



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

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

NATÁLIA CAROLINA VIEIRA

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Araraquara
2020



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

NATÁLIA CAROLINA VIEIRA

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

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Araraquara - SP
2020

FICHA CATALOGRÁFICA

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

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

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: NATÁLIA CAROLINA VIEIRA

ORIENTADOR: IAN CASTRO GAMBOA

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


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


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


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


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


Prof.^a Dr.^a TAÍCIA PACHÉCO FILL
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNICAMP - Campinas

Araraquara, 29 de maio de 2020

DADOS CURRICULARES

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2016-2020

Doutorado em Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara-SP.
Título: Estudo químico de fungos da rizosfera de *Senna spectabilis* utilizando abordagem OSMAC e ferramentas analíticas do estado da arte para anotação e caracterização de metabólitos.

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

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

2014-2016

Mestrado em Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara-SP.
Título: Estudos de fungos filamentosos isolados da rizosfera de *Senna spectabilis*: uma exploração racional da biodiversidade molecular com potencial citotóxico e anticolinesterásico.

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

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

2009-2013

Graduação em Licenciatura em Química

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

FORMAÇÃO ACADÊMICA COMPLEMENTAR

2010 – 2013

Iniciação Científica

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara-SP.
Título: Desenvolvimento de método analítico rápido para detecção de adulteração de etanol por metanol em postos de abastecimento de combustíveis automotivos.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Pezza

Bolsista: CNPq-PIBIC

2016

Estágio Docência

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

Curso de Graduação em: Engenharia Química

Nome da Disciplina: Química Orgânica II – Teórica

Carga Horária Total: 60 horas

Professor Responsável pela Disciplina: Ian Castro-Gamboa

2019-2020

Supervisão Científica

Aluna: Júlia Silva Soares (Iniciação Científica).

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

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

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

DISCIPLINAS CURSADAS DURANTE O DOUTORADO

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

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

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

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

ARTIGOS SUBMETIDOS

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

ARTIGOS EM ANDAMENTO

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

TEXTOS EM JORNAIS DE NOTÍCIAS/REVISTAS

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

APRESENTAÇÕES DE TRABALHOS

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

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS, CONGRESSOS, EXPOSIÇÕES E FEIRAS

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

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

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço

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

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

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

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

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

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

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

ao Richard Fernandes pela ajuda nas Análises de Componentes Principais,

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

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

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE APÊNDICE

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

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

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

SUMÁRIO

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

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

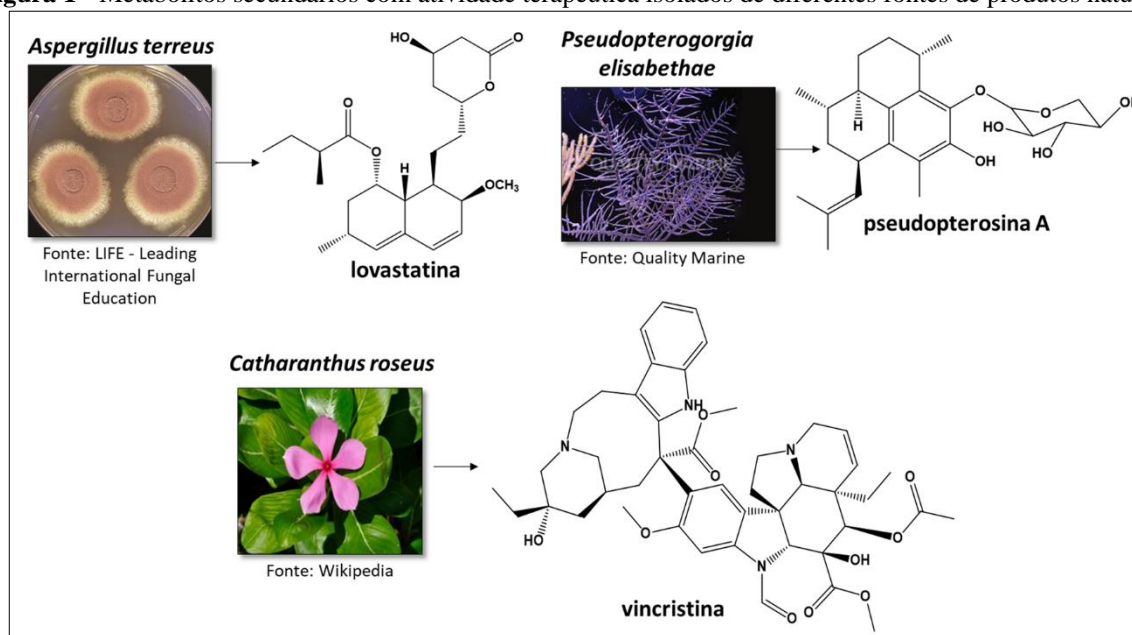
1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

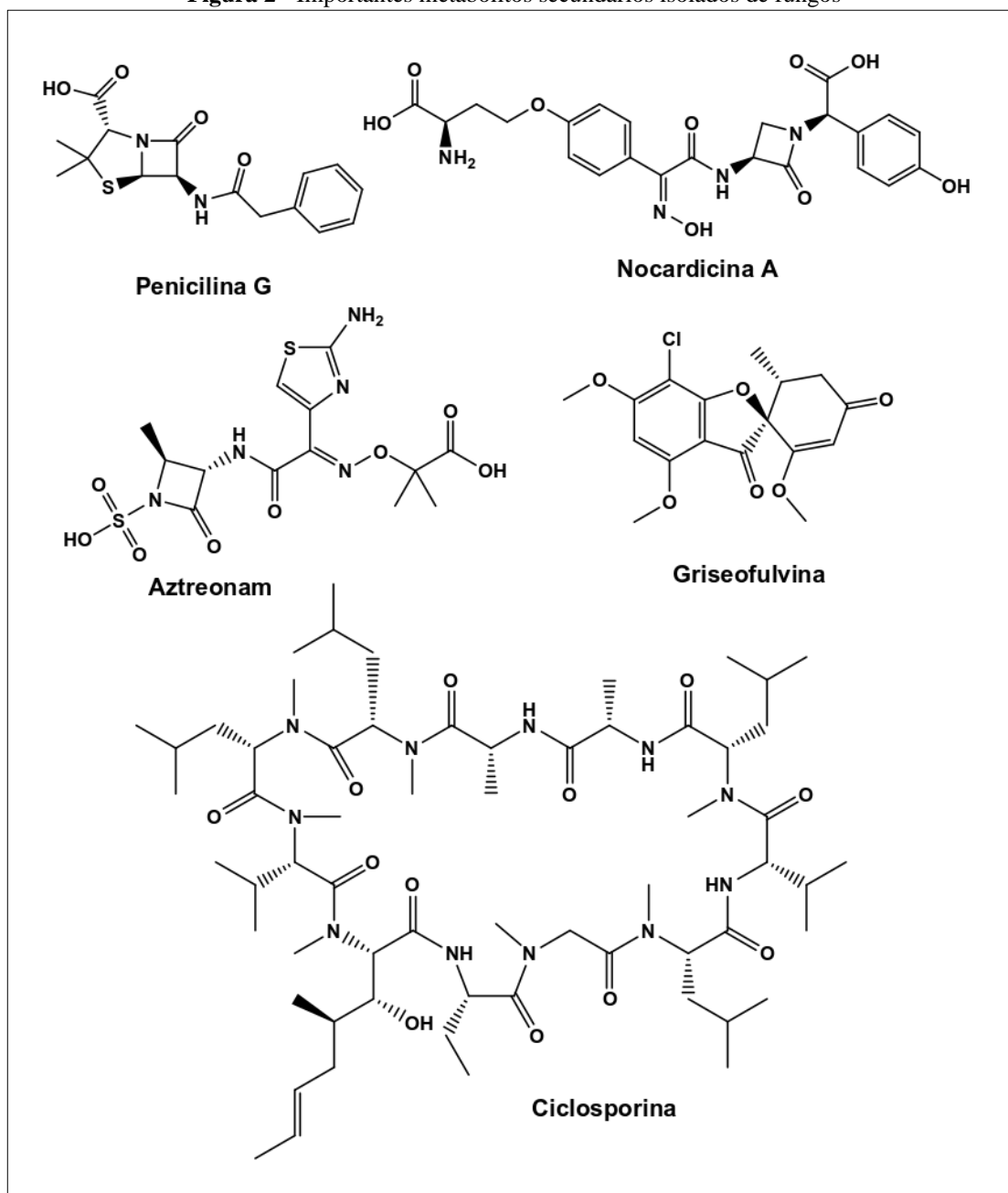
Ao longo dos anos, um dos fatos que estimulou a indústria a desenvolver programas de pesquisa em PN foi durante a segunda guerra mundial (1939-1945), após a produção em grande escala da penicilina que abriu a era dos antibióticos e também o interesse para o descobrimento de outros fármacos, como a lovastatina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

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

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

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

Figura 2 - Importantes metabólitos secundários isolados de fungos



Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

1.2 Fungos de Rizosfera

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

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

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

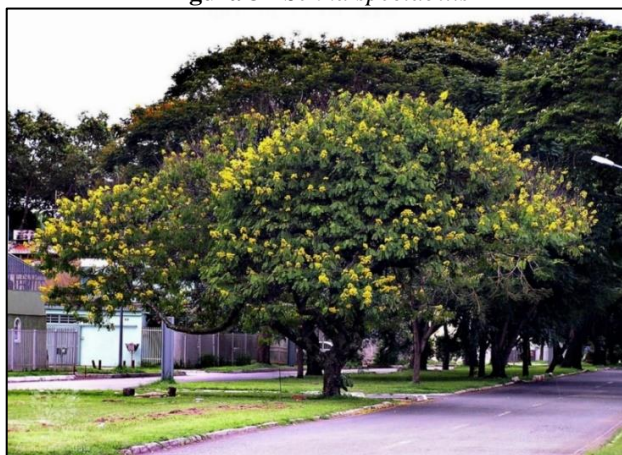
ataques de patógenos, já que muitos organismos, tanto benéficos quanto oportunistas se aproximam da rizosfera para se alimentarem dos exsudatos das raízes (CARDOSO, E.J.B.N, ANDREOTE, 2016; MENDES; GARBEVA; RAAIJMAKERS, 2013). Sendo assim, essa é uma região muito importante para o controle, crescimento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

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

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

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

Figura 3 - *Senna spectabilis*

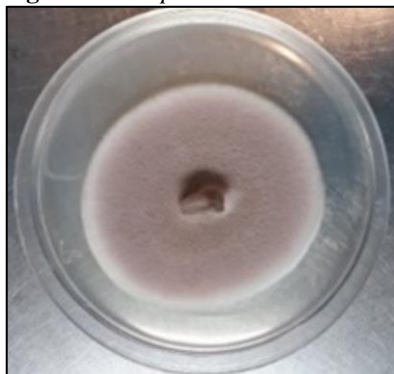


Fonte: Jardim Botânico (UTD JARDIM BOTÂNICO, 2020).

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

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

Figura 4 - *Purpureocillium lilacinum*



Fonte: Fotografia registrada pela autora, 2020.

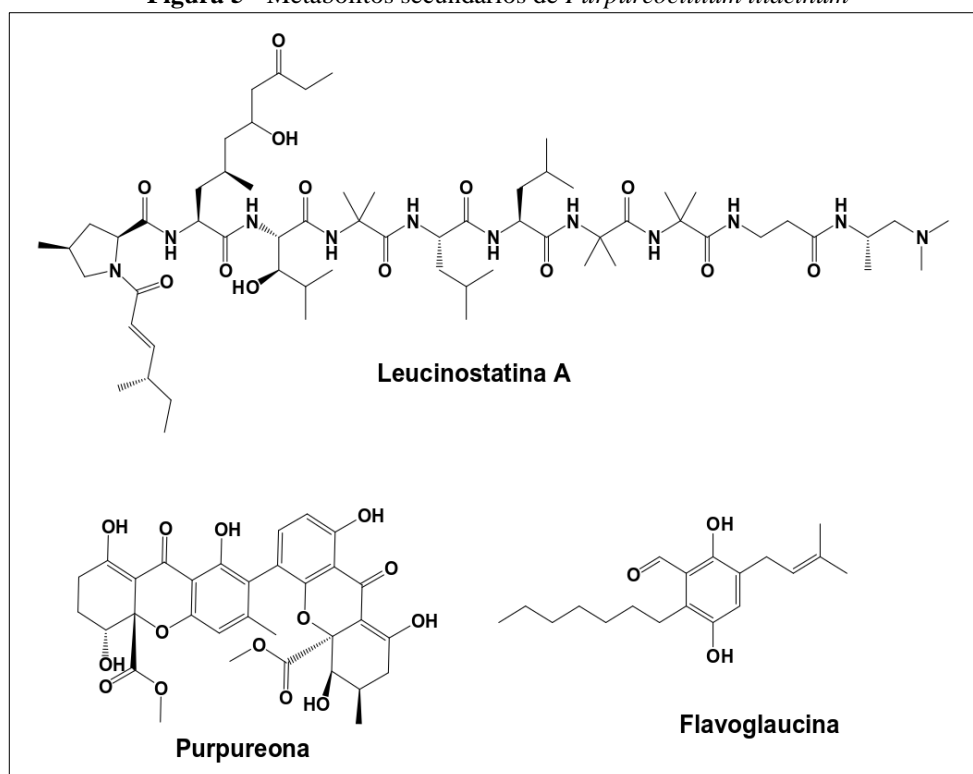
Purpureocillium é um gênero comumente encontrado no solo e *P. lilacinum* é uma espécie que antes era conhecida como *Paecilomyces lilacinum*, porém uma revisão taxonômica, em 2011, acabou por reconhecê-lo como sendo do gênero *Purpureocillium* (LUANGSA-ARD *et al.*, 2011).

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

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

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

Figura 5 - Metabólitos secundários de *Purpureocillium lilacinum*



Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

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

Figura 6 - *Fusarium solani*



Fonte: Fotografia registrada pela autora, 2020.

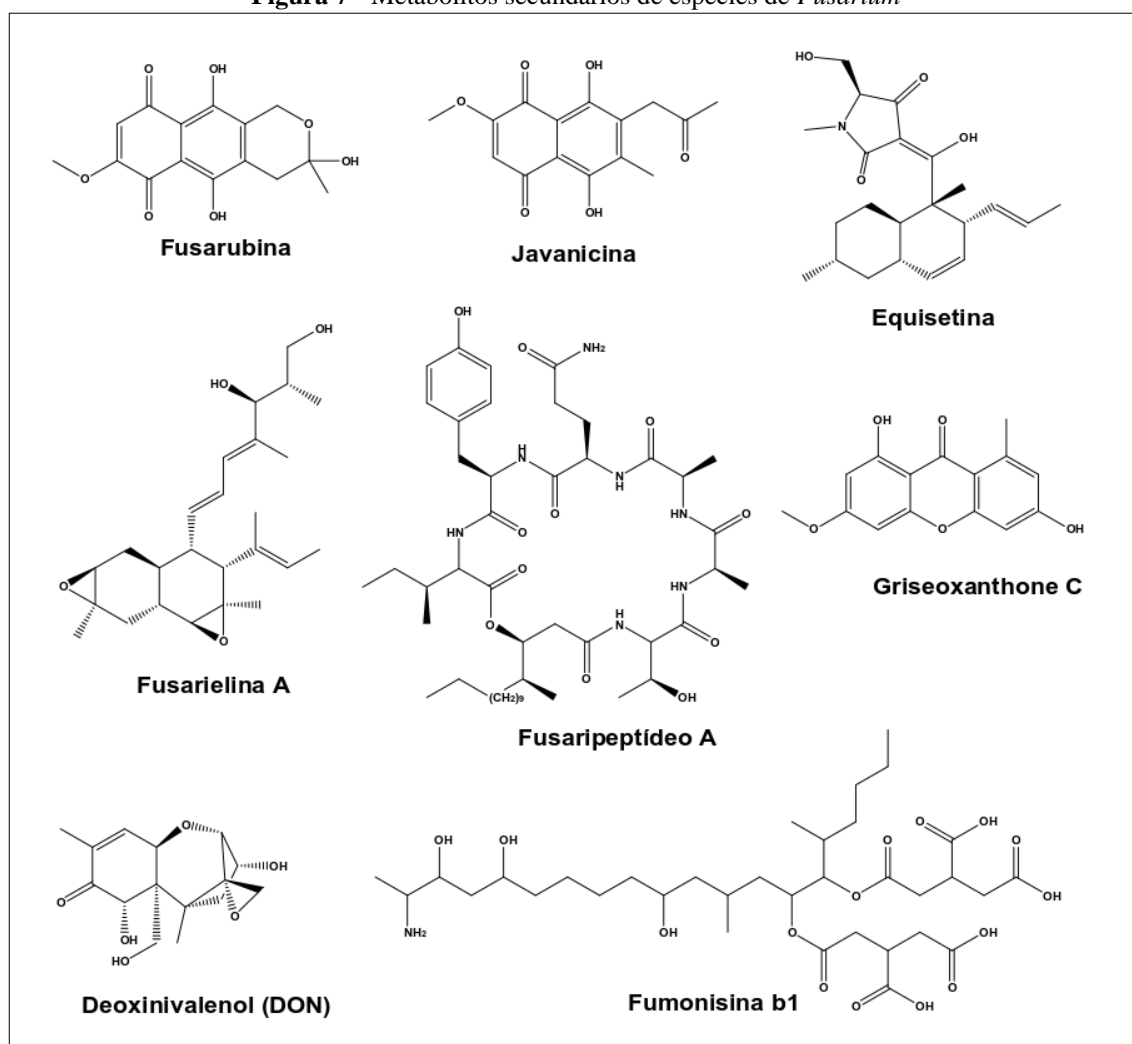
O gênero *Fusarium* é comumente encontrado no meio ambiente, principalmente no solo (SALAH *et al.*, 2015), assim como *P. lilacinum*, e contém mais de 70 espécies conhecidas (MUNKVOLD, 2017). Apesar de muitas espécies de *Fusarium* serem consideradas patógenas para humanos, elas desempenham um papel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

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

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

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

Figura 7 - Metabólitos secundários de espécies de *Fusarium*



Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

1.4 Métodos de Cultivo e Análise de Extratos Fúngicos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

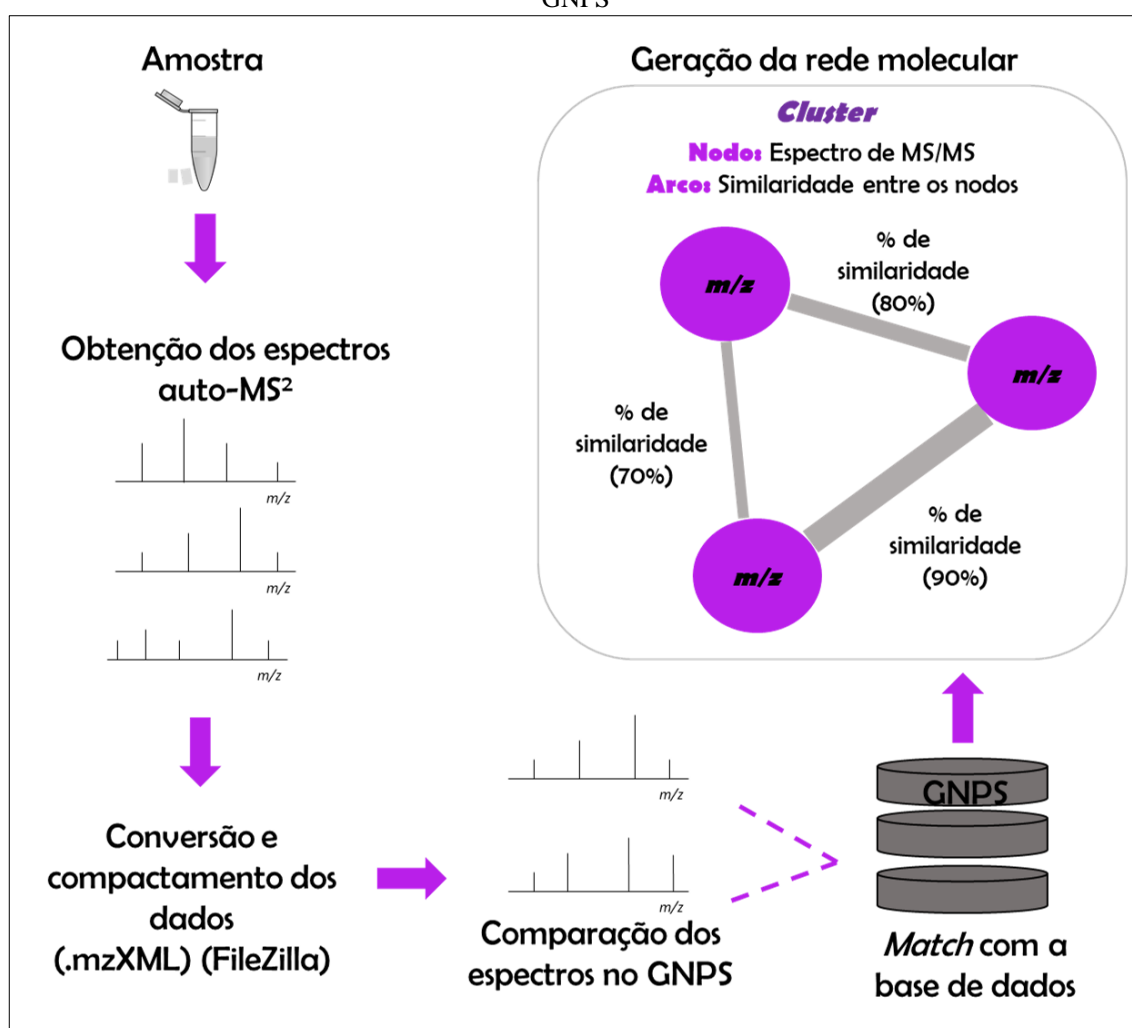
A rede molecular é representada por *clusters*, em que um *cluster* é formado por nodos e arcos: um nodo é representado por um espectro de MS/MS e os arcos, que conectam os nodos, representam a similaridade espectral de um nodo com outro (Figura 8). Os espectros das amostras são avaliados de acordo com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

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

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

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

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



Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

1.6 UNIFI - Sistema de Informação Científica, Waters

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

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

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

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

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

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

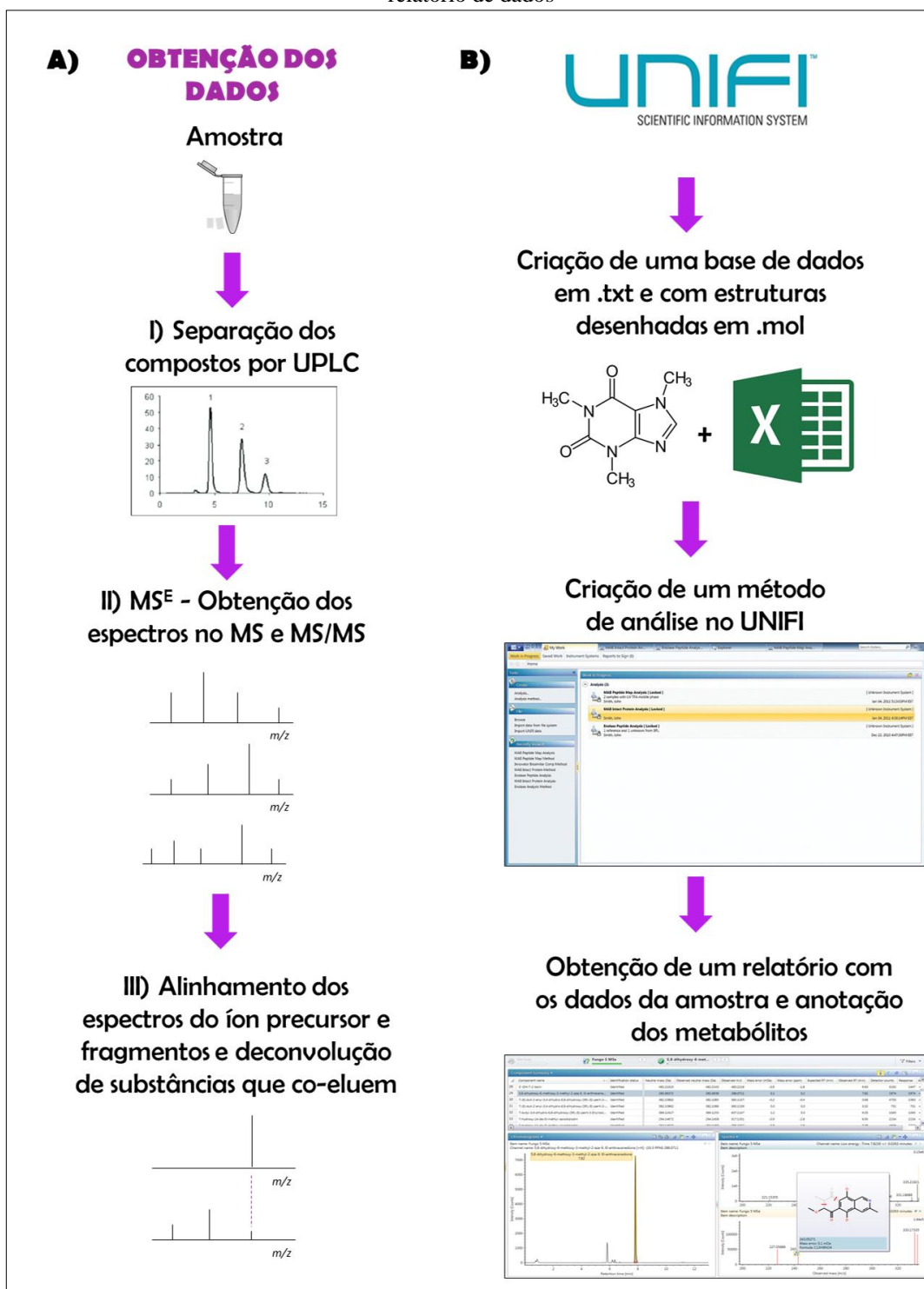
Após a realização da análise em UPLC-QTOF-MS^E, um método é desenvolvido no UNIFI, que consiste em otimizar os parâmetros para melhor sensibilidade do software em comparar os dados da amostra com as bases de dados. Sendo eles, os valores de intensidade dos espectros de alta e baixa energia (MS e MS/MS)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

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

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

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

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



Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

2. OBJETIVO

Avaliar o perfil metabólico de extratos de AcOEt de *Fusarium solani* e *Purpureocillium lilacinum* isolados da rizosfera de *Senna spectabilis* a partir de estudos de OSMAC.

Utilizar espectrometria de massas acoplada a cromatografia (GC-MS e LC-MS) para a anotação de metabólitos nos extratos utilizando abordagens metabolômicas e ferramentas de bioinformática como *Molecular Networking* em conjunto com a plataforma GNPS e também o sistema de informações da Waters Corporation, UNIFI.

Avaliar as atividades biológicas desses extratos.

Realizar o isolamento de substâncias de interesse através de métodos cromatográficos e elucidação estrutural por RMN 1 D e 2 D.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Identificação Genética dos Fungos

Foram testadas as viabilidades de alguns fungos da rizosfera de *S. spectabilis* disponíveis em nosso laboratório, sendo eles codificados como: CSP-2, CSP-28b, CSP-45, CSP-12Ia e CSP-14. Porém, apenas dois desses fungos foram escolhidos para dar continuidade a este trabalho, sendo eles o CSP-14 e o CSP-12Ia. Os fungos selecionados foram identificados pelo método de sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do DNA (FELL *et al.*, 2000; WHITE *et al.*, 1990), por uma empresa terceirizada (BPI – Biotecnologia, Pesquisa e Inovação - Botucatu - SP). Foi realizado o sequenciamento automático por eletroforese capilar no equipamento ABI3500 *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*) e alinhamento das sequências de nucleotídeos produzidas com as sequências de referência depositadas no *GenBank*.

3.2 Cultivo dos Fungos

Primeiramente, os cultivos dos fungos foram realizados em meio sólido, PDA (*Potato Dextrose Ágar*) durante 12 dias a 25 °C.

Após esse período, o ágar foi cortado em pedaços com tamanhos de 1 cm de diâmetro para cada fungo e adicionados aos frascos erlenmeyers contendo os meios líquidos para fermentação, para os estudos de OSMAC. Para o co-cultivo, a mesma quantidade de cada fungo foi adicionada a um mesmo frasco.

Todos os cultivos líquidos, inicialmente em pequena escala, foram realizados em 1,2 L (6 erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultura cada) de meio líquido PDB (*Potato Dextrose Broth*) e 1,2 L de czapek, durante 28 dias à 25 °C (Protocolo NuBBE) em modo estático ou sob agitação à 29,5 rpm (utilizando uma incubadora shaker) para a obtenção dos extratos iniciais para estudos de OSMAC, em pequena escala, obtendo os seguintes códigos: (CCA- cultivo em czapek com agitação; CSA- cultivo em czapek em modo estático; PCA- cultivo em PDB com agitação; PSA- cultivo em PDB em modo estático). Para o cultivo dos brancos (contendo apenas os meios de cultura) foi realizado com 200 mL de cada meio de cultura para cada experimento.

E para o primeiro cultivo em larga escala, utilizado para fracionamento e isolamento de substâncias do co-cultivo PSA (foi o extrato escolhido para purificação de compostos), foram utilizados 8 L (40 erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultura) de meio de

cultura PDB em modo estático (PSA). E para o segundo cultivo em grande escala, do co-cultivo PSA, foi realizado utilizando 20 L (100 erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultura cada) para obtenção de um maior rendimento de massa de extrato.

3.3 Obtenção dos Extratos Brutos

Após o período de incubação de 28 dias, a cultura de cada fungo foi filtrada à vácuo para eliminar a massa do micélio, e então foi realizada uma extração líquido-líquido do caldo utilizando 3 porções de 300 mL de acetato de etila para cada 500 mL de cultura. E posteriormente o extrato foi concentrado a pressão reduzida em rotaevaporador, fornecendo os extratos brutos que foram armazenados em frascos limpos. Em seguida os extratos foram solubilizados em 95:5 (MeOH:H₂O), passaram por uma etapa de *clean-up* (Strata X, C18) e em seguida as amostras foram filtradas em membrana 0,22 µm.

3.4 Atividades Biológicas

3.4.1 Atividade Antibacteriana

A triagem antibacteriana dos extratos utilizando linhagens de bactérias resistentes foi realizada no Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular (LEMiMo) na Universidade Federal de São Carlos, sob a supervisão da Prof. Dra. Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo.

Triagem antibacteriana: Cada extrato foi diluído em DMSO e preparada uma solução estoque. Posteriormente foi realizada uma diluição seriada em caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado (MHCA) (BD Lot. 3322206) segundo o protocolo CLSI (NCCLS, 2013). A partir disso cada extrato foi testado em 512 µg/mL a 1 % DMSO, segundo o CLSI. No controle positivo foi adicionada apenas a bactéria testada sem o extrato para observar o seu crescimento em caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado 1 % DMSO. Para o controle negativo foi utilizado apenas o meio de cultura caldo Mueller Hinton Cátion ajustado a 1 % de DMSO, sem bactéria, para indicar que não houve contaminação. A incubação foi a 37 °C e a leitura visual dos resultados foi feita após 24 h. Os testes foram realizados em duplicata. A triagem positiva indica que houve atividade antibacteriana na concentração testada, inibindo o crescimento. Uma triagem negativa indica que não houve atividade antibacteriana nesta concentração testada e houve crescimento da bactéria. Para os extratos que foram positivos para a triagem foram

determinadas a concentração inibitória mínima. Para o controle foi feito um meio de cultura com a porcentagem de DMSO igual a utilizada para diluir as amostras e a bactéria foi então cultivada (na mesma quantidade e concentração em que foi colocada nos poços com o extrato testado), para observar a diferença no seu crescimento e inibição em comparação com a bactéria crescendo na presença do extrato.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC): Para se determinar a MIC, utilizou-se todas as linhagens da espécie bacteriana que se mostrou sensível ao extrato. Dos poços do extrato a 512 µg/mL partiram as diluições seriadas (1:2) até a concentração de 0,06 µg/mL. A incubação foi feita a 37 °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 duplicata.

As linhagens bacterianas utilizadas para os testes foram: *Staphylococcus epidermidis* (ATCC35984), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC29212), *Enterococcus faecium* (VRE16), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC700603 - Gran-Negativa), *Escherichia coli* (ATCC25922 - Gran-Negativa), *Acinetobacter baumannii* (Aci 50 - Gran-Negativa), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984), *Staphylococcus aureus* (SA16), *Staphylococcus aureus* (SA88), *Staphylococcus aureus* (SA43) B2, *Staphylococcus aureus* (SA43 B7), *Staphylococcus aureus* (SA43), *Staphylococcus aureus* (25923), *Staphylococcus aureus* (Mu50) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984).

3.4.2 Análise de Citotoxicidade

As análises citotóxicas foram realizadas no Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo em São Paulo sob orientação da Professora Dra. Letícia Veras Costa Lotufo.

Os extratos foram diluídos em DMSO na concentração de 10 mg/mL e testados em linhagens de MM200 (melanoma), MCF-7 (carcinoma de mama) e RPE (pigmento epitelial de retina humana).

Metodologia: Foram plaqueadas 1×10^4 células por poço, em placas de 96 poços (5×10^4 células/mL em 200 µL de meio). Após 24 horas, os extratos foram adicionados em concentrações de 5 µg/mL e 50 µg/mL, cada concentração em duplicata, e incubadas por 72 horas. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo e dimetilsulfóxido (DMSO) com controle negativo. Após 72 horas de incubação, o sobrenadante foi substituído por meio de cultura contendo MTT (*Methyl thiazol tetrazolium*) (0,5 mg/mL). Três horas mais tarde, o

sobrenadante foi removido, e após secagem da placa, o precipitado contendo azul de formazan de MTT foi dissolvido em 150 μL de DMSO, e a absorbância foi medida a 570 nm (MOSMANN, 1983).

3.5 Análise de Componentes Principais

Cada extrato para Análise de Componentes Principais foi realizado em cultivos de 1 frasco erlenmeyer de 500 mL (em triplicata) contendo 200 mL do meio de cultura, cultivados por 28 dias a 25 °C sob agitação ou em modo estático e extraídos com acetato de etila. E posteriormente analisados por ^1H RMN (metodologia descrita na sessão 3.6.1). A matriz foi normalizada, para compensar possíveis variações amostrais, sendo posteriormente centrada na média, para que as coordenadas ficassem no centro do conjunto de dados. Os dados obtidos por RMN foram organizados em matriz, onde as linhas são relativas as amostras (número de espectros) e as colunas representam as intensidades relativas em cada deslocamento. O software utilizado para o tratamento dos dados foi o programa computacional MATLAB e o gráfico foi gerado no Microsoft Excel.

3.6 Equipamentos e Softwares Utilizados

3.6.1 RMN 600 MHz (14,1 T)

As amostras foram analisadas em um equipamento de RMN Bruker Advance III HD 600 (14,1 T) com criosonda inversa TCI Cryo-probehead com três canais dedicados, ^1H , ^{13}C e ^{15}N , com sistema de sintonia automática ATMA (*Automatic Tuning and Matching*) e amplificadores resfriados para os três núcleos. Com refrigeração BCU I (*Bruker Cool Unit*), com bobina de gradiente em z (50 G/cm) e controle de temperatura (0 a 50 °C) BSVT (*Bruker Smart Temperature Control*). O equipamento também conta com trocador automático para 60 amostras (*SampleXpress*).

Para os extratos brutos: 2 mg de cada extrato foi solubilizado em 200 μL de CD_3OD e centrifugado, e então o sobrenadante foi transferido para um tubo de RMN de 3 mm.

Os experimentos 1D e 2D foram realizados para as substâncias isoladas, que foram solubilizadas em CD_3OD e centrifugadas, e então os sobrenadantes foram transferidos para tubos de RMN de 3 mm.

3.6.2 GC-MS

Derivatização dos extratos para análise em GC-MS:

Metoximação: 5-10 mg dos extratos foram solubilizados em 80 µL de uma solução de cloridrato de metoxiamina em piridina (20 mg/mL) e em seguida foram adicionados mais 100 µL de piridina e aqueceu-se em banho-maria a 30 °C por 90 min.

Sililação: Na amostra metoximada foram adicionados 200 µL de MSTFA [*N*-metil-*N*(trimetilsilil)trifluoroacetamida] e aqueceu-se a 37 °C por 30 min. Após esses procedimentos as amostras foram filtradas com microfiltro de 0,22 µm e transferidas para vial com *insert* de 350 µL.

Especificações do equipamento: Shimadzu®. Modelo: QP2020. Ionização por Elétrons (EI). Autoinjeter: AOC-20i. Gás de arraste: hélio. Coluna: Shimadzu, Modelo: SH-Rtx-5MS (5 % difenil 95 % dimetilpolisiloxano). Dimensões: 30 m (comprimento) x 0,25 mm (diâmetro interno) x 0,25 µm (espessura do filme).

Temperatura do forno: 140 °C (3 min) 3 °C/min 320 °C (10 min) até 79,67 min. A temperatura do injetor foi 260 °C. Modo de injeção: *splitless/split*. Início *splitless*, 0,75 min *split* (1/50), 2 min *split* 1/20 a um fluxo constante de 1,3 mL.min⁻¹, o volume de amostra injetado foi de 1 µL. Condições MS: temperatura da fonte de íons e interface de 250 °C, modo de ionização por elétrons a 70 eV, faixa das massas de aquisição de *m/z* 40-600 Daltons.

As moléculas propostas foram analisadas pelo software Shimadzu GC-MS solution Ver. 2.61, os índices de retenção (IR) foram calculados pela equação de Van den Dool e Kratz (Equação 1), utilizando um padrão de hidrocarbonetos (C8-C40) analisados nas mesmas condições dos extratos, e em seguida esses índices de retenção foram comparados com a base de dados NIST (*National Institute of Standards and Technology*).

$$IR = 100.n + 100. \left(\frac{t_{R(x)} - t_{R(n)}}{t_{R(n+1)} - t_{R(n)}} \right) \quad \text{(Equação 1)}$$

n= número de carbonos do hidrocarboneto que eluiu antes ao analito;

t_{R(x)}= tempo de retenção do analito;

t_{R(n)}= tempo de retenção do hidrocarboneto anterior ao analito;

t_{R(n+1)}= tempo de retenção do hidrocarboneto posterior ao analito.

3.6.3 HPLC-ESI-microTOF II-TOF-MS

As análises foram realizadas no Departamento de Ciências Biomoleculares, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP) campus de Ribeirão Preto sob a supervisão do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes.

Para realizar as análises de redes moleculares, os espectros de massas foram obtidos utilizando um HPLC da marca Shimadzu, utilizando bombas de alta pressão (LC-20AD), com degaseificador (DGU-20A3), injetor automático (SIL-20A HT), detector UV-VIS com arranjo de diodos (PDA) SPD-M20A, com módulo de comunicação CBM-20A. Esse cromatógrafo foi acoplado ao espectrômetro de massas operando em alta resolução da marca Bruker Daltonics microTOF II-IES-TOF.

Os espectros foram adquiridos em modo positivo (ESI⁺), com faixa de massa de m/z 50-1500 operando em Auto (MS) – Análises em DDA. Capillary: 3500 V; end plat offset: 450 V; Dry Gas: 9 L.min⁻¹; Dry Temp: 220 °C; Funnel 1 RF: 200 Vpp; Funnel 2 RF: 300 Vpp; Hexapole RF: 250 Vpp; Ion energy: 5 eV; Low Mass: 70 m/z ; Collision energy (Collision Cell) 10 eV; Pre Pulse Storage: 7 μ s.

Método HPLC: Fase móvel: Acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico (v/v) (B)/Água com 0,1 % de ácido fórmico (v/v) (A). Gradiente linear: 5 % - 100 % de B em 45 minutos, de 45-55 minutos permaneceu em 100 % de B, de 55-57 minutos retornou à condição inicial de 5 % de B e de 57-68 minutos permaneceu em 5 % para o reequilíbrio da coluna. Vazão: 1 mL.min⁻¹. Fase estacionária: coluna de fase reversa Kinetex C18 100 R, 150 x 4,60 mm, 5 μ m. Volume de injeção: 1 μ L. Concentração do extrato: 1 mg/mL (Solubilizadas em metanol grau HPLC). O software utilizado para tratamento dos dados foi DataAnalysis versão 4.3.

3.6.4 Análises de Dados por Redes Moleculares (Molecular Networking)

Os experimentos tandem foram adquiridos em Auto (MS) e em modo positivo (ESI⁺), no equipamento Bruker - HPLC-ESI-microTOF II-TOF-MS (Sessão 3.6.3). Os dados foram convertidos do formato *.d* para o formato *.mzXML* utilizando o software MS-Convert que faz parte do pacote ProteoWizard. Em seguida, os dados foram compactados através do software FileZilla Client 3.34.0. A rede molecular foi gerada na plataforma GNPS. Os parâmetros utilizados no GNPS foram: tolerância de massa do íon molecular: 0,1 Da. Tolerância de massa do íon fragmento: 0,05. Cosseno: 0,7. Mínimo de picos: 6. Mínimo de cluster: 2. O algoritmo

MS-Cluster foi utilizado para agrupar os espectros, com uma tolerância de cosseno de 0,5, em espectros de consenso. E a visualização dos *clusters* foi feita no software Cytoscape v. 3.6.1.

No seguinte link pode ser visualizado o resultado obtido pelo GNPS: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=05a07188e62345a8847ee3b8beaf2bed>.

No Cytoscape foram atribuídas cores aos nodos para diferenciar de forma visual os diferentes espectros dos fungos e co-cultivos. E a largura dos arcos está de acordo com a similaridade do cosseno relacionada aos espectros conectados, quanto maior a espessura do arco, maior a similaridade entre os espectros e vice-versa.

Todos os metabólitos identificados nos brancos dos meios de cultura foram excluídos das análises.

3.6.5 UPLC-QTOF/MS^E

Para realizar as análises da plataforma UNIFI os espectros de massas foram adquiridos no UPLC-MS modelo ACQUITY UPLC I - Class System acoplado ao Xevo G2-S QTOF (Waters Corporation). Parâmetros utilizados para UPLC: fase móvel A: água (0,1 % de ácido fórmico v/v), fase móvel B: acetonitrila (0,1 % de ácido fórmico v/v); o método foi realizado em gradiente linear: 5 % - 100 % de B em 8 minutos, de 8-13 minutos permaneceu em 100 % de B, de 13-18 minutos retornou à condição inicial de 5 % de B e de 18-23 minutos permaneceu em 5 % para o reequilíbrio da coluna;; vazão: 0,4 mL.min⁻¹; volume de injeção: 0,1 µL; fase estacionária: coluna de fase reversa Acquity UPLC®HSS T3 Column (1.8 µm; 2.1 mm x 100 mm) e temperatura de 35 °C. As condições do MS^E foram realizadas em modo positivo (ESI⁺), com capillary voltage: 3 kV, sample cone: 40 V, source temperature: 100 °C, desolvation temperature: 650 °C, desolvation gas: 800 L.h⁻¹, acquisition range: 50-1200 D, sampling rate: 20 points.sec⁻¹, collision energy: low energy: 20 eV e collision energy ramp high energy: 20-50 eV; MS Collision Energy: 10 eV. Concentração das amostras: 1 mg/mL (solubilizadas em metanol grau HPLC).

3.6.6 Sistema de Informações Científicas da Waters - UNIFI

Os experimentos foram adquiridos através do UPLC-QTOF/MS^E, em modo positivo (ESI⁺) (Descrito na sessão 3.6.5).

Uma base de dados com metabólitos já relatados para os gêneros *Fusarium* e *Purpureocillium* foram construídas e inseridas no UNIFI, contendo 269 e 183 metabólitos

respectivamente (Apêndice A e B), para o *match* (ou correspondência) dos dados espectrais das amostras com os bancos de dados. As bases foram construídas em formato .txt no Excel e as estruturas desenhadas no ChemDraw Professional 17.1 em formato .mol.

As análises foram realizadas a fim de comparar os metabólitos do extrato com aqueles dos bancos de dados levando em conta: a massa de alta resolução, cálculo do erro em ppm (limite estabelecido de 5 ppm) e o possíveis padrões de fragmentações das substâncias. Todos os metabólitos identificados nos brancos dos meios de cultura foram excluídos das análises.

3.6.7 HPLC Analítico e HPLC-PDA Semi-preparativo

As análises e separações das frações foram realizadas utilizando HPLC-PDA em um cromatógrafo líquido semi-preparativo de gradiente binário (Jasco[®]), acoplado a um detector de arranjo de foto diodos (PDA) com faixa de varredura de 195-650 nm e intervalo mínimo de 1 nm (Jasco[®]). A aquisição e processamento dos dados cromatográficos foi realizada com o software ChromNAV (Cromatec[®]). As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna de fase reversa semi-preparativa kinetex 5 µm C18 (250 x 10 mm, 100 Å), com vazão de 4,0 mL/min, volume de injeção de 100 µL/min. Concentração das amostras: 10 mg/100 µL.

As frações foram otimizadas em modo analítico com uma coluna de fase reversa Kinetex 5 µm C18 (150 x 4,60 mm, 100 Å) com fase móvel H₂O/CH₃CN, em equipamento modelo PU-2089 (Jasco[®]), fluxo de 1 mL.min⁻¹ acoplado a detector de arranjo de foto diodos com faixa de varredura de 195-650 nm e intervalo mínimo de 1 nm, modelo MD-2010 (Jasco[®]), sendo que para a aquisição e processamento dos dados cromatográficos foi utilizado o software ChromNAV (Chromatec[®]).

3.6.8 Infusão Direta por Espectrometria de Massas

Dois diferentes espectrômetros de massas por infusão direta foram utilizados para análise das substâncias purificadas:

1 - DI-ESI-QTOF-MS/MS - Bruker:

O equipamento utilizado foi um Bruker Maxis Impact, sendo um espectrômetro de massas de alta resolução com configuração ESI-QTOF em modo *Full scan* e MS², em modo de ionização positivo (ESI⁺). A voltagem do capilar foi de 3000 V, e temperatura do capilar de 180 °C, com

fluxo de secagem (N₂) de 4 L.min⁻¹ e pressão do nebulizador de 0,3 Bar. Com faixa de aquisição de massa de 50-1500 Da. Concentração da amostra: 100 ppm.

2 - DI-ESI-QTOF-MS/MS - Waters:

O equipamento utilizado foi um Xevo G2-S QTOF (Waters Corporation), com fonte de ionização ESI, operando em modo positivo (ESI⁺) e em *Full scan*. A voltagem do capilar foi de 1,4 kV e temperatura da fonte 100 °C, fluxo de gás: 50 L.h⁻¹, tempo de scan: 1 s, energia de colisão para MS/MS: 21 eV, vazão: 5 µL.min⁻¹.

3.6.9 HPLC-ESI-IT-MS/MS e o Software QuantAnalysis

O equipamento que conta com o sistema LC Shimadzu[®], com bomba LC-20AD e detector de Arranjo de Diodos SPD-M20A, com injetor automático SIL-20AHT e módulo de comunicação CBM-20A e degaseificador (DGU-20A_{3R}) foi utilizado. Acoplado ao espectrômetro de massas ion-trap, amaZon-SL (Bruker Daltonics[®]), com ionização por electrospray (ESI), em modo positivo.

Para comparação das substâncias purificadas e dos extratos na sessão 4.6.3, foi realizado um gradiente linear com solventes A: Água/0,1 % ácido fórmico (v/v) e B: ACN/0,1 % ácido fórmico (v/v) variando de 5 % - 100 % de B em 45 minutos, de 45-55 minutos permaneceu em 100 % de B, de 55-57 minutos retornou à condição inicial de 5 % de B e de 57-68 minutos permaneceu em 5 % para o reequilíbrio da coluna. Foi utilizada fase estacionária Kinetex 5 µm C18 (150 x 4,60 mm, 100 A), com vazão de 1 mL.min⁻¹. Os espectros de massas foram obtidos em Manual MS(n) em modo ESI⁺; a voltagem do capilar utilizada foi 4500 V, temperatura de dessolvatação de 300 °C, fluxo do gás de secagem (N₂) 10 L.min⁻¹, pressão do nebulizador 50 psi, massa alvo: *m/z* 500, *scan*: *m/z* 50-1200. Concentração dos extratos: 1 mg/mL e concentração substâncias: 100 ppm, solubilizados em metanol. Os dados foram analisados no software DataAnalysis versão 4.3. E os softwares de aquisição e controle foram HyStar 3.2 e trapControl.

Para as análises de quantificação da sessão 4.7, foi realizado um gradiente linear com bombas A: Água/0,1 % ácido fórmico (v/v) e B: ACN/0,1 % ácido fórmico (v/v), variando de 70 % - 100 % de B em 10 minutos, de 10-17 minutos permaneceu em 100 % de B, de 17-19 minutos retornou à condição inicial de 5 % de B e de 19-24 minutos permaneceu em 5 % para o reequilíbrio da coluna. Foi utilizada fase estacionária Kinetex 5 µm C18 (150 x 4,60 mm, 100 A), com vazão de 0,45 mL.min⁻¹. Os experimentos foram realizados em modo ESI⁺ - Manual

MS(n) - que é um modo SEM de análise; a aquisição dos dados foi dividida em dois segmentos: o primeiro segmento de 0 a 5 min em modo Manual MS(n) com as configurações otimizadas para o analito alvo m/z 281; e o segundo segmento de 5-10 min com as configurações otimizadas para o padrão interno (diclofenaco de sódio) m/z 296. Os parâmetros utilizados foram: voltagem do capilar: 4500 V, temperatura de dessolvatação: 300 °C, fluxo do gás de secagem (N_2): 10 L.min⁻¹, pressão do nebulizador: 50 psi, massa alvo: m/z 400 e *scan*: m/z 100-400. Os dados foram analisados no software DataAnalysis versão 4.3. Os softwares de aquisição e controle foram HyStar 3.2 e trapControl.

Para a quantificação foi utilizado o software Compass QuantAnalysis 4.3 (Bruker); a *sample table* construída durante a análise no LC-MS foi importada para o software QuantAnalysis e um método foi criado para a obtenção da curva analítica e quantificação do analito de interesse, informando todos os dados definidos para os cromatogramas de íons extraídos (Manual MS(n)) do analito de interesse e também do padrão interno (diclofenaco de sódio, Sigma Aldrich®), com o monitoramento do íons precursores e dos íons fragmentos (m/z 281 → 249; 207 e m/z 296 → 277; 249, respectivamente).

3.6.10 ATR-FTIR e Medida de Rotação Óptica ($[\alpha]_D$)

As medidas de rotação óptica, $[\alpha]_D$, foram realizadas no laboratório de Produtos Naturais - IQ - UNESP sob a supervisão da Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento, em um equipamento Perkin Elmer® 341 LC, com lâmpada de sódio ($\lambda_{max} = 589$ nm) e cela de quartzo com caminho óptico de 1,00 dm.

Os espectros de infravermelho foram feitos no espectrofotômetro de absorção ATR-FTIR, Bruker - VERTEX 70, com detector DLaTGS e faixa de leitura (400 a 4000 cm⁻¹).

Essas análises foram realizadas para as substâncias purificadas de caráter inédito nesse trabalho.

3.7 Fracionamento e Isolamento das Substâncias do Extrato do Co-cultivo PSA

3.7.1 Primeiro Fracionamento (CC) - Isolamento das Substâncias Produzidas no Co-cultivo PSA

O primeiro extrato em larga escala do Co-cultivo PSA (Co-cultivo realizado em meio de cultura PDB, mantido em modo estático) foi fracionado por cromatografia em coluna (CC) sob

vácuo, utilizando sílica de fase reversa (C18) como fase estacionária e sistema de eluentes em gradiente como fase móvel apresentados na Figura 10.

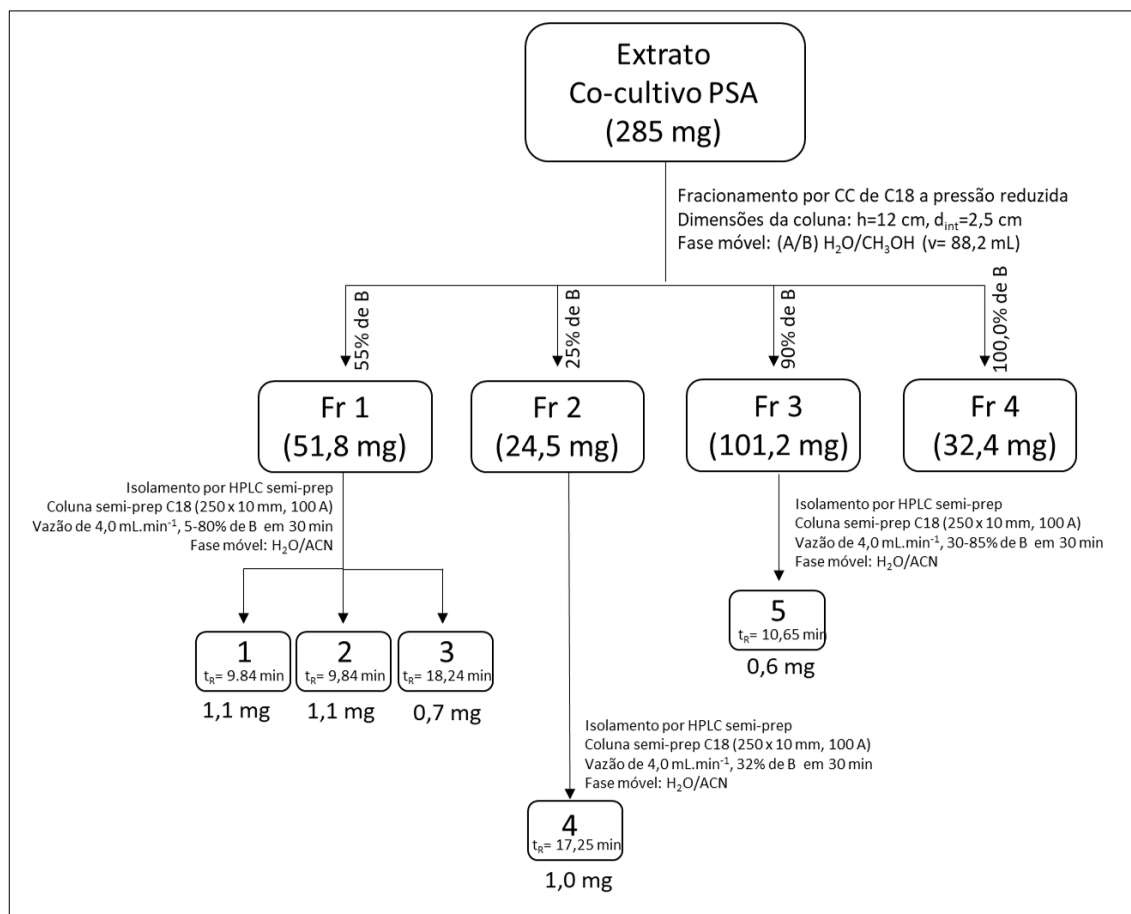
A Fr 1, obtida, foi otimizada para melhor separação através do HPLC-PDA em modo analítico (descrito na sessão 3.6.7): 5-80 % de B em 30 minutos com fase móvel H₂O/CH₃CN. O método foi transposto para HPLC-PDA em escala semi-preparativa (equipamento descrito na sessão 3.6.7) utilizando volume de injeção de 100 µL e vazão de 4 mL.min⁻¹. O monitoramento foi realizado a 254 e 310 nm devido à melhor absorção das substâncias na amostra. Este procedimento forneceu as subfrações, que foram analisadas por experimentos 1D e 2D em RMN, e espectrometria de massas, sendo identificadas as substâncias de **1** à **3** (Figura 10).

A Fr 2 foi otimizada em modo analítico e transposto para HPLC em escala semi-preparativa, obtendo um sistema isocrático de 32 % de B com fase móvel H₂O/CH₃CN. O método foi transposto para HPLC-PDA em escala semi-preparativa utilizando volume de injeção de 100 µL e vazão de 4 mL.min⁻¹ com monitoramento a 254 e 310 nm, levando a purificação da substância **4**.

A Fr 3 também foi otimizada em modo analítico e transposto para HPLC em escala semi-preparativa, obtendo um sistema gradiente: 38-85 % de B em 30 minutos com fase móvel H₂O/CH₃CN. Em seguida essa amostra foi separada, com monitoramento a 254 e 310 nm. Levando a purificação da substância **5** (Figura 10).

As substâncias foram submetidas às análises de RMN, espectrometria de massas, infravermelho e $[\alpha]_D$.

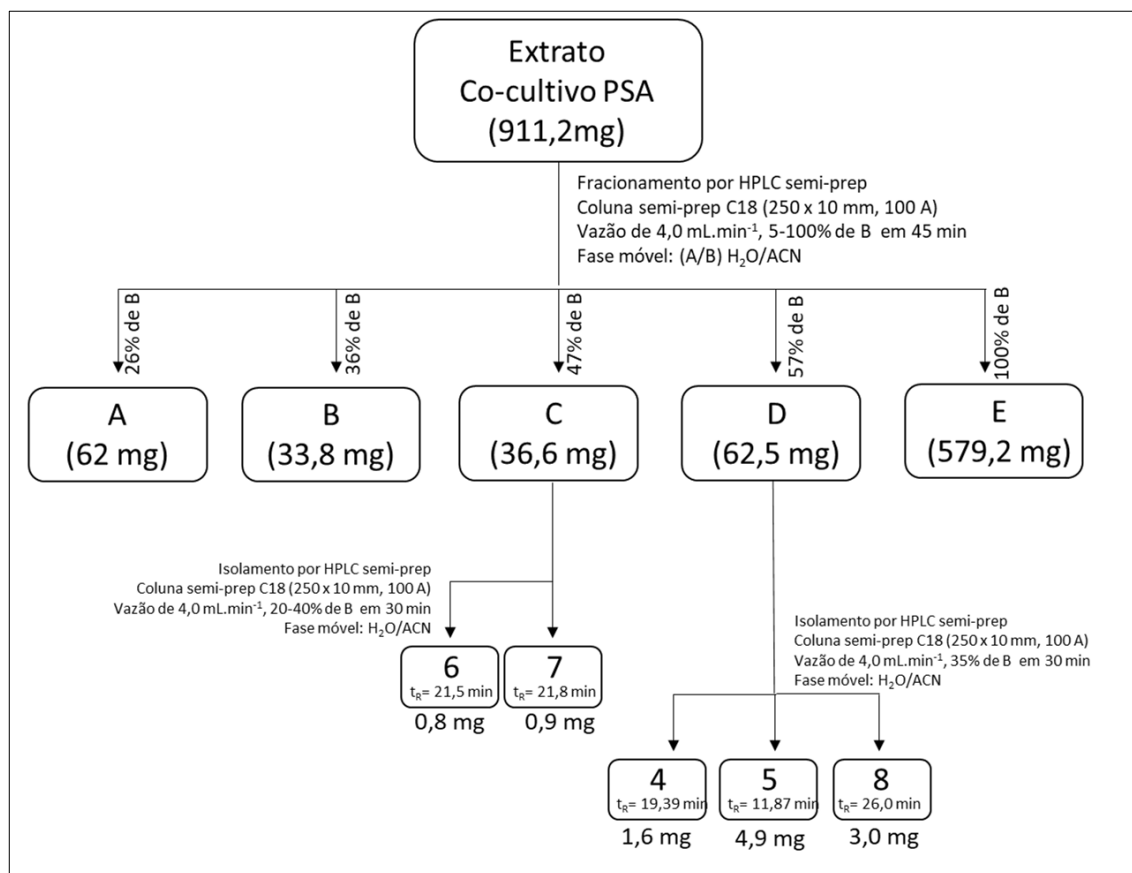
Figura 10 - Esquema do primeiro fracionamento e isolamento por CC e HPLC semi-preparativo do Co-cultivo PSA



Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

3.7.2 Segundo Fracionamento (HPLC-PDA Semi-preparativo) - Isolamento das Substâncias Produzidas no Co-cultivo PSA

Diferente do primeiro fracionamento em CC, descrito na sessão 3.7.1, nesse segundo fracionamento, foi realizado utilizando HPLC-PDA semi-preparativo de acordo com o fluxograma abaixo (Figura 11). O extrato bruto foi fracionado em HPLC-PDA semi-preparativo, obtendo as frações de A a E. As substâncias de interesse encontraram-se nas frações C e D. As frações foram então purificadas em HPLC-PDA semi-preparativo, podendo identificar as substâncias **6**, **7** e **8** como descrito na Figura 11. As substâncias foram submetidas às análises de RMN e espectrometria de massas, infravermelho e $[\alpha]_D$.

Figura 11 - Segundo fracionamento por HPLC-PDA semi-preparativo do Co-cultivo PSA

Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

3.8 Quantificação da Substância 5 (6-(11-(hidroximetil)-9-metiloct-7-en-7-il)-2-metóxi-4H-piran-4-ona)

Para evidenciar um dos efeitos da OSMAC sobre ou aumento da produção de uma substância nos extratos, realizamos a quantificação da substância **5** (6-(11-(hidroximetil)-9-metiloct-7-en-7-il)-2-metóxi-4H-piran-4-ona) nos diferentes extratos de *F. solani* e co-cultivo a partir da resolução da diretoria colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, determinada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que dispõe sobre a validação de métodos analíticos e de outras providências (ANVISA, 2017). Os experimentos foram realizados por HPLC-ESI-IT-MS/MS como descrito na sessão 3.6.9.

A validação foi feita utilizando a substância **5** purificada e caracterizada a partir do extrato Co-cultivo PSA. Realizando a construção da curva analítica (linearidade) para a substância **5**, e a precisão e a recuperação nos extratos de *F. solani* PSA e co-cultivo PSA.

Para a construção da curva analítica, as soluções do padrão foram preparadas a partir de uma solução estoque (5 µg/mL) fazendo diluições seriadas obtendo 7 pontos para a curva

(0,019531 - 1,25 $\mu\text{g/mL}$), utilizando como diluente MeOH grau HPLC. A curva foi realizada em triplicata e construída a partir da razão entre a área do analito e o padrão interno.

O teste de ajuste do modelo linear (homoscedasticidade) foi realizado a partir da análise das variâncias (Teste-F de significância) pela construção de uma Tabela ANOVA, para verificar se a linearidade da curva foi satisfatória.

Para a precisão foram realizadas corridas com 6 réplicas de cada extrato, em concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$, individualmente preparadas.

O percentual de recuperação nos extratos (10 $\mu\text{g/mL}$) foi analisado em triplicata e o preparo das soluções do padrão foram avaliados em três níveis de concentrações, 0,18, 0,22 e 0,26 $\mu\text{g/mL}$ (para Co-cultivo PSA) e 0,05, 0,06 e 0,07 $\mu\text{g/mL}$ (para *F. solani*).

Todas as análises foram realizadas contendo 2 $\mu\text{g/mL}$ de padrão interno diclofenaco de sódio (massa molar: 296 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) e analisadas pela espectrometria de massas no método descrito na sessão 3.6.9.

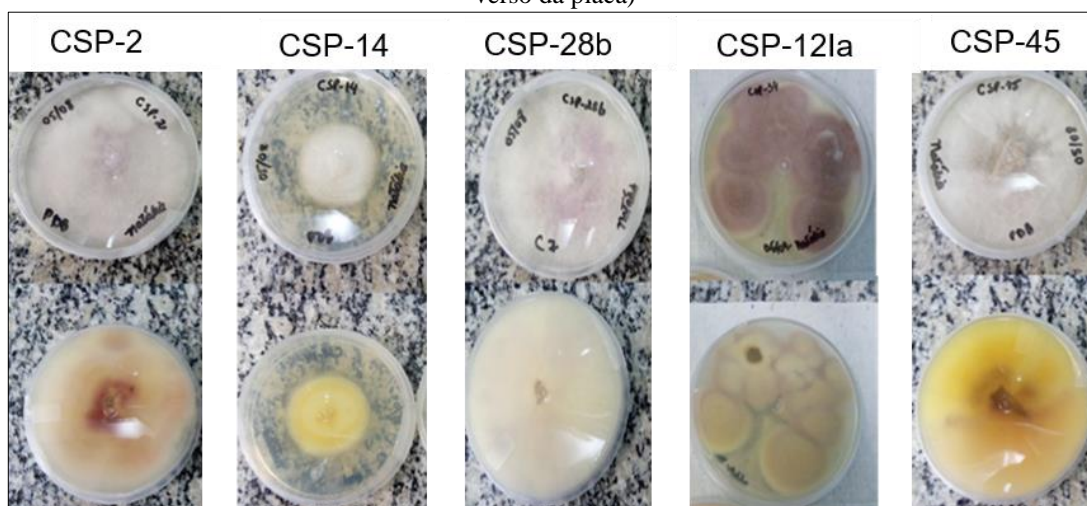
Os extratos de *F. solani* e Co-cultivo (PSA, PCA, CSA e CCA) foram analisados para verificar o teor da substância **5** presente em cada um. Dessa forma, foram realizadas análises em triplicata de cada extrato a 10 $\mu\text{g/mL}$ e calculada a concentração e o desvio padrão do analito em cada extrato.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Fungos Selecionados para este Trabalho

Alguns fungos isolados da rizosfera de *S. spectabilis* que já eram conhecidos por apresentarem características distintas entre si, foram cultivados para testar suas viabilidades, sendo eles, codificados como CSP-2, CSP-28b, CSP-45, CSP-12Ia e CSP-14, e todos apresentaram um bom crescimento e estavam livres de contaminação (Figura 12). Porém, como um dos objetivos deste trabalho foi estudar os microrganismos em co-cultivo, os fungos que eram mais diferentes entre si e melhor apresentaram uma interação em meio sólido (Figura 13) foram selecionados para dar continuidade ao trabalho, sendo eles: CSP-14 e CSP-12Ia.

Figura 12 - Fungos inicialmente cultivados de *Sena spectabilis* para teste de viabilidade em meio PDA (frente e verso da placa)



Fonte: Fotografias registradas pela autora, 2016.

Bertrand e colaboradores observaram, em seus estudos, que a interação, em co-cultivo entre dois fungos, poderia acontecer de quatro maneiras: **1)** inibição a distância - em que os fungos param de crescer antes de entrarem em contato; **2)** linha de inibição - é observada uma linha preta de contato entre os dois fungos sugerindo a precipitação de substâncias nessa região; **3)** inibição por contato - em que os fungos param de crescer no momento em que entram em contato; e **4)** crescimento em sobreposição - quando um fungo cresce sobre o outro (BERTRAND *et al.*, 2014).

No co-cultivo avaliado, foi possível observar (Figura 13) uma inibição à distância, em que os fungos param de crescer antes de entrarem em contato. Concluindo, de forma preliminar, que o co-cultivo desses microrganismos parece indicar uma perturbação em seus

desenvolvimentos, o que poderia sugerir uma alteração na produção metabólica através do silenciamento ou ativação de genes biossintéticos. O que poderia ser interessante para a busca de novos metabólitos bioativos. Por esse motivo, esses fungos foram escolhidos para esse trabalho.

Figura 13 - Co-cultivo de CSP-12Ia e CSP-14 com 15 dias de crescimento



Fonte: Fotografia registrada pela autora, 2019.

4.2 Identificação Genética dos Fungos CSP-14 e CSP-12Ia

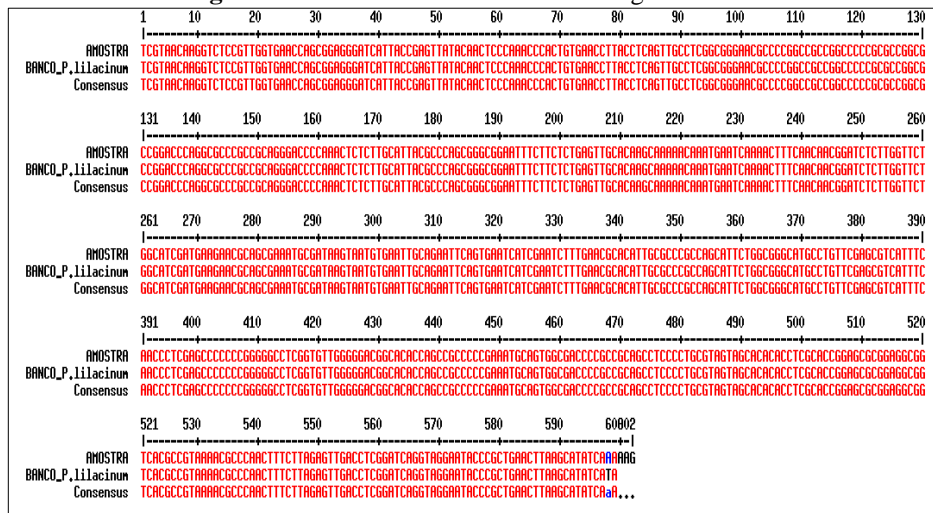
A sequência da região ITS do DNA dos microrganismos gerada foi comparada com o banco de dados GenBank e as espécies foram identificadas.

Para o fungo CSP-12Ia obteve-se 100% de identidade com *Purpureocillium lilacinum*, com o número de acesso KM396.1.

Para o fungo CSP-14 obteve-se 100 % de identidade com *Fusarium solani*, com número de acesso JQ277276.1.

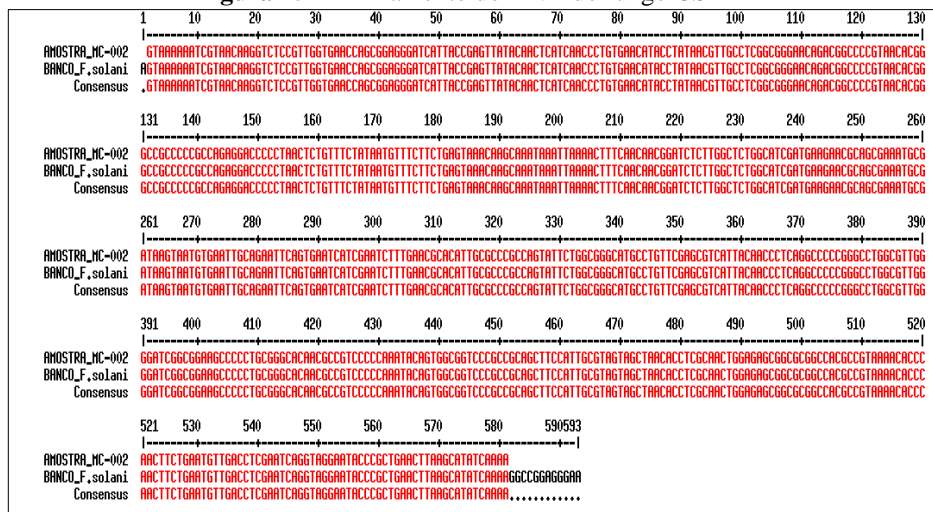
As Figuras 14 e 15 apresentam o alinhamento dos DNA obtidos.

Figura 14 - Alinhamento do DNA do fungo CSP-12Ia



Fonte: Figura obtida pela empresa terceirizada, 2017.

Figura 15 - Alinhamento do DNA do fungo CSP-14



Fonte: Figura obtida pela empresa terceirizada, 2017.

4.3 OSMAC e Produção dos Extratos em Pequena Escala

O primeiro passo para os dois fungos escolhidos, foi cultivá-los em meio líquido, em pequena escala, variando seus cultivos. Para que dessa forma fosse possível verificar os efeitos da OSMAC – variando o meio de cultura, agitação, modo estático e co-cultivo. Assim foram obtidos 12 extratos (4 para cada mono/co-cultivo - CSA, CCA, PSA e PCA), sendo eles:

(CSA) - Czapek em modo estático

(CCA) - Czapek com agitação

(PSA) - PDB em modo estático

(PCA) - PDB com agitação

Os brancos de cada experimento também foram realizados, de forma que continham nos frascos apenas os meios de cultivo sem os fungos, que foram igualmente extraídos.

A Tabela 1 apresenta o rendimento dos extratos para cada experimento de cada monocultura, branco e co-cultivo.

Tanto para o fungo *P. lilacinum*, e *F. solani*, o cultivo que apresentou o maior rendimento foi em czapek sob agitação (CCA), obtendo 40 mg de extrato para *P. lilacinum* e 111,5 mg para *F. solani*. Já o co-cultivo apresentou um maior rendimento em meio PDB em modo estático (PSA) com 49,7 mg.

O cultivo em pequena escala, foi obtido para realizar os estudos de atividade biológica, análise de RMN e espectrometria de massas para os estudos de OSMAC por análises qualitativas e de comparação entre eles, que serão discutidos nas próximas sessões.

***Tabela 1 - Massas obtida dos extratos brutos**

Fungo	CSA (mg)	CCA (mg)	PSA (mg)	PCA (mg)
<i>P. lilacinum</i>	36,0	40,0	18,2	10,3
<i>F. solani</i>	13,4	111,5	60,3	29,0
Co-cultivo	16,0	15,0	49,7	19,4
Branco	1,0	1,6	16,2	11,5

***nota:** Todas as Tabelas desse documento foram elaboradas pela autora, 2020.

4.4 Ensaios Biológicos

4.4.1 Atividade Antibacteriana

A utilização difundida de antimicrobianos na medicina humana, agropecuária, medicina veterinária e etc., aumentou os níveis de bactérias resistentes, que podem gerar grandes danos para a saúde humana, animal e para o ecossistema. Os sistemas ambientais, como água, por exemplo, frequentemente recebem resíduos de atividades humanas. Estes resíduos podem conter níveis elevados de antibióticos que podem ser disseminados através da água ou terra, possibilitando assim a ocorrência de linhagens de bactérias super-resistentes (BUENO *et al.*, 2018). Nesse contexto, então, se faz necessária a pesquisa para o descobrimento de novos metabólitos para combater esses microrganismos que preocupam a população.

Sendo assim, os extratos 12 extratos obtidos foram submetidos a ensaios antibacterianos, contra bactérias resistentes (Tabela 2) para realização dos cálculos de MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*), e MBC (*Minimal Bactericidal Concentration*).

A concentração inibitória mínima (MIC) é a concentração mais baixa do extrato que impede o crescimento visível de uma bactéria (atividade bacteriostática), enquanto que a concentração bactericida mínima (MBC) é a concentração que resulta na morte da bactéria (atividade bactericida) (TRIPATHI, 2018). Quanto menor o MIC, maior a potência e, quanto maior a potência, maior a dificuldade da bactéria em desenvolver resistência. Foi utilizado controle positivo contendo apenas a bactéria testada sem o extrato para observar o seu crescimento. Para o controle negativo foi utilizado apenas o meio de cultura, sem a bactéria, para indicar que não houve contaminação.

Foi possível observar que os extratos de *F. solani* PSA e Co-cultivo PSA apresentaram atividade na máxima concentração avaliada de 512 mg/L contra as bactérias *S. epidermidis* ATCC35984 e *S. aureus* ATCC25923, como apresentado na Tabela 2. A atividade de inibição do crescimento corresponde aos valores < 512 destacados em negrito para cada extrato nessa Tabela.

Tabela 2 - Resultados da triagem antibacteriana para os extratos de *P. lilacinum*, *F. solani* e co-cultivo

Linhagens bacterianas	MIC (mg/L)											
	<i>P. lilacinum</i>				<i>F. solani</i>				Co-cultivo			
	(CCA)	(CSA)	(PCA)	(PSA)	(CCA)	(CSA)	(PCA)	(PSA)	(CCA)	(CSA)	(PCA)	(PSA)
<i>S. epidermidis</i> ATCC35984	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	<512	>512	>512	>512	<512
<i>S. aureus</i> ATCC25923	>512*	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	<512
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>E. faecium</i> VRE16	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>K.pneumoniae</i> ATCC700603 (GN)	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>E. coli</i> ATCC25922 (GN)	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>A. baumannii</i> Aci 50	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512

* Inibição parcial de 89,25 %.

Esses dois extratos que apresentaram atividade, foram submetidos a novos ensaios para o cálculo do MIC e MBC (Tabelas 3 e 4).

Como o extrato de co-cultivo PSA apresentou atividade contra uma espécie de *S. aureus* (ATCC25923), ele foi testado frente a outras linhagens (*S. aureus* (SA16), *S. aureus* (SA88),

S. aureus (SA43) B2, *S. aureus* (SA43 B7), *S. aureus* (SA43) e *S. aureus* (Mu50)) obtendo os valores de MIC.

O extrato de co-cultivo PSA apresentou, para *S. aureus* SA43, uma inibição total do crescimento bacteriano em 512 mg/L e uma inibição parcial de 68 % a 256 mg/L. Enquanto para as outras linhagens de *Staphylococcus* houve apenas inibições parciais a 512 mg/L. Esses dados podem ser observados nas Tabelas 3 e 4.

Os extratos apresentaram valores significativos para o MIC em 512 mg/L (Tabela 3 e 4), portanto não foi possível calcular o MBC já que as concentrações para o MIC foram os valores máximos avaliados.

Tabela 3 - MIC e MBC para Co-cultivo-PSA

Linhagens bacterianas	Extrato Co-cultivo PSA			
	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MBC/MIC	Atividade
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	512	>512	N.D.	N.D.
<i>S. aureus</i> SA16	>512	>512	N.D.	N.D.
<i>S. aureus</i> SA88	>512*	>512	N.D.	N.D.
<i>S. aureus</i> SA43 B2	>512**	>512	N.D.	N.D.
<i>S. aureus</i> SA43 B7	>512***	>512	N.D.	N.D.
<i>S. aureus</i> SA43	512****	>512	N.D.	N.D.
<i>S. aureus</i> 25923	512	>512	N.D.	N.D.
<i>S. aureus</i> Mu50	>512	>512	N.D.	N.D.

Legenda:

* Na concentração de 512 houve inibição parcial de 38% para a *S. aureus* SA88.

** Na concentração de 512 houve inibição parcial de 50 % para a *S. aureus* SA43 B2.

*** Na concentração de 512 houve inibição parcial de 60,4 % para a *S. aureus* SA43 B7.

**** Na concentração de 512 houve inibição total do crescimento e na concentração de 256 houve parcial de 68,5 % para a *S. aureus* SA43.

N.D.: não determinada

Tabela 4 - MIC e MBC para *F. solani* PSA

Linhagens bacterianas	Extrato <i>F. solani</i> PSA			
	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MBC/MIC	Atividade
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	512	>512	N.D.	N.D.

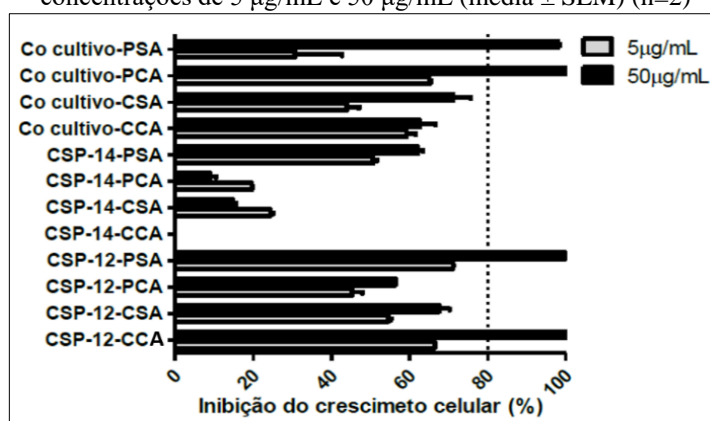
4.4.2 Análise de Citotoxicidade

O câncer ainda é uma doença complexa e muitas vezes mortal, e o uso de agentes terapêuticos oriundos de produtos naturais representam uma grande porcentagem de fármacos quimioterapêuticos, bem como de quimioprevenção. Muitos desses agentes podem ser combinados com drogas quimioterapêuticas já administradas para uma melhor terapia, mostrando que os produtos naturais ainda merecem grande atenção dentro dessa vertente

(BISHAYEE; SETHI, 2016). Portanto é relevante que seja realizada uma análise citotóxica dos extratos, obtidos nesse trabalho, contextualizando a busca por novos agentes quimioterapêuticos.

Dentre os 12 extratos avaliados, os extratos Co-cultivo PSA, Co-cultivo-PCA, *P. lilacinum* PSA e *P. lilacinum* CCA mostraram um potencial de inibição do crescimento celular superior a 80 % em linhagens de melanoma (MM-200) na concentração de 50 µg/mL (Figura 16, Tabela 5). A linhagem MM-200 tem se mostrado mais sensível do que a linhagem de carcinoma mamário (MCF-7), o qual seria uma justificativa para a ausência de um potencial citotóxico dos extratos para a linhagem MCF-7 (Figura 17; Tabela 6). Os extratos também foram avaliados frente a linhagens de células não tumorais RPE (pigmento epitelial de retina humana), para observar sua citotoxicidade em células saudáveis (Figura 18, Tabela 7), obtendo então resultado positivo para essas células, apontando que os extratos também apresentam citotoxicidade para células saudáveis nessa concentração.

Figura 16 - Inibição do crescimento celular (%) dos extratos em linhagem de melanoma (MM- 200), com as concentrações de 5 µg/mL e 50 µg/mL (média ± SEM) (n=2)



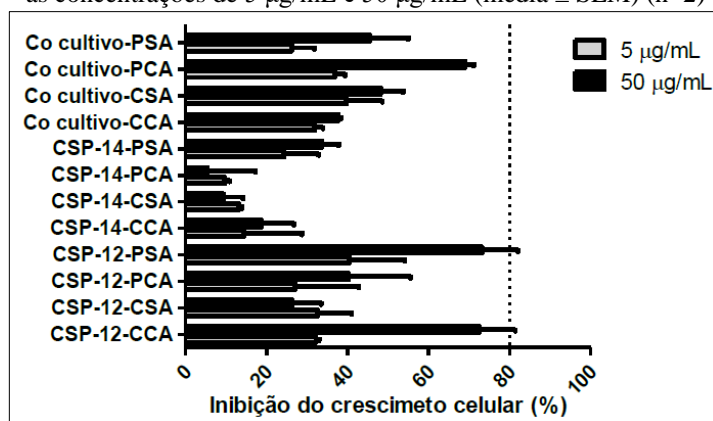
Legenda: CSP-12 (*P. lilacinum*) e CSP-14 (*F. solani*)

Fonte: Figura obtida no ICB-USP sob supervisão da Prof. Dra. Leticia Lotufo, 2017.

Tabela 5 - Inibição do crescimento celular (%) dos extratos em linhagem de melanoma (MM- 200), com as concentrações de 5 µg/mL e 50 µg/mL (média ± SEM) (n=2)

Extrato	5 µg/mL		50 µg/mL	
	Média	*SEM	Média	SEM
<i>P. lilacinum</i> CCA	66,42	0,16	100,00	0,007
<i>P. lilacinum</i> CSA	54,54	0,68	67,58	2,71
<i>P. lilacinum</i> PCA	45,33	2,61	56,33	0,13
<i>P. lilacinum</i> PSA	71,13	0,05	99,78	0,85
<i>F. solani</i> CCA	0,00	9,51	0,00	10,87
<i>F. solani</i> CSA	24,39	0,68	14,68	0,92
<i>F. solani</i> PCA	19,63	0,19	8,91	1,53
<i>F. solani</i> PSA	50,62	0,97	62,15	1,24
Co cultivo CCA	59,22	2,28	62,63	3,97
Co cultivo CSA	43,93	3,11	71,12	4,53
Co cultivo PCA	65,04	0,56	100,00	0,03
Co cultivo PSA	30,56	12,22	97,96	0,56

*SEM: desvio médio padrão

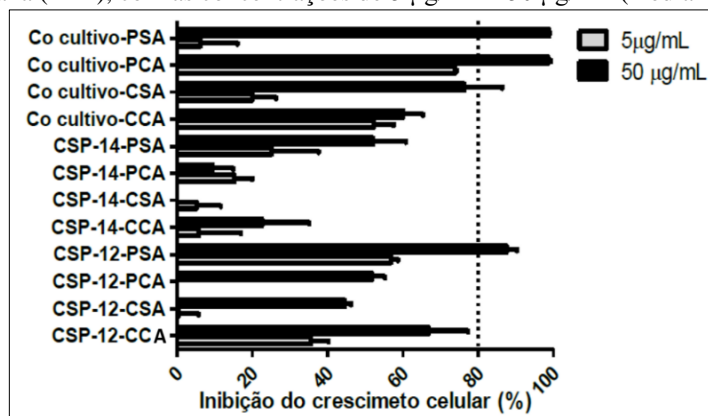
Figura 17 - Inibição do crescimento celular (%) dos extratos em linhagem de carcinoma mamário (MCF-7), com as concentrações de 5 µg/mL e 50 µg/mL (média ± SEM) (n=2)Legenda: CSP-12 (*P. lilacinum*) e CSP-14 (*F. solani*)

Fonte: Figura obtida no ICB-USP sob supervisão da Prof. Dra. Letícia Lotufo, 2017.

Tabela 6 - Inibição do crescimento celular (%) dos extratos em linhagem de carcinoma mamário (MCF-7), com as concentrações de 5 µg/mL e 50 µg/mL (média ± SEM) (n=2)

Extrato	5 µg/mL		50 µg/mL	
	Média	SEM	Média	SEM
<i>P. lilacinum</i> CCA	32,19	0,76	72,48	8,95
<i>P. lilacinum</i> CSA	32,52	8,44	26,28	7,18
<i>P. lilacinum</i> PCA	27,02	15,72	40,20	15,36
<i>P. lilacinum</i> PSA	40,48	13,64	73,15	8,86
<i>F. solani</i> CCA	14,38	14,38	18,79	8,03
<i>F. solani</i> CSA	13,07	0,89	9,40	4,81
<i>F. solani</i> PCA	9,65	1,22	5,41	11,83
<i>F. solani</i> PSA	24,31	8,55	33,66	4,13
Co cultivo CCA	31,84	2,05	37,78	0,59
Co cultivo CSA	39,61	8,98	48,14	5,59
Co cultivo PCA	36,80	2,63	69,03	2,14
Co cultivo PSA	26,20	5,58	45,43	9,55

Figura 18 - Inibição do crescimento celular (%) dos extratos em linhagem não tumoral de pigmento epitelial de retina humana (RPE), com as concentrações de 5 µg/mL e 50 µg/mL (média ± SEM) (n=2)



Legenda: CSP-12 (*P. lilacinum*) e CSP-14 (*F. solani*)

Fonte: Figura obtida no ICB-USP sob supervisão da Prof. Dra. Letícia Lotufo, 2017.

Tabela 7 - Inibição do crescimento celular (%) dos extratos em linhagem não tumoral de pigmento epitelial de retina humana (RPE), com as concentrações de 5 µg/mL e 50 µg/mL (média ± SEM) (n=2)

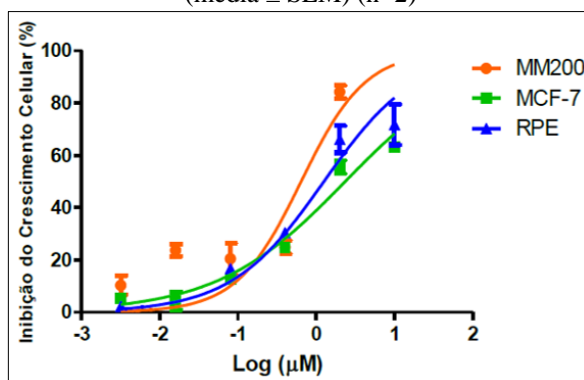
Extratos	5 µg/mL		50 µg/mL	
	Média	SEM	Média	SEM
<i>P. lilacinum</i> CCA	35,57	4,70	66,82	10,44
<i>P. lilacinum</i> CSA	0,3	5,38	44,55	1,64
<i>P. lilacinum</i> PCA	0,00	9,60	51,82	3,40
<i>P. lilacinum</i> PSA	56,85	1,85	87,54	2,74
<i>F. solani</i> CCA	5,79	11,21	22,57	12,54
<i>F. solani</i> CSA	5,18	6,46	0,00	5,03
<i>F. solani</i> PCA	15,22	4,77	9,44	5,46
<i>F. solani</i> PSA	25,15	12,51	52,07	8,73
Co cultivo CCA	52,21	5,30	60,09	5,27
Co cultivo CSA	19,91	6,46	76,26	10,10
Co cultivo PCA	73,82	0,43	98,56	0,82
Co cultivo PSA	6,22	9,79	98,88	0,018

Foi utilizado como controle positivo o composto doxorrubicina para as três linhagens de célula, MM-200, MCF-7 e RPE. As informações podem ser observadas na Figura 19 e Tabela 8 abaixo.

Tabela 8 - Regressão não linear do controle positivo doxorrubicina com concentrações de 0,0032 a 10 µM em linhagem de melanoma (MM-200), carcinoma mamário (MCF-7) e pigmento epitelial de retina humana (RPE) (média ± SEM) (n=2)

	MM-200	MCF-7	RPE
IC50	0,64	2,353	1,26
Intervalo de confiança – 95%	0,33 – 1,26	1,56 – 3,55	0,44 – 3,54
R²	0,86	0,96	0,86

Figura 19 - Regressão não linear do controle positivo doxorrubicina com concentrações de 0,0032 a 10 μM em linhagem de melanoma (MM-200), carcinoma mamário (MCF-7) e pigmento epitelial de retina humana (RPE) (média \pm SEM) (n=2)



Fonte: Figura obtida no ICB-USP sob supervisão da Prof. Dra. Leticia Lotufo, 2017.

4.5 Análise Qualitativa dos Extratos para Observação dos Efeitos da OSMAC

A OSMAC (*One Strain Many Compounds*) é uma abordagem que traz o conceito de variação metabólica através de diferentes formas de cultivo para um mesmo microrganismo. Portanto, a fim de evidenciar seus efeitos nos extratos desse trabalho, foram realizadas Análise de Componentes Principais a partir de dados de RMN ^1H , análises por GC-MS e LC-MS utilizando ferramentas de bioinformática como *Molecular Networking* e UNIFI para anotação dos diferentes metabólitos produzidos.

4.5.1 Análise de Componentes Principais

Para observarmos preliminarmente de forma estatística a diferença na produção metabólica dos fungos nas monoculturas e no co-cultivo (nos diferentes extratos obtidos – CCA, CSA, PCA e PSA) observando assim os efeitos da OSMAC, foi realizada uma Análise de Componentes Principais.

Os dados obtidos por ^1H RMN foram organizados em matriz, onde as linhas são relativas às amostras e as colunas representam as intensidades relativas em cada deslocamento.

Essa ferramenta quimiométrica foi aplicada a matriz, através do software Matlab, sendo feita a análise do conjunto amostral, o que gerou o gráfico de *scores* (Figura 20).

Em relação aos dados da PC1 (27,19%) e PC2 (23,29%), foi possível observar que o fungo *P. lilacinum* (Pl) não apresentou grande variação de metabólitos ao variar o seu cultivo, pois seus extratos em PDB, czapek, com ou sem agitação (PCA, PSA, CCA e CSA) aparecem muito próximos e no mesmo quadrante em que se encontram os valores negativos da PC1 e

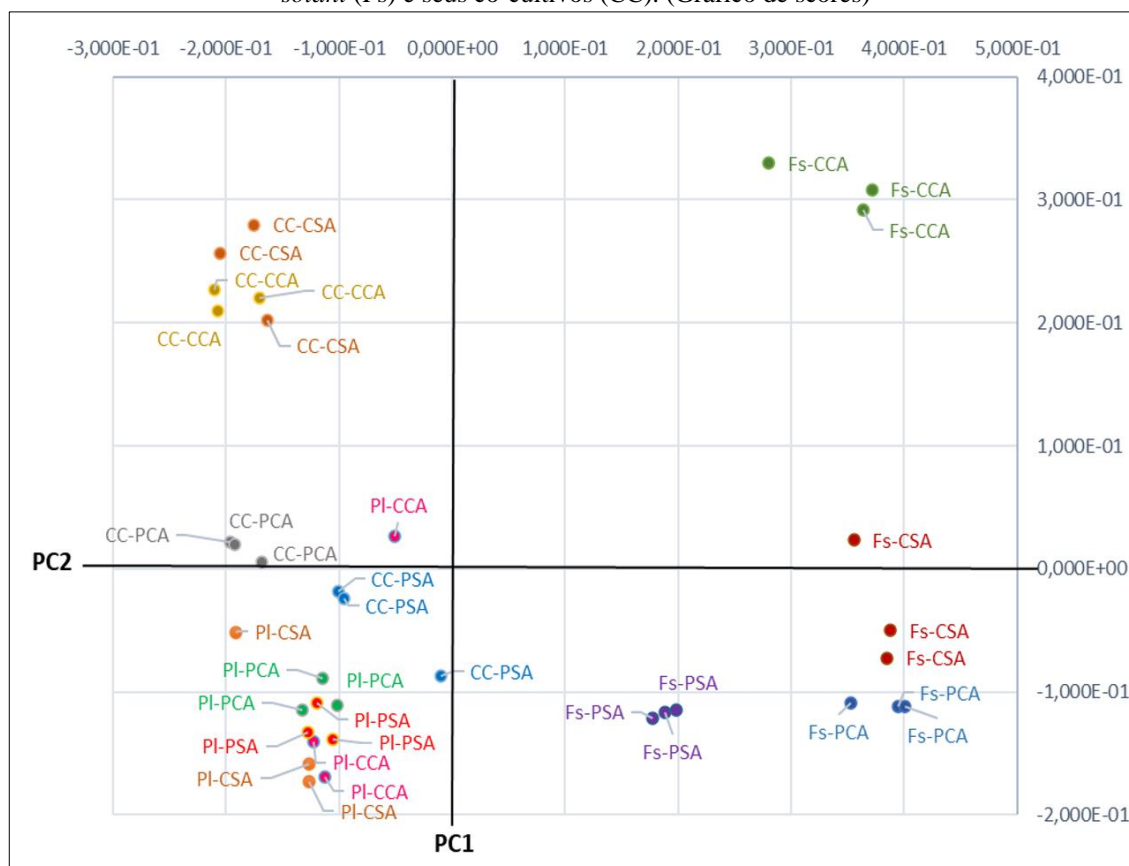
PC2. Diferente deste, os extratos de *F. solani* (Fs), apresentam-se mais distantes nos quadrantes, principalmente para o experimento CCA.

Também foi possível observar que de acordo com a PC1 e a PC2, os extratos de *P. lilacinum* (Pl) e *F. solani* (Fs) apresentam-se em regiões distintas do gráfico de *scores*, o que era esperado já que são fungos de gêneros diferentes. *P. lilacinum* (Pl) aparece na porção negativa da PC1 enquanto *F. solani* (Fs) aparece do lado positivo da PC1, sugerindo diferenças na produção de metabólitos.

O co-cultivo (CC) em czapek com e sem agitação (CCA e CSA) não apresentaram quase variação em relação às PCs analisadas, considerando que a agitação não foi significativa na produção de metabólitos diferentes em meio czapek. Outra observação interessante foi que o co-cultivo (CC) PSA está muito próximo aos grupos da monocultura de *P. lilacinum* (Pl), podendo concluir que de acordo com a PC1 e PC2, nesse co-cultivo o fungo *P. lilacinum* (Pl) apresentou comportamento dominante na produção de metabólitos quando cultivado em conjunto com *F. solani* (Fs). Porém, os co-cultivos que foram realizados em czapek, apresentaram-se mais diferentes possíveis das monoculturas.

Dessa forma é possível obter uma visão geral de todos os extratos das monoculturas e co-cultivos, de forma a evidenciar diferenças metabólicas em relação a OSMAC. Foi possível visualizar principalmente em relação aos metabólitos majoritários que são observados no RMN.

Figura 20 - Análise de Componentes Principais (PC1xPC2) dos fungos *Purpureocillium lilacinum* (PI) e *F. solani* (Fs) e seus co-cultivos (CC). (Gráfico de scores)



Fonte: Figura obtida pela autora, no Excel, 2017.

4.5.2 GC-MS

Os extratos foram analisados por GC-MS para observarmos os metabólitos referentes às monoculturas dos fungos *F. solani* e *P. lilacinum* e seus co-cultivos, de acordo com a OSMAC. Os brancos dos meios de cultura também foram analisados.

A primeira etapa foi realizar a derivatização dos extratos, para obter a possibilidade de análise de substâncias não-voláteis. A derivatização melhora a separação e análise cromatográfica, pois substitui os hidrogênios ativos de grupos funcionais polares, evitando a formação de ligações de hidrogênio entre as moléculas providenciando a capacidade de serem analisadas por cromatografia gasosa, tornando-as termicamente estáveis. Fornece também estabilidade térmica e a capacidade de melhorar a separação de substâncias enantioméricas, por exemplo, pois em amostras derivatizadas essas substâncias podem apresentar propriedades diferentes, o que muitas vezes não se observa em amostras sem a modificação química (MOLDOVEANU; DAVID, 2019).

A silição, utilizada nessas análises, ativa as moléculas através dos grupos OH, COOH, SH, NH, CONH, POH SOH, pela substituição por um grupo sili e a metoximação transforma cetonas e aldeídos em iminas diminuindo a polaridade e melhorando a análise por GC-MS (MOLDOVEANU; DAVID, 2019).

A segunda etapa foi calcular o índice de retenção dos metabólitos do extrato e compará-los com os valores fornecidos pela NIST, através da equação de Van den Dool e Kratz para análises de GC realizadas sob rampa de temperatura. Para o cálculo os valores de tempo de retenção dos padrões de hidrocarbonetos (C9-C40) adquiridos nos mesmos parâmetros cromatográficos foram utilizados.

A combinação de GC-MS com a biblioteca NIST foi uma estratégia de combinação de informações entre perfis espectrais e índice de retenção bastante eficientes, obtendo um *fingerprint* dos extratos. Além disso, também foi considerado o índice de similaridade entre o espectro real e o espectro disponível do software.

Uma terceira etapa foi verificar o perfil de fragmentação de metabólitos que não apresentaram índice de retenção disponíveis na base de dados (Figuras 21-36 abaixo).

Foi observado que a derivatização não foi muito eficiente e, portanto, a maioria dos íons moleculares observados não estão derivatizados. Ou como em alguns casos, foi observada a presença de substâncias derivatizadas e também a presença delas sem a modificação. Porém essa evidência não prejudicou de forma significativa essas análises.

A Tabela 9 apresenta os metabólitos identificados através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, onde encontram-se os valores de I_R (índice de retenção) calculado e também da literatura, do t_R (tempo de retenção da substância) e da similaridade descrita pelo software GC-solution.

Foram anotados 46 metabólitos, entre eles, ácidos orgânicos, ésteres, alcaloides, esteróis, dicetopiperazinas entre outros. E as estruturas químicas de todos os metabólitos podem ser encontradas no Apêndice C.

Algumas observações foram feitas e mostraram como diferentes formas de cultivo estimulam a produção de diferentes metabólitos. Isso pode ser considerado pelo fato de terem sido observados compostos exclusivos nas monoculturas ou nos co-cultivos. Além de ter sido evidenciado que o meio de cultura e agitação também afetam a produção metabólica desses fungos. Sob essa ótica, o co-cultivo foi a forma que mais estimulou diferentes metabólitos, quando comparados com as monoculturas. As substâncias **5, 7, 17, 21, 23, 30, 33, 34, 41, 43, 44 e 45** da Tabela 9, foram observados apenas nos co-cultivos e não estão presentes nas monoculturas (As estruturas podem ser observadas no Apêndice C).

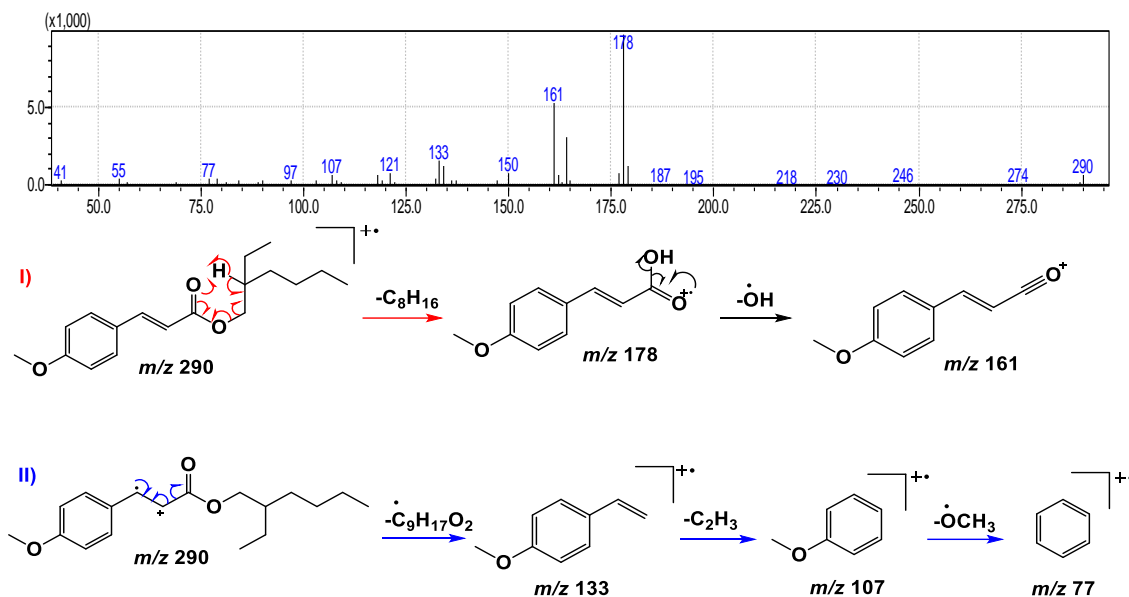
A substância **5**, ácido dodecanóico, é considerado um *quorum sensing* (mecanismo de regulação de genes em resposta a aumentos na densidade populacional) que pode auxiliar em processos de virulência, antibióticos e outros fatores, e já foi relatada por ser responsável pelo aumento de piocianina em *Pseudomonas* causadoras de infecções hospitalares. Sendo assim, sua produção apenas no co-cultivo sugere que essa molécula auxilia na produção de algum fator de competição que está ocorrendo entre os dois fungos em contato (KWAN *et al.*, 2011).

Por outro lado, algumas substâncias, podem também, ser inibidoras da rede de interação *quorum sensing* de alguns microrganismos, como forma de defesa, que faz parte de uma interação ecológica (CHERNIN *et al.*, 2011). Esse também pode ser um dos motivos pelo qual o co-cultivo apresentou muitos metabólitos que não foram detectados nas monoculturas.

Outras observações foram avaliadas, como o ácido oleico, **10**, que a sua produção foi realizada por *P. lilacinum* e permaneceu no co-cultivo. Enquanto o ácido palmítico (**11a** e **11b**) foi produzido por *F. solani*, *P. lilacinum* e co-cultivo, já que se trata de um ácido graxo comum de metabolismo primário de fungos (FRANCISCO; SALDANHA; FRAGA, 2017).

As substâncias **25** e **46** foram produzidos apenas em czapek enquanto a substância **26** foi produzida apenas em PDB. Além disso as substâncias **1**, **2**, **3**, **8**, **12**, **14**, **22** e **42**, da Tabela 9, foram observadas apenas na monocultura de *P. lilacinum*, que variou nos extratos de PCA, PSA, CCA e CSA. E o mesmo observou-se para *F. solani* com as substâncias **15**, **18**, **20** e **38** (As estruturas podem ser observadas no Apêndice C). Dessa forma, foi possível evidenciar claramente como a abordagem OSMAC influencia diretamente os genes biossintéticos dos fungos levando a diferentes vias metabólicas.

Figura 21 - Proposta de fragmentação da substância ácido 2-propenóico-3-(4-metoxifenil)-2-etilhexil éster (1) por ionização por elétrons em GC-MS



* As Figuras 21-36 foram elaboradas pela autora (2020), e os espectros foram obtidos no software GC-Solution.

Figura 22 - Proposta de fragmentação da substância ácido 3-hidróxi-decanóico (2) por ionização por elétrons em GC-MS

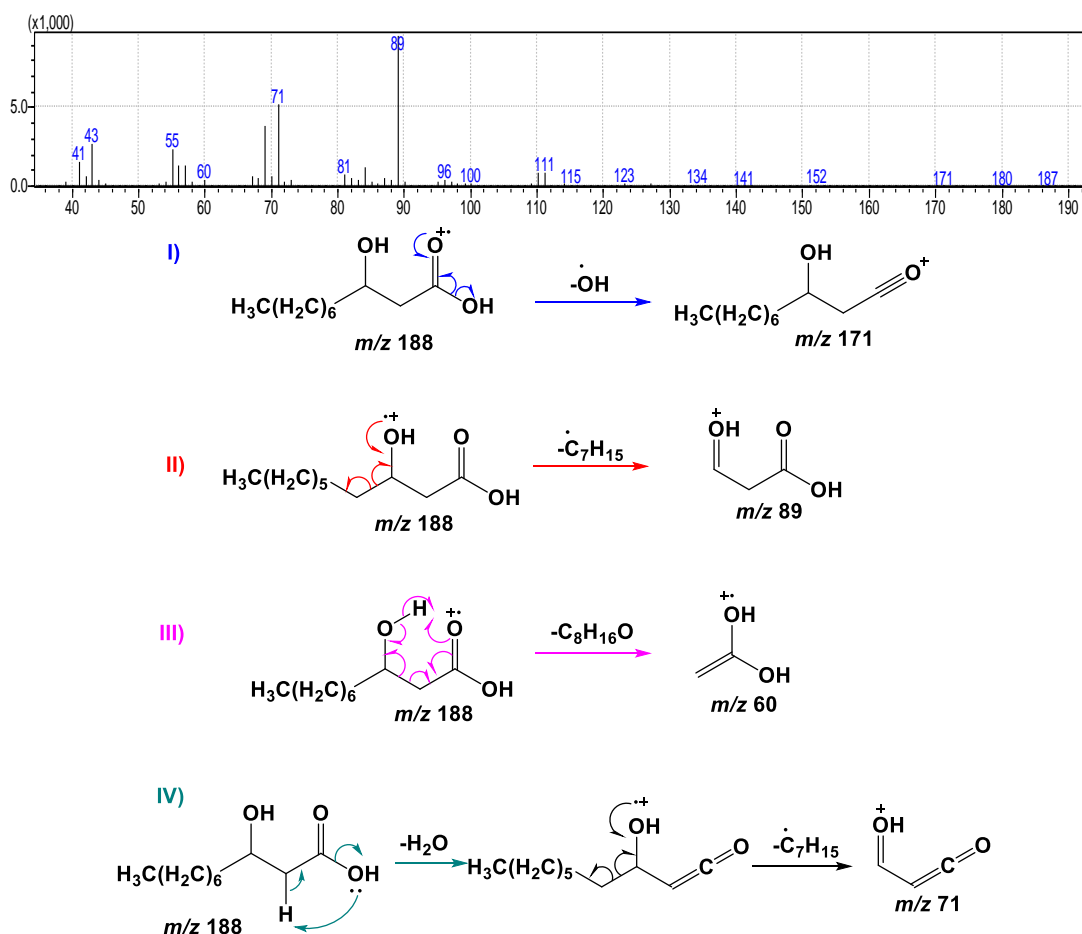


Figura 23 - Proposta de fragmentação da substância 1-indolicarboxaldeído-2-hidróxi-7-metil (17) por ionização por elétrons em GC-MS

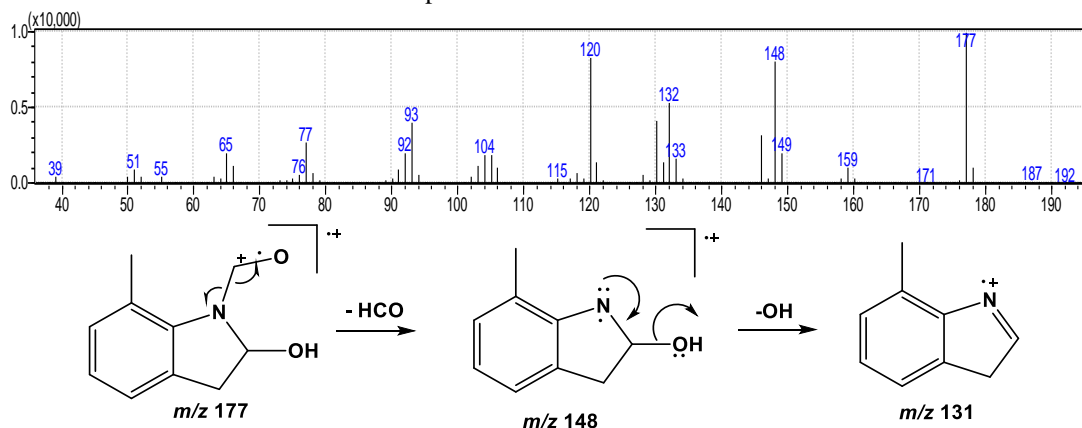


Figura 24 - Proposta de fragmentação da substância lumicroma (18) por ionização por elétrons em GC-MS

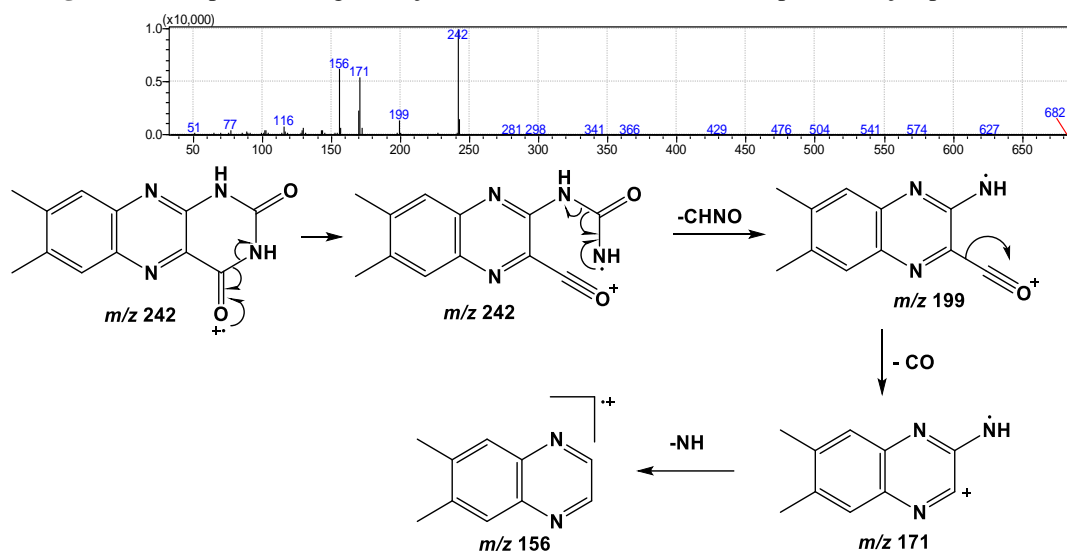


Figura 25 - Proposta de fragmentação da substância erucilamida (23) por ionização por elétrons em GC-MS

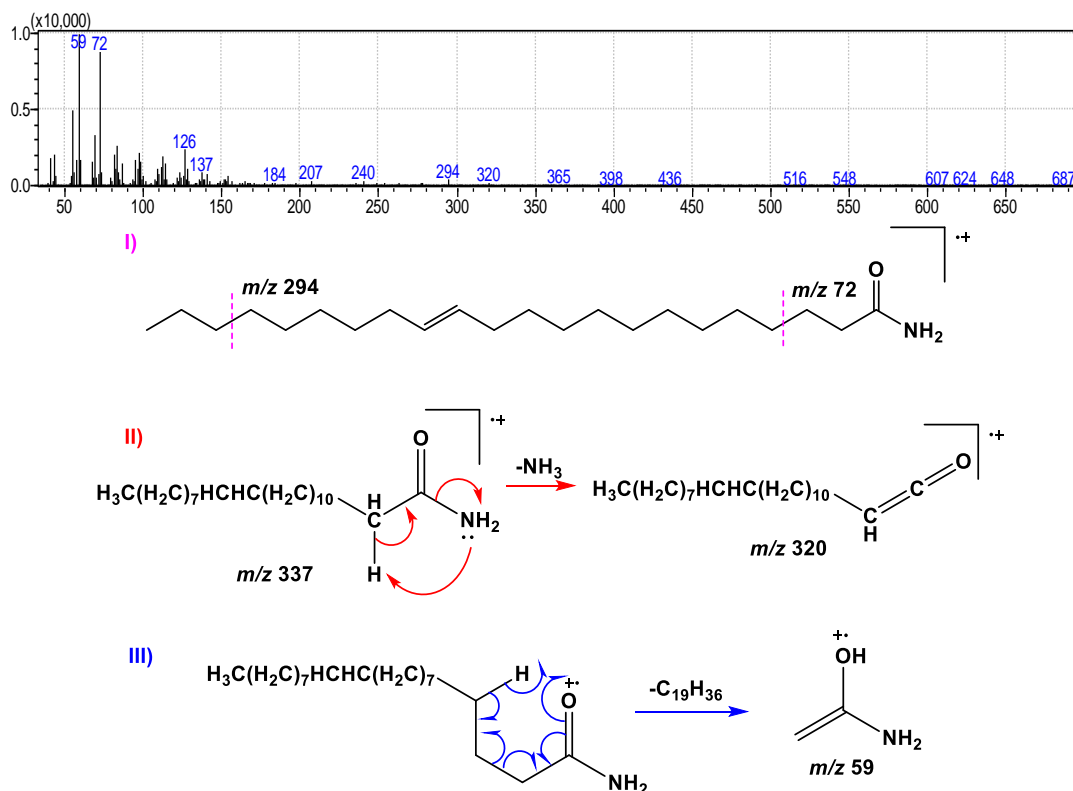


Figura 26 - Proposta de fragmentação da substância tetradecanamida (26) por ionização por elétrons em GC-MS

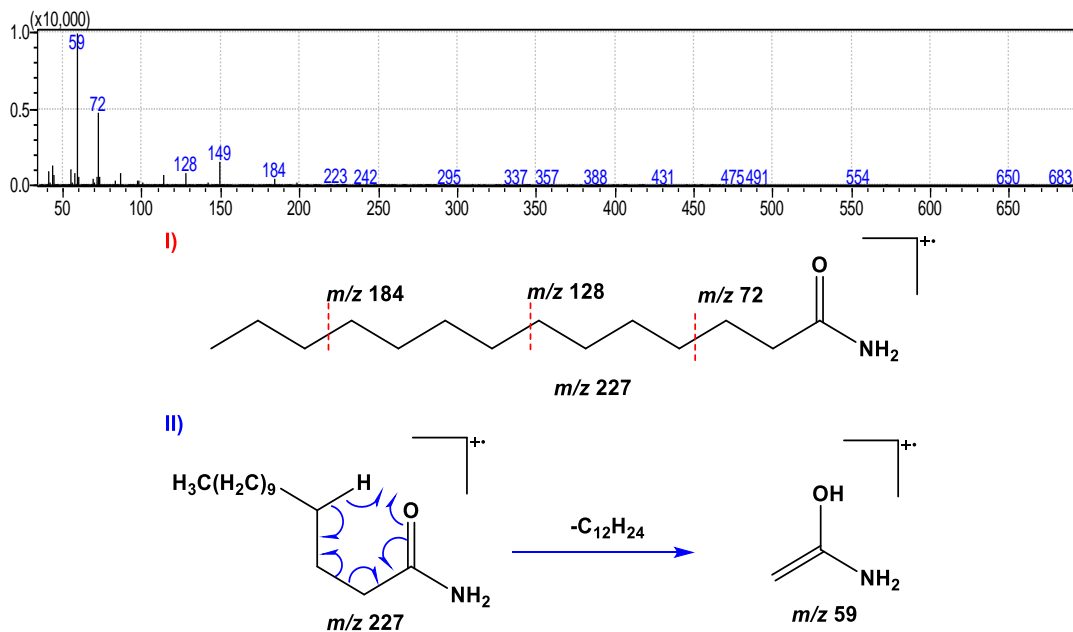


Figura 27 - Proposta de fragmentação da substância 2,5-piperazinediona-3-(fenilmetil) (**28**) por ionização por elétrons em GC-MS

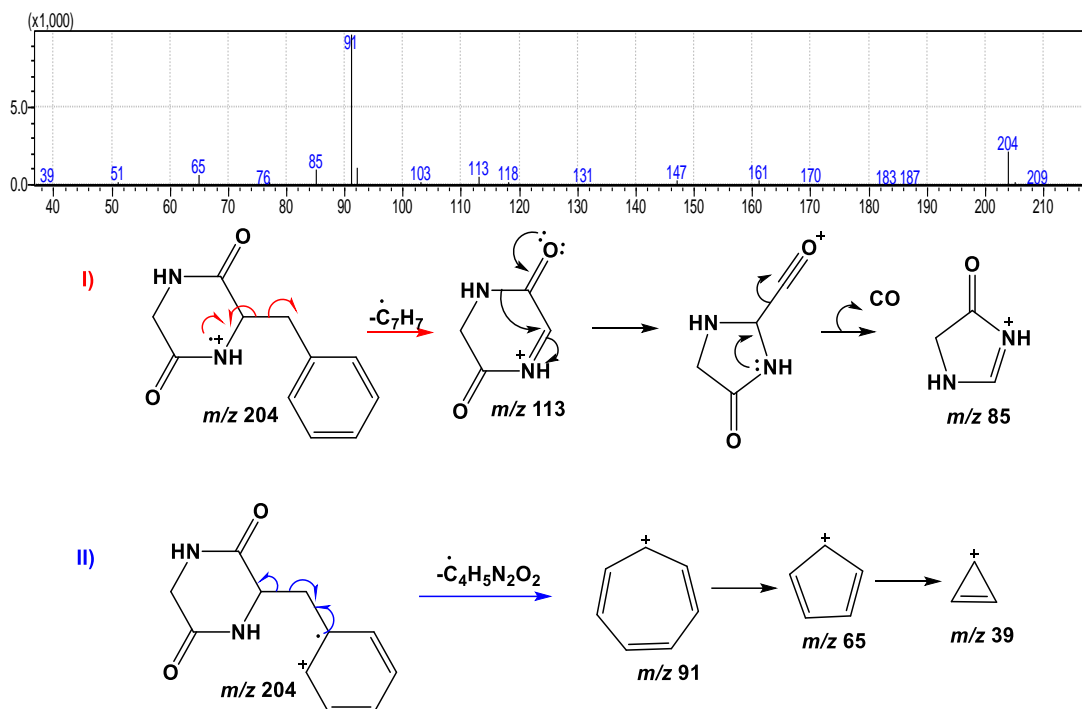


Figura 28- Proposta de fragmentação da substância 2,5-piperazinediona-3,6-bis(fenilmetil) (**29**) por ionização por elétrons em GC-MS

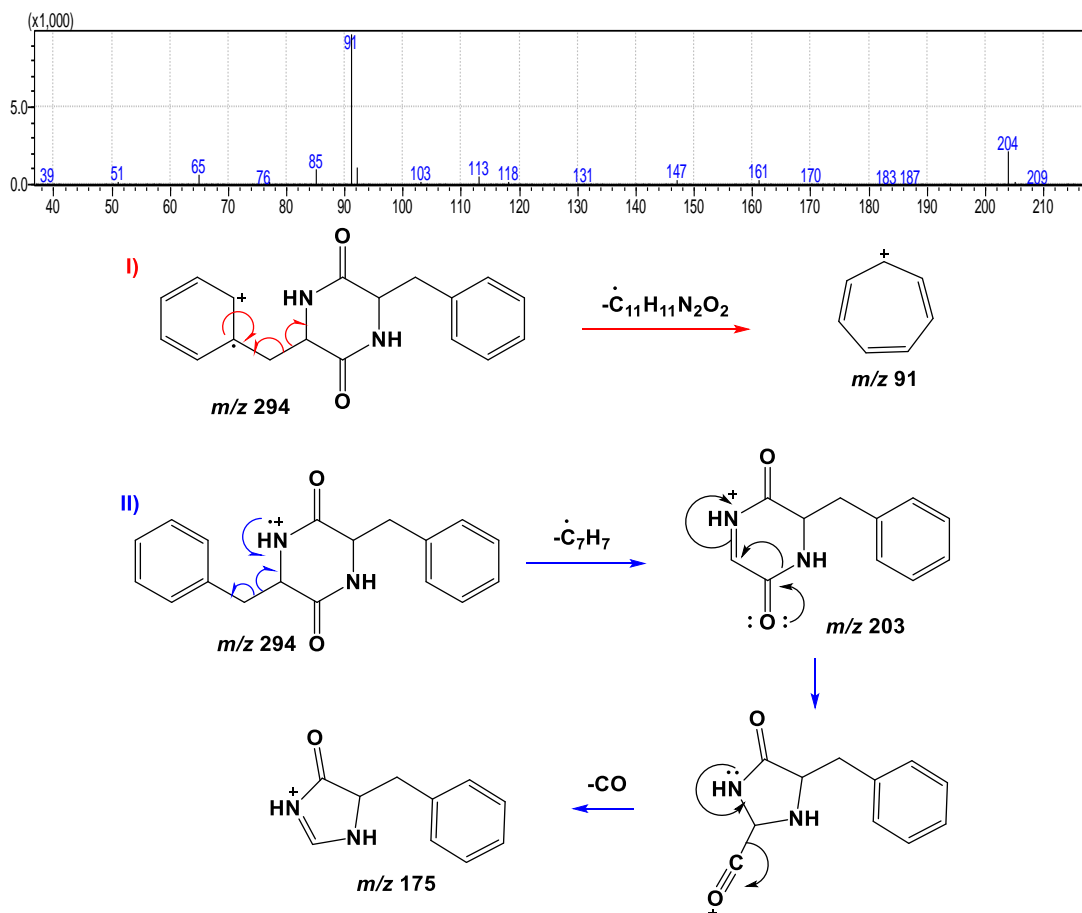


Figura 29- Proposta de fragmentação da substância 3-(hidroximetil)piperazina-2,5-diona (**30**) por ionização por elétrons em GC-MS

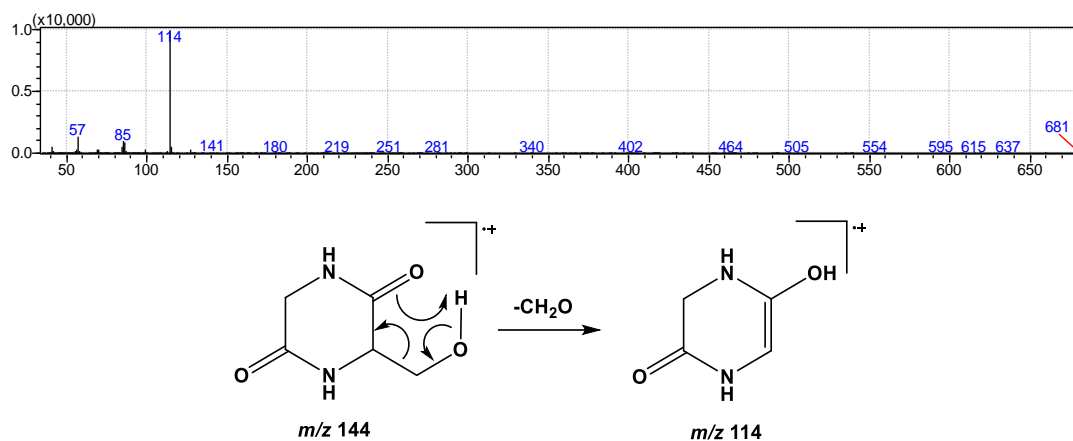


Figura 30 - Proposta de fragmentação da substância dehidroergosterol (**35**) por ionização por elétrons em GC-MS

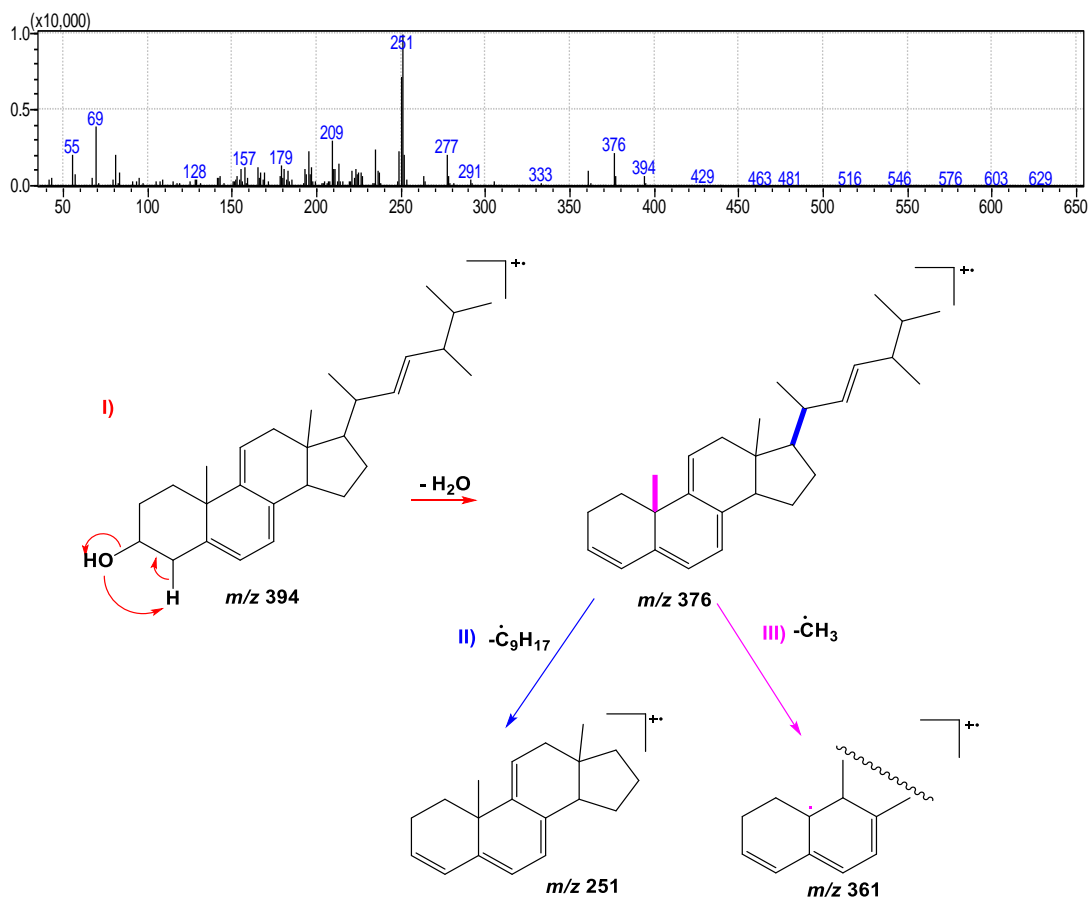


Figura 31 - Proposta de fragmentação da substância γ -sistosterol (36) por ionização por elétrons em GC-MS

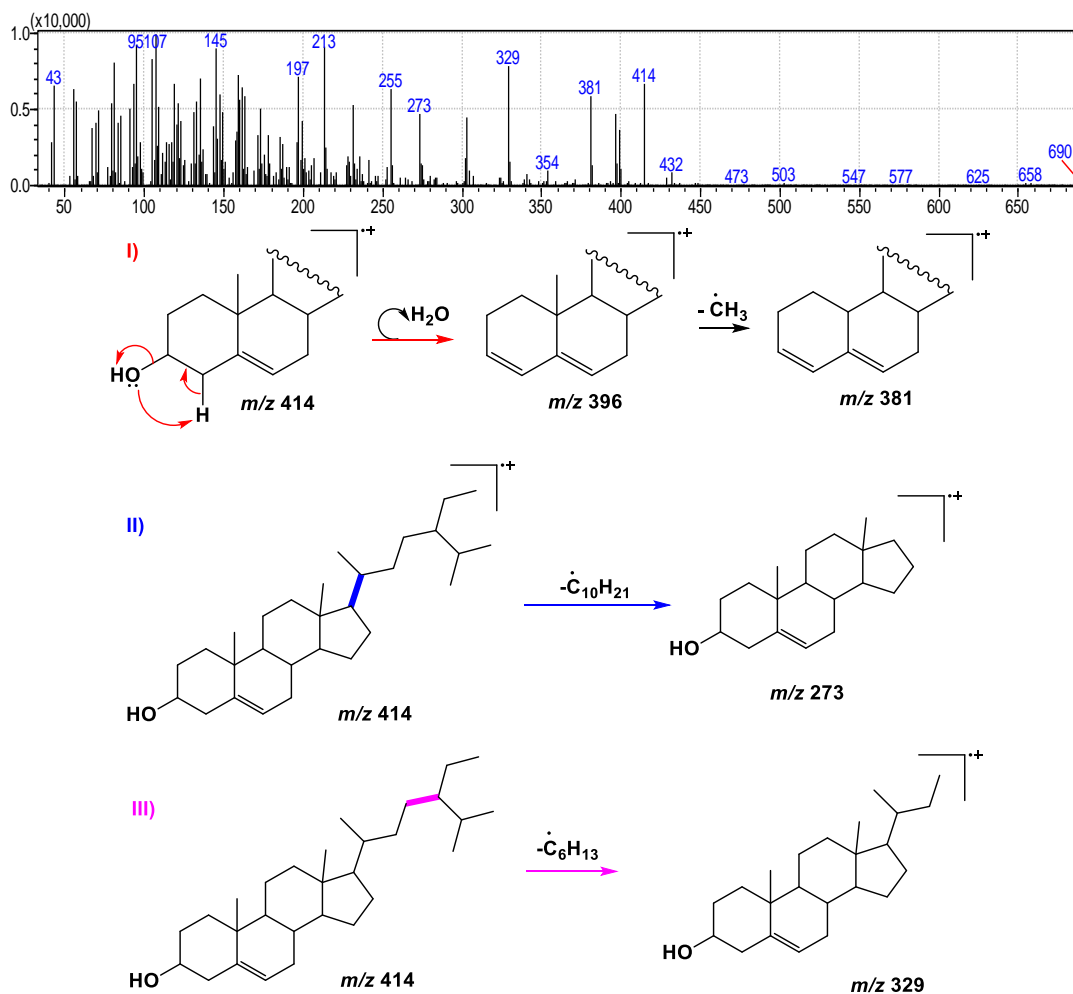


Figura 32 - Proposta de fragmentação da substância 2-pirrolidina-1-decil (38) por ionização por elétrons em GC-MS

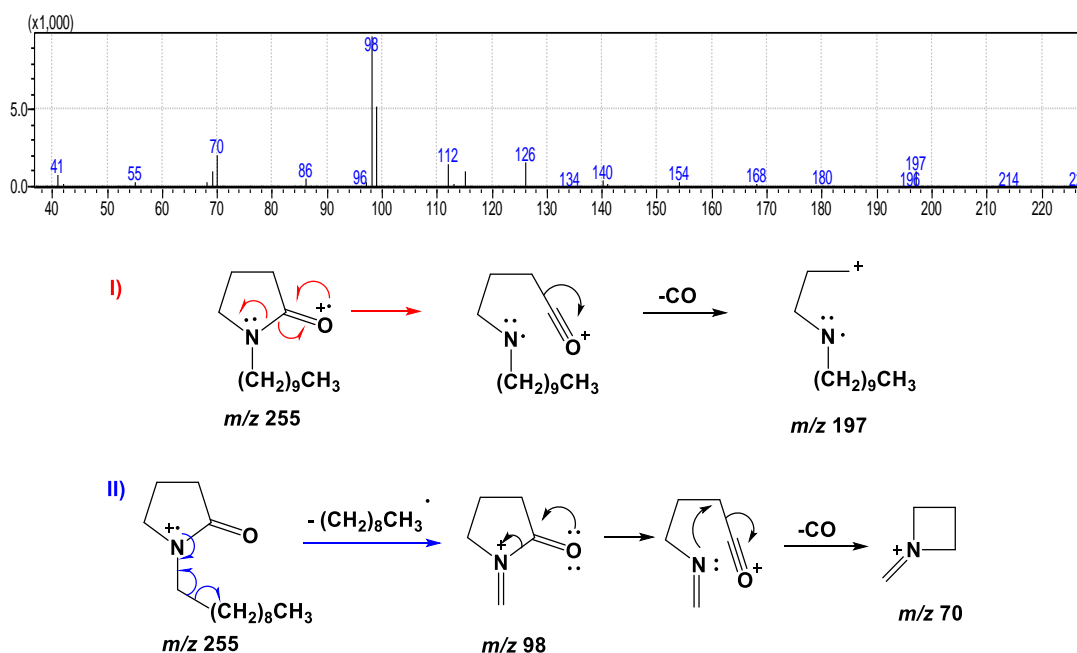


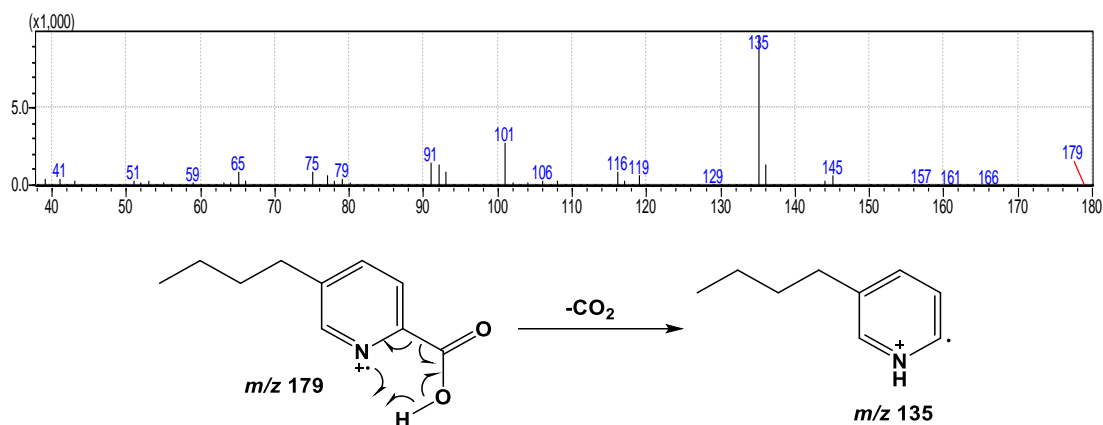
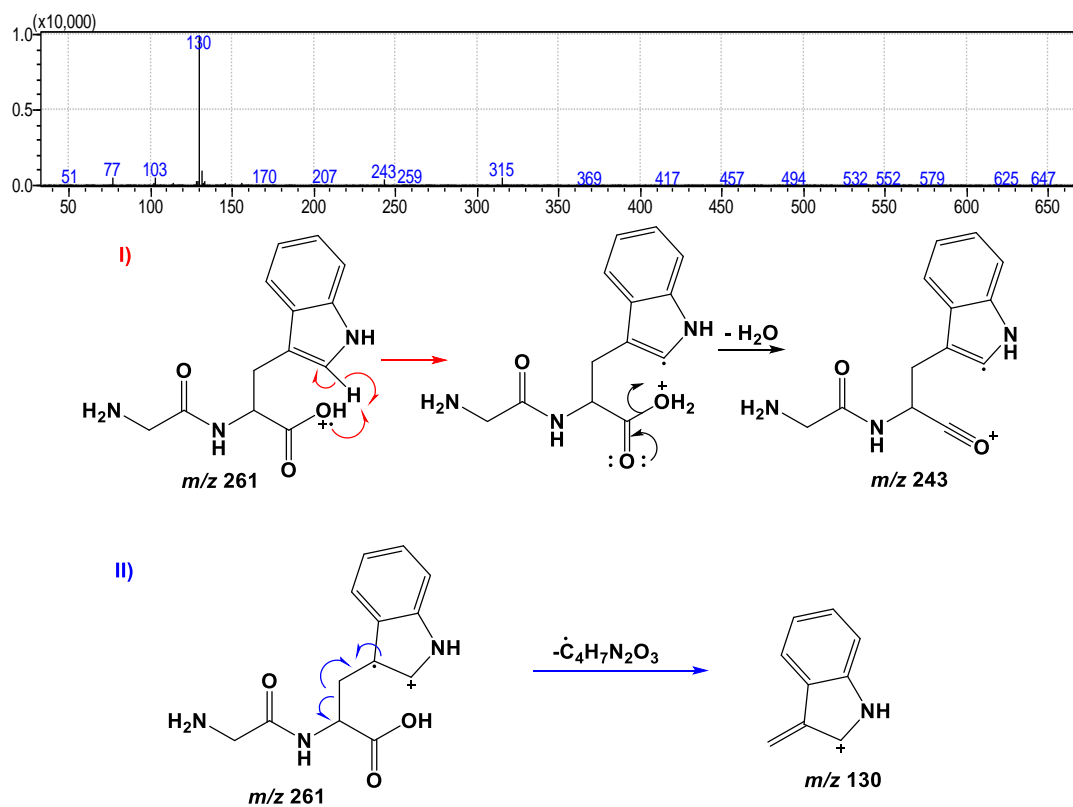
Figura 33 - Proposta de fragmentação da substância ácido fusárico (42) por ionização por elétrons em GC-MS**Figura 34** - Proposta de fragmentação da substância glicil-L-triptofano (43) por ionização por elétrons em GC-MS

Figura 35 - Proposta de fragmentação da substância benzenoetanol- α -(fenilmetil) (**44**) por ionização por elétrons em GC-MS

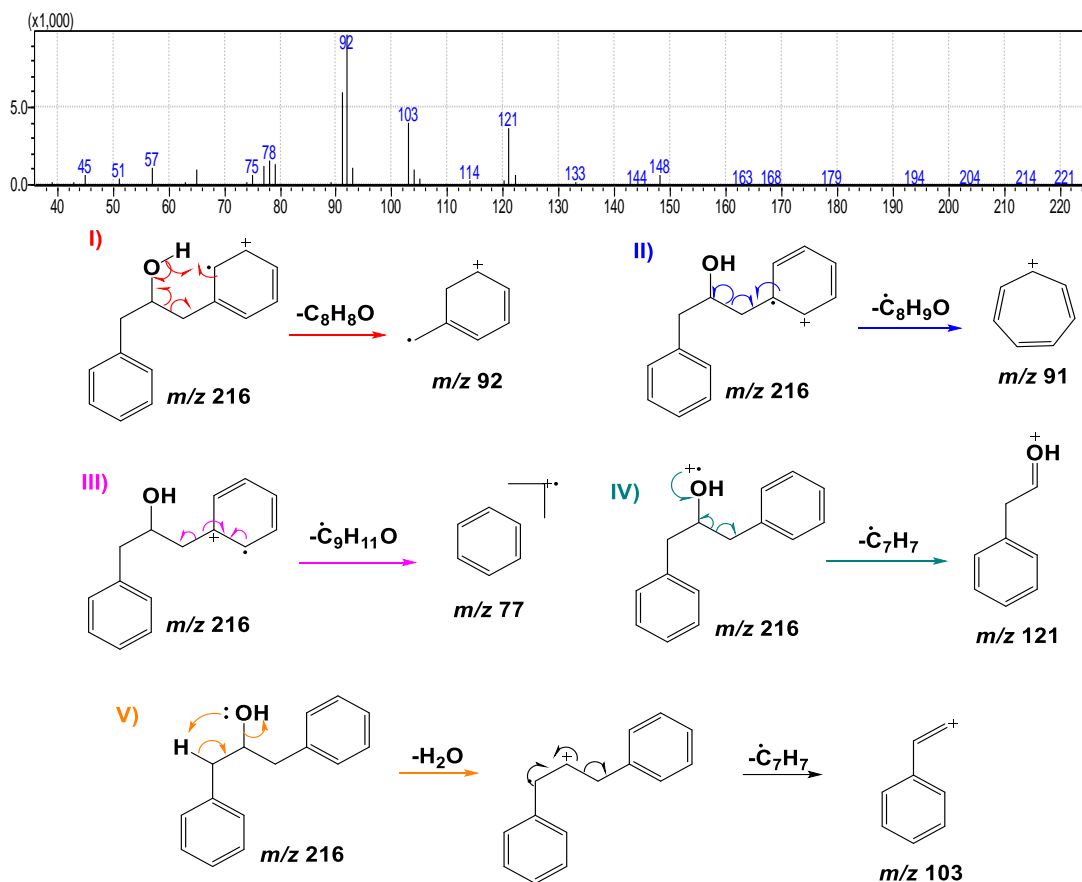


Figura 36 - Proposta de fragmentação da substância éter cis-2-penten-1-ol-trimetilsilil (**46**) por ionização por elétrons em GC-MS

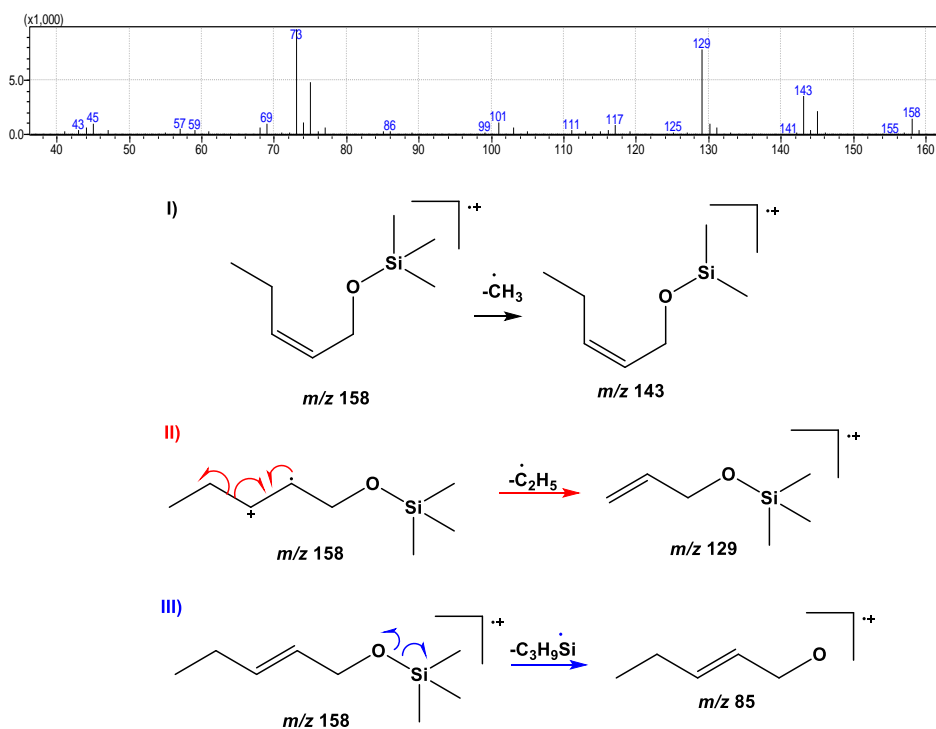


Tabela 9 - Metabólitos anotados por GC-MS para *F. solani*, *P. lilacinum* e co-cultivo nos diferentes tipos de cultivo

(Continua)

Nº	Molécula	Extrato	t _R (min.)	I _{Rcalc.}	I _{Rlit}	ΔIR	Similaridade (%)
Ácidos Orgânicos							
1	2-propenóico-3-(4-metoxifenil)-2-etilhexil éster	<i>P. lilacinum</i> (PCA)	31,3	2323	-	-	81
2	ácido 3-hidroxicadecanóico	<i>P. lilacinum</i> (CSA)	7,8	1524	-	-	92
3	ácido 6-octadecanóico-trimetilsilil éster	<i>P. lilacinum</i> (CCA)	28,4	2220	2211	9	87
4	ácido cis-6-octadecenóico-metil éster	<i>P. lilacinum</i> (CCA) <i>F. solani</i> (PCA)	24,9	2101	2104	3	88
5	ácido dodecanóico	Co-cultivo (CCA, CSA, PCA, PSA)	8,7	1559	1558	1	91
6	ácido linoleico	<i>P. lilacinum</i> (CCA) <i>F. solani</i> (PCA, PSA) Co-cultivo (CCA, CSA, PSA)	25,9	2137	2136	1	90
7	ácido mevalônico-mono-trimetilsilil	Co-cultivo (CCA, CSA)	5,0	1395	1393	2	90
8	ácido <i>N</i> -decanóico	<i>P. lilacinum</i> (CCA)	4,6	1388	1387	1	90
9a	ácido octadecanóico	<i>P. lilacinum</i> (PCA) <i>F. solani</i> (CSA, PCA) Co-cultivo (CCA, PCA, PSA)	26,8	2165	2164	1	91
9b	ácido octadecanóico-trimetilsilil éster	<i>P. lilacinum</i> (CCA)	29,1	2246	2243	3	89

Tabela 9 - Metabólitos anotados por GC-MS para *F. solani*, *P. lilacinum* e co-cultivo nos diferentes tipos de cultivo

(Continuação)

Nº	Molécula	Extrato	t _R (min.)	I _R calc.	I _R lit	ΔIR	Similaridade (%)
10	ácido oleico	<i>P. lilacinum</i> (CCA, CSA, PCA, PSA) Co-cultivo (CCA, PSA)	26,1	2144	2147	3	91
11a	ácido palmítico	<i>F. solani</i> (CCA, CSA, PCA, PSA) <i>P. lilacinum</i> (PSA) Co-cultivo (CCA, CSA, PCA, PSA)	20,7	1964	1963	1	93
11b	ácido palmítico-trimetilsilil éster	<i>P. lilacinum</i> (CCA)	23,3	2049	2040	9	89
12	ácido palmítoleico	<i>P. lilacinum</i> (CCA)	20,0	1944	1953	9	90
13	ácido pentadecanóico	<i>P. lilacinum</i> (CCA, PCA, PSA) <i>F. solani</i> (PCA, PSA) Co-cultivo (CCA, CSA, PSA)	17,5	1861	1865	4	90
14	ácido <i>trans</i> -9-octadecenoico-trimetilsilil éster	<i>P. lilacinum</i> (CCA)	28,6	2227	2227	0	89
Alcaloides							
15	4-metilindol	<i>F. solani</i> (PSA)	7,0	1485	1479	6	93
16	harman	<i>P. lilacinum</i> (PCA) <i>F. solani</i> (PCA, PSA)	21,2	1980	1975	5	95
17	1-indolicarboxaldeído-2-hidróxi-7-metil	Co-cultivo (PSA)	10,4	1624	-	-	81

Tabela 9 - Metabólitos anotados por GC-MS para *F. solani*, *P. lilacinum* e co-cultivo nos diferentes tipos de cultivo

							(Continuação)
Nº	Molécula	Extrato	t _R (min.)	I _R calc.	I _R lit	ΔIR	Similaridade (%)
18	lumicroma	<i>F. solani</i> (PCA, PSA) Co-cultivo (CCA, PSA)	42,2	2741	-	-	88
Álcoois							
19	1-dodecanol	<i>F. solani</i> (CSA) Co-cultivo (CCA, CSA, PCA)	6,7	1474	1473	1	91
20	hexadecanol	<i>F. solani</i> (PCA)	18,0	1880	1876	4	86
21	tetradecanol	Co-cultivo (PCA)	11,9	1677	1676	1	94
Amidas							
22	2-fenilacetamida	<i>P. lilacinum</i> (PCA)	5,5	1409	1411	2	94
23	erucilamida	Co-cultivo (CCA, CSA, PCA)	43,2	2781	-	-	88
24	hexadecanamida	<i>F. solani</i> (CSA, PSA) Co-cultivo (CCA, CSA, PCA)	27,2	2181	2182	1	91
25	octadecanamida	<i>F. solani</i> (CSA) Co-cultivo (CCA, CSA)	33,1	2388	2398	10	88
26	tetradecanamida	<i>F. solani</i> (CSA) Co-cultivo (CCA)	20,9	1972	-	-	91
27	<i>N</i> -(2-fenil)-acetamida	<i>F. solani</i> (CSA, PSA) Co-cultivo (CSA, PCA)	7,8	1520	1513	7	95

Tabela 9 - Metabólitos anotados por GC-MS para *F. solani*, *P. lilacinum* e co-cultivo nos diferentes tipos de cultivo

Nº	Molécula	Extrato	t _R (min.)	I _R calc.	I _R lit	ΔIR	Similaridade (%)
Dicetopiperazinas							
28	2,5-piperazinadiona-3-(fenilmetil)	<i>P. lilacinum</i> (PSA) <i>F. solani</i> (PSA, PCA) Co-cultivo (PSA, PCA)	27,1	2181	-	-	81
29	2,5-piperazinadiona-3,6-bis(fenilmetil)	<i>P. lilacinum</i> (CSA, CCA, PSA, PCA) Co-cultivo (CSA, CCA, PCA)	43,6	2798	-	-	90
30	3-(hidroximetil)piperazina-2,5-diona	Co-cultivo (PCA, PSA)	14,7	1773	-	-	86
Ésteres							
31	metil linoleato	<i>F. solani</i> (PCA) Co-cultivo (CCA)	24,7	2095	2092	3	91
32	metil octadecanoato	<i>F. solani</i> (CCA, PCA) Co-cultivo (CCA)	25,6	2128	2128	0	91
33	metil-elaidato	Co-cultivo (CCA)	24,8	2101	2109	8	89
34	metil-palmitato	Co-cultivo (CCA)	19,5	1927	1926	1	87
Esteróis							
35	dehidroergosterol	<i>F. solani</i> (PCA) Co-cultivo (CCA, PSA)	52,0	3174	-	-	82

Tabela 9 - Metabólitos anotados por GC-MS para *F. solani*, *P. lilacinum* e co-cultivo nos diferentes tipos de cultivo

							(Continuação)
Nº	Molécula	Extrato	t _R (min.)	I _R calc.	I _R lit	ΔIR	Similaridade (%)
36	γ-sitosterol	<i>F. solani</i> (PSA)	55,1	3329	-	-	88
Outros metabólitos							
37	2,4-di-tert-butilfenol	<i>F. solani</i> (CSA, PSA) Co-cultivo (CSA)	7,6	1516	1513	3	91
38	2-pirrolidina-1-decil	<i>F. solani</i> (PCA)	12,7	1706	-	-	84
39	4'-hidroacetofenona	<i>P. lilacinum</i> (PCA)	6,2	1446	1447	1	82
		Co-cultivo (PCA)	6,2	1446		1	89
40a	tirosol	<i>F. solani</i> (CSA) Co-cultivo (CSA, PCA)	5,9	1431	1431	0	97
40b	4-hidroxifeniletanol-2-trimetilsilil	Co-cultivo (PCA)	9,2	1578	1568	10	91
41	7,9-di-tert-butil-1-oxaespino[4,5]deca-6,9-dieno-2,8-diona	Co-cultivo (CSA, PSA)	19,4	1924	1916	8	89
42	ácido fusárico	<i>P. lilacinum</i> (CSA)	10,2	1616	-	-	82
43	glicil- <i>L</i> -triptofano	Co-cultivo (PSA)	46,3	2914	-	-	86
44	benzenoetanol-α-(fenilmetil)	Co-cultivo (PSA)	5,8	1428	-	-	86

Tabela 9 - Metabólitos anotados por GC-MS para *F. solani*, *P. lilacinum* e co-cultivo nos diferentes tipos de cultivo

Nº	Molécula	Extrato	t _R (min.)	I _R calc.	I _R lit	ΔIR	(Conclusão)
							Similaridade (%)
45	1,2-difenoxietano	Co-cultivo (CSA, PCA, PSA)	15,9	1811	1810	1	88
46	éter cis-2-penten-1-ol-trimetilsilil	<i>P. lilacinum</i> (CCA)	7,4	1505	-	-	82
		<i>F. solani</i> (CCA)	7,4	1506	-	-	83

4.5.3 Análise das Redes de Interações Moleculares - Molecular Networking (GNPS)

Uma rede de interações moleculares (*Molecular Networking*) foi criada usando o *workflow* on-line na plataforma GNPS, através dos espectros obtidos por HPLC-ESI-microTOF II-TOF-MS, com experimentos em Auto (MSⁿ).

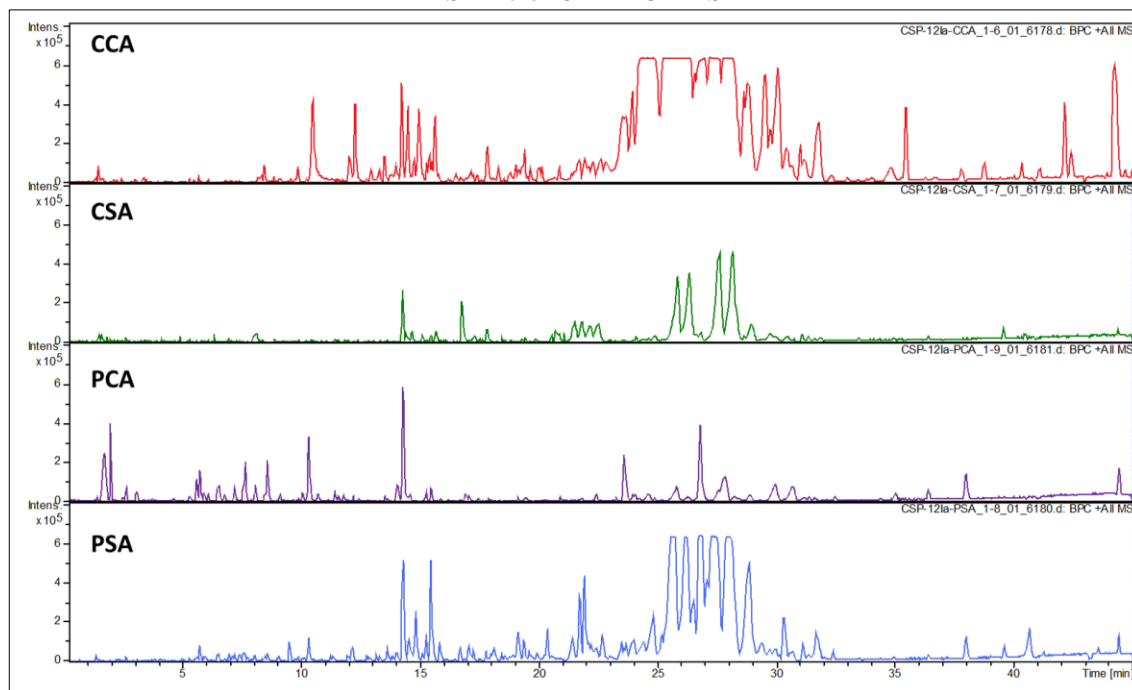
Os espectros obtidos foram realizados a partir de análises DDA (*data-dependent acquisition*) (WANG *et al.*, 2016) em que cada íon precursor está associado a um espectro de fragmentação e um número limitado de íons são analisados por intervalo de tempo. De fato esse método de análise pode trazer algumas limitações, como não selecionar íons de baixa abundância ou aqueles que co-eluem, perdendo algumas informações dos extratos (FENAILLE *et al.*, 2017), mas de modo geral, tem funcionado de forma eficiente em análises de misturas complexas.

Os perfis obtidos dos extratos por HPLC-ESI-microTOF II-TOF-MS estão apresentados nas Figuras 37-39. Foi possível observar como a OSMAC afeta a produção de metabólitos dos microrganismos, observando vários sinais que diferem entre eles nos espectros, e poucos sinais que são coincidentes entre todos eles.

A rede de interações moleculares foi construída com dados espectrais (LC-MS/MS) dos extratos de *F. solani*, *P. lilacinum* e co-cultivo, contendo os 12 experimentos (CSA, CCA, PSA e PCA), que permitiu a visualização de moléculas relatadas na base de dados do GNPS em comparação com os dados experimentais de MS/MS. Nesse trabalho, foram considerados os valores de cosseno de 0,7 a 0,95 para o agrupamento dos espectros em um *cluster*, e aqueles que apresentaram valores de cosseno acima de 0,95 foram agrupados pelo MS-Cluster gerando um espectro de consenso.

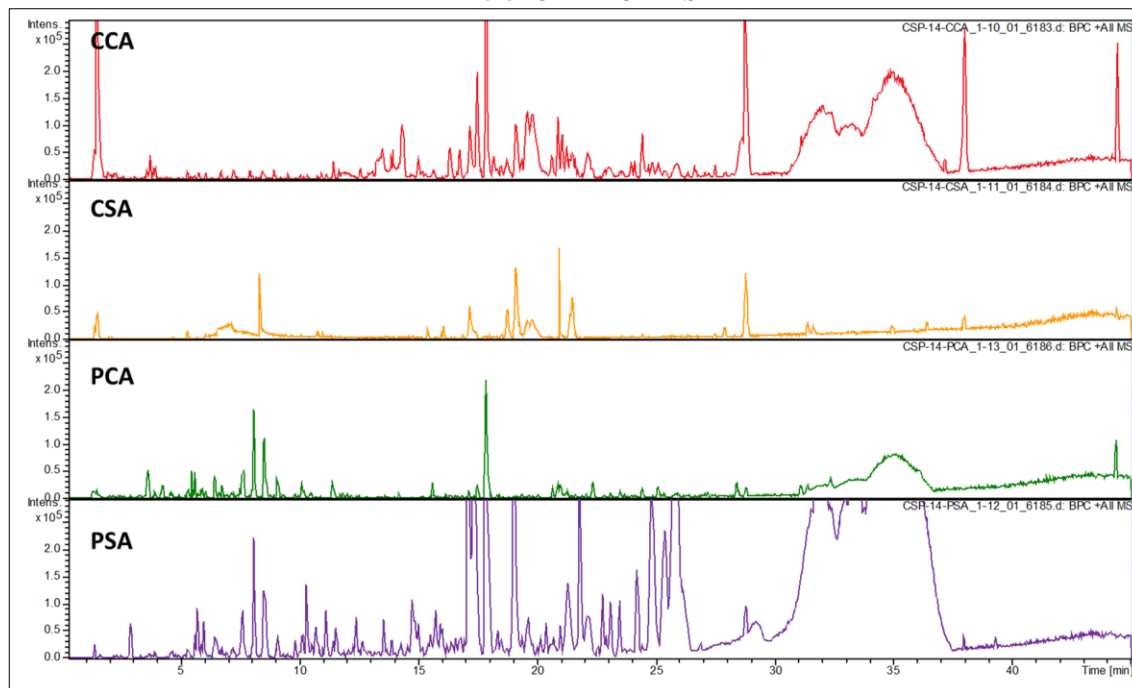
Foram estabelecidas cores aos nodos, no Cytoscape, para a diferenciação dos extratos dos fungos e do co-cultivo, sendo **Amarelo: Co-cultivo**, **Azul: *P. lilacinum*** e **Vermelho: *F. solani***. E a largura dos arcos está atribuída aos valores de cosseno, quanto maior a espessura do arco, maior a similaridade espectral.

Figura 37 - Perfil metabólico BPC de *P. lilacinum* nos diferentes cultivos (CCA, CSA, PCA, PSA) em HPLC-ESI-microTOF II-TOF-MS



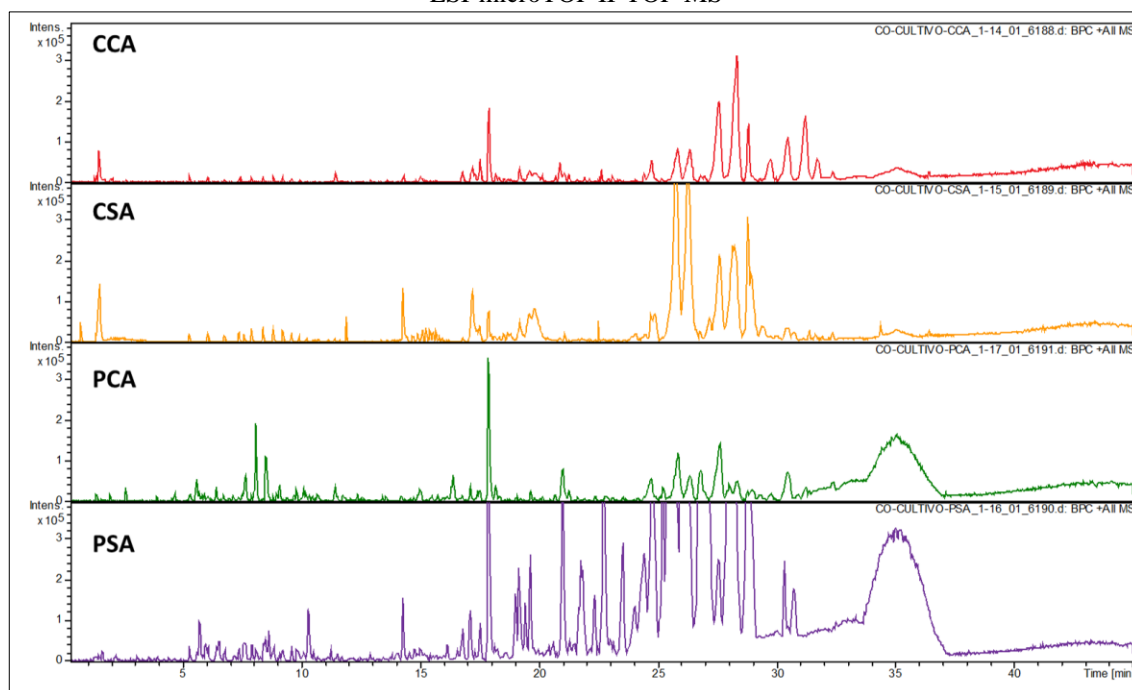
Fonte: Elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 38 - Perfil metabólico BPC de *F. solani* nos diferentes cultivos (CCA, CSA, PCA, PSA) em HPLC-ESI-microTOF II-TOF-MS



Fonte: Elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 39 - Perfil metabólico BPC de co-cultivo nos diferentes cultivos (CCA, CSA, PCA, PSA) em HPLC-ESI-microTOF II-TOF-MS



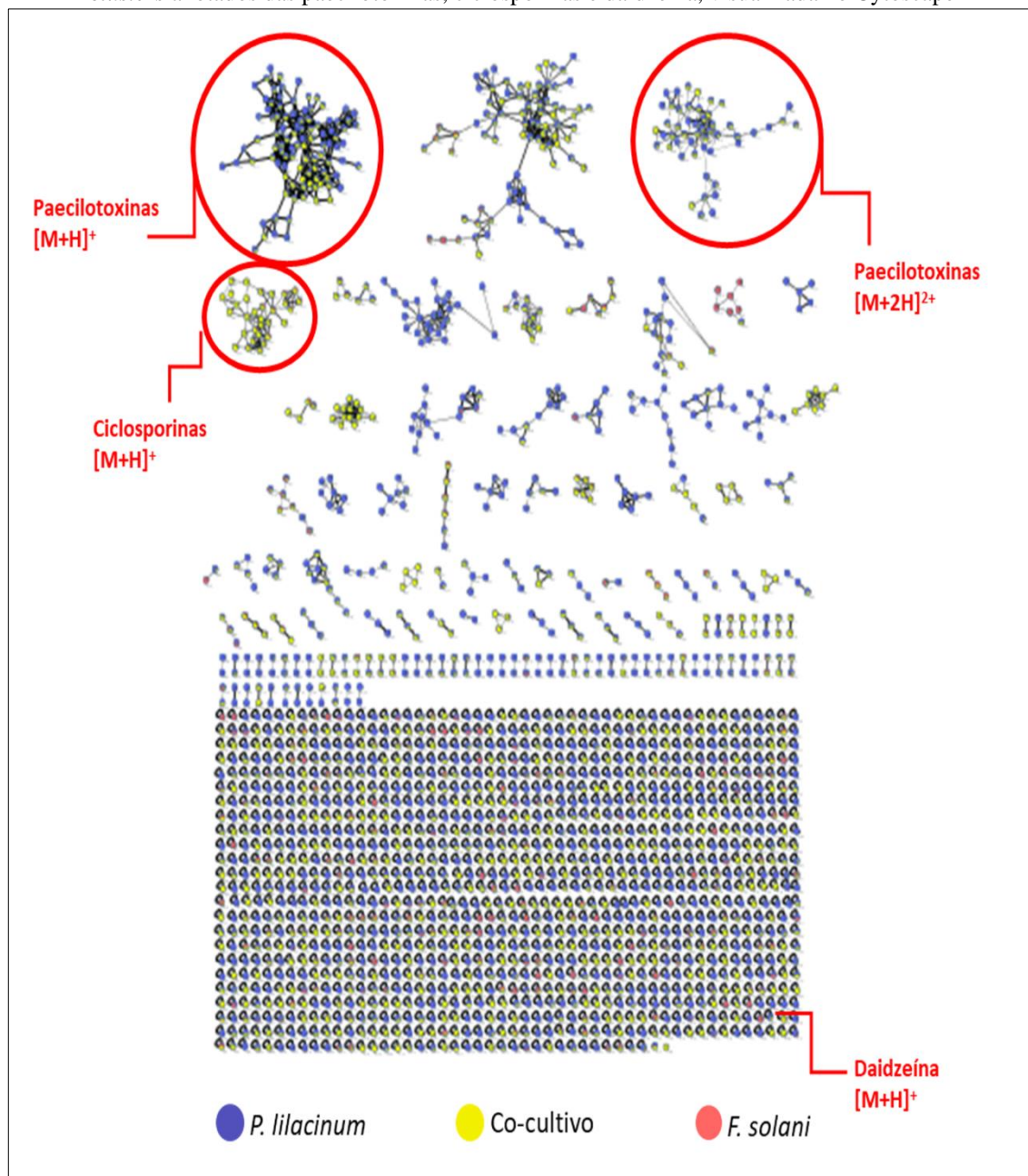
Fonte: Elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Foram anotados 27 metabólitos em comparação com a base de dados do GNPS para os extratos avaliados sendo que a rede molecular apresentou 1917 nodos e 131 *clusters* após remover aqueles relacionados aos brancos dos meios de cultura e solvente. Dessa forma alguns metabólitos foram anotados nos extratos pelo GNPS, e outros metabólitos foram anotados em comparação com as bases de dados externas como *Dictionary of Natural Products* e as bases de dados *in-house* construídas neste trabalho. Todas as estruturas químicas anotadas podem ser encontradas no apêndice C.

A Figura 40 representa a rede de interações moleculares obtida no Cytoscape, e a Tabela 10 fornece os íons anotados e suas informações espectrais.

Os nodos anotados, são descritos abaixo para cada classe de substâncias anotadas: daidzeína, paecilotoxinas e ciclosporinas, que correspondem a 19 metabólitos (47-65).

Figura 40 - Representação da rede de interações moleculares obtida para os extratos avaliados, destacando os *clusters* anotados das paecilotoxinas, ciclosporinas e daidzeína, visualizada no Cytoscape

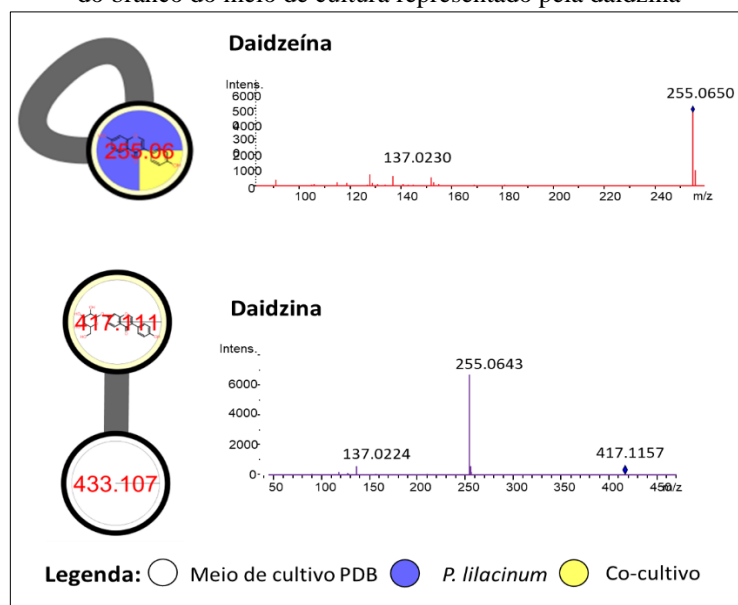


Fonte: Figura obtida pela autora no software Cytoscape, e editada 2019.

Isoflavona - Daidzeína (47):

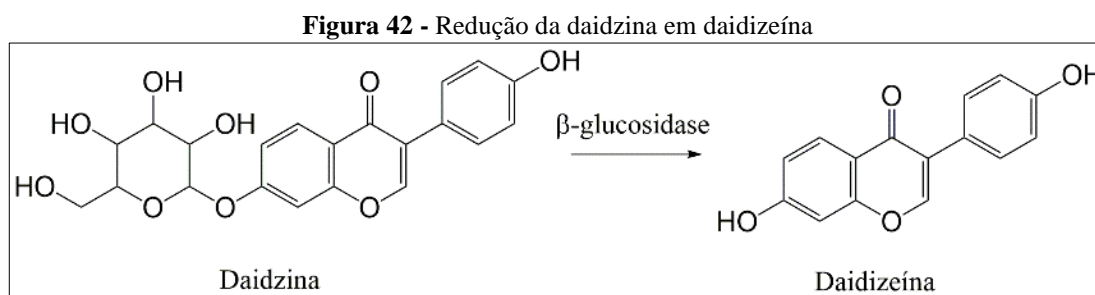
O primeiro nodo observado foi da isoflavona daidzeína (Figura 41), que se apresentou sem correlações com outros nodos. Ao analisarmos a rede molecular (inicialmente sem a remoção dos nodos referentes aos brancos do solvente e meios de cultura) foi possível observar que o extrato do meio de cultura PDB apresentou a substância daidzina (Figura 41) que é a estrutura glicosilada da daidzeína.

Figura 41 - Produção de daidzeína por *P. lilacinum* e co-cultivo observada através da rede molecular e o nodo do branco do meio de cultura representado pela daidzina



Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

Os extratos em PDB da espécie *P. lilacinum* (PSA e PCA), e também o extrato em PDB do co-cultivo (PSA) apresentaram a produção da daidzeína, sugerindo assim que houve uma hidrólise da daidzina (presente no meio PDB) pelo fungo *P. lilacinum*. A produção de agliconas a partir de isoflavonas glicosiladas por processos enzimáticos (utilizando por exemplo β -glucosidase) é bem definido na literatura (AND; JI, 2005; YANG *et al.*, 2009) o que explica o motivo pelo qual muitos fungos acabam “produzindo” (na verdade biotransformando) a daidzina em daidzeína (Figura 42).



Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

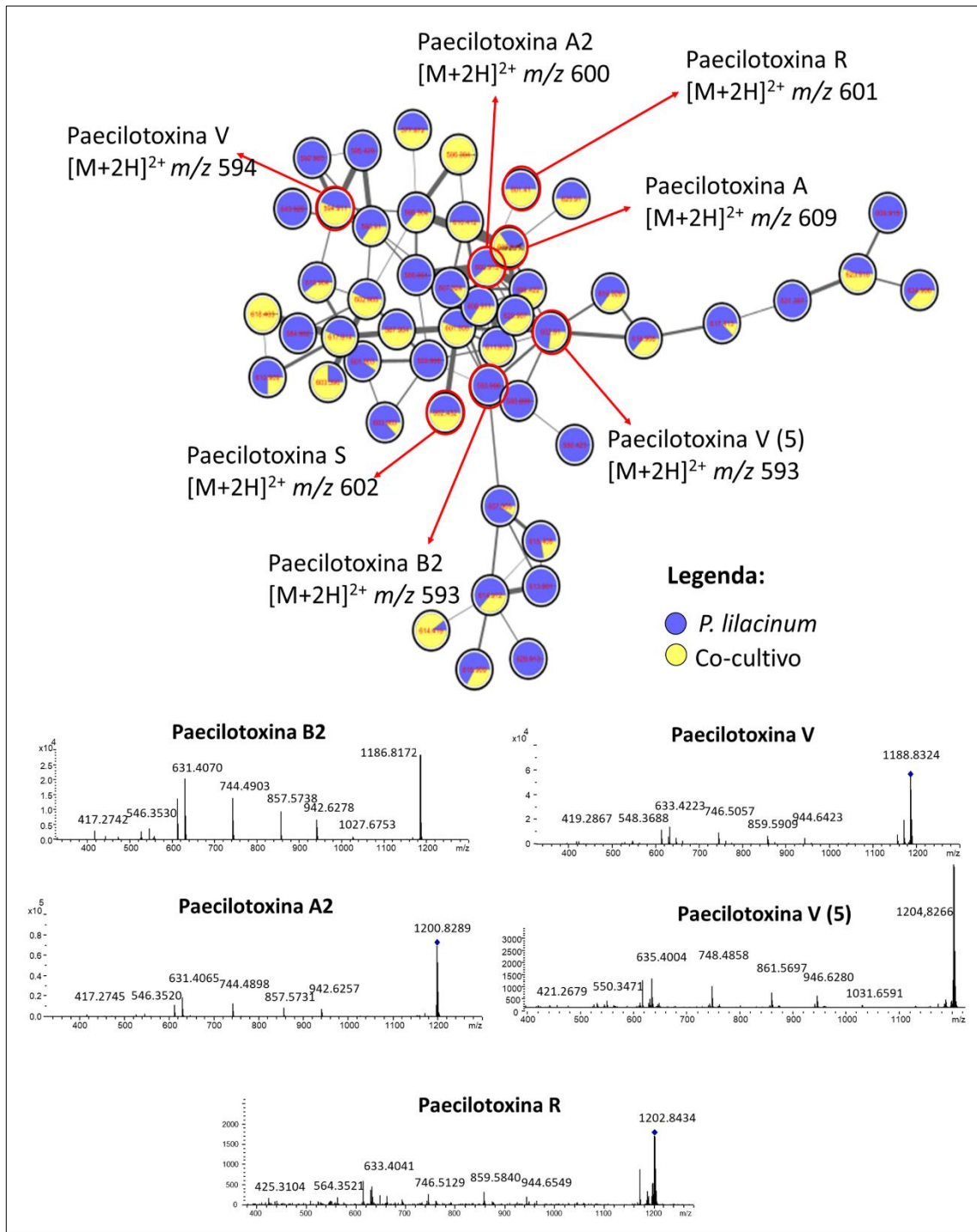
Assim, sugerimos que *P. lilacinum* foi capaz de hidrolisar a daidzina presente no meio de cultura PDB. De forma que essa isoflavona é proveniente de um processo de biotransformação realizado por alguns fungos.

Peptídeos Acíclicos - Paecilotoxinas (48-63):

Dois *clusters* referentes às paecilotoxinas foram evidenciados. Um deles apresentou os metabólitos na forma $[M+2H]^{2+}$ (Figura 43) e o outro apresentou-se na forma $[M+H]^+$ (Figura 44).

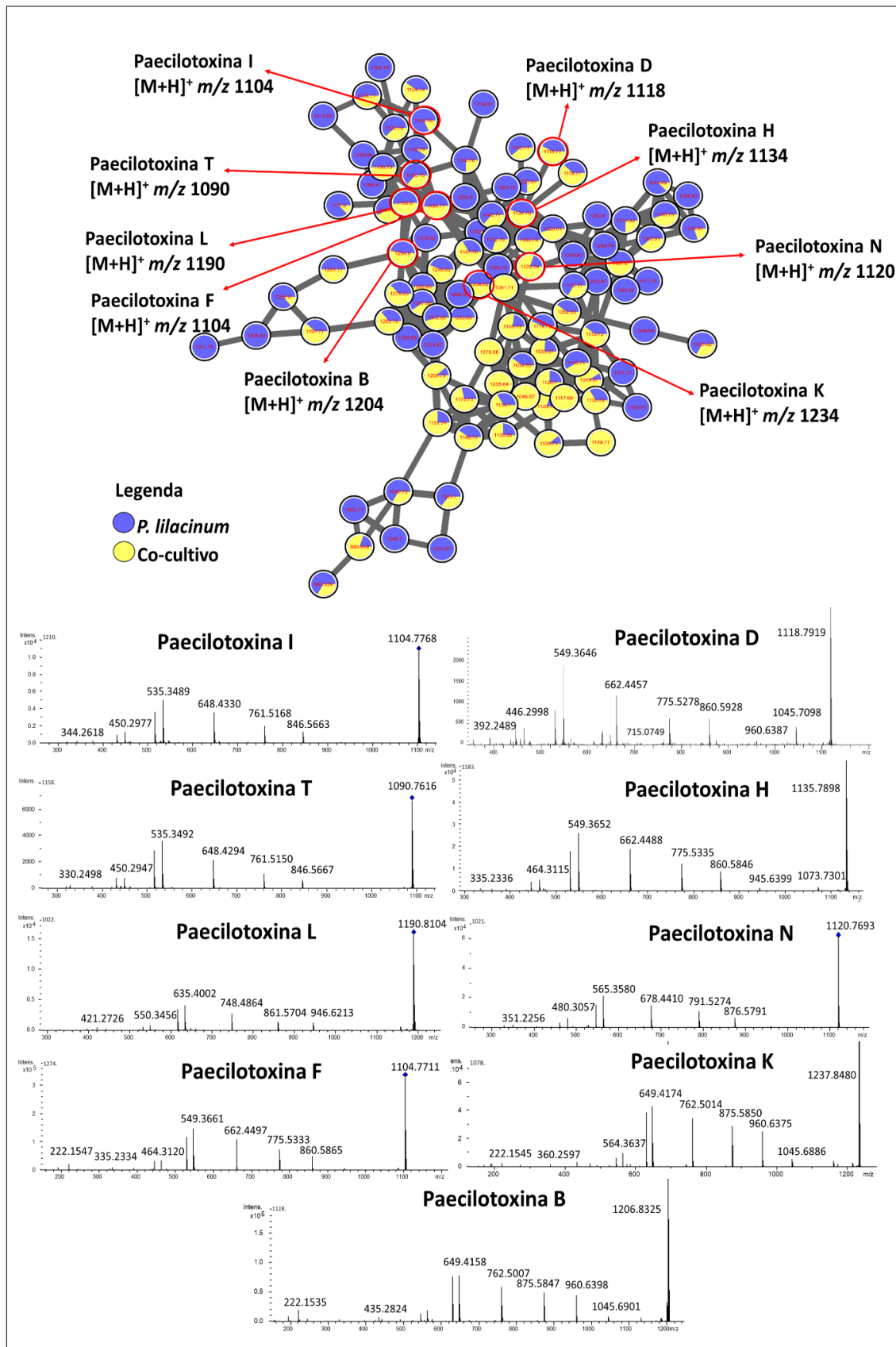
Para as paecilotoxinas $[M+2H]^{2+}$ foi realizada uma deconvolução dos sinais dos espectros de massas no software DataAnalysis ver 4.3 para obtenção dos espectros $[M+H]^+$ a fim de facilitar a observação das perdas de aminoácidos para confirmar as estruturas. O GNPS anotou apenas as paecilotoxinas A e H, e a partir da base de dados *in-house* (Apêndice A e B) foi possível identificar também outras quinze paecilotoxinas nesses *clusters*: A2, V, R, S, B2, V(5), I, T, L, F B, D, N e K (MARTINEZ; MORAES, 2015).

Figura 43 - Produção de paecilotoxinas por *P. lilacinum* e co-cultivo na forma $[M+2H]^{2+}$ observada na rede molecular



Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

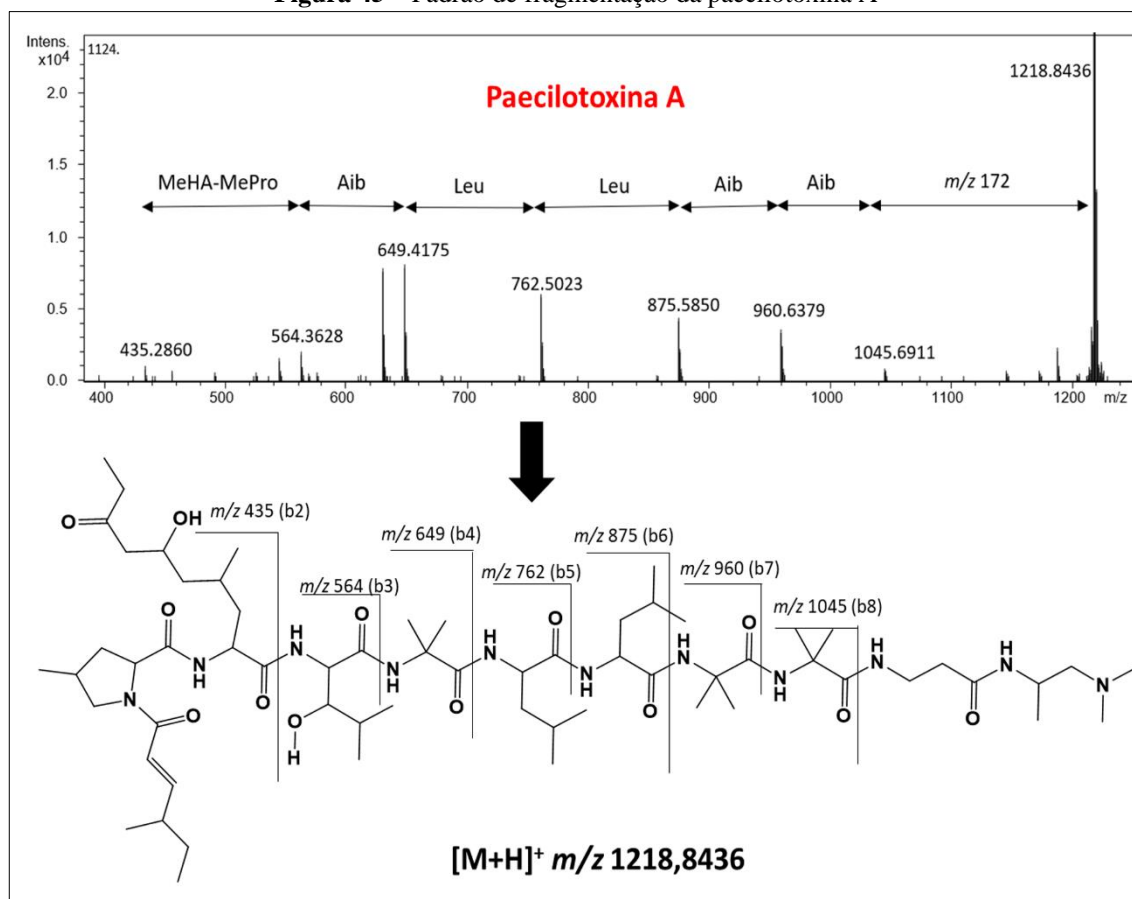
Figura 44 - Produção de paecilotoxinas por *P. lilacinum* e co-cultivo na forma $[M+H]^+$ observada na rede molecular



Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

O perfil de fragmentação foi similar para todas as substâncias, como pode ser observado na Figura 45 a sequência de aminoácidos representada pela paecilotoxina A (íon precursor: m/z 1218 $[M+H]^+$). Foram observados os fragmentos b referentes a fragmentação nas ligações peptídicas, primeiramente pela perda neutra de 172 Da, seguido da perda sequencial dos aminoácidos. O íon fragmento m/z 1045 é referente a perda do aminoácido não proteínogênico ácido α -aminoisobutírico (Aib: $m=85$ Da), seguida da perda de outro aminoácido Aib gerando o íon fragmento m/z 960, depois foram geradas perdas de duas leucinas (Leu: $m=113$) consecutivas evidenciadas pela formação dos íons fragmentos m/z 762 e m/z 649, em seguida foi observada outra perda de Aib com m/z 564 e por último o íon fragmento m/z 435 referente a perda de MeHA-MePro.

Figura 45 – Padrão de fragmentação da paecilotoxina A



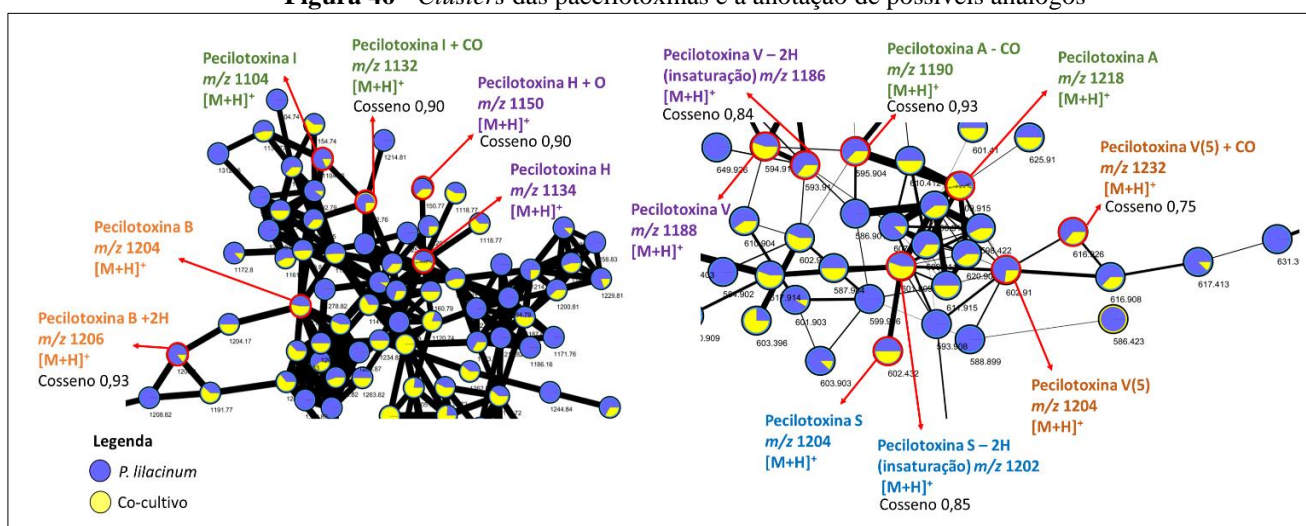
Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

As paecilotoxinas, também conhecidas como leucinostatinas, são micotoxinas comumente produzidos pelo gênero *Purpureocillium* que são associadas, assim como outras micotoxinas, a atividade nematófaga muito características desse gênero de fungo (SHARMA *et al.*, 2016), além de algumas delas apresentarem atividade antitumoral (DEGENKOLB;

VILCINSKAS, 2016), o que pode estar relacionado ao fato de alguns dos extratos de co-cultivo e *P. lilacinum* terem apresentado atividade citotóxica em linhagem de melanoma, como discutido anteriormente.

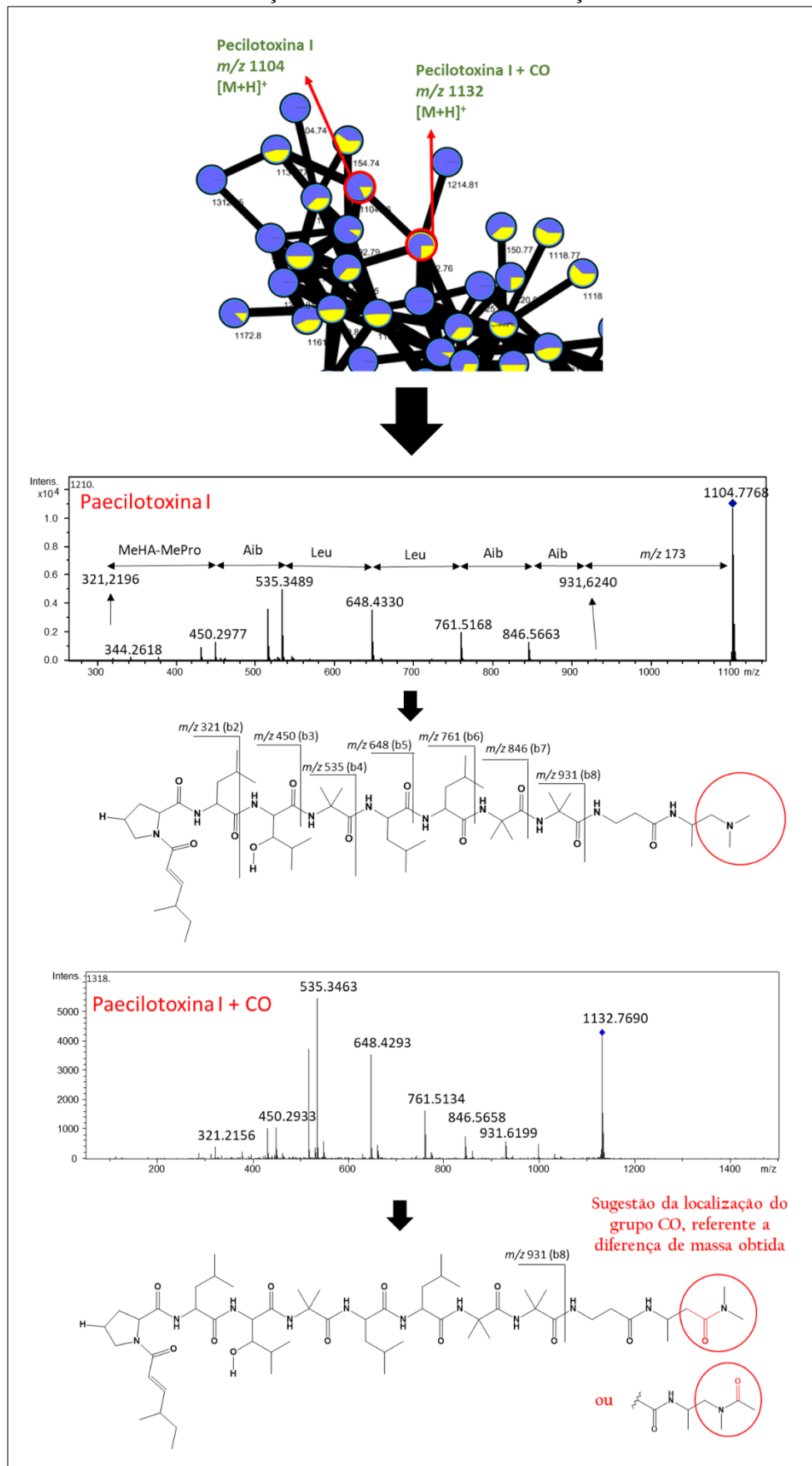
Muitas dessas moléculas foram anotadas na rede molecular, e pela dimensão dos *clusters* é possível perceber que existem diversas outras paecilotoxinas que ainda não foram catalogadas que estão presentes nesses extratos, considerando que os nodos vizinhos são substâncias dessa mesma classe. Como pode ser observado na Figura 46, existem algumas diferenças de massa que sugerem substâncias análogas com diferenças relacionadas à uma adição ou perda de monóxido de carbono, oxigênio e insaturações, gerando pequenas modificações nas estruturas, que confirmam a hipótese de novos metabólitos dessa classe. Como exemplo, é possível ver na Figura 47 a paecilotoxina I e o seu derivado contendo um grupo CO a mais, cuja massa de alta resolução gerou um erro de 1,1 ppm sendo um valor confiante para adição de 27,9947 Da referentes a um grupo CO. É possível observar que esse novo espectro apresenta exatamente o mesmo perfil de fragmentação da paecilotoxinas I, e portando o grupo CO deve estar incluído do lado direito terminal da estrutura oxidando a amina para a formação de uma amida. Essas modificações podem ocorrer em amostras biológicas, e as análises de agrupamento e similaridade *in-silico* ajudam na anotação dessas moléculas análogas desconhecidas (AKSENOV *et al.*, 2017).

Figura 46 - Clusters das paecilotoxinas e a anotação de possíveis análogos



Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

Figura 47 – Cluster das paecilotoxinas e os espectro de massas da paecilotoxina I e do seu análogo contendo uma diferença de massa relacionada a uma adição de CO



Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

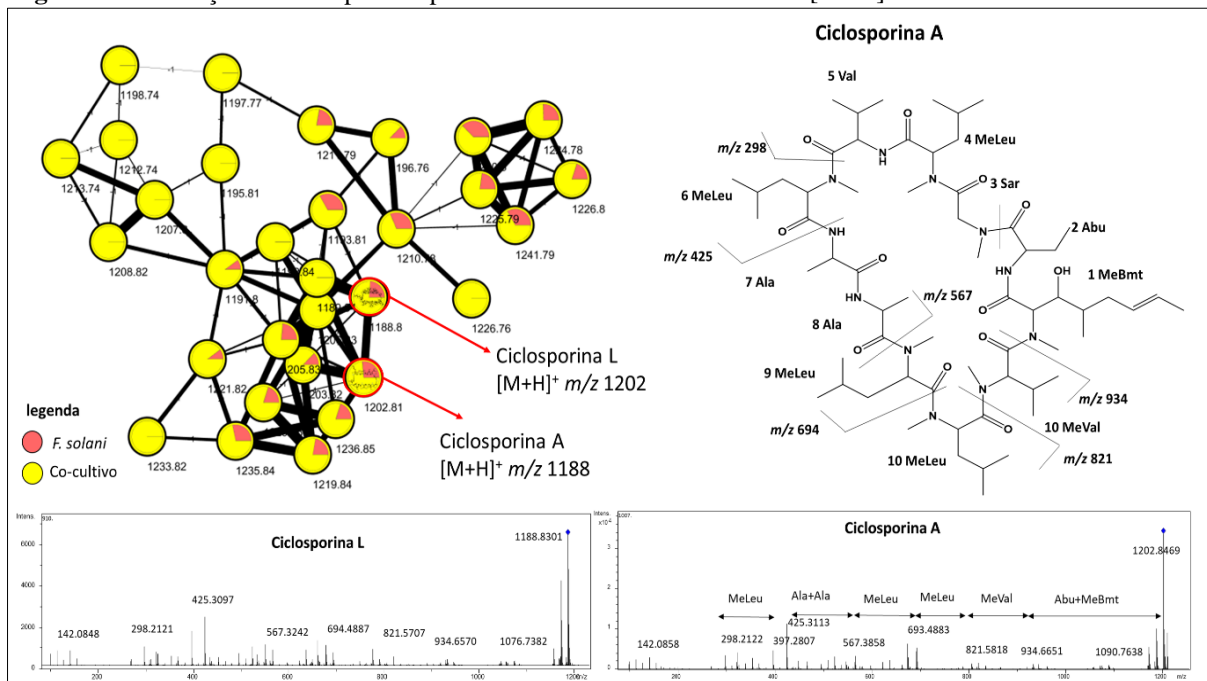
Peptídeos Cíclicos - Ciclosporinas (64 e 65):

Foi identificado um *cluster* formado por compostos da classe das ciclosporinas. Esses metabólitos são característicos de microrganismos, que apresentam aminoácidos *N*-metilados. Na rede molecular, o GNPS indicou a presença de ciclosporina L e A (Figura 48), sendo a ciclosporina A (Cyc A) um isômero da ciclosporina H e da ciclosporina-9-(*N*-metil-*L*-isoleucina)-ciclosporina A. Porém, a Cyc A, já foi identificada na literatura para a espécie *F. solani* (DEGENKOLB; VILCINSKAS, 2016).

Neste *cluster*, muitos outros nodos apresentam o mesmo perfil de fragmentação, entretanto não foi possível a anotação de outras ciclosporinas conhecidas nas bases de dados e na literatura. Isso sugere que novas estruturas de ciclosporinas podem estar presentes nesses extratos (Figura 48). Essas substâncias já foram identificadas em *Fusarium*, como citado anteriormente, porém, aqui observamos que a maioria dos nodos do *cluster* (Figura 48) são representados pelo co-cultivo, sugerindo que essa pode ser uma forma capaz de produzir diferentes substâncias análogas, até mesmo inéditas.

A produção das ciclosporinas só foi observada em *F. solani*, cultivado em meio PDB submetido a agitação; o meio de cultura czapek e o modo estático não foram capazes de ativar os genes para produção desses metabólitos. Porém no co-cultivo com *P. lilacinum*, foi evidenciada a produção das ciclosporinas em todos os meios avaliados, o que pode estar associada a atividade antifúngica (TANSEER; ANJUM, 2011) que essas substâncias apresentam, podendo assim, durante o co-cultivo os genes biossintéticos para a produção das Cycs terem sido favorecidas na tentativa de combater o fungo *P. lilacinum*, durante a interação entre eles.

Para ciclosporina A, o perfil de fragmentação (Figura 48) segue primeiro na eliminação de Abu+MeBmt gerando o íon fragmento m/z 934, seguido da perda de uma metil-valina (MeVal) formando o íon fragmento m/z 821, seguido das perda neutras de duas MeVal produzindo os íons fragmentos m/z 693 e m/z 567, seguido da perda de duas alaninas (Ala) gerando m/z 425 e por último a perda neutra de uma metil-leucina (MeLeu) formando o íon fragmento m/z 298.

Figura 48 - Produção de ciclosporinas por *F. solani* e co-cultivo na forma $[M+H]^+$ observada na rede molecular

Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

A rede de interações moleculares e a utilização do GNPS nos ajudou a obter informações dos extratos avaliados, principalmente sobre peptídeos, em que é possível observar exatamente a sequência dos aminoácidos, conseguindo anotar com mais precisão as substâncias. Além da produção de daidzeína, a partir da biotransformação que o fungo faz com o metabólito do meio de cultura, daidzina.

Foi possível também obter a informação de metabólitos análogos que, aparentemente são inéditos, a partir do agrupamento nos *clusters*, os quais foram obtidas as informações químicas, porém não apresentaram *match* com as bases de dados.

Na Tabela 10 é possível verificar todas as informações espectrais discutidas aqui, e também em quais extratos foram observadas essas substâncias. No Apêndice C podem ser encontradas as suas respectivas estruturas.

Tabela 10 - Metabólitos identificados através da rede de interações moleculares (GNPS) para extratos de *F. solani*, *P. lilacinum* e co-cultivo, analisados em modo positivo em HPLC-ESI-microTOF II-TOF-MS

(Continua)

N°	Substância	t _R (min)	Aduto/Molécula Protonada	Extrato	ESI (íon precursor) (m/z)	Erro (ppm)	ESI (MS/MS) (m/z)
Isoflavona							
47	daidzeína	14	[M+H] ⁺	<i>P.lilacinum</i> (PCA, PSA) Co-cultivo (PSA)	255,0650	2,4	152; 137; 128; 115; 91
Peptídeo Acíclico							
48	paecilotoxina H	26,93	[M+H] ⁺	Co-cultivo (PSA, CSA, PCA, CCA) <i>P.lilacinum</i> (CCA, PCA, PSA, CSA)	1134,7872	1,1	945; 860; 775; 662; 549; 464; 335
49	paecilotoxina A	26,1	[M+2H] ²⁺ (m/z 609)	Co-cultivo (PSA, CSA, PCA, CCA) <i>P.lilacinum</i> (CCA, CSA, PSA)	1218,8436	0,2	1045; 960; 875; 762; 649; 564; 435
50	paecilotoxina T	26,5	[M+H] ⁺	Co-cultivo (CSA, PSA) <i>P.lilacinum</i> (CSA, PSA, CCA)	1090,7616	1,7	846; 761; 648; 535; 450; 321
51	paecilotoxina I	27	[M+H] ⁺	Co-cultivo (PSA) <i>P.lilacinum</i> (PCA, PSA, CCA)	1104,7768	1,3	846; 761; 648; 535; 450; 321
52	paecilotoxina F	28,2	[M+H] ⁺	Co-cultivo (PSA) <i>P.lilacinum</i> (PCA, PSA, CCA)	1104,7711	3,9	945; 860; 775; 662; 549; 464; 335; 222
53	paecilotoxina D	30,9	[M+H] ⁺	Co-cultivo (PSA, CSA, PCA, CCA) <i>P.lilacinum</i> (CCA, PCA, PSA, CSA)	1118,7945	3,1	945; 860; 775; 662; 549; 464; 335
54	paecilotoxina N	23,9	[M+H] ⁺	<i>P.lilacinum</i> (PSA) Co-cultivo (PSA)	1120,7693	0,9	961; 876; 791; 678; 565; 480; 351
55	paecilotoxina L	24	[M+H] ⁺	Co-cultivo (PSA, CSA, PCA, CCA) <i>P.lilacinum</i> (CCA, PCA, PSA, CSA)	1190,8121	1,4	946; 861; 748; 635; 550; 421

Tabela 10 - Metabólitos identificados através da rede de interações moleculares (GNPS) para extratos de *F. solani*, *P. lilacinum* e co-cultivo, analisados em modo positivo em HPLC-ESI-microTOF II-TOF-MS

								(Conclusão)
N°	Substância	tr (min)	Aduto/ Molécula Protonada	Extrato	ESI (íon precursor) (m/z)	Erro (ppm)	ESI (MS/MS) (m/z)	
56	paecilotoxina B	25,8	[M+H] ⁺	Co-cultivo (PSA) <i>P.lilacinum</i> (CCA)	1204,827	0,7	1045; 960; 875; 762; 649; 435; 222	
57	paecilotoxina K	24,9	[M+H] ⁺	Co-cultivo (PSA, CSA, PCA, CCA) <i>P.lilacinum</i> (CCA, PCA, PSA, CSA)	1234,8344	3,2	1045; 960; 875; 762; 649; 435; 222	
58	paecilotoxina B2	27,2	[M+2H] ²⁺ (m/z 593)	<i>P.lilacinum</i> (CSA, CCA)	1186,8169	0,3	1045; 942; 857; 744; 631; 546; 417	
59	paecilotoxina V	28,5	[M+2H] ²⁺ (m/z 594)	Co-cultivo (CSA, PSA) <i>P.lilacinum</i> (CSA, PSA, CCA)	1188,8324	0,3	944; 859; 746; 633; 548; 419	
60	paecilotoxina A2	27,7	[M+2H] ²⁺ (m/z 600)	Co-cultivo (PSA, CSA, CCA) <i>P.lilacinum</i> (CCA, PCA, PSA, CSA)	1200,8289	3,2	942; 857; 744; 631; 546; 417	
61	paecilotoxina R	28,7	[M+2H] ²⁺ (m/z 601)	<i>P.lilacinum</i> (CSA) Co-cultivo (PCA)	1202,8434	4,2	944; 859; 746; 633; 548	
62	paecilotoxina V (5)	24,5	[M+2H] ²⁺ (m/z 602)	Co-cultivo (CSA, PSA) <i>P.lilacinum</i> (CSA, PSA, CCA)	1204,8266	1,0	1031; 946; 861; 748; 635; 550; 421	
63	paecilotoxina S	30,6	[M+2H] ²⁺ (m/z 602)	<i>P.lilacinum</i> (PSA) Co-cultivo (CSA)	1204,8651	0,8	1031; 946; 861; 748; 635; 550; 421	
Peptídeo Cíclico								
64	ciclosporina L	31,5	[M+H] ⁺	Co-cultivo (PSA, CSA, PCA, CCA) <i>F. solani</i> (PCA)	1188,8328	2,3	934; 821; 694; 567; 425; 298	
65	ciclosporina A	33,4	[M+H] ⁺	Co-cultivo (PSA, CSA, PCA, CCA) <i>F. solani</i> (PCA)	1202,8485	1,8	934; 821; 694; 567; 425; 298	

4.5.4 UPLC-QTOF/MS^E e o Sistema de Informações Científicas UNIFI

Os fungos estudados nesse trabalho, *P. lilacinum* e *F. solani*, representam dois grandes gêneros com extensivo estudo químico na literatura. Então foi construída uma base de dados *in-house* para esses microrganismos para comparação automática com os extratos brutos via UNIFI, a fim de tentar utilizar uma outra abordagem de anotação de metabólitos, pois, através do GNPS não foi possível obter informações a respeito de outros metabólitos que são comumente produzidos por esses microrganismos (o que mais forneceu resultados satisfatórios via GNPS foi a anotação de peptídeos, considerando que análise de substâncias como lipídeos e pequenos peptídeos tem uma boa confiabilidade referente ao padrão de fragmentação que funcionam muito bem para esse tipo de análise (AKSENOV *et al.*, 2017).

A base de dados *in-house* contou com metabólitos referentes ao gênero *Fusarium*, principalmente das espécies *F. solani* e *F. oxysporum*, obtendo 269 substâncias catalogadas (Apêndice A). E metabólitos referentes ao gênero *Paecilomyces/Purpureocillium* foram analisados configurando 183 metabólitos descritos (Apêndice B). Dessa forma a base de dados foi organizada com a presença de todos esses metabólitos juntamente com as estruturas desenhadas em formato .mol para comparação com o UNIFI.

A utilização do MS^E e equipamentos LC-MS-TOF e LC-MS/MS-TOF são uma ótima forma de aquisição de informações químicas sobre misturas complexas, pela obtenção da composição elementar das amostras e informações sobre o perfil de fragmentação (PLUMB *et al.*, 2006).

Assim, a anotação dos metabólitos se deu através do UNIFI por comparação com as bases de dados, que gerou propostas de íons fragmentos e também o erro referente a fórmula molecular (máximo 5 ppm). Os experimentos foram realizados também para os extratos dos meios de cultivo, e as substâncias pertencentes nos meios foram excluídas das análises. Todas as informações dos metabólitos são dadas na Tabela 11. O conjunto de dados obtidos, juntamente com o perfil de fragmentação avaliado, sugeriu a anotação de 36 metabólitos (66-102), sendo eles, alcaloides, peptídeos, esteróis, naftoquinonas, policetídeos entre outros. As estruturas de todos as substâncias estão apresentadas no apêndice C.

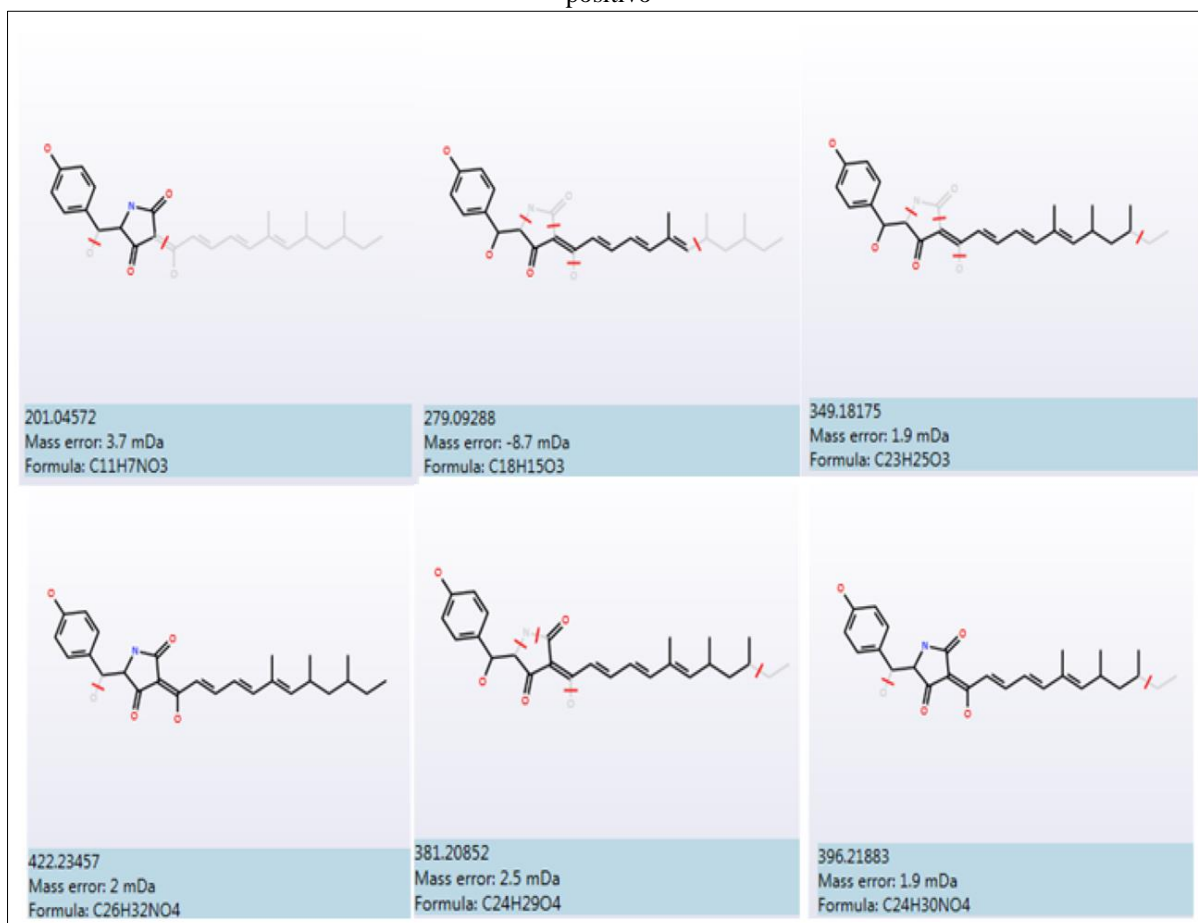
O UNIFI fornece muitas propostas de fragmentações das estruturas pela utilização de um algoritmo que faz a conexão e desconexão das ligações nas estruturas das substâncias sugerindo os possíveis fragmentos. Em alguns deles as propostas de fragmentações foram sugeridas neste texto. Abaixo, encontra-se a discussão referente aos metabólitos anotados via UNIFI.

Alcaloides (66-68):

Três diferentes alcaloides foram evidenciados, sendo um deles o alcaloide sesquiterpênico huperazina A (**66**), com $[M+Na]^+$ m/z 265,1323, gerando os íons fragmentos $[M+H]^+$ m/z 210 e 196 característicos desse metabólito (SZYPUŁA *et al.*, 2011).

O segundo metabólito observado foi o alcaloide monoterpênico militarinona B (**67**), com $[M+Na]^+$ m/z 462,2264 que tem como fragmentos sugeridos pelo UNIFI os íons apresentados na Figura 49, sendo uma perda comum de água evidenciada de acordo com Schmidt *et al.*, 2003 gerando o íon m/z 422 (SCHMIDT *et al.*, 2003).

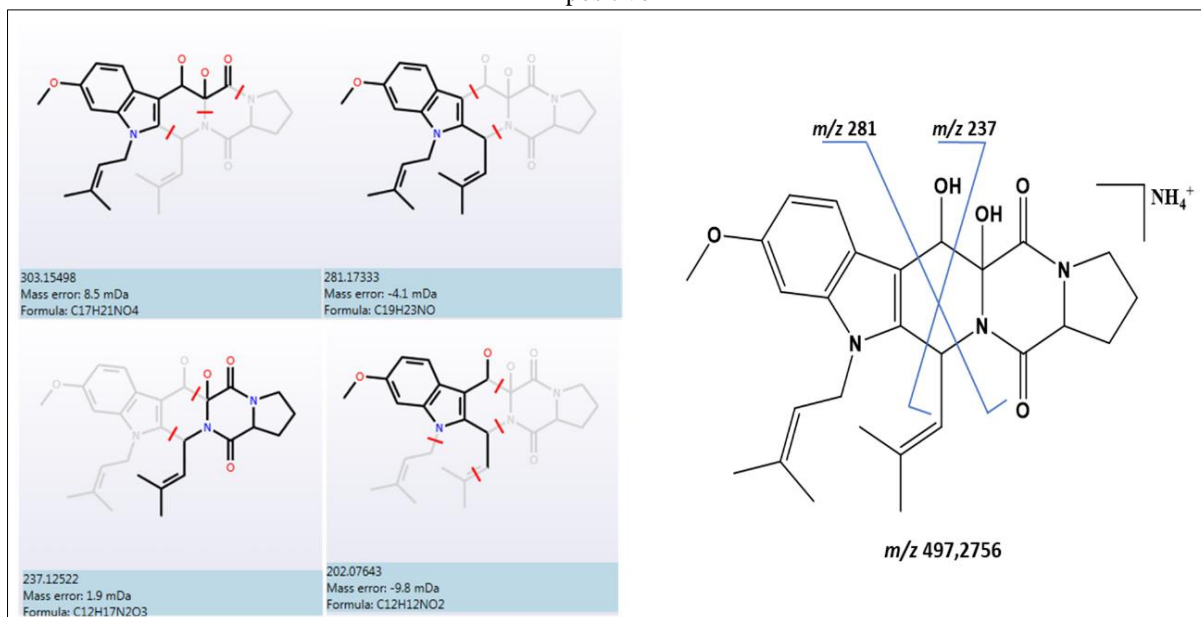
Figura 49 - Íons fragmentos, via UNIFI, da substância militarinona B (**67**) por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo



Fonte: As Figuras 49-56 e 58-62 foram adaptadas do UNIFI pela autora, 2020.

O terceiro foi o alcaloide indólico fumitremogina B (**68**) $[M+NH_4]^+$ m/z 497,2756 que apresentou espectro de MS/MS com sinais característicos, de acordo com a literatura, como m/z 237 e m/z 281 (FORNAL *et al.*, 2017) (Figura 50).

Figura 50 - Íons fragmentos, via UNIFI da substância fumitremogina B (**68**) por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo



Dicetopiperazinas (**69** e **70**):

Assim como no GC-MS, duas dicetopiperazinas foram anotadas no UPLC-MS. Essa classe de metabólitos é frequentemente produzida por fungos, e apresentam diversas atividades biológicas promissoras como antibiótica, antitumoral e imunossupressora (GUIMARÃES *et al.*, 2010) e em UPLC-MS foram evidenciadas apenas nos extratos de *Fusarium*.

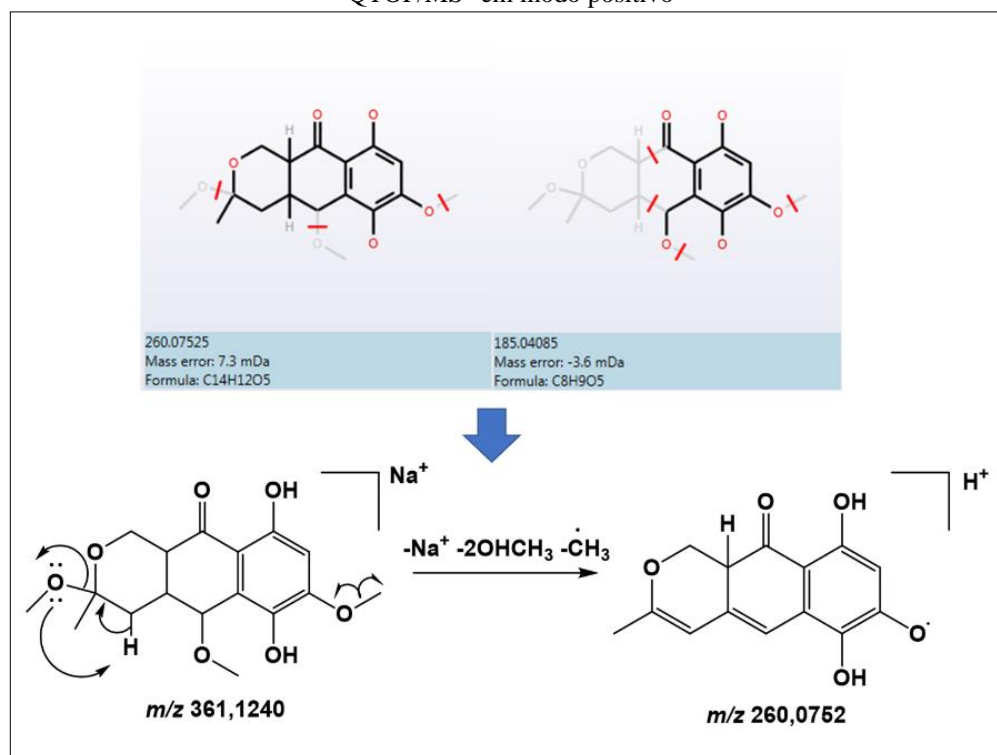
Fusaperazina C (**70**) e seu derivado 3-(4-((3-metilbut-2-en-1-il)oxi)benzil)-3,6-bis(metilthio)piperazina-2,5-diona (**69**), se diferenciam pela adição e substituição de grupos SCH₃ e apresentam o mesmo íon fragmento de m/z 237, que são derivados da substância 2,5-piperazinadiona-3-(fenilmetil) anotada através do GC-MS (**26**).

Dihidronaftalenonas (**71** e **72**):

As substâncias 3,5-dimetoxidihidrofusarubina B (**71**) e dihidronaftalenona (**72**) são evidenciadas pelos íons precursores [M+Na]⁺ m/z 361,1240 e m/z 315,0854, respectivamente. Para a substância **71** observou-se a eliminação de duas metoxilas além de uma perda de metila radicalar, gerando o íon fragmento m/z 260, proposto na Figura 51.

Para a dihidronaftalenona **72** observa-se apenas a perda da metila radicalar pela evidência do íon m/z 279.

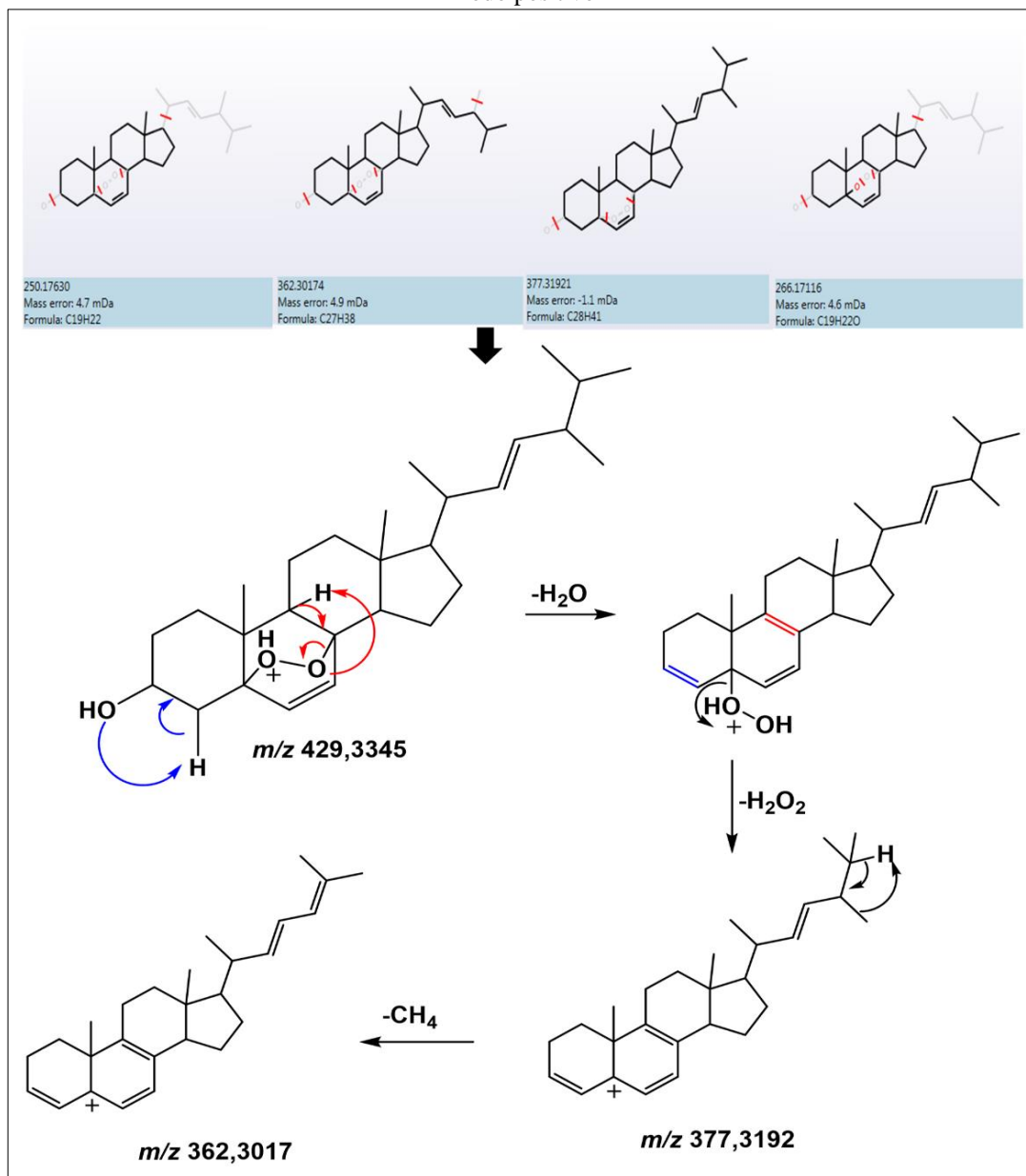
Figura 51 - Íons fragmentos, via UNIFI da substância 3,5-dimethoxidihidrofusarubina (**71**) proposta por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo



Esteróis (**73-75**):

2B-6B-dihidroxi-5 α -metoxiergosta-7,22-dieno (**73**), ergosterol (**74**) e peróxido de ergosterol (**75**) são esteróis, classe já identificada em GC-MS para *Fusarium*. No UNIFI os metabólitos foram observados em *Fusarium*, *Purpureocillium* e no co-cultivo. Além disso, para *Fusarium* as substâncias **73** e **74** são observadas apenas nos extratos CCA enquanto a substância **75** foi evidenciada apenas em *Purpureocillium* e em co-cultivo para o extrato PCA. Todos os metabólitos apresentaram-se em extratos no qual o cultivo foi realizado sob agitação, sugerindo que eles apresentam essa condição para serem produzidos, como sugere a OSMAC. Na Figura 52 está apresentada a proposta de fragmentação para o peróxido de ergosterol, $[M+H]^+$ m/z 429,3345, com íon fragmento de m/z 377 referente a uma desidratação juntamente com a clivagem do peróxido e m/z 362 por uma eliminação de metano (DEMARQUE *et al.*, 2016). Também são formados os íons fragmentos m/z 266 pela clivagem da cadeia lateral e duas desidratações e m/z 250 pela perda da cadeia lateral com uma desidratação e a eliminação do peróxido (MÜNGER; BOULOS; NYSTRÖM, 2018).

Figura 52 - Íons fragmentos, via UNIFI da substância peróxido de ergosterol (**75**) por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo

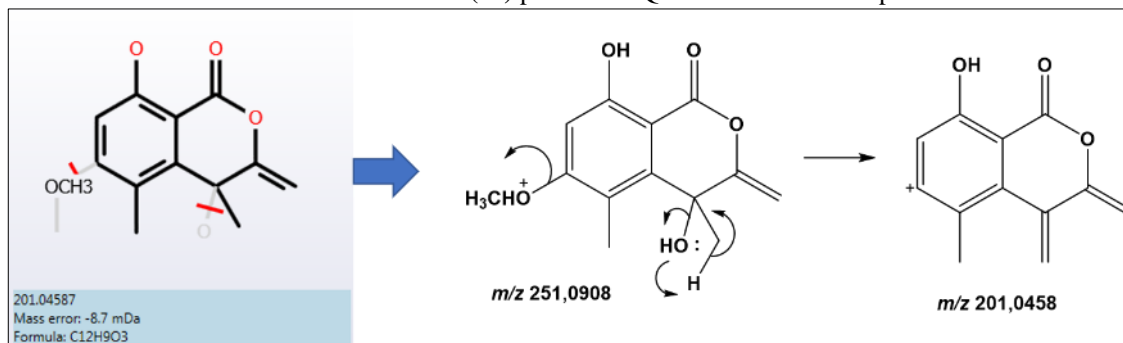


Isocromanonas (**76-79**):

3,4-dihidro-4,8-dihidroxi-6-metoxi-4,5-dimetil-3-metil-isocromen-ona (**76**), bem como 7-but-2-enil-3,4-dihidro-6,8-dihidroxi-3-pent-3-enil-isochromen-1-ona-6-sulfato (**77**), fusaraisocromanona (**78**) e fusarentina dimetil éter (**79**) são derivados de isocromanonas já descritas para *F. solani*. A substância **77** com íon precursor $[M+H]^+$ m/z 251,0908 apresentou íon fragmento m/z 201 pela eliminação de água e metoxila, como sugerido pelo UNIFI e está representado na Figura 53. Essa classe de substâncias são muito características de fungos, e além de *Fusarium*, *Cadophora* sp (RUSMAN *et al.*, 2015), *Dothideomycete* sp (HEWAGE *et al.* 2015). *Estudo químico de fungos da rizosfera de Senna spectabilis utilizando abordagem OSMAC e ferramentas analíticas do estado da arte para anotação e caracterização de metabólitos*

al., 2014), *Aspergillus banksianus* (CHAUDHARY *et al.*, 2018) também são produtores dessa classe.

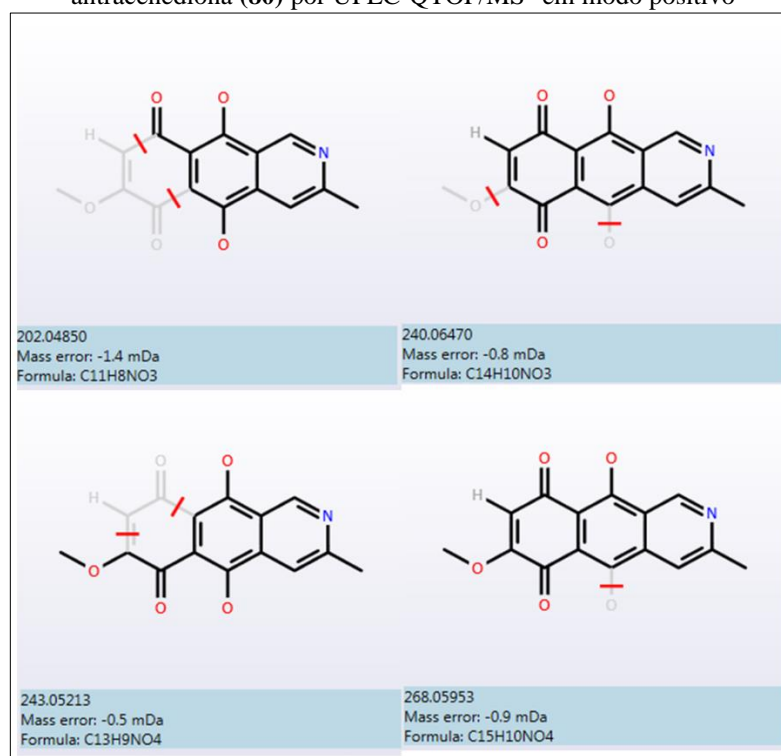
Figura 53 - Íons fragmentos, via UNIFI da substância proposta 3,4-dihidro-4,8-dihidroxi-6-metoxi-4,5-dimetil-3-metil-neisocromen-ona (**76**) por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo



Naftoquinonas (**80** e **81**):

Duas naftoquinonas foram anotadas nos extratos de co-cultivo, sendo elas 5,8-dihidroxi-6-metoxi-3-metil-2-aza-9,10-antracenediona (**80**) e solaninaftoquinona (**81**). Sendo a substância **80** anotada também para extratos de *F. solani*. A Figura 54 representa os fragmentos da naftoquinona (**80**) sugeridos pelo UNIFI.

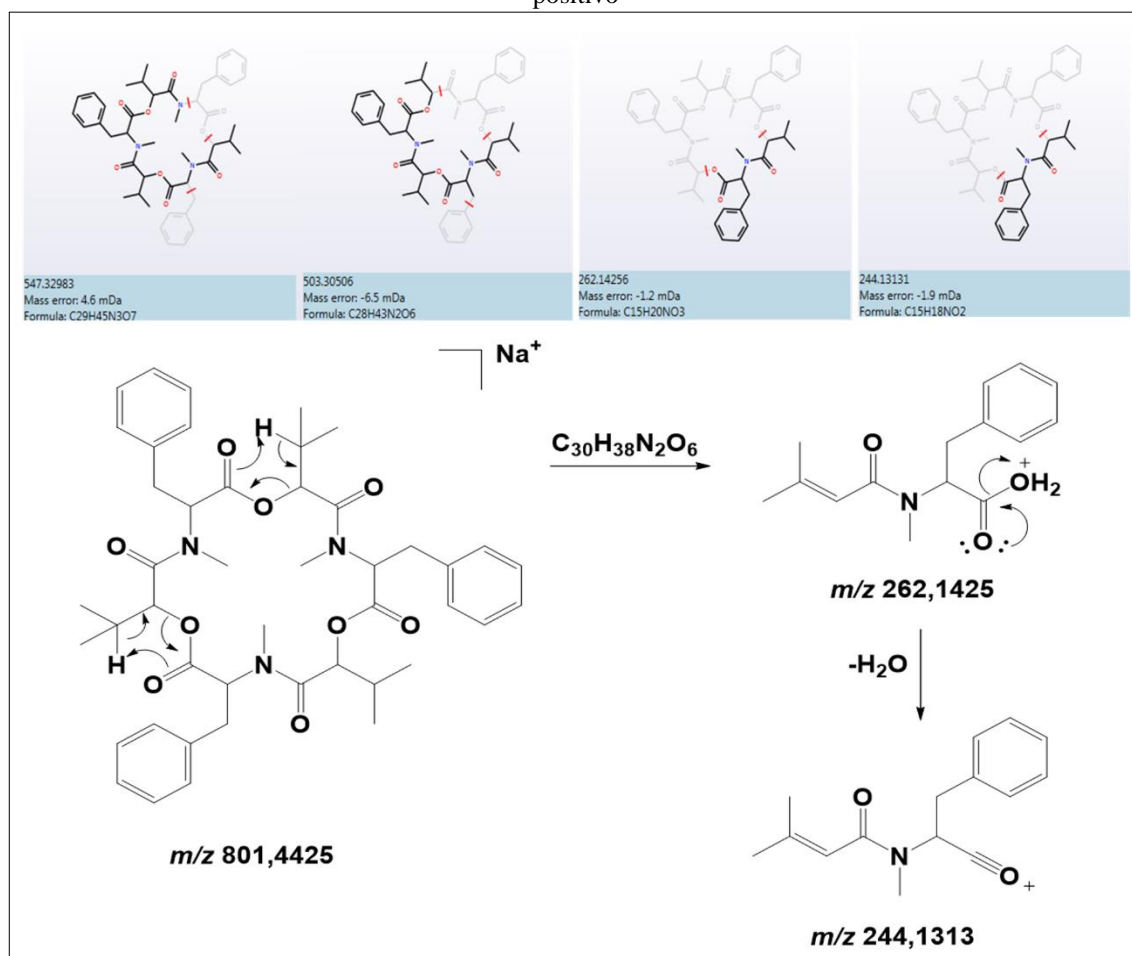
Figura 54 - Íons fragmentos, via UNIFI da substância proposta 5,8-dihidroxi-6-metoxi-3-metil-2-aza-9,10-antracenediona (**80**) por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo



Peptídeos cíclicos (82-91):

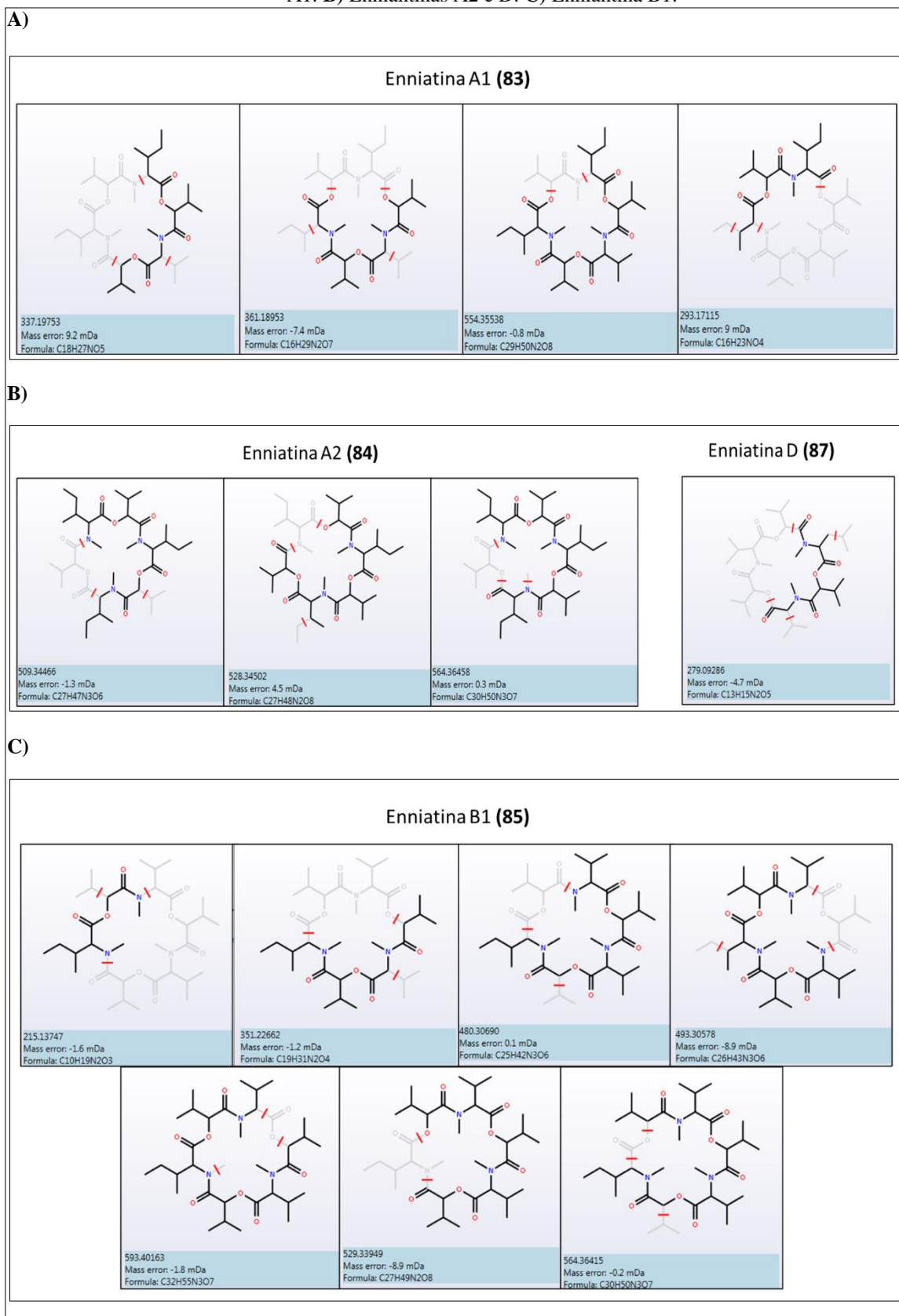
Beauvericina (82), já foi relatada em espécies de *Fusarium* e *Purpureocillium* (LOGRIECO *et al.*, 1998). Neste trabalho essa substância foi anotada nos extratos dos os dois fungos, apresentando $[M+NH_4]^+$ m/z 801,4425. Apresentando íons fragmentos característicos, principalmente pela observação de m/z 262 e m/z 244 referentes a um fragmento contendo um resíduo do aminoácido fenilalanina, que ocorre a partir de rearranjos de McLafferty, seguido de uma desidratação, respectivamente (Figura 55) (HU; RYCHLIK, 2012). A beauvericina foi observada apenas em extratos de czapek, tanto para *F. solani* quanto para *P. lilacinum*, e interessante não foi evidenciada em co-cultivo, portanto os genes responsáveis pela produção desse metabólito são provavelmente inibidos quando eles estão em co-cultivo. Sendo um dos fatores abordados pela OSMAC sobre a diferença na produção metabólica quando o meio de cultura é alterado de czapek para PDB ou quando alteramos de monocultura para co-cultivo.

Figura 55 - Íons fragmentos, via UNIFI da substância beauvericina (82) por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo



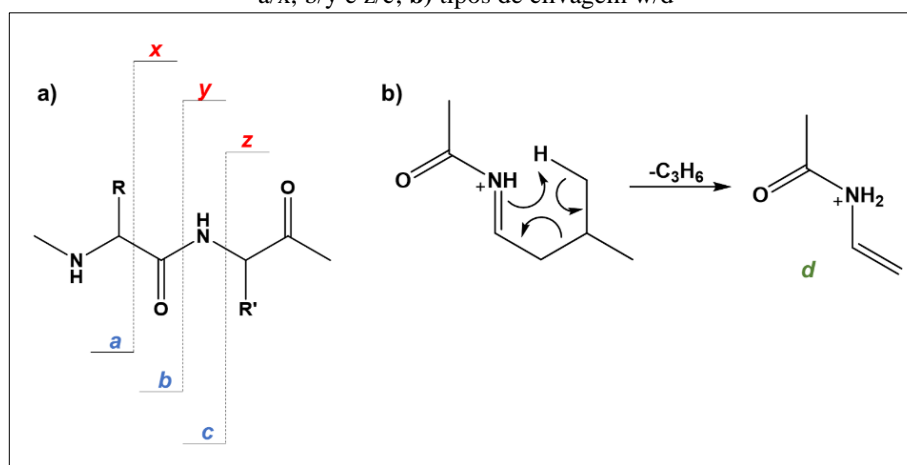
Outros peptídeos cíclicos foram anotados (**83-90**), sendo eles as enniantinas A1, A2, B1, B2, D, G, M2 e MK, respectivamente (algumas delas estão apresentadas na Figura 56). Apesar dos íons fragmentos mais comuns de peptídeos, formados em experimentos CID na espectrometria de massas, sejam aqueles referentes a clivagem da ligação peptídica chamados de *b/y*, também puderam ser evidenciados os íons fragmentos *a/x* e *c/z* como mostra a Figura 57 (CANTÚ *et al.*, 2008).

Figura 56 - Íons fragmentos, via UNIFI de algumas diferentes enniatinas sugeridas pelo UNIFI. **A)** Enniantina A1. **B)** Enniatinas A2 e D. **C)** Enniantina B1.



Sendo assim, foi possível observar clivagens do tipo b/y , x/a e z/c , nas enniantinas como apresentado na Figura 56. E além disso, também foram evidenciados os íons do tipo d decorrentes da fragmentação da cadeia lateral gerando os íons w/d (Figura 56). A fragmentação w/d (Figura 57) pode ocorrer em experimentos CID (em que é possível distinguir principalmente os aminoácidos leucinas e isoleucinas) (JOHNSON; MARTIN; BIEMANN, 1988).

Figura 57 - Representação dos tipos de íons fragmentos gerados por CID em peptídeos: **a)** Tipos de clivagem a/x , b/y e z/c ; **b)** tipos de clivagem w/d

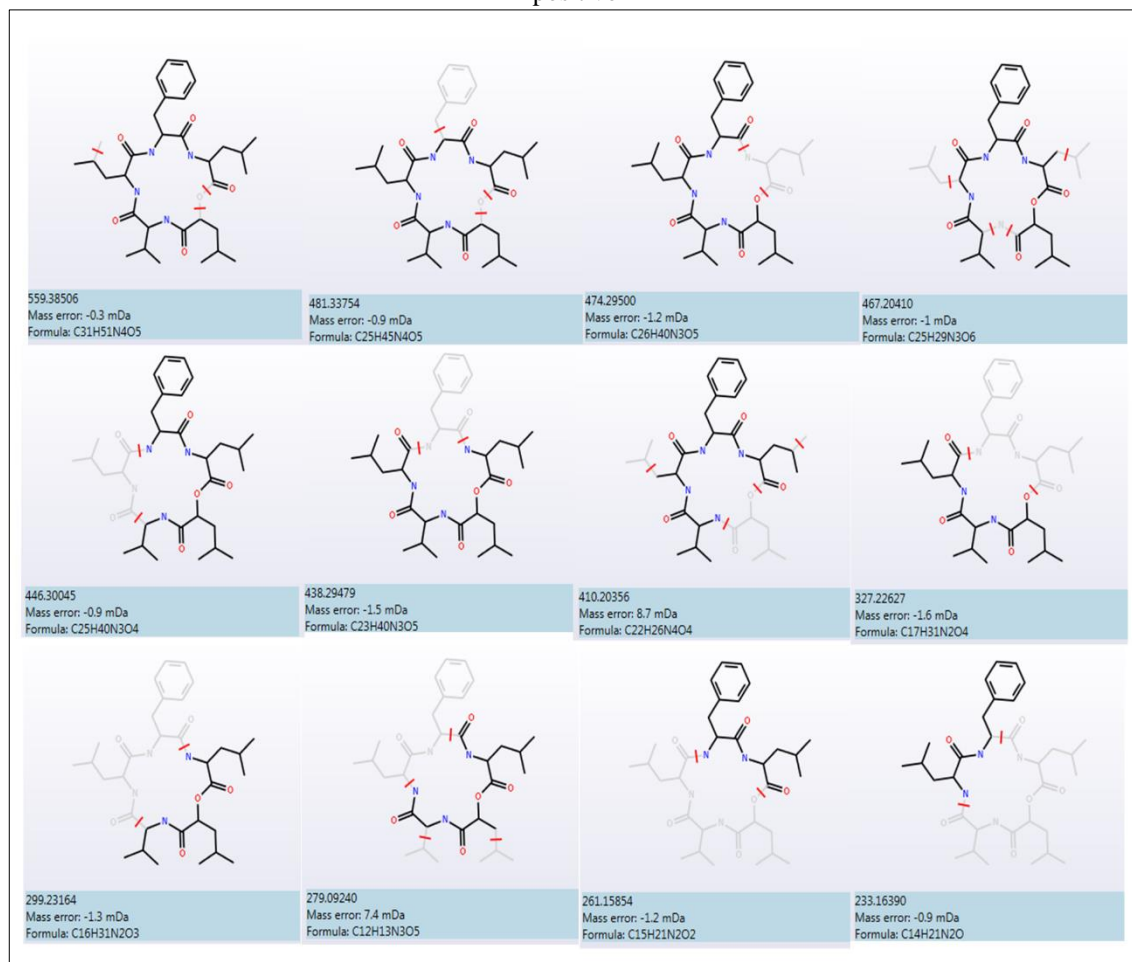


Fonte: (CANTÚ *et al.*, 2008; JOHNSON; MARTIN; BIEMANN, 1988)

As enniatinas são produzidas por espécies de *Fusarium*, assim como a beauvericina, e ambas são biossintetizadas pela mesma enzima precursora. Essas substâncias, diferente da beauvericina, foram evidenciadas principalmente em extratos de co-cultivo. Elas apresentam atividade antibiótica, e a produção em co-cultivo pode estar relacionada à interação ecológica que ocorre entre os dois fungos em um ambiente competitivo (LIUZZI *et al.*, 2017).

O peptídeo sansalvamida (**91**) $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ m/z 604,4073 foi anotado em extrato de PDB para *F. solani* e co-cultivo. E os fragmentos gerados foram analisados. O íon fragmento m/z 474 é referente a perda de um aminoácido leucina. Seguido de uma perda de fenilalanina gerando o íon fragmento m/z 327, além de formar os fragmentos do tipo z/c , x/a e w/d , sugeridos pelo UNIFI, como observado na Figura 58.

Figura 58 - Íons fragmentos, via UNIFI da substância sansalvamida (**91**) por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo



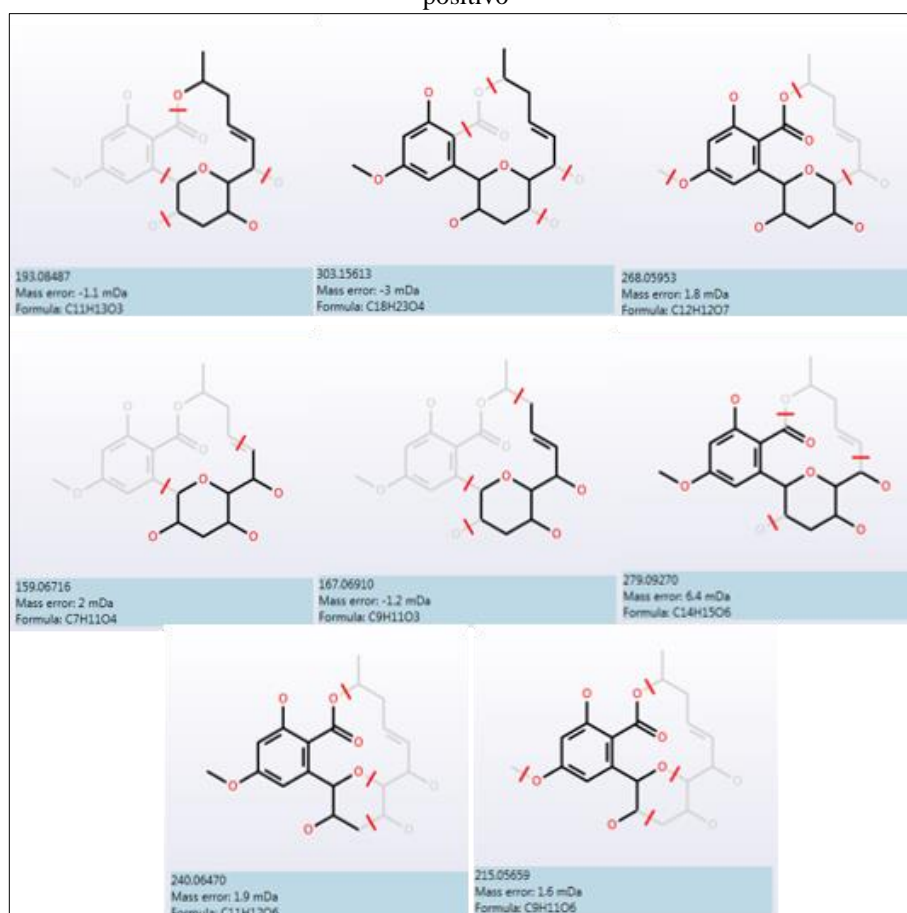
Policetídeos (**92-96**):

Lucilactaeno (**95**) e NG-391 (**96**) são policetídeos que foram anotados pelo UNIFI, e se diferem pela presença de um epóxido em **96** e uma γ -lactama em **95**. Esses metabólitos são derivados da mesma via biossintética, o que explica o motivo pelo qual são sempre evidenciados juntos em extratos de *Fusarium* de acordo com a literatura (GUIMARÃES *et al.*, 2009). Também foi notada a presença das substâncias fusarina D e Z (**93** e **94**) que são derivadas das substâncias (**96**) e (**95**) respectivamente, pela evidência do epóxido e da γ -lactama, contendo alterações nas cadeias laterais. E como parte dos policetídeos, também foi anotada a substância fusarielina A (**92**). As substâncias **95** e **96** já foram relatadas com alta atividade anticâncer (KAKEYA *et al.*, 2001) mostrando que essa classe apresenta um importante potencial de bioatividade. As substâncias **92**, **93** e **94** foram características apenas do extrato de *F. solani* CCA. Enquanto **95** e **96** foram produzidos por extratos de *Fusarium* e também do co-cultivo.

Outros metabólitos (97-101):

O macrolídeo paecilomicina B (97) foi anotado no extrato de co-cultivo PSA e os possíveis íons fragmentos foram sugeridos pelo UNIFI, de acordo com a Figura 59. Essa família de metabólitos é comumente encontrada em fungos, incluindo *Fusarium* (ARUNPANICHLERT *et al.*, 2011) e *Purpureocillium* com atividade antibacteriana e antifúngica.

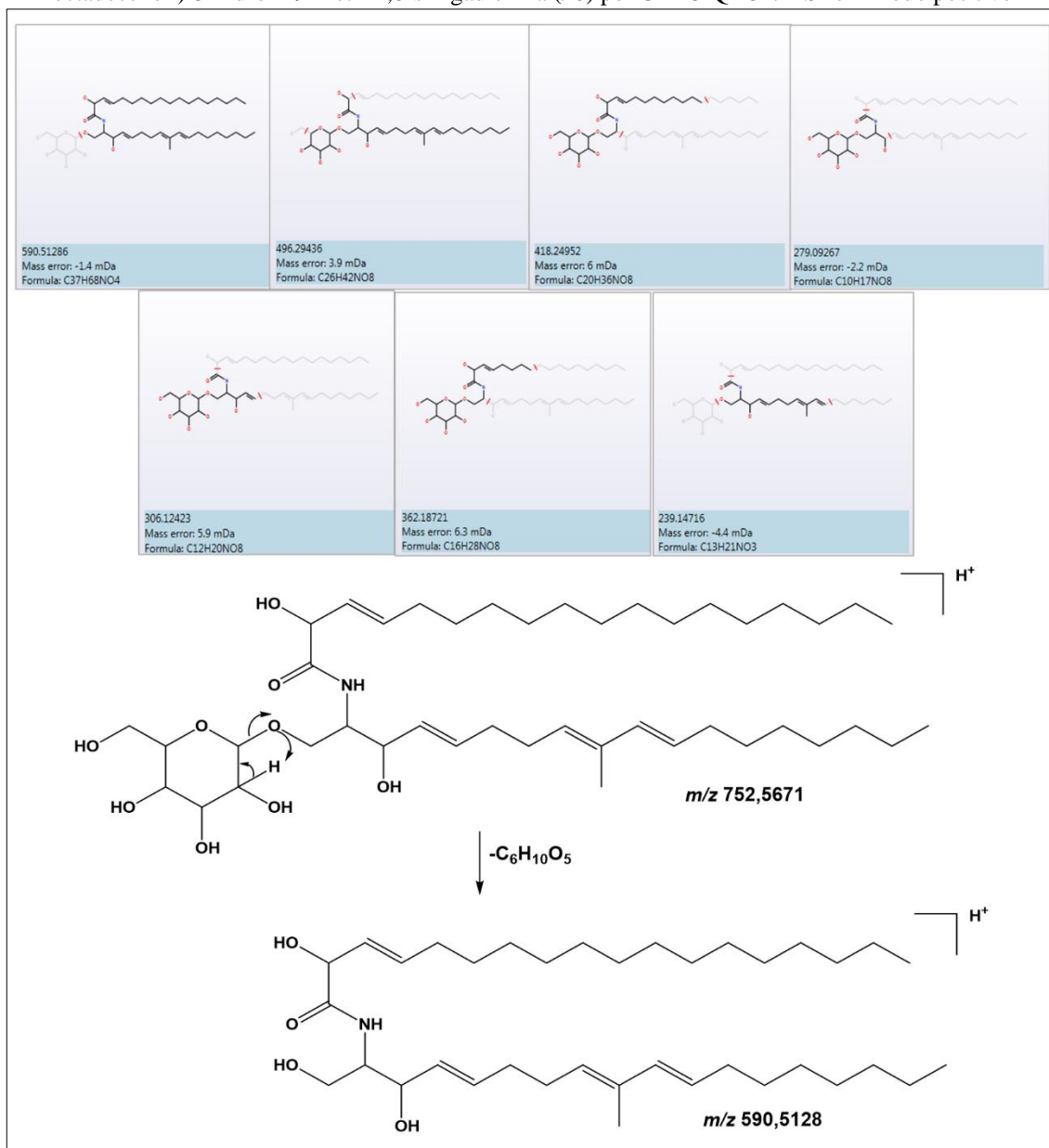
Figura 59 - Íons fragmentos, via UNIFI da substância paecilomicina B (97) por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo



A monocultura de *F. solani* e também o co-cultivo apresentaram a produção do metabólito *O*-glucopiranosil-2-*N*-(2-hidroxi-3-octadecenoil)-3-hidroxi-9-metil-4,8-sfingadienina (98), que tem alta atividade antibacteriana relatada (DESHMUKH; VEREKAR; BHAVE, 2014). Essa substância forneceu o íon precursor $[M+H]^+$ m/z 752,567 e íons fragmentos m/z 590 referente a perda de uma hexose, e outros fragmentos de perdas consecutivas de parte da cadeia lateral sugeridos pelo UNIFI (Figura 60). Essa substância foi evidenciada apenas no cultivo PCA.

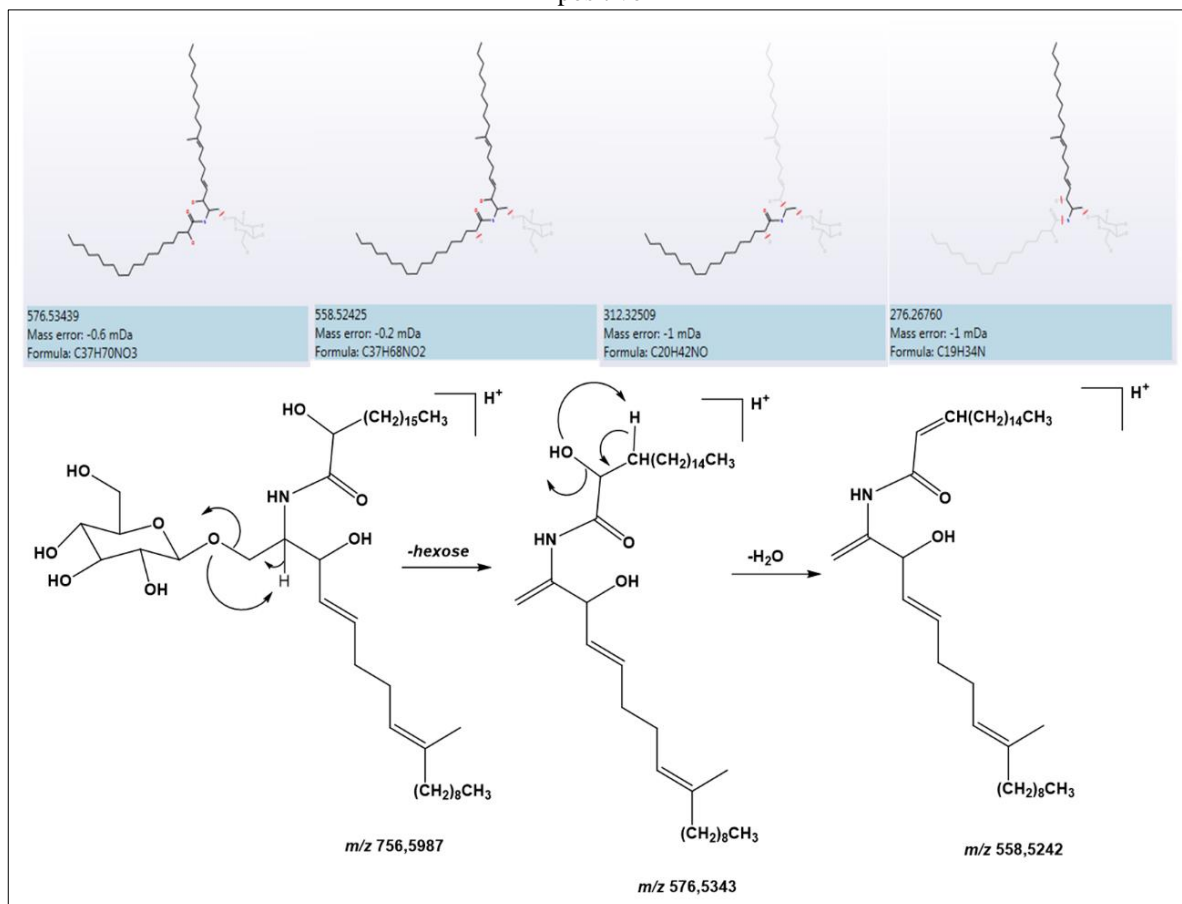
Estudo químico de fungos da rizosfera de Senna spectabilis utilizando abordagem OSMAC e ferramentas analíticas do estado da arte para anotação e caracterização de metabólitos

Figura 60 - Íons fragmentos, via UNIFI da substância proposta *O*-glucopiranosil-2-*N*-(2-hidroxi-3-octadecenoil)-3-hidroxi-9-metil-4,8-sfingadienina (**98**) por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo



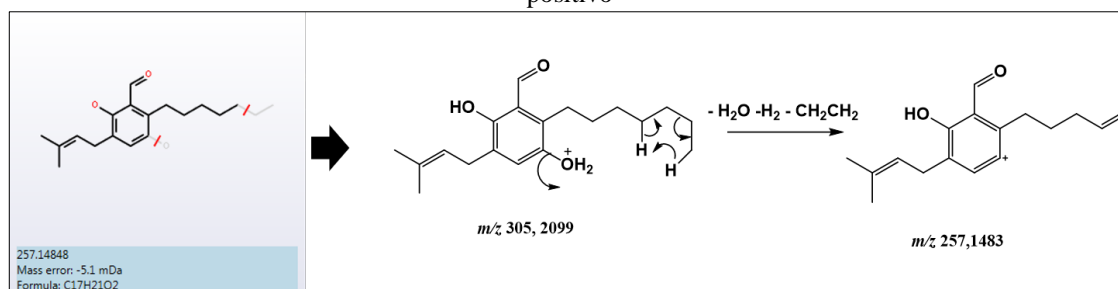
Foi anotado também, no extrato de co-cultivo PCA, a produção do lipídeo cerebrosídeo D (**99**), $[M+H]^+$ m/z 756,6987, que apresentou íons fragmentos referentes a eliminação da hexose (m/z 576) seguido de uma desidratação (m/z 558), além da clivagem das cadeias laterais, saturada e insaturada (CHRISTIE; HAN, 2010), como demonstrado na Figura 61.

Figura 61 - Íons fragmentos, via UNIFI da substância cerebroside D (**99**) por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo



Uma hidroquinona, flavoglaucina (**100**), foi anotada no extrato de *P. lilacinum* PCA e CSA, a partir do íon precursor $[M+H]^+$ m/z 305,2099 gerando o íon fragmento m/z 257,1483 referente a uma desidratação e uma eliminação 1,4 que pode ocorrer em moléculas com cadeia longa saturada (Figura 61) (DEMARQUE *et al.*, 2016).

Figura 62 - Íons fragmentos, via UNIFI da substância flavoglaucina (**100**) por UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo



A substância 4-hidroxifenilacetato de metila (**101**) também foi observada no extrato de co-cultivo PSA e apresentou um íon fragmento referente a perda de uma metila com m/z 151.

A utilização da ferramenta UNIFI, a partir de dados obtidos por UPLC-QTOF-MS^E favoreceu a análise qualitativa dos metabólitos nos extratos, não só de peptídeos, mas também de outras classes. Já que, nesse caso, é possível adicionar uma biblioteca contendo qualquer metabólito que se deseja buscar nas amostras. Pois, um dos desafios de trabalhar com base de dados para metabólitos de microrganismos, é justamente a quantidade de metabólitos disponíveis que ainda é muito inferior comparado com metabólitos de plantas que já possuem bases de dados muito mais consolidadas. Dessa forma adicionando a biblioteca nas análises, facilitou muito a anotação dos metabólitos. Foi possível observar a produção de cada um deles em cada tipo de cultivo notabilizando o resultado apontado pela OSMAC. Vários metabólitos foram anotados em apenas um tipo de cultivo específico, mostrando como a OSMAC pode fornecer uma quantidade maior de substâncias, já que ajuda a silenciar ou ativar os genes biossintéticos desses microrganismos.

Tabela 11 - Metabólitos anotados para *F. solani*, *P. lilacinum* e Co-cultivo nos diferentes tipos de cultivo via UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo utilizando o software UNIFI

(Continua)

N°	Metabólitos	Extrato	tr	Aduto/ Molécula protonada	Íon precursor (<i>m/z</i>)	Erro (mDa)	Íons fragmentos (<i>m/z</i>)	Referência
Alcaloides								
66	huperzina A	(<i>P. lilacinum</i> CSA)	4,35	[M+Na] ⁺	265,1323	1,2	210,0904; 196,0738	(TELES; TAKAHASHI, 2013)
67	militarinona B	(Co-cultivo PSA)	7,82	[M+Na] ⁺	462,2264	1,3	422,2345; 396,2188; 381,2085; 349,1817; 279,0928; 201,0457	(SCHMIDT <i>et al.</i> , 2003)
68	fumitremorgina B	(<i>F. solani</i> CCA)	6,35	[M+NH ₄] ⁺	497,2756	-0,3	303,1549; 281,1733; 279,0923; 237,1252; 202,0764	(DESHMUKH; VEREKAR; BHAVE, 2014)
Dicetopiperazinas								
69	3-(4-((3-metilbut-2-en-1-il)oxi)benzil)-3,6-bis(metilthio)piperazina-2,5-diona	(<i>F. solani</i> CCA)	5,16	[M+NH ₄] ⁺	398,1581	1,4	237,0894; 165,0683	(GUIMARÃES <i>et al.</i> , 2010)
70	fusaperazina C	(<i>F. solani</i> CCA, PSA)	5,11	[M+Na] ⁺	341,1486		237,0897; 209,0946; 165,0684	(GUIMARÃES <i>et al.</i> , 2010)
Dihidronaftalenonas								
71	3,5-dimetoxidihidrofusarubina B	(<i>F. solani</i> CCA)	0,5	[M+Na] ⁺	361,124	-1,8	260,0752; 185,0408	(KORNSAKULKARN <i>et al.</i> , 2011)

Tabela 11 - Metabólitos anotados para *F. solani*, *P. lilacinum* e Co-cultivo nos diferentes tipos de cultivo via UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo utilizando o software UNIFI

(Continuação)

N ^o	Metabólitos	Extrato	t _R	Aduto/ Molécula protonada	Íon precursor (<i>m/z</i>)	Erro (mDa)	Íons fragmentos (<i>m/z</i>)	Referência
72	dihidronaftalenona	(Co-cultivo PSA)	6,31	[M+Na] ⁺	315,0854	1,5	279,0927	(KORNSAKULKARN <i>et al.</i> , 2011)
Esteróis								
73	2 <i>B</i> -6 <i>B</i> -dihydroxy-5 <i>a</i> -methoxyergosta-7,22-diene	(<i>F. solani</i> CCA)	12,84	[M+H] ⁺	445,3668	-0,8	315,2302; 185,1149	(SHEN <i>et al.</i> , 2016)
74	ergosterol	(<i>F. solani</i> CCA)	8,13	[M+Na] ⁺	419,3286	0,1	318,2393; 241,1539	(SHEN <i>et al.</i> , 2016)
75	peróxido de ergosterol	(Co-cultivo PCA) (<i>P. lilacinum</i> PCA)	10,7	[M+H] ⁺	429,3345		377,3192; 362,3017; 266,1711; 250,1763	(LIU <i>et al.</i> , 2015)
Isocromanonas								
76	3,4-dihidro-4,8-dihidroxi-6-metoxi-4,5-dimetil-3-metil-isocromen-1-ona	(Co-cultivo PSA)	2,83	[M+H] ⁺	251,0908	-0,6	201,0458	(BOONYAKETGOSON <i>et al.</i> , 2015)
77	7-but-2-enil-3,4-dihidro-6,8-dihidroxi-3-pent-3-enil-isochromen-1-ona-6-sulfato	(<i>F. solani</i> CCA)	8,5	[M+H] ⁺	383,115	-0,9	365,1047; 347,0943; 325,1121; 158,9627	(KONGUE TATONG <i>et al.</i> , 2014)
78	fusaraisocromanona	(<i>F. solani</i> PSA)	5,6	[M+Na] ⁺	275,0903	1,3	209,1272; 181,1317	(BOONYAKETGOSON <i>et al.</i> , 2015)

Tabela 11 - Metabólitos anotados para *F. solani*, *P. lilacinum* e Co-cultivo nos diferentes tipos de cultivo via UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo utilizando o software UNIFI

(Continuação)

N ^o	Metabólitos	Extrato	t _R	Aduto/ Molécula protonada	Íon precursor (<i>m/z</i>)	Erro (mDa)	Íons fragmentos (<i>m/z</i>)	Referência
79	fusarentina dimetileter	(<i>F. solani</i> CCA)	4	[M+Na] ⁺	333,1296	-1,3	279,0925	(GROVE; POPLÉ, 1979)
Naftoquinonas								
80	5,8-dihidroxi-6-metoxi-3-metil-2-aza-9, 10-antracenediona	(Co-cultivo CSA, PCA, PSA) (<i>F. solani</i> PSA, CSA)	6,32	[M+H] ⁺	286,0703		268,0598; 243,0522; 240,0646; 215,0568	(TATUM; BAKER, 1983)
81	solaninaftoquinona	(Co-cultivo PSA)	5,59	[M+H] ⁺	275,0906	-0,8	179,0690	(TADPETCH <i>et al.</i> , 2014)
Peptídeos cíclicos								
82	beauvericina	(<i>F. solani</i> CCA) (<i>P. lilacinum</i> CSA)	10,33	[M+NH ₄] ⁺ , [M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺	801,4428		547,3298; 503,3050; 262,1425; 244,1313	(LOGRIECO <i>et al.</i> , 1998)
83	enniatina A1	(Co-cultivo CCA, CSA, PCA)	4,97	[M+Na] ⁺	690,4267		554,3553; 361,1895; 337,1975; 293,1711	(ROIG <i>et al.</i> , 2014)
84	enniatina A2	(Co-cultivo PSA)	8,66	[M+Na] ⁺	704,4468	1,1	564,3645; 528,3450; 509,3446	(ROIG <i>et al.</i> , 2014)
85	enniatina B1	(Co-cultivo CSA, PSA)	7,52	[M+H] ⁺	654,4344		613,3967; 611,4154; 593,4016; 564,3641; 529,3394; 493,3057; 480,3069; 351,2266; 215,1374	(ROIG <i>et al.</i> , 2014)

Tabela 11 - Metabólitos anotados para *F. solani*, *P. lilacinum* e Co-cultivo nos diferentes tipos de cultivo via UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo utilizando o software UNIFI

(Continuação)

N°	Metabólitos	Extrato	t _R	Aduto/ Molécula protonada	Íon precursor (m/z)	Erro (mDa)	Íons fragmentos (m/z)	Referência
86	enniatina B2	(Co-cultivo PSA)	7,4	[M+NH ₄] ⁺	643,427		564,3635; 466,3117	(ROIG <i>et al.</i> , 2014)
87	enniatina D	(<i>F. solani</i> CCA)	12,3	[M+Na] ⁺	676,4171	2,7	279,0928	(SY-CORDERO; PEARCE; OBERLIES, 2012)
88	enniatina G	(<i>F. solani</i> PSA)	7,66	[M+Na] ⁺	690,432	2	538,3595; 510,3644; 439,2893; 269,1850; 241,1536	(SY-CORDERO; PEARCE; OBERLIES, 2012)
89	enniatina M2	(Co-cultivo CSA)	7,02	[M+H] ⁺	684,4446	1,7	355,2368; 187,1218	(SY-CORDERO; PEARCE; OBERLIES, 2012)
90	enniatina MK	(Co-cultivo PSA)	8,43	[M+Na] ⁺	704,4455	-0,2	584,4107; 457,2760; 415,3260; 279,0928	(SONG <i>et al.</i> , 2009)
91	sansalvamida	(Co-cultivo PCA, PSA) (<i>F. solani</i> PSA)	9,12	[M+NH ₄] ⁺	604,4069	0,1	559,3850; 481,3375; 474,2950; 467,2041; 446,3004; 438,2947; 410,2035; 327,2262; 299,2316; 279,0924; 261,1585; 233,1639	(ROMANS-FUERTEs <i>et al.</i> , 2016)
Policetídeos								
92	fusarielina A	(<i>F. solani</i> CCA)	8,52	[M+Na] ⁺	425,2651	-1,1	335,2180; 333,2026; 269,1867	(BROWN <i>et al.</i> , 2012)
93	fusarina D	(<i>F. solani</i> CCA)	5,08	[M+NH ₄] ⁺	449,2278	-0,4	386,1586; 368,1482; 340,1532; 199,1097	(NIEHAUS <i>et al.</i> , 2013)

Tabela 11 - Metabólitos anotados para *F. solani*, *P. lilacinum* e Co-cultivo nos diferentes tipos de cultivo via UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo utilizando o software UNIFI

(Continuação)

N ^o	Metabólitos	Extrato	t _R	Aduto/ Molécula protonada	Íon precursor (<i>m/z</i>)	Erro (mDa)	Íons fragmentos (<i>m/z</i>)	Referência
94	fusarina Z	(<i>F. solani</i> CCA)	6,03	[M+H] ⁺	416,1684	-2	386,1583; 358,1632; 318,1318; 227,1050	(ZHU; JEFFREY, 1993)
95	lucilactaeno	(Co-cultivo CCA, CSA, PCA, PSA) (<i>F. solani</i> CCA, CSA, PSA)	6,25	[M+Na] ⁺ , [M+H] ⁺	402,1906		303,1559; 261,1089; 194,0928	(KAKEYA <i>et al.</i> , 2001)
96	NG-391	(Co-cultivo PCA, PSA) (<i>F. solani</i> CCA, PCA, PSA, CSA)	5,37	[M+Na] ⁺ , [M+H] ⁺ , [M+K] ⁺ , [M+NH ₄] ⁺	440,1668		317,1350; 264,0881; 245,1162; 217,1212; 203,1054; 194,0928; 189,1265; 179,1056; 161,0583	(KAKEYA <i>et al.</i> , 2001)
Outros								
97	paecilomicina B	(Co-cultivo PSA)	6,33	[M+Na] ⁺	403,1379		303,1561; 301,1402; 279,0927; 268,0595; 240,0647; 215,0565; 193,0848; 167,0691; 159,0671; 151,0743	(XU <i>et al.</i> , 2010)
98	<i>O</i> -glucopiranosil-2- <i>N</i> -(2 - hidroxi-3 -octadecenoil)-3- hidroxi-9-metil-4,8- sfingadienina	(Co-cultivo PCA) (<i>F. solani</i> PCA)	11,11	[M+H] ⁺	752,5670		590,5128; 496,2943; 418,2495; 362,1872; 306,1242; 279,0926; 239,1471	(DESHMUKH; VEREKAR; BHAVE, 2014)

Tabela 11 - Metabólitos anotados para *F. solani*, *P. lilacinum* e Co-cultivo nos diferentes tipos de cultivo via UPLC-QTOF/MS^E em modo positivo utilizando o software UNIFI

(Conclusão)

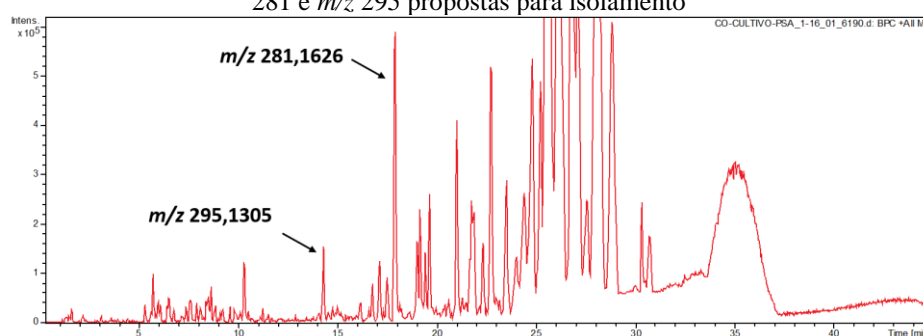
N ^o	Metabólitos	Extrato	t _R	Aduto/ Molécula protonada	Íon precursor (<i>m/z</i>)	Erro (mDa)	Íons fragmentos (<i>m/z</i>)	Referência
99	cerebrosídeo D	(Co-cultivo PCA)	12,15	[M+H] ⁺	756,5987	0,3	576,5343; 558,5242; 312,3250; 276,2676	(ZHANG <i>et al.</i> , 2011)
100	flavoglaucina	(<i>P. lilacinum</i> PCA, CSA)	5,03	[M+H] ⁺	305,2099		257,1483	(JAYAKRISHNAN; BENJAMIN, 2016)
101	4-hidróxifenilacetato de metila	(Co-cultivo PSA)	6,31	[M+H] ⁺	167,0694	-0,8	151,0743	(BOGNER <i>et al.</i> , 2017)

4.6 Fracionamento e Isolamento de Substâncias do Extrato de Co-cultivo PSA

Após a análise qualitativa dos extratos, por GC-MS e LC-MS com a utilização de ferramentas de bioinformática como redes moleculares e UNIFI, optou-se por avaliar de forma mais reducionista o extrato de co-cultivo PSA que apresentou atividade biológica promissora.

Analisando o espectro BPC (obtidos por HPLC-ESI-microTOF II-TOF-MS) desse extrato, foram observados que dois metabólitos não haviam sido anotados, sendo eles representados por m/z 281 e m/z 295 (Figura 63). Foi realizada também uma busca na base de dados DNP, e essas substâncias alvo não apresentaram nenhuma estrutura possível de ser confirmada pela espectrometria de massas. Dessa forma, devido a possibilidade de serem estruturas inéditas optou-se por realizar o isolamento desses metabólitos para elucidação estrutural.

Figura 63 - Espectro BPC do co-cultivo PSA obtido por HPLC-ESI-microTOF II-TOF-MS, e as substâncias m/z 281 e m/z 295 propostas para isolamento



Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

4.6.1 Primeiro Fracionamento do Extrato de Co-cultivo PSA

O primeiro fracionamento foi realizado em cromatografia de coluna (CC) sob vácuo para diminuir a complexidade do extrato para posterior purificação das substâncias. Sendo assim, o extrato foi fracionado em quatro partes: **Fr 1**, **Fr 2**, **Fr 3** e **Fr 4**, descrito na sessão 3.7.1. A análise por espectrometria de massas (espectros não apresentados) das frações obtidas mostrou que as substâncias de interesse estavam nas frações Fr 2 e Fr 3, enumeradas como as substâncias **4** e **5**.

Em consequência do fracionamento, a Fr 1 apresentou um metabólito que pôde ser melhor observado, graças a menor complexidade do extrato. Dessa forma, essa substância apresentou íon precursor m/z 239,1358 que não havia sido anotada anteriormente e também não foi encontrada nas bases de dados. Sendo assim, foi realizado o seu isolamento e elucidação

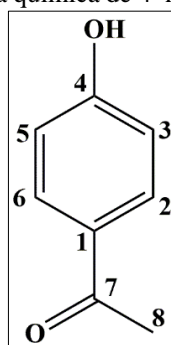
estrutural configurando a substância **2**. A Fr 1 também contou com o isolamento da substância **3**, sendo a daidzeína, que confirmou a presença desse metabólito no extrato, que havia sido anotado pelo GNPS, confirmando a eficiência desse método de anotação. E a substância **1** (que já havia sido anotado por GC-MS) foi identificada em mistura com a substância **2**.

4.6.1.1 Elucidação estrutural da substância 1

A substância **1**, já anotada nas análises por GC-MS (em co-cultivo PCA e *P. lilacinum* PCA), foi evidenciada aqui em mistura com a substância **2**. Os dados de RMN confirmaram a estrutura 4'-hidroxiacetofenona em comparação com os dados da literatura. A Figura 64 apresenta o espectro de RMN de hidrogênio onde é possível verificar as duas substâncias (**1** e **2**) em mistura, com destaque para o valor das integrais dos picos evidentes que mostram que os valores não são complementares confirmando a presença das duas substâncias. A substância **1** (Figura 67) apresenta sinais na região aromática (entre δ_H 6,5 e 8,5 ppm) enquanto a substância **2** apresenta sinais na região alifática (entre δ_H ,5 e 4,5 ppm).

Nas Figuras 65 e 66 é possível observar os espectros de HSQC e HMBC para a substância **1**, e a Tabela 12 apresenta os dados de RMN em comparação com a literatura (CHEMICAL BOOK, 2020).

Figura 64 - Estrutura química de 4'-hidroxiacetofenona (**1**)

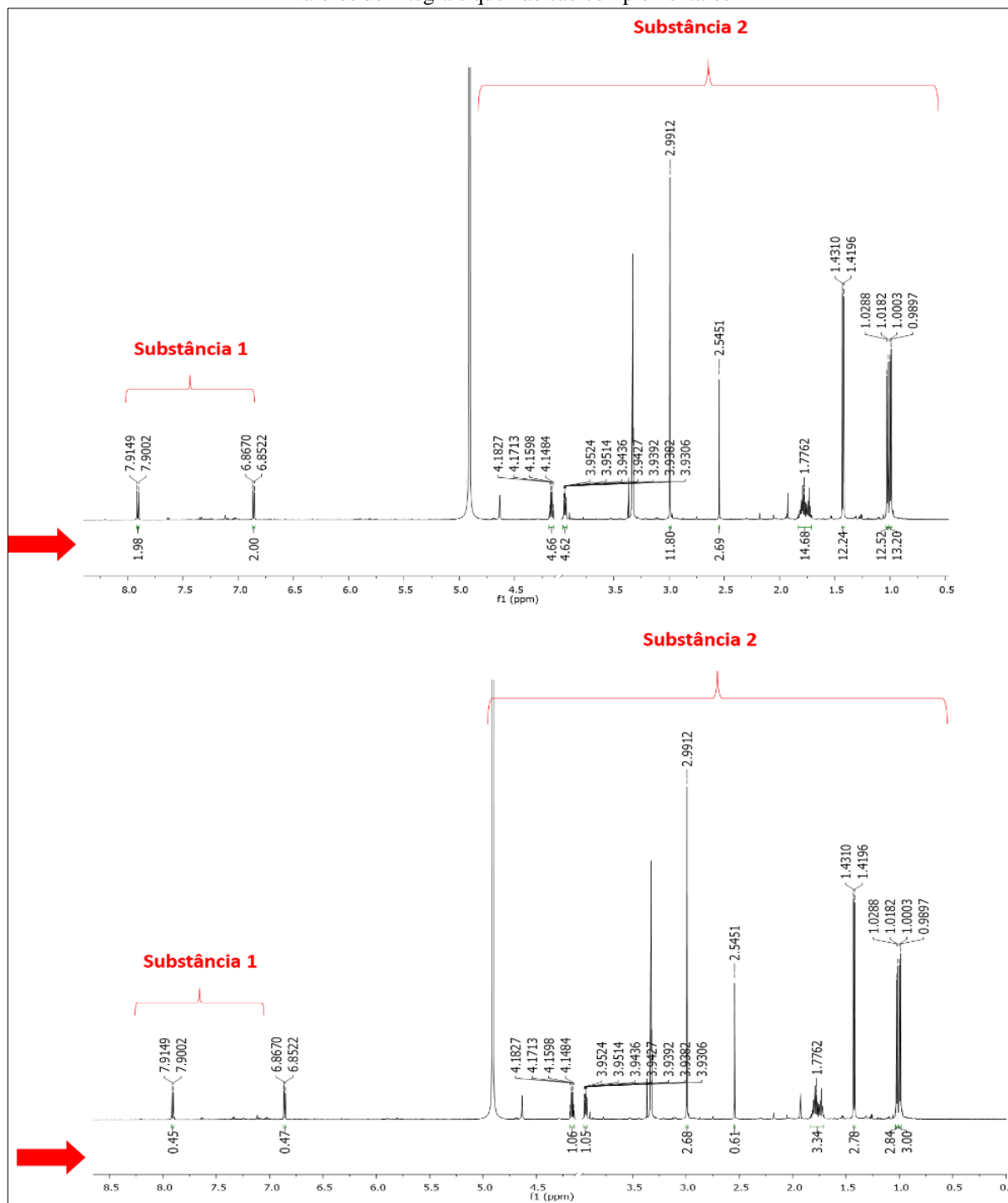


Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

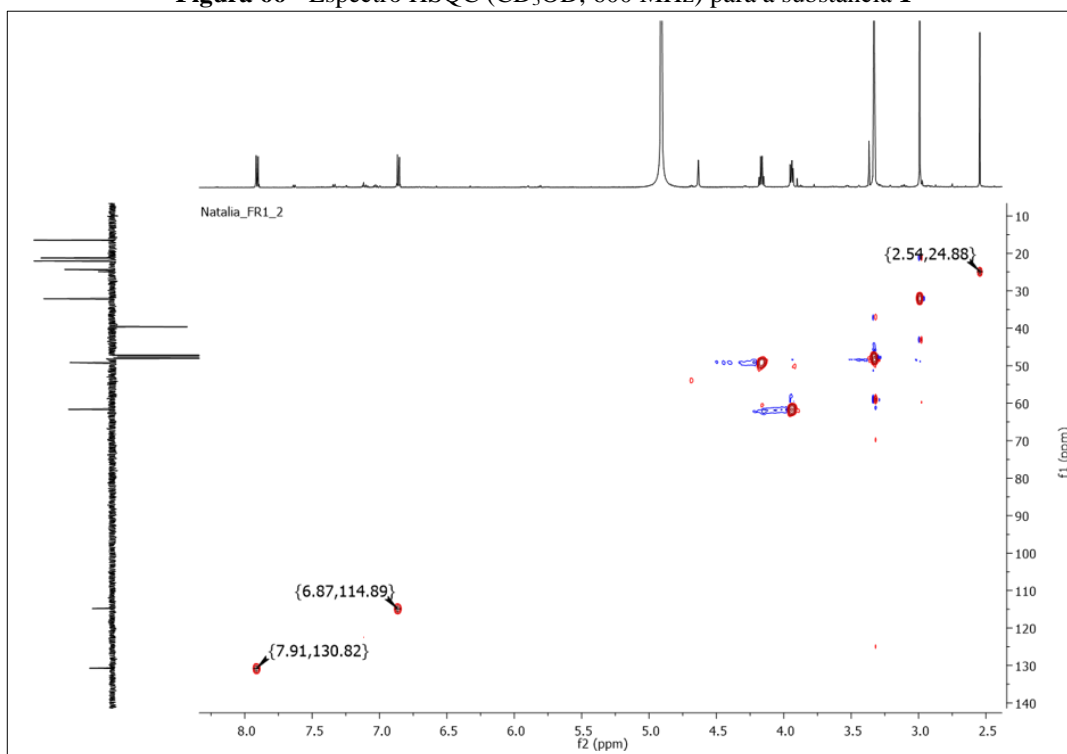
Tabela 12 - Dados de RMN de ^1H e HSQC (CD_3OD , 600 MHz) da substância **1** em comparação com a literatura (CHEMICAL BOOK, 2020)

Posição	δ_H	δ_C	δ_C Literatura
1	-	128,7	129,2
4	-	162,6	162,1
7	-	198,0	199,5
2 e 6	7,91(dd; $J=8,8$ e 2,0)	130,8	131,5
3 e 5	6,86(dd; $J=8,8$ e 2,0)	114,9	115,8
8	2,54 (s)	24,9	26,3

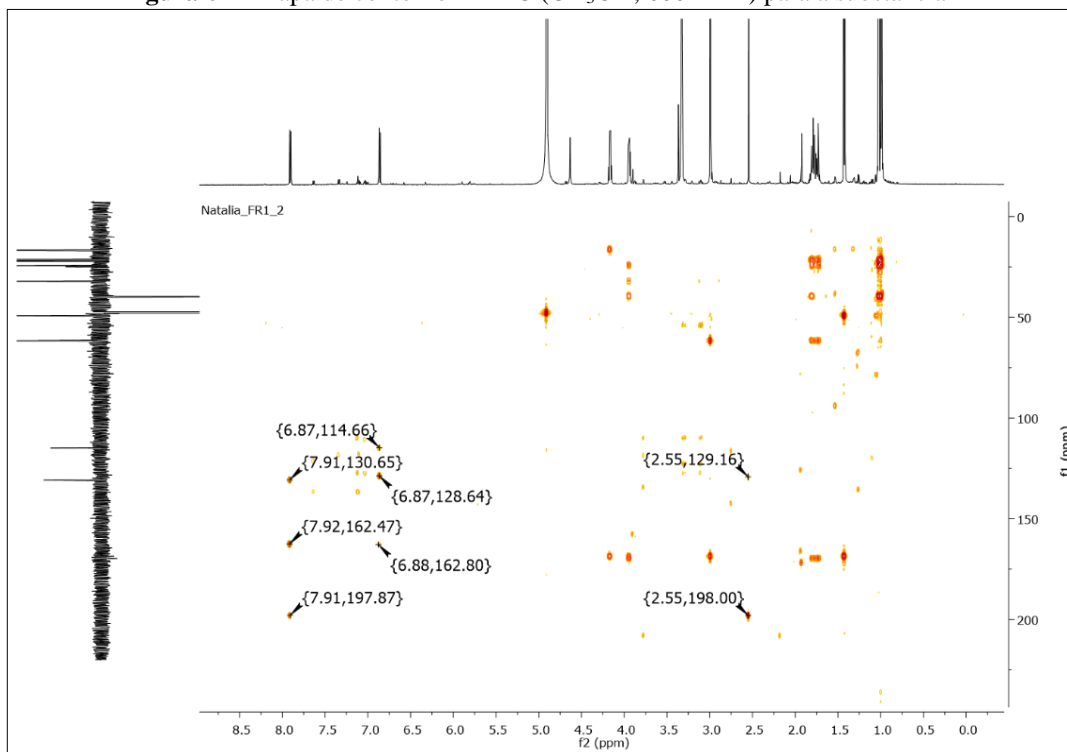
Figura 65 - Espectro de ^1H RMN (CD_3OD , 600 MHz) contendo a mistura das substâncias **1** e **2** destacando os valores de integrais que não são complementares



Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 66 - Espectro HSQC (CD₃OD, 600 MHz) para a substância 1

Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 67 - Mapa de contorno HMBC (CD₃OD, 600 MHz) para a substância 1

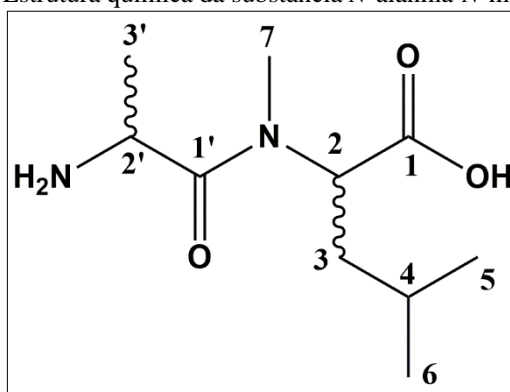
Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

4.6.1.2 Elucidação estrutural da substância 2

Para a substância **2**, foram observados dois dupletos em δ_H 0,99 e δ_H 1,02 com a mesma constante de acoplamento $J= 6,34$ que foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-6 e H-5. Os sinais em δ_H 1,43 (3H, *d*, $J= 6,8$) e δ_H 4,17 (1H, *q*, $J= 6,8$) indica o acoplamento entre os hidrogênios adjacentes H-3' e H-2'. Um simpleto largo (δ_H 2,99) foi atribuído ao H-7 característico de uma metila ligada a um átomo de nitrogênio. O duplo-duplete, em δ_H 3,94, foi atribuído ao H-2 que apresenta acoplamento com o H-3. O deslocamento em δ_H 1,77 representado por um multiplete foi atribuído aos hidrogênios H-3 e H-4 (Figura 69). O mapa de contorno HSQC apresentou a correlação dos hidrogênios com os carbonos, como apresentado na Figura 70. O mapa de contorno HMBC (Figura 71) mostrou a presença de duas carbonilas em C-1 e C-1' em correlação com os hidrogênios H-2 (δ_H 3,94), H-3 (δ_H 1,77), H-4 (δ_H 1,77) e H-2' (δ_H 4,17), H-7 (δ_H 2,99), H-3' (δ_H 1,43), respectivamente. O experimento COSY (Figura 72) forneceu a correlação H-6 \leftrightarrow H-5 \leftrightarrow H-4 e H-3 \leftrightarrow H-2, caracterizando o aminoácido leucina, e também a correlação H-2' \leftrightarrow H-3' \leftrightarrow H-7, caracterizando a outra parte da molécula reconhecida como alanina com um grupo metila ligado ao nitrogênio. Identificando essa substância como um dipeptídeo *N*-alanina-*N*-metilleucina (Figura 68). A Tabela 13 apresenta os resultados discutidos.

A Figura 73 apresenta o espectro de massas dessa substância com $[M+Na]^+$ m/z 239,1358, seguido de uma desidratação $[M+Na]^+$ m/z 221,1257, que confere com a massa de alta resolução calculada para a fórmula molecular $C_{10}H_{20}N_2O_3$, sendo $[M+Na]^+_{calc.}$ m/z 239,1369 (erro da massa molecular: 4,6 ppm) com dois graus de insaturação.

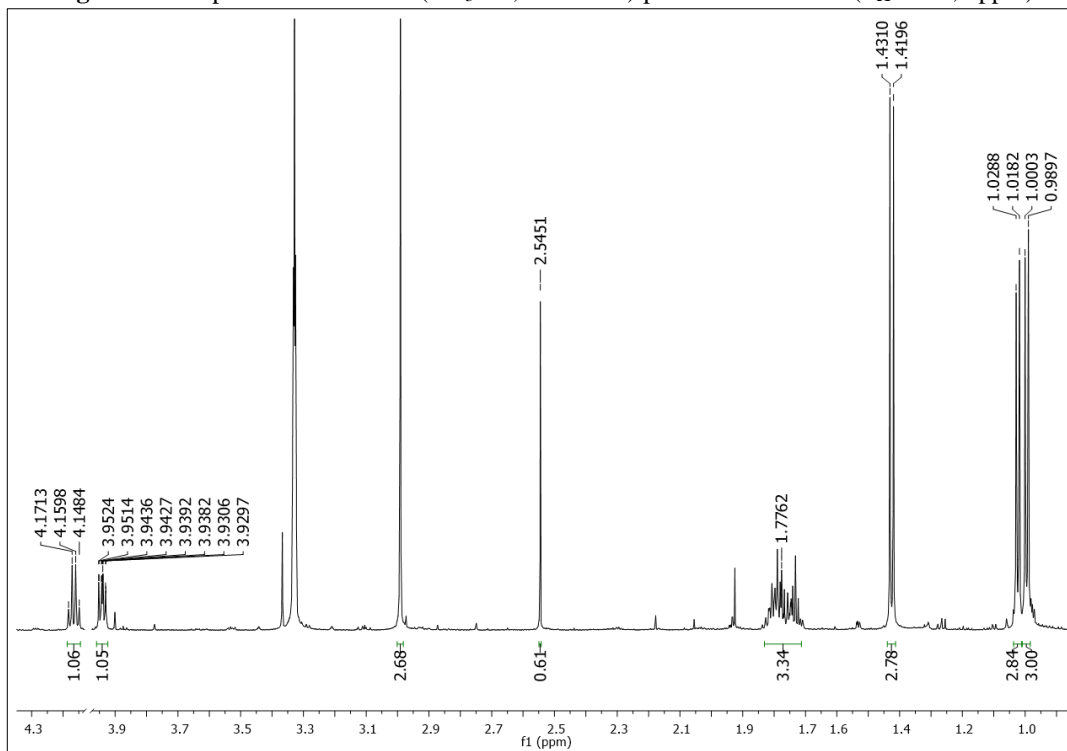
Peptídeos *N*-metilados são comuns em microrganismos e são muito atrelados a compostos farmacêuticos importantes como a ciclosporina (NISHIYAMA *et al.*, 1999). E de acordo com uma busca na base de dados Scifinder e Reaxys, a substância **2** tem sido descrita como uma substância sintética (MCDERMOTT; BENOITON, 1973) atribuída a dificuldades de sintetização por conta de sua facilidade de racemização, sendo então descrito aqui pela primeira vez a partir de uma fonte natural.

Figura 68 - Estrutura química da substância *N*-alanina-*N*-metileucina (2)

Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

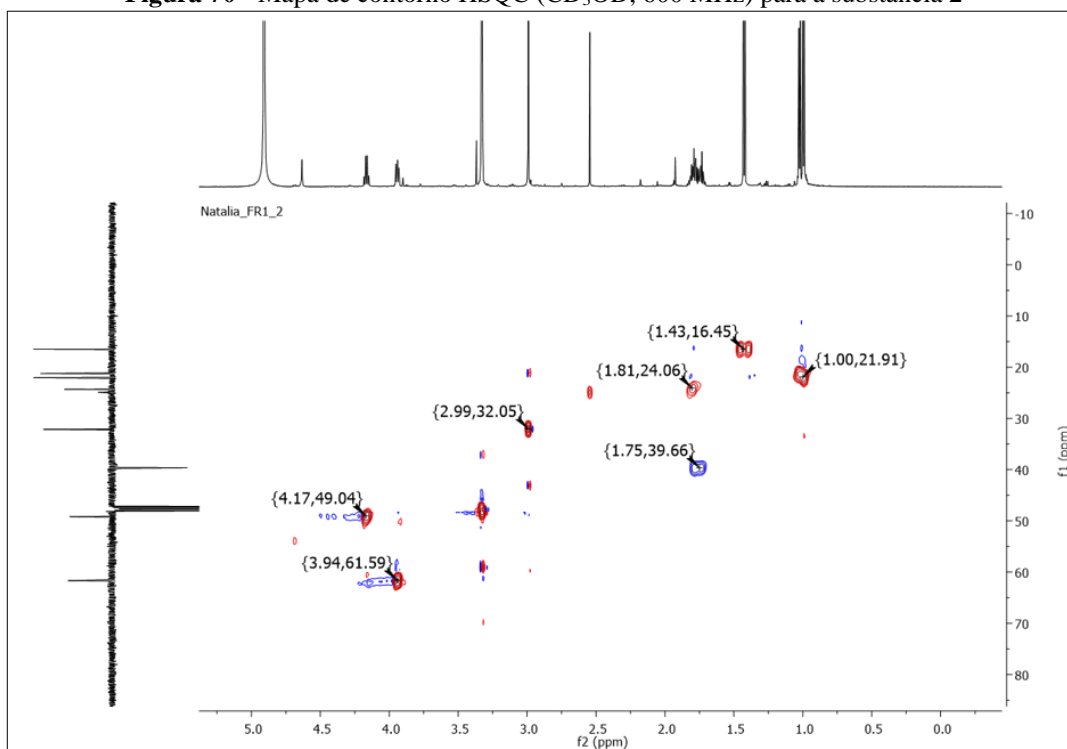
Tabela 13 - Dados de RMN de ^1H , HMBC, HSQC e COSY (CD_3OD , 600 MHz) da substância 2

Posição	δ_H	δ_C	HMBC	COSY
1	-	169,6	-	-
1'	-	168,6	-	-
2	3,94 (<i>dd</i> , $J=5,41$ e $7,69$)	61,8	C-1, C-3, C-4, C-7	H-3, H-4
2'	4,17 (<i>q</i> , $J=6,80$)	49,2	C-1', C-3'	H-3', H-7
3	1,77 (<i>m</i>)	39,6	C-1, C-2, C-4, C-5, C-6	H-2
3'	1,43 (<i>d</i> , $J=6,80$)	16,5	C-1', C-2'	H-2'
4	1,77 (<i>m</i>)	24,3	C-1, C-2, C-3, C-5, C-6	H-2
5	1,02 (<i>d</i> , $J=6,34$)	21,2	C-3, C-5	H-3, H-4, H-6
6	0,99 (<i>d</i> , $J=6,34$)	22,1	C-3, C-4, C-6	H-3, H-4, H-5
7	2,99 (<i>s</i>)	32,1	C-1', C-2	H-2', H-3'

Figura 69 - Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) para a substância 2 (δ_H 0 - 4,3 ppm)

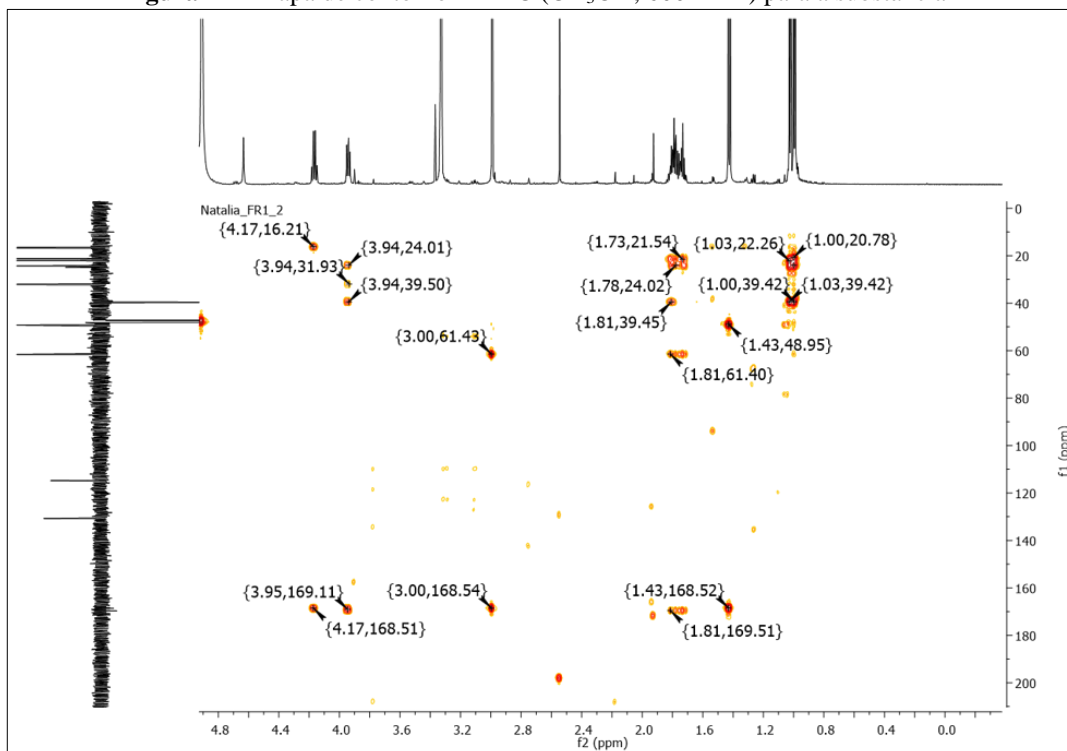
Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 70 - Mapa de contorno HSQC (CD_3OD , 600 MHz) para a substância **2**

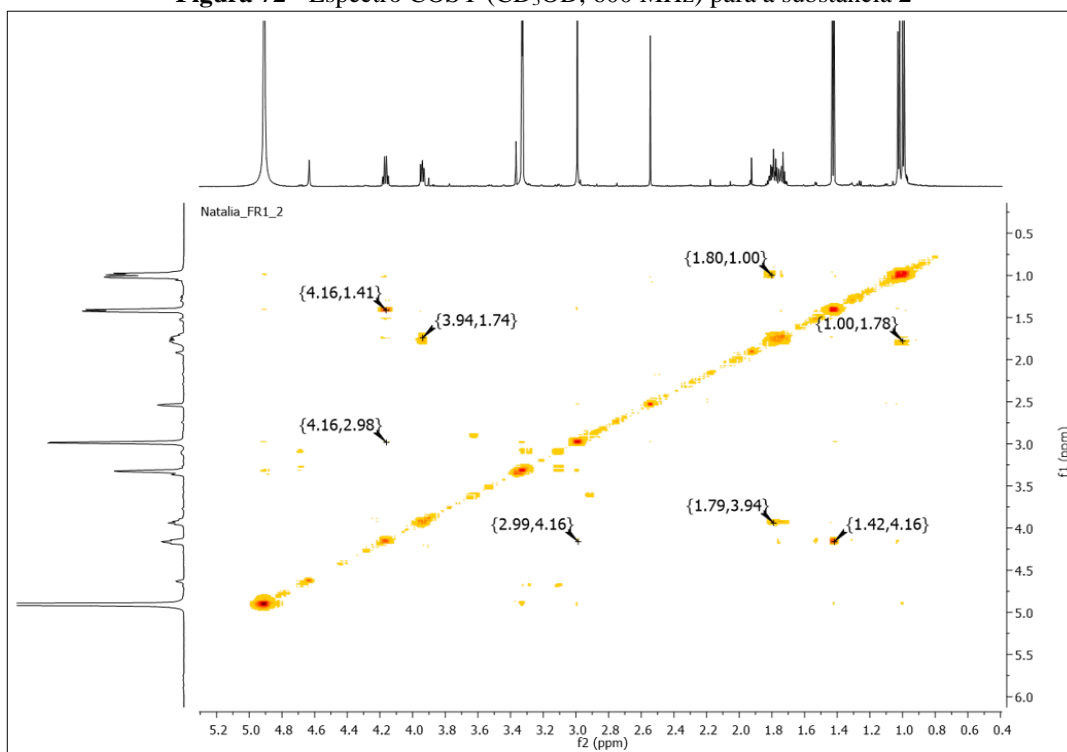


Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

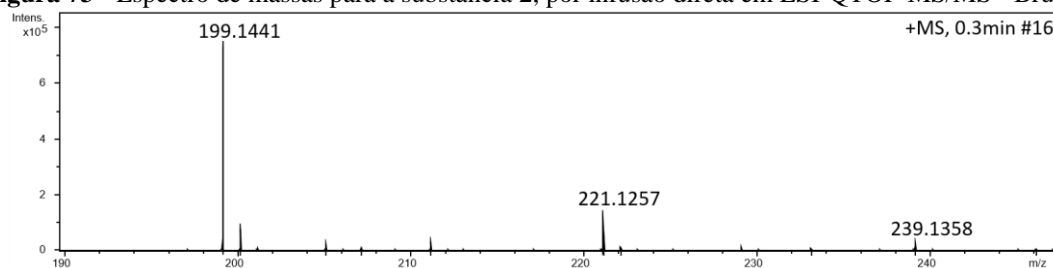
Figura 71 - Mapa de contorno HMBC (CD_3OD , 600 MHz) para a substância **2**



Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 72 - Espectro COSY (CD₃OD, 600 MHz) para a substância **2**

Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 73 - Espectro de massas para a substância **2**, por infusão direta em ESI-QTOF-MS/MS - Bruker

Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

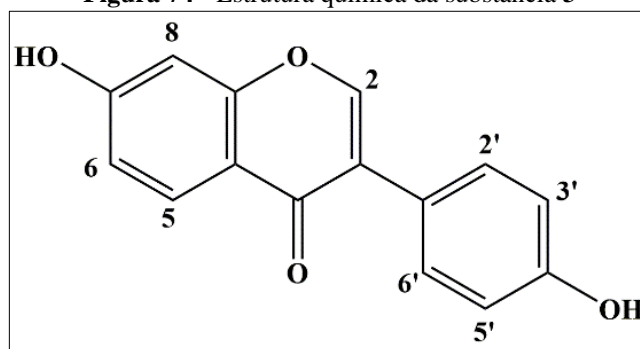
4.6.1.3 Elucidação estrutural da substância **3**

A substância **3** (Figura 74) apresentou impureza, porém, não houve problema para sua identificação. E foi possível observar seus sinais apenas na região dos hidrogênios aromáticos (Figura 75).

O simpleto em δ_H 8,15 foi atribuído ao H-2. Em δ_H 8,07 um duplete com $J= 8,82$ foi atribuído ao H-5 com acoplamento em *orto* com o H-6. Um outro duplete foi observado em δ_H 7,39 que integra para dois hidrogênios simétricos H-2' e H-6' que acoplam em *orto* ($J= 8,7$) com os outros dois hidrogênios simétricos H-3' e H-5' que possuem um deslocamento em δ_H 6,87 representado por um duplete ($J= 8,7$). Um duplo duplete foi evidenciado em δ_H 6,95

atribuído ao H-6 que acopla em *orto* ($J= 8,82$) com o H-5 ($\delta_H 8,07$) e em *meta* ($J= 2,27$) com o H-8 ($\delta_H 6,86$). O mapa de contorno HSQC mostrou os acoplamentos diretos carbono-hidrogênio (Figura 76) e o mapa de contorno HMBC (Figura 77) forneceu os carbonos quaternários C-7 ($\delta_C 163,6$), C-9 ($\delta_C 158,4$), C-10 ($\delta_C 116,5$), C-3 ($\delta_C 124,4$), C-1' ($\delta_C 122,7$) e C-4' ($\delta_C 157,2$) e também uma carbonila C-4 ($\delta_C 176,8$). Esses resultados levaram a elucidação da isoflavona 4',7-dihidroxiisoflavona (daidzeína) citada anteriormente como um produto de biotransformação que o fungo realiza a partir da daidzina presente no meio de cultivo PDB. Esse metabólito foi identificado através do GNPS para o co-cultivo PSA e para a monocultura de *P. lilacinum* PSA e PCA (Tabela 10). A elucidação estrutural dessa substância por RMN confirmou a precisão dos estudos por *molecular networking*. Os dados de RMN foram comparados com a literatura (SORDON *et al.*, 2017) e estão apresentados na Tabela 14.

Figura 74 - Estrutura química da substância 3

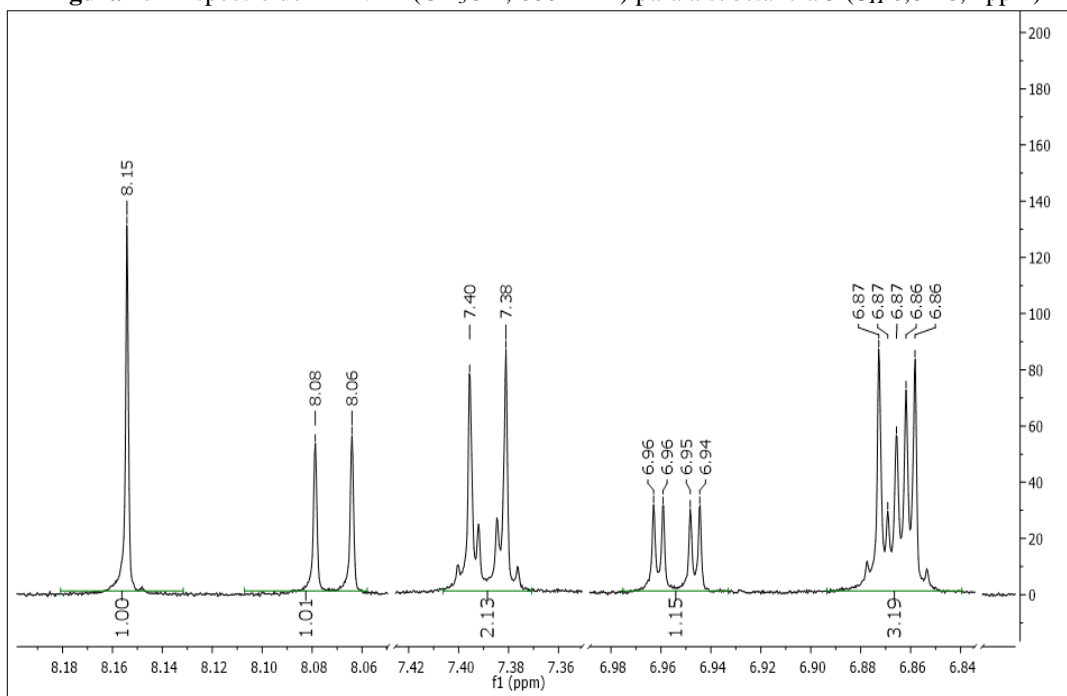


Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

Tabela 14 - Dados de RMN de 1H , HMBC e HSQC (CD_3OD , 600 MHz) da substância 3 em comparação com a literatura (SORDON *et al.*, 2017)

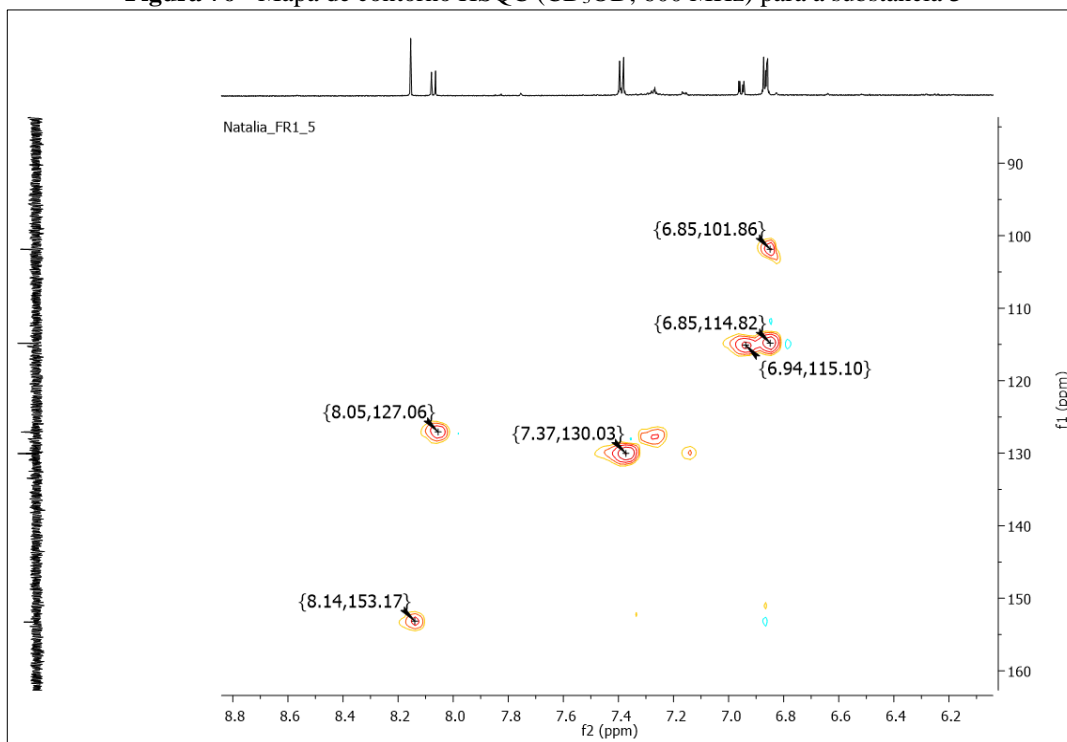
Posição	δ_H	δ_C	HMBC	Literatura
2	8,15 (s)	153,2	C-3, C-4, C-9	8,29 (1H, s)
3	-	124,4	-	-
4	-	176,8	-	-
5	8,07 (d, $J=8,8$)	127,1	C-4, C-7, C-9	7,96 (1H, d, $J=8,7$)
6	6,95 (dd, $J=2,2$ e 8,8)	115,1	C-8, C-10	6,93 (1H, dd, $J= 2,2$ e 8,7)
7	-	163,6	-	-
8	6,86 (d, 2,2)	101,9	C-7	6,85 (1H, d, $J=2,2$)
9	-	158,4	-	-
10	-	116,5	-	-
1'	-	122,7	-	-
2' e 6'	7,39 (d, $J=8,7$)	130,0	C-2', C-3, C-4', C6'	7,37 (2H, m)
3' e 5'	6,87 (d, $J=8,7$)	114,8	C-1'	6,80 (2H, m)
4'	-	157,2	-	-

Figura 75 - Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) para a substância **3** (δ_{H} 6,8 - 8,1 ppm)

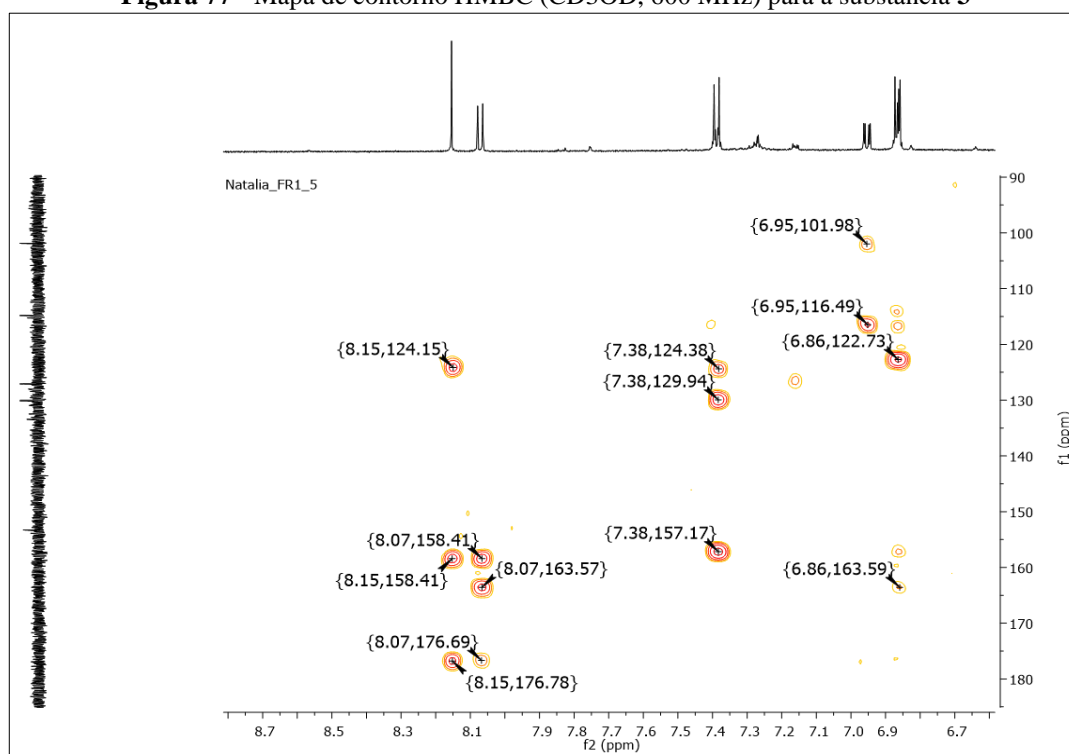


Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 76 - Mapa de contorno HSQC (CD_3OD , 600 MHz) para a substância **3**



Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 77 - Mapa de contorno HMBC (CD₃OD, 600 MHz) para a substância **3**

Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

4.6.1.4 Elucidação estrutural da substância **4**

A substância **4** (Figura 78) apresentou sinais em RMN de ¹H na região dos hidrogênios alifáticos em que foram evidenciados sinais de três dupletos referentes às metilas H-7' (δ_H 1,92), H-9' (δ_H 1,03) e H-11' (δ_H 0,96). O hidrogênio H-7' apresenta acoplamento do tipo “W” com o H-8 que contém a mesma constante de acoplamento ($J= 1,0$), que faz parte de um sistema alílico. Os sinais de H-10 (δ_H 1,25 e 1,42) caracterizam os hidrogênios diastereotópicos desse metileno. Os hidrogênios H-12 também apresentam características diastereotópicas (δ_H 1,95 e 2,23). E os hidrogênios H-9 e H-11 (δ_H 2,74 e 1,95) apresentam-se como multipletos integrando, cada um, para 1 hidrogênio confirmando a presença desses metinos. O simpleto evidenciado em δ_H 3,87 foi atribuído ao hidrogênio H-4' cujo deslocamento é característico de metila de metoxila. Na região dos hidrogênios olefínicos foram observados três sinais, em que o duplete em δ_H 5,58 foi atribuído ao H-3 que acopla com o H-5 (δ_H 6,15) com constante de acoplamento $J= 1,9$ característico de um acoplamento meta. Em δ_H 6,36 foi evidenciado um duplo duplete que foi atribuído ao H-8, que apresenta acoplamento com H-7' ($J= 1,0$) e com H-9 ($J= 10,1$) (Figura 79). No experimento DEPTq (Figura 80) foram evidenciados os sinais dos carbonos C-2 (δ_C 167,5) característico de carbonila de lactona α , β insaturada e C-13 (δ_C 182,4)

característico de carbonila de ácido carboxílico. Outros sinais de carbonos quaternários foram evidenciados, sendo eles C-6 (δ_C 161,3), C-7 (δ_C 126,2) e C-4 (δ_C 174,5).

O mapa de contorno HSQC apresentou a correlação dos hidrogênios com os carbonos, como apresentado na Figura 81.

E o mapa de contorno HMBC forneceu as correlações da substância como apresentado nas Figuras 82 e 83. As correlações do H-12 (δ_H 1,95 e 2,23) com C-11' (δ_C 21,2) e C-13 (δ_C 180,1) confirmam a presença do ácido carboxílico no final da cadeia lateral. Enquanto as correlações de H-3 (δ_H 5,58) com C-2 (δ_C 167,5), C-4 (δ_C 174,5) e C-5 (δ_C 99,6); H-4' (δ_H 57,4) com C-4 (δ_C 174,5); e H-5 (δ_H 6,15) com C-3 (δ_C 89,0), C-4 (δ_C 174,5), C-6 (δ_C 161,3) e C-7 (δ_C 126,2) definem o anel lactônico (α -pirona) com a presença da metoxila na posição 4.

Experimentos de TOCSY 1 D foram realizados para confirmar a sequência da cadeia lateral. Irradiando o hidrogênio metínico em δ_H 6,36 (H-8) pode-se observar a sequência H-7' \leftrightarrow H-8 \leftrightarrow H-9 \leftrightarrow H-9' \leftrightarrow H-10 \leftrightarrow H-11' (Figura 84). A irradiação na metila em δ_H 0,96 (H-11') apresentou a sequência H-9 \leftrightarrow H-9' \leftrightarrow H-10 \leftrightarrow H-11 \leftrightarrow H-11' \leftrightarrow H-12 (Figura 85). Dessa forma foi possível verificar a sequência inteira de H-7' até H-13. A presença do H-7' no TOCSY 1 D não seria esperado, visto que a presença do carbono quaternário C-7 interromperia a sequência, porém como se trata de um sistema alílico esse fenômeno é visualizado. A tabela 15 apresenta os dados de RMN obtidos.

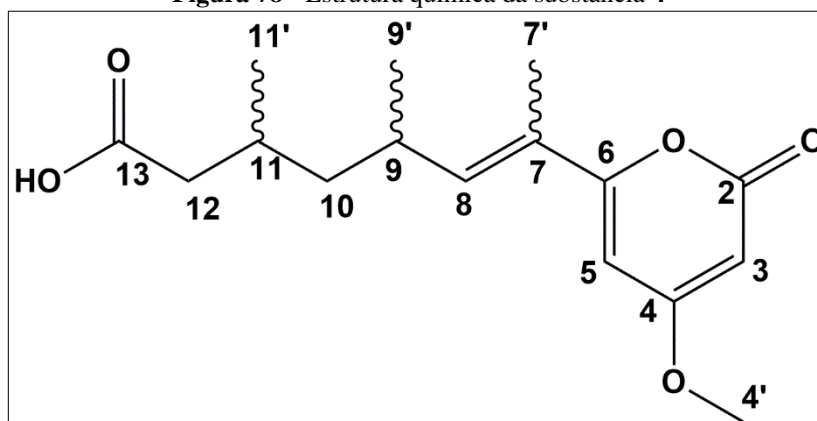
A massa de alta resolução (HRESIMS) da substância **4** gerou os íons precursores $[M+Na]^+$ m/z 317,1368 e $[M+H]^+$ m/z 295,1549 (Figura 86), que confirmou a fórmula molecular $C_{16}H_{22}O_5$ com $[M+H]^+$ calculado de m/z 295,1544 (erro: 1,7 ppm) com 6 graus de insaturação.

A Figura 87 apresenta o espectro de infra-vermelho da substância **4**, em que foram verificadas algumas bandas características como 1728 cm^{-1} e 1713 cm^{-1} que podem ser atribuídas às carbonilas do ácido carboxílico e à lactona conjugada, e 3373 cm^{-1} da hidroxila do ácido carboxílico terminal.

Sendo assim, a estrutura identificada como ácido 7-(4-metóxi-2-oxo-2H-piran-6-il)-9,11-dimetiloct-8-enóico (α -pirona), confirmou a hipótese inicial de ser uma estrutura inédita.

Assim, foi calculado o valor de $[\alpha]_D^{20}$: + 50,0 (c 0,11, MeOH). A substância apresentou coloração púrpura.

Figura 78 - Estrutura química da substância 4

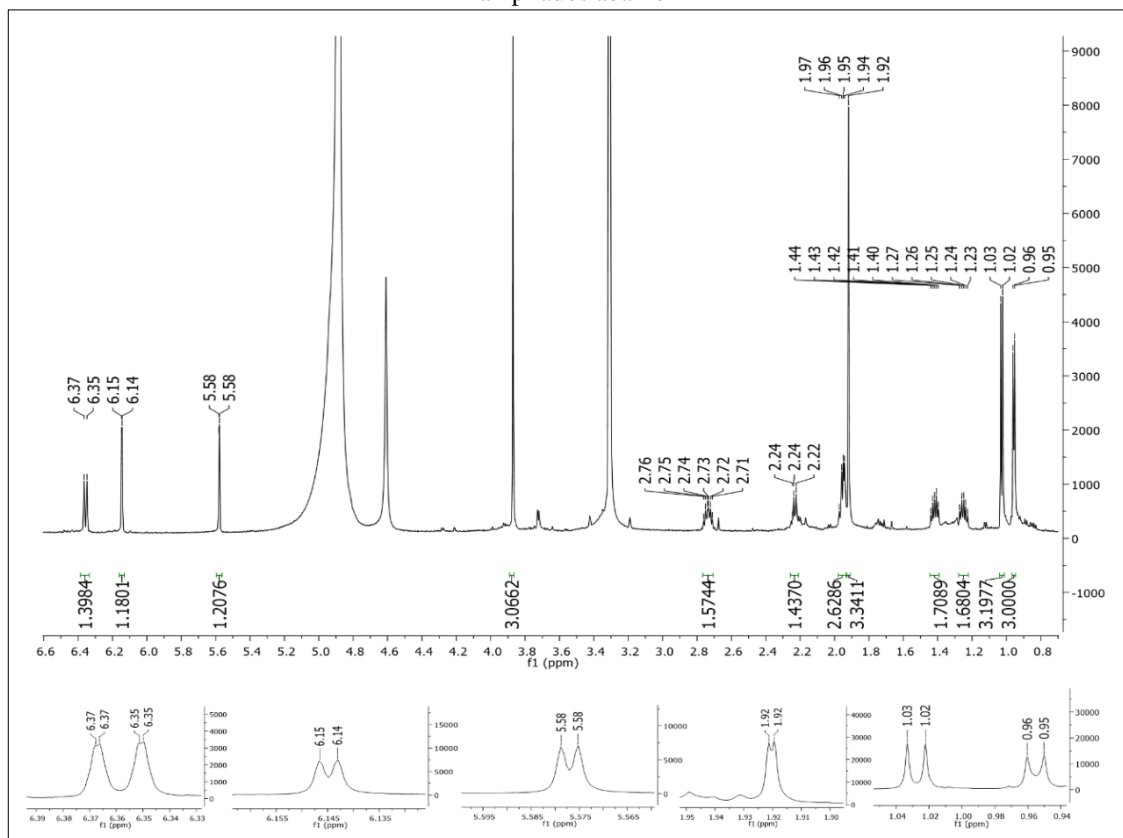


Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

Tabela 15 - Dados de RMN de ^1H , HMBC e HSQC (CD_3OD , 600 MHz) da substância 4

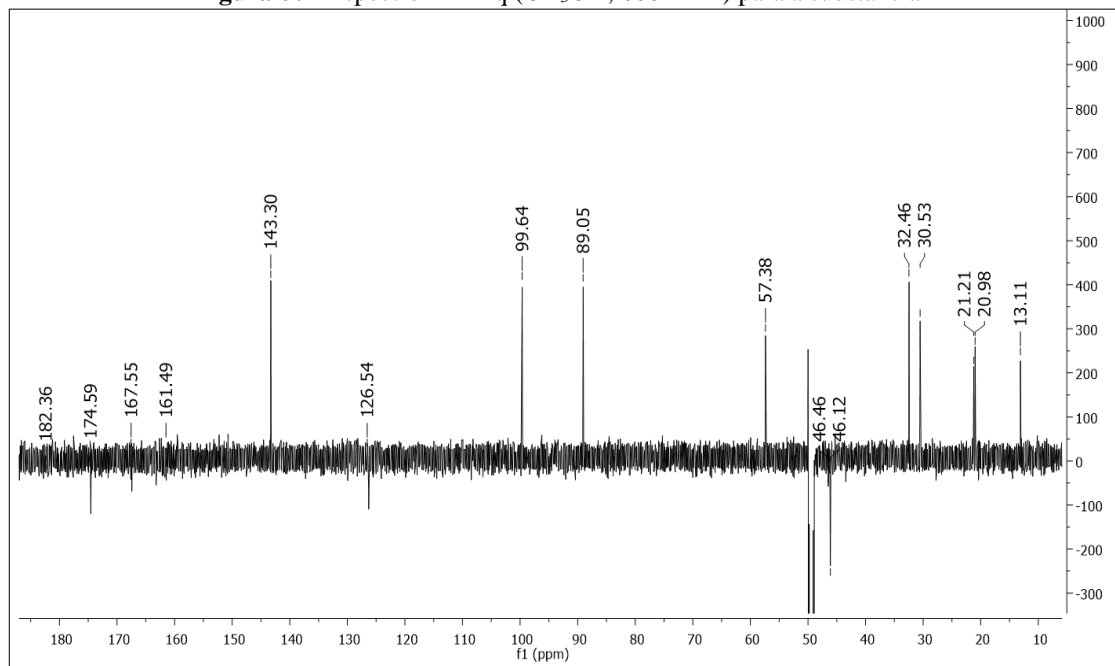
Posição	δ_{H}	δ_{C}	HMBC
2	-	167,5	-
3	5,58, <i>d</i> ($J=1,9$)	89,0, CH	C-2, C-4, C-5
4'	3,87, <i>s</i>	57,4, CH_3	C-4
4	-	174,5	-
5	6,15, <i>d</i> ($J=1,9$)	99,6, CH	C-3, C-4, C-6, C-7
6	-	161,3	-
7'	1,92, <i>d</i> ($J=1,0$)	13,1, CH_3	C6, C-7, C-8
7	-	126,2	-
8	6,36, <i>dd</i> ($J=10,1$ e $1,0$)	143,2, CH	C-6, C-7, C-7', C-9', C-9, C-10
9'	1,03, <i>d</i> ($J=6,7$)	20,9, CH_3	C-8, C-9, C-10
9	2,74, <i>m</i>	32,4, CH	C-7, C-8, C-9', C-10
10	1,25, <i>q</i> ($J=7,0$) 1,42, <i>q</i> ($J=7,0$)	46,1, CH 46,1, CH	C-8, C-9'-C-11, C-12
11'	0,96, <i>d</i> ($J=5,9$)	21,2, CH_3	C-11, C-12
11	1,95, <i>m</i>	30,5, CH	-
12	1,95, <i>m</i> 2,23, <i>m</i>	46,5, CH 46,5, CH	C-11', C-13
13	-	182,4	-

Figura 79 - Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) para a substância **4**, com alguns sinais importantes ampliados abaixo



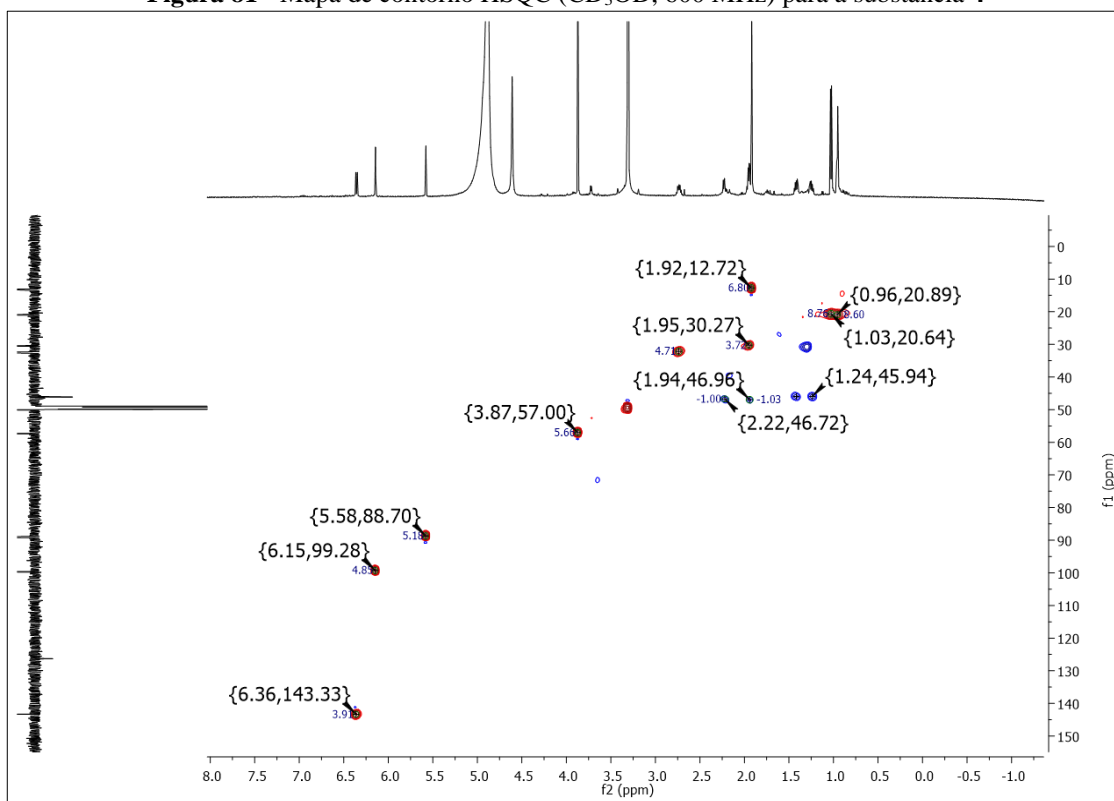
Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 80 - Espectro DEPTq (CD_3OD , 600 MHz) para a substância **4**



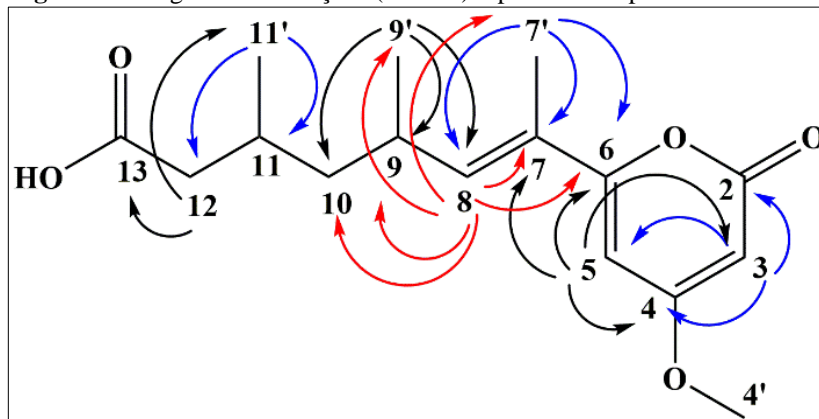
Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 81 - Mapa de contorno HSQC (CD_3OD , 600 MHz) para a substância **4**



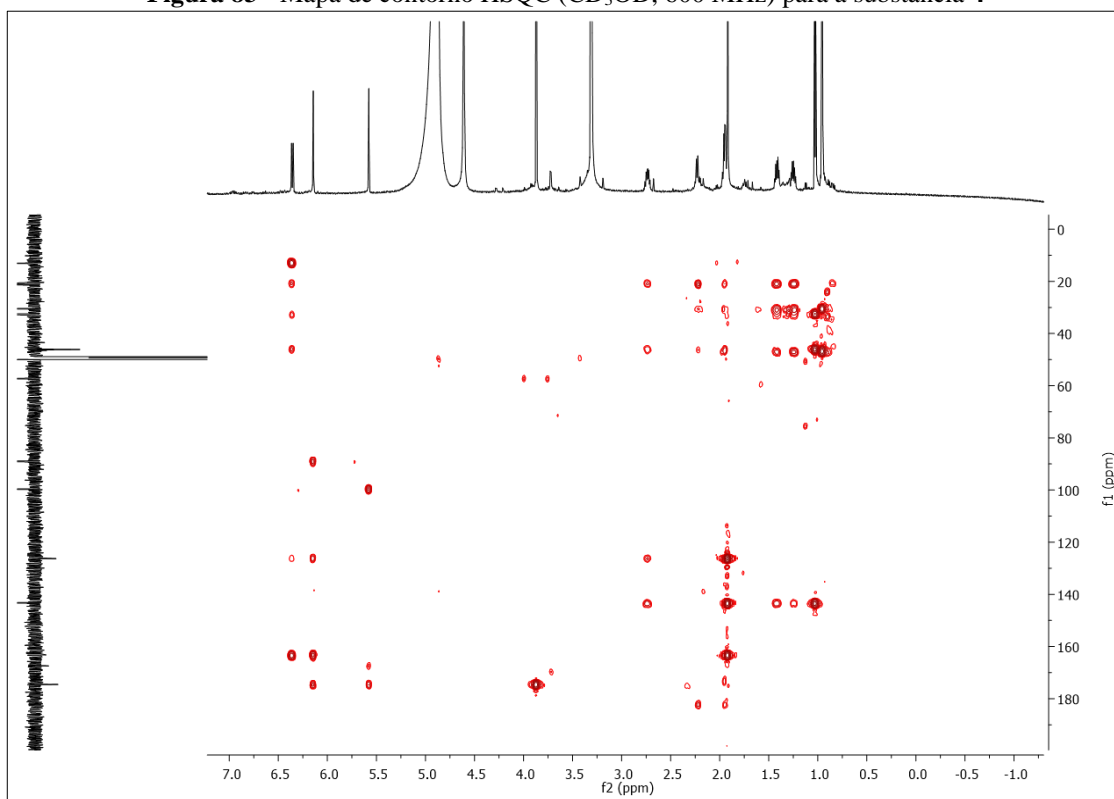
Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 82 - Algumas correlações (HMBC) representadas para a substância **4**



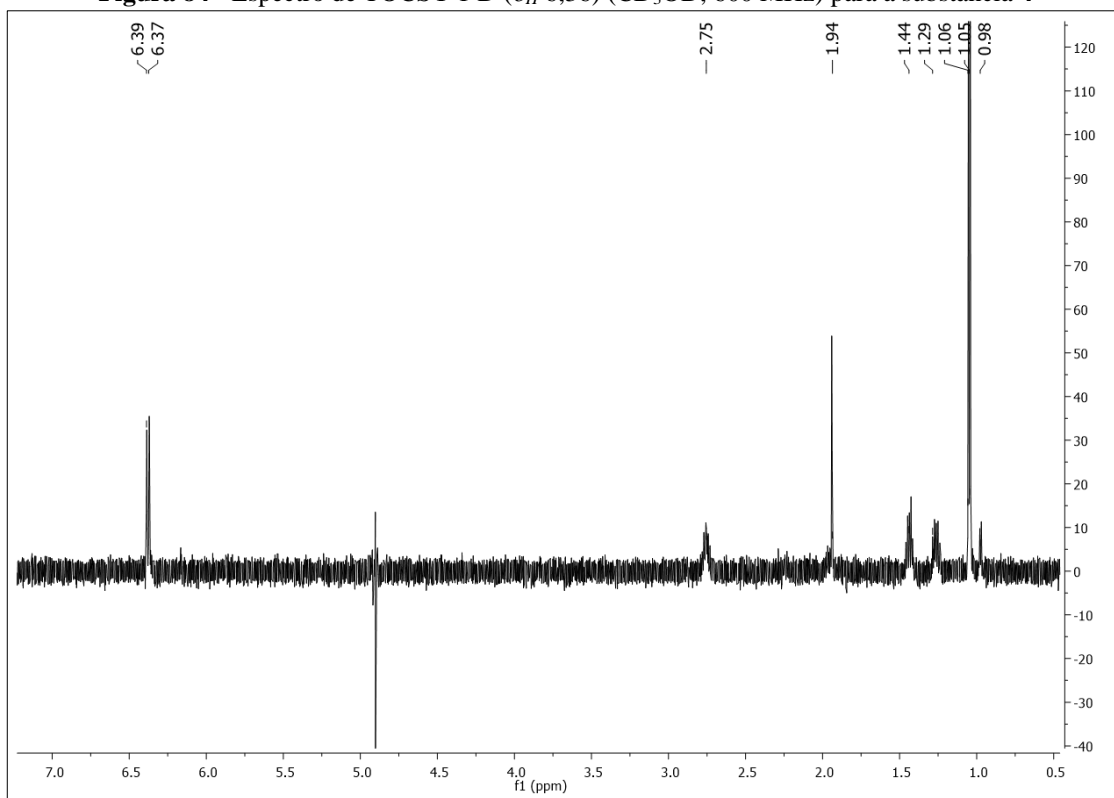
Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

Figura 83 - Mapa de contorno HSQC (CD_3OD , 600 MHz) para a substância **4**

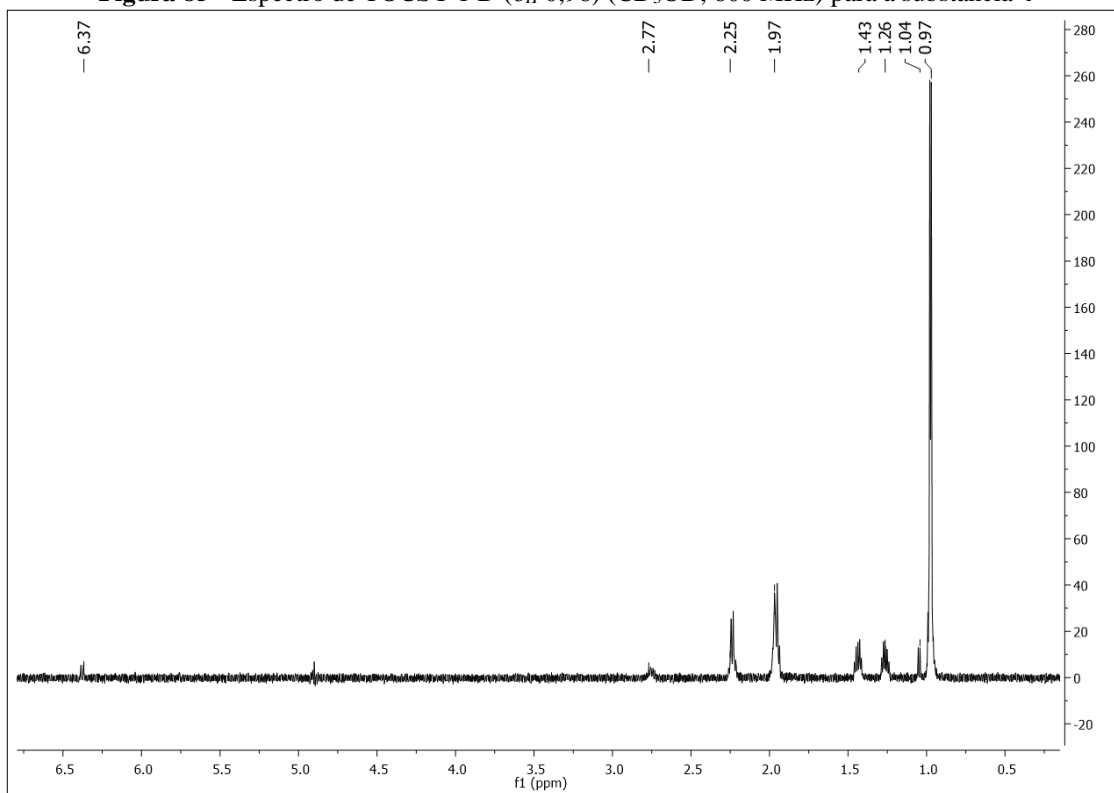


Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

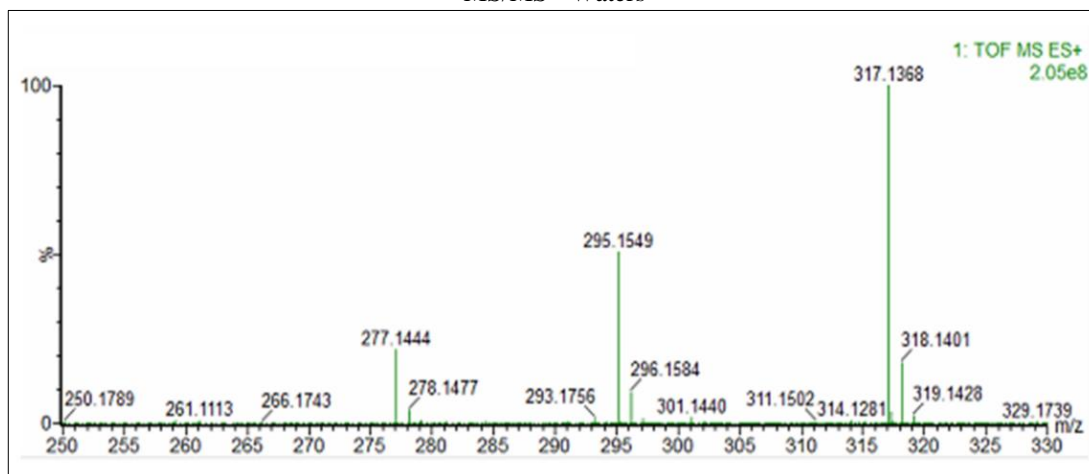
Figura 84 - Espectro de TOCSY 1 D (δ_H 6,36) (CD_3OD , 600 MHz) para a substância **4**



Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

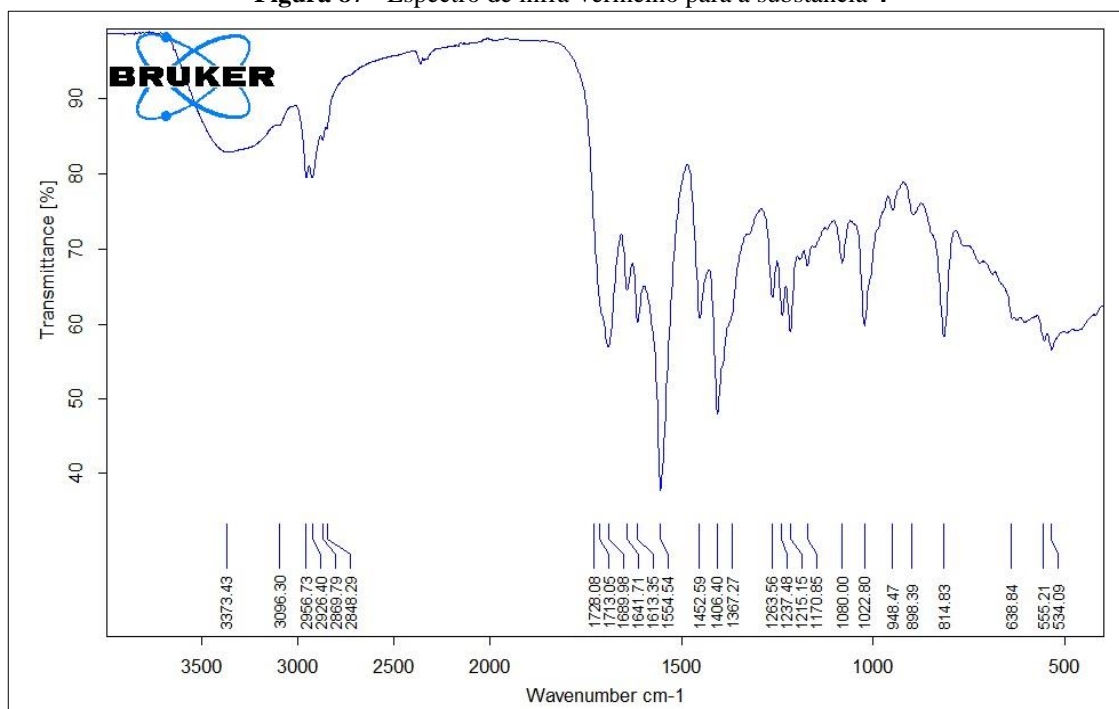
Figura 85 - Espectro de TOCSY 1 D (δ_H 0,96) (CD_3OD , 600 MHz) para a substância **4**

Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 86 - Espectro de massas (HRESIMS) obtido em ESI modo positivo para a substância **4**, por ESI-QTOF-MS/MS - Waters

Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 87 - Espectro de infra-vermelho para a substância 4



Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

4.6.1.5 Elucidação estrutural da substância 5

A substância **5** (Figura 88) apresentou perfil espectral em RMN de ^1H , DEPTq, HSQC e HMBC, muito parecidos com a substância **4**, cujos sinais que se diferem, são discutidos nesse tópico.

O RMN de ^1H (Figura 89) apresentou um deslocamento em δ_{H} 3,45 referente a um duplo quarteto que foi atribuído ao H-11'. O sinal em δ_{H} 0,90 foi atribuído ao H-13, que apresentou-se como um tripleto, com pico integrado para 3 hidrogênios, evidenciando uma metila.

Analisando o DEPTq (Figura 90) foi observada a presença do carbono carbinólico com δ_{C} em 65,4 atribuído ao C-11'. E ainda, foi evidenciada a presença de um carbono quaternário atribuído a carbonila C-4 com δ_{C} 180,0 com deslocamento característico de cetona cíclica α , β insaturada.

O mapa de contornos HSCQ apresentou a correlação dos hidrogênios com os carbonos, como apresentado na (Figura 91).

O mapa de contorno HMBC (Figura 93) apresentou correlações que confirmam a estrutura (Figura 92). O H-5 (δ_{H} 6,20) apresenta correlação com C-7 (δ_{C} 125,9), C-6 (δ_{C} 163,4), C3 (δ_{C} 89,8) e C-4 (δ_{C} 185,0), que auxilia na atribuição da carbonila na posição 4. E o H-3 (δ_{H} 5,59) se correlaciona com C2 (δ_{C} 170,2), C-5 (δ_{C} 109,2) e C-4 (δ_{C} 185,0) também corrobora

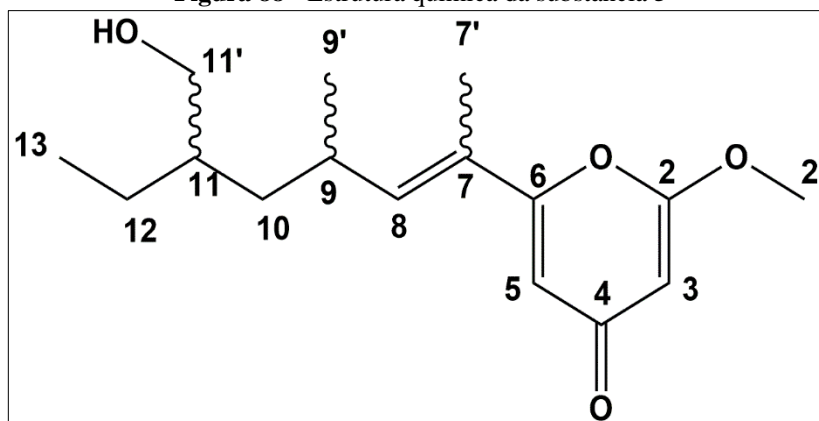
em indicar a presença da carbonila na posição 4 e a metoxila na posição 2, confirmando assim um anel γ -pirona (diferente do que foi observado para a substância **4**, que apresenta uma lactona - α -pirona).

Os experimentos de TOCSY 1 D confirmam a sequência de spins da cadeia lateral. Quando a irradiação ocorre em δ_H 1,05 (H-9') é possível observar a sequência completa C-8 \leftrightarrow C-7' \leftrightarrow C-9 \leftrightarrow C-9' \leftrightarrow C-10 \leftrightarrow C-11 \leftrightarrow C11' \leftrightarrow C12 \leftrightarrow C13 (Figura 94). Os dados espectroscópicos da substância **5** são apresentados na Tabela 16.

O espectro de massas de alta resolução (HRESIMS), apresentou $[M+H]^+$ m/z 281,1750 para a substância **5** (Figura 95) que confirma a fórmula molecular $C_{16}H_{24}O_4$ com $[M+H]^+$ calculado de m/z 281,1751 (erro: 0,35 ppm), apresentando cinco graus de insaturação. Assim, foi calculado o valor de $[x]_D^{20}$: + 80,9 (c 0,11, MeOH). A substância apresentou coloração marrom avermelhada.

No espectro de infra-vermelho (Figura 96) a banda aproximadamente em 1650 cm^{-1} representa a cetona cíclica insaturada que difere da substância **4**. Além disso, as bandas acima de 1700 não são observadas.

Figura 88 - Estrutura química da substância **5**

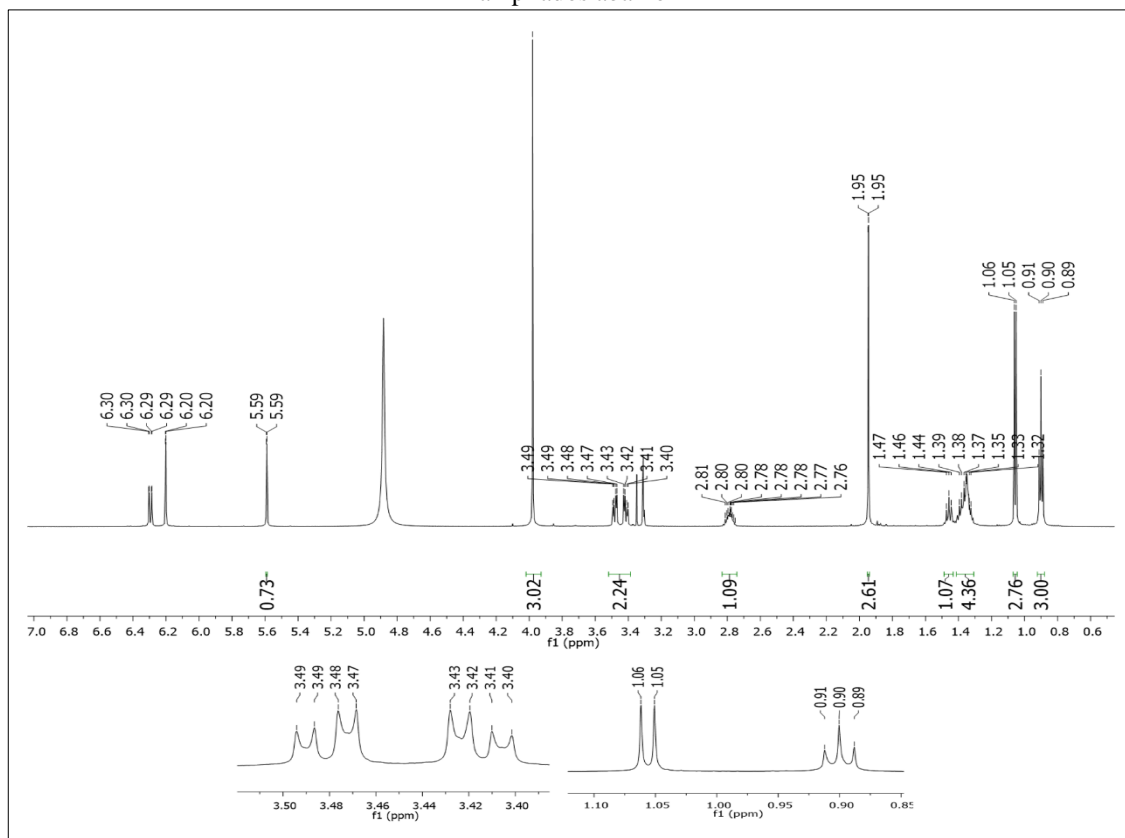


Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

Tabela 16 - Dados de RMN de ^1H , HMBC e HSQC (CD_3OD , 600 MHz) da substância **5**

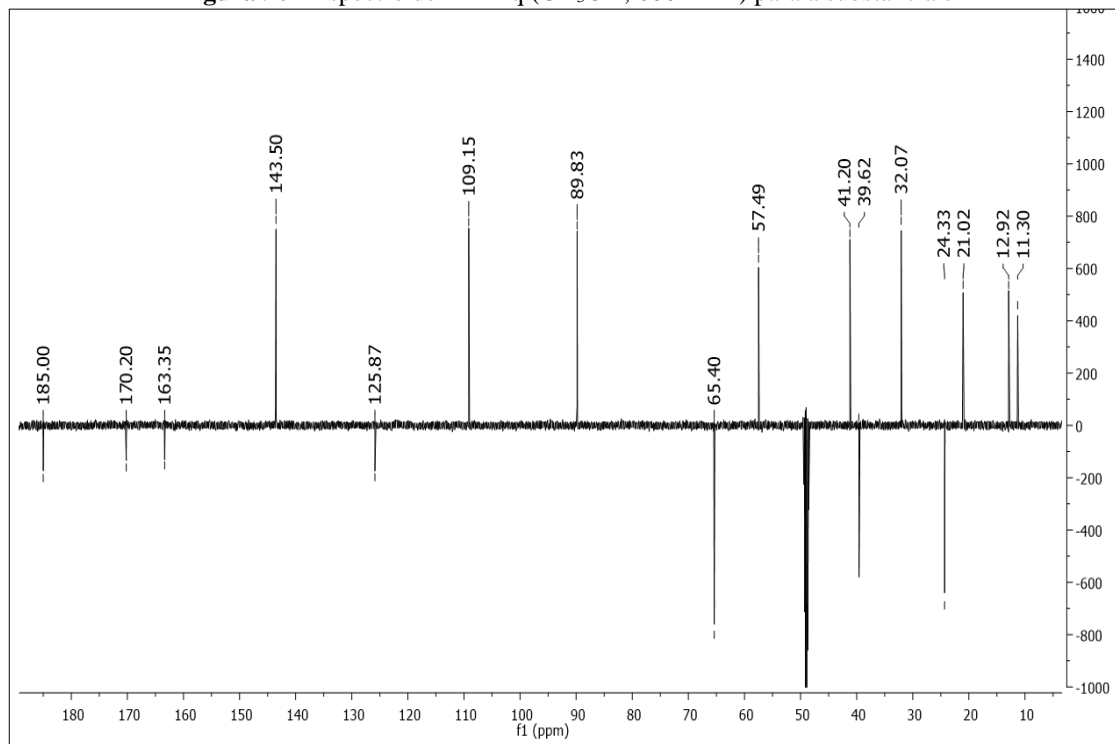
	δ_{H}	δ_{C}	HMBC
2	-	170,2, C	-
2'	3,98, <i>s</i>	57,5, CH_3	C-2
3	5,59, <i>d</i> ($J=1,8$)	89,8, CH	C-2, C-4, C-5
4	-	185,0, C	-
5	6,20, <i>d</i> ($J=1,8$)	109,2, CH	C-3, C-4, C-6, C-7
6	-	163,4, C	-
7	-	125,9, C	-
7'	1,95, <i>d</i> ($J=1,3$)	12,9, CH_3	C-5, C-6, C-7, C-8
8	6,30, <i>dd</i> ($J=9,9, 1,2$)	143,5, CH	C-6, C-7, C-7', C-9, C-9', C-10
9	2,79, <i>m</i>	32,1, CH	C-10
9'	1,05, <i>d</i> ($J=6,6$)	21,0, CH_3	C-8, C-9, C-10
10	1,33, <i>m</i>	39,6, CH	C-8, C-11, C-11', C-12
	1,46, <i>m</i>	39,6, CH	C-9, C-9', C-11, C-11', C-12
11	1,35, <i>m</i>	41,2, CH	C-11', C-13
11'	3,45, <i>dq</i> ($J=10,7, 4,6$)	65,4, CH_2	C-10, C-12
12	1,39, <i>m</i>	24,3, CH_2	C-11, C-11', C-13
13	0,90, <i>t</i> ($J=7,4$)	11,3, CH_3	C-11, C-12

Figura 89 - Espectro de RMN ¹H (CD₃OD, 600 MHz) para a substância **5**, com alguns sinais importantes ampliados abaixo

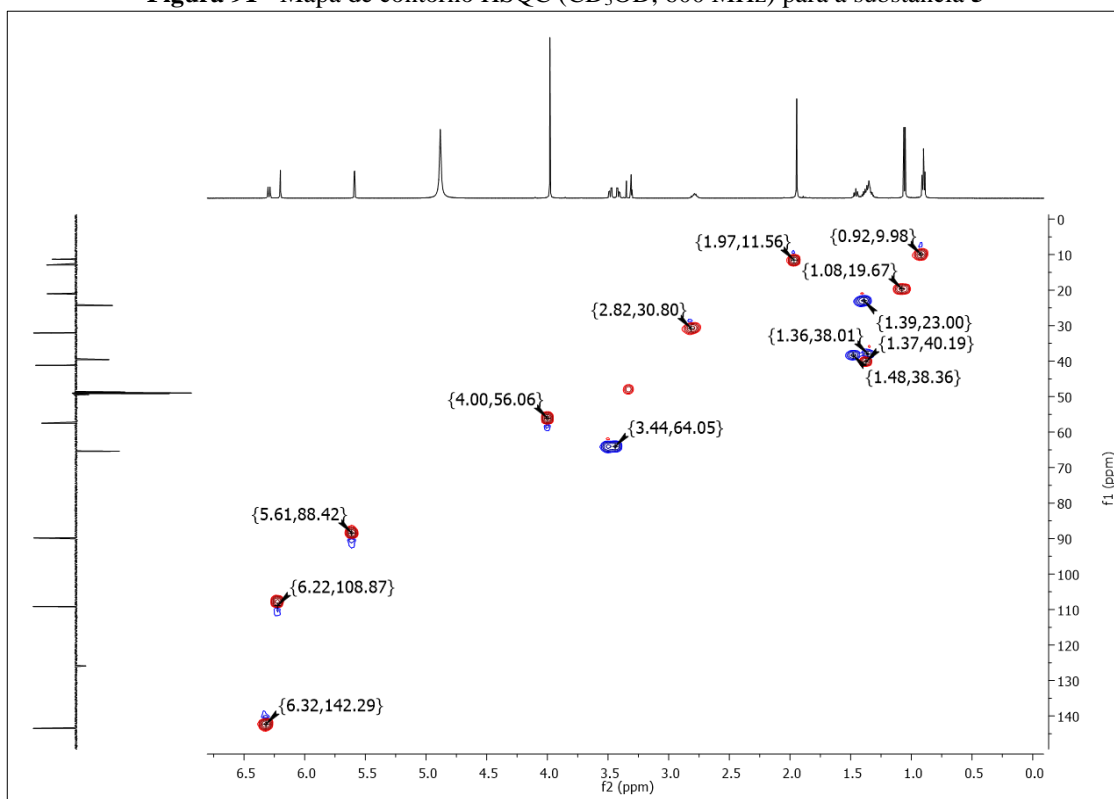


Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

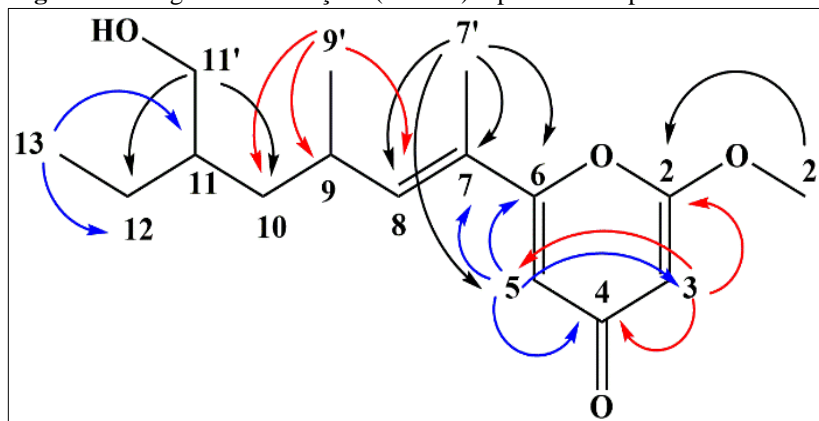
Figura 90 - Espectro de DEPTq (CD₃OD, 600 MHz) para a substância **5**



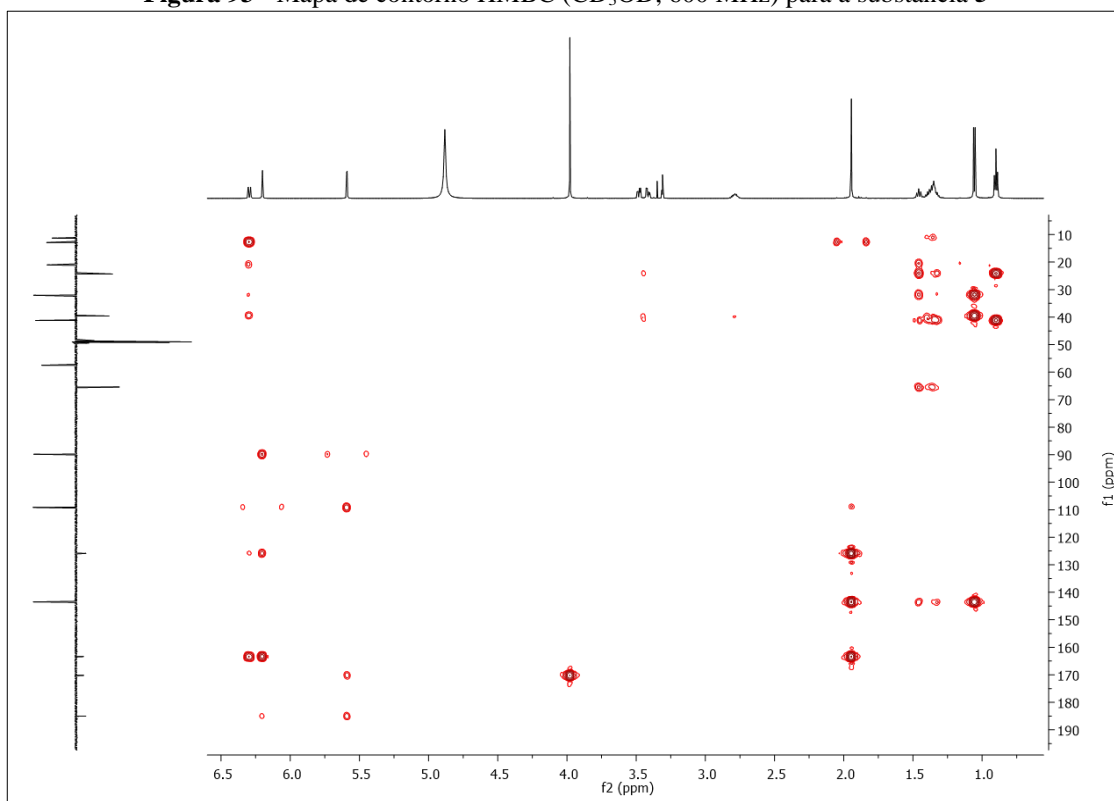
Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 91 - Mapa de contorno HSQC (CD_3OD , 600 MHz) para a substância **5**

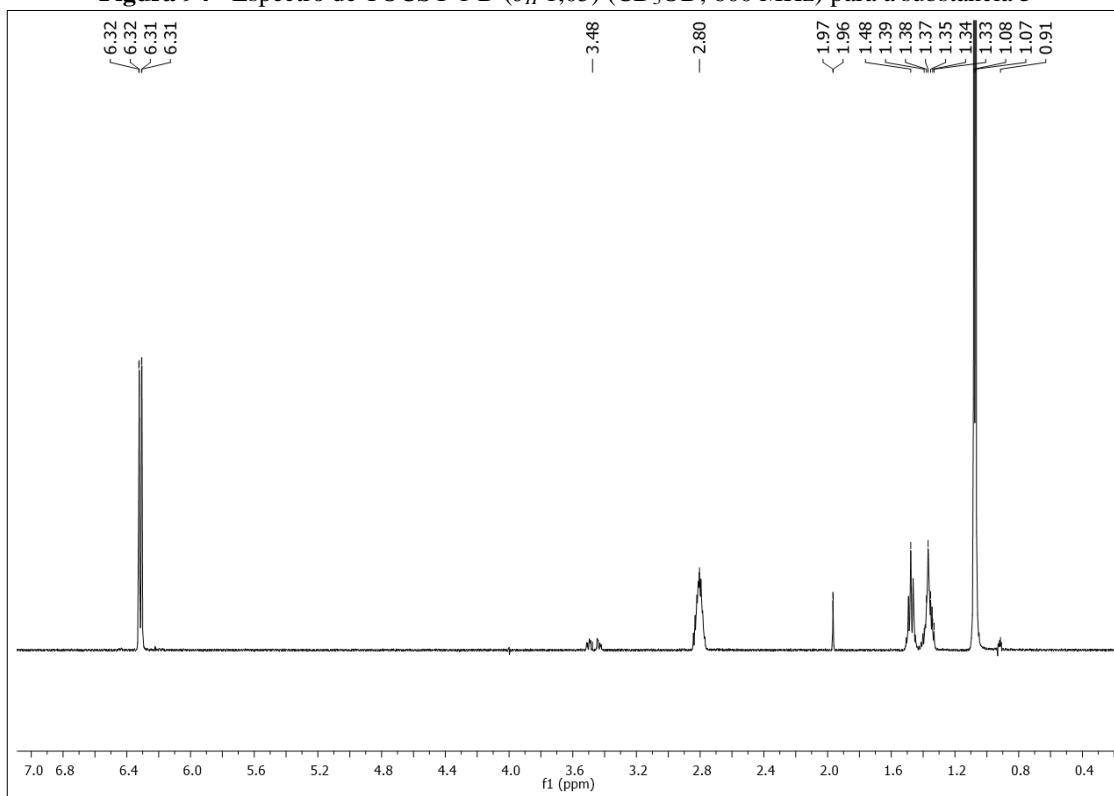
Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 92 - Algumas correlações (HMBC) representadas para a substância **5**

Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

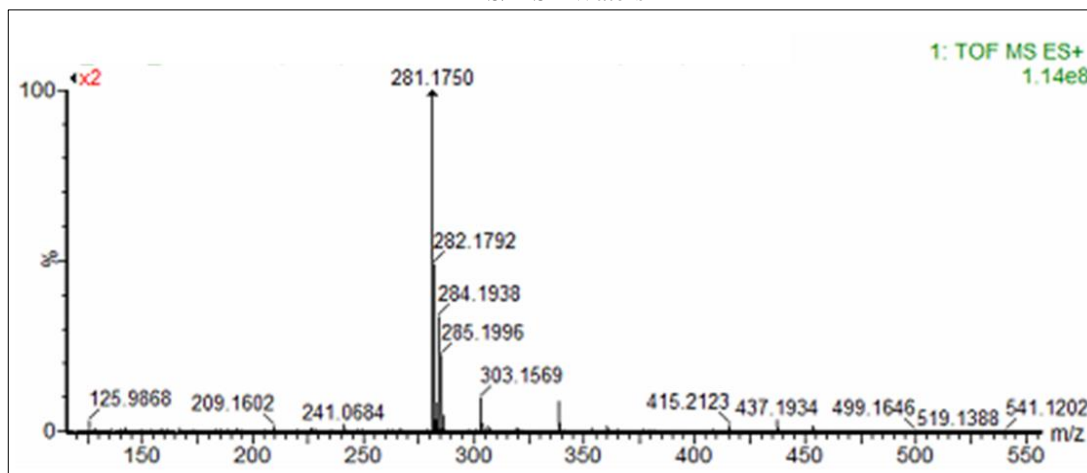
Figura 93 - Mapa de contorno HMBC (CD_3OD , 600 MHz) para a substância **5**

Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 94 - Espectro de TOCSY 1 D (δ_H 1,05) (CD_3OD , 600 MHz) para a substância **5**

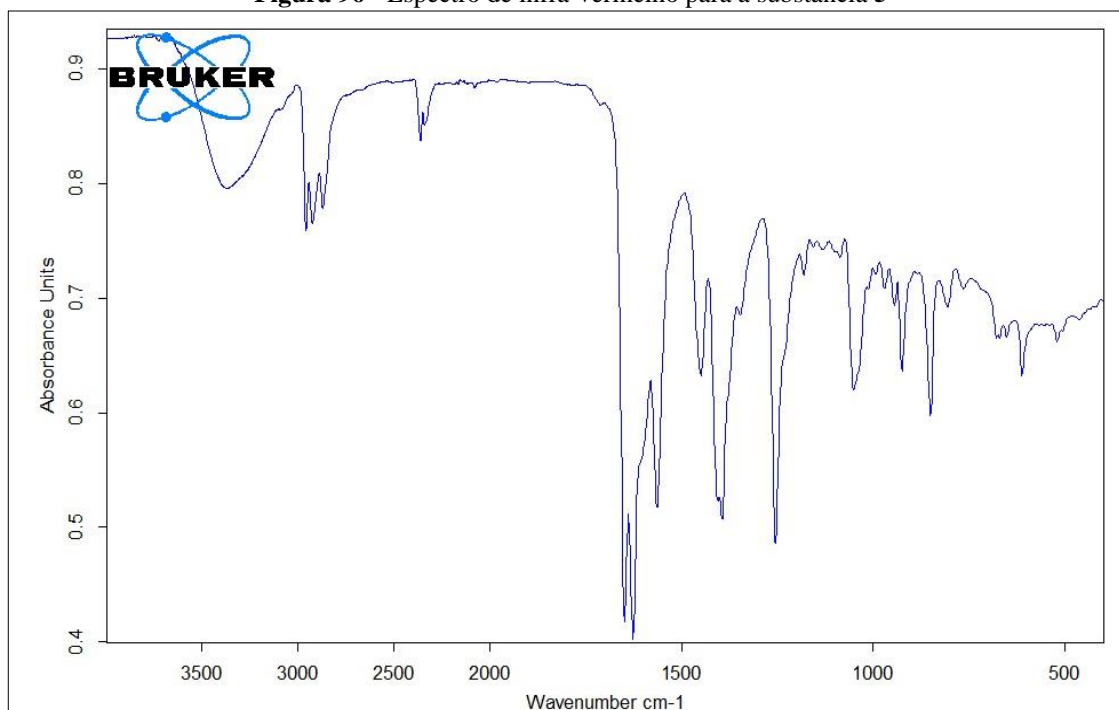
Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 95 - Espectro de massas (HRESIMS) obtido em ESI modo positivo para a substância **5**, por ESI-QTOF-MS/MS - Waters



Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 96 - Espectro de infra-vermelho para a substância **5**



Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

A substância **5** contém carbonos quirais, podendo apresentar diferentes diastereoisômeros. Em 2019, um dos diastereoisômeros possíveis para essa estrutura foi publicado (GONG *et al.*, 2019), como sendo a substância nomeada de fusarester D. Porém aqui não estão apresentados os dados da estereoquímica relativa ou absoluta, portanto a nomenclatura da substância **5** foi atribuída como 6-(11-(hidroximetil)-9-metiloct-7-en-7-il)-2-metóxi-4*H*-piran-4-ona.

4.6.2 Segundo Fracionamento do Extrato de Co-cultivo PSA

A fim de conseguir maior rendimento das substâncias purificadas, decidiu-se realizar um segundo cultivo, em uma escala maior (20 L) do extrato de co-cultivo PSA. Foram obtidos 911,5 mg de extrato que foi fracionado diretamente em HPLC semi-preparativo descrito na sessão 3.7.2. As substâncias de m/z 281 e m/z 295 foram investigadas por espectrometria de massas (espectros não apresentados). Nesse processo, foi evidenciado um diastereoisômero da substância **4** (numerado como **7**). E as substâncias **6** e **8** foram reconhecidas com a mesma massa molecular de alta resolução da substância **5** com m/z 281, porém foi possível observar diferenças nessas estruturas comparadas a substância **5**. Abaixo estão apresentadas as elucidaciones estruturais dessas substâncias.

4.6.2.1 *Elucidación estrutural da substância 6*

A substância **6** (Figura 97), apresentou sinais nos espectros de RMN muito parecidos com a substância **5**. A diferença está nas posições 11 e 11', em que no espectro de RMN de ^1H (Figura 98) não foi evidenciado nenhum sinal para a posição 11, e a posição 11' foi atribuída a um simpleto, referente a uma metila (δ_{H} 1,10). O espectro de DEPTq (Figura 99) apresentou um carbono quaternário a mais do que para a substância **5** e foi atribuído ao carbono carbinólico C-11 (δ_{C} 74,0).

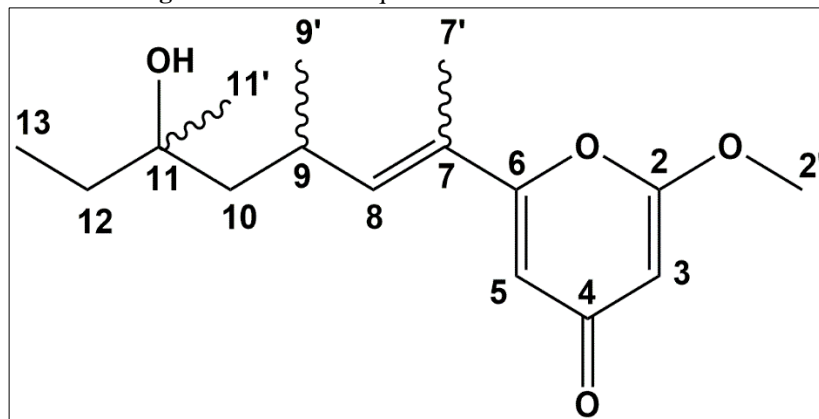
O mapa de contornos HSQC (Figura 100) é apresentado na Figura 100 e mostra as correlações de carbonos e hidrogênios.

E o mapa de contornos HMBC (Figura 102) apresenta algumas correlações que confirmam a mudança na cadeia lateral dessa estrutura, como o H-10 (δ_{H} 1,62) que acopla com o C-8 (δ_{C} 145,4), C-9 (δ_{C} 30,8), C-9' (δ_{C} 22,7), C-10 (δ_{C} 49,7), C-11 (δ_{C} 74,0), C-11' (δ_{C} 26,8) e C-12 (δ_{C} 36,5). E o H-11' (δ_{H} 1,10) que acopla com C-10 (δ_{C} 49,7), C-11 (δ_{C} 74,0) e C-12 (δ_{C} 36,5) (Figura 101).

O espectro de massas de alta resolução (HRESIMS) (Figura 103) da substância **6** forneceu a molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 281,1753 que confirma a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_4$ com $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado de m/z 281,1751 (erro: 0,7 ppm), apresentando cinco graus de insaturação. Assim, foi calculado o valor de $[x]_D^{20}$: + 15,5 (c 0,11, MeOH). A substância apresentou coloração marrom.

A Tabela 17 apresenta os dados de RMN da substância **6** que foi nominada como 6-(11-hidróxi-9,11-dimetil-oct-7-en-7-il)-2-metóxi-4*H*-piran-4-ona.

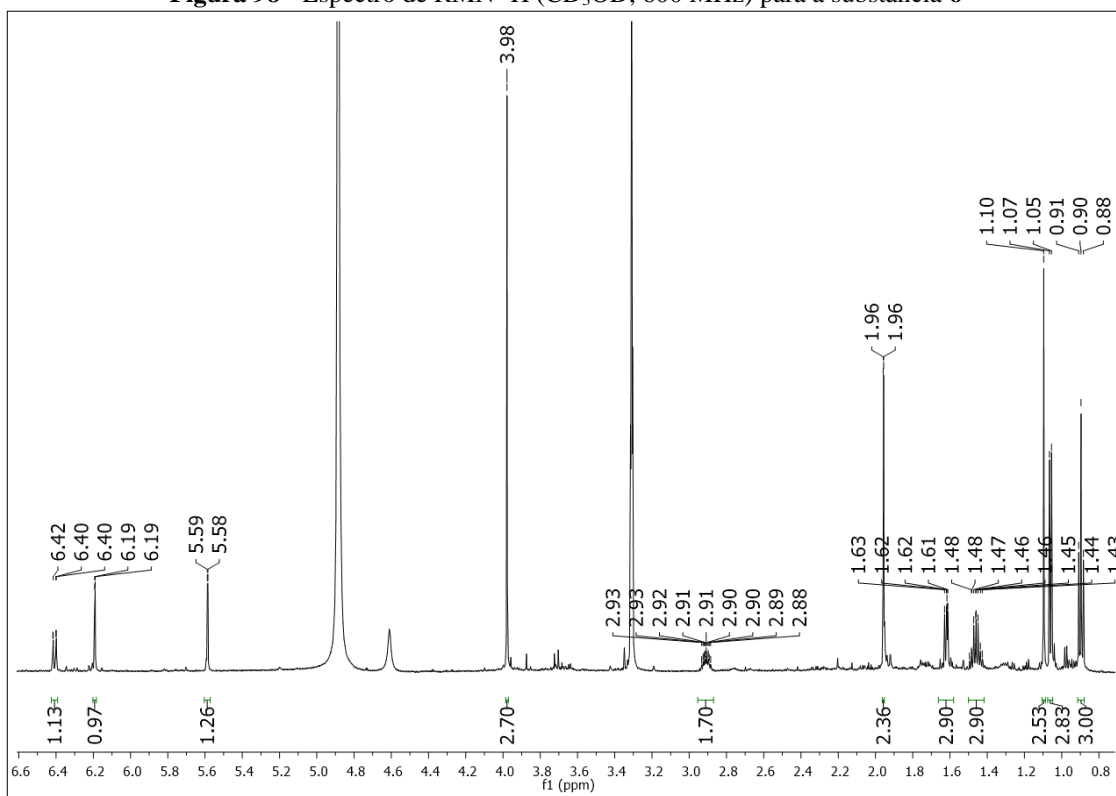
Figura 97 - Estrutura química da substância **6**



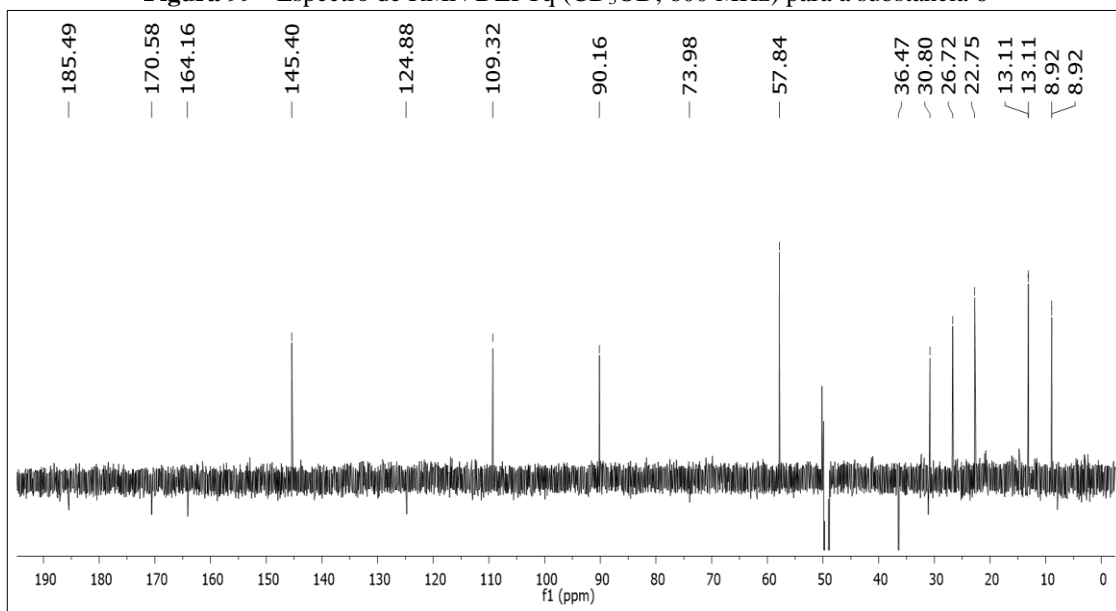
Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

Tabela 17 - Dados de RMN de ^1H , HMBC e HSQC (CD_3OD , 600 MHz) da substância **6**

	δ_{H}	δ_{C}	HMBC
2	-	170,6	-
2'	3,98, <i>s</i>	57,8, CH ₃	C-2
3	5,58, <i>d</i> ($J=1,90$)	90,2, CH	C-2, C-4, C-5
4	-	185,5	-
5	6,19, <i>d</i> ($J=1,90$)	109,3, CH	C-3, C-6, C-7
6	-	164,2	-
7	-	124,9	-
7'	1,96, <i>d</i> ($J=1,25$)	13,1, CH ₃	C-6, C-7, C-8
8	6,40, <i>dd</i> ($J=1,25$ e $9,95$)	145,4, CH	C-6, C-7', C-10
9	2,91, <i>m</i>	30,8, CH	C-7, C-8, C-9'
9'	1,05, <i>d</i> ($J=6,69$)	22,7, CH ₃	C-8, C-9, C-10
10	1,62, <i>m</i>	49,7, CH ₂	C-8, C-9', C-9, C-11, C-11', C-12
11	-	74,0	-
11'	1,10, <i>s</i>	26,8, CH ₃	C-10, C-11, C-12,
12	1,46, <i>m</i>	36,5, CH ₂	C-10, C-11', C-11, C-13
13	0,90, <i>t</i> ($J=7,5$)	8,9, CH ₃	C-9', C-11, C-12

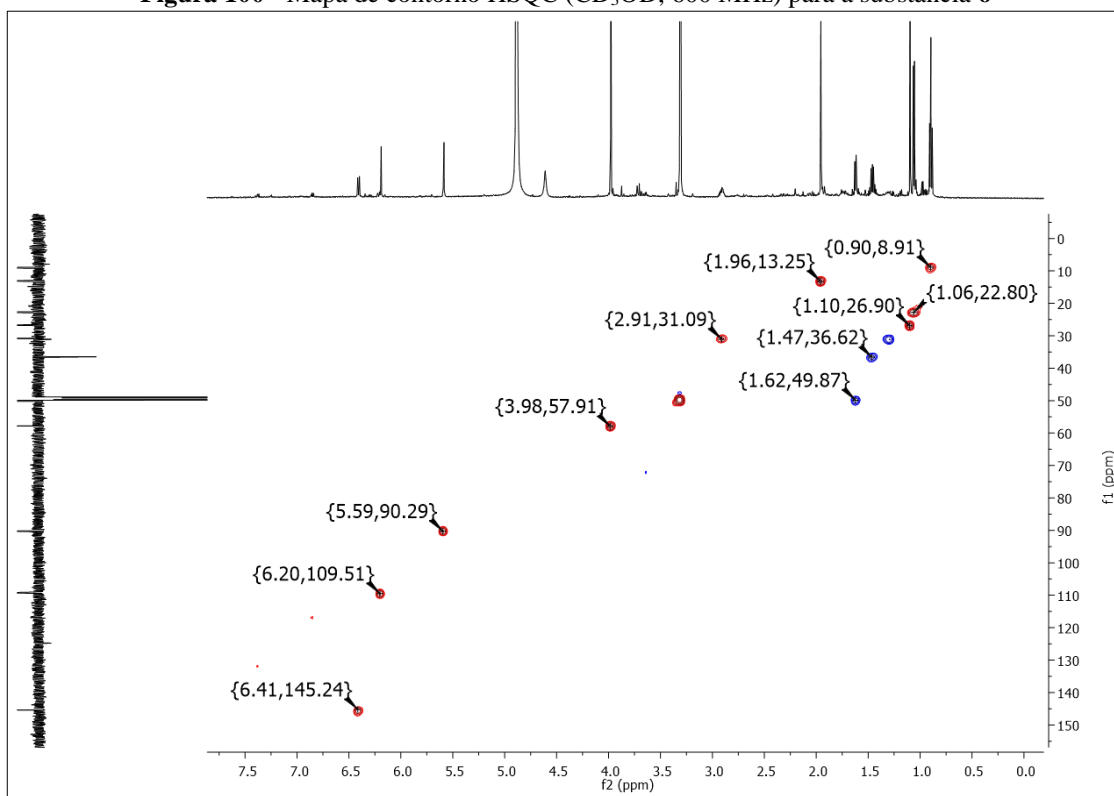
Figura 98 - Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) para a substância **6**

Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 99 - Espectro de RMN DEPTq (CD_3OD , 600 MHz) para a substância **6**

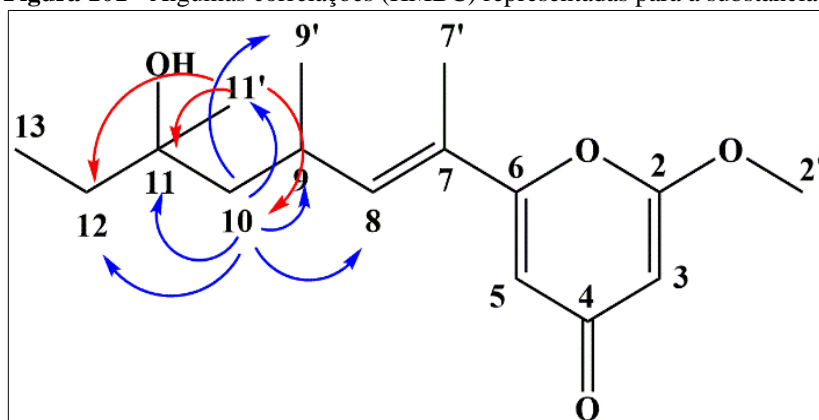
Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 100 - Mapa de contorno HSQC (CD_3OD , 600 MHz) para a substância **6**

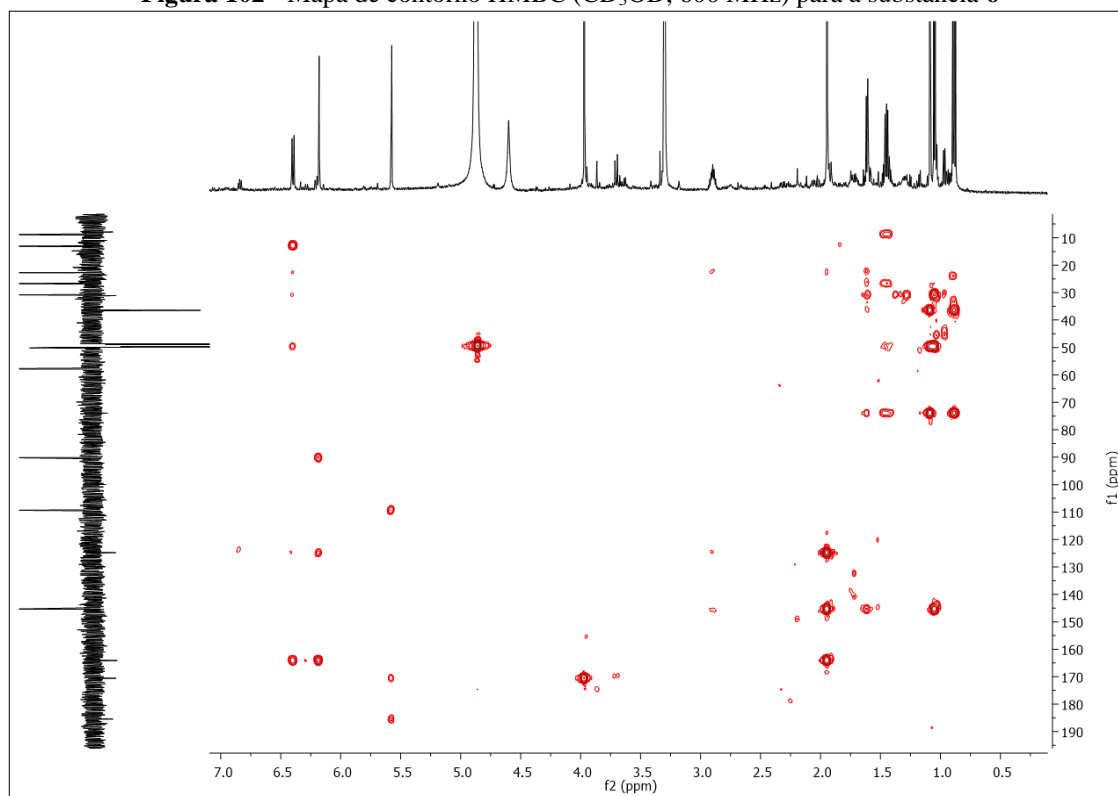


Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

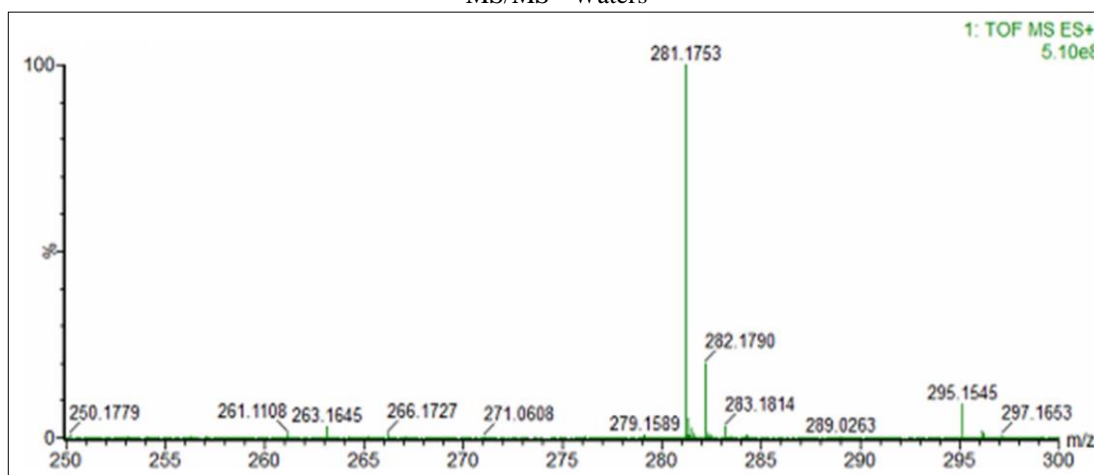
Figura 101 - Algumas correlações (HMBC) representadas para a substância **6**



Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

Figura 102 - Mapa de contorno HMBC (CD_3OD , 600 MHz) para a substância **6**

Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 103 - Espectro de massas (HRESIMS) obtido em ESI modo positivo para a substância **6**, por ESI-QTOF-MS/MS - Waters

Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

4.6.2.2 Elucidação estrutural da substância **7**

A substância **7** (Figura 104) apresentou o mesmo perfil espectrométrico e espectroscópico da substância **4**, sendo considerado seu diastereoisômero. A substância apresentou algumas impurezas, mas não atrapalhou na sua elucidação estrutural. Nas Figuras 105-108 são

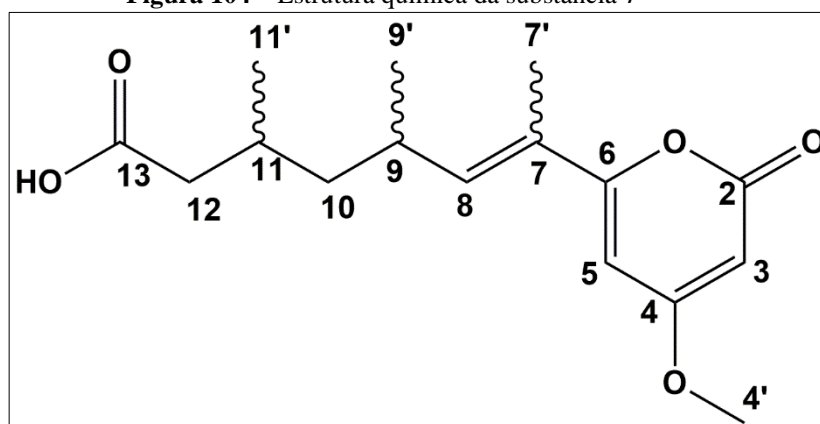
apresentados os espectros de RMN e de massas dessa substância, e a Tabela 18 apresenta os dados obtidos por RMN em comparação com a substância 4.

O espectro de massas de alta resolução gerou a molécula protonada $[M+H]^+$ com m/z 295,1550 (Figura 109) que confirma a fórmula molecular $C_{16}H_{22}O_5$ com $[M+H]^+$ calculado de m/z 295,1544 (erro: 2,03 ppm) com 6 graus de insaturação.

Assim, foi calculado o valor de $[\alpha]_D^{20}$: + 34,8 (c 0,023, MeOH). A substância apresentou coloração marrom.

Essa substância apresenta centros quirais, podendo apresentar diferentes diastereoisômeros. Nesse trabalho, não foram realizados experimentos de estereoquímica, mas podemos confirmar que as substâncias 4 e 7 são dois dos diastereoisômeros possíveis dessa estrutura.

Figura 104 – Estrutura química da substância 7

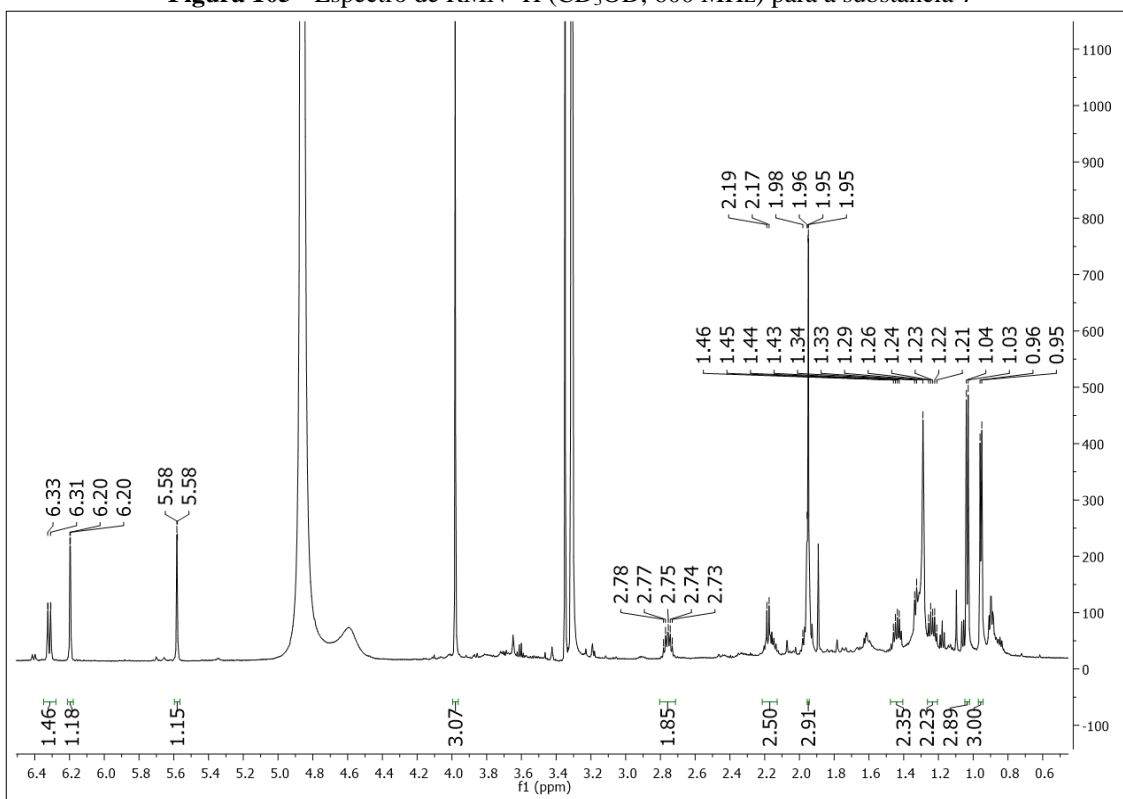


Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

Tabela 18 - Dados de RMN de ^1H , HMBC e HSQC (CD_3OD , 600 MHz) da substância **7** em comparação com a substância **4**

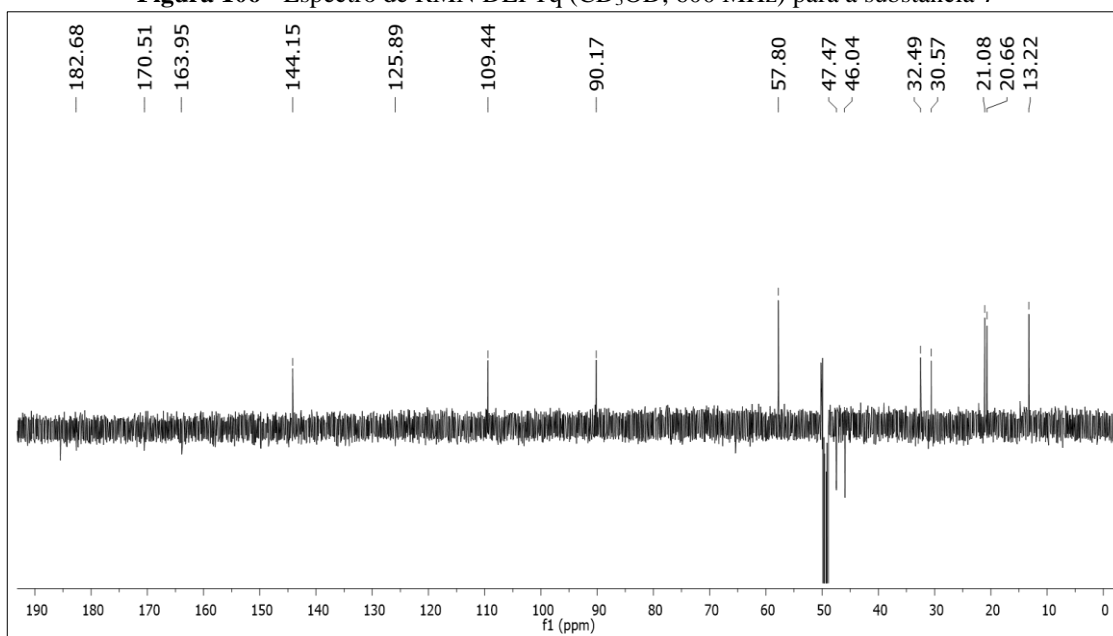
	Substância 7			Substância 4		
	δ_{H}	δ_{C}	HMBC	δ_{H}	δ_{C}	HMBC
2	-	-	-	-	167,5	-
3	5,58, <i>d</i> ($J=1,85$)	90,2, CH	C-4, C-5	5,58, <i>d</i> ($J=1,9$)	89,0, CH	C-2, C-4, C-5
4'	3,98, <i>s</i>	57,8, CH_3	C-4	3,87, <i>s</i>	57,4, CH_3	C-4
4	-	170,5	-	-	174,5	-
5	6,20, <i>d</i> ($J=1,85$)	109,4, CH	C-3, C-6, C-7	6,15, <i>d</i> ($J=1,9$)	99,6, CH	C-3, C-4, C-6, C-7
6	-	164,0	-	-	161,3	-
7'	1,95, <i>d</i> ($J=1,16$)	13,2, CH_3	C-6, C-7, C-8	1,92, <i>d</i> ($J=1,0$)	13,1, CH_3	C-6, C-7, C-8
7	-	125,9	-	-	126,2	-
8	6,32, <i>dd</i> ($J=1,16$)	144,2, CH	C-6, C-7, C-7', C-9', C-10	6,36, <i>dd</i> ($J=10,1$ e $1,0$)	143,2, CH	C-6, C-7, C-7', C-9', C-9, C-10
9'	1,03, <i>d</i> ($J=6,64$)	20,7, CH_3	C-8, C-9, C-10	1,03, <i>d</i> ($J=6,7$)	20,9, CH_3	C-8, C-9, C-10
9	2,76, <i>m</i>	32,5, CH	C-7, C-8, C-9', C-10	2,74, <i>m</i>	32,4, CH	C-7, C-8, C-9', C-10
10	1,23, <i>m</i>	46,0, CH	C-8, C-9', C-11, C-12	1,25, <i>q</i> ($J=7,0$)	45,9, CH	C-8, C-9', C-11, C-12
	1,44, <i>m</i>	46,0, CH	-	1,42, <i>q</i> ($J=7,0$)	45,9, CH	-
11'	0,96, <i>d</i> ($J=6,17$)	21,0, CH_3	C-11, C-12	0,96, <i>d</i> ($J=5,9$)	21,2, CH_3	C-11, C-12
11	1,96, <i>m</i>	30,6, CH	C-11', C-11, C-12	1,95, <i>m</i>	30,5, CH	-
	1,97, <i>m</i>	47,5, CH	-	1,95, <i>m</i>	46,5, CH	C-11', C-13
12	2,18, <i>m</i>	47,5, CH	C-9', C-10, C-11, C-13	2,23, <i>m</i>	46,5, CH	-
13	-	182,7	-	-	180,1	-

Figura 105 - Espectro de RMN ¹H (CD₃OD, 600 MHz) para a substância 7

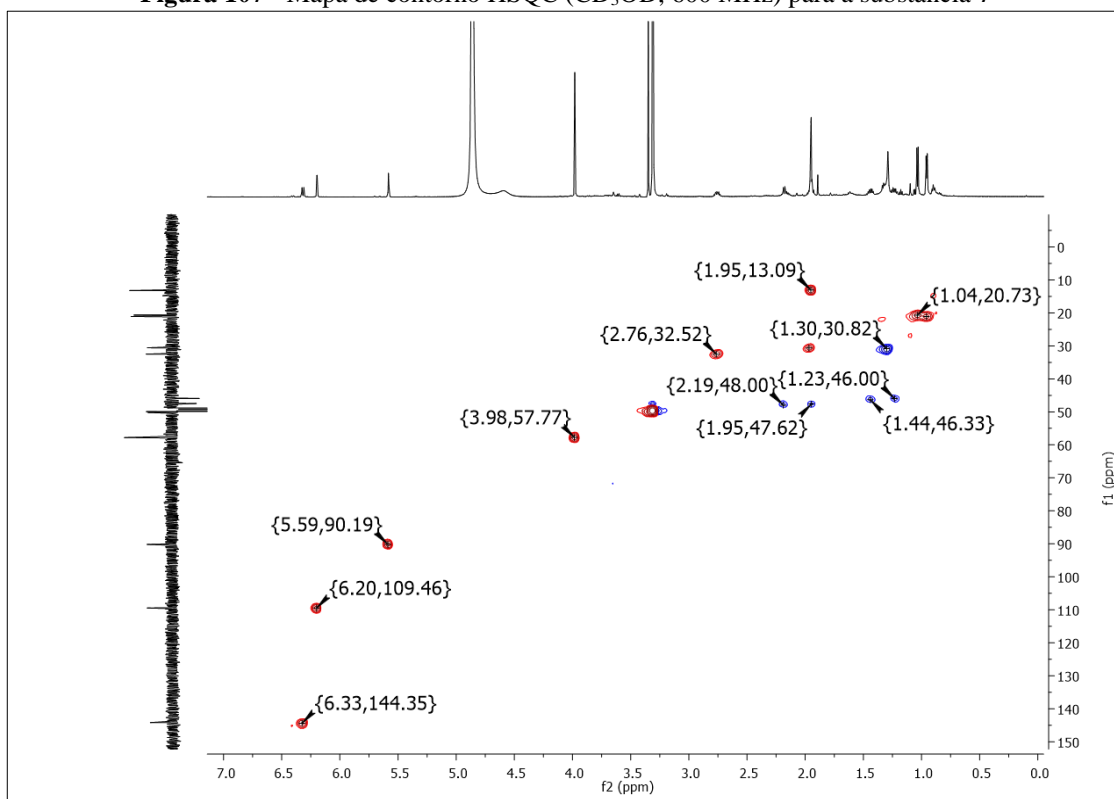


Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

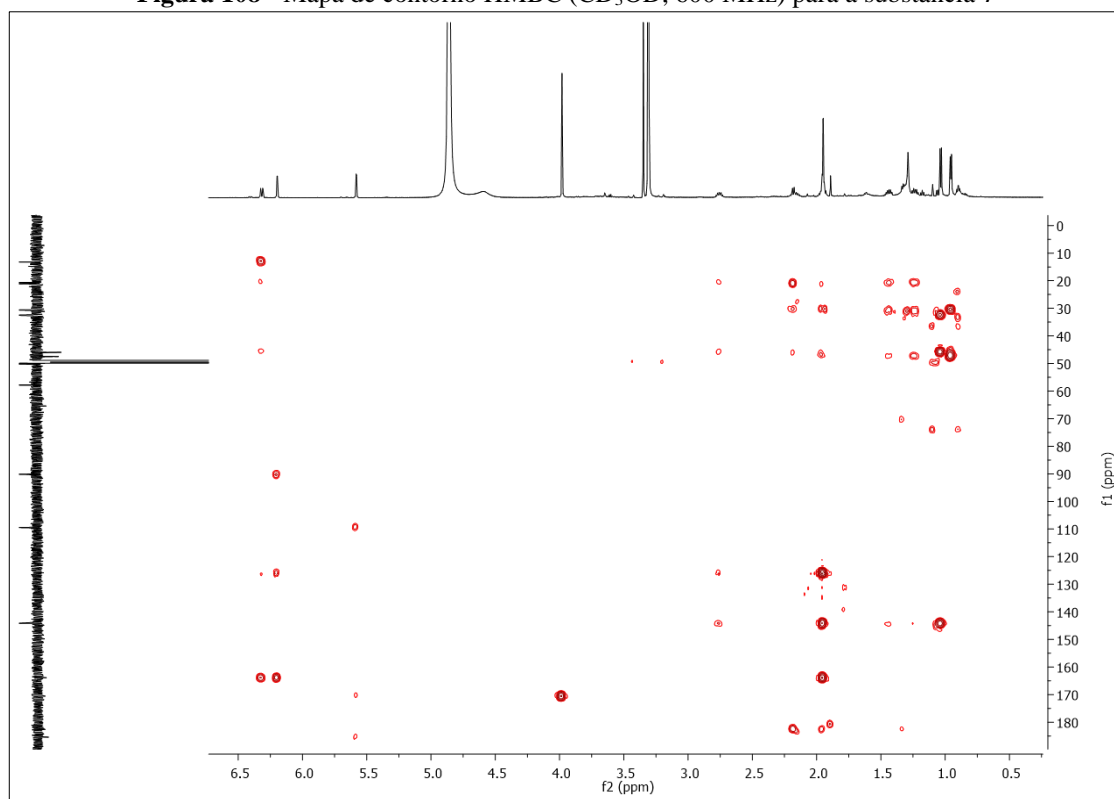
Figura 106 - Espectro de RMN DEPTq (CD₃OD, 600 MHz) para a substância 7



Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

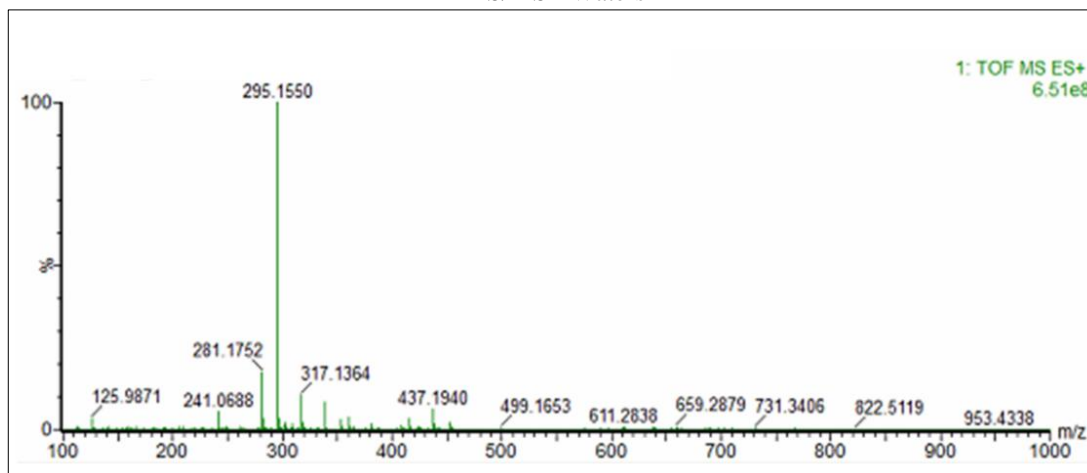
Figura 107 - Mapa de contorno HSQC (CD₃OD, 600 MHz) para a substância 7

Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 108 - Mapa de contorno HMBC (CD₃OD, 600 MHz) para a substância 7

Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 109 - Espectro de massas (HRESIMS) obtido em ESI modo positivo para a substância **7**, por ESI-QTOF-MS/MS - Waters



Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

4.6.2.3 Elucidação estrutural da substância **8**

A substância **8** (Figura 110) apresentou espectros de RMN muito parecidos com a substância **5**, incluindo a mesma massa molecular. Porém alguns sinais evidenciam a presença de uma lactona na estrutura **8** ao invés de uma γ -pirona como observado para a substância **5**. Os sinais que diferem da estrutura **4** serão apresentados nesse tópico.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 111) apresenta os mesmos sinais em comparação com a substância **5**. O experimento DEPTq (Figura 112) apresentou os sinais em δ_{C} 167,3 que foi atribuído ao C-2, formando uma lactona e δ_{C} 174,4 atribuído ao C-4 onde está ligada a metoxila.

O experimento HSQC (Figura 113) da substância **8** também apresentou os mesmos sinais da substância **5**.

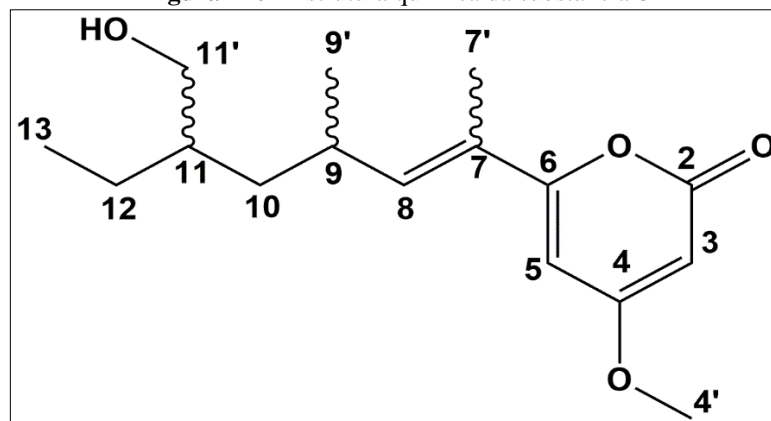
O HMBC (Figura 114 e 115) mostra a correlação que confirma o anel lactônico, onde o H-3 (δ_{H} 5,58) apresenta correlação com o C-2 (δ_{C} 167,3), C-4 (δ_{C} 174,4) e C-5 (δ_{C} 99,6). E o H-5 (δ_{H} 6,15) apresenta correlação com C-3 (δ_{C} 89,0), C-4 (δ_{C} 174,4), C-6 (δ_{C} 163,0) e C-7 (δ_{C} 126,4). A correlação do H-5 é a mais importante, que indica a posição da metoxila em C-4 mais próxima a ele. Portanto essa estrutura apresenta a inversão da carbonila e da metoxila (C-2 e C-4) em comparação com a substância **5**. Portanto, a substância **8** foi nomeada como 6-(hidroximetil-oct-7-en-7-il)-4-metóxi-2H-piran-2-ona.

A Tabela 19 apresenta os dados de RMN da substância **8** em comparação com a **5**.

O espectro de massas de alta resolução (HRESIMS) evidencia a mesma massa molecular da substância **5** $[\text{M}+\text{H}]^+$ com m/z 281,1755 (Figura 116), confirmando a fórmula molecular

$C_{16}H_{24}O_4$ com $[M+H]^+$ calculado de m/z 281,1751 (erro: 1,4 ppm). Assim, foi calculado o valor de $[\alpha]_D^{20}$: + 136,1 (c 0,036, MeOH). A substância apresentou coloração marrom.

Figura 110 - Estrutura química da substância 8

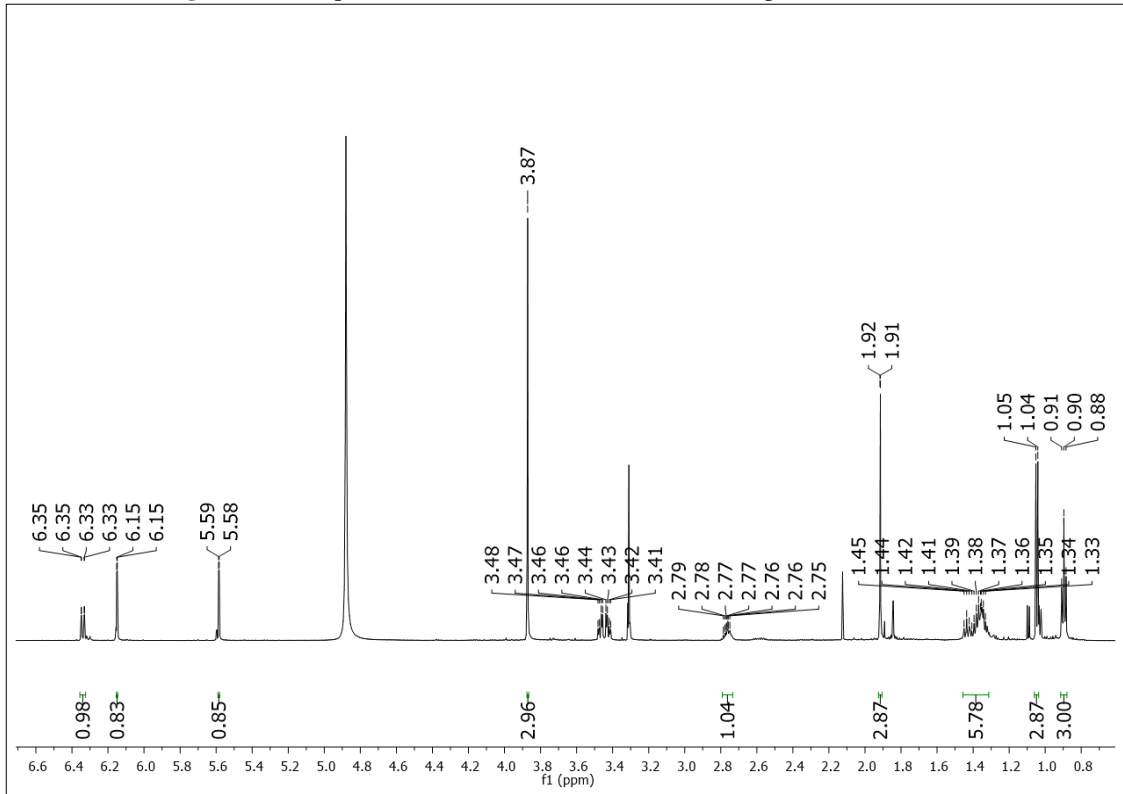


Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

Tabela 19 - Dados de RMN de ^1H , HMBC e HSQC (CD_3OD , 600 MHz) da substância **8** em comparação com a substância **5**

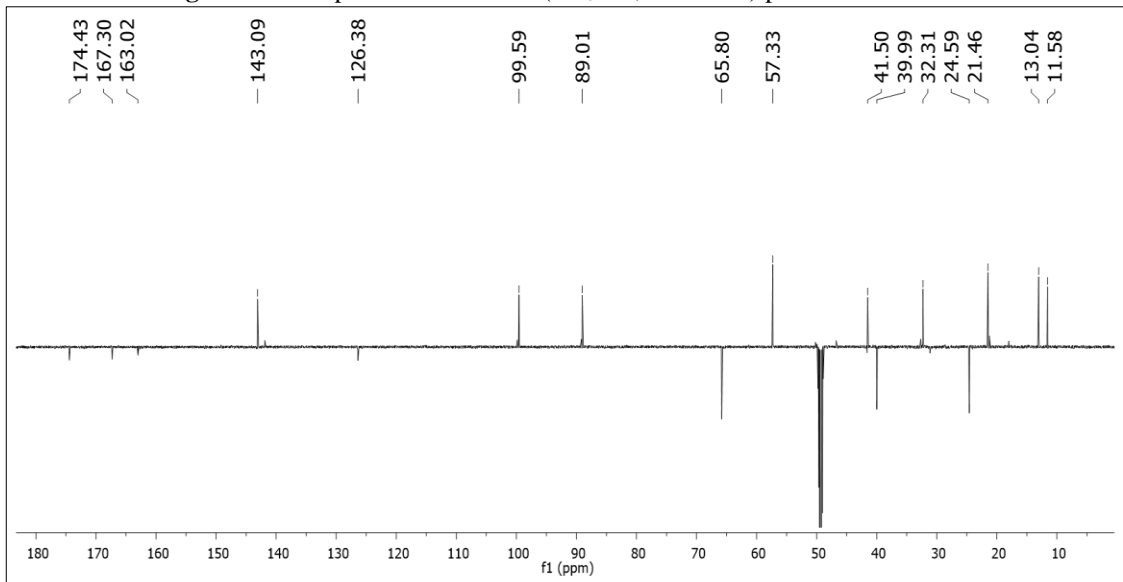
	Substância 8			Substância 5		
	δ_{H}	δ_{C}	HMBC	δ_{H}	δ_{C}	HMBC
2	-	167,3 C	-	-	170,2, C	-
2'	-	-	-	3,98, <i>s</i>	57,5, CH_3	C-2
3	5,58, <i>d</i> ($J=2,1$)	89,0, CH	C-2, C-4 e C-5	5,59, <i>d</i> ($J=1,8$)	89,8, CH	C-4, C-2 e C-5
3'	3,87, <i>s</i>	57,3, CH_3	C-4	-	-	-
4	-	174,4, C	-	-	185,0, C	-
5	6,15, <i>d</i> ($J=2,1$)	99,6, CH	C-4, C-6, C-7 e C-3	6,20, <i>d</i> ($J=1,8$)	109,2, CH	C-4, C-6, C-7 e C-3
6	-	163,0, C	-	-	163,4, C	-
7	-	126,4, C	-	-	125,9, C	-
7'	1,92, <i>d</i> ($J=1,3$)	13,0, CH_3	C-6, C-8 e C-7	1,95, <i>d</i> ($J=1,3$)	12,9, CH_3	C-6, C-8, C-7 e C-5
8	6,34, <i>dd</i> ($J=9,9, 1,3$)	143,1, CH	C-6, C-7, C-10, C-9, C-7' e C-9'	6,30, <i>dd</i> ($J=9,9, 1,2$)	143,5, CH	C-6, C-7, C-9, C-7', C-9' e C-10
9	2,76, <i>m</i>	32,3, CH	C-10	2,79, <i>m</i>	32,1, CH	C-10
9'	1,05, <i>d</i> ($J=6,6$)	21,5, CH_3	C-8, C-9 e C-10	1,05, <i>d</i> ($J=6,6$)	21,0, CH_3	C-8, C-9 e C-10
10	1,34, <i>m</i>	40,0, CH	C-12, C-11 e C-8	1,33, <i>m</i>	39,6, CH	C-12, C-11, C-11' e C-8
	1,43, <i>m</i>	40,0, CH	C-9', C-12, C-9, C-11, C-11' e C-8	1,46, <i>m</i>	39,6, CH	C-9', C-12, C-9, C-11 e C-11'
11	1,36, <i>m</i>	41,5, CH	C-13	1,35, <i>m</i>	41,2, CH	C-13 e C-11'
11'	3,45, <i>dq</i> ($J=10,8, 5,0$)	65,8, CH_2	C-12 e C-11	3,45, <i>qd</i> ($J=10,7, 4,6$)	65,4, CH_2	C-12 e C-10
12	1,37, <i>m</i>	24,6, CH_2	C-11, C-9, C-13 e C-11'	1,39, <i>m</i>	24,3, CH_2	C-11, C-13 e C-11'
13	0,90, <i>t</i> ($J=7,4$)	11,6, CH_3	C-12 e C-11	0,90, <i>t</i> ($J=7,4$)	11,3, CH_3	C-12 e C-11

Figura 111 - Espectro de RMN ¹H (CD₃OD, 600 MHz) para a substância **8**

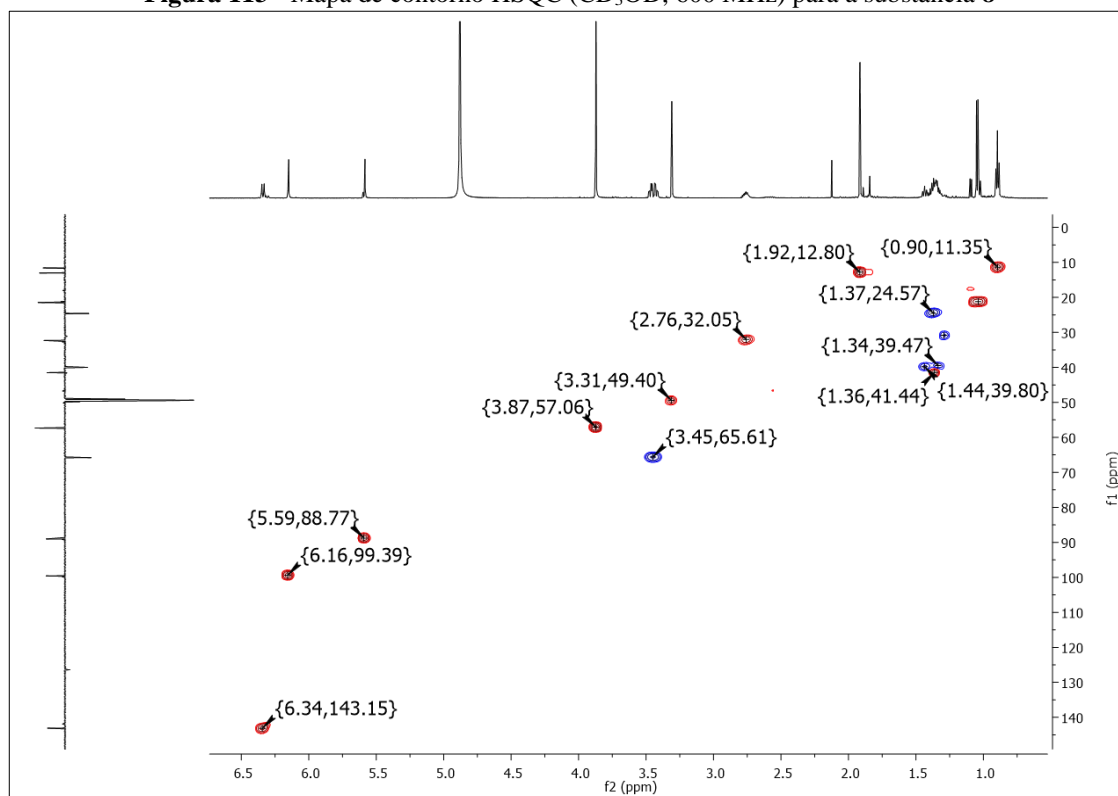


Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 112 - Espectro de RMN ¹³C (CD₃OD, 600 MHz) para a substância **8**

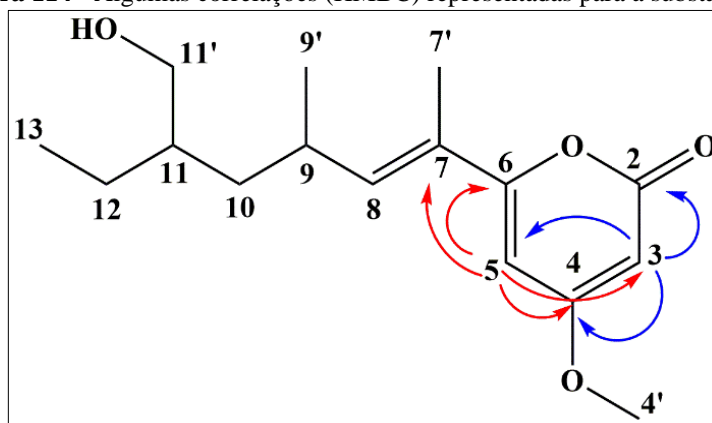


Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

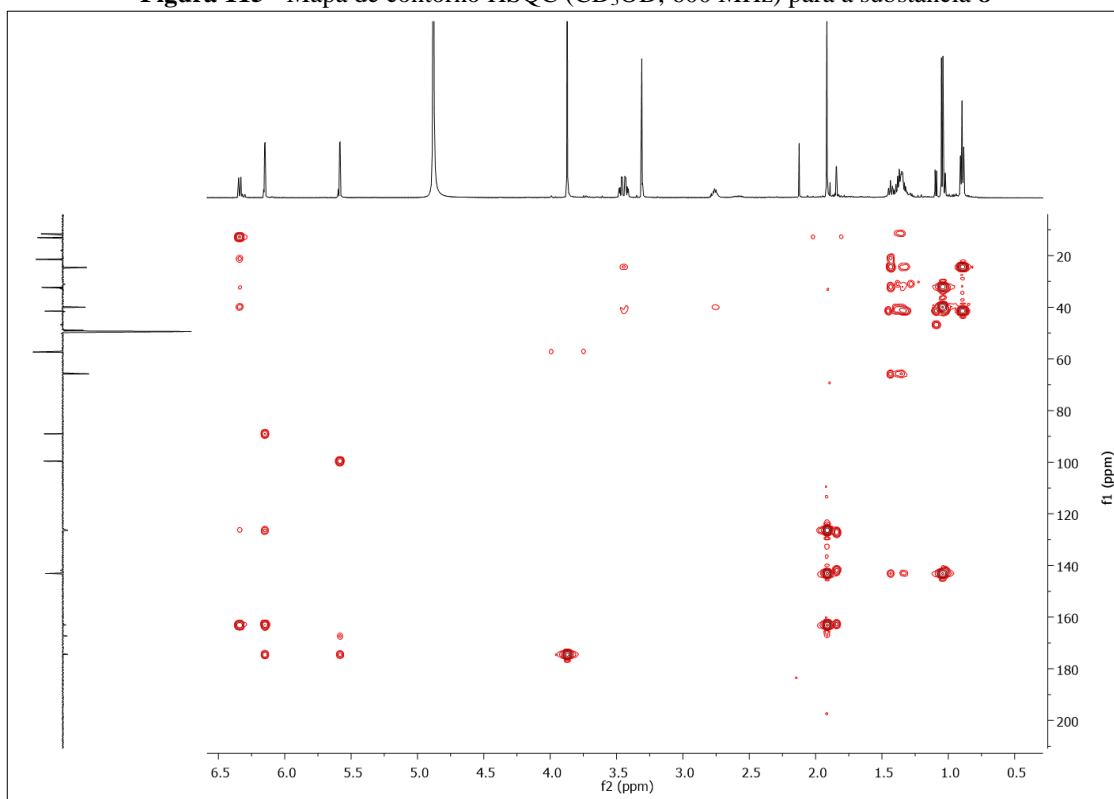
Figura 113 - Mapa de contorno HSQC (CD₃OD, 600 MHz) para a substância 8

Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

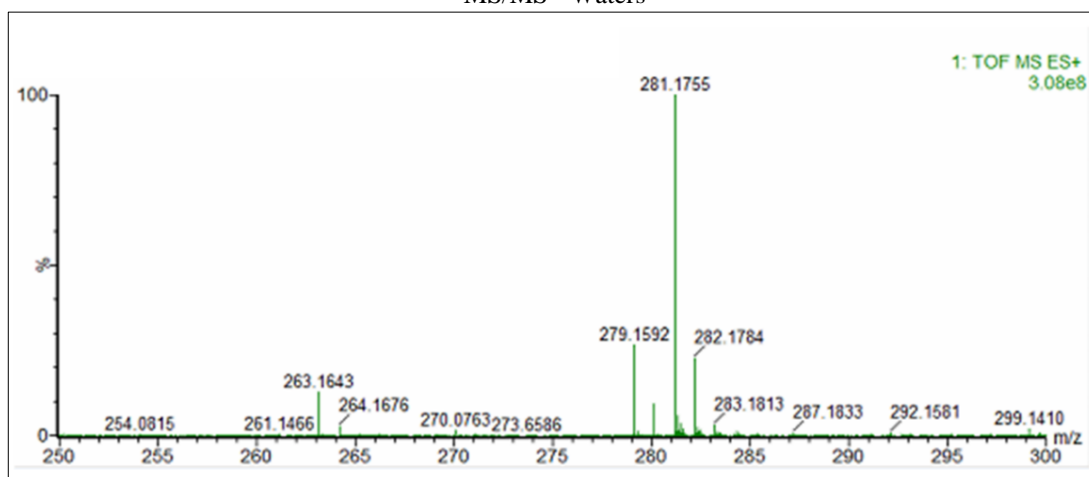
Figura 114 - Algumas correlações (HMBC) representadas para a substância 8



Fonte: Figura elaborada pela autora, 2020.

Figura 115 - Mapa de contorno HSQC (CD_3OD , 600 MHz) para a substância **8**

Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 116 - Espectro de massas (HRESIMS) obtido em ESI modo positivo para a substância **8**, por ESI-QTOF-MS/MS - Waters

Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

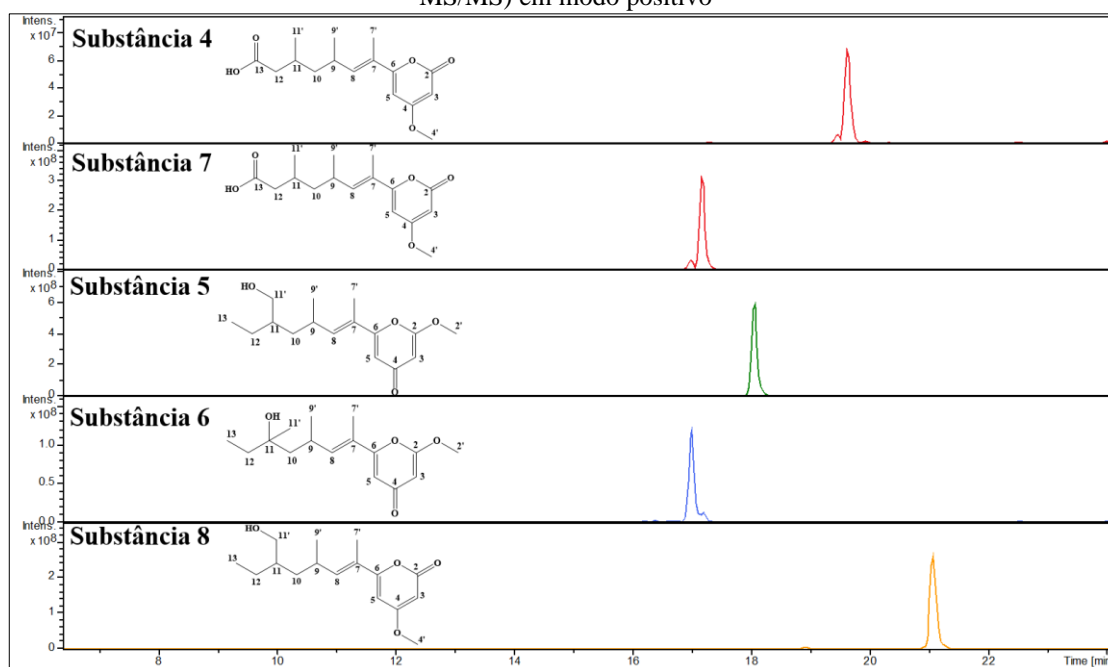
As análises espectrométricas e espectroscópicas levaram a elucidação estrutural das substâncias de **4-8** sendo elas, α e γ -pironas. Elas se diferem nas posições da carbonila do anel e também na cadeia lateral.

Para as γ -pironas alguns estudos de biossíntese mostram que esses tipos de substâncias são derivadas de acetato e as metilações são provenientes da metionina (AVENT; HANSON; TRUNEH, 1992; C. PEDRAS; CHUMALA, 2005).

4.6.3 Comparação das Substâncias 4, 5, 6, 7 e 8.

Na Figura 117 foi possível observar o espectro de massas (BPC) das substâncias 4, 5, 6, 7 e 8 em ESI modo positivo, cujo experimento foi realizado HPLC-ESI-IT-MS/MS de acordo com o método descrito em 3.6.9. Foi possível confirmar que as substâncias 4 e 7 são diastereoisômeros pois apresentam diferentes tempos de retenção. E as substâncias 5, 6 e 8 que tem a mesma massa molecular também apresentam diferentes tempos de retenção.

Figura 117 – Comparação do tempo de retenção das substâncias 4, 5, 6, 7 e 8 em espectros BPC (HPLC-ESI-IT-MS/MS) em modo positivo

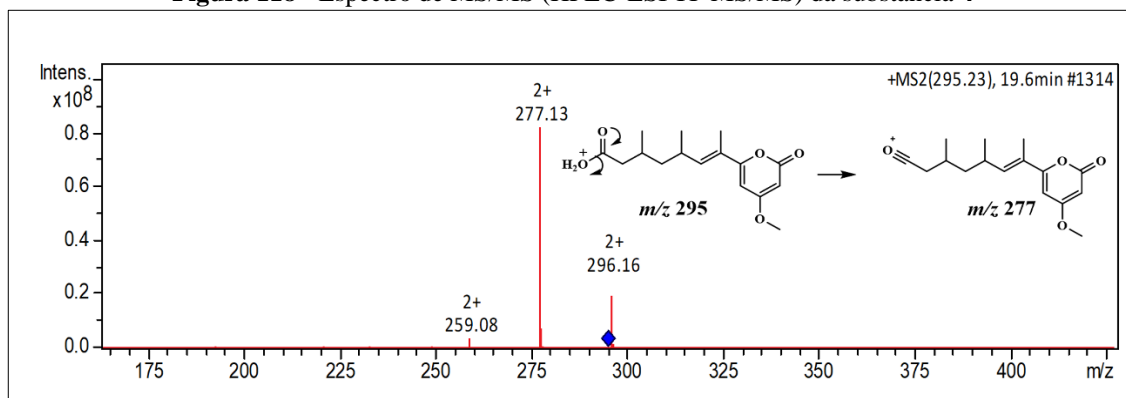


Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Nas Figuras de 118 a 122 estão apresentados os espectros de MS/MS obtidos e as propostas de fragmentação dessas moléculas, que se resumem em uma perda de água e de metoxila. As substâncias 4 e 7 apresentam o mesmo íon fragmento de m/z 277, o que era esperado já que são diastereoisômeros, porém diferem nas intensidades. E as substâncias 6 e 8 que tem a mesma massa molecular m/z 281 apresentam os mesmos fragmentos, m/z 263 e 231, mesmo sendo estruturas um pouco diferentes. A substância 5 é a única que apresenta um

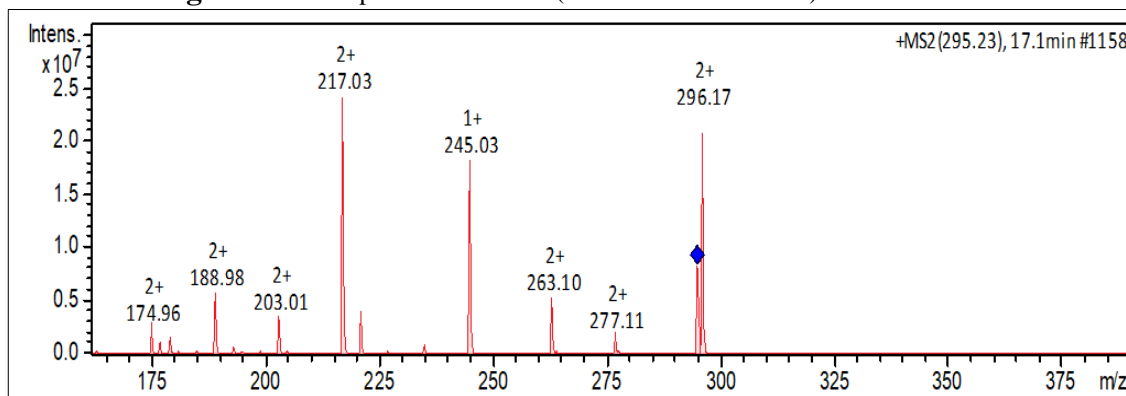
fragmento diferenciado relacionado a um rearranjo do tipo McLafferty gerando o íon fragmento m/z 207, ao invés de uma simples desidratação. O motivo para formar esse fragmento pode estar relacionado a estereoquímica dessa molécula que favoreceu esse rearranjo, e que provavelmente a estereoquímica da substância **5** é diferente da substância **8**.

Figura 118 - Espectro de MS/MS (HPLC-ESI-IT-MS/MS) da substância **4**



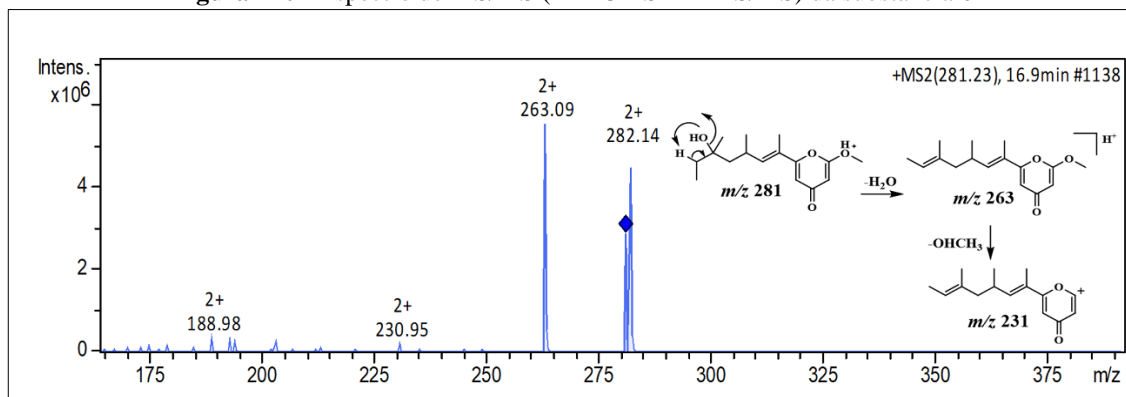
Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 119 - Espectro de MS/MS (HPLC-ESI-IT-MS/MS) da substância **7**

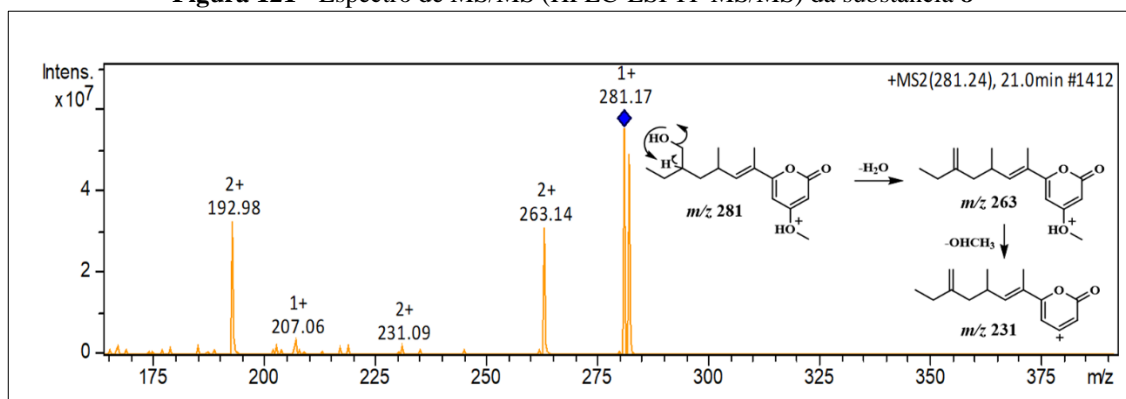


Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

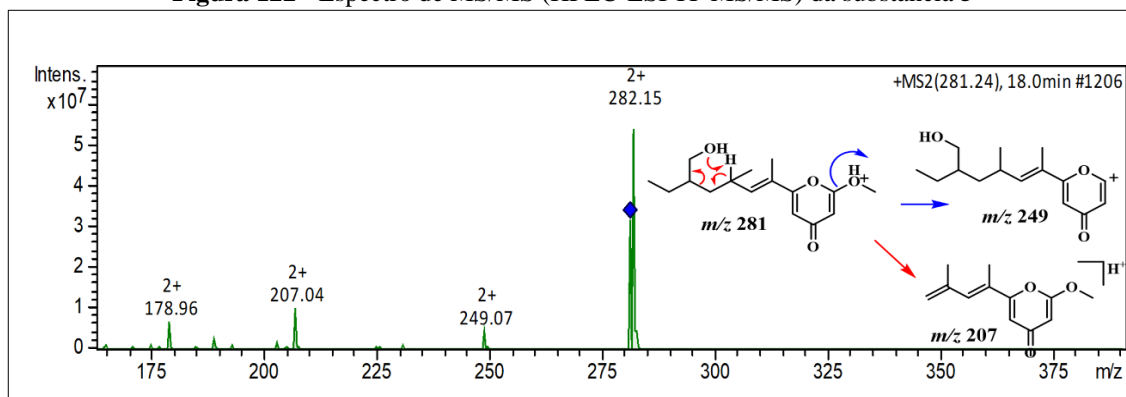
Figura 120 - Espectro de MS/MS (HPLC-ESI-IT-MS/MS) da substância **6**



Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 121 - Espectro de MS/MS (HPLC-ESI-IT-MS/MS) da substância **8**

Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 122 - Espectro de MS/MS (HPLC-ESI-IT-MS/MS) da substância **5**

Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Pela evidência de um dos diastereoisômeros da substância **5** ter recentemente sido identificada em um extrato de *Fusarium* (GONG *et al.*, 2019) foi possível concluir que as substâncias isoladas são então produzidas por *F. solani* no co-cultivo.

As Figuras 123 e 124 apresentam os espectros BPC das substâncias em comparação com os espectros dos diferentes extratos de co-cultivo (PCA, PSA, CCA e CSA). Foi observado que as substâncias aparecem em todos os extratos, porém em concentrações diferentes, um dos fatos que normalmente são observados em estudos de OSMAC.

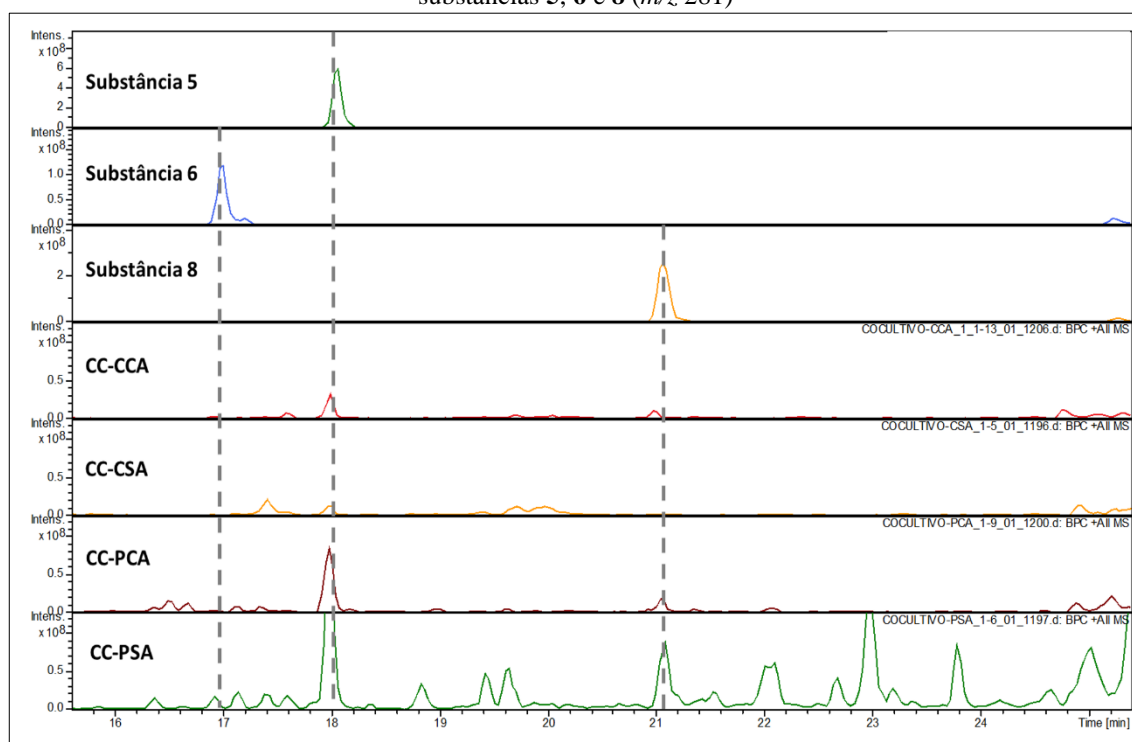
Avaliando os extratos de *F. solani* (Figuras 125 e 126), também nos diferentes cultivos, (PCA, PSA, CCA e CSA) a substância **5** está presente em todos eles, porém as outras substâncias são evidenciadas apenas em alguns dos extratos e em quantidades muito pequenas.

A produção da substância **5** aparentemente é maior durante a interação de *F. solani* com *P. lilacinum*, que mostra que essa substância representa algum tipo de sistema de defesa de *Fusarium*. Um dos apontamentos levantados pela OSMAC é o aumento da produção metabólica

de uma substância em diferentes condições, e aqui o co-cultivo foi capaz de apresentar esse efeito.

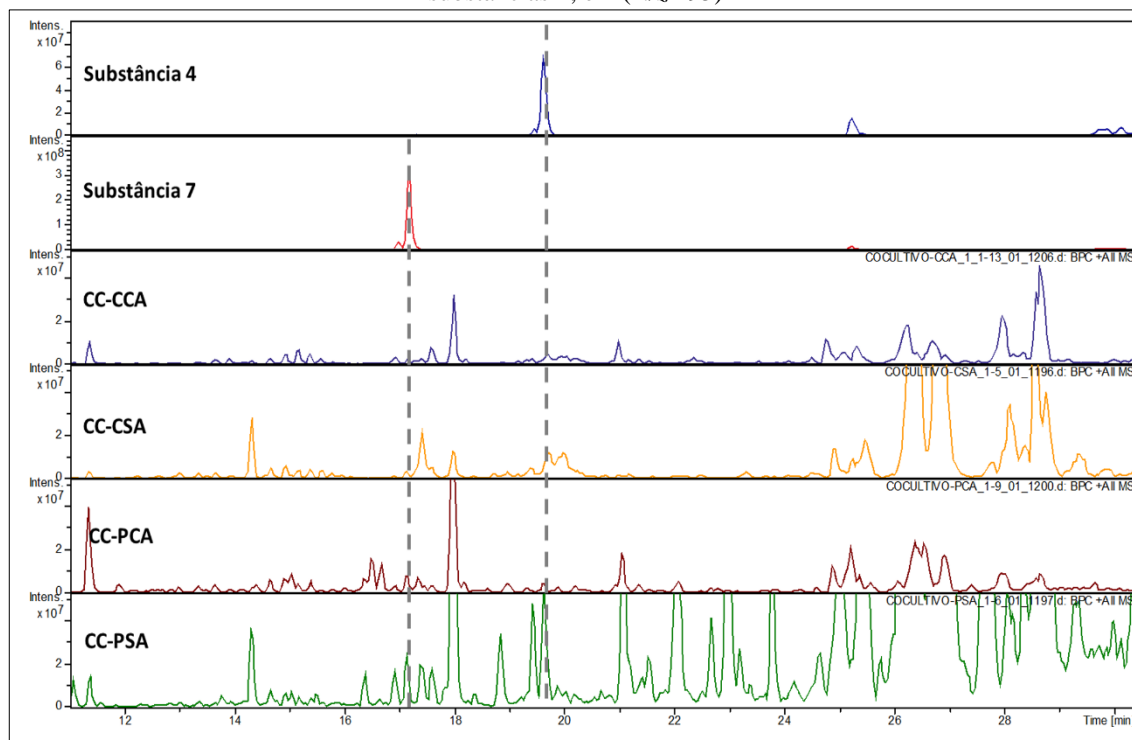
Para definir esse fato com clareza, como a substância **5** foi observada em todos os extratos do co-cultivo e de *Fusarium*, no próximo tópico está apresentada a discussão da quantificação dessa substância em todos os extratos, apresentando esse efeito da OSMAC.

Figura 123 - Espectros BPC (HPLC-ESI-IT-MS/MS) dos extratos do co-cultivo (CC) em comparação com as substâncias **5**, **6** e **8** (m/z 281)



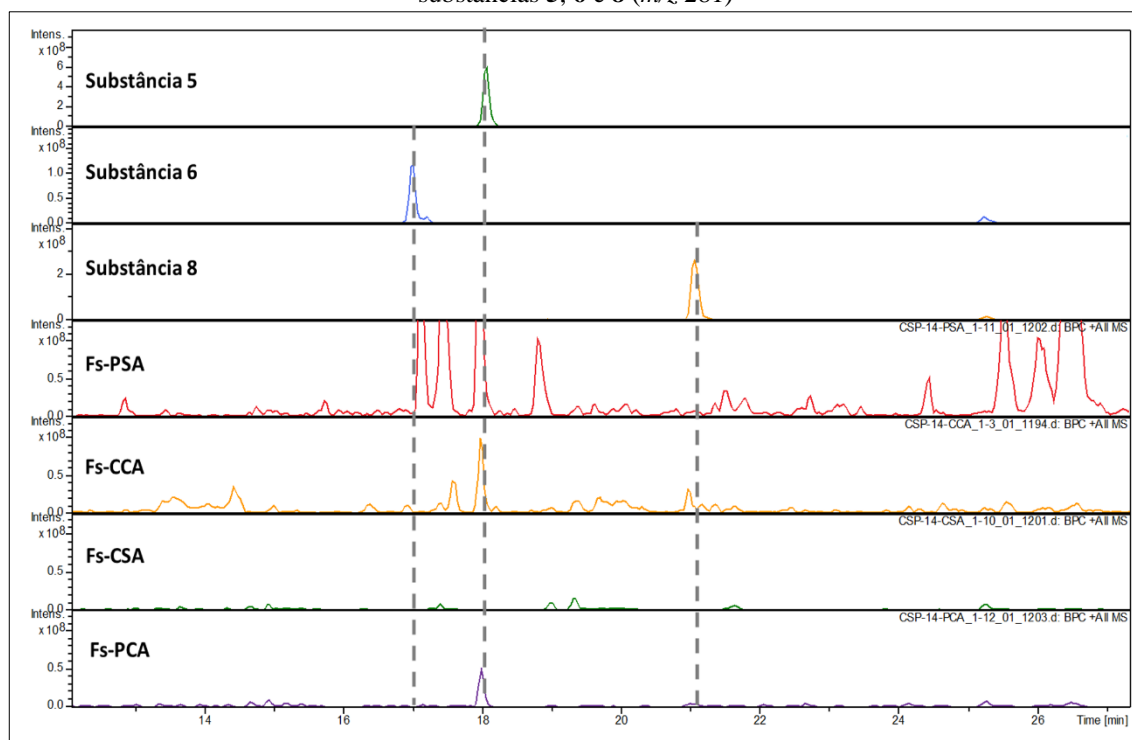
Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 124 - Espectros BPC (HPLC-ESI-IT-MS/MS) dos extratos do co-cultivo (CC) em comparação com as substâncias **4**, e **7** (m/z 295)



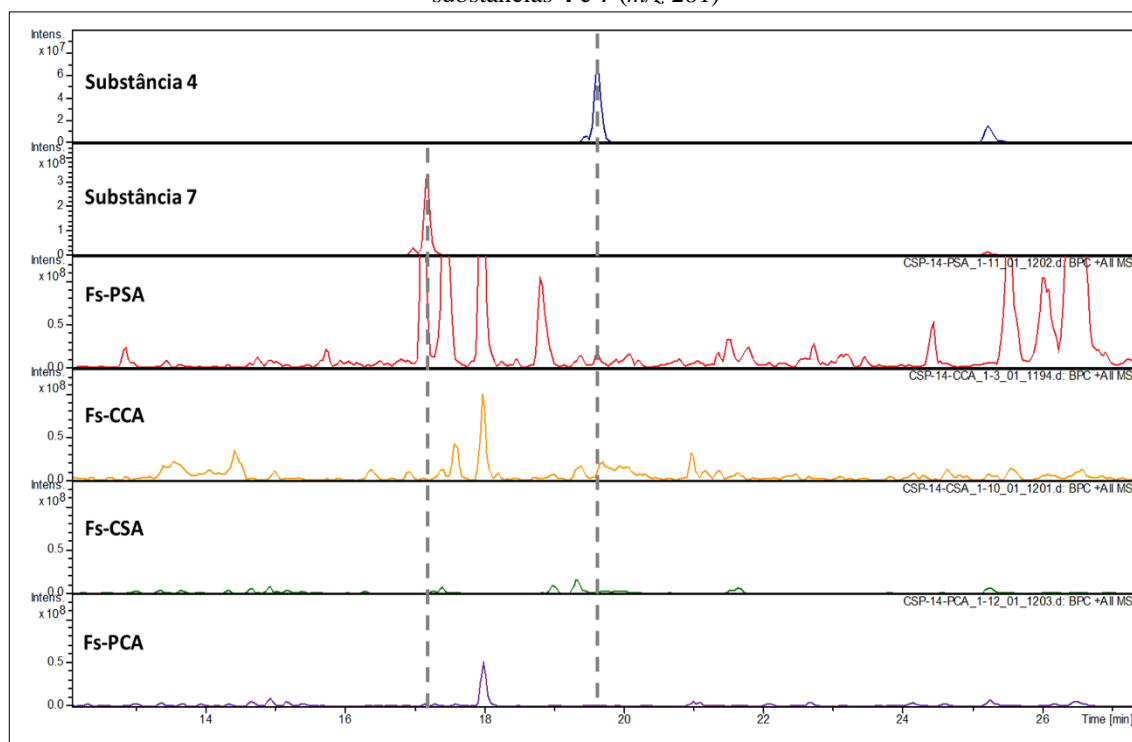
Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 125 - Espectros BPC (HPLC-ESI-IT-MS/MS) dos extratos de *F. solani* (Fs) em comparação com as substâncias **5**, **6** e **8** (m/z 281)



Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Figura 126 - Espectros BPC (HPLC-ESI-IT-MS/MS) dos extratos de *F. solani* (Fs) em comparação com as substâncias **4** e **7** (m/z 281)



Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

4.7 Quantificação da Substância **5** (6-(11-(hidroximetil)-9-metiloct-7-en-7-il)-2-metóxi-4H-piran-4-ona) nos Extratos de *Fusarium solani* e Co-cultivo

4.7.1 Validação

A fim de verificar o teor da substância **5** (6-(11-(hidroximetil)-9-metiloct-7-en-7-il)-2-metóxi-4H-piran-4-ona) nos extratos de *F. solani* e de co-cultivo, para evidenciar o aumento ou diminuição da produção desse metabólito, foi realizada uma quantificação. Para isso foi construída uma curva analítica e calculados os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). Para os extratos de *F. solani* e Co-cultivo PSA foram determinadas a precisão e a recuperação.

As análises foram realizadas por HPLC-MS/MS, sendo que o método de quantificação MS/MS foi estabelecido utilizando a opção Manual MS(n), que é um modo SRM de análise. Nesse método foram monitorados os íons precursores (tanto do analito quanto do padrão interno), que foram fragmentados, e os íons produto formados foram utilizados no software QuantAnalysis.

No QuantAnalysis foi possível criar um método analisando a transição dos íons precursores para os íons produto (diclofenaco de sódio: m/z 296 \rightarrow 277; 249 e substância **5**: m/z 281 \rightarrow 105).
Estudo químico de fungos da rizosfera de Senna spectabilis utilizando abordagem OSMAC e ferramentas analíticas do estado da arte para anotação e caracterização de metabólitos

281 → 249; 207). A curva analítica foi construída, nesse software, a partir da relação entre as áreas do analito/padrão interno.

O teor da substância **5** em todos os extratos de co-cultivo e *F. solani* foi determinado pela interpolação de suas áreas na curva analítica, sendo as áreas correspondentes à substância, determinadas no cromatograma SRM dos extratos.

Para o padrão interno, foi escolhido o diclofenaco de sódio, por ser uma substância sintética (um fármaco), que elui em tempo de retenção diferente do analito.

4.7.1.1 Curva analítica e limites de detecção e quantificação (LD e LQ)

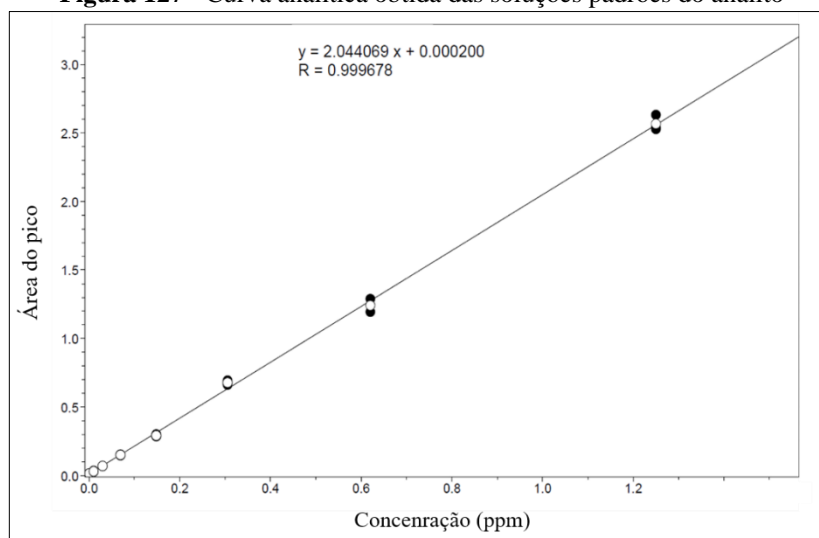
A curva analítica (Figura 127) foi construída pelo software QuantAnalysis através dos valores das áreas dos picos que foram relacionados com os sete níveis de concentração do analito (0,019531, 0,0390625, 0,078125, 0,15625, 0,3125, 0,625, 1,25 µg/mL) em função do padrão interno. Através da curva analítica foram obtidos os valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), utilizando as Equações 2 e 3. Os parâmetros estatísticos que determinam a linearidade da curva analítica estão apresentados na Tabela 20.

$$LD = \frac{3,3 \cdot DPa}{IC} \quad \text{(Equação 2)}$$

$$LQ = \frac{10 \cdot DPa}{IC} \quad \text{(Equação 3)}$$

- DPa é o desvio padrão dos valores de intercepção das curvas analíticas em triplicata e IC é a inclinação da curva.

Figura 127 - Curva analítica obtida das soluções padrões do analito



Fonte: Figura elaborada com dados da pesquisa, 2020.

Tabela 20 - Parâmetros da curva analítica

Coefficiente linear (a)	Coefficiente angular (b)	Fator de correlação (R^2)	Faixa linear ($\mu\text{g/mL}$)	LD ($\mu\text{g/mL}$)	LQ ($\mu\text{g/mL}$)
0,000200	2,044069	0,999678	0,019531-1,25	0,00008	0,00025

O fator de correlação (R^2) apresentou um excelente valor, próximo a 1 (mínimo aceito de 0,98) o que indica uma boa linearidade de regressão por alguns analistas (CASSIANO *et al.*, 2009). Porém mesmo com valores de R^2 aceitáveis, pode ocorrer que a regressão não seja linear ou que o modelo de regressão linear proposto não atenda a faixa de concentração estabelecida. Para isso é necessário realizar os testes de homoscedasticidade e significância de regressão que estão descritos na próxima sessão (CASSIANO *et al.*, 2009; PIMENTEL; NETO, 1996).

4.7.1.2 Teste de ajuste do modelo linear (homoscedasticidade) e avaliação da significância da regressão

A homoscedasticidade da curva analítica foi verificada pela avaliação de ajuste do modelo linear pela análise das variâncias (teste-F de significância) (Tabela ANOVA) (Tabela 21).

A linearidade do método é determinada com o cálculo da razão das médias quadráticas, F , sendo que se $F \leq F_{Tab}$, o método possui uma boa linearidade. Nos cálculos aqui realizados, o $F = 2,66$ e o $F_{tab} = 2,74$, conferindo assim um modelo satisfatório que não apresenta falta de ajuste por erros aleatórios, sendo considerado um modelo homoscedástico (CASSIANO *et al.*, 2009; PIMENTEL; NETO, 1996).

Para o teste de significância da regressão, o teste F indica se existe uma relação linear entre as variáveis x e y . Para isso, o F precisa ser maior ou igual ao F_{tab} . Portanto, para esse estudo, o $F = 16310,43$ e o $F_{tab} = 4,30$ confirmando que a relação linear é bastante significativa (quanto maior o F , maior é a relação entre x e y) (CASSIANO *et al.*, 2009; PIMENTEL; NETO, 1996). Estes resultados indicam, portanto, uma boa proporcionalidade entre a concentração do padrão e a área do pico cromatográfico na faixa de concentração analisada.

Tabela 21 - Análise da variância para ajuste do modelo de regressão linear

Tabela Anova						
	SQ	G.L	Média	Teste F	F_{tab}	F/F_{tab}
Regressão	1,64E ⁺⁰¹	1	1,64E ⁺⁰¹	16310,43	4,30	3792,29
Resíduo	2,21E ⁻⁰²	22	1,01E ⁻⁰³			
Falta de ajuste	2,41E ⁺⁰¹	6	4,02E ⁺⁰⁰	2,66	2,74	
Erro puro	2,41E ⁺⁰¹	16	1,51E ⁺⁰⁰			
Total	1,64E ⁺⁰¹					

*SQ= Soma Quadrática; G.L=Grau de Liberdade

4.7.2 Precisão

A precisão, fornece a proximidade dos resultados obtidos a partir de análises independentes de múltiplas amostras sendo fundamental na determinação da qualidade do método analítico (CASSIANO *et al.*, 2009).

A repetibilidade (precisão intra-dia) e também a precisão intermediária (inter-dia), foram realizadas de acordo com o protocolo da ANVISA (ANVISA, 2017). A partir de 6 réplicas dos extratos foi calculado o desvio padrão relativo (DPR %) do tempo de retenção (t_R) e da área do pico, considerando os valores obtidos aceitáveis (menores do que 5 %) (Tabela 22) (CASSIANO *et al.*, 2009).

Tabela 22 - Desvio padrão relativo (%) das áreas e tempo de retenção (t_R) calculadas para a substância 5 nos extratos de Co-cultivo e *F. solani*

Extrato	t_R (DPR%)				Área da Banda (DPR%)			
	dia 1	dia 2	dia 3	Inter-dia	dia 1	dia 2	dia 3	Inter-dia
Co-cultivo PSA	0,19	0,17	0,11	0,15	3,57	4,37	4,17	4,01
<i>F. solani</i> PSA	0,13	0,09	0,15	0,16	4,99	4,36	3,20	4,32

4.7.3 Recuperação

A recuperação contribui para verificar a eficiência da extração de amostras biológicas, a partir da adição do analito na matriz (CASSIANO *et al.*, 2009).

Deste modo, a recuperação consistiu na fortificação dos extratos de co-cultivo PSA e *F. solani* PSA, em três níveis (alto, médio e baixo - de 80 a 120%) que se encontram na faixa de concentração esperada do analito (ANVISA, 2017).

Os extratos foram analisados em triplicata e as soluções foram avaliadas em três níveis de concentrações: 0,18, 0,22 e 0,26 $\mu\text{g/mL}$ (para Co-cultivo PSA) e 0,05, 0,06 e 0,07 $\mu\text{g/mL}$ (para *F. solani*).

O resultado é considerado satisfatório no intervalo de 70 a 120 % de recuperação (RIBANI *et al.*, 2004). O extrato do co-cultivo apresentou uma recuperação satisfatória para os limites calculados (entre 70 e 120 %) (Tabela 23), enquanto o extrato de *F. solani* apresentou uma exatidão superior ao valor estabelecido, conferindo um intervalo maior de recuperação (maior que 120 %) (Tabela 23).

Tabela 23 - Resultados de recuperação dos extratos de Co-cultivo e *F. solani* PSA

Nível (%)	Co-cultivo PSA (%)	DPR (%)	<i>F. solani</i> PSA (%)	DPR (%)
80	114,95 ± 1,44	1,26	125,54 ± 2,97	2,37
100	115,67 ± 2,21	1,91	126,79 ± 4,12	3,25
120	119,76 ± 0,93	0,78	124,71 ± 1,16	0,93

Para garantir a confiabilidade dos resultados foi determinado um intervalo de confiança para os extratos, com valores de 95 % para a distribuição-*t*, obtendo o intervalo de 114 % < μ < 119 % para o extrato do co-cultivo e 123 % < μ < 127 % para *F. solani* de acordo com a equação 4 (KAZUSAKI *et al.*, 2012).

$$\bar{x} - t \cdot \frac{\sqrt{s}}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{x} + t \cdot \frac{\sqrt{s}}{\sqrt{n}} \quad (\text{Equação 4})$$

\bar{x} = média; t = t_{tab} ; s = desvio padrão; n = número de amostras medidas

O teste *t* foi calculado para verificar a exatidão do método em 120 %, sendo considerado satisfatório apenas para o Co-cultivo PSA ($t < t_{tab}$). Para *F. solani*, o teste *t* foi satisfatório apenas para valores de recuperação considerados a 124 % (Tabela 24) ($t < t_{tab}$).

Tabela 24 - Teste t para os extratos de Co-cultivo e *F. solani* PSA

Teste <i>t</i>	Co-cultivo PSA (120%)	<i>F. solani</i> PSA (124%)
média	116,93	125,68
desvio padrão	2,66	2,75
t_{cal}	-2,81	1,495
t_{tab}	2,30	2,30

O DPR calculado foi menor que 5 % e então a recuperação dos extratos foram consideradas aceitáveis, visto que, os valores de concentração para o extrato de *F. solani* PSA são muito baixos, o que pode acarretar em erros experimentais maiores, já que a espectrometria de massas é uma técnica muito sensível.

4.7.4 Quantificação da Substância 5 nos Extratos Avaliados

O teor da substância **5** nos extratos estudados de *F. solani* e de co-cultivo PSA, PCA, CCA e CSA foi determinado pelas análises dos extratos a 10 µg/mL realizados em triplicatas, obtendo-se uma média da concentração e o seu desvio padrão.

A produção de um dos diastereoisômeros da substância **5** é realizada por *Fusarium*, como já evidenciado na literatura (GONG *et al.*, 2019), mas foi observado um aumento significativo na sua produção ao variar os extratos de acordo com a OSMAC.

Alguns dos extratos de co-cultivo e *F. solani* apresentaram concentrações dentro do limite de detecção e quantificação, porém estão fora dos limites da curva analítica. Dessa forma, não foi possível realizar a quantificação e sim estimar um valor dentro dos limites calculados para os extratos de *F. solani* CSA, *F. solani* CCA, *F. solani* PCA e co-cultivo CSA (grifados em vermelho na Tabela 25). Para os extratos de *F. solani* PSA, co-cultivo CCA, co-cultivo PSA e co-cultivo PCA foi possível realizar a quantificação de acordo com a curva analítica obtida (grifados em azul na Tabela 25).

É nítido que os extratos em meio de cultura PDB apresentaram um maior teor da substância **5** quando comparados com os extratos em meio czapek, tanto para *F. solani* quanto para o co-cultivo. E ainda, o co-cultivo apresentou um aumento muito significativo dessa substância em todos os extratos (Tabela 25). No co-cultivo PSA, por exemplo, do qual a substância **5** foi isolada, a produção foi 4 vezes maior quando comparada com a monocultura de *F. solani* em PSA.

O co-cultivo é inspirado no ambiente natural de competição de microrganismos, o que leva a variação da produção metabólica, ou no caso, ao aumento na produção de um determinado metabólito (NONAKA *et al.*, 2011). Isso ocorre de acordo com os mecanismos de defesa ou de sinalização em uma rede dinâmica de interações intra ou inter-espécies (BERTRAND *et al.*, 2014; ROMANO *et al.*, 2018).

Dessa forma, um dos efeitos da OSMAC foi observado aqui, devido a variação do teor da substância **5** nesses extratos.

Tabela 25 - Concentração da substância 5 nos extratos de co-cultivo e *F. solani* PSA à 10 µg/mL. Vermelho: Extratos que não puderam ser quantificados (concentração dentro do LD e LQ, mas abaixo do primeiro ponto da curva). Azul: Extratos quantificados

Extrato	Concentração da substância 5 (µg/mL)
<i>F. solani</i> CSA	<0,019531 (0,0002 ± 0,000055)
<i>F. solani</i> CCA	<0,019531 (0,0017 ± 0,001)
<i>F. solani</i> PCA	<0,019531 (0,0125 ± 0,001)
<i>F. solani</i> PSA	0,0548 ± 0,00077
Co-cultivo CSA	<0,019531 (0,0096 ± 0,001)
Co-cultivo CCA	0,0218 ± 0,001
Co-cultivo PCA	0,1543 ± 0,001
Co-cultivo PSA	0,2214 ± 0,011

5. CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

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

CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021–1030, 2009.

CHAUDHARY, N. K. et al. Banksialactones and Banksiamarins: Isochromanones and Isocoumarins from an Australian Fungus, *Aspergillus banksianus*. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 7, p. 1517–1526, 2018.

CHEMICAL BOOK. **4'-Hydroxyacetophenone(99-93-4) 13C NMR**. Disponível em: <https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_99-93-4_13CNMR.htm>. Acesso em: 16 mar. 2020.

CHERNIN, L. et al. Quorum-sensing quenching by rhizobacterial volatiles. **Environmental Microbiology Reports**, v. 3, n. 6, p. 698–704, 2011.

CHRISTIE, W. W.; HAN, X. Characterization of lipids by electrospray ionization mass spectrometry. In: CHRISTIE, W. W.; HAN, X. (Eds.). **Lipid Analysis**. 4. ed. Sawston: Woodhead Publishing Limited, 2010. p. 305–338.

DAHLIN, P. et al. Integrated control of *Meloidogyne incognita* in tomatoes using fluopyram and *Purpureocillium lilacinum* strain 251. **Crop Protection**, v. 124, p. 104874, 2019.

DEFESA VEGETAL. **Fusarium solani**. Disponível em: <<http://www.defesavegetal.net/fusaso>>. Acesso em: 14 mar. 2020.

DEGENKOLB, T.; VILCINSKAS, A. Metabolites from nematophagous fungi and nematicidal natural products from fungi as an alternative for biological control. Part I: metabolites from nematophagous ascomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 9, p. 3799–3812, 2016.

DEMARQUE, D. P. et al. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: An important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 432–455, 2016.

DENG, L. et al. Identification of chemical ingredients of peanut stems and leaves extracts using UPLC-QTOF-MS coupled with novel informatics UNIFI platform. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 51, n. 12, p. 1157–1167, 2016.

DESHMUKH, S. K.; VEREKAR, S. A.; BHAVE, S. V. Endophytic fungi: A reservoir of antibacterials. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–44, 2014.

DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 843–847, 2001.

EL-ANEED, A.; COHEN, A.; BANOUB, J. Mass spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 44, n. 3, p. 210–230, 2009.

ESCRIVÁ, L.; FONT, G.; MANYES, L. In vivo toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 78, p. 185–206, 1 abr. 2015.

FELL, J. W. et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1351–1371, 2000.

FENAILLE, F. et al. Data acquisition workflows in liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry-based metabolomics: Where do we stand? **Journal of Chromatography A**, v. 1526, p. 1–12, 2017.

FORNAL, E. et al. Fast and easy liquid chromatography–mass spectrometry method for evaluation of postharvest fruit safety by determination of mycotoxins: Fumitremorgin C and verruculogen. **Postharvest Biology and Technology**, v. 131, p. 46–54, 2017.

FRANCISCO, M. R.; SALDANHA, T.; FRAGA, M. E. Fungi as an alternative to produce essential

- fatty acids. **Científica**, v. 45, n. 2, p. 123, 2017.
- GEORGANTEA, P. et al. Sesquiterpenes with inhibitory activity against CDC25 phosphatases from the soft coral *Pseudopterogorgia rigida*. **Tetrahedron**, v. 72, n. 23, p. 3262–3269, 2016.
- GONG, J. et al. Fusaresters A–E, new γ -pyrone-containing polyketides from fungus *Fusarium* sp. Hungcl and structure revision of fusariumin D. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 17, p. 5526–5532, 2019.
- GOSWAMI, S. et al. A review on lovastatin and its production. **Journal of Biochemical Technology**, v. 4, n. 1, p. 581–587, 2012.
- GROVE, J. F.; POPLE, M. Metabolic products of *Fusarium larvarum* Fuckel. The fusarentins and the absolute configuration of monocerin. **Journal of Chemical Information and Modeling**, p. 2048–2051, 1979.
- GUIMARÃES, D. O. et al. A simple method for the quantitative analysis of tyrosol by hplc in liquid czapek cultures from endophytic fungi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 1, p. 188–194, 2009.
- GUIMARÃES, D. O. et al. Diketopiperazines produced by endophytic fungi found in association with two Asteraceae species. **Phytochemistry**, v. 71, n. 11–12, p. 1423–1429, 2010.
- HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Publishing Group**, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015.
- HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. . **Microbiol Spectrum**, v. 5, p. 1–17, 2017.
- HEWAGE, R. T. et al. One strain-many compounds (OSMAC) method for production of polyketides, azaphilones, and an isochromanone using the endophytic fungus *Dothideomycete* sp. **Phytochemistry**, v. 108, p. 87–94, 2014.
- HU, L.; RYCHLIK, M. Biosynthesis of ^{15}N 3-Labeled Enniatins and Beauvericin and Their Application to Stable Isotope Dilution Assays. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 29, p. 7129–7136, 2012.
- HUMPHREY, J. M.; CHAMBERLIN, A. R. Chemical synthesis of natural product peptides: Coupling methods for the incorporation of noncoded amino acids into peptides. **Chemical Reviews**, v. 97, n. 6, p. 2243–2266, 1997.
- JAYAKRISHNAN, T.; BENJAMIN, S. *Purpureocillium lilacinum* Strain BP13 Produces Flavoglucin. **Electronic Journal of Biology**, v. 12, n. 4, p. 472–476, 2016.
- JOHNSON, R. S.; MARTIN, S. A.; BIEMANN, K. Collision-induced fragmentation of $(M + H)^+$ ions of peptides. Side chain specific sequence ions. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes**, v. 86, p. 137–154, 1988.
- KAKEYA, H. et al. Lucilactaene, a new cell cycle inhibitor in p53-transfected cancer cells, produced by a *Fusarium* sp. **The Journal of Antibiotics**, v. 54, n. 10, p. 850–854, 2001.
- KAZUSAKI, M. et al. Validation of analytical procedures by high-performance liquid chromatography for pharmaceutical analysis. **Chromatography**, v. 33, n. 2, p. 65–73, 2012.
- KHARWAR, R. N. et al. A comparative study of endophytic and epiphytic fungal association with leaf of *Eucalyptus citriodora* Hook., and their antimicrobial activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 1941–1948, 2010.
- KIND, T. et al. FiehnLib: Mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 24, p. 10038–10048, 2009.

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

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

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

- SONG, H. H. et al. Structural analysis of enniatin H, I, and MK1688 and beauvericin by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and their production by *Fusarium oxysporum* KFCC 11363P. **Food Additives and Contaminants**, v. 26, n. 4, p. 518–526, 2009.
- SORDON, S. et al. Microbial glycosylation of daidzein, genistein and biochanin a: Two new glucosides of biochanin A. **Molecules**, v. 22, n. 1, 2017.
- SY-CORDERO, A. A.; PEARCE, C. J.; OBERLIES, N. H. Revisiting the enniatins: A review of their isolation, biosynthesis, structure determination and biological activities. **Journal of Antibiotics**, v. 65, n. 11, p. 541–549, 2012.
- SZYPULA, W. et al. Determination of huperzine a in *Huperzia selago* plants from wild population and obtained in vitro culture by high-performance liquid chromatography using a chaotropic mobile phase. **Acta Chromatographica**, v. 23, n. 2, p. 339–352, 2011.
- TADPETCH, K. et al. Cytotoxic naphthoquinone and a new succinate ester from the soil fungus *Fusarium solani* PSU-RSPG227. **Phytochemistry Letters**, v. 11, p. 106–110, 2014.
- TANSEER, S.; ANJUM, T. Modification of C and N sources for enhanced production of cyclosporin “A” by *Aspergillus terreus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1374–1383, 2011.
- TATUM, J. H.; BAKER, R. A. Naphthoquinones produced by *Fusarium solani* isolated from citrus. **Phytochemistry**, v. 22, n. 2, p. 543–547, 1983.
- TELES, A. P. C.; TAKAHASHI, J. A. Paecilomide, a new acetylcholinesterase inhibitor from *Paecilomyces lilacinus*. **Microbiological Research**, v. 168, n. 4, p. 204–210, 6 maio 2013.
- TOGHUEO, R. M. K. Bioprospecting endophytic fungi from *Fusarium* genus as sources of bioactive metabolites. **Mycology**, p. 1–21, 2019.
- TRIPATHI, K. D. **Essentials of medical pharmacology**. 8. ed. [s.l.] Jp Medical Ltd, 2018.
- UTD JARDIM BOTÂNICO. *Senna spectabilis*. Disponível em: <https://jb.utad.pt/especie/Senna_spectabilis>. Acesso em: 14 mar. 2020.
- VALLI, M. et al. Development of a natural products database from the biodiversity of Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 3, p. 439–444, 2013.
- VAN DE VELDE, M. E. et al. Vincristine-induced peripheral neuropathy in children with cancer: A systematic review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 114, p. 114–130, 1 jun. 2017.
- VANDERMOLEN, K. M. et al. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. **AMB express**, v. 3, n. 7, p. 1–7, 2013.
- VIANT, M. R.; SOMMER, U. Mass spectrometry based environmental metabolomics: A primer and review. **Metabolomics**, v. 9, p. 144–158, 2013.
- VIEGAS, C. et al. Further Bioactive Piperidine Alkaloids from the Flowers and Green Fruits of *Cassia spectabilis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 908–910, 2004.
- VIEGAS, C. J. et al. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1279–1286, 2006.
- WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, p. 828–837, 2016.
- WANG, M. et al. MASST: A Web-based Basic Mass Spectrometry Search Tool for Molecules to Search Public Data. **bioRxiv**, p. 1–18, 2019.
- WATERS. **UNIFI Scientific Information System**. Disponível em: <https://www.waters.com/waters/en_US/UNIFI-Scientific-Information-System/nav.htm?cid=134801359&locale=en_US>. Acesso em: 16 mar. 2020.

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

APÊNDICE

Apêndice A - Levantamento de metabólitos descritos (inglês) na literatura para o gênero *Fusarium*

(Continua)

N°	Metabólito	N°	Metabólito	N°	Metabólito	N°	Metabólito	N°	Metabólito
1	2,3-dihidro-5,8-dihidroxy-6-methoxy-2-hydroxymethyl-3-(2-hydroxypropyl)-1,4-naphthalenedione	55	5,10-dihydroxy-1,7-dimethoxy-3-methyl-1H-naphtho-[2,3-c]-pyran- 6,9-dione	109	cyclo-(phe-ser)	163	fusaraisochromenone	217	methyl 2-(4-hydroxyphenyl)acetate
2	(-)-jasmonic acid	56	5,7,2',4'-tetrahydroxy-8-(3''-hydroxy-3''-methyl-butyl) isoflavanone	110	cyclonerodiol	164	fusarentin dimethylether	218	methyl 4-hydroxybenzoate
3	(-)-oxysporidinone	57	5,8-dihydroxy-2-methoxy-6-hydroxymethyl-7-(2-hydroxypropyl)-1,4-naphthalenedione	111	cyclotryprostatin B	165	fusaric acid	219	methyl ether fusarubin
4	(+)-7-iso-jasmonic acid	58	5,8-dihydroxy-6-methoxy-3-methyl-2-aza-9, 10-anthracenedione	112	daidzein	166	fusarielin A	220	monaspilosin
5	(1S,2R)-3-oxo-2-pentylcyclopentane-1-butyric acid	59	5-0-methylsolaniol	113	decano-d-lactone	167	fusarimine	221	monocerin1
6	(1S,2R)-3-oxo-2-(2Z-pentenyl)cyclopentane-1-butyric acid	60	5-hydroxy-3-methoxydihydrofusarubin A	114	deoxynivalenol (DON)	168	fusarin A	222	N -9,10-dihydro-7-iso-jasmonic acid-isoleucine
7	(1S,2R)-3-oxo-2-(2Z-pentenyl)cyclopentane-1-octanoic acid	61	5-hydroxy-3-methoxydihydrofusarubin D	115	diacetoxyscirpenol (DAS)	169	fusarin C	223	N-[(-)-jasmonoyl]-(-S)-isoleucine
8	(1S,2R)-3-oxo-2-(2Z-pentyl)cyclopentane-1-octanoic acid	62	5-methoxydihydrofusarubin	116	diacetylivalenol (3,15dianiv) ou diacetylivalenol (4,15dianiv)	170	fusarin C open	224	N-[9,10-dihydro-7-iso-jasmonoyl]

Apêndice A - Levantamento de metabólitos descritos (inglês) na literatura para o gênero *Fusarium*

(Continuação)

N°	Metabólito	N°	Metabólito	N°	Metabólito	N°	Metabólito	N°	Metabólito
9	(1S,2R)-3-oxo-2-pentenylcyclopentane-1-hexanoic acid	63	5-O-methyljavanicin	117	dihydrofusarin C	171	fusarin D	225	N-demethylsambutoxin
10	(1S,2R)-3-oxo-2-pentylcyclopentane-1-hexanoic acid	64	7-(E)-but-2-enyl-3,4-dihydro-6,8-enylisochromen-1-one-6-sulfate	118	dihydronaphthalenone	172	fusarin X	226	nectriafurone
11	(1S,2S)-3-oxo-2-pentylcyclopentane-1-butyric acid	65	7-butyl-3,4-dihydro-6,8-enylisochromen-1-one-6-sulfate	119	dimethyl ketal of oxysporidinone	173	fusarin Z	227	nectriafurone-8-methyl ether
12	(1S,2S)-3-oxo-2-(2Z-pentenyl)cyclopentane-1-butyric acid	66	7-ethylbenzoate-7-heptanoic acid	120	enniatin A	174	fusarinolic acid	228	neomangicol A
13	(1S,2S)-3-oxo-2-(2Z-pentenyl)cyclopentane-1-octanoic acid	67	7-hydroxy-14-de-O-methyl-lasiodiplodin	121	enniatin A1	175	fusariocin C	229	neomangicol B
14	(1S,2S)-3-oxo-2-(2Z-pentyl)cyclopentane-1-octanoic acid	68	7-iso-cucurbitic acid	122	enniatin A2	176	fusarithioamide A	230	neomangicol C
15	(1S,2S)-3-oxo-2-pentenylcyclopentane-1-hexanoic acid	69	7-O-methylgenistein	123	enniatin B	177	fusariumin	231	neurosporaxanthin-b--D-glucopyranoside
16	(1S,2S)-3-oxo-2-pentylcyclopentane-1-hexanoic acid	70	8-acetylneosolaniol	124	enniatin B1	178	fusarnaphthoquinone A	232	NG-391
17	(2S,2R,3R,3E,4E,8E)-1-O-β-Dglucopyranosyl-2-N-(2-hydroxy-3-octadecenoyl)-3-hydroxy-9-methyl-4,8-sphingadienine	71	8-O-methylbostrycoidin	125	enniatin B2	179	fusarochromanone derivate	233	nivalenol (NIV)

Apêndice A - Levantamento de metabólitos descritos (inglês) na literatura para o gênero *Fusarium*

(Continuação)

N°	Metabólito	N°	Metabólito	N°	Metabólito	N°	Metabólito	N°	Metabólito
18	(2S,R,3R,E,4E,8E,10E)-1-O- β -D-glucopyranosyl-2-N-(2-hydroxy-3-octadecenoyl)-3-hydroxy-9-methyl-4,8,10-sphingatrienine	72	8-O-methyljavanicin	126	enniatin C	180	fusarochromanone derivate2	234	norbikaverin
19	(R)-3,4-dihydro-4,8-dihydroxy-6-methoxy-4,5-dimethyl-3-methylenoisochromen-1-one	73	9,10-dehydrofusaric acid	127	enniatin D	181	fusarochromanone derivate3	235	norjavanicin
20	(S)-banchromene	74	9,10-dihydro-7-iso-jasmonic acid	128	enniatin E	182	fusarochromanone derivative4	236	novarubin
21	1,4-naphthalenedione-3,8-dihydroxy-5,7-dimethoxy-2-(2-oxopropyl)	75	9,10-dihydrojasmonic acid	129	enniatin F	183	fusarubin	237	oxysporone
22	1,5,10-trihydroxy-7-methoxy-3-methyl-1-H-naphtho-[2,3-cl-pyran-6,9-dione	76	9,10-dihydrojasmonic acid- isoleucine	130	enniatin G	184	fusarubin1	238	paclitaxel
23	10-hydroxycamptothecin	77	9-methoxycamptothecin	131	enniatin L	185	fusarubin2	239	pentahydroxyscirpene (PHS)
24	14-de-O-methyl-lasiodiplodin	78	9-O-methylanhydrofusarubin	132	enniatin M1	186	fusarubin3	240	radicicol
25	1-dehydro-11-hydroxyandrostenedione	79	9-O-metylfusarubin	133	enniatin M2	187	fusarubin4	241	radicinin
26	1-dehydro-11-hydroxyandrostenedione derivate 17-oxyme	80	acetyl deoxynivalenol (ADON)	134	enniatin mk	188	fusarubin5	242	rhein
27	1-O-acetyl glycerol	81	alfatoxin	135	epi-fusarin C	189	fuscofusarin	243	rohitukine
28	2,3-dihydro-5-hydroxy-4-hydroxymethyl-8-methoxy-naphtho[1,2-b]furan-6,9-dione	82	allantoin	136	ergosta-7,22-diene-3b,5a,6b-triol	190	fuscofusarin1	244	rordin E

Apêndice A - Levantamento de metabólitos descritos (inglês) na literatura para o gênero *Fusarium*

(Continuação)

N°	Metabólito	N°	Metabólito	N°	Metabólito	N°	Metabólito	N°	Metabólito
29	2,3-dihydro-5-hydroxy-8-methoxy-2,4-dimethyl-naphtho-[1,2-b]-furan-6,9-dione	83	anhydrofusarubin	137	ergosterol	191	gibepyrone	245	roridin E acetate
30	2B-6B-dihydroxy-5a-methoxyergosta-7, 22 diene	84	anhydrofusarubin lactone	138	ergosterol peroxide	192	gliotoxin	246	sambacide
31	2B-9a-dihydroxy-5a-methoxyergosta-7,22-diene	85	antibiotic	139	ethyl-3,5-dihydroxy-7-(6,8-dihydroxynonyl)benzoate	193	helvolic acid	247	sambutoxin
32	2-deceno-d-lactone	86	aspergillol B	140	ethyl-3,5-dihydroxy-7-(8-hydroxynonyl)benzoate	194	HT2-glucoronide conjugate	248	sanguinarine
33	3-(1-hydroxyethyl)-2,8-dihydroxy-6- methoxy-anthraquinone	87	aurofusarin	141	formononetin	195	HT2-toxin	249	sansalvamide
34	3,12,14-trihydroxycard-20(22)-enolide	88	baccharinoid B4	142	fujikurin A	196	hydroxyculmorin	250	satratoxin-H
35	3,15-diacetyl-nivalenol	89	beauvericin	143	fujikurin B	197	hydroxylucilactaene	251	solaninaphthoquinone
36	3,4,15-trianiv	90	bikaverin	144	fujikurin D	198	Illicolin A	252	solaniol
37	3,4,4a,10a-tetrahydro-3,6,9-trihydroxy-7- methoxy-3-methyl-1H-naphtho[2,3-c]pyran-5,10-dione	91	bikaverin2	145	fumitremorgin B	199	indole-3-acetic acid	253	sterigmatocystin
38	3,5-dimethoxydihydrofusarubin B	92	bikaverin3	146	fumitremorgin C	200	indole-3-acetic acid methyl ester	254	T-2 tetraol
39	3,5-dimethoxydihydrofusarubin D	93	bisdethiobis(methylthio)gliotoxin	147	fumonisin	201	isoculmorin	255	T-2 toxin
40	3-[[4-[(3-methyl-2-buten-1-yl)oxy]phenyl]methyl]-3,6-bis(methylthio)-(3S,6R)-2,5-piperazinedione	94	bis-N-norgliovictin	148	fumonisin B1	202	javanicin	256	T2-tetraol glucuronide conjugate

Apêndice A - Levantamento de metabólitos descritos (inglês) na literatura para o gênero *Fusarium*

(Conclusão)

N°	Metabólito	N°	Metabólito	N°	Metabólito	N°	Metabólito	N°	Metabólito
41	3-acetyl-2,8-dihydroxy-6-methoxy-anthraquinone	95	bostrycoidin	149	fumonisin B2	203	kakkatin	257	TDP-1
42	3-acetyl-7-hydroxy-5-methoxyl-3H-isobenzofuran-1-one	96	camptothecin	150	fumonisin B3	204	karuquinone A	258	TDP-2
43	3-hydroxi-Ht2	97	cercosporin	151	fumosin FB1	205	karuquinone B	259	triacetylnivalenol (3,4,15dianiv)
44	3-hydroxymaackianisoflavan	98	cerevisterol	152	fumosin FB2	206	karuquinone C	260	trichosetin
45	3'-OH-T-2 toxin	99	citrinin	153	fusalanipyrone	207	lanceolatin A	261	tyrosol
46	3R,4aR,10aR)-5,10-dioxo-3,4,4a,5,10,10a-hexahydro-3,7-dimethoxy-3-methyl-6,9-dihydroxy-1-H-naphtho(2,3-c)pyran	100	coculnol	154	fusaperazine C	208	longiborneol	262	uridine
47	4-(4-hydroxyphenethoxy)-4-oxobutanoic acid	101	cucurbitic acid Methyl ester	155	fusaproliferin	209	lucilactaene	263	verruculogen
48	4,15-diacetyl-nivalenol	102	culmorin	156	fusapyridon A	210	mangicol A-B	264	vinblastine
49	4-acetylnivalenol	103	culmorone	157	fusapyridon B	211	mangicol C	265	vincristine
50	4-deacetylneosolanide	104	curvulalic acid	158	fusaquinone Bdeoxy	212	mangicol D	266	wortmannin1
51	4-hydroxybenzoic acid	105	curvulin	159	fusar1	213	mangicol E	267	wortmannin2
52	4-hydroxydihydronorjavanicin	106	cyclo-(L-prolyl-L-glycine)	160	fusar2	214	mangicol F	268	zearalenol
53	4-hydroxyphenylacetic acid	107	cyclo-(L-prolyl-L-proline)	161	fusar3	215	mangicol G	269	zearalenona
54	5-(but-3-en-1-yl)picolinic acid	108	cyclo-(L-prolyl-L-valine)	162	fusaraisochromanone	216	marticin		

Apêndice B - Levantamento de metabólitos descritos (inglês) na literatura para o gênero *Purpureocillium/Paecilomyces*

(Continua)

N°	Metabólito	N°	Metabólito	N°	Metabólito	N°	Metabólito	N°	Metabólito
1	(+)-N-deoxymilitarinone A	38	aspulvinone O	75	methylphomaligol A	112	paecilоquinone C	149	phomapyrone B
2	(22E,24R)-stigmasta-4,6,8(14)22-tetraen-3-one	39	beauvericin	76	micropyrone	113	paecilоquinone D	150	phomapyrone C
3	(22E,24R)-stigmasta-5,7,22-trien-3-B-ol	40	beauvericin A	77	militarinone A	114	paecilоquinone E	151	protuboxepin B
4	(3Z,5E)-octa-3,5-diene-1,3,4-tricarboxylic acid 3,4 anhidride	41	beauverolide C	78	militarinone B	115	paecilоsetin	152	pyrenocine A
5	1',2'-epoxy aigialomycin D	42	brefeldin A	79	militarinone C	116	paecilосide A	153	pyrenocine B
6	1,3-dimethoxy-1-octyloctahydroisobenzofuran-4-ol	43	butyrolactone I	80	militarinone D	117	paecilосpirone	154	pyrenocine I
7	1,5-dideoxy-3-C-methyl-arabitol	44	butyrolactone IV	81	N-(2-hydroxyphenyl)-acetanamide	118	Paecilосpirone2	155	rubrofusarin-6-O-b -(4-O-methylglucopyranoside)
8	14-Hydroxycornexistin	45	butyrolactone IX	82	norlichexanthone-6-O-b -(4-O-methylglucopyranoside)	119	paecilotoxin A	156	saintopin
9	2-(4-hydroxyphenyl) ethanol	46	butyrolactone V	83	paecilaminol	120	paecilotoxin A2	157	secalonic acid A
10	2,5-furandimethanol	47	butyrolactone VI	84	paecilin A	121	paecilotoxin B	158	semi-viriditoxin
11	2-heptyloctahydro-1H-indene-1,3,4-triol	48	cerebroside C	85	paecilin B	122	paecilotoxin B2 (2)	159	semiviriditoxic acid
12	2-hydroxybenzylalcohol	49	cerebroside D	86	paecilodepsipeptide A	123	paecilotoxin C	160	semiviriditoxin
13	3,5,9-trimethyl-deca-2,8-trien-1-ol	50	cholesteryl linoleate	87	paecilodepsipeptide B	124	paecilotoxin D	161	sorbicillinoid urea
14	3-[(2Z)-1-oxo-2-buten-1-yl]oxazolidin-2-one	51	chrysophanol	88	paecilodepsipeptide C	125	paecilotoxin D (2)	162	sphingofungins E
15	3alfa-hydroxy-3,5-dihydro sodium	52	citroviridin	89	paecilomycin A	126	paecilotoxin F	163	sphingofungins F
16	3-octyloctahydroisobenzofuran-1,7-diol	53	cyclo(isoleucylleucyl); (1'S,3S,6S)-form	90	paecilomycin B	127	paecilotoxin H	164	spirotenuipesine A
17	3R,5E,7E,9R,11E,13Z)-1-((3aS,6aR)-2-amino-5-oxo-3a,5,6,6a-tetrahydrofuro-4-(4'-carboxy-2'-ethyl-hydroxypentyl)-5,6-dihydro-6-methyl-cyclobuta[b]pyridine-3,6-dicarboxylic acid	54	cyclo(prolylthreonyl)	91	paecilomycin C	128	paecilotoxin I	165	spirotenuipesine B
18		55	derivado do globulol	92	paecilomycin D	129	paecilotoxin III	166	stigmasterol

Apêndice B - Levantamento de metabólitos descritos (inglês) na literatura para o gênero *Purpureocillium/Paecilomyces*

(Conclusão)

N°	Metabólito	N°	Metabólito	N°	Metabólito	N°	Metabólito	N°	Metabólito
19	4(5,5-dimethyl-1-oxaspirol (2,5)oct-4-yl)-3-buten-2-one	56	dipicolinic acid	93	paecilomycin E	130	paecilotoxin IV	167	tenellic acid A
20	4beta-acetoxy-12,13-epoxytrichothec-9-ene-3alpha,15-diol	57	emodin	94	paecilomycin F	131	paecilotoxin K	168	tenuipesine A
21	4-hydroxybenzene-ethanol	58	ergochromone derivative	95	paecilomycin G	132	paecilotoxin L	169	terezine D
22	7'-dehydrozearalenone	59	ergochromone derivative2	96	paecilomycin H	133	paecilotoxin N	170	terreusinone
23	acetylphomaligol A	60	ergosterol	97	paecilomycin I	134	paecilotoxin R	171	trans-7',8'-dehydrozearalenol
24	acremoauxin A	61	ergosterol peroxide	98	paecilomycin J	135	paecilotoxin S	172	UCE1022
25	acremoxanthone C	62	farasinone A	99	paecilomycin K	136	paecilotoxin T	173	varioloid A
26	adenosine	63	farinomalein	100	paecilomycin L	137	paecilotoxin U	174	varioloid B
27	aigialomycin B	64	farinosone B	101	paecilomycin M	138	paecilotoxin V	175	varioloids A
28	aigialomycin C	65	farinosone C	102	paecilomycine A	139	paecilotoxin V(4)	176	varioloids B
29	aigialomycin D	66	flavoglaucin	103	paecilomycine B	140	paeciloxazine	177	variotin
30	aigialomycin F	67	formosusin A	104	paecilomycine C	141	paeciloxocin A	178	varioxepine A
31	aigialospirol	68	formosusin B	105	paecilomycone A	142	paeciloxocin B	179	versiconol
32	aloe-emodin	69	formosusin C	106	paecilomycone B	143	phomaligol A	180	viriditoxin
33	antibiotic LL-Z1640-1	70	formoxazine	107	paecilomycone C	144	phomaligol A hydroperoxide	181	zeaenol
34	aspernolide A	71	huperzine A	108	paecilopyrone A	145	phomaligol A1	182	zearalenone
35	aspulvinone C	72	kurasoins A	109	paecilopyrone B	146	phomaligol A1 hydroperoxide	183	zeorin
36	aspulvinone D	73	kurasoins B	110	paeciloquinone A	147	phomaligol B		
37	aspulvinone H	74	linoleic acid	111	paeciloquinone B	148	phomaligol C		

Apêndice C - Estrutura química das substâncias anotadas, neste trabalho, por GC-MS e LC-MS

(Continua)

N°	Substância	Estrutura molecular
1	ácido 2-propenóico, 3-(4-metoxifenil)-2, etilhexil éster	
2	ácido 3-hidroxi-decanoico	
3	ácido 6-octadecanoico	
4	ácido cis-6-octadecanoico, metil éster	
5	ácido dodecanoico	
6	ácido linoleico	
7	ácido mevalônico	
8	ácido N-decanoico	
9	ácido octadecanoico	
10	ácido oleico	
11	ácido palmítico	
12	ácido palmitoleico	
13	ácido pentadecanoico	
14	ácido trans-9-octadecenoico	
15	4-metilindol	

Apêndice C - Estrutura química das substâncias anotadas, neste trabalho, por GC-MS e LC-MS

(Continuação)

N°	Substância	Estrutura molecular
16	harman	
17	1-indolicarboxaldeído, 2-hidroxi-7-metil	
18	lumicroma	
19	1-dodecanol	
20	hexadecanol	
21	tetradecanol	
22	2-fenilacetamida	
23	erucilamida	
24	hexadecanamida	
25	octadecanamida	
26	tetradecanamida	
27	<i>N</i> -(2-fenil)-acetamida	
28	2,5-piperazinadiona, 3-(fenilmetil)	
29	2,5-piperazinadiona, 3,6-bis(fenilmetil)	

Apêndice C - Estrutura química das substâncias anotadas, neste trabalho, por GC-MS e LC-MS

(Continuação)

N°	Substância	Estrutura molecular
30	3-(hidroximetil)piperazina-2,5-diona	
31	metil linoleato	
32	metil octadecanoato	
33	metil-elaidato	
34	metil palmitato	
35	dehidroergosterol	
36	γ-sistosterol	
37	2,4-di-tert-butilfenol	
38	2-pirrolidinona, 1-decil	
39	4'-hidroxiacetofenona	
40	tirosol	
41	7,9-di-tert-butil-1-oxaespino[4,5]deca-6,9-dieno-2,8-diona	

Apêndice C - Estrutura química das substâncias anotadas, neste trabalho, por GC-MS e LC-MS

(Continuação)

N°	Substância	Estrutura molecular
42	ácido fusárico	
43	glicil-L-triptofano	
44	benzenoetanol, α -(fenilmetil)	
45	1,2-difenoxietano	
46	éter <i>cis</i> -2-penten-1-ol	
47	daidzeína	
48	paecilotoxina H	
49	paecilotoxina A	
50	paecilotoxina T	
51	paecilotoxina I	

Apêndice C - Estrutura química das substâncias anotadas, neste trabalho, por GC-MS e LC-MS

(Continuação)

N°	Substância	Estrutura molecular
52	paecilotoxina F	
53	paecilotoxina D	
54	paecilotoxina N	
55	paecilotoxina L	
56	paecilotoxina B	
57	paecilotoxina K	

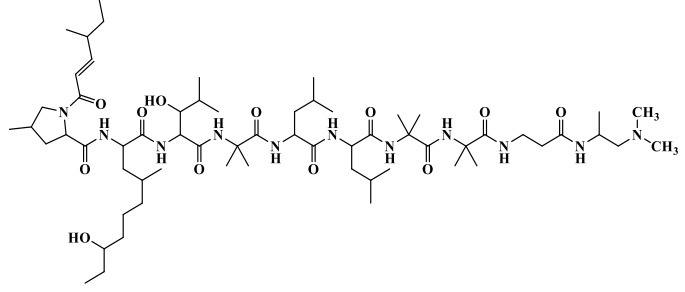
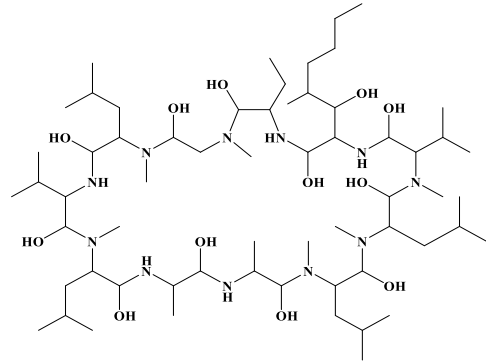
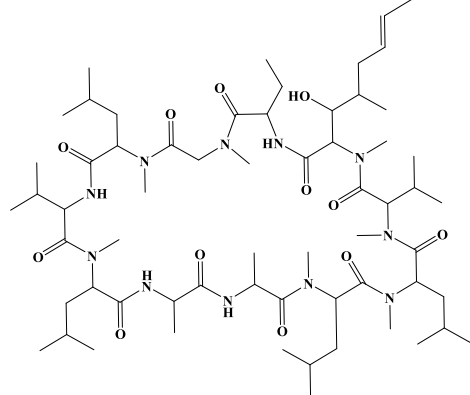
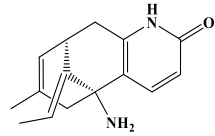
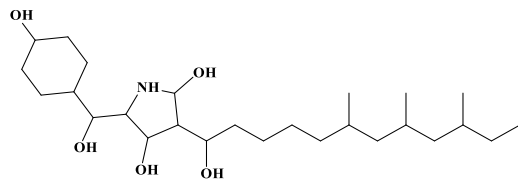
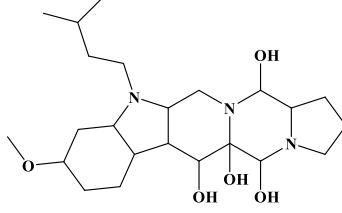
Apêndice C - Estrutura química das substâncias anotadas, neste trabalho, por GC-MS e LC-MS

(Continuação)

N°	Substância	Estrutura molecular
58	paecilotoxina B2	
59	paecilotoxina V	
60	paecilotoxina A2	
61	paecilotoxina R	
62	paecilotoxina V(5)	

Apêndice C - Estrutura química das substâncias anotadas, neste trabalho, por GC-MS e LC-MS

(Continuação)

N°	Substância	Estrutura molecular
63	paecilotoxina S	
64	ciclosporina L	
65	ciclosporina A	
66	huperzina A	
67	militarinona B	
68	fumitremorgina B	

Apêndice C - Estrutura química das substâncias anotadas, neste trabalho, por GC-MS e LC-MS

(Continuação)

N°	Substância	Estrutura molecular
69	3-(4-((3-metilbut-2-en-1-il)oxi)benzil)-3,6-bis(metiltio)piperazina-2,5-diona	
70	fusaperazina C	
71	3,5-dimetoxidihidrofusarubina B	
72	dihidronaftalenona	
73	2B-6B-dihidroxi-5a-metoxi ergosta-7,22 dieno	
74	ergosterol	
75	peróxido de ergosterol	
76	3,4-dihidro-4,8-dihidroxi-6-metoxi-4,5-dimetil-3-metil-isocromen-1-ona	

Apêndice C - Estrutura química das substâncias anotadas, neste trabalho, por GC-MS e LC-MS

(Continuação)

N°	Substância	Estrutura molecular
77	7-but-2-enil-3,4-dihidro-6,8-dihidroxi-3-pent-3-enil-isochromen-1-ona-6-sulfato	
78	fusaraisocromanona	
79	fusarentina dimetileter	
80	5,8-dihidroxi-6-metoxi-3-metil-2-aza-9,10-antracenediona	
81	solaninaftoquinona	
82	beauvericina	
83	enniatina A1	

Apêndice C - Estrutura química das substâncias anotadas, neste trabalho, por GC-MS e LC-MS

(Continuação)

N°	Substância	Estrutura molecular
84	enniatina A2	
85	enniatina B1	
86	enniatina B2	
87	enniatina D	
88	enniatina G	

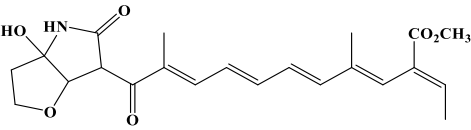
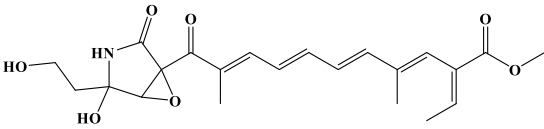
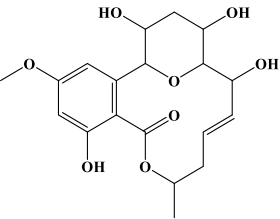
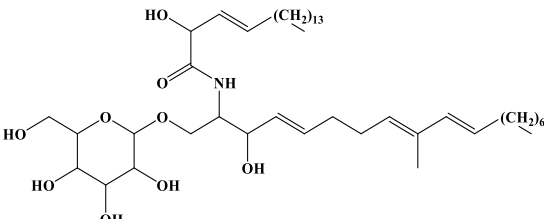
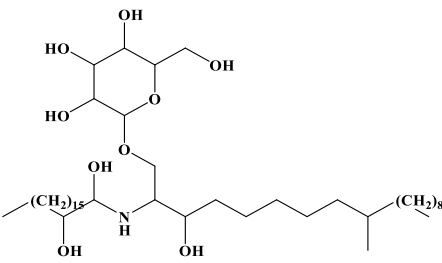
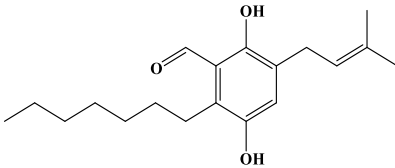
Apêndice C - Estrutura química das substâncias anotadas, neste trabalho, por GC-MS e LC-MS

(Continuação)

N°	Substância	Estrutura molecular
89	eniatina M2	
90	eniatina MK	
91	sansalvamida	
92	fusarielina A	
93	fusarina D	
94	fusarina Z	

Apêndice C - Estrutura química das substâncias anotadas, neste trabalho, por GC-MS e LC-MS

(Conclusão)

N°	Substância	Estrutura molecular
95	lucilactaeno	
96	NG-391	
97	paecilomicina B	
98	<i>O</i> -glucopiranosil-2- <i>N</i> -(2-hidroxi-3-octadecenoil)-3-hidroxi-9-metil-4,8-sfingadienina	
99	cerebrosídeo D	
100	flavoglaucina	
101	4-hidróxifenilacetato de metila	