R. M. K. Bioprospecting endophytic fungi from *Fusarium* genus as sources of bioactive metabolites. **Mycology**, v. 11, p. 1–21, **2020**.
18. MUNKVOLD, G. P. *Fusarium* species and their associated mycotoxins. **Methods in Molecular Biology**, v. 1542, p. 51–106, **2017**.
19. HEWAGE, R. T. *et al.* One strain-many compounds (OSMAC) method for production of polyketides, azaphilones, and an isochromanone using the endophytic fungus *Dothideomycete* sp. **Phytochemistry**, v. 108, p. 87–94, **2014**.
20. PAN, R., *et al.* Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: A literature review. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 294, **2019**.
21. VANDERMOLEN, K. M. *et al.* Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. **AMB express**, v. 3, p. 1-7, **2013**.

22. CANUTO, G. A. B. *et al.* Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, p. 75–91, **2018**.
23. PILON, A. C. *et al.* Plant metabolomics: Methods and challenges. **Química Nova**, v. 43, p. 329–354, **2020**.
24. DEMARQUE, D. P. *et al.* Mass spectrometry-based metabolomics approach in the isolation of bioactive natural products. **Scientific Reports**, v. 10, p. 1-9, **2020**.
25. TAWFIKE, A. F.; VIEGELMANN, C.; EDRADA-EBEL, R. Metabolomics and dereplication strategies in natural products. **Methods in Molecular Biology**, v. 1055, p. 227–244, **2013**.
26. TANG, H.; XIAO, C.; WANG, Y. Important roles of the hyphenated HPLC-DAD-MS-SPE-NMR technique in metabonomics. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 47, p. S157-S162, **2009**.
27. SALEM, M. A. *et al.* Metabolomics in the context of plant natural products research: From sample preparation to metabolite analysis. **Metabolites**, v. 10, **2020**.
28. PILON, A. C. *et al.* Molecular networks: An analysis on annotations and discovery of new assets. **Química Nova**, v. 44, p. 1168–1179, **2021**.
29. FUNARI, C. S. *et al.* Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, v. 36, p. 1605-1609, **2013**.
30. WANG, M. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, p. 828–837, **2016**.
31. ARON, A. T. *et al.* Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. **Nature Protocols**, v. 15, p. 1954–1991, **2020**.
32. QUINN, R. A. *et al.* Molecular Networking as a Drug Discovery, Drug Metabolism, and Precision Medicine Strategy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, p. 143–154, **2017**.

33. YANG, J. Y. *et al.* Molecular networking as a dereplication strategy. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 1686–1699, **2013**.
34. PLUMB, R. S. *et al.* UPLC/MS^E; a new approach for generating molecular fragment information for biomarker structure elucidation. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, p. 1989–1994, **2006**.
35. VIEIRA, N. C.; CORTELO, P. C.; CASTRO-GAMBOA, I. Rapid qualitative profiling of metabolites presents in *Fusarium solani*, a rhizospheric fungus derived from *Senna spectabilis*, using GC/MS and UPLC-QTOF/MSE techniques assisted by UNIFI information system. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 26, p. 281–291, **2020**.
36. DE 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**.
37. VANZOLINI, K. L. *et al.* Acetylcholinesterase Immobilized Capillary Reactors–Tandem Mass Spectrometry: An On-Flow Tool for Ligand Screening. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, p. 2038–2044, **2013**.
38. VILELA, A. F. L. *et al.* An improved immobilized enzyme reactor-mass spectrometry-based label free assay for butyrylcholinesterase ligand screening. **Analytical Biochemistry**, v. 549, p. 53–57, **2018**.
39. SEIDL, C. *et al.* A novel on-flow mass spectrometry-based dual enzyme assay. **Analytica Chimica Acta**, v. 1072, p. 81–86, **2019**.
40. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests For Bacteria That Grow aerobically; Approved standard, 10th Edition. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; **2015**.
41. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. In: 23th Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, **2013**.
42. PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 864–870, **2004**.

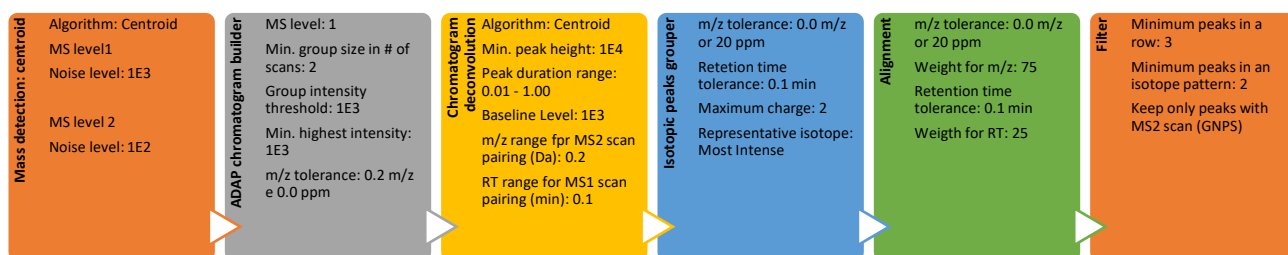
43. IBRAHIM, S. R. M., et al. Bright Side of *Fusarium oxysporum*: Secondary Metabolites Bioactivities and Industrial Relevance in Biotechnology and Nanotechnology. **Journal of Fungi**, v. 7, p. 943, **2021**.
44. NOTHIAS L. F. et al. Feature-based Molecular Networking in the GNPS Analysis Environment. **Nature Methods**, v. 17, p. 905-908, **2020**.
45. PLUSKAL, T.; CASTILLO, S.; VILLAR-BRIONES, A.; OREŠIČ, M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, p. 395, **2010**.
46. EDEL-HERMANN, V.; LECOMTE, C. Current Status of *Fusarium oxysporum* *Formae Speciales* and Races. **Phytopathology**, v. 109, p. 512–530, **2019**.
47. JAYASINGHE, L. et al. *N* -Methyl-4-hydroxy-2-pyridinone Analogues from *Fusarium oxysporum*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 439–442, **2006**.
48. LI, L. N. et al. Discovery and Characterization of 4-Hydroxy-2-pyridone Derivative Sambutoxin as a Potent and Promising Anticancer Drug Candidate: Activity and Molecular Mechanism. **Molecular Pharmaceutics**, v. 15, p. 4898–4911, **2018**.
49. PHILLIPS, N. J. et al. Characterization of the *Fusarium* toxin equisetin: the use of phenylboronates in structure assignment. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, p. 8223–8231, **1989**.
50. WU, Q. et al. A Review on the Synthesis and Bioactivity Aspects of Beauvericin, a *Fusarium* Mycotoxin. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. 1338, **2018**.
51. HU, L.; RYCHLIK, M. Biosynthesis of ¹⁵ N₃ -Labeled Enniatins and Beauvericin and Their Application to Stable Isotope Dilution Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7129–7136, **2012**.
52. SONG, H. H. et al. Structural analysis of enniatin H, I, and MK1688 and beauvericin by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and their production by *Fusarium oxysporum* KFCC 11363P. **Food Additives & Contaminants**, v. part A 26, p. 518–526, **2009**.

53. 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**.
54. WILLIAMS, S. M.; BRODBELT, J. S. MSⁿ characterization of protonated cyclic peptides and metal complexes. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 15, p. 1039–1054, **2004**.
55. MIERSCH, O.; BOHLMANN, H.; WASTERNAK, C. Jasmonates and related compounds from *Fusarium oxysporum*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 517–523, **1999**.
56. LIU, Z. Y. *et al.* Fragmentation study of five trichothecenes using electrospray hybrid ion trap/time-of-flight mass spectrometry with accurate mass measurements. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 309, p. 133–140, **2012**.
57. SEWRAM, V. *et al.* Production of Fumonisin B and C Analogues by Several *Fusarium* Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4861–4866, **2005**.
58. SIMONS, R. *et al.* Identification of prenylated pterocarpan and other isoflavonoids in *Rhizopus* spp. elicited soya bean seedlings by electrospray ionisation mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 25, p. 55–65, **2011**.
59. SONG, H. H., *et al.* Diversity in Beauvericin and Enniatins H, I, and MK1688 by *Fusarium oxysporum* isolated from potato. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, p. 296–301, **2008**.
60. URBANIAK, M.; WASKIEWICZ, A.; STEPIEN, Ł. *Fusarium* cyclodepsipeptide mycotoxins: Chemistry, biosynthesis, and occurrence. **Toxins**, v. 12, p. 765, **2020**.
61. VIEIRA, R., *et al.* Induction of metabolic variability of the endophytic fungus *Xylaria* sp. by OSMAC approach and experimental design. **Archives of Microbiology**, v. 203, p. 3025–3032, **2021**.

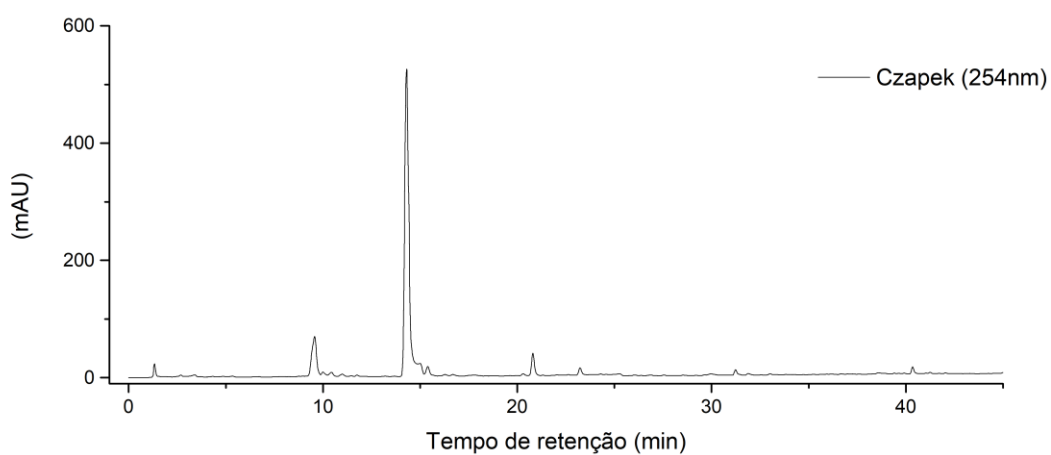
62. MELGAR, G. Z. *et al.* Growth Curves of Filamentous Fungi for Utilization in Biocatalytic Reduction of Cyclohexanone. **Global Journal of Science Frontier Research Chemistry**, v. 13, **2013**.
63. CARDOSO, E. R.; CARLOSASSIS, L.; NAHAS, E. Nutrição e crescimento do fungo nematófago *Arthrobotrys oligospora*. **Summa Phytopathologica**, vol. 35, p. 267-272, **2009**.

APÊNDICE

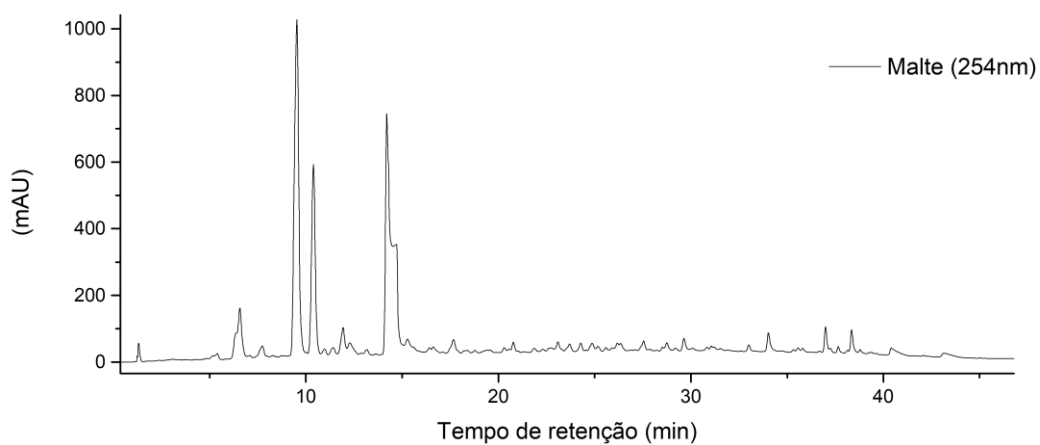
Apêndice 1 - Parâmetros utilizados no pré-processamento dos dados no MZmine 2.53.



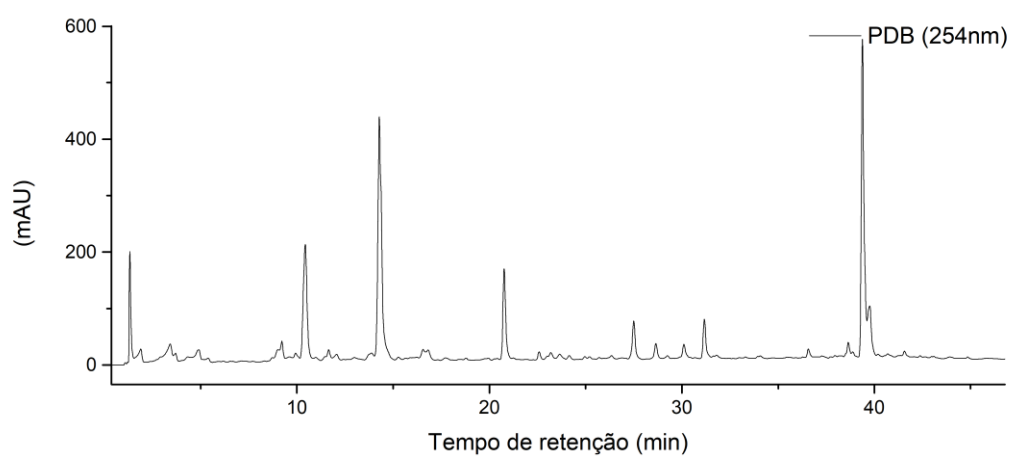
Apêndice 2 - Cromatograma HPLC-DAD do fungo S.S_R10 em meio de czapek ($\lambda = 254$ nm).



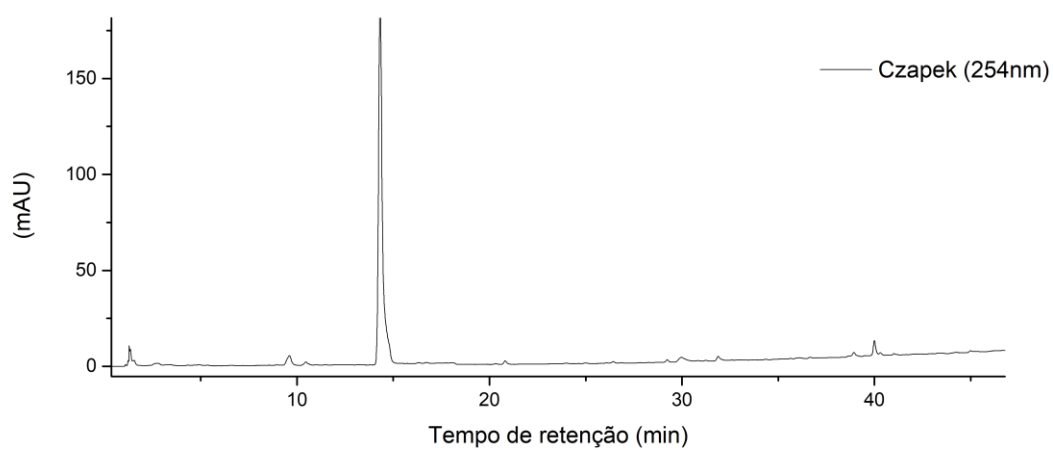
Apêndice 3 - Cromatograma HPLC-DAD do fungo S.S_R10 em meio de malte ($\lambda = 254$ nm).



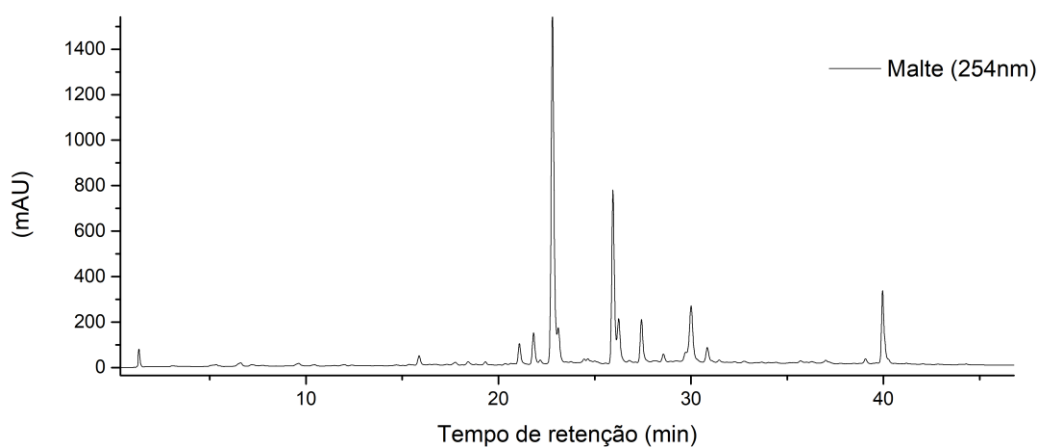
Apêndice 4 - Cromatograma HPLC-DAD do fungo S.S_R10 em meio de PDB ($\lambda = 254$ nm).



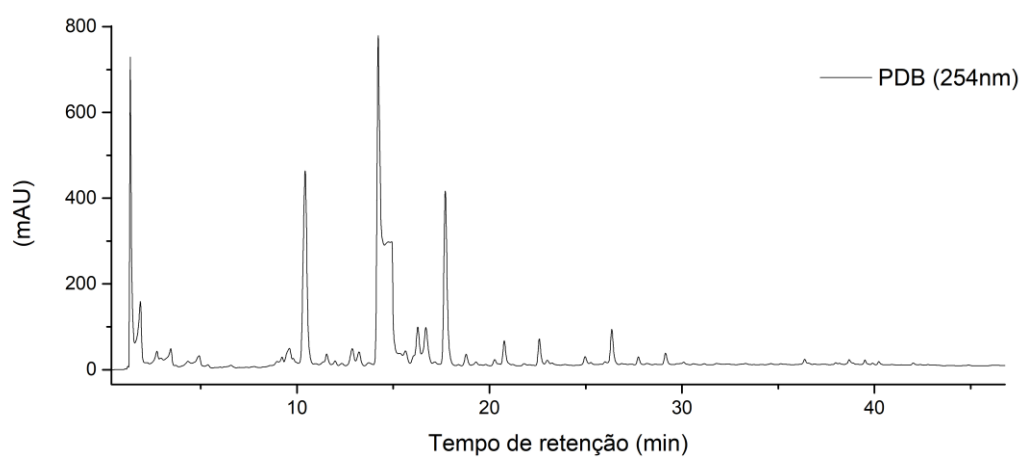
Apêndice 5 - Cromatograma HPLC-DAD do fungo S.S_R13 em meio de czapek ($\lambda = 254$ nm).



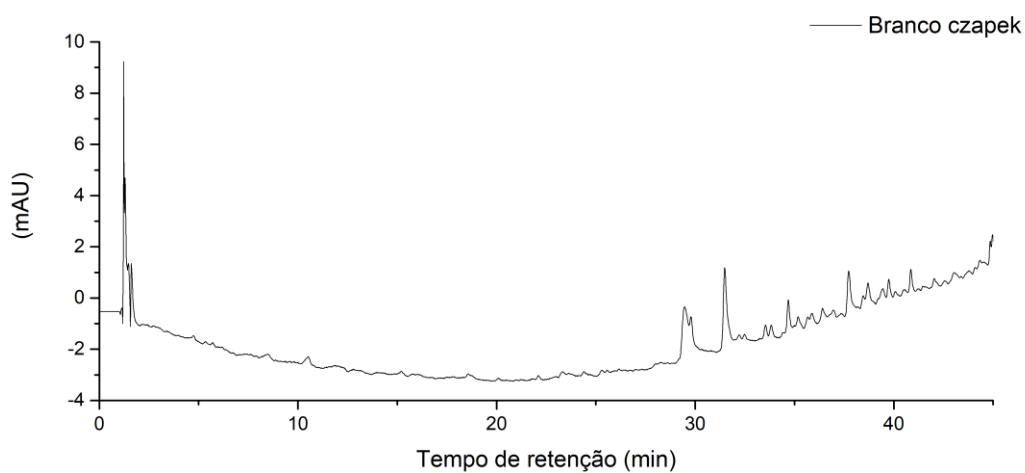
Apêndice 6 - Cromatograma HPLC-DAD do fungo S.S_R13 em meio de malte ($\lambda = 254$ nm).

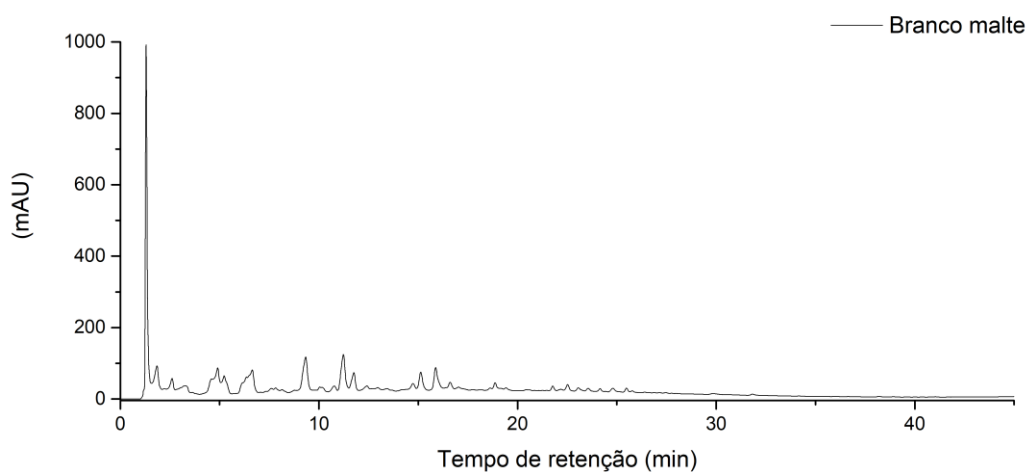
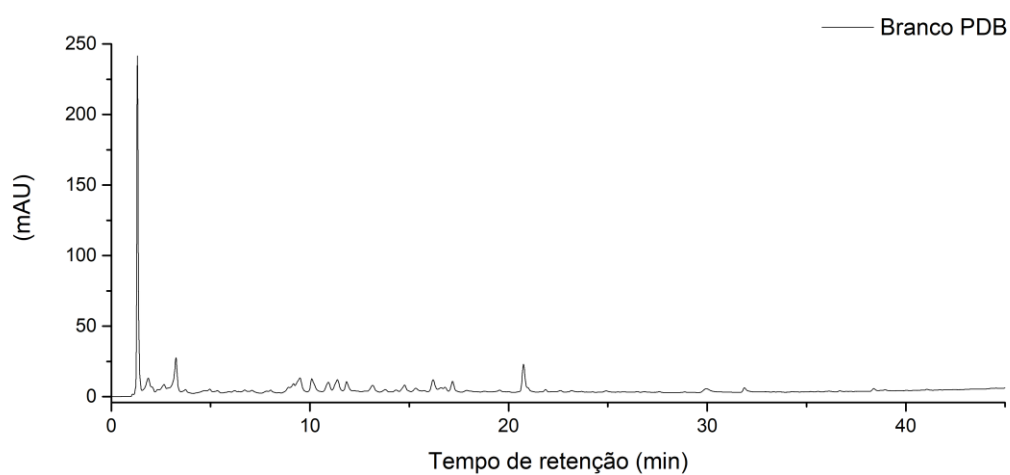


Apêndice 7 - Cromatograma HPLC-DAD do fungo S.S_R13 em meio de PDB ($\lambda = 254$ nm).



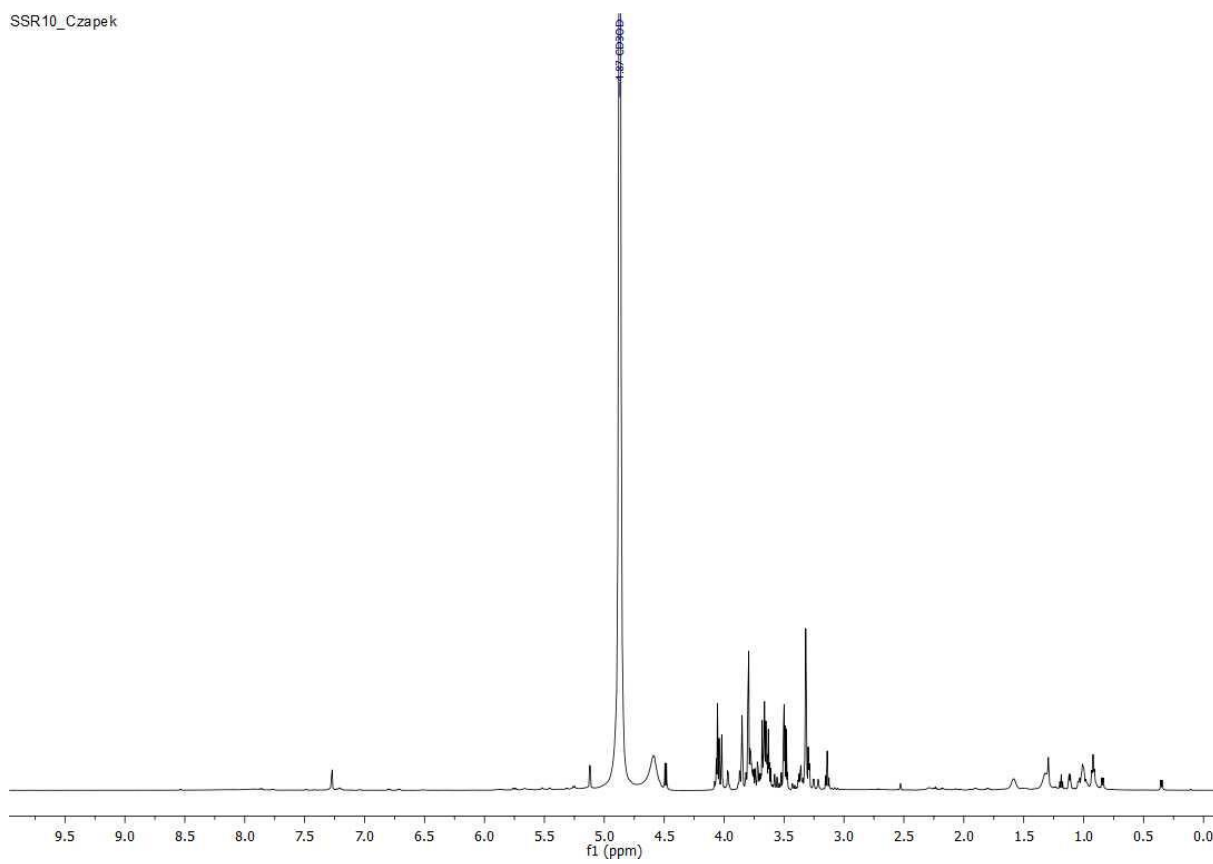
Apêndice 8 - Cromatograma HPLC-DAD do meio de cultivo de czapek ($\lambda = 254$ nm).



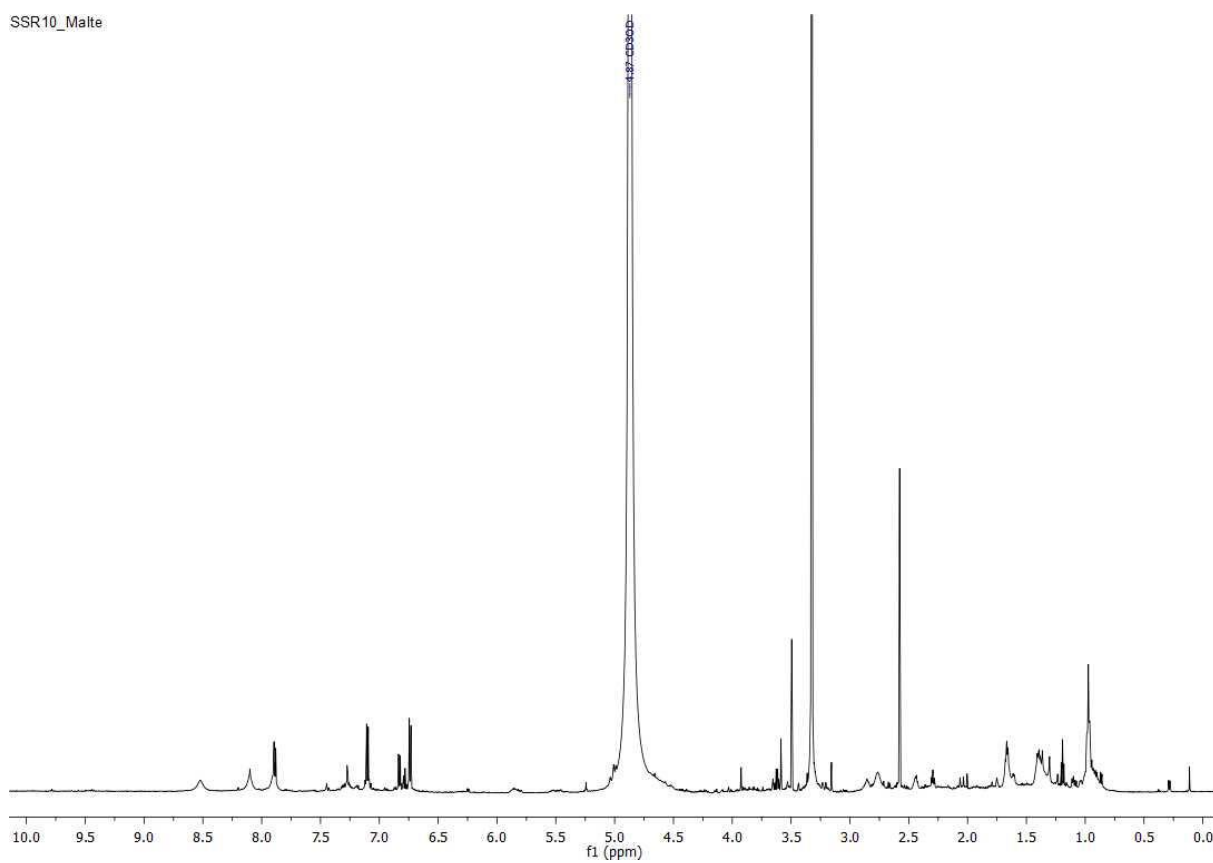
Apêndice 9 - Cromatograma HPLC-DAD do meio de cultivo de malte ($\lambda = 254$ nm).**Apêndice 10** - Cromatograma HPLC-DAD do meio de cultivo de PDB ($\lambda = 254$ nm).

Apêndice 11 - Espectro de RMN ^1H de S.S_R10C (CD_3OD , 600 MHz).

SSR10_Czapek

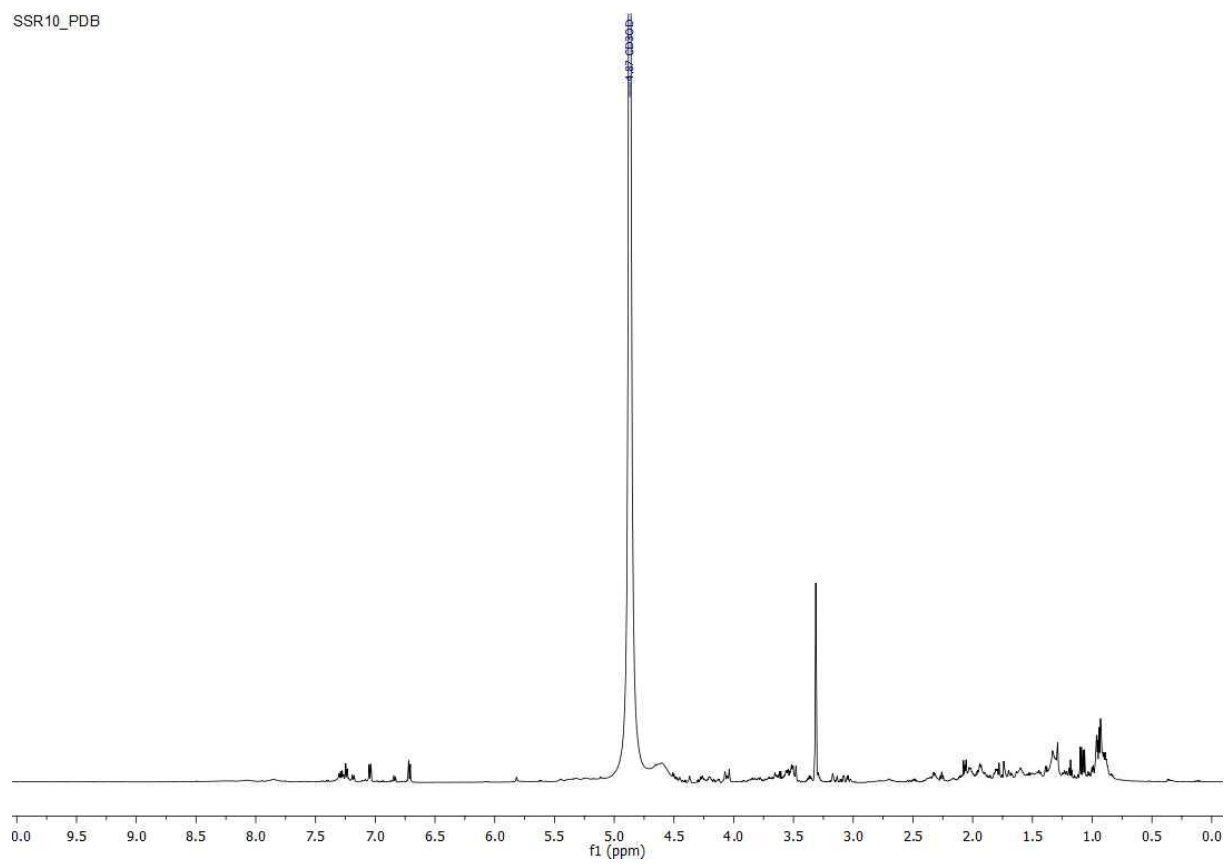
**Apêndice 12 - Espectro de RMN ^1H de S.S_R10M (CD_3OD , 600 MHz).**

SSR10_Malte

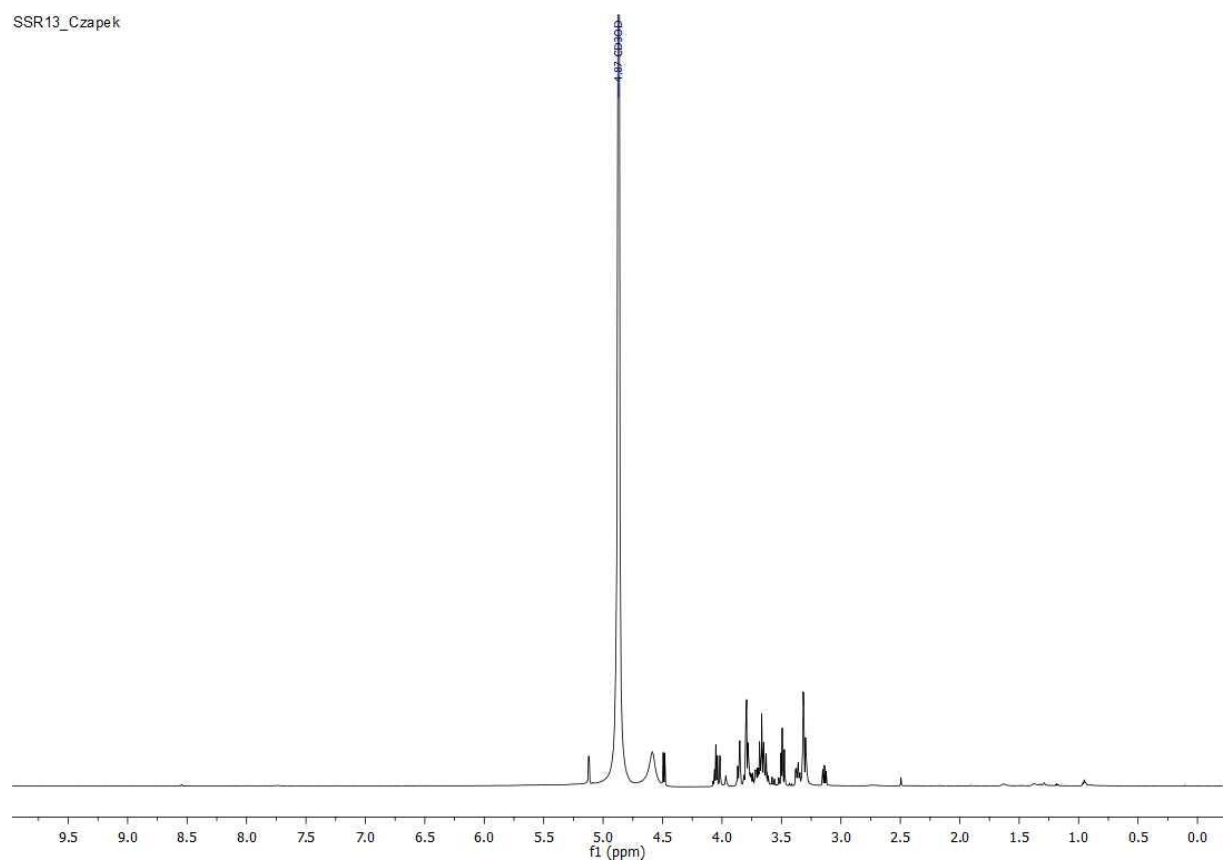


Apêndice 13 - Espectro de RMN ^1H de S.S_R10P (CD_3OD , 600 MHz).

SSR10_PDB

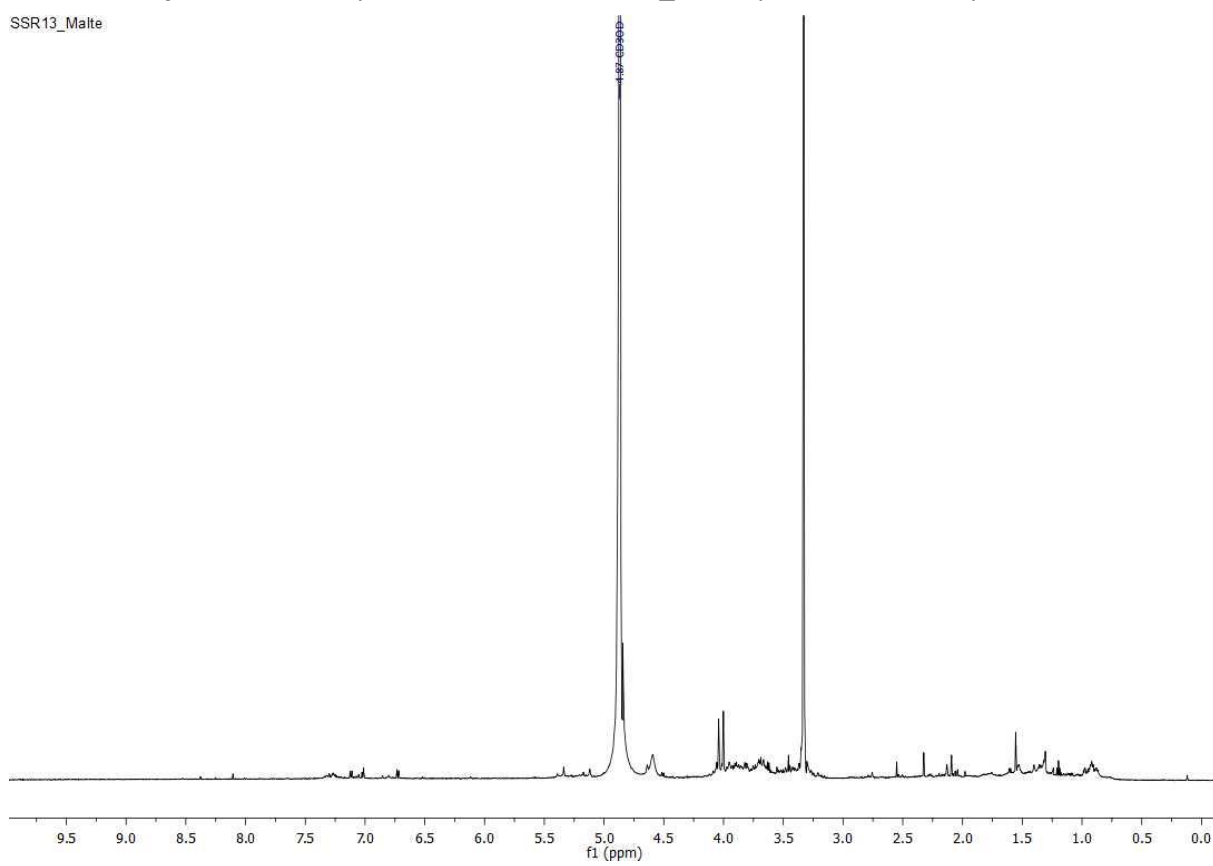
**Apêndice 14** - Espectro de RMN ^1H de S.S_R13C (CD_3OD , 600 MHz).

SSR13_Czapek

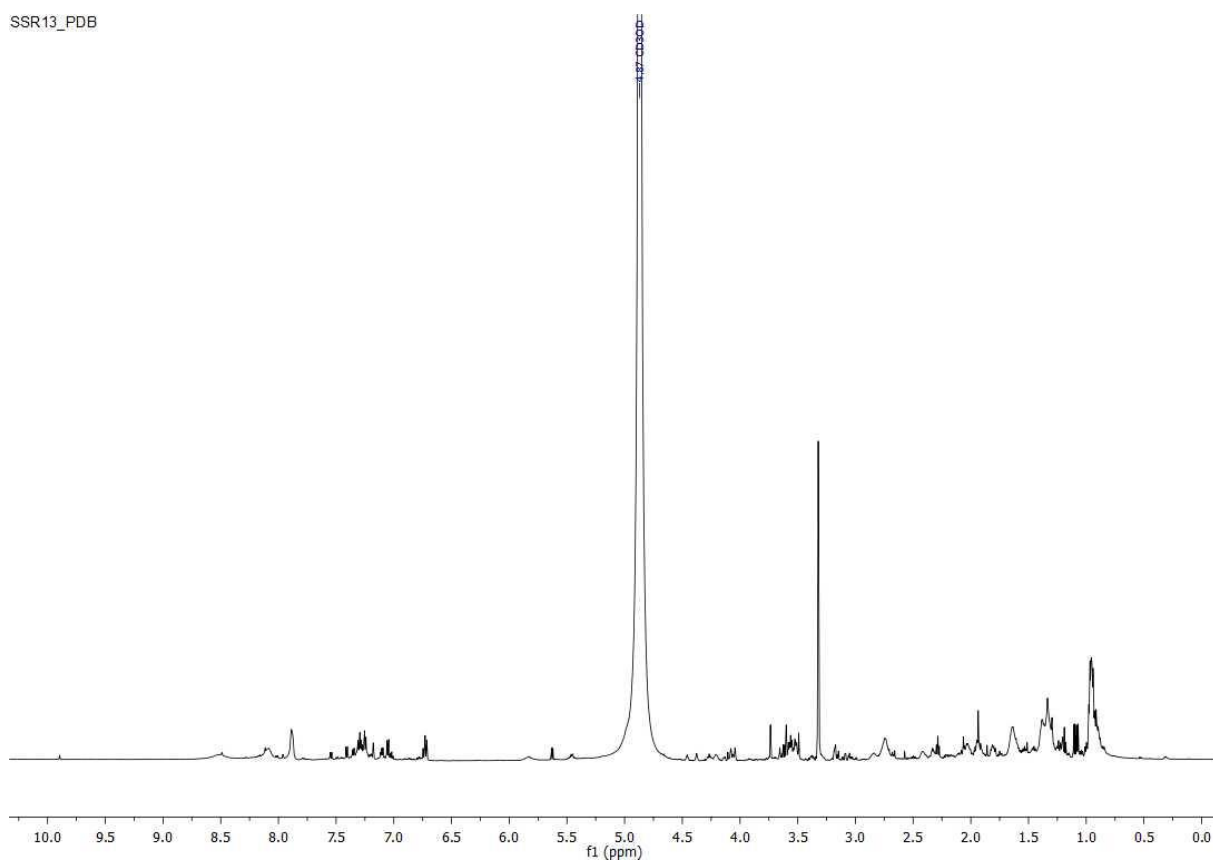


Apêndice 15 - Espectro de RMN ^1H de S.S_R13M (CD_3OD , 600 MHz).

SSR13_Malte

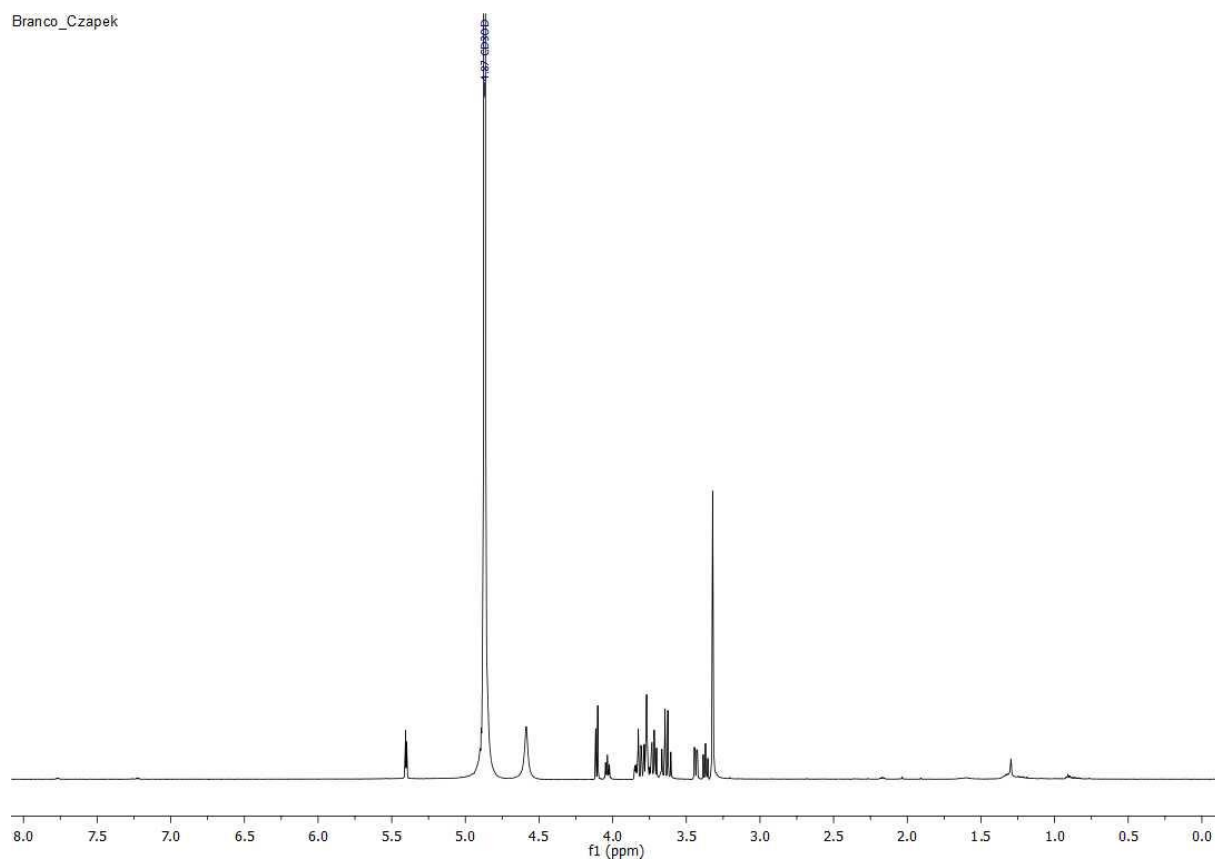
**Apêndice 16** - Espectro de RMN ^1H de S.S_R13P (CD_3OD , 600 MHz).

SSR13_PDB

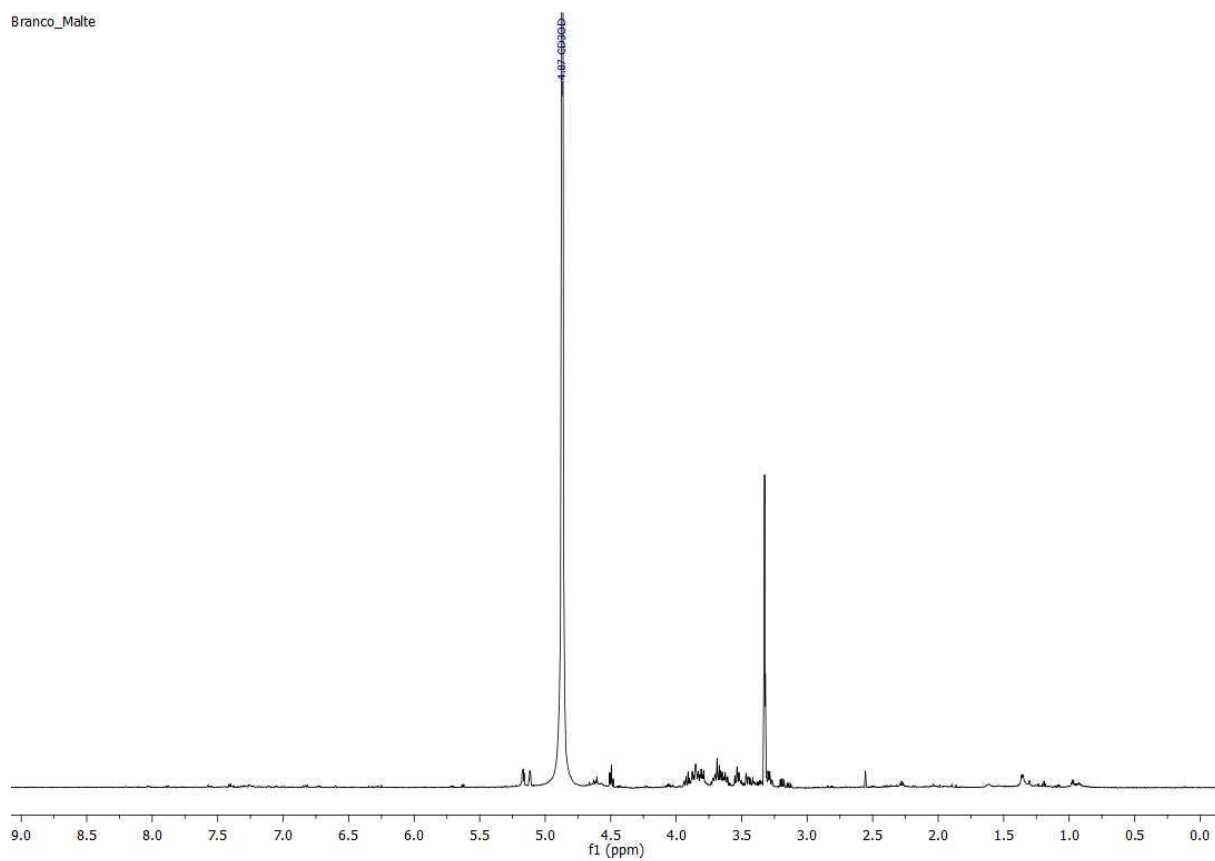


Apêndice 17 - Espectro de RMN ^1H do meio de czapek (CD_3OD , 600 MHz).

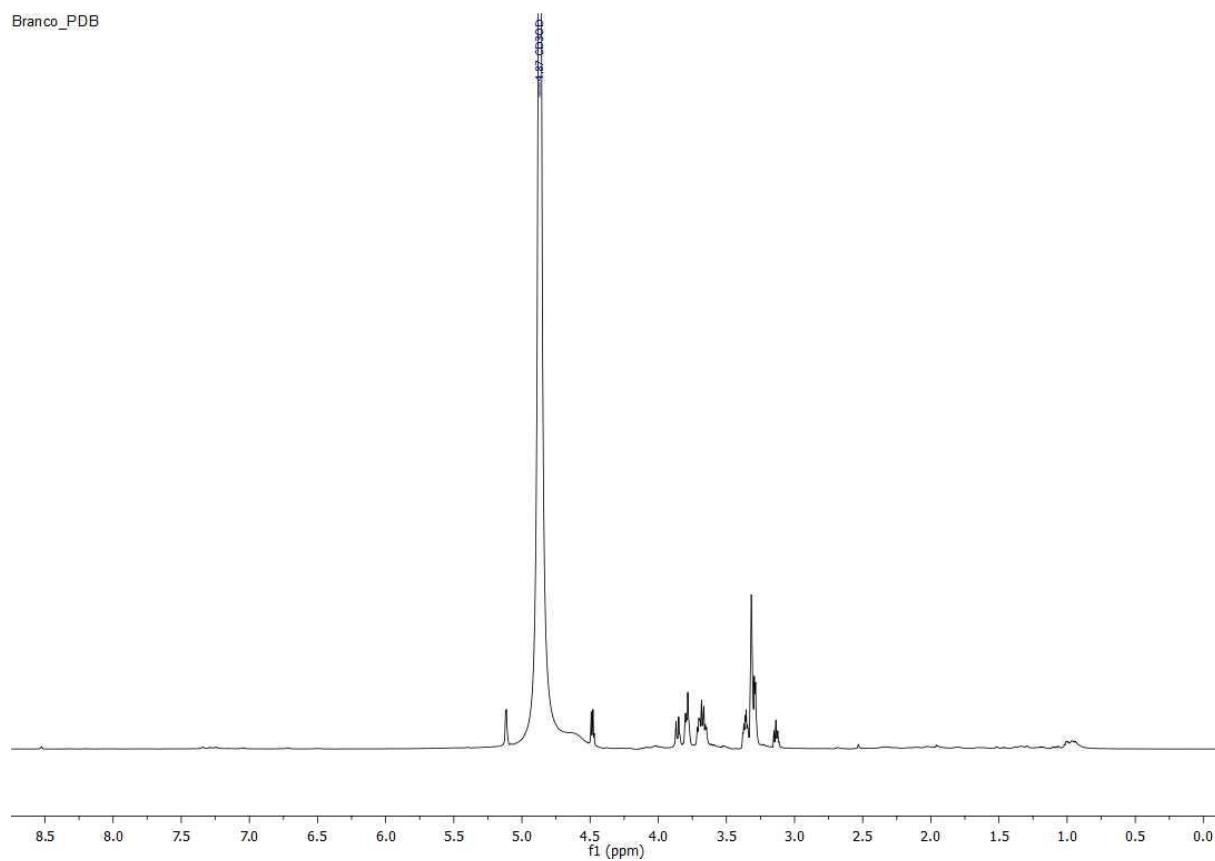
Branco_Czapek

**Apêndice 18** - Espectro de RMN ^1H do meio de malte (CD_3OD , 600 MHz).

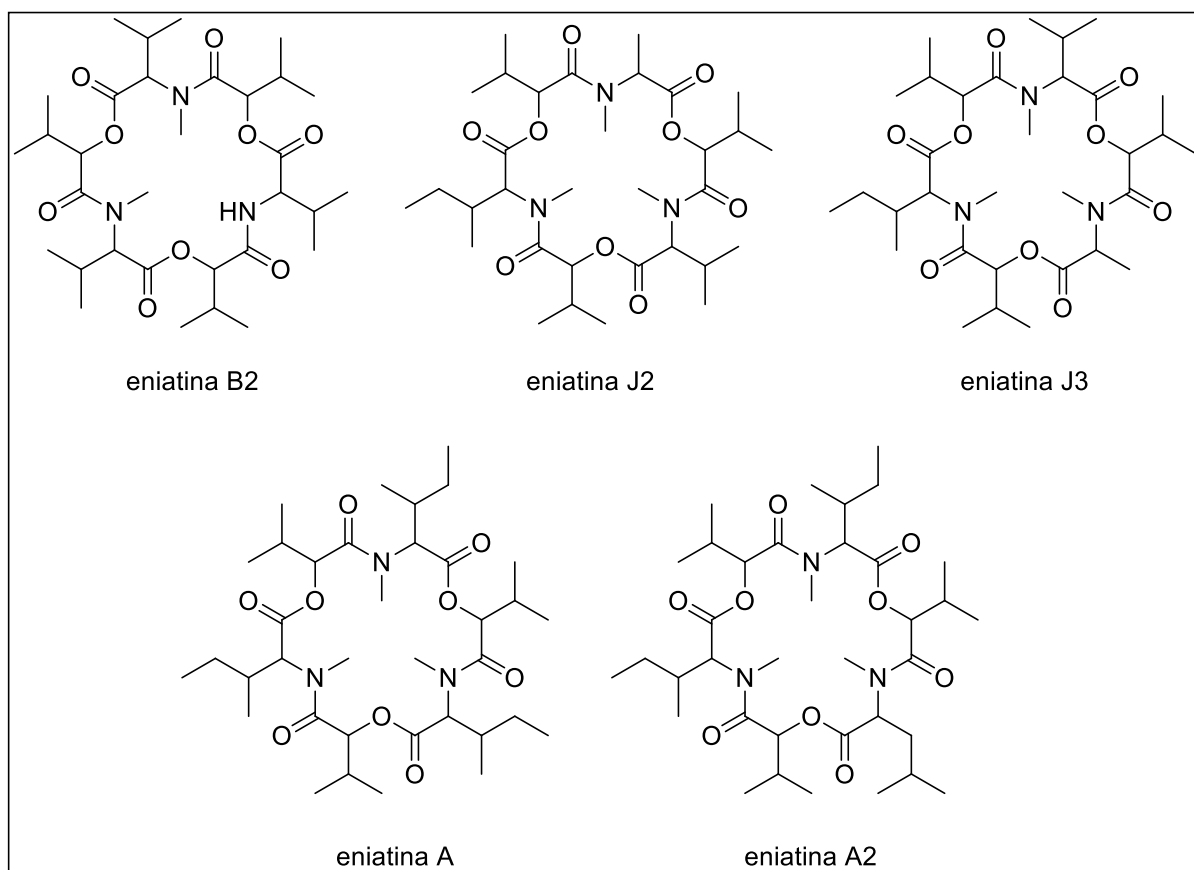
Branco_Malte



Apêndice 19 - Espectro de RMN ^1H do meio de PDB (CD_3OD , 600 MHz).



Apêndice 20 - Estrutura química das eniatinas.



Apêndice 21 - Tabela ANOVA para a resposta intensidade do pico de ácido fusárico.

Fonte de variação	Soma dos quadrados (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média quadrática (MQ)	Teste $F_{(calculado)}$
Regressão	2,44E+16	2	1,22E+16	11,73
Resíduos	9,38E+15	9	1,04E+15	
Falta de ajuste	1,18E-16	1	1,18E-16	1,00E-31
Erro puro	9,38E+15	8	1,17E+15	
Total	3,38E+16	11		

Regressão $F_{0,05;2;9}$ (F_{tabela}) = 4,26 $R^2=0,7227$; R^2 adj.= 0,6187; Resíduos $F_{0,05;1,8}$ (F_{tabela})= 5,32

Apêndice 22 - Tabela ANOVA para a resposta intensidade do pico de beauvericina.

Fonte de variação	Soma dos quadrados (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média quadrática (MQ)	Teste $F_{(calculado)}$
Regressão	6,55E+16	2	3,27E+16	5,53
Resíduos	5,33E+16	9	5,92E+15	
Falta de ajuste	2,66E-15	1	2,66E-16	4,00E-31
Erro puro	5,33E+16	8	6,66E+15	
Total	1,19E+17	11		

Regressão $F_{0,05;2;9}$ (F_{tabela}) = 4,26 $R^2=0,5515$ R^2 adj.= 0,3833; Resíduos $F_{0,05;1,8}$ (F_{tabela})= 5,32

Apêndice 23 - Tabela ANOVA para a resposta intensidade do pico de eniatina A1.

Fonte de variação	Soma dos quadrados (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média quadrática (MQ)	Teste $F_{(calculado)}$
Regressão	1,25E+16	2	6,23E+16	5,01
Resíduos	1,12E+16	9	1,24E+15	
Falta de ajuste	7,49E-16	1	7,49E-16	5,36E-31
Erro puro	1,12E+16	8	1,40E+15	
Total	2,36E+16	11		

Regressão $F_{0,05;2;9}$ (F_{tabelado}) = 4,26 $R^2=0,5270$; R^2 adj.= 0,3496; Resíduos $F_{0,05;1,8}$ (F_{tabelado})= 5,32

Apêndice 24 - Tabela ANOVA para a resposta intensidade do pico de eniatina B1.

Fonte de variação	Soma dos quadrados (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média quadrática (MQ)	Teste $F_{(calculado)}$
Regressão	3,04E+16	2	1,52E+16	12,73
Resíduos	1,08E+16	9	1,20E+15	
Falta de ajuste	7,18E-16	1	7,18E-16	5,34E-31
Erro puro	1,08E+16	8	1,35E+15	
Total	4,12E+16	11		

Regressão $F_{0,05;2;9}$ (F_{tabelado}) = 4,26 $R^2=0,7388$; R^2 adj.= 0,6408; Resíduos $F_{0,05;1,8}$ (F_{tabelado})= 5,32