



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA ARAÚJO
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



RAFAEL VIANA DA SILVA

Aplicação de planejamento fatorial para estudo químico e biológico de *Hypoxylon monticulosum*, fungo endofítico da alga marinha *Acanthophora spicifera*

Araraquara
2022

RAFAEL VIANA DA SILVA

Aplicação de planejamento fatorial para estudo químico e biológico de *Hypoxylon monticulosum*, fungo endofítico da alga marinha *Acanthophora spicifera*

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

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva
Co-orientadora: Profa. Dra. Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade

Araraquara
2022

S586a

Silva, Rafael Viana da

Aplicação de planejamento fatorial para estudo químico e biológico de *Hypoxylon monticulosum*, fungo endofítico da alga marinha *Acanthophora spicifera* / Rafael Viana da Silva. -- Araraquara, 2022
166 f. : il.

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

Orientadora: Dulce Helena Siqueira Silva

Coorientadora: Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade

1. Fungos endofíticos. 2. Planejamento de experimentos. 3. Produtos naturais. 4. Algas vermelhas. 5. Quimiometria. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE:

"Aplicação de planejamento fatorial para estudo químico e biológico de *Hypoxylon monticulosum* endofítico da alga marinha *Acanthophora spicifera*"

AUTOR: RAFAEL VIANA DA SILVA

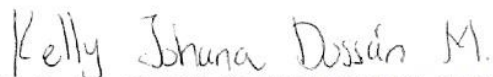
ORIENTADORA: DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA

COORIENTADORA: TERESINHA DE JESUS AGUIAR DOS SANTOS ANDRADE

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



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



Profa. Dra. KELLY JOHANA DUSSAN MEDINA (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia, Física e Matemática / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Dr. NERILSON MARQUES LIMA (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



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



Profa. Dra. CLAUDIA QUINTINO DA ROCHA (Participação Virtual)
Departamento de Química / Universidade Federal do Maranhão - UFMA - São Luís

Araraquara, 30 de agosto de 2022

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Rafael Viana da Silva

Data de nascimento: 22 de abril de 1989

Naturalidade: Teresina-PI

Nacionalidade: Brasileiro

ENDEREÇO PROFISSIONAL

NuBBE – Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais,
Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara,
Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho.

Rua Prof. Francisco Degni, 55 - Araraquara-SP, CEP: 14.801-970, SP - Brasil

e-mail: espainha_viana@hotmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2022

Doutorado em Química - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Instituto de Química, Araraquara - SP.

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva.

Co-orientadora: Profa. Dra. Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade.

2016-2018

Mestrado em Química - Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina - PI.

Título: Análise fitoquímica, atividade repelente, inseticida e larvicida de *Annona montana* sobre o vetor *Aedes aegypti*. Ano de Obtenção: 2018.

Orientadora: Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa.

2008-2011

Graduação em Química Licenciatura – Instituto federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí (IFPI), Teresina - PI. Título da Monografia: Estudo de pilhas no ensino de química: uma abordagem contextualizada e interativa.

Orientadora: Profa. Ms. Francisca das Chagas Alves da Silva.

Bolsista do Programa Institucional de Bolsa de Iniciação à Docência - PBID (2010 - 2011).

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalhos publicados e/ou submetidos a periódicos indexados:

FEITOSA, C. M.; SILVA, R. V.; MATOS, J. M. E.; ARAÚJO, L. S. Compostos oriundos de plantas nordestinas com potencial antioxidante. In: FEITOSA, C. M. (Orgs.). **Antioxidantes: aspectos químicos, farmacológicos e terapêuticos**. Campinas-SP: Átomo, 2017. p. 55-64.

JÚNIOR, J. S. C.; SILVA, R. V.; FEITOSA, C.M.; FIGUERÊDO, J. S. Produtos naturais no combate ao mosquito *Aedes aegypti*. In: FEITOSA, C. M.; BARROS, V. M. **Óleos fixos e seus constituintes como fontes de formulações inseticidas e repelentes**. Campinas-SP: Átomo, 2019. p. 133-149.

Apresentações de trabalho

SILVA, R. V.; FEITOSA, C. M. Uso de plantas como repelentes do mosquito *Aedes aegypti*: revisão bibliográfica. In: I Workshop da Pós-Graduação em Química, "Energia, Cidadania e Sustentabilidade", 2016, Teresina-PI. I Workshop da Pós-Graduação em Química, "Energia, Cidadania e Sustentabilidade", 2016.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

I Workshop da Pós-Graduação em Química, "Energia, Cidadania e Sustentabilidade", 2016, Teresina-PI. Carga horária: 20 h.

Semana Nacional da Ciência e Tecnologia (SNCT), 2018, Araraquara-SP. 18 e 20 de outubro de 2018.

Workshop do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), 2019, São Pedro-SP. 16 a 18 de agosto de 2019.

IV Semana Nacional de Ciência e Tecnologia e III Seminário de Iniciação Científica - IFMA, 2021, Presidente Dutra-MA. 20 e 21 de outubro de 2021.

XXXIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp - IQ/ Araraquara, 2021, Araraquara-SP. 28 e 29 de outubro de 2021 (AVALIADOR).

XII Workshop de Quimiometria, 2021, Feira de Santana-BA. 08 e 09 de novembro de 2021.

8th Brazilian Conference on Natural Products (BCNP) and XXXIV Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (RESEM), 2021, Goiânia-GO. 09 a 12 de novembro de 2021.

51ª Semana da Química, 2021, Araraquara-SP. 22 a 27 de novembro de 2021.

2º Simpósio Regional Sudeste de Farmacognosia, 2022, Penedo-RJ. 27 a 30 de abril 2022.

Outras atividades

Curso de extensão universitária em "Mediação Pedagógica na Educação a Distância" da Universidade Virtual do Estado de São Paulo (UNIVESP), 2019. Carga horária: 40 h.

Cursos de extensão universitária em "Ensino e Aprendizagem Colaborativos na Educação A Distância" da Universidade Virtual do Estado de São Paulo (UNIVESP), 2019. Carga horária: 120 h.

A minha família, minha avó partena (Catarina) e meu avô materno (Chico) (in memoriam) que nunca me deixaram desaminar nos momentos que quase sucumbi.

AGRADECIMENTOS

Antes de qualquer outro, devo honrarias e glórias ao meu Senhor **Deus**, porque com toda certeza, foi quem me proporcionou a oportunidade de cursar uma pós-graduação de alto nível no Brasil e no mundo, fazendo parte de uma instituição que tenho orgulho de ter conseguido tal formação. Além de ser minha fortaleza, concebendo-me muita saúde, força de vontade, coragem, calma e paciência nos momentos mais difíceis nos quais atravessei nessa jornada.

A minha amada mãe **Maria Helena Viana da Silva**, a qual tenho infinito orgulho, gratidão e admiração por sempre acreditar no potencial de cada um de nós, e nunca nos deixar desacreditar em dias melhores por meio do estudo e educação. Sei que o seu esforço foi grande, as dificuldades foram muitas, mas tenho muita satisfação em poder deixá-la realizada com mais essa vitória.

Ao meu pai **José Bento Rodrigues da Silva**, que mais que um pai, é o meu melhor amigo, com quem converso, brinco, aconselho e sou aconselhado, e que apesar da saúde fragilizada, sempre está presente, seja numa simples conversa por telefone seja numa viagem de carro pelo mundo a fora. Também tenho muito orgulho de ser seu filho pai, essa conquista também é sua.

A orientadora, **Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Siqueira Silva**, pelo acolhimento, confiança, apoio e acreditar em mim desde o primeiro e-mail trocado, e ter aceito o convite. A serenidade nos ensinamentos, orientações, e discussões que vão além do contexto acadêmico, reforçam que ter você como orientadora foi a melhor oportunidade que eu poderia ter e conseguir vencer esse desafio. Muito Obrigado!

A co-orientadora, **Prof^a. Dr^a. Teresinha de Jesus Aguiar dos Santos Andrade**, pelo apoio e colaboração que foram de suma importância, principalmente, ao mostrar o “caminho da pedras” para melhor aproveitamento dos dados.

A minha irmã, **Marylane Viana da Silva**, pelo apoio, motivação e ser um espelho profissional, pessoal e acadêmico que tenho a sorte de acompanhar e seguir os passos.

A meu irmão, **Samuel Viana da Silva**, exemplo de hombridade que sempre está disponível para todos os momentos, e que também é um entusiasta da realização profissional por meio do estudo.

A minha namorada/ noiva/ esposa, **Luciene Alves Viana Linhares**, a qual superou comigo todas as fases de relacionamento, distância, viagens, solidão,

saudade, mas nunca deixou de me apoiar, motivar-me nos momentos mais difíceis e me fortalecer com seus incentivos e palavras de afeto, carinho e amor.

Aos meus familiares: tias **Nazeré, Bianca e Edilsa** que sempre manifestaram-se com carinho e positividade, tios **Roque, Bernardo e José** que junto com os primos proporcionaram momentos de distração, avós maternos **Maria de Lourdes – “Paquinha” e Francisco – “Chico”** (último *in memorian*) pela receptividade, conversas, conselhos e ensinamentos de vida que sempre levarei comigo, avó paterna **Catarina** (*in memorian*) que me mostrou a simplicidade e a leveza de encarar as situações.

As minhas sobrinhas, **Augusta e Analice** por renovar as esperanças de que que no final as coisas se encaixam e tudo dar certo!

Ao meu cunhado **Albino** e cunhada **Mônica** pelo apoio e incentivo.

Aos amigos de graduação **Felipe, Assis e Samuel** pelas sugestões, incentivo e amizade.

Aos amigos de laboratório, estudo e grupo de pesquisa **Iatã, Rebeca, Alana, Vitor, Givaldo, Lucas, Edelson, Adriely, Ana Leticia, Helena, Tony, Maria do Carmo, Camila Cunha, Mayara, Gabriela, Rafael Vieira, Marcus, Henrique** entre tantos outros que no momento não estou recordando.

Aos técnicos de laboratório, **João, Juliana e Nivaldo** pelo apoio constante, paciência e ensinamentos compartilhados.

Aos amigos do futebol em especial, **Rafael, Renan, Wesley, Guilherme, Túlio, José, Cassamo, Cauê, Gustavo**.

A todos os funcionários e funcionárias do IQ, que sempre se mostraram bastante solícitos em ajudar no que fosse preciso.

Agradecer também a FAPEMA (BD-02328/21) pelo apoio e incentivo.

Aos professores colaboradores!

Enfim, só tenho a agradecer a todos que de alguma forma me ajudaram a tornar esse momento possível, realizado, e me fizeram amadurecer como ser humano, profissional e pesquisador!

E se cheguei até aqui, foi porque me apoie no ombro dos gigantes”
(Isaac Newton)

*“Bom mesmo é ir a luta com determinação,
abraçar a vida com paixão,
perder com classe, e vencer com ousadia,
porque o mundo pertence a quem se atreve
e a vida é muito para ser insignificante.”*
(Augusto Branco)

RESUMO

O fungo endofítico *Hypoxylon monticulosum* pertence a família Hypoxylaceae, e constitui-se como uma espécie amplamente distribuída no ambiente marinho e terrestre, possuindo uma grande variedade de compostos bioativos com atividade citotóxica, antimicrobiana e antifúngica. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo descrever o perfil químico e biológico do fungo endofítico *Hypoxylon monticulosum* associado à alga marinha *Acanthophora spicifera*, a partir da análise do perfil químico nos diferentes meios de cultivo (MBD, Malte, Czapeck e Arroz), tipo de água (Ultrapura e água do mar), além do isolamento, anotação estrutural e caracterização de substâncias produzidas por este fungo, bem como otimizar as condições de cultivo por meio de um planejamento fatorial completo 2^3 e Delineamento por Composto Central Rotacional (DCCR), usando como variáveis temperatura (X_1), tempo de fermentação (X_2) e luminosidade (X_3), a fim de buscar o maior número de compostos produzidos, além de avaliar a bioatividade dos extratos. Após análise dos perfis químicos, o meio MBD em água do mar foi eleito para as demais abordagens, onde no planejamento fatorial completo 2^3 todas as variáveis apresentaram-se estatisticamente significativas para a resposta escolhida, levando à otimização na condição cuja temperatura foi 25 °C, tempo de fermentação de 21 dias e luminosidade de 12 horas. Os extratos obtidos nos ensaios do planejamento fatorial completo foram analisados por CLAE-DAD-EM, e os dados espectrais foram confrontados com a biblioteca do GNPS, no qual foi gerado o *Classical Molecular Networking*, e com auxílio da ferramenta *in silico* MolNetEnhancer foi possível diagnosticar as principais classes de metabólitos nesses extratos, destacando os alcaloides como majoritários, além de serem anotados o aurapteno, e um *cluster* representativo de ácidos graxos insaturados. Nos ensaios biológicos, os extratos brutos do planejamento de experimentos e da curva de crescimento fúngico, mostraram-se satisfatórios, com destaque a atividade citotóxica frente a linhagem de carcinoma de colorretal (HCT-116) no ensaio com temperatura de 25°C, tempo de fermentação de 21 dias e luminosidade de 2 horas, e da curva de crescimento com 21 dias de fermentação para concentração de 5 µg/mL, e ensaios com temperatura de 30°C, tempo de fermentação de 14 dias e luminosidade de 18 horas, além do ensaio com temperatura de 25°C, tempo de fermentação de 21 dias e luminosidade de 21 horas na concentração de 50 µg/mL. O extrato bruto na condição otimizada foi particionado e as frações resultantes submetidas a estudo químico por CLAE-DAD, CLAE-DAD-EM e RMN ^1H . A fração aquosa (F_{aq2}) forneceu a substância **S01** conhecida como diidroesporotriolídeo, e a fração acetonitrila (F_{ACN}) forneceu a substância **S02**, supostamente, estrutura nova. Portanto, os resultados obtidos nesse trabalho ressaltam a importância da investigação dos microrganismos marinhos nas suas diversas formas de cultivo, bem como os fatores que influenciam tanto a produção metabólica como a bioatividade.

Palavras-chave: Fungos endofíticos *Hypoxylon* sp., Planejamento de experimentos, Produtos naturais, Algas vermelhas, Quimiometria.

ABSTRACT

The endophytic fungus *Hypoxylon monticulosum* belongs to the family Hypoxylaceae, and constitutes a species widely distributed in the marine and terrestrial environment, having a wide variety of bioactive compounds with cytotoxic, antimicrobial and antifungal activity. Therefore, this study aimed to describe the chemical and biological profile of the endophytic fungus *Hypoxylon monticulosum* associated with the seaweed *Acanthophora spicifera*, based on the analysis of the chemical profile in different culture media (MBD, Malt, Czapeck and Rice), type of water (Ultrapure and seawater), in addition to the isolation, structural annotation and characterization of substances produced by this fungus, as well as optimizing the cultivation conditions through a complete factorial design 2^3 and Rotational Central Compound Design (DCCR), using as variables temperature (X_1), fermentation time (X_2) and luminosity (X_3), in order to search for the largest number of compounds produced, in addition to evaluating the bioactivity of the extracts. After analyzing the chemical profiles, the MBD medium in seawater was chosen for the other approaches, where in the complete factorial design 2^3 all variables were statically significant for the chosen response, leading to optimization in the condition whose temperature was 25 °C, fermentation time of 21 days and luminosity of 12 hours. The extracts obtained in the tests of the complete factorial design were analyzed by HPLC-DAD-EM, and the spectral data were confronted with the GNPS library, in which the *Classical Molecular Networking* was generated, and with the aid of the in silico tool MolNetEnhancer it was possible to diagnose the main classes of metabolites in these extracts, highlighting the alkaloids as the majority, in addition to aurapten, and a representative cluster of unsaturated fatty acids. In the biological assays, the crude extracts from the experimental design and from the fungal growth curve were satisfactory, with emphasis on the cytotoxic activity against the colorectal carcinoma lineage (HCT-116) in the assay with a temperature of 25°C, fermentation time 21 days and 2 hours luminosity, and the growth curve with 21 days of fermentation for a concentration of 5 µg/mL, and tests with a temperature of 30°C, fermentation time of 14 days and 18 hours brightness, in addition to the test with temperature of 25°C, fermentation time of 21 days and luminosity of 21 hours at a concentration of 50 µg/mL. The crude extract in the optimized condition was partitioned and the resulting fractions subjected to chemical study by HPLC-DAD, HPLC-DAD-MS and ^1H NMR. The aqueous fraction (Faq2) provided the substance **S01** known as dihydrosporotriolide, and the acetonitrile fraction (FACN) provided the substance **S02**, supposedly a new structure. Therefore, the results obtained in this work emphasize the importance of investigating marine microorganisms in their various forms of cultivation, as well as the factors that influence both metabolic production and bioactivity.

Keywords: Endophytic fungi *Hypoxylon* sp., Design of experiments, Natural products, Red algae, Chemometrics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplos de fármacos derivados de produtos naturais	28
Figura 2: Classificação de medicamentos aprovados pelo FDA em 2018 de acordo com a estrutura química	29
Figura 3: Principais medicamentos aprovados pelo FDA em 2018 derivados de produtos naturais.....	30
Figura 4: Total de novos fármacos aprovados entre janeiro/1981 a setembro/19	31
Figura 5: Fórmula estrutural de alguns Produtos Naturais Marinhos.....	34
Figura 6: Metabólitos secundários de algas marinhas.....	37
Figura 7: Principais metabólitos secundários isolados da alga <i>Acanthophora spicifera</i>	39
Figura 8: Exemplos de produtos naturais isolados de fungos endofíticos	41
Figura 9: Tendência de descoberta de produtos naturais marinhos.....	42
Figura 10: Metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos de algas marinhas	43
Figura 11: Exemplos de alguns metabólitos secundários isolados de fungos do gênero <i>Hypoxylon</i>	48
Figura 12: Metabólitos secundários isolados da espécie <i>Hypoxylon monticulosum</i> .	51
Figura 13: Metabólitos secundários isolados do gênero <i>Annulohypoxylon</i>	53
Figura 14: Fluxograma para metabolismo secundário baseado em OSMAC	57
Figura 15: Metodologia de esterilização, isolamento e purificação dos endófitos	67
Figura 16: Perfil cromatográfico em gradiente exploratório do extrato bruto de AS-02 em condições otimizadas (254 nm).....	75
Figura 17: Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos; modo analítico) do extrato bruto de AS-02 fase aquosa (F _{aq}) (254 nm)	75
Figura 18: Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% ACN:H ₂ O v/v a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos; modo analítico) do extrato bruto de AS-02 fase acetonitrila (F _{ACN}) (254 nm)	76
Figura 19: Cromatograma em escala semi-preparativa por CLAE-DAD da fração de fase aquosa AS-02-F _{aq} (254 nm).....	77
Figura 20: Cromatograma em escala semi-preparativa por CLAE-DAD da fase acetonitrila de AS-02-F _{ACN} (254 nm)	78

Figura 21: Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos; modo analítico) dos extratos brutos de AS-01 na água do mar variando o meios de cultivo (254 nm). Azul escuro (arroz), Vermelho (Czapek), Verde (malte), Preto (PDB)	89
Figura 22: Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos; modo analítico) dos extratos brutos de AS-01 na água ultra pura variando o meios de cultivo (254 nm). Azul escuro (arroz), Vermelho (Czapek), Verde (malte), Preto (PDB)	89
Figura 23: Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos; modo analítico) dos extratos brutos de AS-02 na água do mar variando o meios de cultivo (254 nm). Azul escuro (arroz), Vermelho (Czapek), Verde (malte), Preto (PDB)	89
Figura 24: Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos; modo analítico) dos extratos brutos de AS-09 na água ultra pura variando o meios de cultivo (254 nm). Azul escuro (arroz), Vermelho (Czapek), Verde (malte), Preto (PDB)	90
Figura 25: Espectros de RMN de ¹ H de AS-01 variando o meio de cultura e permanecendo água do Mar (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 300 MHz)	90
Figura 26: Espectros de RMN de ¹ H de AS-01 variando o meio de cultura e permanecendo água ultrapura (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 300 MHz)	91
Figura 27: Espectros de RMN de ¹ H de AS-02 variando o meio de cultura e permanecendo água do Mar (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 300 MHz)	91
Figura 28: Espectros de RMN de ¹ H de AS-09 variando o meio de cultura e permanecendo água ultrapura (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 300 MHz)	92
Figura 29: Cromatograma obtido por CG-EM de AS-01	92
Figura 30: Cromatograma obtido por CG-EM de AS-02	93
Figura 31: Gráfico teórico da curva de crescimento de um fungo filamentosos	97
Figura 32: Curva de crescimento com os valores do logaritmo neperiano (Ln) do fungo <i>H. monticulosum</i> em MDB, água do mar, temperatura 25°C e modo estático, por 07, 14, 21, 28 e 35 dias, método peso seco	98
Figura 33: Curva de crescimento do fungo <i>H. monticulosum</i> em MDB, água do mar, temperatura 25°C e modo estático, por 07, 14, 21, 28 e 35 dias	99

Figura 34: Perfil cromatográfico em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H ₂ O v/v a 1 mL.min ⁻¹ ; 40 minutos; modo analítico) dos extratos brutos obtidos com 07 (vermelho), 14 (marrom), 21 (preto), 28 (rosa) e 35 (cinza) dias de crescimento da espécie <i>H. monticulosum</i>	99
Figura 35: Diagrama de Pareto com as variáveis de regressão em ordem crescente de importância de acordo com o Planejamento Fatorial Completo 2 ³	106
Figura 36: Dados observados dos valores preditos para a resposta número de picos cromatográficos.....	108
Figura 37: Diagrama de Pareto com as variáveis de regressão em ordem crescente de importância de acordo com o DCCR.....	111
Figura 38: Valores observados pelos valores preditos para a resposta número de picos cromatográficos DCCR	113
Figura 39: Superfície de resposta (a) e Mapa de contorno (b) para o aumento do número de picos cromatográficos em função da temperatura e tempo de fermentação do fungo <i>H. monticulosum</i>	114
Figura 40: Estruturas químicas dos extrólitos produzidos por <i>T. albobiverticillus</i> a temperatura de 24°C	116
Figura 41: Superfície de resposta (c) e Mapa de contorno (d) para o aumento do número de picos cromatográficos em função da temperatura e luminosidade do fungo <i>H. monticulosum</i>	117
Figura 42: Classes químicas de produtos naturais anotadas para os clusters do <i>Molecular Networking</i> através da ferramenta MolNetEnhancer, visualizada no Cytoscape	120
Figura 43: Representação da rede de interações moleculares obtida para os extratos avaliados a partir do Planejamento Fatorial completo 2 ³ para o fungo <i>H. monticulosum</i>	122
Figura 44: Produção de Aurapteno por <i>H. monticulosum</i> observada através da rede molecular e comparação do espectro de massas	123
Figura 45: Produção de ácidos graxos insaturados e aaptmina por <i>H. monticulosum</i> observada através da rede molecular	124
Figura 46: Comparação dos espectros de massas da plataforma GNPS com o experimento do composto ácido 12(13)-epóxi-9Z-octadecenoico	125
Figura 47: Comparação dos espectros de massas da plataforma GNPS com o experimento do composto ácido (Z)-2-octilpent-2-enodioico.....	126

Figura 48: Comparação dos espectros de massas da plataforma GNPS com o experimento do composto aptamina no modo positivo.....	127
Figura 49: Produção de haplamina por <i>H. monticulosum</i> observada na rede molecular e comparação dos espectros de massas.....	128
Figura 50: Gráfico dos resultados do ensaio de triagem para AChEe para cada extrato	131
Figura 51: Gráfico dos resultados do ensaio de triagem para BChEh para cada extrato	132
Figura 52: Gráfico dos resultados do ensaio de triagem para KLK-Shp-NHS para cada extrato.....	133
Figura 53: Porcentagem de inibição dos extratos brutos de <i>H. monticulosum</i> frente crescimento celular da linhagem de carcinoma colorretal (HCT-116)	134
Figura 54: Bioensaio <i>in vitro</i> de viabilidade das amostras obtidas a partir de <i>H. monticulosum</i> denominadas (A, B, C, D, E, F, 7, 14, 21, 28 e 35) sobre juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> , após 48 horas de exposição. Controle negativo (C-) dH ₂ O; Controle positivo (C+) álcool - EtOH 70% e Controle interno DMSO 1%	136
Figura 55: Espectro no UV-Vis da substância S01	138
Figura 56: Espectro de massas de baixa resolução da substância S01 , modo negativo.....	138
Figura 57: Espectro de RMN de ¹ H de S01 (DMSO- <i>d</i> ₆ 600 MHz)	141
Figura 58: Mapa de contorno de HSQC da substância S01 (DMSO- <i>d</i> ₆ 150 MHz). 142	
Figura 59: Mapa de contorno de HMBC da substância S01 (DMSO- <i>d</i> ₆ 150 MHz). 143	
Figura 60: Espectro UV-Vis da substância S02	144
Figura 61: Espectro de RMN de ¹ H de S02 (DMSO- <i>d</i> ₆ 600 MHz)	147
Figura 62: Mapa de contorno de HSQC da substância S02 (DMSO- <i>d</i> ₆ 150 MHz) 148	
Figura 63: Mapa de contorno de COSY da substância S02 (DMSO- <i>d</i> ₆ 600 MHz) . 149	
Figura 64: Mapa de contorno de HMBC da substância S02 (DMSO- <i>d</i> ₆ 150 MHz). 150	
Figura 65: Espectro de massas da substância S02 modo positivo.....	151

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Obtenção dos extratos brutos das cepas fúngicas cultivadas em meio líquido (MDB, Malte e Czapeck)	69
Esquema 2: Obtenção dos extratos brutos das cepas fúngicas cultivadas em meio sólido (arroz)	70
Esquema 3: Fracionamento dos extratos brutos das cepas fúngicas cultivadas em meio sólido (arroz).....	70
Esquema 4: Isolamento dos metabólitos da fração AS-02-F _{aq4} produzidos por <i>H. monticulosum</i>	77
Esquema 5: Isolamento dos metabólitos da fração acetonitrila (F _{ACN}) produzidos por <i>H. monticulosum</i>	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Meios de cultivo utilizados para cultivo dos fungos endofíticos	62
Tabela 2: Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 para uma maior produção metabólica do fungo <i>H. monticulosum</i>	72
Tabela 3: Matriz do DCCR para otimização da produção metabólica do fungo <i>H. monticulosum</i>	73
Tabela 4: Fracionamento da fase aquosa do extrato bruto de AS-02 por cromatografia em coluna com sílica derivatizada C-18	76
Tabela 5: Extratos de AS-02 e respectivos códigos.....	79
Tabela 6: Massa de cada extrato bruto obtido a partir da variação de meio de cultivo das linhagens fúngicas AS-01, AS-02 e AS-09, em escala reduzida	86
Tabela 7: Frações obtidas a partir da extração líquido-líquido dos extratos brutos AS-01-A-Mar, AS-01-A-MQ, AS-02-A-Mar e AS-09-A-MQ.....	87
Tabela 8: Identificação das substâncias presentes em AS-01 por CG-EM e comparação com os índices de retenção calculados com os da literatura*.	93
Tabela 9: Identificação das substâncias presentes em AS-02 por CG-EM e comparação com os índices de retenção calculados com os da literatura*.	93
Tabela 10: Respostas do planejamento fatorial completo 2^3 para uma maior produção metabólica do fungo <i>H. monticulosum</i>	103
Tabela 11: Efeitos estimados e coeficientes de regressão dos parâmetros analisados e os erros padrão correspondentes para o número de picos cromatográficos pelo Planejamento Fatorial Completo 2^3 com o fungo <i>H. monticulosum</i>	105
Tabela 12: Análise de Variância do modelo com o Planejamento Fatorial Completo 2^3 para o número de picos cromatográficos	107
Tabela 13: Matriz do DCCR para otimização da produção metabólica do fungo <i>H. monticulosum</i>	109
Tabela 14: Efeitos estimados e coeficientes de regressão dos parâmetros analisados e os erros padrão correspondentes para o número de picos cromatográficos pelo DCCR com o fungo <i>H. monticulosum</i>	110
Tabela 15: Análise de Variância do modelo com DCCR para o número de picos cromatográficos.....	112
Tabela 16: Resultado da triagem antibacteriana dos extratos brutos	130

Tabela 17: Porcentagem de inibição dos extratos brutos de <i>H. monticulosum</i> frente ao crescimento celular da linhagem de carcinoma colorretal (HCT-116) na concentrações de 5µg/mL e 50 µg/mL (média ± SEM) (n=2).....	135
Tabela 18: Dados de RMN de ¹ H (600 MHz) e ¹³ C (150 MHz) da substância S01 .	140
Tabela 19: Dados de RMN de ¹ H (600 MHz) e ¹³ C (150 MHz) da substância S02 .	145

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Φ	Diâmetro
δ_H	Deslocamento químico de 1H (em ppm)
δ_C	Deslocamento químico de ^{13}C (em ppm)
AAS	Ácido Acetil Salicílico
AChE	Enzima Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina Trifosfato
BChE	Enzima Butirilcolinesterase
BDA	Batata Dextrose Ágar
C-18	Sílica gel de fase reversa tipo octadecil silano
CC	Cromatografia em Coluna
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
d	Dubleto
DAD	Detector Arranjo de Diodos
ddd	Duplo Duplo Dubleto
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EI	Impacto de Elétrons
ESI	Ionização por Eletrospray
EtOH	Etanol
eV	Elétron volt
FAc	Fração acetato de etila
FACN	Fração acetonitrila
FAq	Fração aquosa
FDA	Food and Drug Administration
FHex	Fração Hexânica
GNPS	Global Natural Products Social Molecular Networking
HCT-116	Linhagem de células de adenocarcinoma de cólon humano

HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation - Correlação heteronuclear a múltiplas ligações ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation - Correlação heteronuclear a uma ligação ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$)
IC ₅₀	Concentração Inibitória
IR _{calc.}	Índice de retenção calculado de acordo com a equação de Van den Dool and Kratz
IR _{lit.}	Índice de retenção descrito na literatura de acordo com a equação de Van den Dool and Kratz
IT	Ion Trap
ITS	Internal Transcribed Spacer - Espaçador transcrito interno
<i>J</i>	Constante de acoplamento
KLK	Enzima calicreína
Ln	Logaritmo Neperiano
m	Multiplete
MDB	Meio Batata Dextrose
MHCA	Caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado
min.	Minutos
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
MQEP	Média Quadrática do Erro Puro
MQFA	Média Quadrática da Falta de Ajuste
MQ _R	Média Quadrática da Regressão
MQ _r	Média Quadrática do Resíduo
<i>m/z</i>	relação massa/carga
NAP	Networking Annotation Propagation
OSMAC	One Strain Many Compounds
PC	Ponto Central
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNM's	Produtos Naturais Marinhos
ppm	Partes por milhão
Q-TOF	Analisador quadrupolo tempo de voo
RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
UV	Espectroscopia Ultra-violeta
R ²	Coeficiente de correlação

s	Singleto
SQ_r	Soma Quadrática Residual
SQ_R	Soma Quadrática da Regressão
SQ_T	Soma Quadrática Total
t	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
T	Tesla

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 BREVE HISTÓRICO DOS PRODUTOS NATURAIS	25
1.2 ORGANISMOS E MICRORGANISMOS MARINHOS COMO FONTE DE PRODUTOS NATURAIS	31
1.2.1 Algas marinhas	36
1.2.1.1 <i>Algas Rhodophytas</i>	38
1.2.1.1.1 <i>A macroalga Acanthophora spicifera</i>	38
1.2.2 Endófitos: uma rica fonte de metabólitos funcionais	39
1.3 DIFERENÇAS ENTRE PRODUTOS NATURAIS MICROBIANOS MARINHOS E SEUS HOMÓLOGOS TERRESTRES	44
1.4 FUNGOS DA FAMÍLIA HYPOXYLACEAE	45
1.4.1 Gênero <i>Hypoxylon</i>	46
1.4.1.1 <i>A espécie Hypoxylon monticulosum</i>	50
1.4.2 Gênero <i>Annulohypoxylon</i>	52
1.5 AVANÇOS RECENTES NA DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS NATURAIS MICROBIANOS MARINHOS	55
1.5.1 Variação das condições de cultivo de microrganismos – One Strain Many Compounds (OSMAC)	56
1.5.2 Quimiometria e Planejamento Fatorial Completo (2³)	58
1.5.3 Molecular Networking e plataforma GNPS	59
2 OBJETIVOS	61
2.1 GERAL	61
2.2 ESPECÍFICOS	61
3 PARTE EXPERIMENTAL	62
3.1 MATERIAIS	62
3.1.1 Meio de cultivo	62
3.1.2 Solventes gerais	62
3.1.3 Equipamentos gerais para o desenvolvimento do projeto	62
3.1.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)	63
3.1.5 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN de ¹H e ¹³C)	64

3.1.6 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas.....	64
3.1.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM).....	65
3.2 MÉTODOS	66
3.2.1 Seleção e coleta da macroalga.....	66
3.2.2 Obtenção e cultivo do endófito	66
3.2.3 Identificação dos fungos <i>H. monticulosum</i> e <i>A. stygium</i>	67
3.2.4 Obtenção dos extratos brutos dos fungos endofíticos em escala reduzida	69
3.2.5 Construção da curva de crescimento do endófito <i>H. monticulosum</i> (AS-02) para o Planejamento Fatorial Completo 2^3	71
3.2.6 Planejamento Fatorial Completo (2^3) e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	71
3.2.7 Dados da Rede de Interações Moleculares (<i>Molecular Networking</i>).....	73
3.2.8 Obtenção do extrato bruto otimizado de <i>H. monticulosum</i> em escala ampliada.....	74
3.2.8.1 Fracionamento do extrato bruto em condições otimizadas.....	74
3.2.8.1.1 Estudo da fração AS-02 F _{aq4}	76
3.2.8.1.2 Estudo da fração AS-02 F _{ACN}	78
3.2.9 Atividades Biológicas	79
3.2.9.1 Avaliação do potencial antimicrobiano	80
3.2.9.2 Triagem pontual de inibidores para as enzimas calicreína (KLK) e acetilcolinesterases (AChE e BChE)	80
3.2.9.2.1 Ensaio de ligantes com os biorreatores AChE _{ee} e ABChE _{hu}	81
3.2.9.2.2 Ensaio de inibição pontual a 100 μ M.....	81
3.2.9.2.3 Ensaio ligantes com KLK-Shp-NHS.....	82
3.2.9.3 Avaliação da atividade antitumoral (Citotoxicidade)	82
3.2.9.4 Bioensaio <i>in vitro</i> de nematotoxicidade	83
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
CAPÍTULO 1: PROSPECÇÃO QUÍMICA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>A. spicifera</i>	86
4.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS EM ESCALA REDUZIDA	86
4.1.1 Avaliação dos perfis químicos dos extratos brutos.....	88

CAPÍTULO 2: PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL NA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO METABÓLICA DE <i>H. monticulosum</i>	94
4.2 ESCOLHA DAS VARIÁVEIS E RESPOSTA	95
4.2.1 Temperatura	95
4.2.2 Tempode fermentação (Curva de crescimento)	96
4.2.3 Luminosidade	100
4.2.4 Resposta (Número de picos ou Bandas cromatográficas)	101
4.3 PLANEJAMENTO FATORAL COMPLETO (2 ³)	102
4.3.1 Significância Estatística das Variáveis Independentes	104
4.3.2 Análise de Variância do Modelo Estatístico do Planejamento Fatorial Completo	106
4.4 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) E METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR)	109
4.4.1 Análise da Superfície de Resposta	113
CAPÍTULO 3: ANOTAÇÕES DA REDE DE INTERAÇÕES MOLECULARES DA PLATAFORMA GNPS	119
CAPÍTULO 4: PERFIL BIOLÓGICO DOS EXTRATOS	129
4.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO	129
4.6 TRIAGEM PONTUAL DE INIBIDORES PARA AS ENZIMAS CALICREÍNA (KLK) E ACETILCOLINESTERASES (AChE e BChE)	131
4.6.1 Triagem de inibidores da acetilcolinesterase	131
4.6.2 Triagem de inibidores da calicreína (KLK)	133
4.7 ENSAIO ANTITUMORAL (CITOTOXICIDADE)	134
4.8 POTENCIAL NEMATICIDA	135
CAPÍTULO 5: ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS PRODUZIDAS POR <i>H. monticulosum</i> PELO MÉTODO OTIMIZADO	137
4.9 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA S01	137
4.10 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA S02	144
5 CONCLUSÃO	152
REFERÊNCIAS	154

1 INTRODUÇÃO

1.1 BREVE HISTÓRICO DOS PRODUTOS NATURAIS

A química de produtos naturais é o ramo mais antigo da química orgânica, tendo parte das suas bases teóricas definidas ainda nos tempos da alquimia, fato que tornou essa ciência bem estabelecida e consistente. O principal objeto de estudo da química de produtos naturais são os metabólitos secundários (produtos finais da expressão gênica), que constituem várias classes de compostos não essenciais para o crescimento, desenvolvimento ou reprodução dos seres vivos, mas que são capazes de auxiliar na sobrevivência dos mesmos, sendo uma fonte essencial bem sucedida de medicamentos obtidos de fontes naturais, principalmente, plantas, animais e microrganismos (DEWICK, 2009; BERLINCK, et al., 2017).

Essas substâncias são formadas por estruturas químicas complexas e orientação espacial definida, cuja produção, provavelmente, seja resultado de mecanismos de adaptação a um determinado ambiente, ou de defesa contra agentes patógenos, em que alguns constituintes podem ser únicos para grupos específicos de organismos, os quais são sintetizados para interagir estereosseletivamente com alvos biológicos, que os torna muito atrativos para a descoberta de novos fármacos (DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2015).

Historicamente, os produtos naturais têm sido amplamente utilizados há milhares de anos em muitas regiões do mundo, onde a humanidade sempre tem buscado na natureza atender às suas necessidades, tais como a cura de diversas doenças e alívio de dores por meio da ingestão de ervas e folhas, principalmente. Talvez esta tenha sido uma das primeiras formas de uso desses produtos, em que tais práticas foram registradas em compêndios e repassadas ao longo das gerações, motivo que tornou muito desses produtos candidatos a medicamentos atuais (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; RAO, et al., 2019).

Os primeiros registros que remontam o uso de produtos naturais derivados de plantas datam de aproximadamente 2600 a.C. em tábuas de argila, em escrita cuneiforme, feitas pelos sumérios na região da baixa Mesopotâmia, que relataram o emprego de quase 1000 substâncias derivadas de plantas, com destaque à óleos de *Cedrus* (Cedro), *Cupressus sempervirens* (Cipestre), *Glycyrrhiza glabra* (Alcaçuz),

Cominphora (Mirra) e *Papaver somniferum* (Papoula), amplamente utilizados no tratamento de infecções respiratórias, parasitárias e inflamação (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; CRAGG; NEWMAN, 2013; BERNARDINI, et al., 2017).

Ainda de acordo com os mesmos autores, outros documentos farmacêuticos muito importantes nesse período foram o Papiro de Ebers (aproximadamente 1550 a.C.), tratado médico egípcio mais conhecido na área farmacêutica, que demonstrou o uso de mais de 700 medicamentos, a maior parte de origem vegetal, com usos variados que vão desde gargarejos, infusões, pílulas e até mesmo pomadas; a Matéria Médica chinesa (1100 a.C.) que ganhou importante notoriedade ao longo dos séculos por documentar o uso de produtos naturais em mais de 1500 registros envolvendo prescrições e medicamentos, além do Sistema Ayurvédico indiano (1000 a.C.).

Também colaboraram para o avanço das práticas terapêuticas com produtos naturais, os gregos e romanos. Em 201 d.C., Galeno tido hoje como “Pai da Farmácia”, organizou os trabalhos de Dioscórides, considerado o fundador da Farmacognosia, em um sistema racional de terapias medicinais baseado em extratos de plantas e outros produtos naturais. Esse conhecimento ficou conhecido como sistema terapêutico greco-romano, que durante a Idade Média teve que ser preservado nos mosteiros da Inglaterra, França, Alemanha e Irlanda, principalmente, por conta da Santa Inquisição (NEWMAN; CRAGG, 2005).

Enquanto a Europa vivia um momento de poucos avanços na descoberta de propriedades terapêuticas de produtos naturais, os árabes consagraram o conhecimento greco-romano, complementando-o com recursos próprios, e juntamente com as ervas chinesas e indianas, tornaram-se os primeiros a introduzir farmácias particulares, tendo o ápice com a publicação do Cânone Medicinal por Avicenna (NEWMAN; CRAGG, 2013; BERNARDINI, et al., 2017).

Em suma, todo conhecimento produzido ao longo da história sobre produtos naturais formou a base da maioria dos medicamentos, seguidos de estudos clínicos, farmacológicos e químicos subsequentes. Sendo assim, um marco importante para a descoberta racional de medicamentos a partir de plantas foi o isolamento da morfina (**1**) em 1804 por Friederich Wilhelm Adam Setüner. A morfina tornou-se o primeiro metabólito secundário a ser comercializado pela empresa farmacêutica Merck em 1826, e foi muito utilizada durante a Segunda Guerra Mundial, bem como nos dias de hoje (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2014).

Após o isolamento da morfina, iniciou-se uma intensa busca na investigação de outros constituintes de ervas medicinais, como a quinina (2), que foi isolada em 1820 por Pelletier e Caventou ao estudarem as cascas secas de espécies de *Cinchona*, que eram comumente utilizadas no tratamento de alguns tipos de febre, inclusive a malária, e alguns tipos de câncer. O fato curioso que envolveu a quinina, é que somente em 2004 a *Food and Drugs Administration* (FDA) aprovou o uso como medicamento antimalárico (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Outro fato importante no isolamento de substâncias bioativas a partir de plantas foi a digitoxina (3), isolada em 1875 por Schmiedeberg a partir da flor de *Digitalis purpurea*, um glicosídeo cardiotônico usado para melhorar a contração cardíaca, especialmente em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva. Contudo, o exemplo mais famoso e conhecido até o momento de substância natural produzido por síntese orgânica é o ácido acetil salicílico (AAS) (4), obtido como derivado da salicina (5), um produto natural isolado das cascas do salgueiro *Salix alba*, que passou a ser comercializado em 1899 pela empresa farmacêutica Bayer (NEWMAN; CRAGG, 2013).

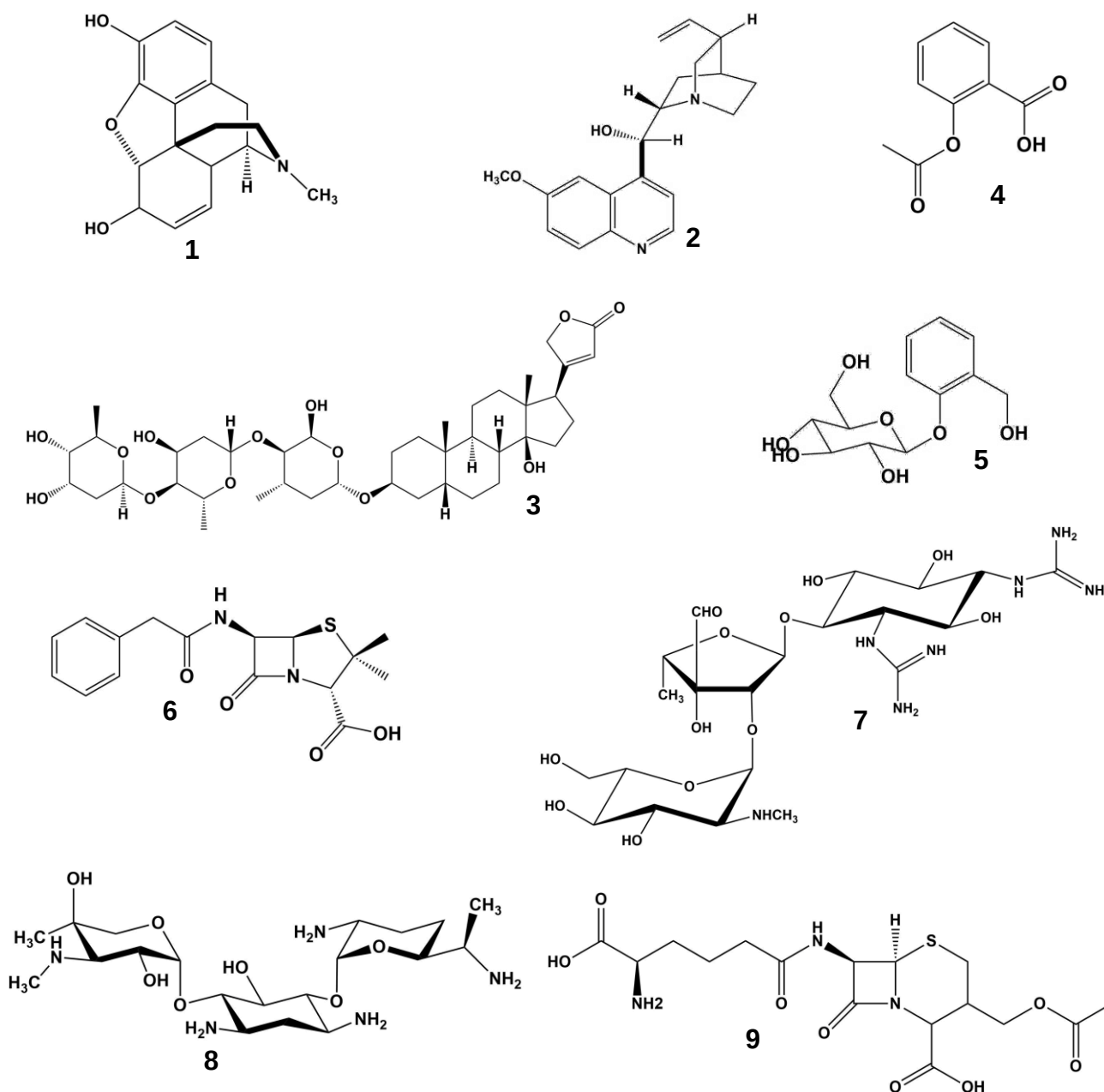
Ainda nesse contexto, no início do século XX, o desenvolvimento mais significativo em produtos naturais foi promovido por Fleming, que descobriu de maneira acidental o antibiótico penicilina G (6), isolada do fungo *Penicillium notatum*, amplamente comercializada nos dias de hoje. Esta descoberta fez com que a maioria das pesquisas científicas se voltasse para o isolamento de substâncias provenientes de fontes de microrganismos, fortalecendo a indústria farmacêutica, principalmente na busca de novos antibióticos como a estreptomicina (7), gentamicina (8), cefalosporina C (9), entre outros (BERNARDINI et al., 2017).

Por essa perspectiva, o mercado global de medicamentos tem crescido paulatinamente a cada ano, valendo cerca de 1,1 trilhões de dólares. Muito desse rendimento pode estar associado às substâncias obtidas direta ou indiretamente de produtos naturais, onde do total de medicamentos autorizados, 25% são oriundos de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais (CALIXTO, 2019).

Ainda de acordo com o mesmo autor, esses números apontam para um crescente interesse da indústria farmacêutica sobre esses recursos, os quais apresentam como principais vantagens, serem fontes de agentes terapêuticos seja como droga seja como fitoterápico, diversidade química abrangente, com estruturas complexas e definidas espacialmente, além de serem estereoespecíficas em alvos

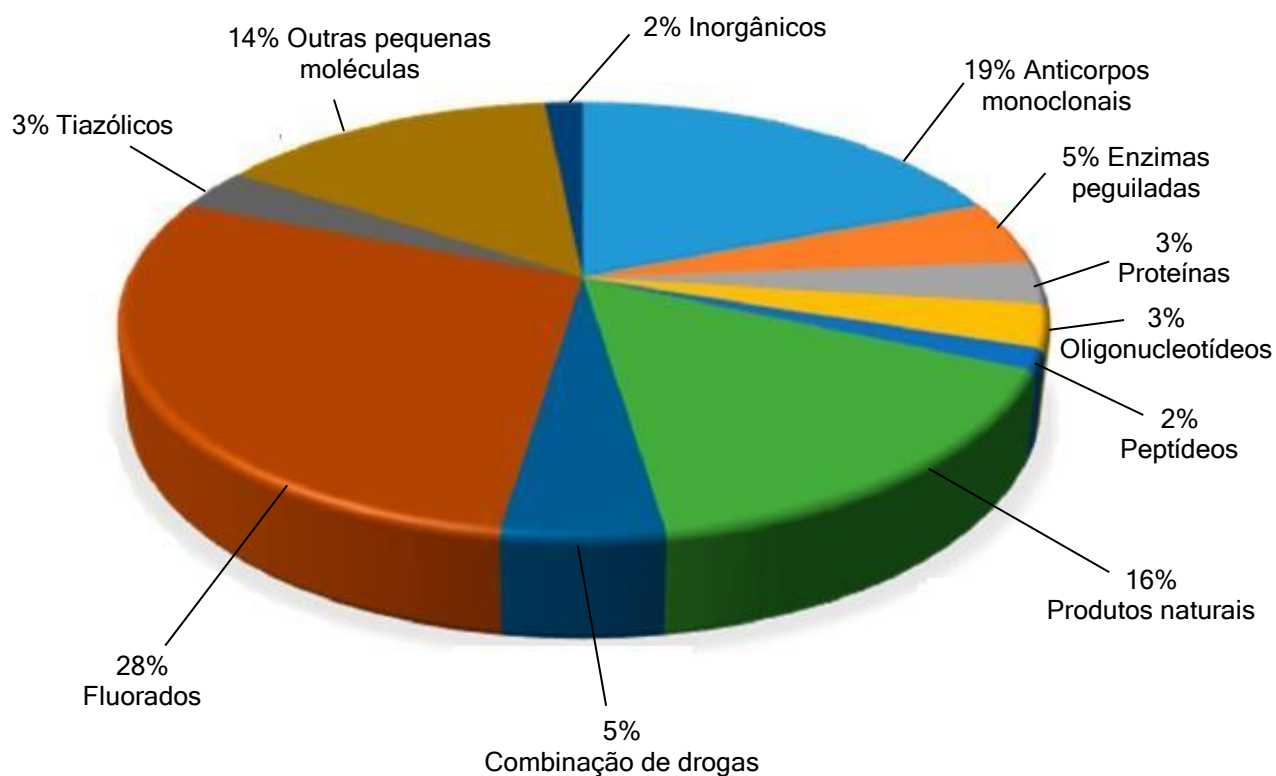
biológicos, que podem funcionar como marcadores taxonômicos de novos medicamentos.

Figura 1: Exemplos de fármacos derivados de produtos naturais ao longo da história.



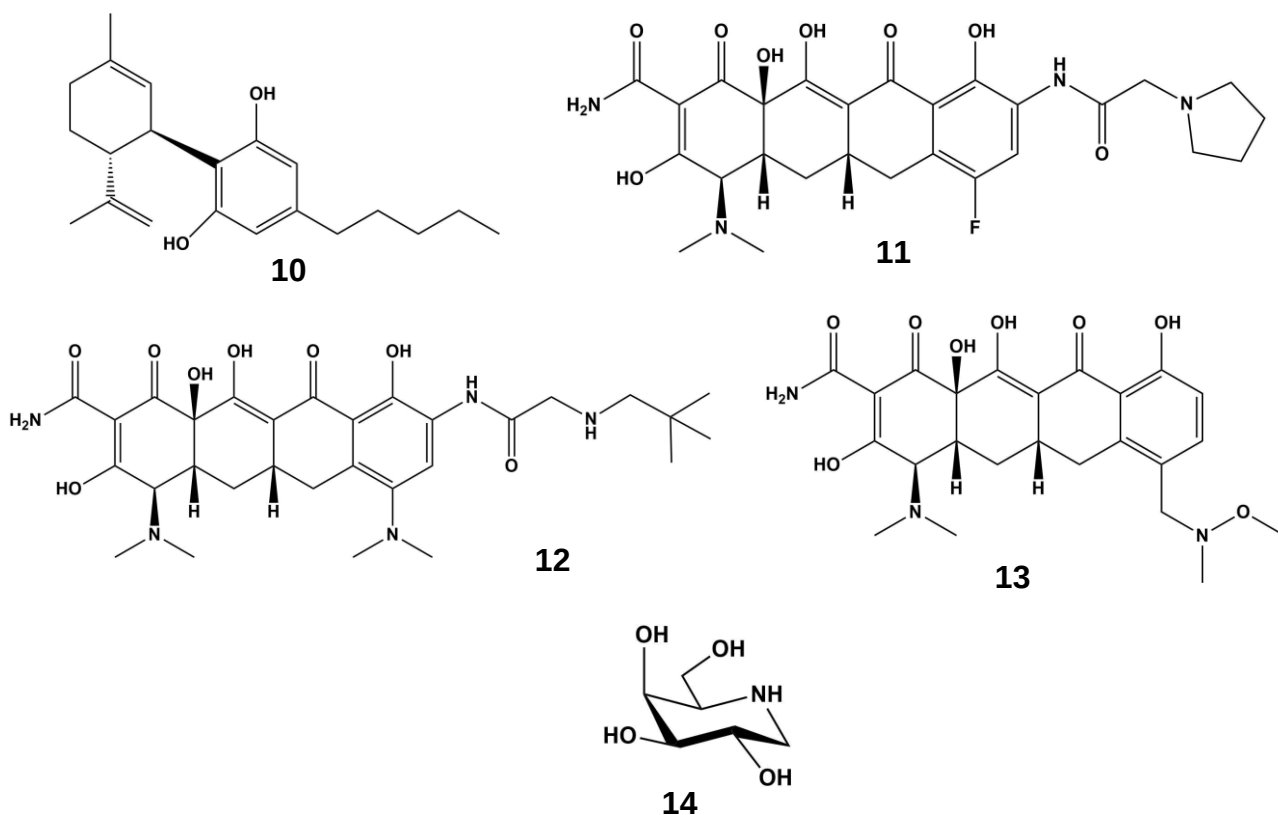
Em uma avaliação feita por Torre e Albericio (2019), em 2018, a FDA aprovou 59 novos medicamentos, distribuídos entre 42 novas entidades químicas e 17 biológicos, superando a marca de 53 medicamentos autorizados em 1996. Esses mesmos autores destacaram que do total de medicamentos aprovados, 16% tiveram estrutura química baseada em produtos naturais (**Figura 2**), com destaque ao canabidiol (Epidiolex™) (**10**), sendo o primeiro medicamento derivado da maconha aprovado para o tratamento das síndromes de Dravet e Lennox-Gastaut, associadas à formas graves de epilepsia infantil, três antibióticos de tetraciclina para várias doenças infecciosas, a eravaciclina (Xerava™) (**11**), omadaciclina (Nuzyra™) (**12**) e sareciclina (Seysara™) (**13**), além de um iminoaçúcar de estereoquímica semelhante a D-galactose por nome migalastat (Galafold™) (**14**) indicada no tratamento da doença de Fabry. .

Figura 2: Classificação dos medicamentos aprovados pelo FDA em 2018 de acordo com a estrutura química.



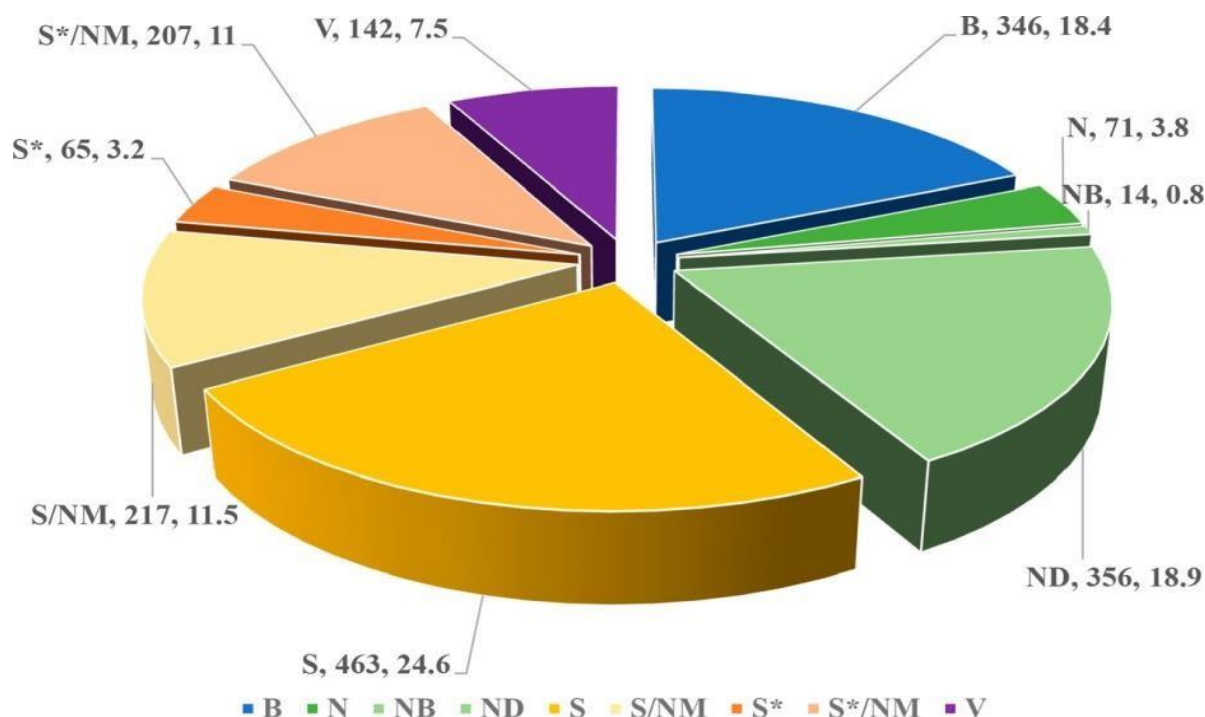
Fonte: Torres; Albericio (2019) adaptado.

Figura 3: Principais medicamentos aprovados pelo FDA em 2018 derivados de produtos naturais.



Mais recentemente, Newman e Cragg (2020) em uma atualizada revisão da literatura, que compreendeu de 01 de janeiro de 1981 a 30 de setembro de 2019, demonstraram que 1881 substâncias foram aprovadas como fármacos, destas 26,7% são produtos naturais distribuídos de tal maneira: 3,8% são produtos naturais inalterados (N), 18,9% são derivados de produto natural (ND), 3,2% são drogas sintéticas inspiradas em produtos naturais farmacofóricos (S*), e 0,8% são produtos naturais botânicos (definidos como mistura – fitoterápicos, NB) (**Figura 4**).

Figura 4: Total de novos fármacos aprovados entre janeiro/1981 a setembro/2019.



Fonte: Newman e Cragg (2020).

Legenda: **B:** macromolécula biológica; **N:** Produto Natural Inalterado; **NB:** Fármaco botânico (definido como mistura); **ND:** Derivado de Produto Natural; **S:** Fármaco sintético; **S*:** Fármaco sintético que apresenta um produto natural farmacofórico; **V:** Vacinas; **/NM:** Mimetizam produtos naturais.

Sendo assim, mesmo com a aplicação cada vez mais extensa de produtos naturais e seus princípios bioativos para o tratamento de doenças resistentes aos medicamentos disponíveis atualmente como alguns tipos de câncer, infecções fúngicas, bacterianas e virais, além de outras apresentarem poucas opções de tratamento, como a Doença de Alzheimer, a busca por novas substâncias bioativas tem se tornado cada vez mais necessária. Nesse contexto, justifica-se o fato de muitos pesquisadores terem concentrado esforços na busca de novas fontes de substâncias biologicamente ativas como organismos e microrganismos marinhos.

1.2 ORGANISMOS E MICRORGANISMOS MARINHOS COMO FONTE DE PRODUTOS NATURAIS

A investigação sistemática de organismos marinhos como fonte concebível de medicamentos data de 1940, porém somente em meados da década de 70 os estudos foram intensificados, devido a uma grande variedade de metabólitos totalmente novos ou que ainda não foram relatados no ambiente terrestre (WALI et

al., 2019). Li e Lou (2017) apontam que entre 1985 e 2012, mais de 15000 substâncias químicas, incluindo 4196 produtos naturais marinhos bioativos foram descobertas nesse habitat.

Ainda nessa perspectiva, Carroll et al. (2019) destacaram em uma revisão de literatura para produtos naturais marinhos referente ao ano de 2018, que 1554 novos compostos foram descritos em 469 artigos, revelando um incremento de 4% das novas substâncias relatadas no ano anterior, onde 47 delas foram descritas pela primeira vez em uma fonte marinha. Esses números indicam o crescente interesse pelo ambiente marinho, representando um vasto recurso para novos produtos naturais bioativos com utilidade em pesquisa básica, ciências biomédicas e desenvolvimento terapêutico.

Nos últimos 40 anos, o avanço progressivo na exploração do ambiente marinho pode também ser justificado por ser um nicho ecológico ainda pouco explorado, uma vez que os oceanos correspondem a mais de 70% da superfície da Terra e constitui mais de 90% do espaço habitável, com grande quimio e biodiversidade de organismos que nele vivem (CHOUDHARY et al., 2017). Em relação à diversidade química das moléculas obtidas de fontes marinhas, há uma variedade de estruturas que vão desde peptídeos lineares simples, alcaloides, ácidos graxos, terpenos, policetídeos, entre outros, em que a maioria exibe importantes atividades biológicas como antimicrobiano, antiviral, antioxidante, anti-inflamatório, antidiabetes e anticolinestérsica, potencialmente útil para tratamento da Doença de Alzheimer (LI; LOU, 2017).

O alto potencial de produção de substâncias únicas pelos organismos marinhos está relacionado às condições extremas nas quais eles se encontram, que incluem alta salinidade da água, pouca ou nenhuma presença de luz, grandes variações de temperatura e pressão, e baixa disponibilidade de nutrientes e oxigênio. Tais condições, provavelmente, favoreçam a atividade biológica dos produtos naturais sintetizados por eles, em que podem desenvolver mecanismos de adaptação e/ou defesa (GOGINENI; HAMANN, 2018).

Além da bioatividade, as condições hostis do habitat marinho podem favorecer novas rotas biossintéticas de metabólitos secundários em termos de extensão, precursor inicial e nível de caracterização, demandando uma requintada engenharia genética e metabólica para produção de estruturas complexas, as quais

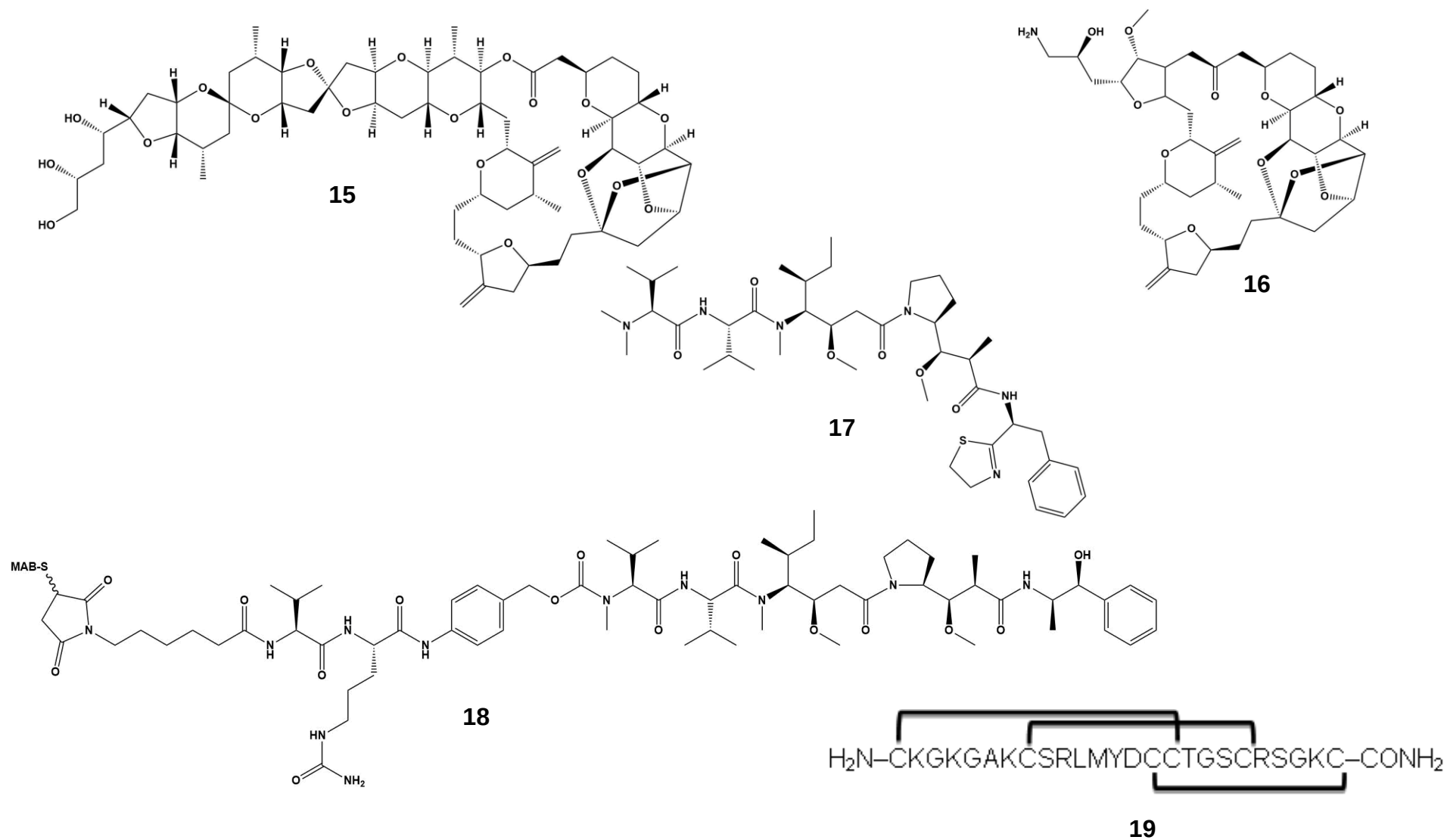
podem ter suas sínteses químicas quase impraticáveis em laboratório (BHATIA et al., 2022).

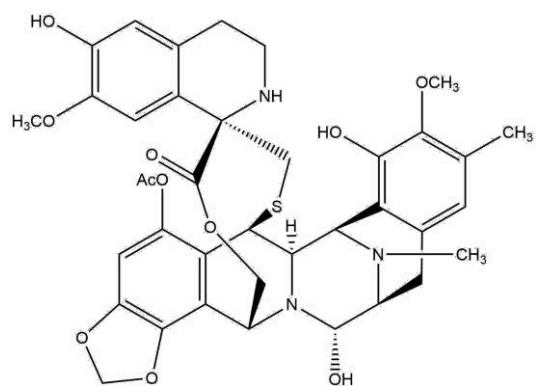
Nesse sentido, métodos de produção baseados principalmente na coleta e cultivo de microrganismos marinhos, juntamente com técnicas de extração, surgem como primeira opção para a produção desses compostos, haja vista que muitos deles se acumulam em pequenas quantidades, o que torna um dos principais obstáculos para melhor compreensão da química e composição dos metabólitos marinhos. Isso pode elevar os custos da produção, além de problemas ambientais, já que é inviável crer que a produção de Produtos Naturais Marinhos (PNM's) dependa apenas da coleta (KHALIFA, et al., 2019).

Muitas moléculas bioativas obtidas do bioma marinho entraram no mercado global de medicamentos e ensaios clínicos, dentre elas podemos citar a halicondrina B (**15**), um macrolídeo poliéster isolado da esponja marinha japonesa *Halichondria okadai*, cujo análogo sintético mantém o fragmento ativo, o mesilato de eribulina (Halaven®, **16**), aprovada em 2010 pela FDA como medicamento no tratamento do câncer de mama. E ainda, a dolastatina (**17**) isolada da lebre do mar *Dolabella auricularia*, que serviu de inspiração para a síntese do conjugado anticorpo-medicamento (Adcetris®, **18**) aprovado como agente antineoplásico (LI; LOU, 2017).

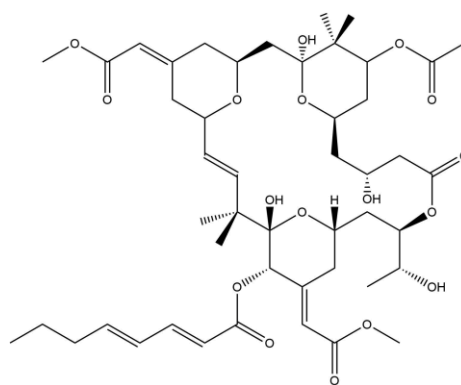
Também são exemplos de Produtos Naturais Marinhos (PNM's) o ziconotídeo (Prialt®, **19**), um peptídeo conhecido com ω -conotoxina isolado do molusco *Conus magnus*, comercializado como agente terapêutico para dores crônicas, e a ecteinascidina 743 ou trabectedina (Yondelis®, **20**), isolada do tunicato *Ecteinascidia turbinata* comercializada para o tratamento de câncer (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Podemos destacar ainda a briostatina (**21**), um agente anticâncer isolado do briozoário *Bugula neritina*, e os nucleosídeos espongouridina (**22**) e espongotimidina (**23**) isolados da esponja marinha *Tethya crypta*, ambos com atividade antiviral, e que proporcionaram o desenvolvimento, a partir de similares sintéticos, da adenina-arabinosídeo (ara-A) ou vidarabina, comercializada como Vira-A® (**24**), com atividade antiviral, e da citosina-arabinosídeo ou citarabina (ara-C), conhecida como Cytosar-U® ou Depocyt® (**25**) usado no tratamento da leucemia (LOTUFO et al., 2009; MAYER et al., 2010).

Figura 5: Fórmula estrutural de alguns Produtos Naturais Marinhos.

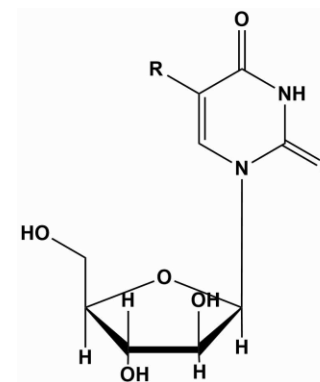




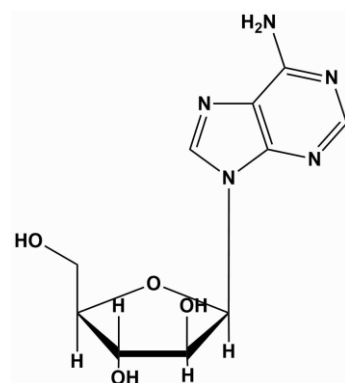
20



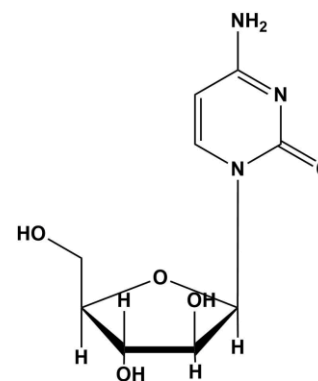
21



22 R= H
23 R= CH₃



24



25

1.2.1 Algas marinhas

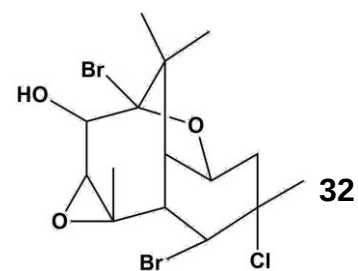
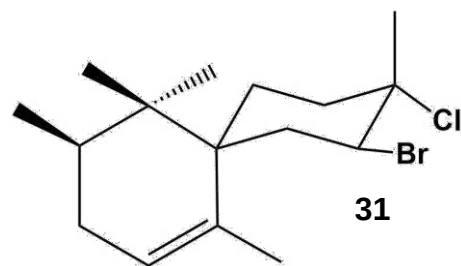
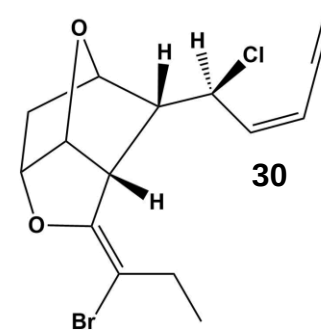
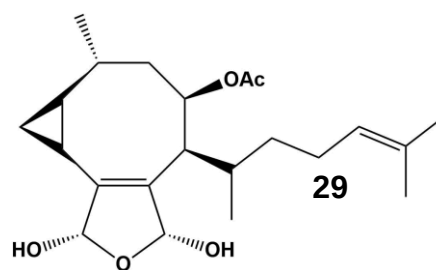
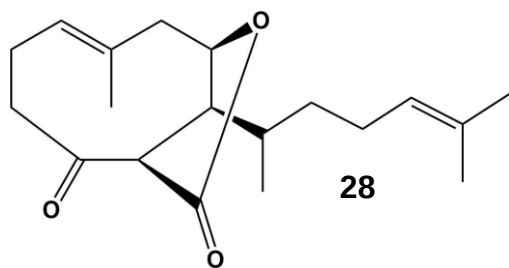
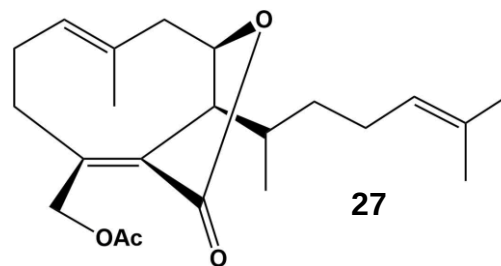
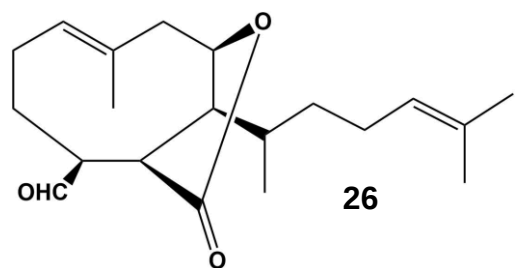
No rol da química de PNM's, é imperativo destacar o papel das macroalgas, haja vista que compreendem um grupo de diversos organismos fotossintetizantes, responsáveis pela estruturação da atmosfera terrestre ao produzir oxigênio molecular, e, conseqüente formação da camada de ozônio (CABRAL et al., 2011). Desempenham um papel importante, ao servir de matéria-prima para produção de cosméticos, medicamentos, espessantes e estabilizantes, além de serem empregadas como indicadoras da qualidade de sistemas aquáticos, atuando como "índice de poluição", já que foi observada correlação entre a baixa diversidade da população de algas e alta poluição do sistema aquático (RAMAKRITNAN et al., 2017).

Além disso, as algas são fonte de metabólitos secundários que associadas a um estágio evolutivo elevado, são capazes de biossintetizar constituintes de estruturas químicas extremamente diversificadas, como acetogeninas, terpenos, derivados de aminoácidos, fenóis, alcaloides, macrolídeos entre outros (SALI et al., 2018).

Recentemente, diversas substâncias novas foram isoladas de algas marinhas, sendo que muitas dessas substâncias demonstraram atividades biológicas interessantes, como os dictiolídeos A (**26**) e B (**27**), e o nordictiolídeo (**28**), isolados da alga marrom *Dictyota dichotoma*, que exibiram atividades antitumorais, e o crenuladial (**29**) isolado da alga *Diolophus ligatus* que exerceu atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* e *Aeromonas hydrophyla* (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; GANESAN et al., 2018).

Dentre as macroalgas existentes, as algas vermelhas são as de maior importância, com aproximadamente 6000 espécies no total, tendo como característica ampla quimiodiversidade de substâncias halogenadas. Enquadra-se como exemplo desse tipo de alga, a pertencente ao gênero *Laurencia*, que são únicas na produção de acetogeninas com uma subestrutura de enino terminal como em (**30**), e em terpenos halogenados conhecidos como chamigrenos A e B (**31-32**) (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; UMAMAHESWARI et al., 2017).

Figura 6: Metabólitos secundários de algas marinhas.



1.2.1.1 Algas Rhodophytas

As algas vermelhas representam um dos mais antigos grupos de algas marinhas que, caracterizam-se pela presença da coloração avermelhada devido ao pigmento acessório ficoeritrina, podendo variar a cor para violeta, azul, preta ou marrom, dependendo de alterações de outros pigmentos como a ficocianina e aloficocianina, encontradas em regiões próximas ao Equador, presas a rochas, conchas de moluscos e sobre outras algas (TEIXEIRA, 2012). São eficientes na produção de polissacarídeos sulfatados (carragenanas e ágar), bem como de substâncias halogenadas, terpenos, policetídeos, fenóis, hidrocarbonetos voláteis e acetogeninas (ANAND et al., 2018).

1.2.1.1.1 A macroalga *Acanthophora spicifera*

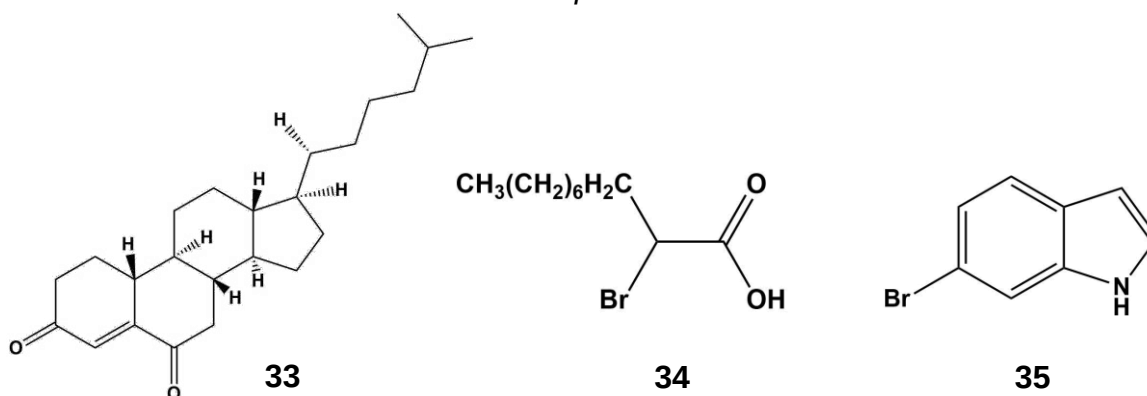
A *Acanthophora spicifera* é uma alga vermelha pertencente à classe Rhodophyceae, ordem Ceramiales, família Rhodomelaceae, de ocorrência em uma ampla variedade de substratos marinhos, sendo uma das espécies de algas vermelhas mais abundantes em regiões de recifes, destacadamente em habitats tropicais e subtropicais, com maior biomassa encontrada em lugares quentes (KILIAR; MCLACHLAN, 1986).

Apresenta coloração vermelho-acastanhada ou esverdeada, comumente utilizada no preparo de alimento para dieta humana, e também como importante fonte de alimento para outros organismos marinhos, além de funcionar como biofiltro (LANG et al, 2007).

Vários compostos de interesse foram identificados em *A. spicifera*, incluindo flavonoides com atividade antibacteriana e antitumoral, além de outras substâncias fenólicas com potencial antioxidante e antidiabético (SALI et al. 2018). Além disso, estudos realizados por Burkholder, Burkholder e Almodovar (1960) mostraram que o extrato metanólico da alga possui atividade antiviral e antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Mycobacterium smegmatis*.

Com relação à quimiodiversidade de metabólitos secundários produzidos pela alga, podemos citar o trabalho desenvolvido por Sali et al. (2018), o qual relatou a presença do esteroide 4-colestano-3,6-diona (**33**), além do ácido 2-bromohexadecanóico (**34**) e 6-bromoindol (**35**), como potenciais agentes citotóxicos.

Figura 7: Principais metabólitos secundários isolados da alga *Acanthophora spicifera*.



Embora haja uma grande diversidade de algas ainda a serem exploradas, nas últimas décadas, pesquisas têm se concentrado no estudo de microrganismos associados a algas marinhas, como por exemplo, os fungos endofíticos. Estes apresentam ampla diversidade biológica e química, representando uma das mais relevantes fontes de substâncias bioativas, cujas aplicações têm auxiliado no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

1.2.2 Endófitos: uma rica fonte de metabólitos funcionais

O termo endofítico está relacionado a microrganismos que são capazes de colonizar o interior de tecidos de plantas e/ou algas durante toda ou parte de sua vida, sem causar efeitos patogênicos aparentes, uma vez que a relação entre alga e endófito se dá de maneira simbiótica do tipo mutualística, onde as algas fornecem abrigo e nutrientes para os fungos, enquanto estes protegem as algas contra agentes patógenos e fornecem resistência a condições de estresse abiótico e toxicidade (MANGANYI et al., 2018).

Alguns pesquisadores acreditam que a relação simbiótica entre endófito e hospedeiro seja proveniente da evolução de interações antagônicas, principalmente parasitárias, onde houve um equilíbrio entre a virulência do microrganismo endofítico e as respostas de defesa do hospedeiro (RAJAMANIKYAM, et al., 2017). Recentemente, foi evidenciado que a interação endófito-planta/alga pode não ser apenas o equilíbrio entre a virulência e as respostas de defesa, mas uma interação mais complexa que envolve recombinação gênica entre as espécies durante a fase evolutiva (BOGAS, et al., 2022).

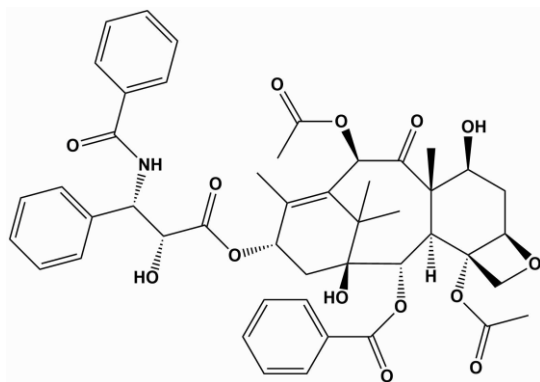
Embora seja difícil a diferenciação entre fitopatógenos e endófitos, devido às características genéticas semelhantes, a bioprospecção de microrganismos endofíticos constitui uma atividade potencial a futuros estudos que buscam encontrar novas moléculas para a formulação de compostos bioativos com alto grau de diversidade biológica e estrutural (LACERDA; POLONIO; GOLIAS, 2022).

De acordo com Bondkly, Bondkly, Bondkly (2021) a síntese de compostos bioativos por microrganismos endofíticos geralmente é regulada e afetada por uma série de fatores, que incluem a espécie do hospedeiro, genótipo, origem do material, localização geográfica, interações com o hospedeiro, além dos fatores bióticos e abióticos que resultam na especificidade da microbiota da espécie hospedeira.

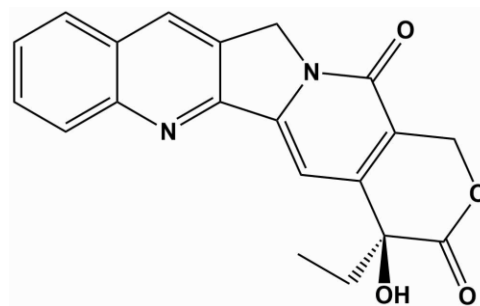
Por esse aspecto, os fungos conseguem se difundir por quase todos os nichos ecológicos desenvolvendo uma série de estratégias que permitem seu crescimento, recuperação em situações de estresse, e negação a inibidores, ao produzir metabólitos secundários com atividades biológicas promissoras. Nesse sentido, fungos endofíticos são altamente diversos e constituem uma importante fonte de metabólitos novos, potenciais e ativos (SPITELLER, 2015).

Felício et al. (2015) mostram que é importante avançar nas pesquisas com fungos endofíticos associados às algas marinhas, principalmente devido ao potencial biológico desvendado pelas pesquisas de bioprospecção, uma vez que foi relatado em outros estudos, o isolamento de substâncias antitumorais de fungos endofíticos de plantas, como o paclitaxel (36), camptotecina (37), podofilotoxina (38), vinblastina (39) e vincristina (40).

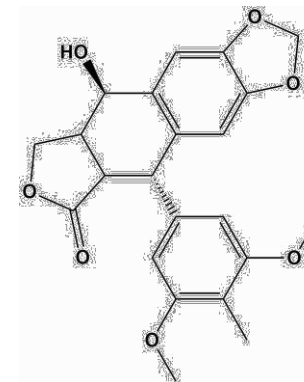
Figura 8: Exemplos de produtos naturais isolados de fungos endofíticos de plantas.



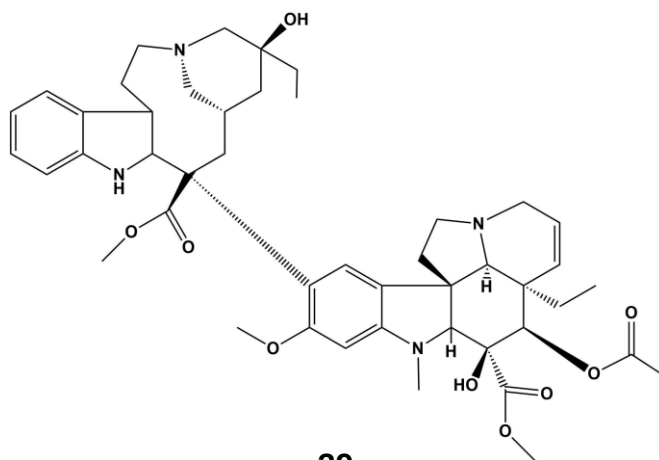
36



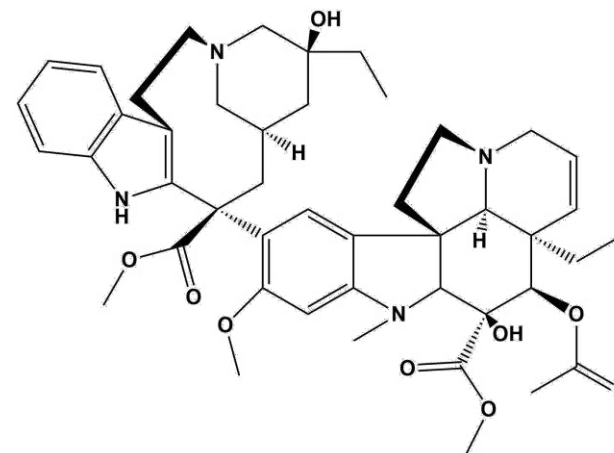
37



38



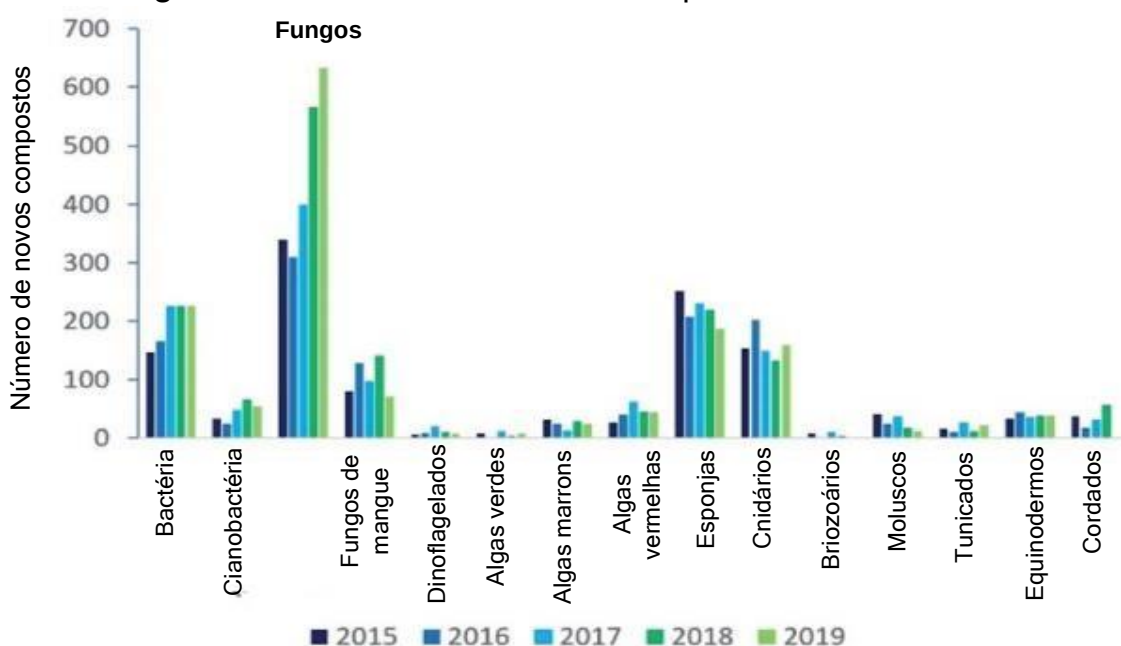
39



40

Estudos realizados com fungos endofíticos de algas marinhas têm mostrado uma grande quimiodiversidade de produtos naturais, exibindo diferentes atividades farmacológicas interessantes como: antioxidante, anticancerígeno, anti-inflamatório, antiviral e antiparasitário (LI et al., 2018; KAMAT et al., 2020). Dados relacionados a esse tema apontam que, em 2018 houve um crescimento de 38% em relação a 2017 de novas substâncias produzidas por fungos endofíticos de algas marinhas, e que até 2024 tendem a se tornar a fonte mais prolífica de produtos naturais marinhos, ultrapassando cnidários e esponjas (CARROLL et al., 2019). Numa revisão mais recente, é possível perceber esse mesmo comportamento, onde em 2019, os produtos naturais marinhos derivados de fungos representaram quase 47% do total de novos PNM's relatados (**Figura 9**) (CARROLL et al., 2021).

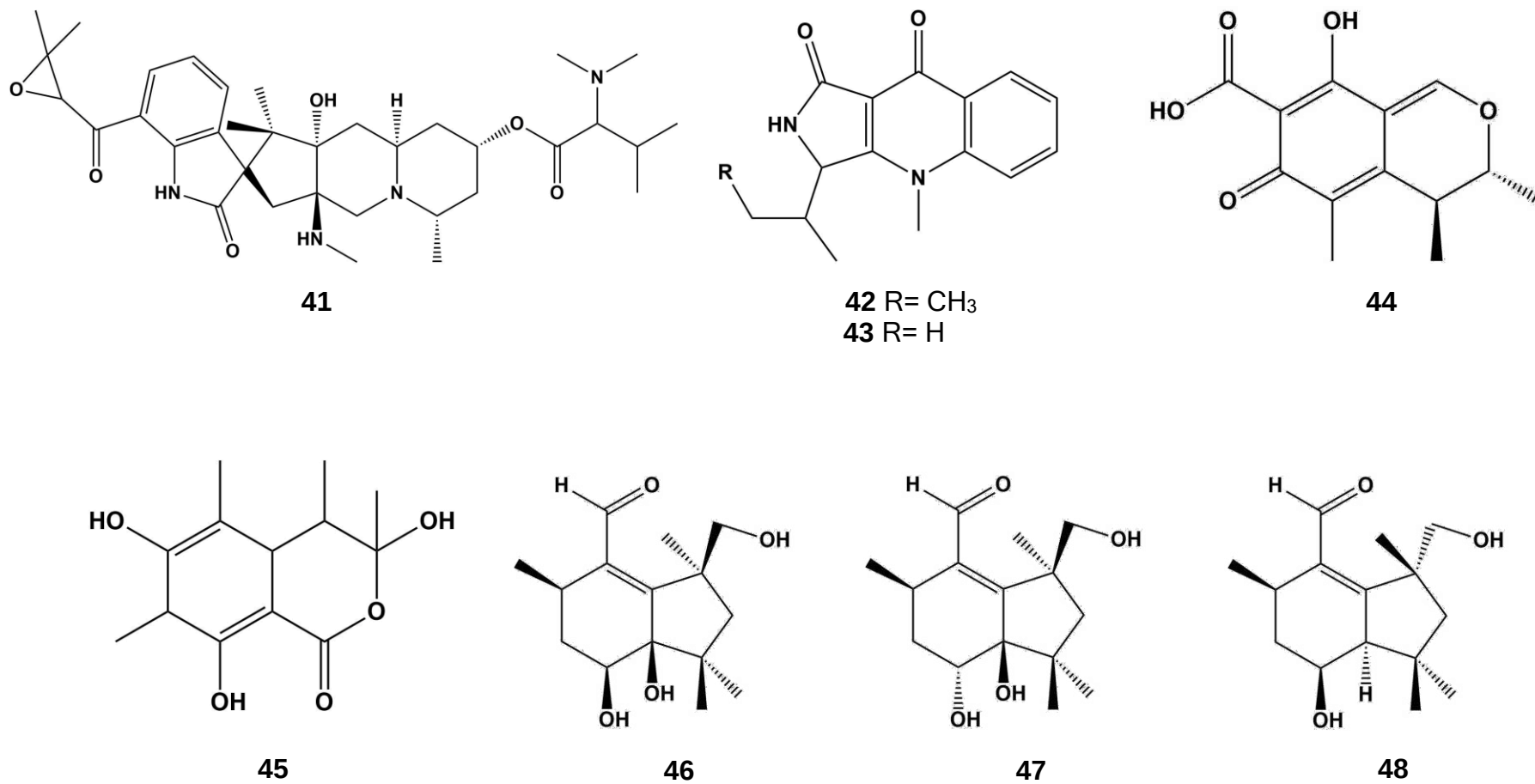
Figura 9: Tendência de descoberta de produtos naturais marinhos.



Fonte: Carroll et al. (2021) adaptado.

São exemplos de metabólitos isolados de fungos endofíticos de algas marinhas, o alcaloide quinolizidínico citrinidina A (**41**), os alcaloides quinolactínicos quinolactina A (**42**) e B (**43**) e policetídeos como a citrinina (**44**) e esclerotinina (**45**), todas obtidas a partir do fungo *Penicillium citrinum* isolado na alga vermelha *Dichotomaria marginata* (ANDRADE, 2014). Podemos destacar também os sesquiterpenos botrianos (**46-48**) isolados do fungo *Nemania bipapillata* obtido da alga *Asparagopsis taxiformis* (MEDINA et al., 2019).

Figura 10: Metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos de algas marinhas.



A complexidade e importância da relação endófito e alga indica um potencial químico e biológico dos microrganismos na química de produtos naturais, não apenas pelos metabólitos secundários produzidos, mas também pela sustentabilidade da produção de matéria prima em larga escala através de processos fermentativos, uma vez que além da relação ecológica, os mesmos habitam ecossistemas distintos (MEDINA, 2016; HONÓRIO, 2018).

1.3 DIFERENÇAS ENTRE PRODUTOS NATURAIS MICROBIANOS MARINHOS E SEUS HOMÓLOGOS TERRESTRES

A transição de plantas e animais do meio aquático para o terrestre demandou adaptação a um ambiente com propriedades físicas e químicas muito distintas, onde o arcabouço bioquímico dos organismos e microrganismos marinhos e terrestres também tiveram que acompanhar a evolução e, conseqüentemente, é aceitável presumir que os metabólitos secundários produzidos por endófitos desses dois ambientes sejam notavelmente diferentes (STEELE; BRINK; SCOTT, 2019).

Nesse sentido, as comunidades microbianas são bastante diversificadas, constituídas por uma maquinaria biocatalítica que medeia a biossíntese de metabólitos secundários, onde a complexidade estrutural das substâncias produzidas irá depender das relações intra e interespecíficas em cada ecossistema, a observar a diversidade, estrutura e localização da comunidade hospedeira (RAJAMANIKYAM, et al., 2017; BOGAS, et al., 2022).

Por esse motivo, produtos naturais microbianos marinhos e terrestres possuem semelhanças e diferenças nas propriedades físico-químicas, e aspectos estruturais do ponto de vista evolutivo. De acordo com Shang et al. (2018), em geral, PNM's são menos solúveis e maiores, em termos de cadeia carbônica, se comparados com PNT's, além de possuírem anéis grandes (8 a 10 membros), fragmentos e *scaffolds* únicos, e terem mais átomos de nitrogênio e halogênio, especialmente bromo. Tais aspectos, sugerem que produtos naturais microbianos marinhos podem ser produzidos por rotas biossintéticas mais variadas do que seus homólogos terrestres.

Atualmente, fungos endofíticos marinhos têm sido os mais estudados dentre os microrganismos desse ecossistema, sendo a fonte mais produtora de novos compostos bioativos. Entretanto, pesquisas apontam que após 2015, 70% das

substâncias isoladas de fungos marinhos são estruturalmente semelhantes aos isolados antes de 2015, o que supõe que apesar dos avanços de coleta, cultivo e isolamento, a revelação de novos produtos naturais marinhos ainda é baixa, e bastante problemática, uma vez que os custos envolvidos na pesquisa marinha podem ser bem mais onerosos do que estudos com microrganismos terrestres (VOSER; CAMPBELL; CARROLL, 2022).

Sendo assim, de acordo com os mesmo autores, ao fazer um paralelo entre as estruturas de produtos naturais microbianos marinhos e terrestres, ficou evidenciado que aproximadamente 76% de todos os PN's isolados de endófitos marinhos estão alinhados com os homólogos terrestres, ou seja, microrganismos marinhos e terrestres tendem a compartilhar genes biossintéticos comuns, em que os principais subgrupos de metabólitos compartilhados são policetídeos, peptídeos e alcaloides.

Dessa maneira, Moghaddam et al. (2021) consideram que apesar da crescente exploração do ambiente marinho para estudo, é importante que o foco das pesquisas passe a considerar os microrganismos marinhos, aprimorando cada vez mais as técnicas de cultivo e isolamento, para então realizar estudos de comparação genômica entre microrganismos terrestres e marinhos, para que sejam direcionados à descoberta de novos produtos naturais microbianos marinhos.

1.4 FUNGOS DA FAMÍLIA HYPOXYLACEAE

A família Hypoxylaceae é uma das maiores famílias do filo Ascomycota, que foi recentemente criada para agrupar gêneros ao quais antes eram classificados em Xylariaceae. Após diversas abordagens polifásicas, houve a constatação de que essa família possui características filogenéticas distintas de outras linhagens de Xylariaceae, o que permitiu uma reorganização das famílias a partir de características morfológicas e quimiotaxonômicas (DARANAGAMA et al. 2018; WENDT et al. 2018).

Os principais representantes dessa família são os fungos do gênero *Hypoxylon* e *Annulohypoxylon*, sendo que este último foi proposto por Hsieh, Ju, Rogers (2005) para abrigar espécies de *Hypoxylon* da seção *Annulata*, que durante alguns anos, eram tidos no mesmo grupo taxonômico. Entretanto, devido às diferenças morfológicas e de metabólitos secundários, bem como dos genes que

codificam a β -tubulina e α -actina reforçaram ainda mais a segregação dos dois gêneros (SÁNCHEZ-BALLESTEROS et al., 2000; SWANNASSAI et al., 2013).

De acordo com Becker; Stadler (2021) e Cheng et al. (2020), o *Hypoxylon* é o maior gênero fúngico dentro da família Hypoxylaceae, com mais de 300 espécies descritas, e mais de 200 metabólitos potencialmente bioativos relatados, sendo uma das principais fontes de drogas antimicrobianas e antifúngicas, enquanto que o *Annulohypoxylon* possui mais de 40 espécies conhecidas, e são ricas em metabólitos secundários únicos, onde a maioria é de grande importância quimiotaxonômica.

1.4.1 Gênero *Hypoxylon*

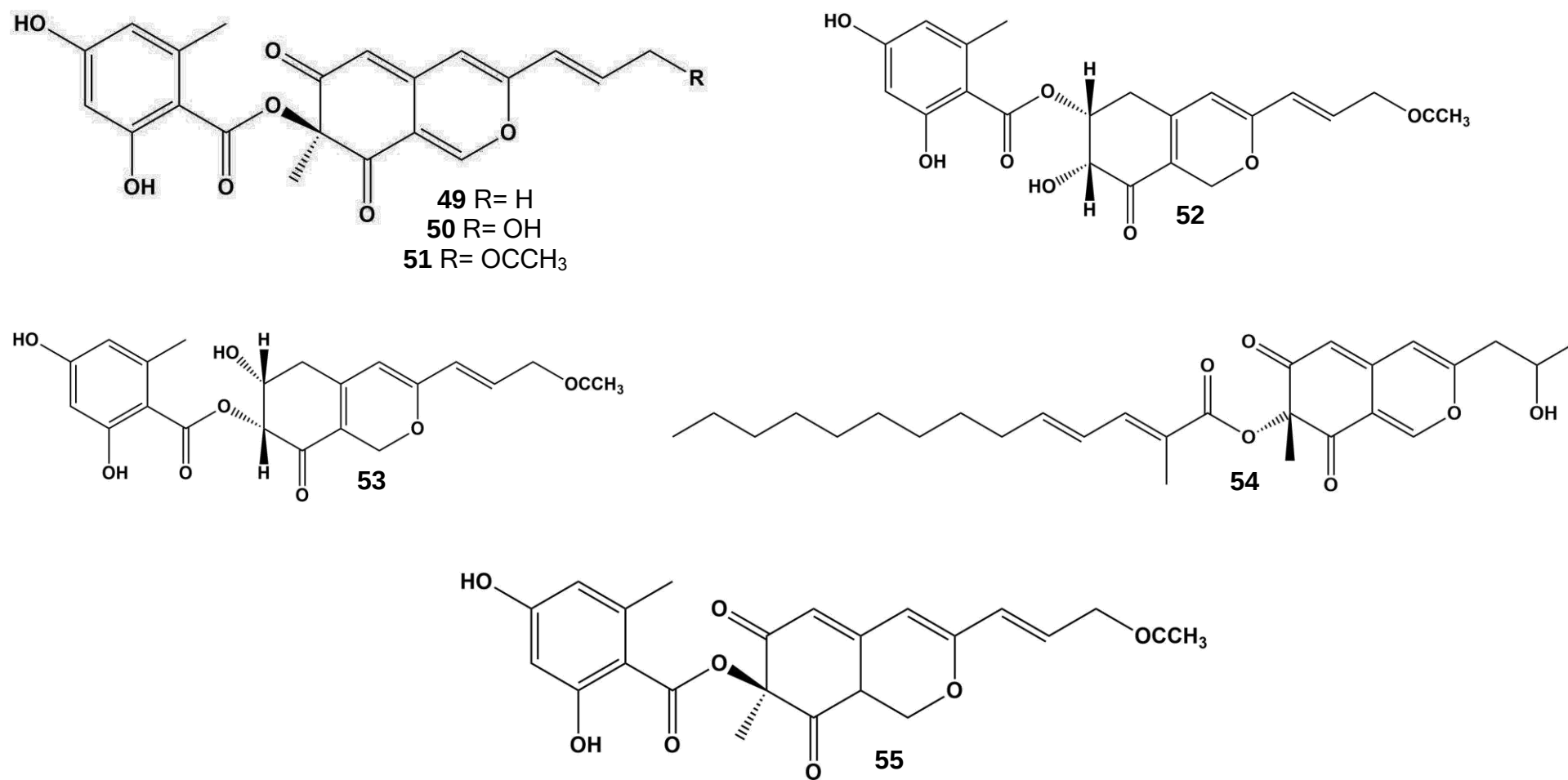
O gênero *Hypoxylon* representa o maior número de espécies dentro da família Hypoxylaceae, com alta diversidade morfológica e química, encontrado principalmente em regiões tropicais e subtropicais. A maioria das espécies desse gênero é saprófita, capaz de formar corpos de frutificação facilmente visíveis na madeira, nutrindo-se de matéria orgânica morta. Contudo, podem ser encontrados também como endófitos ubíquos de plantas e sementes, e por vezes isolados de ambientes marinhos e invertebrados (LOUBIÉRE et al., 2017a; HELALY; THONGBAI; STADLER, 2018).

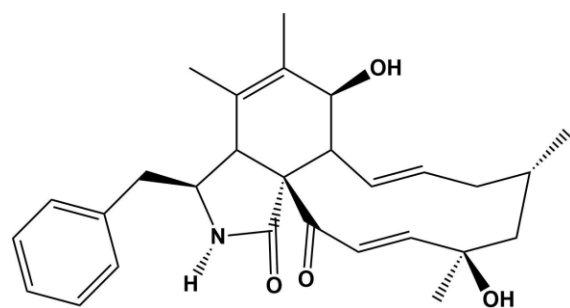
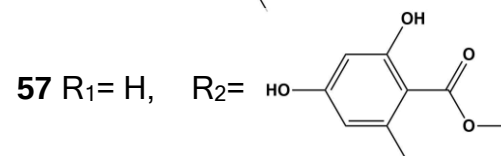
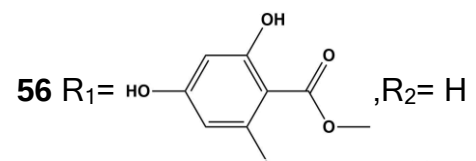
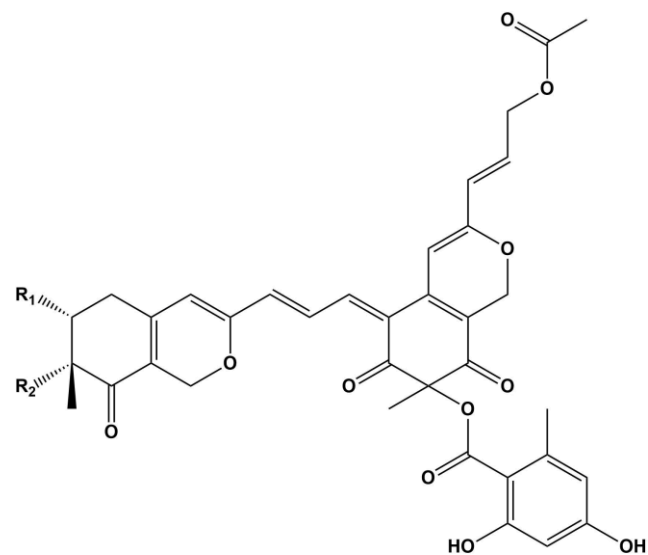
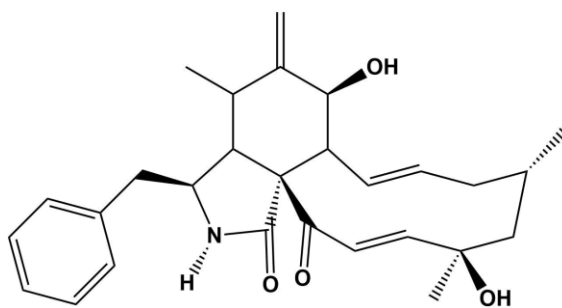
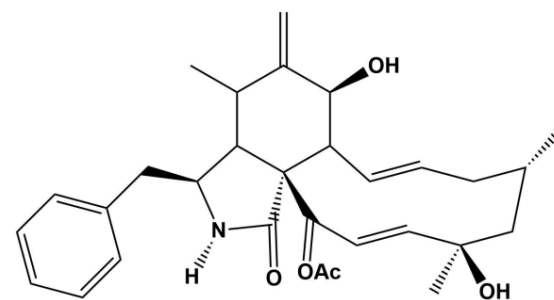
De acordo com Stadler e Fournier (2006), a primeira descrição de uma espécie de *Hypoxylon* foi *H. coccineum*, que apresentou características bastante semelhantes com *H. fragiforme*. Essas espécies tem como principal metabólito secundário a azafilona, um pigmento estromal cujo primeiro representante descrito foi a mitorubrina (49) que mais tarde incluiu seus derivados mitorubrionol e acetato de mitorubrionol, respectivamente (50-51), além das rubiginosinas A, B e C (52-54) de *H. rubiginosum* (Quang et al., 2004), hipomiltina (55) em *H. perforatum*, rutilinas (56-57) de *H. rutilum* (Quang et al., 2005) caracterizadas como azafilonas diméricas derivadas da condensação de monômeros do tipo mitorubrina e rubiginosina, dentre outros.

Além dessas substâncias, Stadler et al. (2006) detectaram em *H. fragiforme* as fragiforminas (58-59), com atividade nematocida, antibacteriana e antifúngica. Essas substâncias foram descritas juntamente com citocalasinas H (60) encontradas no corpo de frutificação jovem, com capacidade de desempenhar inibição da HIV-1

protease (ONDEYKA, et al., 1992). Recentemente, Yuyama et al. (2018) e Wang et al. (2019) descreveram novas citocalasinas nessa espécie de *Hypoxylon* com atividade de inibir o biofilme de *Staphylococcus aureus*.

Figura 11: Exemplos de alguns metabólitos secundários isolados de fungos do gênero *Hypoxylon*.



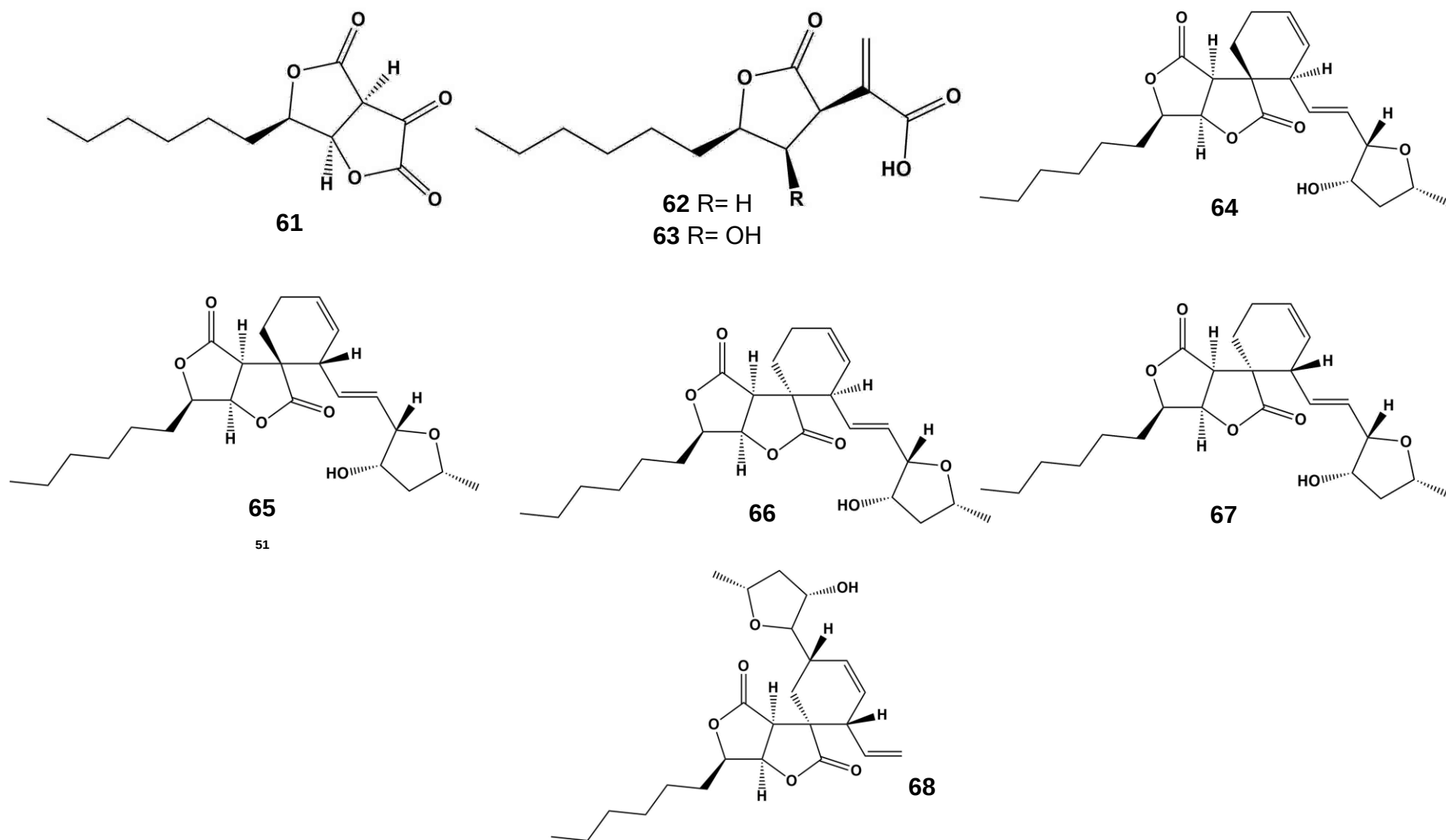
**58****59****60**

1.4.1.1 A espécie *Hypoxylon monticulosum*

Hypoxylon monticulosum é um fungo ascomiceto pantropical pertencente à família Hypoxylaceae, que após estudos taxonômicos recentes e abordagens polifásicas, agora faz parte do gênero *Hypomontagnella*, um novo gênero separado de *Hypoxylon* criado por Lambert et al. (2019), cuja espécie, atualmente, é colocada em um clado separado como o nome de *Hypomontagnella monticulosa*. Constitui-se como uma espécie amplamente distribuída no ambiente marinho e terrestre, produzindo uma grande variedade de compostos bioativos com atividade citotóxica, antimicrobiana e antifúngica (SURUP et al., 2014).

Além de suas bioatividades, alguns dos metabólitos secundários sintetizados por *H. monticulosum* funcionam como marcadores quimiotaxonômicos da espécie, como o esporotriolídeo (**61**), uma furofurandiona cuja primeira ocorrência data de 1994, quando Krohn et al. (1994) isolaram a substância, com forte atividade antifúngica a partir do fungo *Sporothrix* sp. Anos mais tarde, Loubière et al. (2017a) isolaram da esponja marinha *Sphaerocladina* o esporotriolídeo e compostos relacionados, como os ácidos desoxiporótrico (**62**), e esporótrico (**63**), além de uma nova família de produtos naturais conhecidas como esporochartinas (**64-68**), estas com atividade citotóxica contra linhagens de células cancerígenas HCT-116, PC-3 e MCF-7 (LOUBIÈRE et al., 2017b).

Figura 12: Metabólitos secundários isolados da espécie *Hypoxylon monticulosum*.



1.4.2 Gênero *Annulohypoxylon*

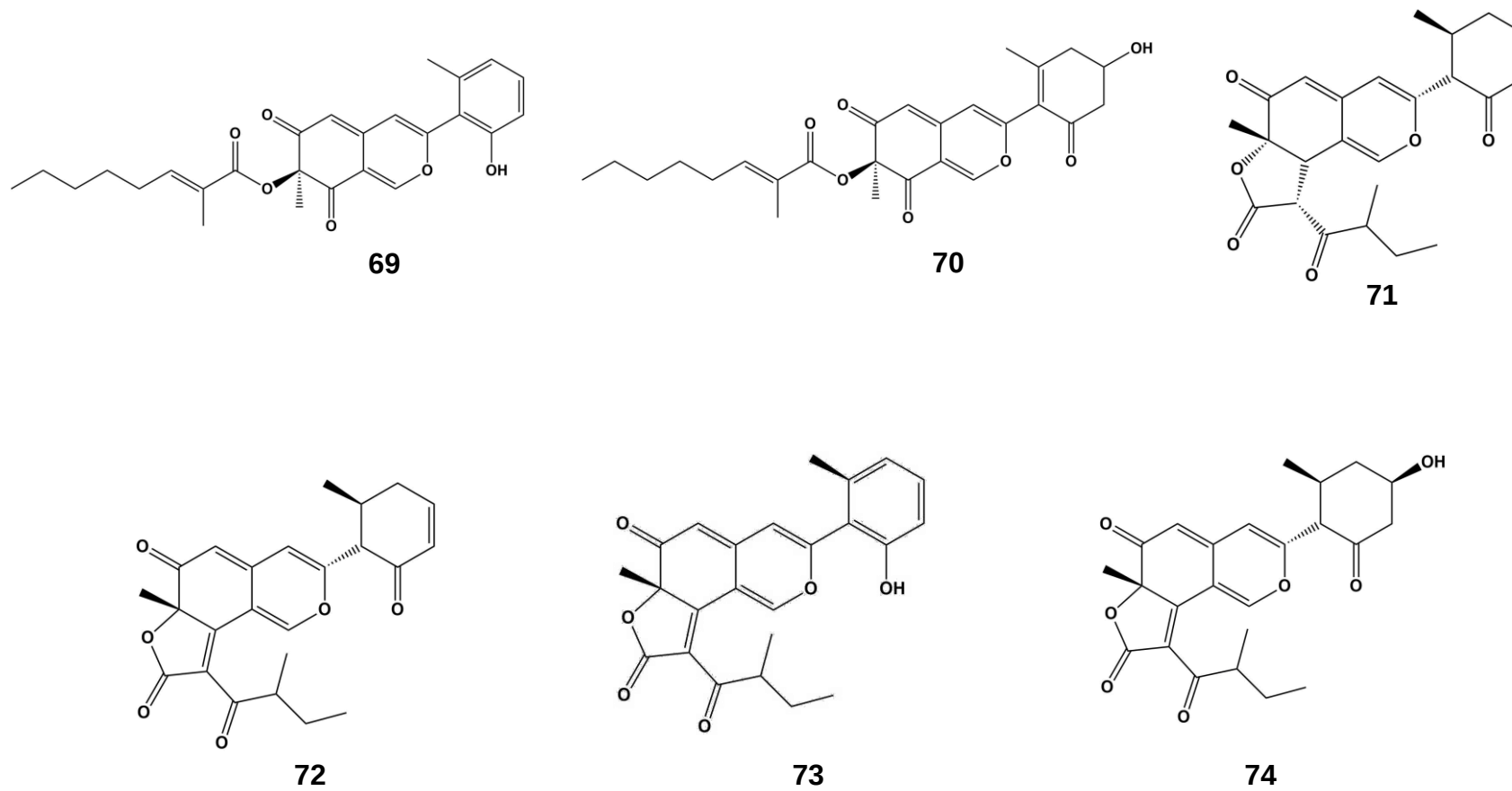
Após extensas avaliações morfológicas, bem como análises de sequenciamento genômico, o gênero *Annulohypoxylon* foi criado a fim de acomodar espécies que apresentavam características morfológicas distintas de outras espécies do gênero *Hypoxylon*, mas que eram classificadas como pertencentes ao gênero *Hypoxylon* e tratadas como *Hypoxylon* sect. *Annulata* (HSIEH; JU; ROGERS, 2005).

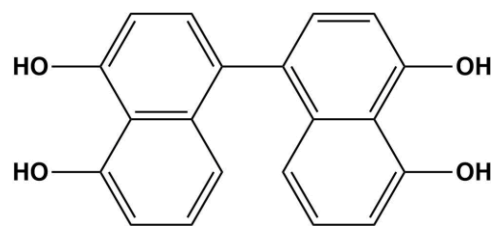
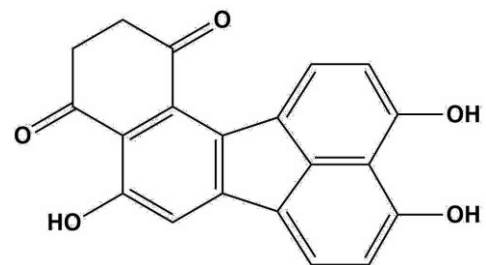
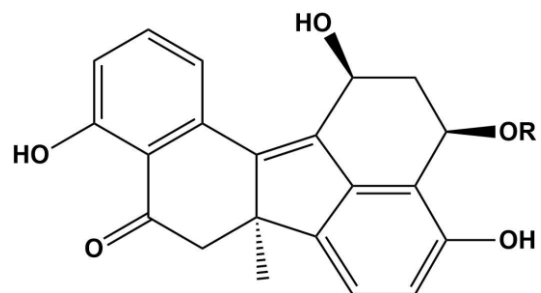
Esse gênero possui mais de 40 espécies conhecidas, e são ricas em metabólitos secundários únicos, onde a maioria é de grande importância quimiotaxonômica. Nos últimos 15 anos, estudos antigos com substâncias extraídas de *Hypoxylon* foram reorganizados, e passaram a ser incluídos como *Annulohypoxylon* como foi o caso do *Annulohypoxylon truncatum* e *Annulohypoxylon cohaerens*, antes classificados como *Hypoxylon truncatum* e *Hypoxylon cohaerens*, respectivamente (SUDARMAN et al., 2016; BECKER; STADLER, 2021).

Quang et al. (2005) propuseram um dos primeiros trabalhos de classificação química do gênero *Annulohypoxylon*, no qual foram estudados extratos de corpos frutíferos de 26 espécies (na época ainda era classificado como subespécie *Hypoxylon* sect. *Annulata*). Kuhnert et al. (2017) realizaram um trabalho mais extenso, enfocando a filogenia e quimiotaxonomia do gênero, no qual 42 espécies foram analisadas por HPLC-MS a fim de verificar os metabólitos marcadores de classificação química.

A partir desses dois estudos, foi possível notar que o gênero *Annulohypoxylon* exibe um arcabouço de metabólitos que vão desde azafilonas, tais como cohaerinas A e B (69-70) e multiforminas A, B, C e D (71-74), com importante atividade antioxidante; derivados de naftaleno, que são bastante onipresentes como o binaftaleno-4,4',5,5'-tetrol (BNT, 75), seus derivados oxidados como a truncatona C (76), hipoxilanóis D, E e F (77-79) e daldinona J (80), onde os três últimos pertencem à subclasse [j] fluorantenos, encontrados até agora, exclusivamente, em *Annulohypoxylon* (KUHNERT et al., 2017; QUANG et al., 2005).

Figura 13: Metabólitos secundários isolados do gênero *Annulohypoxylon*.

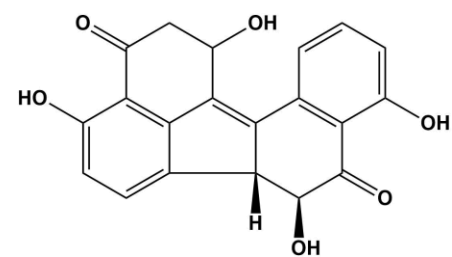


**75****76**

77 R= CH₂CH₃

78 R= CH₃

79 R= H

**80**

1.5 AVANÇOS RECENTES NA DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS NATURAIS MICROBIANOS MARINHOS

A alta variedade de produtos naturais microbianos marinhos oferece oportunidades promissoras para descoberta de medicamentos, especialmente no manejo de doenças infecciosas e cancerosas. Nesse sentido, uma análise abrangente dos metabólitos produzidos por esses microrganismos é fundamental para entender a dinâmica dos processos biossintéticos, bem como os fatores ecológicos e biológicos por trás da produção de um determinado metabólito (LYU et al., 2020).

Com o progresso da coleta de amostras marinhas, separação de compostos, determinação estrutural, além das técnicas de alto rendimento que abrangem genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, a química de produtos naturais microbianos marinhos tem se desenvolvido em um fluxo muito mais rápido do que as abordagens clássicas, permitindo avaliar grandes conjuntos de metabólitos a partir de múltiplas amostras, favorecendo a desreplicação ao propor uma visão abrangente dos metabólitos (REVERTER et al., 2020).

Nos últimos anos, a metabolômica tem sido largamente utilizada com uma ferramenta em pesquisas bioanalíticas, a fim de investigar a interação entre organismos marinhos mediadas por compostos químicos, permitindo a identificação e quantificação dos metabólitos em uma amostra (XIA et al., 2022). Notavelmente, a abordagem metabolômica não direcionada tem sido bastante utilizada pelos pesquisadores, uma vez que a triagem dos metabólitos é realizada por meio de técnicas hífenadas que incluem LC/MS, GC/MS e espectroscopia de RMN, além de envolver múltiplas amostras, análises numéricas, e bancos de dados para identificar padrões e marcadores quimiotaxonômicos (BHATIA et al., 2022).

Nesse contexto, a produção e identificação de compostos bioativos de endófitos marinhos requer cooperação multidisciplinar, haja vista que a abordagem metabolômica permite a análise de misturas químicas complexas, onde é necessário a padronização de métodos para as diferentes amostras analisadas, processamento e tutoria de dados a ser realizada por vários softwares e plataformas *online*, além do conhecimento e domínio de ferramentas de bioinformática como as redes moleculares (REVERTER et al., 2020).

No caso das redes moleculares, especialmente a disponibilizada pela plataforma GNPS, cujos dados são pautados nos espectros de massas sequenciais (tandem MS/MS), ela é produzida a partir de um único conjunto de dados ou uma lista de substâncias, a qual pode destacar diferentes relacionamentos, tais como: estatísticos (metabólitos congêneres), bioquímicos (substratos de reações conhecidas), e químicos (estruturas semelhantes), onde os algoritmos detectam e agrupam metabólitos com base na similaridade dos espectros de massas de fragmentação, mapeando o espaço químico de amostras complexas, facilitando a descoberta de novas moléculas e análogos de compostos conhecidos (GAUGLITZ et al., 2022; SCHMID et al., 2021).

Sendo assim, o uso da abordagem metabolômica associada à técnica OSMAC, inserida no contexto da quimiometria, onde é feito um delineamento experimental orientado, tende a ser uma estratégia bastante inovadora para a descoberta e desenvolvimento de produtos naturais de fungos endofíticos marinhos, ao permitir uma análise mais abrangente e informativa de amostras complexas em diferentes condições de cultivo, com um número mínimo de experimentos, melhorando as anotações de características de metabólitos, redes de similaridade espectral, desreplicação e novas percepções de metabólitos potencialmente bioativos (REVERTER et al., 2020).

1.5.1 Variação das condições de cultivo de microrganismos – *One Strain Many Compounds* (OSMAC)

Quando um microrganismo cresce em ambiente natural ou em laboratório, sua produção metabólica é influenciada pela diferença no fornecimento de nutrientes e aspectos físicos (HEWAGE et al., 2014). Sendo assim, a manipulação sistemática das condições de fermentação de determinado fungo, por exemplo, técnica conhecida como OSMAC (One Strain Many Compounds), representa uma maneira efetiva de ativar vias biossintéticas silenciadas ou pouco expressas dos microrganismos, visando assim uma maior produção de diferentes metabólitos (BODE et al., 2002).

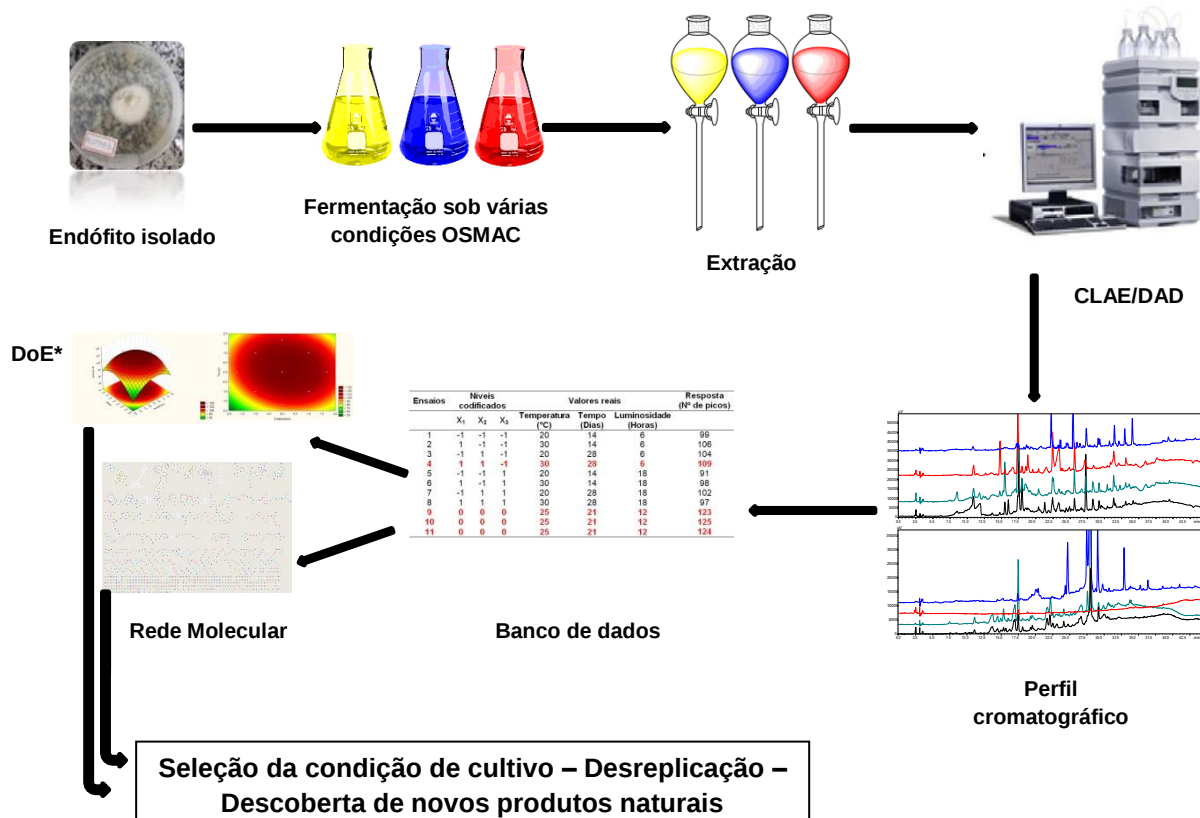
Essa estratégia possibilita a variação de cultivo de maneira racional, onde tanto a disponibilidade de nutrientes do meio de cultura escolhido, bem como os parâmetros físicos como: luminosidade, temperatura, agitação, pH, adição de

inibidores enzimáticos, aeração, uso de diferentes frascos de cultura, adição de sais inorgânicos e materiais adsorventes, podem alterar significativamente a produção de metabólitos de maneira favorável ou não, ou até mesmo aumentar ou diminuir a produção de alguma substância específica (VANDERMOLEN et al., 2013).

De maneira geral, a escolha do parâmetro a ser alterado é aleatória. Por esse motivo, tais variações são conhecidas como induções randômicas, nas quais é desenvolvida uma grande quantidade de experimentos fazendo diversas alterações, de maneira sistematizada, a fim de verificar o aumento da variabilidade metabólica de determinado microrganismo (CHRISTIAN et al.; 2005).

Tendo em vista o exposto, e com a finalidade de otimizar as condições experimentais de cultivo da linhagem fúngica em questão, esse estudo aplicou a técnica OSMAC em dois momentos distintos. Primeiro, na escolha do meio de cultivo que forneceu maior diversidade metabólica; segundo, associado à ferramentas quimiométricas, que possibilitou criar um desenho experimental em forma de planejamento fatorial completo (Figura 14).

Figura 14: Fluxograma para metabolismo secundário baseado em OSMAC.



Fonte: Adaptado Liu et al., 2017. **Legenda:** *Design de Experimentos.

1.5.2 Quimiometria e Planejamento Fatorial Completo (2^3)

Entendida como a aplicação científica de métodos matemáticos e estatísticos projetados para medir a magnitude da correlação entre fatores físicos, de qualidade, e dados instrumentais analíticos usados para interpretar informações químicas, a quimiometria é uma realidade em diversos laboratórios de pesquisa. Essa metodologia é comumente aplicada quando se deseja identificar, num universo de variáveis, aquelas com maior importância ou efeito sobre uma resposta de interesse (CHARLES; ALAMSJAH, 2019).

Segundo Teófilo e Ferreira (2006), a aplicabilidade da quimiometria está em definir de maneira objetiva, quais fatores interferem com maior significância numa dada resposta, e quais são os ajustes que levarão ao melhor resultado. De maneira geral, essa triagem é feita por meio de planejamentos fatoriais (completo e fracionário), onde o pesquisador, com auxílio de dados bibliográficos, irá identificar as variáveis que mais se adequam ao objeto de estudo (FILHO, 2017).

Normalmente, a combinação de k fatores (variáveis) é investigada em dois níveis, consistindo num planejamento fatorial de 2^k experimentos, em que os níveis são nomeados pelo sinal (-) para o nível mais baixo e (+) para o nível mais alto, onde a partir de então, todas as combinações possíveis desses dois níveis são investigadas (MONTGOMERY, 2003). Por esse aspecto, Filho (2017) propõe que o planejamento fatorial completo seja utilizado quando se deseja testar entre duas a quatro variáveis, em dois níveis, podendo fazer no máximo 16 experimentos (2^4), e em situações que se queira testar mais de cinco variáveis, utilizar o planejamento fatorial fracionário, pois executará um número menor de experimentos.

Depois dessa primeira etapa de triagem, e de posse dos fatores que possuem maior efeito sobre uma dada resposta em estudo, outra ferramenta estatística muito eficaz é o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), que permite a exploração de todo o espaço amostral com pontos axiais definidos e equidistantes de um ponto central (MATEUS et al., 2001). Essa ferramenta aliada à Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) permite a otimização de variáveis e obtenção do ponto ótimo, a partir da identificação da relação entre variáveis controláveis e resposta do sistema analisado (MYERS; MONTGOMERY, 1995).

As vantagens dos planejamentos fatoriais estão na redução do número de experimentos sem prejuízo na qualidade da informação, observar interações entre

as variáveis, conhecer antecipadamente a quantidade de experimentos a serem realizados para alcançar determinado objetivo, bem como favorecer a economia de materiais, tempo e resíduos químicos, o que se apoia nos princípios da química verde (FILHO, 2017).

Sendo assim, o uso dessa ferramenta no estudo do metabolismo secundário e da quimiodiversidade de produtos naturais de fungos endofíticos associados à algas marinhas torna possível extrair, com alta reprodutibilidade, uma grande quantidade de informações usando diferentes condições de cultivo, que podem ser modificadas, com um número mínimo de experimentos, permitindo, assim, estimar a totalidade de possíveis interações entre parâmetros eleitos para análise, bem como prever condições otimizadas para condução de experimentos através de modelos de regressão (PILON et al., 2016).

Portanto, de posse dessas informações, esse trabalho propôs um desenho experimental em forma de planejamento fatorial completo 2^3 , o que gerou oito experimentos, onde as variáveis escolhidas para análise foram temperatura, tempo de cultivo e luminosidade, conforme será detalhado adiante, a fim de verificar como resposta o aumento da variabilidade química dos metabólitos produzidos ao acompanhar a disposição de bandas cromatográficas, analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector com Arranjo de Diodos (CLAE-DAD).

1.5.3 Molecular Networking e a Plataforma GNPS

A rede de interações moleculares, comumente conhecida por *Molecular Networking*, vem sendo cada vez mais consolidada, quando o objetivo é aperfeiçoar e acelerar a anotação de metabólitos em extratos brutos. Essa ferramenta atua agrupando *clusters* (conjunto de nodos e arcos), dentro de uma ou mais amostras, que possuem perfil de fragmentação semelhante em relação à espectrometria de massas (EM) tandem (WANG et al., 2016).

Para Bauermeister et al. (2022), a análise de espectros de massas, especialmente os de fragmentação sequenciais (MS/MS), tem sido amplamente difundida em metabolômica, devido a capacidade em detectar e quantificar uma diversidade de moléculas em amostras biológicas complexas. Um exemplo claro dessa nova abordagem, tem sido o desenvolvimento de algoritmos, ferramentas

computacionais e plataformas capazes de compilar tais informações, como a plataforma Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS).

O GNPS possui sua própria biblioteca espectral voltada para análise de conjuntos de dados em experimentos de espectrometria de massas, que permite gerar redes moleculares e obter informações químicas de uma variedade de amostras/ extratos ao mesmo tempo, onde o algoritmo é capaz de organizar cada espectro adquirido, e os categorizar por similaridade, cujo valor calculado será o cosseno do ângulo formado entre os vetores resultantes obtidos pelo alinhamento espectral e comparação do deslocamento dos íons fragmento de cada espectro presente nas amostras ou entre as amostras e os espectros de referência depositados no banco de dados (PILON et al., 2021).

Por esse aspecto, a química de produtos naturais voltada à compreensão sistemática de eventos multivariados empregando EM, associado à ferramentas de bioinformática e análises quimiométricas, tem favorecido o esquadramento de um vasto conjunto de dados relacionados a extratos não só de plantas, mas também de microrganismos, em especial fungos endofíticos, suscitando informações valiosas quanto a rotas biossintéticas envolvidas em grupos distintos (RUSSO et al., 2022).

Outras ferramentas têm sido utilizadas em conjunto com as redes moleculares, as quais são compostas por algoritmos, capazes de prever possíveis padrões de fragmentação, para os constituintes de determinado banco de dados estruturais previamente disponíveis, com base apenas em suas estruturas químicas. Como por exemplo, no próprio GNPS temos o DEREPLICATOR que consiste numa ferramenta que permite desreplicar produtos naturais peptídicos conhecidos em dados de MS/MS, e o Networking Annotation Propagation (NAP) que usa as redes moleculares, e os *hits* obtidos na biblioteca do GNPS, para ranquear as moléculas candidatas a serem anotadas a cada nodo, facilitando a conferência manual dos resultados (MOHIMANI et al., 2018; DA SILVA et al., 2018; FOX RAMOS et al., 2019).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Aplicar métodos quimiométricos do tipo planejamento fatorial completo 2^3 e Delineamento por Composto Central Rotacional (DCCR) para buscar uma maior produção metabólica do fungo endofítico *Hypoxylon monticulosum*, isolado da alga marinha *Acanthophora spicifera* bem como avaliar os perfis químicos e biológicos dos metabólitos secundários produzidos.

2.2 ESPECÍFICOS

- Cultivar o fungo endofítico *Hypoxylon monticulosum* e *Annulohypoxylon stygium* isolados da alga *A. spicifera*, em diferentes meios de cultivo (Malte, MBD, Czapek e Arroz), variando o tipo de água utilizada para o preparo dos mesmos (água do mar e água ultra pura) e obter seus extratos brutos.
- Aplicar a metodologia de planejamento fatorial completo (2^3) para avaliar a influência das condições de cultivo testadas na diversidade química do fungo *H. monticulosum*, bem como criar redes moleculares - *Molecular Networking* - na plataforma GNPS.
- Otimizar o número de metabólitos produzidos por *H. monticulosum* por meio de DCCR associado à MSR.
- Obter o extrato bruto em escala ampliada de *H. monticulosum* em condições otimizadas, e fracioná-lo por coluna a baixa pressão e CLAE-DAD semi-preparativo.
- Elucidar as estruturas químicas das substâncias isoladas através da combinação de métodos espectroscópicos (dados de RMN uni e bidimensionais e UV) e espectrométricos (EM e CG-EM).
- Avaliar o potencial antimicrobiano, anticolinesterásico, citotóxico e nematocida dos extratos.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Meio de cultivo

Tabela 1: Meios de cultivo utilizados para cultivo dos fungos endofíticos.

Meios de cultivo	Tipo	Marca
BDA	Sólido	Acumedia
Arroz	Sólido	Parboilizado
MDB	Líquido	Acumedia
Malte	Líquido	Kasvi
Czapeck	Líquido	Kasvi

Fonte: Autor.

3.1.2 Solventes gerais

Foram utilizados solventes padrões analíticos (P.A) ou destilados como metanol, acetato de etila e etanol das marcas Synth e Merck para extração e fracionamento. Em análises de RMN 1D e 2D utilizou-se os solventes deuterados DMSO- d_6 e CH₃OH- d_4 das marcas Sigma-Aldrich e Deutero, respectivamente.

3.1.3 Equipamentos gerais para o desenvolvimento do projeto

Os extratos e frações foram concentrados em evaporador rotatório da Buchi R-114 (banho de aquecimento B-480), sob pressão reduzida com auxílio de bombas de vácuo D-91126 Schwabach da Heidolph Instruments e refrigeração Marconi BTC-9090.

Para esterilização de material foi usada uma autoclave vertical da marca Phoenix Luferco, e para os trabalhos com microrganismos foi utilizada uma câmara de fluxo laminar vertical da marca Pachane.

As amostras foram pesadas em balanças Mettler Toledo AG245 e AG204 (analíticas) e Marconi BG2000 (semi-analítica).

As cromatografias em coluna (CC) foram realizadas em colunas de vidro, empregando como fase estacionária sílica de fase reversa do tipo octadecil silano (C-18), da marca Sorbent Technologies, com porosidade de 60 Å e tamanho de partículas de 40-75 µm (200-400 mesh). As dimensões das colunas variaram de acordo com a quantidade de material a ser analisado.

3.1.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

As análises por CLAE-DAD foram realizadas em dois equipamentos da marca Shimadzu, a saber:

- Analítico: duas bombas LC-20AT, degaseificador DGU-20A3, comunicadora CBM-20A, injetor automático SIL-20A, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, forno modelo CTO-20A.
- Analítico e Preparativo: duas bombas LC-6AD, comunicadora CBM-20A, injetor automático (modo analítico) SIL-10AF, detector de arranjos de diodos SPD-M20A.

O tratamento dos dados foi obtido através do software Shimadzu LC Solution (versão 1.25 SP2). Além disso, foram utilizadas colunas C-18 Phenomenex Gemini e Luna (250 x 4.60 mm; 5 µm; 110Å) no modo analítico, e coluna C-18 (2) Phenomenex Luna (250 x 10 mm; 5µm; 100Å) no modo semi-preparativo.

Para as análises em modo analítico, as amostras (8,0 mg) foram solubilizadas em 1 mL de solução MeOH:H₂O (95:05) e submetidas a um "clean up" utilizando cartuchos de sílica C-18 (Mackerey-Nagel Chomabond® - 3mL/500mg). Cada injeção foi de 10 µL.

Para as análises em modo semi-preparativo, as amostras também foram solubilizadas em solução MeOH:H₂O (95:05) e submetidas ao "clean up" utilizando cartuchos de sílica C-18. Em seguida, foram secas e diluídas em solução de MeOH:H₂O e/ou ACN:H₂O de mesma polaridade que o início da corrida, até concentração de 20 mg.mL⁻¹. Antes da injeção as amostras foram devidamente filtradas em membranas PTFE (0,22 µm). Cada injeção foi de 100 µL.

Em todas as análises por CLAE-DAD foram utilizados solventes de grau CLAE (Merck Millipore Lichrosolv® ou J. T. Baker Solusorb®) e água ultra pura (MilliQ).

3.1.5 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN de ^1H e ^{13}C)

Os espectros de RMN de ^1H (300 e 600 MHz) e ^{13}C (75 e 151 MHz) uni e bidimensionais foram realizados em espectrofotômetro Bruker 300 Fourier (7,1 T) e Bruker Ascend 600 (14,1 T).

3.1.6 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

As análises de cromatografia em fase gasosa foram realizadas em um cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo QP2020, com ionização por elétrons (EI), equipado com injetor automático AOC-20i, e coluna capilar Restek® SH-RTx-5MS (5% difenil / 95% dimetil polisiloxano) com dimensões de 30m x 0,25 mm (D.I) x 0,25 μm (espessura do filme).

A análise seguiu as seguintes condições:

- Temperatura do injetor: 260 °C.
- Modo de injeção: splitless/split (modo de Grob) início splitless, 0,75 min. split (1/50) e 2 min. split 1/20.
- Temperatura do detetor: 310 °C.
- Vazão do gás de arraste (N_2): 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, gás de *make up*: 29 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, ar sintético: 10 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e hidrogênio: 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.
- Coluna: 140°C (3 min) $\longrightarrow$ 320 °C (10 min)

As condições cromatográficas analisadas por CG-EM tiveram ionização por impacto eletrônico a 70 eV, e a faixa das massas de aquisição foram de m/z 50-500 Daltons.

Para esse tipo de análise os extratos foram submetidos às reações de derivatização:

- Metoximação: 7,0 mg da amostra foram solubilizados em 80 μL de uma solução de metoxiamina em piridina (20 mg/ml) e em seguida adicionou-se mais 100 μL de piridina e aqueceu-se em banho-maria a 30 °C por 90 min.
- Sililação: Na amostra metoximada adicionou-se 200 μL de MSTFA [N-metil-N (trimetilsilil) trifluoroacetamida], homogeneizou-se bem e aqueceu-se a 37°C por 30 min.

Após esses procedimentos, a amostra foi filtrada com microfiltro de 0,22 μm e transferida para vial com insert de 350 μL .

Estas reações são necessárias para que as substâncias desconhecidas presentes se tornem mais voláteis e com maior estabilidade térmica, permitindo a análise por CG-EM. Essa técnica consiste na substituição dos hidrogênios ativos presentes nos grupamentos -OH, -SH, -NH e -COOH por unidades de trimetilsilano (TMS) ou tertbutildimetilsilano (TBDMS).

As estruturas de moléculas propostas foram analisadas pelo software Shimadzu GCMS solution Ver. 2.61, os índices de retenção (IR) foram calculados pela equação de Van den Dool e Kratz, 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 (Instituto Nacional de Normas e Tecnologia).

3.1.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM)

Equipamento Utilizado: Sistema LC Shimadzu®: Bomba: LC-20AD. Detector de Arranjo de Diodos: SPD-M20A. Injetor automático: SIL-20AHT. Módulo de Comunicação: CBM-20A. Modo: Auto-MS. MS/MS Frag Ampl: 75%. Full: 50-1200 m/z. Espectrômetro de Massas: Amazon SL Bruker®. Fonte de ionização: eletrospray (ESI). Analisador: IonTrap.

Método CLAE: Fase móvel: Metanol (B)/ Água ultra pura (A). Gradiente exploratório: 5% a 100% de B em 45 minutos, 45-55 minutos em 100% de B, 55-57 minutos retornando a condição inicial de 5% de B e de 57-68 minutos permanecendo em 5% para o reequilíbrio da coluna. Fluxo: 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Fase estacionária: coluna C-18 Phenomenex Gemini e Luna (250 x 4.60 mm; 5 μm ; 110Å) no modo analítico. Concentração do extrato: 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

O software utilizado para tratamento dos dados foi Data Analysis versão 4.3.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Seleção e coleta da macroalga

Em abril de 2015 foram coletadas no costão direito da Praia da Fortaleza, Ubatuba-SP, pequenas quantidades das partes saudáveis da alga *Acanthophora spicifera* para o isolamento de fungos endofíticos. O material coletado foi lavado cuidadosamente em água do mar e armazenado em frascos contendo água do mar esterilizada por autoclavagem e o antibiótico sulfato de gentamicina (140 mg.mL^{-1}). Logo em seguida, acondicionou-se esse material em caixas térmicas, que foram transportadas ao Instituto de Química - UNESP/Araraquara.

3.2.2 Obtenção e cultivo do endófito

Já em laboratório, a alga foi submetida a esterilização utilizando os seguintes métodos:

- Método 1: imersão em etanol 70% por 10 segundos.
- Método 2: imersão em solução de NaOCl 1% por 6 segundos e em etanol 70% por 2 segundos.

Ambos os procedimentos foram seguidos de uma dupla lavagem em água estéril por 10 minutos (SILVA, 2005).

Após o processo de esterilização, a alga foi seccionada com uso de pinça e bisturis cirúrgicos estéreis e transferida para placas de Petri contendo meio de cultivo sólido batata-dextrose-ágar (BDA), ao qual foi adicionado, após ser autoclavado, o antibiótico sulfato de gentamicina ($100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) para evitar o crescimento bacteriano. Para cada método foram usadas duas placas preparadas com água ultra pura e duas placas com água do mar. Para controle da eficácia do método de esterilização, uma alíquota de água de lavagem foi inoculada em BDA/água ultra pura e BDA/água do mar.

O crescimento dos fungos foi monitorado, e repiques sucessivos foram realizados até a obtenção das linhagens puras, as quais foram preservadas em frascos com água esterilizada (água do mar ou ultra pura) e o fungo em meio sólido BDA. Em seguida, os frascos foram lacrados, mantidos em temperatura ambiente e

depositados na micoteca do Departamento de Bioquímica e Química Orgânica, IQ-UNESP (**Figura 15**).

A avaliação da pureza da linhagem fúngica foi realizada pela aparência uniforme das placas, sendo posteriormente preservadas em "slants", contendo água estéril (MOORE-LANDECKER, 1996). A partir da alga *A. spicifera* foi possível isolar os fungos *H. monticulosum* e *A. stygium*.

Figura 15: Metodologia de esterilização, isolamento e purificação dos endófitos.



Fonte: Honório adaptado, 2018.

3.2.3 Identificação dos fungos *H. monticulosum* e *A. stygium*

A identificação dos fungos endofíticos *H. monticulosum* e *A. stygium* isolados de *A. spicifera* foi realizada em parceria com o Prof. Dr. Marcos Antônio Soares da UFMT, sendo que as cepas fúngicas foram agrupadas morfológicamente e o agrupamento foi confirmado pela análise de traços em microscópicos utilizando lâminas de microcultura e posteriormente comparados com dados taxonômicos.

A identificação seguiu através do sequenciamento Sanger de regiões específicas do DNA (ITS) do microrganismo. Inicialmente foi feita a extração do

material genético kit (ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™), seguido do preparo das reações para o sequenciamento. O sequenciamento das amostras foi feito automaticamente por eletroforese capilar no equipamento ABI3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) e, em seguida, foi realizado o alinhamento das sequências de nucleotídeos produzidas com as sequências de referência depositadas no *GenBank* (banco de dados genômicos).

A PCR para amplificação da região de codificação ITS (Internal Transcribed Sequence), que é a região mais utilizada mundialmente para identificação de fungos, foi realizada com auxílio dos primers ITS1 e ITS4 na concentração de 10 picomols. O volume final de cada amostra foi de 25 microlitros, posteriormente inserida no termociclador usando a programação abaixo:

- I) Inicialização: 94°C por 3 min.
- II) 35 ciclos: 94°C por 0:45s, 49°C por 0:45s, 72°C por 0:50s
- III) Extensão final 72°C por 10 min.

Para avaliar a eficiência do PCR, foi preparado um gel de agarose 0.85% corado com brometo de etídeo, onde foi aplicado, em cada poço, 5 microlitros da amostra junto com tampão. O gel foi submetido a eletroforese com intensidade de 90 volts durante 40 min. Em seguida, o gel foi analisado por fotodocumentador UV, para observar a formação de bandas no gel, indicando que a metodologia para o PCR foi eficiente. Com isso, esta foi submetida a sequenciamento usando os reagentes big dye, água ultrapura e big dye terminator, nas concentrações indicadas pelo fabricante, sendo então inseridas no sequenciador de Sanger modelo ABI 3500 por 12h.

O resultado da etapa anterior é uma sequência de nucleotídeos, com cerca de 500 pares de base (pb) por amostra. As sequências foram visualizadas no software Bioedit e cada sequência foi comparada com o banco de dados *GenBank* (ferramenta Blast), que fornece o resultado da similaridade em forma de porcentagem, sendo considerado satisfatório as similaridades acima de 96%. As espécies foram classificadas nas categorias fitopatógeno, saprófito, micotrófico, entomopatógeno coprófilos, de acordo com os critérios estabelecidos pelos relatórios da literatura e os Serviço de Pesquisa Agrícola do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA-ARS) banco de dados.

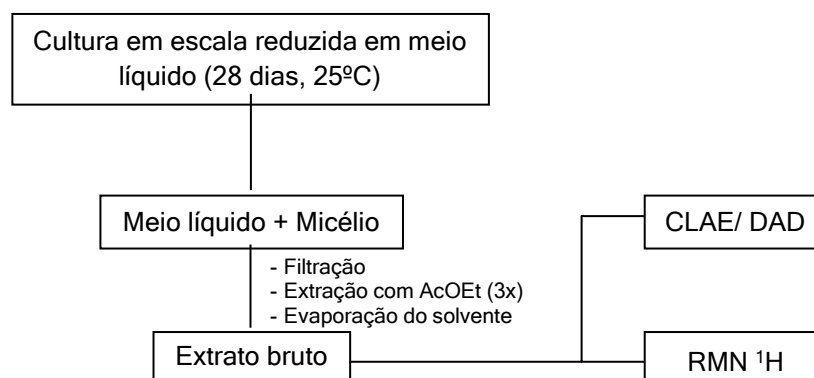
3.2.4 Obtenção dos extratos brutos dos fungos endofíticos em escala reduzida

A partir dos resultados dos trabalhos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa descritos anteriormente, as linhagens fúngicas AS-01 (*Annulohypoxylon stygium* - MQ), AS-02 (*Hypoxylon monticulosum* - MAR) e AS-09 (*Hypoxylon monticulosum* - MQ) foram cultivadas em diferentes meios de cultura para a obtenção de diferentes extratos brutos.

As linhagens fúngicas preservadas, foram repicadas em placas de Petri contendo BDA. Após o crescimento desses fungos, aproximadamente, um terço de micélio de cada placa de Petri foi inoculado em cada meio líquido (MBD, Malte e Czapeck) em modo estático por 28 dias a 25°C, e em meio sólido (arroz) por 21 dias a 25°C também em modo estático.

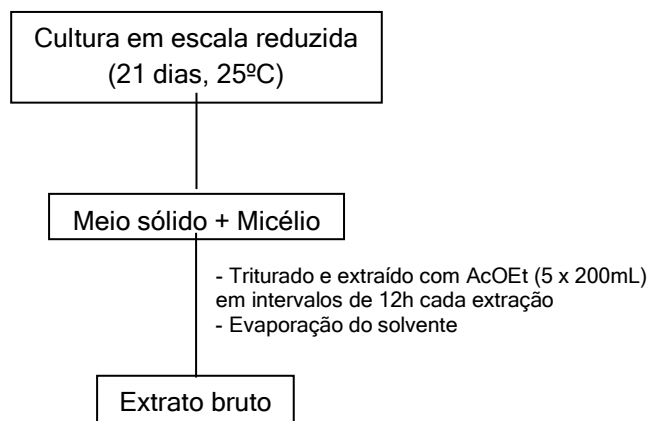
Os meios líquidos foram preparados tanto com água do mar como com água ultra pura esterilizada (3 frascos de Erlenmeyer - boca larga - contendo 200 mL de meio líquido). Após o período de incubação, o caldo foi separado do micélio por filtração, e o filtrado foi submetido a partição líquido-líquido com acetato de etila. Após evaporação do solvente orgânico, foi obtido o extrato bruto de cada fungo (**Esquema 1**). Para o meio sólido, também foi preparado com água do mar e com água ultra pura esterilizada (3 frascos de Erlenmeyer - boca larga - contendo 90 g de arroz e 75,0 mL de água). Após o período de incubação, o meio sólido foi triturado e extraído com acetato de etila (5 x 200 mL) em intervalos de 12h a cada extração (**Esquema 2**).

Esquema 1: Obtenção dos extratos brutos das cepas fúngicas cultivadas em meio líquido (MBD, Malte e Czapeck).



Fonte: Autor.

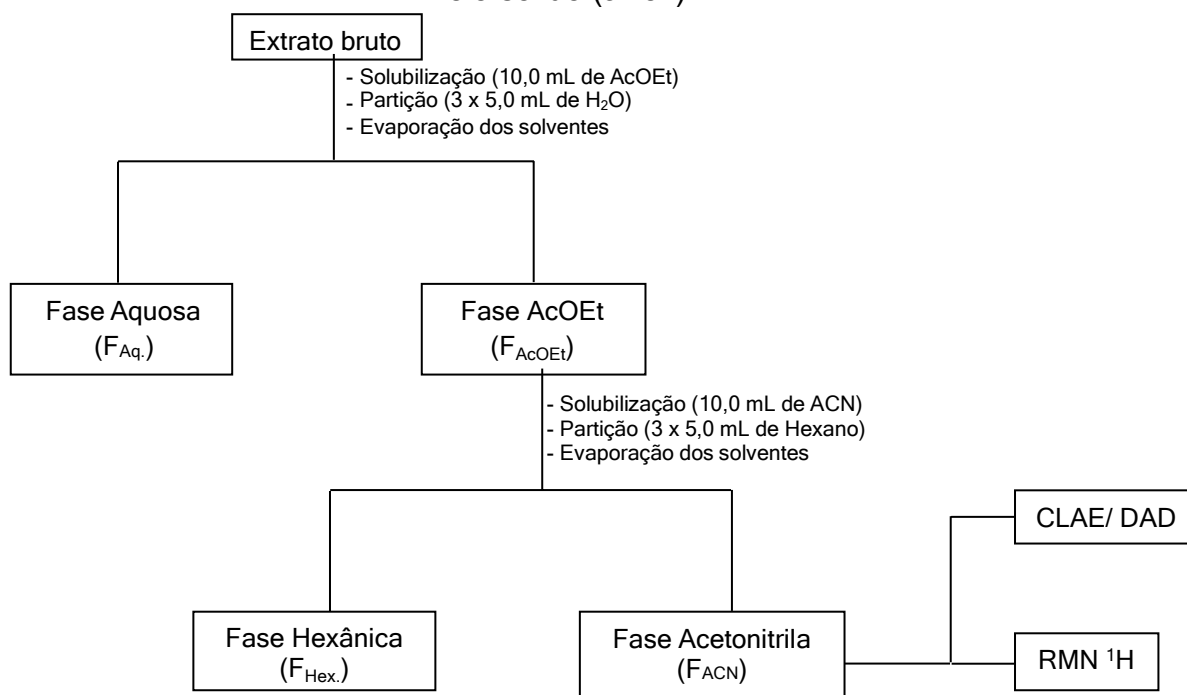
Esquema 2: Obtenção dos extratos brutos das cepas fúngicas cultivadas em meio sólido (arroz).



Fonte: Autor.

Após a obtenção dos extratos brutos do meio sólido, os mesmos foram fracionados de acordo com o **Esquema 3**.

Esquema 3: Fracionamento dos extratos brutos das cepas fúngicas cultivadas em meio sólido (arroz).



Fonte: Autor.

Os solventes recolhidos foram reutilizados nestas extrações, e ao término desses processos, foram descartados de maneira adequada em bombonas

devidamente rotuladas, e encaminhadas ao descarte, seguindo as Normas Gerais de Gerenciamento de Resíduos Químicos do IQ/ UNESP.

3.2.5 Construção da curva de crescimento do endófito *H. monticulosum* (AS-02) para o planejamento fatorial completo 2³

O crescimento da massa fúngica filamentosa de AS-02 na cultura de extrato de batata seguiu metodologia semelhante ao se obter os extratos brutos em escala reduzida. Contudo, baseando-se no trabalho de Cardoso, Assis e Nahas (2009), o método teve adaptações e o crescimento foi avaliado pelo peso seco micelial.

Para isso, o fungo *H. monticulosum* (AS-02) foi repicado em placas de Petri contendo meio BDA. Após o crescimento do fungo, um terço de micélio de cada placa de Petri foi inoculado em meio líquido de batata-dextrose (MDB), solubilizado em água do mar, esterilizado em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio líquido, e cultivado por 7, 14, 21, 28 e 35 dias a 25 °C, em modo estático.

Sendo assim, a curva de crescimento do fungo foi construída com cinco pontos referentes a cada período de fermentação, e foi obtida a partir do peso seco do micélio produzido (g/L) plotados versus tempo de incubação, onde cada ponto da curva de crescimento foi feito em triplicata. Para isso, o micélio foi separado do meio de cultura através da filtração a vácuo, empregando-se funil de Buchner, contendo papel de filtro previamente seco e pesado à 100 °C por 24 horas. O micélio obtido após filtração, foi levado a estufa nas mesmas condições de temperatura e tempo de secagem, logo em seguida, pesado para determinar o peso seco.

Os dados foram avaliados por meio do software Microsoft Office Excel® versão 365.

3.2.6 Planejamento Fatorial Completo (2³) e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Na tentativa de melhorar as condições experimentais para uma maior produção metabólica do fungo *H. monticulosum* (AS-02), foi aplicado um planejamento fatorial completo (2³) com a realização de oito (08) experimentos nas mais diversas condições das variáveis, temperatura (X₁), tempo de fermentação (X₂)

e luminosidade (X_3), modificando-as em dois níveis, sendo (-1) para nível baixo e (1) para nível alto. Além disso, foram realizados mais três (03) experimentos em torno do ponto central (PC), considerado nível zero (0), caracterizado pela média dos valores dos níveis alto e baixo de cada variável. Esse tipo de estratégia experimental é uma etapa de suma importância quando se deseja identificar, num universo de variáveis, aquelas que são mais significativas sobre uma dada resposta.

Para tanto, nessa estratégia, a resposta escolhida para avaliar a maior produção metabólica do fungo *H. monticulosum* foi o número de picos obtidos em análise de CLAE-DAD dos extratos brutos em cada ensaio realizado. Aqui, vale destacar que os extratos foram obtidos seguindo os mesmos métodos da obtenção do extratos brutos em escala reduzida (Esquema 1), tendo como diferenças as condições das variáveis escolhidas em cada ensaio (**Tabela 2**).

Tabela 2: Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 para uma maior produção metabólica do fungo *H. monticulosum*.

Ensaio	Níveis codificados			Valores reais		
	X_1	X_2	X_3	Temperatura (°C)	Tempo (Dias)	Luminosidade (Horas)
1	-1	-1	-1	20	14	6
2	1	-1	-1	30	14	6
3	-1	1	-1	20	28	6
4	1	1	-1	30	28	6
5	-1	-1	1	20	14	18
6	1	-1	1	30	14	18
7	-1	1	1	20	28	18
8	1	1	1	30	28	18
9	0	0	0	25	21	12
10	0	0	0	25	21	12
11	0	0	0	25	21	12

Fonte: Autor.

Após a realização do planejamento fatorial completo 2^3 , foi possível perceber que todas as variáveis analisadas foram significativas. Sendo assim, partiu-se para o método DCCR, no qual foram realizados mais nove (09) ensaios, dos quais seis (06) foram alterando as condições das variáveis em uma rotação de nível equivalente a 1,68 tanto para baixo (-) como para o alto (+), e mais três (03) ensaios em torno do ponto central. Semelhante ao planejamento fatorial completo, os extratos também

foram obtidos seguindo os mesmos métodos da obtenção dos extratos brutos em escala reduzida (Esquema 1) (**Tabela 3**).

Tabela 3: Matriz do DCCR para otimização da produção metabólica do fungo *H. monticulosum*.

Ensaio	Níveis codificados			Valores reais		
	X ₁	X ₂	X ₃	Temperatura (°C)	Tempo (Dias)	Luminosidade (Horas)
12	-1,68	0	0	16,6	21	12
13	1,68	0	0	33,4	21	12
14	0	-1,68	0	25	9	12
15	0	1,68	0	25	33	12
16	0	0	-1,68	25	21	2
17	0	0	1,68	25	21	22
18	0	0	0	25	21	12
19	0	0	0	25	21	12
20	0	0	0	25	21	12

Fonte: Autor.

Para fornecer as condições do controle de temperatura nos ensaios, foi utilizada uma incubadora shaker de bancada SL-222/E, Solab; e para o controle de luminosidade, os frascos Erlenmeyer foram envoltos com papel alumínio. Para tratamento dos dados de CLAE-DAD foi utilizado o software Shimadzu LC Solution (versão 1.25 SP2), em que as amostras foram trabalhadas em modo analítico conforme o descrito no item 3.1.4, e o número de picos foi contado considerando o valor da área mínima de 25000, e descontando os picos da área do branco (controle negativo). Já os dados estatísticos foram obtidos com o auxílio do software Statistica versão 10.

3.2.7 Dados da Rede de Interações Moleculares (*Molecular Networking* – GNPS)

Os espectros de massas sequenciais (MS/MS) foram adquiridos em CLAEauto MS/MS, no equipamento Amazon SL Bruker®, fonte de ionização: eletrospray (ESI), analisador: ion trap (seção 3.1.6). Os dados foram convertidos do formato .d para o formato .mzML por meio do software MS-Convert que faz parte do pacote ProteoWizard. Logo em seguida, os dados foram depositados no repositório Massive com auxílio do software WinSCP. A rede molecular clássica foi gerada na plataforma GNPS e os dados comparados com suas bibliotecas disponíveis.

Os parâmetros de tolerância foram: massa do íon precursor 2,0 Da e para íon do fragmento MS/MS de 0,5 Da. Cosseno: 0,65. Mínimo de picos: 06. Mínimo de cluster: 02. Finalmente, o tamanho máximo de uma família molecular foi definido como 100 e as bordas de pontuação mais baixas foram removidas das famílias moleculares até que o tamanho da família molecular estivesse abaixo desse limite (WANG et al., 2016). O resultado da rede molecular pode ser observado pelo link: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=59d3d3ac2f6549f18fede09784e03883>.

Foram utilizadas também as ferramentas NAP e Deraplicator para desreplicação *in silico* dos compostos, onde esta foi realizada com e sem a busca de análogos peptídicos, e aquela foi direcionada para propagar informações de correspondência de biblioteca espectral, definindo como banco de dados a própria plataforma GNPS e o NPatlas, levando em conta os adutos $[M-H]^+$ para as buscas.

Além disso, para uma melhor compreensão das redes moleculares geradas pelo *Molecular Networking*, foi utilizado o MolNetEnhancer, que permitiu uma visão geral dos dados metabolômicos quanto às classes e sub-classes químicas anotadas com maior probabilidade de acerto para cada *cluster* (ERNST et al., 2019).

3.2.8 Obtenção do extrato bruto otimizado de *H. monticulosum* em escala ampliada

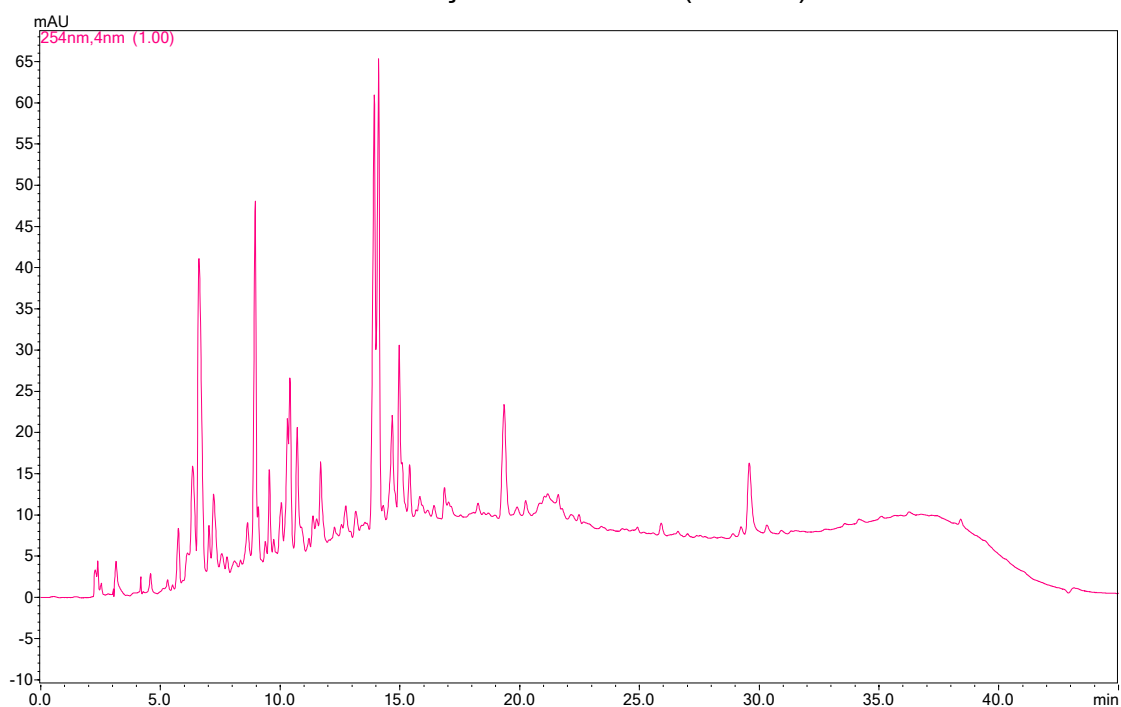
Para obtenção do extrato bruto otimizado em escala ampliada, o fungo endofítico *H. monticulosum* (AS-02) foi cultivado em 09 frascos de Erlenmeyers (totalizando 1,8 L) contendo meio de cultura MBD, que gerou 750,8 mg de extrato. A metodologia de crescimento e extração foi a mesma utilizada no item 3.2.4, na qual o solvente foi evaporado e obteve-se o extrato bruto.

3.2.8.1 Fracionamento do extrato bruto em condições otimizadas (escala ampliada)

Observado o cromatograma de CLAE-DAD do extrato bruto otimizado em escala ampliada (**Figura 16**), parte do mesmo (587,6 mg) foi submetido a uma partição líquido-líquido (**Esquema 3**), que deu origem as fases aquosa (F_{aq} - 347,3 mg) e acetonitrila (F_{ACN} - 217,8 mg) conforme os cromatogramas das **figuras 17 e 18**, respectivamente. A fase aquosa (297,3 mg), também foi submetida a

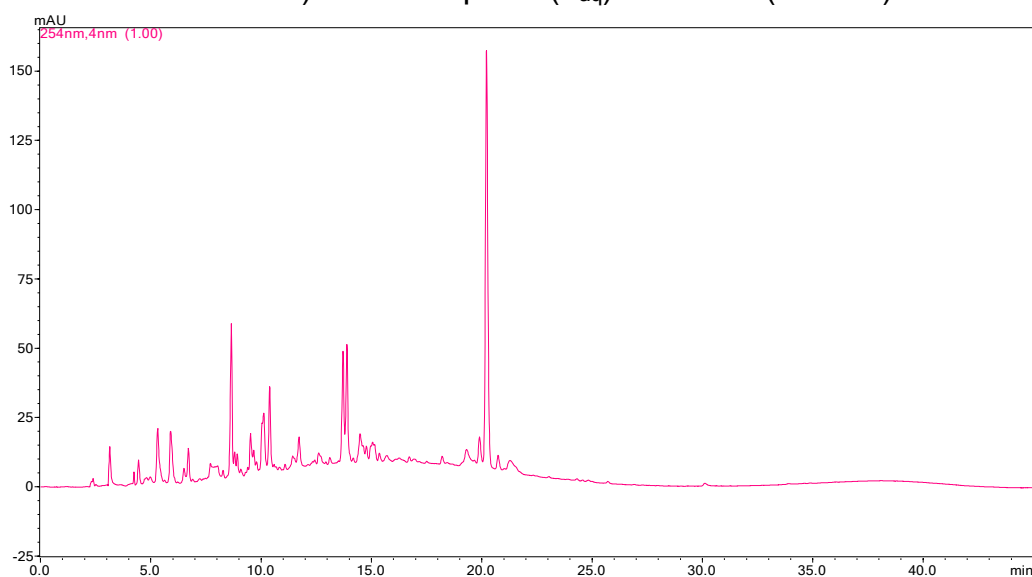
fracionamento por cromatografia em coluna sob vácuo, cuja fase estacionária foi composta por sílica de fase reversa (C-18 – 12,576 g, $\Phi = 1,0$ cm) e uma fase móvel gradiente de MeOH:H₂O, resultando em seis frações de 50 mL cada (**Tabela 4**).

Figura 16: Perfil cromatográfico em gradiente exploratório do extrato bruto de AS-02 em condições otimizadas (254 nm).



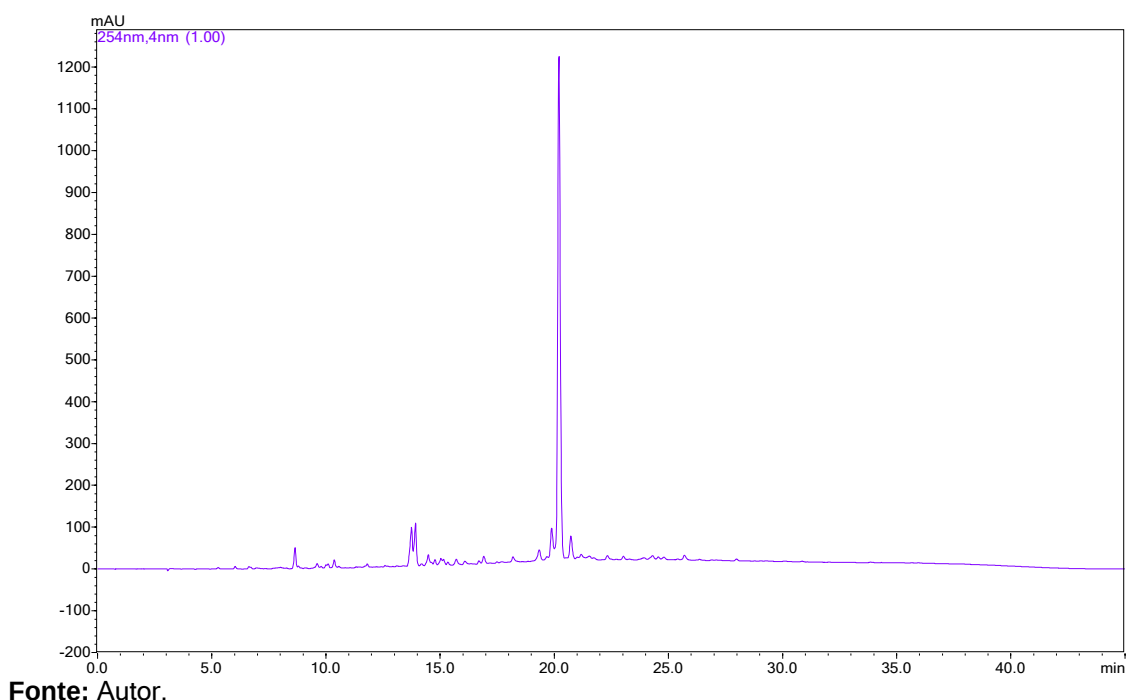
Fonte: Autor.

Figura 17: Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O v/v a 1 mL.min⁻¹; 40 minutos; modo analítico) da fase aquosa (F_{aq}) de AS-02 (254 nm).



Fonte: Autor.

Figura 18: Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% ACN:H₂O v/v a 1 mL.min⁻¹; 40 minutos; modo analítico) da fase acetoneitrila (F_{ACN}) de AS-02 (254 nm).



Fonte: Autor.

Tabela 4: Fracionamento da fase aquosa do extrato bruto de AS-02 por cromatografia em coluna com sílica derivatizada C-18.

Fração	Proporção de MeOH:H ₂ O	Massa (mg)
AS-02-F _{aq1}	10:90	83,4
AS-02-F _{aq2}	20:80	36,3
AS-02-F _{aq3}	30:70	39,0
AS-02-F _{aq4}	40:60	32,5
AS-02-F _{aq5}	50:50	35,3
AS-02-F _{aq6}	00:100	55,4

Fonte: Autor.

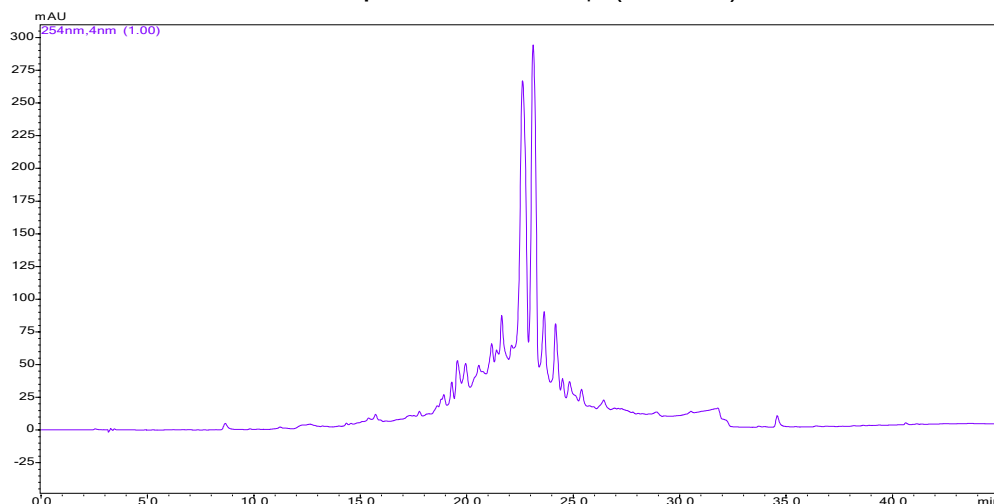
As frações foram analisadas por RMN de ¹H e por CLAE-DAD. A partir dos resultados obtidos, as frações, AS-02-F_{aq4} e F_{ACN} foram selecionadas para estudo.

3.2.8.1.1 Estudo da fração AS-02-F_{aq4}

A fração AS-02-F_{aq4} (32,5 mg) foi submetida à CLAE-DAD em escala semi-preparativa, no qual foi usado uma coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x 10 mm;

5 μ m; 100Å), isocrático de 40% MeOH:H₂O por 30 minutos e vazão de 4,0 mL.min⁻¹. Foram coletadas 10 frações de acordo com os picos do cromatograma (**Figura 19**).

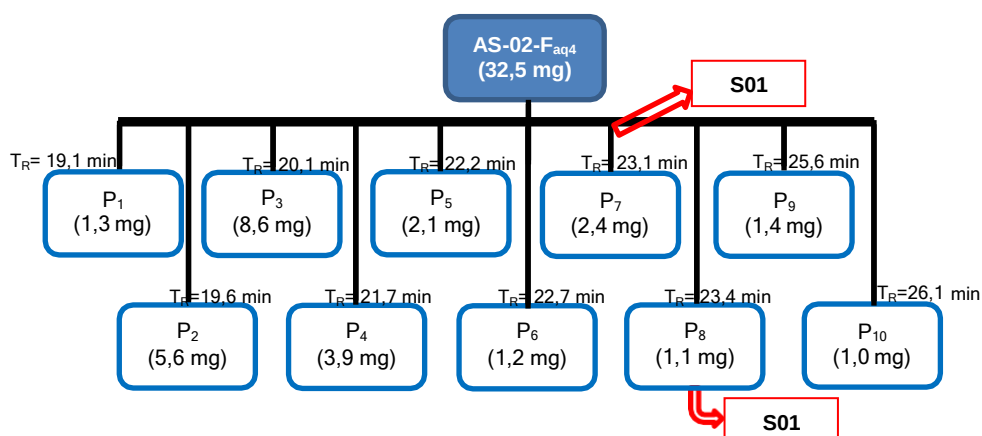
Figura 19: Cromatograma em escala semi-preparativa por CLAE-DAD da fração de fase aquosa AS-02-F_{aq4} (254 nm).



Fonte: Autor.

O **Esquema 4** representa o estudo da fração AS-02-F_{aq4} após CLAE-DAD semi-preparativo, em que todas frações foram analisadas por RMN de ¹H, sendo que as frações P₇ e P₈ forneceram a substância **Sub 01**.

Esquema 4: Isolamento dos metabólitos da fração AS-02-F_{aq4} produzidos por *H. monticulosum*.

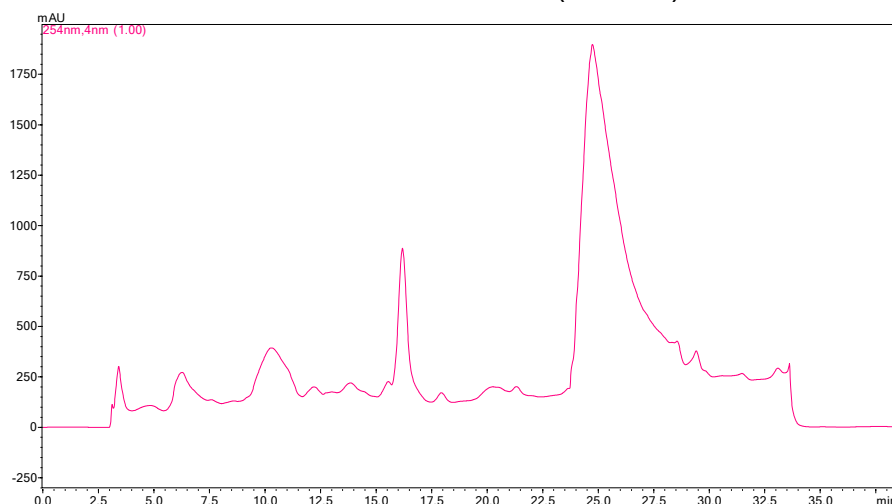


Fonte: Autor. **Legenda:** T_R= Tempo de Retenção.

3.2.8.1.2 Estudo da fração F_{ACN}

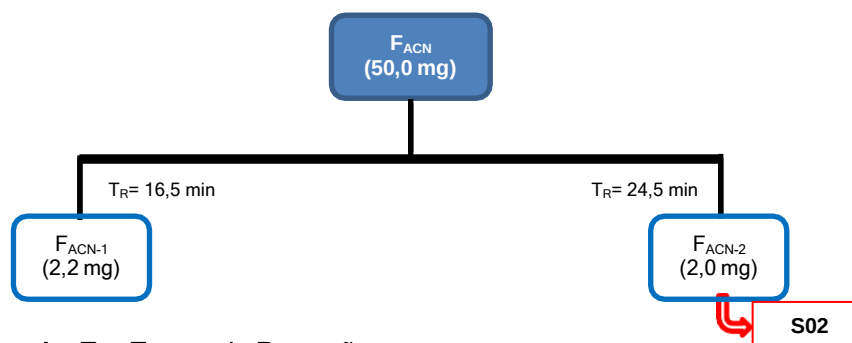
Parte da fração F_{ACN} (50 mg) foi submetida à CLAE-DAD em escala semi-preparativa, onde foi usada uma coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x 10 mm; 5 μ m; 100Å), com gradiente de 50 a 100% ACN:H₂O por 30 minutos e vazão de 4,0 mL.min⁻¹. Foram coletadas 02 frações de acordo com os picos do cromatograma mostrado na **figura 20**. O **Esquema 5** representa o estudo da fração F_{ACN} após CLAE-DAD semi-preparativo, onde todas frações foram analisadas por RMN de ¹H, sendo que a fração F_{ACN-2} forneceu a substância **Sub 02**.

Figura 20: Cromatograma em escala semi-preparativa por CLAE-DAD da fase acetonitrila de AS-02 (254 nm).



Fonte: Autor.

Esquema 5: Isolamento dos metabólitos da fração acetonitrila (F_{ACN}) produzidos por *H. monticulosum*



Fonte: Autor. **Legenda:** T_R= Tempo de Retenção.

3.2.9 Atividades Biológicas

Todos os extratos brutos obtidos no planejamento fatorial completo 2^3 , juntamente com aqueles produzidos na curva de crescimento do fungo AS-02 foram submetidos à avaliação biológica, os quais estão descritos na **Tabela 5** com os seguintes códigos.

Tabela 5: Extratos de AS-02 e respectivos códigos.

Código das amostras	
<i>Extratos Planejamento Fatorial Completo 2^3</i>	A
	B
	C
	D
	E
	F
	G
	H
	I
<i>Extratos Curva de Crescimento</i>	J
	K
	07
	14
	21
	28
	35

Fonte: Autor.

3.2.9.1 Avaliação do potencial antibacteriano

Estes ensaios foram realizados sob supervisão da professora Dr^a. Ilana Camargo do Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular (LEMiMo) da USP de São Carlos-SP.

Cerca de 7,0 mg de cada extrato foi diluído em DMSO para a preparação de uma solução estoque 10x concentrada. Posteriormente, a solução estoque foi diluída 1:10 em caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado (MHCA) (BD). A partir disso, cada extrato foi testado a 512 $\mu\text{g/mL}$ em 1% de DMSO, ou na maior concentração em que foi possível dissolver o composto sem que houvesse precipitação, e a adição do

inóculo foi realizada de acordo com o preconizado pelo CLSI (2015) para o método de microdiluição em caldo.

O controle positivo foi constituído pela adição da bactéria, sem a presença do extrato, a fim de observar o crescimento da mesma no caldo de MHCA. Já o controle negativo, ocorreu apenas a presença do meio de cultura, sem bactéria, para mostrar que não houve contaminação.

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

3.2.9.2 Triagem pontual de inibidores para as enzimas calicreína (KLK) e acetilcolinesterases (AChE e BChE)

Estes ensaios foram realizados em parceria com a professora Dr^a. Carmen Lúcia Cardoso do Grupo de Cromatografia de Bioafinidade e Produtos Naturais (GCBPN) da USP de Ribeirão Preto. Neste ensaio, além dos extratos citados, também foram testados os extratos brutos do DCCR e o extrato bruto otimizado em escala ampliada.

Cerca de 10,0 mg de cada extrato bruto foi submetido a esta triagem, onde soluções estoque das amostras foram preparadas a 10 mg.mL^{-1} em MeOH e diluídas posteriormente em soluções de trabalho de $1,0\text{ mg.mL}^{-1}$, armazenadas em geladeira. Além disso, foi utilizado como instrumentação um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência e velocidade modelo Nexera XR equipado com duas bombas de alta pressão modelo LC-20ADXR, câmara de mistura modelo MR180uLII (volume interno de 180 μL), degaseificador de membrana (on-line) modelo DGU-20A3R, um auto injetor modelo SIL-20A, detector de massas com comprimento de onda variável modelo SPDM20A, forno de colunas modelo CTO-20A e uma interface SHIMADZU CBM-20A. O equipamento está acoplado a um espectrômetro de massas Bruker

modelo AmaZon Speed com fonte tipo ESI (Electrospray Ion Source), duplo funil de íons e analisador do tipo Ion Trap controlado pelo software Compass 1.7.

3.2.9.2.1 Ensaio de ligantes com os biorreatores AChEee e ABChEhu

As amostras foram submetidas ao ensaio anticolinesterásico com as enzimas butirilcolinesterase humana (BChEhu) e acetilcolinesterase de enguia elétrica (AChEee), imobilizadas em dois biorreatores denominados ICERs de 30 cm x 0,01 mm em capilar de sílica fundida.

O procedimento envolve a reação enzimática de hidrólise dos substratos butirilcolina e acetilcolina respectivamente pelas enzimas BChEhu e AChEee, gerando os produtos colina e ácido acético. Para isso, a solução contendo a amostra é eluída de forma efetiva através do ICER em temperatura ambiente, com tempo total de análise de cerca de 3,6 minutos e ao final pode-se identificar a atividade de inibição amostra contra cada enzima comparando as áreas do pico do produto de hidrólise do cromatograma com massa $[M+H]^+$ 104,3 m/z com a solução controle. O composto galantamina foi utilizado como inibidor padrão de referência.

3.2.9.2.2 Ensaio de inibição pontual a 100 μ M

A triagem de inibição foi realizada com as soluções sendo preparadas em triplicatas e alíquotas de 10 μ L sendo injetadas no sistema CLAE-EM contendo os ICER-AChEee, ICER-BChEhu com uma vazão do sistema de 0,05 mL.min⁻¹ na bomba 1 e solução de acetato de amônio 15 mM, pH 8,0 como fase móvel.

Cada análise das amostras é realizada em triplicata e entre a cada uma é realizada triplicata do controle positivo, que consiste na avaliação da atividade enzimática sem o composto candidato a inibidor. Também foi realizada análise do controle negativo, que consiste na avaliação de possíveis interações secundárias de cada composto na auto-hidrólise do substrato da enzima, através da injeção da amostra com um ICER sem enzima.

Os percentuais de inibição foram obtidos comparando-se a área da atividade da enzima na presença do inibidor (Pi) com a área da atividade da enzima na ausência de inibidor (P0), de acordo com a **Equação 1** abaixo:

$$\% \text{ de inibição} = \left[1 - \frac{P_i - S_b}{P_0 - S_b} \right] \times 100$$

em que S_b representa a área da colina resultante da hidrólise espontânea do substrato de acetilcolina.

3.2.9.2.3 Ensaio de ligantes com KLK-Shp-NHS

Para as análises de inibição enzimática com a calicreína, utilizou-se a enzima do pâncreas de porco (KLK) previamente imobilizada em suporte de Sepharose-NHS, como descrito no artigo DE CARVALHO et al (2021).

O procedimento envolve a reação enzimática de quebra do substrato cloridrato de 7-amido-4metil-cumarina (Z-Phe-Arg-AMC), gerando o produto com atividade fluorescente 7-amido-4metil-cumarina. Preparou-se soluções de 25mg.mL⁻¹ KLK-Sepharose-NHS, e para o branco foi utilizado Sepharose-NHS sem adição da solução enzimática.

Cada uma dessas análises foi realizada em triplicata e teve seu respectivo controle negativo, contendo todos os outros reagentes relativos à análise e a solução suporte sem adição da enzima KLK.

A atividade enzimática foi monitorada utilizando um leitor de microplacas foscas por fluorescência com comprimento de onda de excitação e emissão de 380 nm e 440 nm, respectivamente, para detecção de 7-amino-4-metilcumarina, o produto da reação enzimática. O equipamento foi estabilizado a 37 °C, e a análise foi realizada em intervalos de 2 minutos durante 30 minutos, com agitação orbital 5 segundos antes de cada medição.

A avaliação da porcentagem de inibição foi realizada comparando a atividade controle da enzima na ausência do inibidor (Ac) com a atividade da enzima na presença do inibidor (Ai) através do cálculo descrito na **Equação 2**:

$$\text{Inibição Enzimática (\%)} = 100 - \left(\frac{A_i}{A_c} \times 100 \right)$$

3.2.9.3 Avaliação da atividade antitumoral (citotoxicidade)

Este ensaio foi realizado em parceria com a professora Dr^a. Letícia Lotufo do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais Marinhos (LAFARMAR) da USP

de São Paulo. Além dos extratos citados, também foram testados os extratos brutos do DCCR e o extrato bruto otimizado em escala ampliada.

O potencial citotóxico dos extratos brutos foi avaliado por meio de linhagens de células tumorais. As células HCT-116 (adenocarcinoma do cólon) foram cultivadas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EUA). O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Thermo Fisher Scientific) e 1% de penicilina estreptomicina (Thermo Fisher Scientific).

As células foram mantidas em uma incubadora (Panasonic, Osaka, Japão) com 5% de CO₂ a 37 °C. Para o ensaio de metiltiazol tetrazólio (MTT) (Thermo Fisher Scientific), as células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1×10^4 por poço, com 200 µL de meio de cultura. Após 24 horas, as amostras foram testadas em diferentes concentrações, 5µg/mL e 50µg/mL para a triagem.

Após o tratamento, as placas foram incubadas durante 72 horas. Dimetilsulfóxido (DMSO; 0,05%) (Synth, Diadema, SP, Brasil) foi usado como controle negativo, e o composto antineoplásico doxorrubicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi usado como controle positivo. Três horas antes do final do experimento, os meios de cultura foram substituídos por meios frescos contendo solução de MTT (0,5 mg/ mL). Ao final das 72 horas, a solução de MTT foi removida e o produto formazan foi solubilizado em 150 µL de DMSO. A absorbância foi obtida em 540 nm. Os valores de IC₅₀ e seu intervalo de confiança de 95% foram calculados por regressão não linear sigmoidal usando o software GraphPad Prism 6.

3.2.9.4 Bioensaio *in vitro* de nematotoxicidade

Estes ensaios foram realizados em parceria com a professora Dr^a. Maria Eugênia Lisei de Sá e o professor Dr. Thales Lima Rocha, ambos pesquisadores do Laboratório de Prospecção de Compostos Bioativos (LPCB) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Brasília.

Devido a baixa disponibilidade de massa, estes ensaios foram realizados apenas com os extratos brutos da curva de crescimento fúngico, e com os extratos do planejamento fatorial completo de A até F.

Sendo assim, alíquotas secas de 1000µg de amostra foram estocadas em tubos de microcentrifuga de 1,5ml, e foram enviadas para o Laboratório de Prospecção de Compostos Bioativos - LPCB. Logo em seguida, uma solução estoque de DMSO 1% foi preparada.

Após este procedimento, 1000µL de DMSO (1%) foi transferido individualmente com auxílio de micropipeta para cada um dos tubos de microcentrifuga contendo as amostras de fungo endofítico. Subsequentemente, cada tubo de microcentrifuga foi levado por aproximadamente 3 minutos ao agitador vortex para solubilização completa de cada uma das amostras, visando a montagem do bioensaio *in vitro* de nematotoxicidade.

Feito isso, foi realizado a obtenção de ovos juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, onde a extração dos ovos ocorreu por volta de três meses após a inoculação nas plantas de *Nicotiana tabacum*, sendo as raízes separadas da parte aérea, lavadas em água corrente, seccionadas em pedaços de 1 a 2 cm e trituradas em liquidificador na menor velocidade por 30 segundos em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl), na concentração de 1,0% de cloro ativo para a obtenção dos ovos, de acordo com a técnica desenvolvida por Hussey & Barker (1973), modificado por Boneti & Ferraz (1981).

Após este procedimento, o material triturado contendo os ovos foi transferido para peneiras com diferentes tamanhos de poros, 100, 250 e 500 mesh (de acordo com metodologia de Coolen & D'Herde (1972). O material retido na peneira de 500 mesh foi lavado com água corrente até a retirada de todo o hipoclorito, e a suspensão recolhida com auxílio de uma pisseta com água destilada (dH₂O). Subsequentemente, o material contendo os ovos foi transferido para uma câmara de eclosão. Após 24 horas, os juvenis eclodidos foram descartados sendo utilizados apenas os que eclodiram nas 24 horas subsequentes.

Após esse período, uma alíquota contendo 1 ml foi transferida para câmara de contagem de Peters e, com auxílio de um microscópio óptico, os juvenis presentes foram contabilizados e transferidos para microtubos na quantidade oscilando entre (55-70) nematoides por tubo para a execução do bioensaio *in vitro* de nematotoxicidade.

Após essa etapa, foi feita a avaliação do efeito nematotóxico das amostras sobre J2 de *M. incognita*. As metodologias foram realizadas de acordo com Rocha e colaboradores (2017), onde o bioensaio de viabilidade foi realizado em microtubos

de 1,5mL contendo suspensão de água destilada e J2 na quantidade variando de (55-70) em um volume final de 1mL.

Os controles foram preparados utilizando água destilada (controle negativo), álcool etílico 70% (controle positivo) e DMSO 1%. As amostras oriundas de fungo endofítico conteve 100 µg cada, e os controles foram utilizados em triplicata, com os microtubos mantidos a temperatura ambiente ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$) por 48 horas.

Após este período de exposição, os nematoides foram observados utilizando-se lâmina de Peters e microscópio óptico sendo contabilizados os J2 de acordo com sua mobilidade (paralisados e/ou movimentando). Os J2 paralisados foram submetidos ao ensaio de recuperação. A análise estatística dos dados foi conduzida utilizando programa Excel.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para uma melhor apresentação dos resultados, este tópico foi dividido em capítulos.

CAPÍTULO 01 - PROSPECÇÃO QUÍMICA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *A. spicifera*

4.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS EM ESCALA REDUZIDA

As três linhagens fúngicas isoladas de *A. spicifera* foram cultivadas de acordo com a metodologia descrita no tópico 3.2.4. Os meios foram selecionados conforme sua composição química, sendo o meio arroz, malte e MBD, considerados como meios ricos em nutrientes essenciais ao crescimento fúngico, ao passo que o meio de Czapek, apresenta-se com constituintes predominantemente inorgânicos. Quanto ao tipo de água utilizada, justifica-se a água do mar por ser própria do habitat no qual o fungo foi isolado, enquanto a água ultrapura por estar em condições controladas de laboratório.

Dessa maneira, destaca-se que os fungos apresentaram rendimento satisfatório para todos os meios de cultivo, exceto o meio de Czapek para linhagem AS-01 em água do mar, conforme mostrado na **Tabela 6**.

Tabela 6: Massa de cada extrato bruto obtido a partir da variação de meio de cultivo das linhagens fúngicas AS-01, AS-02 e AS-09, em escala reduzida.

Extrato	Massa obtida (mg)
AS-01-Cz-Mar	30
AS-01-Cz-MQ	100
AS-01-B-Mar	100
AS-01-B-MQ	130
AS-01-M-Mar	120
AS-01-M-MQ	100
AS-01-A-Mar	2090
AS-01-A-MQ	4150
AS-02-Cz-Mar	280

Extrato	Massa obtida (mg)
AS-02-B-Mar	580
AS-02-M-Mar	510
AS-02-A-Mar	5640
AS-09-Cz-MQ	230
AS-09-B-MQ	290
AS-09-M-MQ	695
AS-09-A-MQ	5400

Fonte: Autor. **Legenda:** Cz: Meio Czapeck; B: Meio Batata; M: Meio Malte; A: Meio Arroz; Mar: Água do Mar; MQ: Água Miliq.

A **Tabela 7** mostra as massas obtidas para cada fração de extrato bruto a partir da cultura das linhagens fúngicas em meio sólido (arroz), após o processo de partição conforme o **Esquema 3**. Aqui, pode-se perceber que os maiores rendimentos foram registrados na fração aquosa de AS-02 em água do mar, e na fração de acetonitrila de AS-09 em água ultrapura, as quais a massa de extrato ultrapassou 2,0 gramas.

Tabela 7: Frações obtidas a partir da extração líquido-líquido dos extratos brutos AS-01-A-Mar, AS-01-A-MQ, AS-02-A-Mar e AS-09-A-MQ.

Extrato	Massa obtida (mg)
AS-01-A-Mar-FAq	489,2
AS-01-A-Mar-FHex.	585,6
AS-01-A-Mar-FACN	562,7
AS-01-A-MQ-FAq	963,9
AS-01-A-MQ-FHex.	844
AS-01-A-MQ-FACN	1541,2
AS-02-A-Mar-FAq	2008,6
AS-02-A-Mar-FHex.	979,3
AS-02-A-Mar-FACN	1529
AS-09-A-MQ-FAq	769
AS-09-A-MQ-FHex.	693,9
AS-09-A-MQ-FACN	2874,3

Fonte: Autor. **Legenda:** FAq: Fração Aquosa; FHex: Fração Hexânica; FACN: Fração Acetonitrila.

4.1.1 Avaliação dos perfis químicos dos extratos brutos dos fungos endofíticos

Os perfis químicos, obtidos por CLAE-DAD, em comprimento de onda de 254 nm, dos extratos brutos dos fungos *A. stygium* e *H. monticulosum* isolados da alga *A. spicifera*, em diferentes meios de cultivo, bem como diferentes tipos de água, em gradiente exploratório, estão apresentados nas **Figuras 21, 22, 23 e 24**.

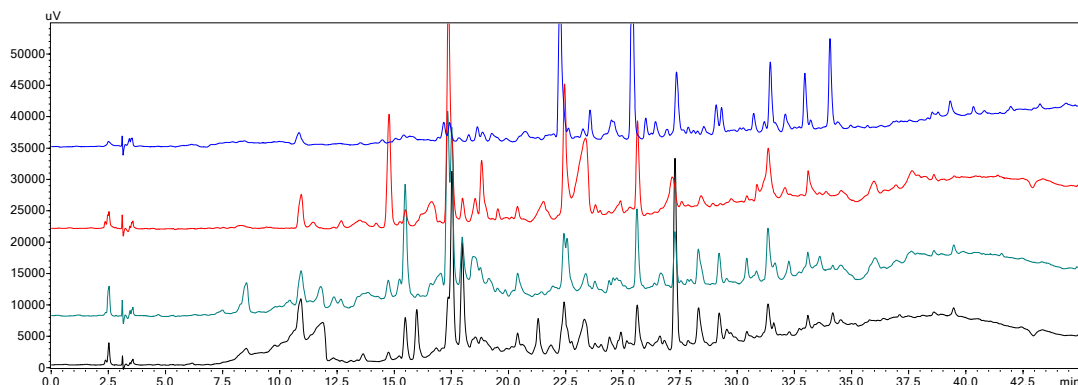
Sendo assim, comparando os cromatogramas, observou-se de maneira geral a presença de picos com diferentes absorbâncias, e polaridade variando de média a alta, com boa resolução cromatográfica, exceto o extrato de malte em água ultrapura da linhagem AS-09 (**Figura 24**). Destaca-se também uma maior produção metabólica pelos endófitos cultivados em MBD e Malte; ao passo que a água do mar mostrou-se favorável tanto para a linhagem AS-01 como para AS-02.

Entretanto, foram observados poucos constituintes químicos no extrato bruto de Czapek, especialmente nas linhagens AS-02 e AS-09 (**Figuras 23 e 24**). Segundo Biasetto (2016) e Medina (2016), a presença de poucos picos em determinado extrato pode estar associada a pouca massa obtida, ou mesmo dos constituintes não absorverem na região do UV, o que sugere ser uma característica na produção metabólica dos fungos.

Seguindo a análise cromatográfica, percebeu-se uma semelhança nos perfis do fungo AS-01 nos diferentes meios de cultivo em água do mar, com presença de bandas cromatográficas com tempos de retenção semelhantes, especialmente em 17,5 e 26 minutos (**Figura 21**).

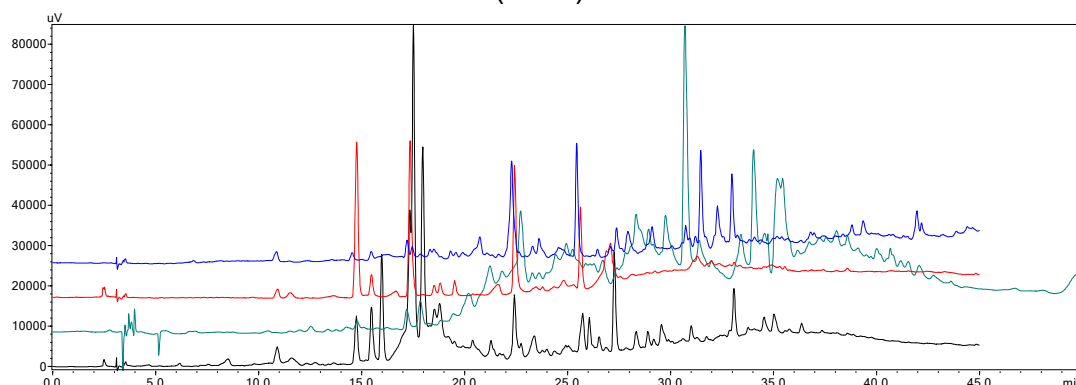
Comportamento semelhante também foi observado na linhagem AS-02 em água do mar, em que nos meios de Malte e Batata apresentaram perfis parecidos, e pico intenso próximo de 28 minutos (**Figura 23**).

Figura 21: Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O v/v a 1 mL.min⁻¹; 40 minutos; modo analítico) dos extratos brutos de AS-01 na água do mar variando o meios de cultivo (254 nm). Azul escuro (arroz), Vermelho (Czapek), Verde (malte), Preto (MBD).



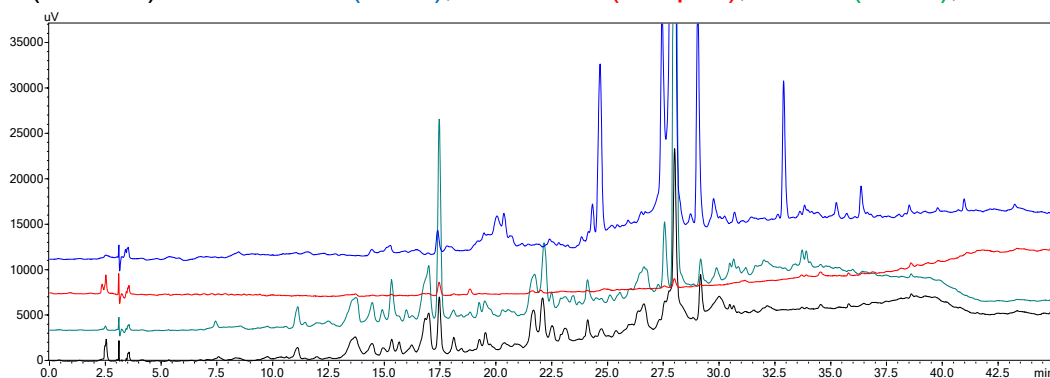
Fonte: Autor.

Figura 22: Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O v/v a 1 mL.min⁻¹; 40 minutos; modo analítico) dos extratos brutos de AS-01 na água ultra pura variando o meios de cultivo (254 nm). Azul escuro (arroz), Vermelho (Czapek), Verde (malte), Preto (MBD).



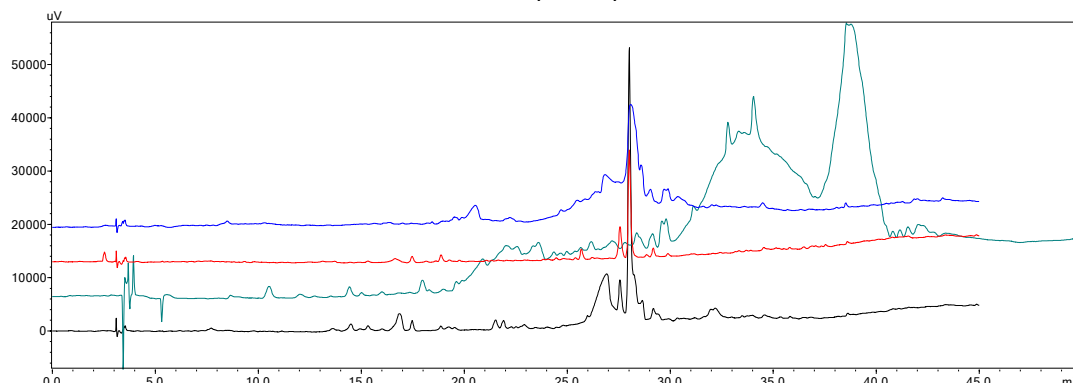
Fonte: Autor.

Figura 23: Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O v/v a 1 mL.min⁻¹; 40 minutos; modo analítico) dos extratos brutos de AS-02 na água do mar variando o meios de cultivo (254 nm). Azul escuro (arroz), Vermelho (Czapek), Verde (malte), Preto (MBD).



Fonte: Autor.

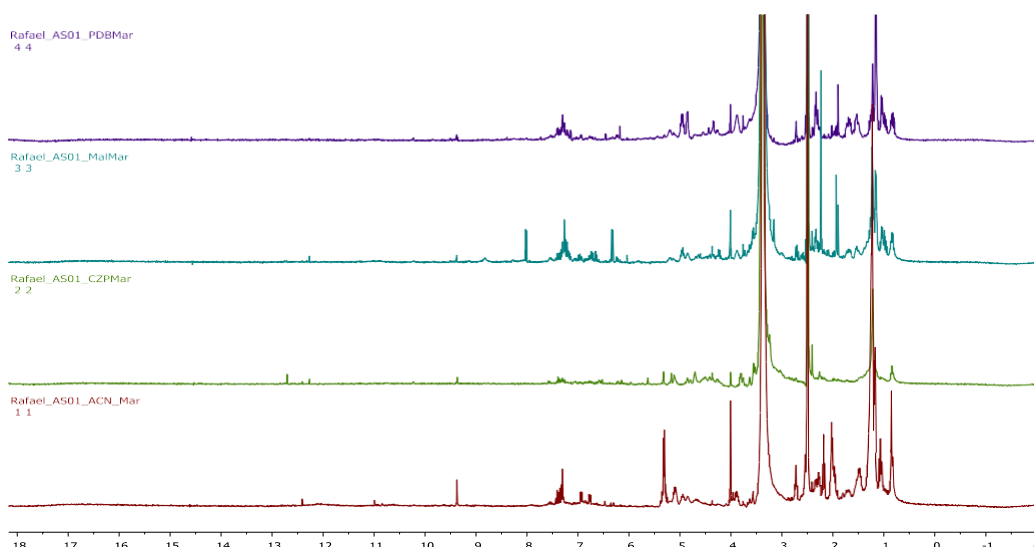
Figura 24: Cromatograma em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O v/v a 1 mL.min⁻¹; 40 minutos; modo analítico) dos extratos brutos de AS-09 na água ultra pura variando o meios de cultivo (254 nm). Azul escuro (arroz), Vermelho (Czapek), Verde (malte), Preto (MBD).



Fonte: Autor.

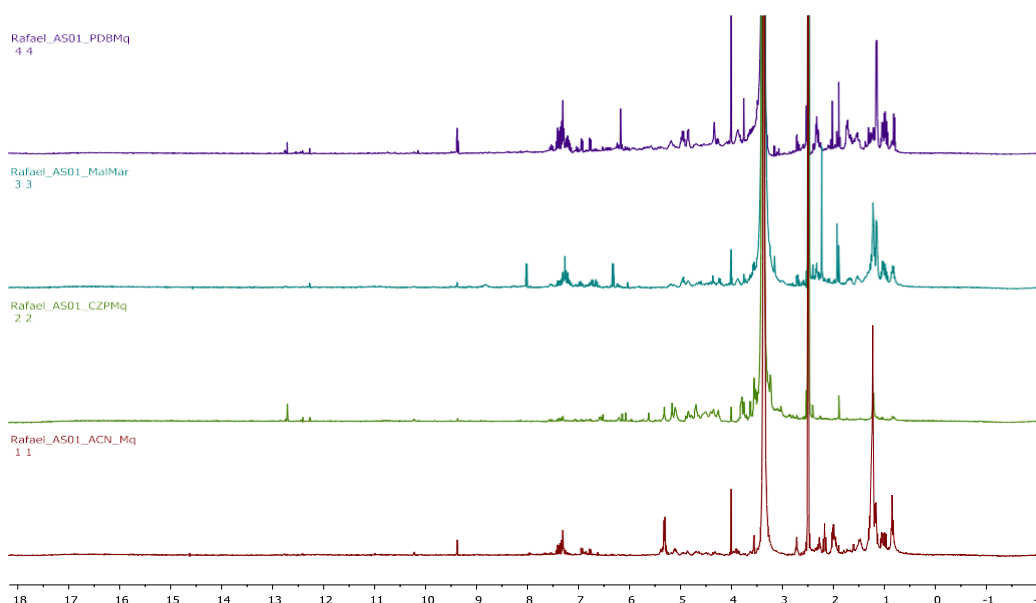
A análise dos espectros de RMN de ¹H (Figuras 25, 26, 27 e 28) dos extratos fúngicos corroborou com a análise em CLAE-DAD, notabilizando de maneira geral sinais de hidrogênios metilênicos e metílicos (δ_H 0,8-3,0 ppm), carbinólicos (δ_H 3,0-4,0 ppm), olefínicos (δ_H 4,5-6,0 ppm) e sinais de hidrogênios aromáticos (δ_H 6,5-8,0 ppm). Em relação à linhagem AS-01, ao se alterar o tipo de água utilizada no cultivo, percebeu-se que os meios de MBD e, destacadamente, Czapek apresentam sinal em δ_H 12,5 podendo ser sinais atribuídos a hidrogênios de ácido carboxílico ou de hidroxila quelada (Figuras 25 e 26).

Figura 25: Espectros de RMN de ¹H de AS-01 variando o meio de cultura e permanecendo água do Mar (DMSO-*d*₆; 300 MHz).



Fonte: Autor.

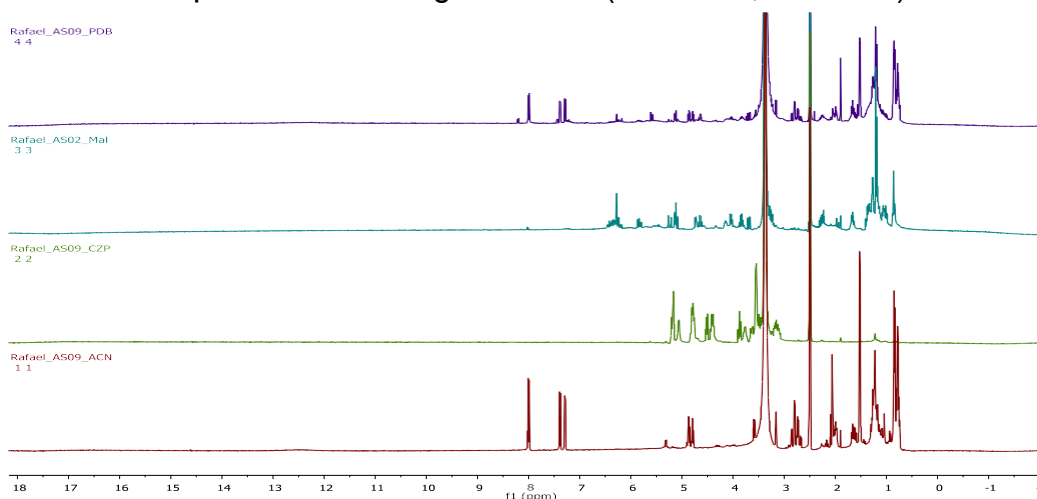
Figura 26: Espectros de RMN de ^1H de **AS-01** variando o meio de cultura e permanecendo água ultrapura ($\text{DMSO-}d_6$; 300 MHz).



Fonte: Autor.

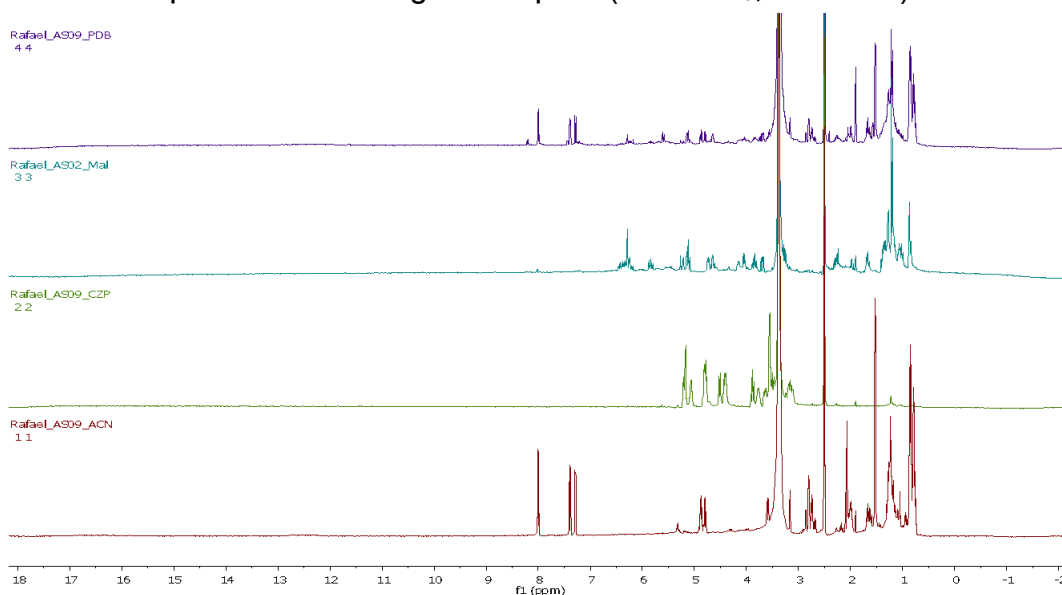
Para as linhagens AS-02 e AS-09, a análise dos extratos por RMN de ^1H mostrou que em água do mar (**Figura 27**), com exceção do meio Czapek, os demais meios apresentaram sinais de hidrogênio entre 0,5 e 8,0 ppm, referentes a hidrogênios metílicos, metilênicos, metínicos, olefínicos, carbinólicos e aromáticos, indicando uma produção metabólica com maior diversidade química. Comportamento semelhante também foi observado para os extratos resultantes do cultivo com água ultrapura (**Figura 28**).

Figura 27: Espectros de RMN de ^1H de AS-02 variando o meio de cultura e permanecendo água do Mar ($\text{DMSO-}d_6$; 300 MHz).



Fonte: Autor.

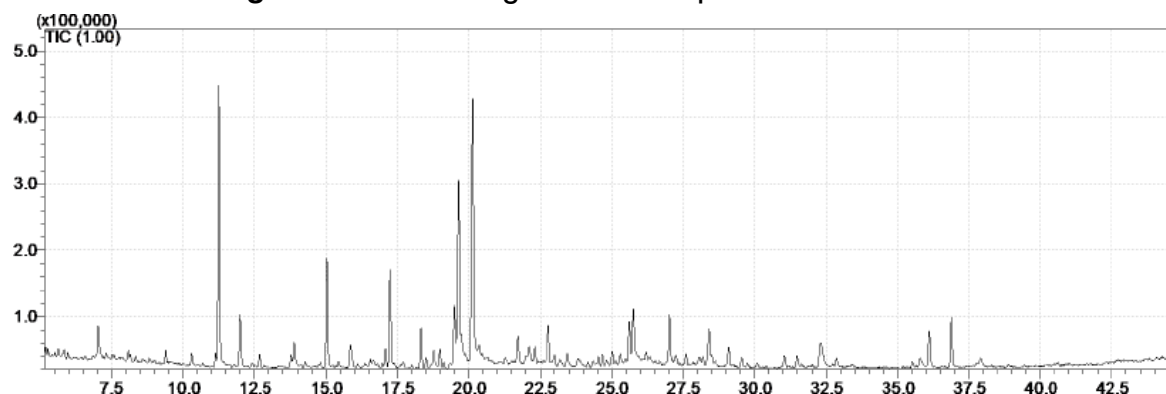
Figura 28: Espectros de RMN de ^1H de AS-09 variando o meio de cultura e permanecendo água ultrapura ($\text{DMSO-}d_6$; 300 MHz).



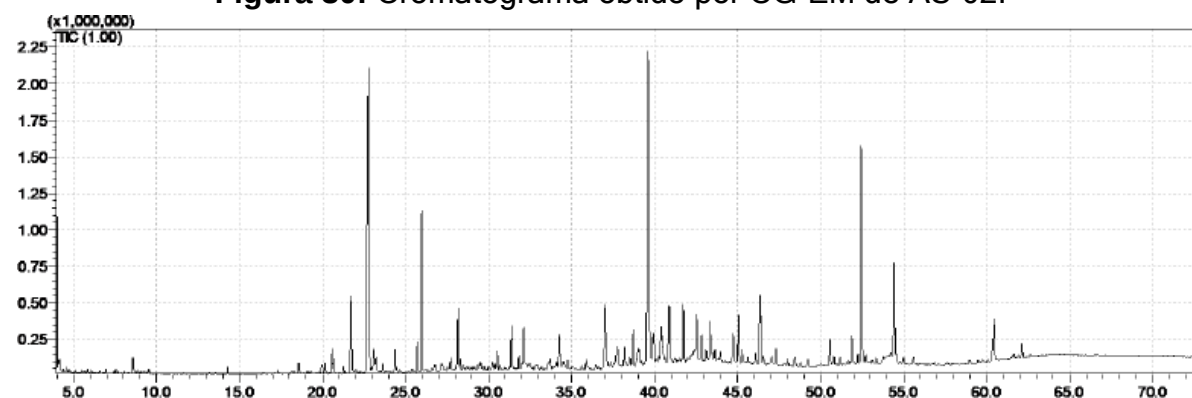
Fonte: Autor.

Pelos resultados de CG-EM foi possível a identificação de constituintes de AS-01 e AS-02, ambos em MDB e água do mar, (**Figuras 29 e 30**) por meio da análise e comparação dos espectros de massas com dados da biblioteca Nist com nível de similaridade de 90% através do software Shimadzu GCMS solution Ver. 2.61. Além disso, foi realizado o cálculo para os índices de retenção de acordo com a equação de Van den Dool and Kratz, cuja utilização tem aplicabilidade em análises com variação de temperatura, e leva em consideração o tempo de retenção da substância de interesse e os tempos de retenção dos alcanos de referência (C40) capazes de eluir antes e após esta substância (TOMAZ, 2011), os quais foram comparados com a literatura (**Tabelas 8 e 9**).

Figura 29: Cromatograma obtido por CG-EM de AS-01.



Fonte: Autor.

Figura 30: Cromatograma obtido por CG-EM de AS-02.

Fonte: Autor. *Literatura: Web Nist: <http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>.

Tabela 8: Identificação das substâncias presentes em AS-01 por CG-EM e comparação com os índices de retenção calculados com os da literatura*.

T _R (min.)	IR _{calc.}	IR _{lit.}	Substância	Referência	Similaridade
9,83	1595	1579	Ácido 3-fenil acético	Tret'yakov, 2008	93%
15,09	1775	1779	Ácido vanílico	Jeroszynska and Ligor, 2005	89%
16,03	1806	1800	Ácido azelaico	Kimura, et al., 1999	90%
16,93	1835	1836	Ácido protocatecuico	Jeroszynska 2003	89%

Fonte: Autor. *Literatura: Web Nist: <http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>.

Tabela 9: Identificação das substâncias presentes em AS-02 por CG-EM e comparação com os índices de retenção calculados com os da literatura*.

T _R (min.)	IR _{calc.}	IR _{lit.}	Substância	Referência	Similaridade
6,54	1454	1450	Ácido decanoico	Tret'yakov, 2007	92%
7,43	1498	-	Ácido málico		93%
10,13	1606	1665	Ácido tartárico	Lefevere, et al., 1989	90%
18,12	1873	1872	Ácido 1,2 benzodicarboxílico	Zeng, et al., 2007	91%
23,62	2050	2047	Ácido palmítico	Kimura, et al., 1999	91%

Fonte: Autor.

Foram identificadas quatro substâncias para AS-01 e cinco para AS-02, sendo que em ambas predominou a presença de ácidos carboxílicos. Para Parthasarathy et al (2020), a presença dessa função orgânica biossintetizada por fungos endofíticos marinhos, provavelmente, seja resultante das condições extremas nas quais eles se encontram, principalmente a salinidade que desempenha um papel importante no crescimento máximo e no alto rendimento de metabólitos.

Para tanto, Sabastianes et al. (2012) evidenciaram que substância com o grupo ácido carboxílico produzido pelo fungo *Diaporthe phaseolorum*, isolado de raízes de mangue, potencializa a atividade antibiótica do ácido 3-hidroxipropiônico se comparado com a forma esterificada. Tal relação também foi constatada por Yamada et al (2018) ao isolar três novos derivados de ácidos carboxílicos que exibiram importante atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais que causam a leucemia.

Dessa maneira, pela análise do perfil químico o meio de cultivo MBD apresentou-se com maior produção metabólica, principalmente devido a sua rica composição química, acompanhado dos meios de arroz e malte. O meio Czapek também merece destaque pelo comportamento dos espectros de RMN de ^1H , especialmente na linhagem AS-01, que mesmo não apresentando uma boa produção em massa e detecção por HPLC-DAD, sugere uma rica produção metabólica.

Portanto, tendo em vista o exposto, bem como trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa, optou-se fazer um planejamento fatorial completo 2^3 e posterior otimização por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) associado à Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) com a linhagem AS-02, em meio de cultivo MBD e água do Mar, a fim de buscar uma maior produção metabólica, além de avaliar a bioatividade dos extratos produzidos em cada ensaio.

CAPÍTULO 2 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL NA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO METABÓLICA DE *H. monticulosum*

O potencial bioativo de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos pode estar intimamente relacionado às vias biossintéticas, nas quais essas substâncias são produzidas, e que por vezes, podem estar silenciadas sob condições de cultivo, que minimizam a quimiodiversidade (YU et al., 2020). Por esse aspecto, numa tentativa de explorar outras formas de biossíntese de produtos naturais marinhos advindos de fungos endofíticos, pesquisadores têm concentrado bastante atenção numa estratégia conhecida como OSMAC (One Strain Many Compounds) (XIE et al., 2021).

De acordo com este último autor, essa abordagem baseia-se na modificação de parâmetros de cultivo, tais como: temperatura, composição do meio, forma do

frasco de cultivo, tempo de fermentação, luminosidade, entre outros. Tais características fazem com que esse processo envolva uma série de variáveis capazes de influenciar na obtenção dos metabólitos bioativos, sendo conveniente nesse caso, fazer uso do planejamento fatorial, uma vez que esse método permite avaliar as interações de todas as variáveis experimentais de interesse de uma vez, bem como seus efeitos sobre uma dada resposta (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Portanto, tendo em vista que as condições de cultivo de um microrganismo podem alterar sua produção metabólica, esta pesquisa aplicou a técnica OSMAC associada ao Planejamento Fatorial Completo 2^3 , onde as variáveis eleitas para análise foram temperatura (X_1), tempo de fermentação (X_2) e luminosidade (X_3). Após avaliar a significância das variáveis com o aumento da biossíntese de metabólitos secundários pelo fungo *H. monticulosum*, as condições de cultivo foram otimizadas por meio de um Delineamento com Composto Central Rotacional e Metodologia de Superfície de Resposta.

4.2 ESCOLHA DAS VARIÁVEIS E RESPOSTA

4.2.1 Temperatura

Segundo Sousa et al. (2019) a escolha das variáveis de cultivo de um determinado microrganismo, constitui um fator crítico na produção de metabólitos secundários, sendo bastante influenciada por fatores bióticos e abióticos capazes de alterar as propriedades fisiológicas e bioquímicas dos endófitos. Nesse sentido, a temperatura é um parâmetro de grande importância no processo de cultivo de fungos, capaz de influenciar significativamente nas reações químicas que acontecem durante o seu crescimento.

Ainda por essa perspectiva, Stange et al. (2019) afirma que cada microrganismo tem uma faixa de tolerância ideal de temperatura para seu crescimento, na qual chamou de temperatura ótima. Contudo, é sabido que microrganismos estão aptos a se desenvolverem nas mais diferentes condições de temperatura, e assim foram classificados nos seguintes grupos de acordo com Carvalho (2010):

- *Psicrófilos*: crescem em temperaturas muito baixas (entre 0°C e 20°C).
- *Pscicotrófilos*: crescem em temperaturas moderadas (entre 25°C e 40°C).

- *Termófilos*: crescem em altas temperaturas (entre 45°C e 65°C).
- *Mesófilos*: possuem a mesma característica dos psicotrófilos, porém em temperatura de refrigeração (segundo a RDC nº 216 da ANVISA de 2004) entre -5°C e -18°C, não conseguem crescer.

Tendo em vista essa classificação, o fungo *H. monticulosum* enquadra-se como um microrganismo psicotrófilo, o que justifica a variação de temperatura no nível -1 igual a 20°C, e no nível 1 igual a 30°C no planejamento fatorial completo. Já no DCCR, esses valores foram ajustados, haja vista que esse tipo de delineamento possui um valor de α que o particulariza, e esse valor torna os coeficientes de regressão ortogonais, conferindo rotabilidade, com pontos a uma mesma distância do ponto central, que para a situação em estudo com três variáveis ($k=3$), o valor codificado foi -1,68 para o nível baixo e 1,68 para o nível alto (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001; MATEUS; BARBIN; CANAGIN, 2001).

Para decodificar os valores de -1,68 e 1,68, em valores experimentais na variável temperatura, Teófilo e Ferreira (2006) propõem o uso da **Equação 3**:

$$xi = \frac{zi - \bar{z}}{\frac{\Delta z}{2}}$$

Onde xi é o valor codificado do DCCR, zi o valor experimental, $\bar{z}$ o valor médio entre o nível (1) e (-1), que é o valor do ponto central, e Δz que corresponde a diferença entre os níveis (1) e (-1). Sendo assim, para o nível -1,68 a temperatura foi de 16,6°C, e para o nível 1,68 o valor experimental foi de 33,4°C.

4.2.2 Tempo de fermentação (Curva de crescimento)

A escolha dessa variável justifica-se por estar intimamente relacionada com o crescimento do microrganismo em estudo. Segundo Moore-Landecker (1996), fungos miceliais ou filamentosos, normalmente apresentam uma massa ramificada formada por um conjunto de hifas emaranhadas, onde a pontal hifal cresce com uma taxa mais ou menos linear constante, estendendo-se à margem da colônia durante o crescimento.

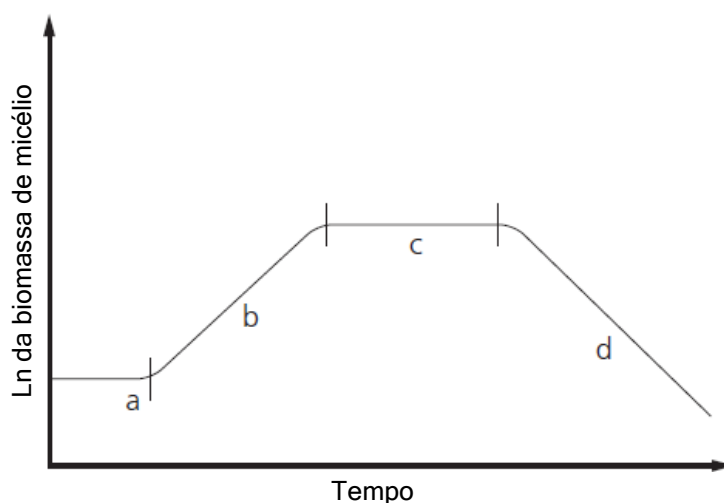
Sendo assim, a determinação do crescimento hifal ao longo do tempo da concentração de um componente celular, da concentração de células ou mesmo da biomassa enlevada no meio líquido, permite obter a curva de crescimento da

população microbiana, expressa pelo logaritmo do número de microrganismos em relação ao tempo gasto para a multiplicação (**Figura 31**). Nesses casos, geralmente, o crescimento ocorre exponencialmente em que pode ser dividido em quatro estágios/fases de acordo com Carvalho (2010), a saber:

- Fase de latência (a): sem crescimento aparente.
- Fase exponencial (b): rápido crescimento. Também chamada de fase logarítmica.
- Fase estacionária (c): células “velhas”, porém resistentes a condições adversas. A depender do microrganismo, esta fase pode até não ser observada.

Fase de destruição ou morte (d): não é observado crescimento, caracterizada por um declínio devido à autólise.

Figura 31: Gráfico teórico da curva de crescimento de um fungo filamentososo.



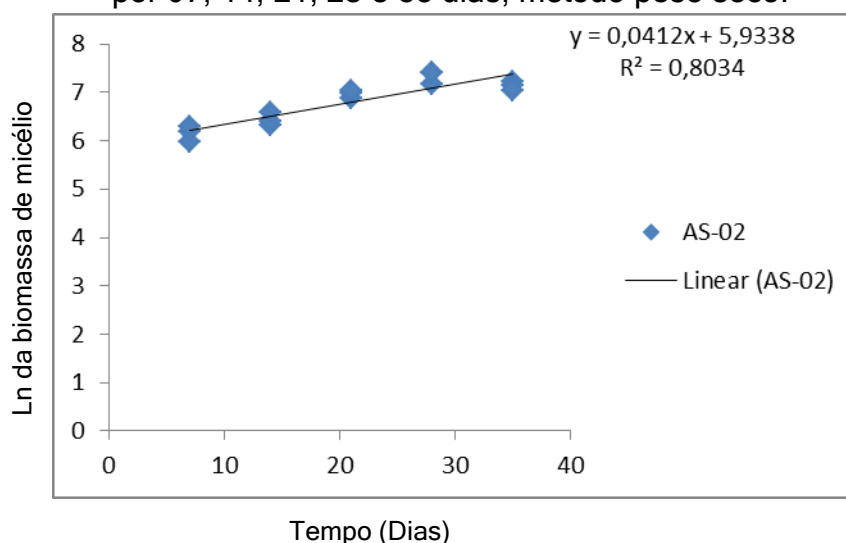
Fonte: Carvalho (2010), adaptado.

Tendo em vista o exposto, bem como a finalidade de definir os valores de nível baixo e alto para realizar o planejamento fatorial completo, sequentemente, o DCCR, foi realizada a curva de crescimento de *H. monticulosum*, conforme o item 3.2.5, a fim de identificar o período de maior crescimento da massa fúngica filamentosa.

De acordo com Langvad (1999), fungos filamentosos que crescem em meio líquido têm uma melhor avaliação de seu crescimento através do aumento do peso seco seja em modo estático ou sob agitação. Contudo, dados de peso seco obtidos

em cada período não devem ser feitos regressão linear diretamente, uma vez que os valores seguem uma tendência exponencial. Sendo assim, esses valores são transformados em escala logarítmica, e após isso, é feita a regressão linear, onde o coeficiente de crescimento para o fungo em estudo foi de 0,0412, com um valor de R^2 acima de 0,8, que implica a regressão linear com valores confiáveis (**Figura 32**).

Figura 32: Curva de crescimento com os valores do logaritmo neperiano (Ln) do fungo *H. monticulosum* em MDB, água do mar, temperatura 25°C e modo estático, por 07, 14, 21, 28 e 35 dias, método peso seco.

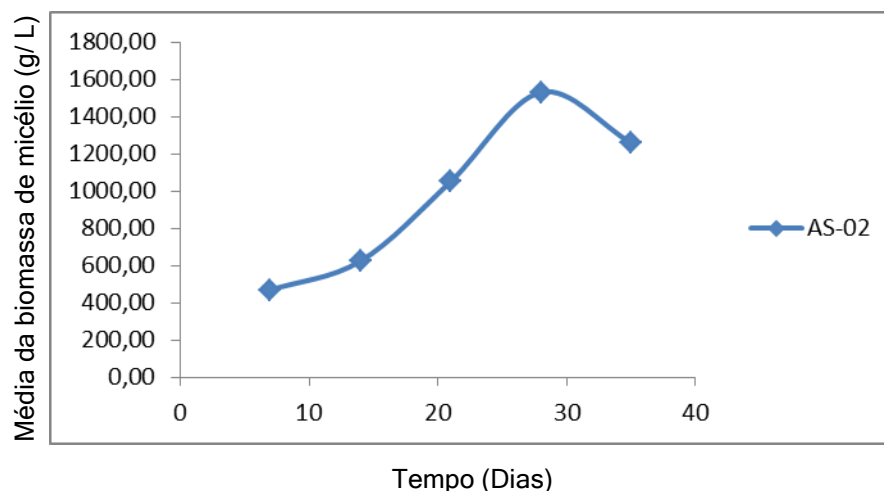


Fonte: Autor.

Legenda: AS-02: Linhagem de *H. monticulosum* cultivado em água do mar.

Dessa maneira, a curva de crescimento do referido fungo é demonstrada na **Figura 33** a partir da média dos valores em triplicata, onde é possível perceber que a fase exponencial chega até o 28º dia cultivo, e a partir daí, ocorre uma redução de micélio, sugerindo que o crescimento do fungo entra na fase de declínio ou morte (MOORE- LANDECKER, 1996; CARVALHO, 2010).

Figura 33: Curva de crescimento do fungo *H. monticulosum* em MDB, água do mar, temperatura 25°C e modo estático, por 07, 14, 21, 28 e 35 dias, método peso seco.

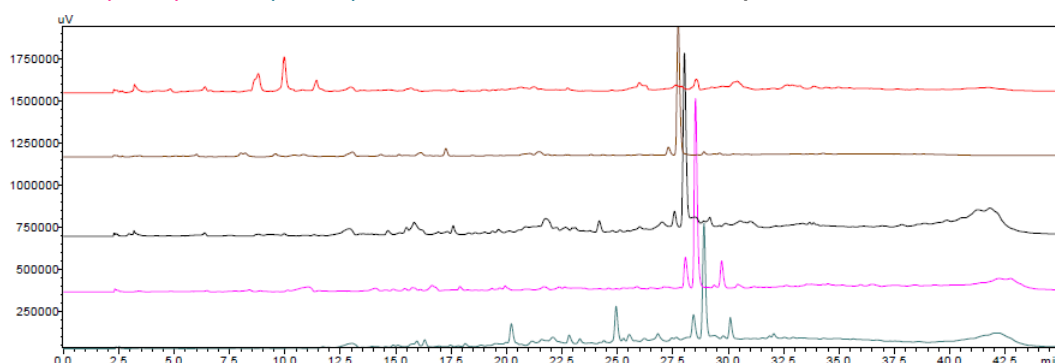


Fonte: Autor.

Legenda: AS-02: Linhagem de *H. monticulosum* cultivado em água do mar.

Outro fato que sustenta o 28º dia como período ótimo de crescimento do fungo *H. monticulosum*, é observado no perfil cromatográfico dos extratos ao longo dos 35 dias de cultivo em meio líquido MDB (**Figura 34**), onde é possível perceber, ao se comparar com os demais cromatogramas, todos obtidos no comprimento de onda de 254 nm, o consumo de nutrientes do meio pelo fungo, que vai diminuindo a detecção ao longo dos dias de fermentação.

Figura 34: Perfil cromatográfico em gradiente exploratório por CLAE-DAD (coluna Phenomenex Luna C-18; 5 a 100% MeOH:H₂O v/v a 1 mL.min⁻¹; 40 minutos; modo analítico) dos extratos brutos obtidos com 07 (vermelho), 14 (marrom), 21 (preto), 28 (rosa) e 35 (cinza) dias de crescimento da espécie *H. monticulosum*.



Fonte: Autor.

Na análise cromatográfica, também é possível observar a presença de banda de alta intensidade após o sétimo dia de cultivo, com T_R de aproximadamente

27,8 min ($UV\lambda_{\text{máx.}}$ 206 nm), sugerindo a presença do marcador quimiotaxonômico da espécie fúngica, o esporotriolídeo, com alta atividade antifúngica (LOUBIÈRE et al., 2017a). Recentemente, Tian et al. (2020) descreveram o esporotriolídeo como uma nova família biossintética de metabólitos secundários de fungos, principalmente, relacionado ao novo gênero *Hypomontagnella*.

Portanto, de posse dessas informações, foi proposto que o nível baixo (-1) para a variável tempo de fermentação seria 14 dias, e para o nível alto (1) 28 dias. Como essa variável foi bastante significativa no planejamento fatorial completo, a mesma foi ajustada para o DCCR, conforme a **equação 3**, em nove (09) dias para o nível -1,68 e 33 dias para o nível 1,68.

4.2.3 Luminosidade

A luminosidade é um fator abiótico de grande importância no desenvolvimento e crescimento dos fungos, não só por ser uma fonte de energia, mas também pela capacidade de provocar mudanças biológicas, morfológicas e, conseqüentemente, metabólicas ao induzir a produção de metabólitos secundários que até então não tenham sido produzidos (SOUZA et al., 2015).

De acordo com Cochrane (1958), a luminosidade pode influenciar na quantidade e qualidade do crescimento micelial, bem como na esporulação; e a radiação próxima da região do UV pode exercer efeito sobre as estruturas reprodutivas aumentando ou diminuindo o crescimento. Em uma pesquisa desenvolvida por Casas-Flores et al. (2004), fungos endofíticos do gênero *Trichoderma* apresentaram morfologia de conidiação em anéis concêntricos de maneira diferente, ao alternar ciclos de luminosidade e escuridão.

Nesse sentido, estima-se que alguns fungos filamentosos podem biossintetizar novos produtos naturais a partir de alterações no “ciclo circadiano”, como resultado da ativação ou não de diversos genes ou proteínas que interferem nos mecanismos de produção dos metabólitos (LUI; BELL-PEDERSEN, 2006). Para a espécie *H. monticulosum*, ainda não foi observado na literatura pesquisas que envolvessem a análise dessa variável; situação esta que também impulsionou na seleção deste parâmetro.

Para tanto, com a finalidade de definir os valores experimentais do nível baixo (-1) e alto (1) para o planejamento fatorial completo, foi feita uma busca na

literatura, onde se percebeu que a maioria dos trabalhos publicados (p. Ex.: LOUREIRO et al., 2002; NOZAKI; CAMARGO; BARRETO, 2004; BERNARDI et al., 2008; SELEGATO et al., 2019) utilizaram para o nível baixo, um período com total ausência de luminosidade, e para o nível alto a situação contrária; tendo como ponto central 12 horas de claro/ 12 horas de escuro.

Entretanto, como esta pesquisa também pretende otimizar as condições de cultivo do fungo *H. monticulosum* visando o aumento da produção metabólica, bem como considerando a luminosidade de grande significância para a resposta, esses valores foram ajustados em condições que favorecessem tal objetivo, uma vez que a luminosidade, em nível baixo, com valor experimental nulo, tornar-se-ia improvável a otimização por DCCR, por conta do valor experimental no nível -1,68, ser negativo.

Sendo assim, o nível baixo teve um fotoperíodo de 6 horas, e o nível alto de 18 horas, com o ponto central de 12 horas de claro/ 12 horas de escuro. Para o DCCR, os valores experimentais de acordo com a **equação 3** foram duas (02) horas de luminosidade no nível -1,68, e 22 horas de luminosidade no nível 1,68.

4.2.4 Resposta (Número de picos ou bandas cromatográficas)

A análise do perfil químico a partir dos extratos brutos de fungos endofíticos, tem se tornado uma prática cada vez mais comum na investigação de padrões cromatográficos de produtos naturais. Essa investigação exige métodos de separação eficientes, capazes de facilitar a análise de amostras complexas, avaliando a qualidade e veracidade dos metabólitos secundários, bem como os marcadores quimiotaxonômicos (FRISVARD, 1989; SOARES et al., 2018).

Nesse sentido, a CLAE-DAD apresenta-se como um método bastante promissor para a detecção e quantificação de produtos naturais, especialmente na análise de extratos brutos fúngicos. Essa técnica tem como princípio, a separação dos componentes de uma mistura distribuídos em duas fases (uma estacionária e outra móvel), no qual é usado como detector, uma matriz com arranjo de diodos capaz de absorver luz na região do ultravioleta (UV) e visível (Vis) do espectro, na faixa de comprimento de onda de 190 – 800 nm (MARQUES; OLIVEIRA, 2013).

Em produtos naturais, é comum verificar a região de 220 – 400 nm para determinar os analitos de interesse. A preferência por essa região do espectro, provavelmente, seja justificada pela presença de grupos cromóforos na amostra,

caracterizada por manifestar grupos carbonílicos, aromáticos, ligações duplas conjugadas, entre outros. Essas características permitem a determinação e quantificação de substâncias de acordo com sua absorbância na faixa de comprimento de onda (REJCZAK; TUZIMSKI, 2017).

Outras vantagens inerentes a CLAE-DAD é o fato de ser uma plataforma analítica simples, econômica e confiável, sem necessidade de derivatização da amostra, permitindo uma maior identificação de grupos biossintéticos, uma vez que metabólitos correlacionados podem ter o mesmo cromóforo e espectro de UV-Vis. Além disso, há a possibilidade de hifenização com outros detectores como a Espectrometria de Massas (EM) (FRISVARD, 1989; ZHANG; XIE, 2014; REJCZAK; TUZIMSKI, 2017).

Tendo em vista esses aspectos, a avaliação do número de bandas cromatográficas dispostas num cromatograma CLAE-DAD fornece informações de tempo de retenção e dados espectrais, sendo possível determinar a quantidade de cada analito em um pico. Assim, o uso destas ferramentas possibilita verificar a diversidade química de metabólitos em um dado extrato bruto. Contudo, alguns parâmetros cromatográficos devem ser levados em consideração para essa análise, tais como: tempo de retenção, seletividade, eficiência (dependente do tipo de coluna usada), resolução das bandas cromatográficas, bem como alargamento de banda (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Portanto, para essa pesquisa, a distribuição do número de bandas cromatográficas dos extratos brutos de *H. monticulosum* foi considerada como resposta tanto para o planejamento fatorial completo, como no DCCR. A contagem foi feita com o uso do software Shimadzu LC solution (versão 1.25 SP2), levando em consideração a área das bandas cromatográficas superior a 25000, e descontado o número de bandas cromatográficas presentes no branco, que consistiu na análise de apenas o meio de cultura.

4.3 PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2³

Observadas as condições de cada parâmetro para a realização dos ensaios no planejamento fatorial completo e DCCR, as respostas obtidas nas combinações dos níveis escolhidos foram registradas na matriz de planejamento conforme a **Tabela 10**. Esses valores de resposta são essenciais para o cálculo dos efeitos

principais, interações e erro experimental, sendo que este último foi definido pela realização do experimento em réplicas em torno do ponto central, cuja finalidade foi definir se existem ou não efeitos significativos. É digno de nota também, que os testes foram realizados de forma aleatória, para garantir a distribuição equânime de todos os fatores.

Sendo assim, analisando a **Tabela 10** é possível perceber que o maior número de bandas cromatográficas (123, 125 e 124) foi obtido nos experimentos em torno do ponto central (ensaios 9, 10 e 11 respectivamente) com temperatura de 25 °C, tempo de incubação de 21 dias e luminosidade de 12/12 horas de claro/ escuro. Em outra condição, no ensaio 4, com temperatura de 30 °C, tempo de incubação de 28 dias e luminosidade de 6 horas, foram obtidas 109 bandas.

Ainda de acordo com a **Tabela 10**, fazendo um comparativo entre o ensaio 5, no qual o número de picos foi o menor valor experimental observado (91 picos), com o resultado do ensaio 4, que registrou 109 picos, é possível notar que a variação dos valores de Temperatura, Tempo de fermentação e Luminosidade realmente influenciam na resposta, principalmente, quando os valores reais são os do ponto central.

Tabela 10: Respostas do planejamento fatorial completo 2^3 visando uma maior produção metabólica do fungo *H. monticulosum*.

Ensaio	Níveis codificados			Valores reais			Resposta (Nº de picos)
	X ₁	X ₂	X ₃	Temperatura (°C)	Tempo (Dias)	Luminosidade (Horas)	
1	-1	-1	-1	20	14	6	99
2	1	-1	-1	30	14	6	106
3	-1	1	-1	20	28	6	104
4	1	1	-1	30	28	6	109
5	-1	-1	1	20	14	18	91
6	1	-1	1	30	14	18	98
7	-1	1	1	20	28	18	102
8	1	1	1	30	28	18	97
9	0	0	0	25	21	12	123
10	0	0	0	25	21	12	125
11	0	0	0	25	21	12	124

Fonte: Autor.

4.3.1 Significância Estatística das Variáveis Independentes

Com a obtenção da resposta para cada ensaio, a análise de significância estatística para as variáveis independentes foi realizada com base no valor dos efeitos. Sendo assim, com os experimentos descritos na **Tabela 10**, foi possível calcular sete efeitos, distribuídos dessa maneira: três principais (1, 2 e 3), três de interações binárias ou secundárias (12, 13 e 23) e um de interação ternária ou terceira ordem (123).

Segundo Rodrigues e Lemma (2009), o efeito principal de uma variável é uma variação média na resposta produzida por uma variação no nível, ou seja, quando passamos de um nível baixo para um nível mais alto, podendo ser representado pela **equação 4**, ou ainda, indicar o quanto cada variável influencia na resposta observada.

$$Efeito\ principal = \frac{2(\sum y^{+} - \sum y^{-})}{n}$$

Nessa equação, y corresponde à média dos efeitos individuais da medida, os sinais (+) e (-) correspondem ao nível alto e baixo, respectivamente, e n corresponde ao número total de experimentos do planejamento. Ao passo que o efeito de interação, é o efeito simultâneo dos fatores sobre uma dada resposta em estudo.

Dessa forma, foi possível calcular os efeitos estimados e evidenciar os de maior importância conforme a **Tabela 11**. Esses valores fazem referência às variáveis independentes quanto à ordem de significância estatística, obedecendo aos valores do teste T (Student), e do método do valor de P para um dado fator. Sendo assim, verifica-se que todos os efeitos principais influenciaram no aumento do número de bandas cromatográficas, assim como na interação binária 12. Contudo, as interações 13 e 23, além da interação ternária 123 não se mostraram estatisticamente significativas, motivo pelo qual não foram incluídas na equação do modelo.

Tabela 11: Efeitos estimados e coeficientes de regressão dos parâmetros analisados e os erros padrão correspondentes para o número de picos cromatográficos pelo Planejamento Fatorial Completo 2^3 com o fungo *H. monticulosum*.

Fatores	Efeitos	T _{calc.} (2)*	Valor de p*	-95% Lim. Conf.	+95% Lim. Conf.	Coefic.	Erro Puro
Média	100,75	284,964	0,000012	99,2288	102,2712	100,75	0,353553
Curvatura	46,5	34,3425	0,000847	40,6742	52,3258	23,25	0,677003
Efeitos Principais							
Temperatura (X ₁)	3,5	4,9497	0,038476	0,4576	6,5424	1,75	0,353553
Tempo (X ₂)	4,5	6,364	0,023813	1,4576	7,5424	2,25	0,353553
Luminosidade (X ₃)	-7,5	-10,6066	0,008772	-10,5424	-4,4576	-3,75	0,353553
Interações							
X ₁ X ₂	-3,5	-4,9497	0,038476	-6,5424	-0,4576	-1,75	0,353553
X ₁ X ₃	-2,5	-3,5355	0,071523	-5,5424	0,5424	-1,25	0,353553
X ₂ X ₃	0,5	0,7071	0,552786	-2,5424	3,5424	0,25	0,353553
X ₁ X ₂ X ₃	-2,5	-3,5355	0,071523	-5,5424	0,5424	-1,25	0,353553

Fonte: Autor.

Legenda: t= estatística do teste com dois graus de liberdade; p= probabilidade de significância do teste t.

Ainda de acordo com a **Tabela 11**, é possível perceber que alguns efeitos foram negativos e outros positivos. De acordo com Filho (2017), o efeito é positivo, quando ao passar do nível baixo para o nível alto da variável, a resposta aumenta e quando negativo, ocorre o contrário. Sendo assim, observa-se que a luminosidade exerce efeito negativo (-7,5) de maior importância dentro do conjunto de valores investigados, indicando uma forte influência dessa variável sobre a resposta experimental.

Outro fato importante foi o ajuste de um modelo matemático de primeira ordem (**Equação 5**), com o objetivo de representar o número de picos cromatográficos, a partir de dados de coeficientes de regressão.

Equação 5: Modelo matemático do Planejamento Fatorial completo 2^3 .

$$Y = 100,75 (\pm 0,353553) + 1,75 (\pm 0,353553)X_1 + 2,25 (\pm 0,353553)X_2 - 3,75 (\pm 0,353553)X_3 - 1,75 (\pm 0,353553)X_1X_2$$

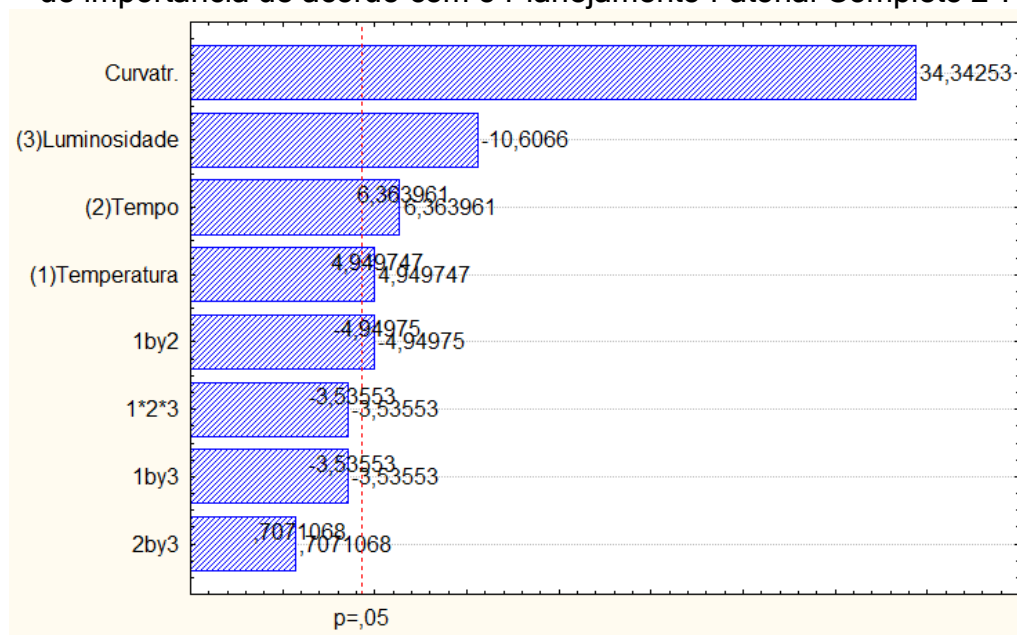
Onde: Y representa a resposta (nº de picos); X₁, X₂ e X₃ representam os termos lineares de cada parâmetro analisado.

A referida equação acima é válida para um intervalo definido que vai de -1 a +1 (valores codificados) para as variáveis Temperatura, Tempo e Luminosidade.

Essas variáveis, juntamente com as interações do modelo, apresentaram erro puro de 0,353553 para a resposta avaliada. Os coeficientes foram obtidos pelo programa STATISTICA, de acordo com a **Tabela 11**.

Os dados da referida tabela podem ser confirmados graficamente pelo diagrama de Pareto (**Figura 35**), o qual mostra as variáveis em ordem de importância para o modelo de regressão, onde a linha tracejada vermelha revela os coeficientes que são significativos ao nível de significância escolhido. Sendo assim, é possível afirmar, a partir do modelo linear, que as variáveis X_1 , X_2 e X_3 (Temperatura, Tempo de fermentação e Luminosidade, respectivamente) e a interação X_1X_2 ultrapassam o valor de $p = 0,05$, no nível de confiança 95%, comprovando que os valores são estatisticamente significativos. Nota-se também que o modelo possui curvatura significativa, o que sugeriu completar o planejamento com os pontos axiais por meio do DCCR.

Figura 35: Diagrama de Pareto com as variáveis de regressão em ordem crescente de importância de acordo com o Planejamento Fatorial Completo 2^3 .



Fonte: Autor.

4.3.2 Análise de Variância do Modelo Estatístico do Planejamento Fatorial Completo

Para avaliar a qualidade do ajuste do modelo foi realizada a análise de variância (ANOVA), aqui representada pela **Tabela 12**. Por ela, segundo Pereira e

Pereira Filho (2018), a Soma Quadrática Residual (SQ_r) do modelo é obtida a partir do somatório do erro puro com a falta de ajuste, cujo valor correspondeu a 14,5. Já a Soma Quadrática da Regressão (SQ_R) é obtida através da diferença entre a Soma Quadrática Total (SQ_T) pela Soma Quadrática Residual (SQ_r), resultando num valor igual a 1394,4. Vale destacar que os valores de erro puro, falta de ajuste e SQ_T foram obtidos pelo software STATISTICA.

Assim, a Média Quadrática que corresponde à razão entre a Soma Quadrática pelo Grau de Liberdade foi verificada, e a partir de então o valor de F foi calculado pela divisão entre a Média Quadrática da Regressão (MQ_R) pela Média Quadrática do Resíduo (MQ_r), e entre Média Quadrática da Falta de Ajuste ($MQFA$) pela Média Quadrada do Erro Puro ($MQEP$) (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Tabela 12: Análise de Variância do modelo com o Planejamento Fatorial Completo 2^3 para o número de picos cromatográficos.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Nº de Graus de Liberdade	Média Quadrática (MQ)
Regressão (R)	1394,4	4	348,6
Resíduo (r)	14,5	6	2,4
Falta de Ajuste	12,5	4	3,1
Erro Puro	2,0	2	1
Total	1408,9	10	
$R^2 = 98,97$			
$F_{\text{calculado}} = MQR/MQ_r = 144,25$		$F_{\text{calculado}} = MQFA/MQEP = 3,1$	
$F_{\text{tabelado}}(4,6) = 4,53$		$F_{\text{tabelado}}(4,2) = 19,25$	
$F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}} = 31,84$			

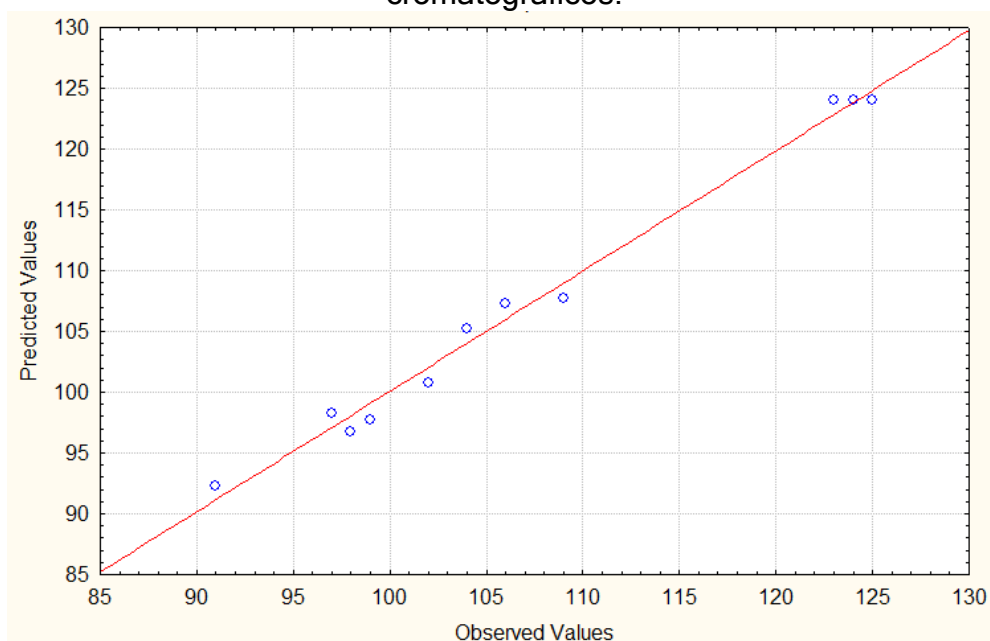
Fonte: Autor.

De acordo com a **Tabela 12**, observou-se que o modelo apresentou regressão significativa, haja vista que o valor do $F_{\text{calculado}}$ (MQR/MQ_r) é 31,84 vezes maior que o F_{tabelado} , o que denota que a equação é estatisticamente significativa e útil para fins preditivos, a um nível de confiança de 95%. Além disso, a equação não possui falta de ajuste, uma vez que o $F_{\text{calculado}}$ da $MQFA/MQEP$ é menor que o F_{tabelado} . Dessa maneira, é possível elaborar superfície de resposta para avaliação da região ótima de operação das variáveis que maximizem a resposta em estudo (PEREIRA E PEREIRA FILHO 2018).

É importante destacar também, que o Coeficiente de Determinação (R^2) entre as respostas observadas e os valores preditos pelo modelo estatístico de primeira ordem foi de 0,9897. Segundo Saramago e Silva (2005), esse valor, em geral, é expresso em porcentagem e representa o quanto os resultados podem ser explicados. Então, para o modelo proposto, o valor de R^2 foi maior que 90%, evidenciando que o modelo foi estatisticamente significativo.

Essa análise pode ser corroborada pela observação do gráfico dos valores observados para valores preditos (**Figura 36**). Por esse gráfico, os valores preditos são representados pela reta, ao passo que os valores observados são representados pelos pontos. Assim, uma parte dos valores observados em torno da média é descrita pela equação de regressão, enquanto o restante é considerado resíduo (BARROS; SCARMINIO; BRUNS, 2001). Portanto, verifica-se uma linearidade aproximada dos resultados sob a reta vermelha.

Figura 36: Dados observados de valores preditos para a resposta número de picos cromatográficos.



Fonte: Autor.

4.4 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) E METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR)

Após a realização do planejamento fatorial completo 2^3 , foi possível perceber que as variáveis Temperatura, Tempo de fermentação e Luminosidade foram significativas para o aumento da diversidade de metabólitos secundários da espécie fúngica em estudo, avaliada pelo aumento do número de picos cromatográficos, com uma curvatura bastante significativa.

Sendo assim, partiu-se para a aplicação do DCCR, com o qual foram realizados mais nove (09) ensaios, dos quais seis (06) foram realizados alterando as condições das variáveis em uma rotação de 45° em relação ao ponto de partida, que equivaleu ao valor codificado de 1,68 tanto para o nível baixo (-) como para o nível alto (+), e mais três (03) ensaios em torno do ponto central, cujos resultados encontram-se registrados na **Tabela 13**.

Tabela 13: Matriz do DCCR para otimização da produção metabólica do fungo *H. monticulosum*.

Ensaio	Níveis codificados			Valores reais			Resposta (Nº de picos)
	X ₁	X ₂	X ₃	Temperatura (°C)	Tempo (Dias)	Luminosidade (Horas)	
1	-1	-1	-1	20	14	6	99
2	1	-1	-1	30	14	6	106
3	-1	1	-1	20	28	6	104
4	1	1	-1	30	28	6	109
5	-1	-1	1	20	14	18	91
6	1	-1	1	30	14	18	98
7	-1	1	1	20	28	18	102
8	1	1	1	30	28	18	97
12	-1,68	0	0	16,6	21	12	96
13	1,68	0	0	33,4	21	12	113
14	0	-1,68	0	25	9	12	96
15	0	1,68	0	25	33	12	112
16	0	0	-1,68	25	21	2	103
17	0	0	1,68	25	21	22	106
9	0	0	0	25	21	12	123
10	0	0	0	25	21	12	125
11	0	0	0	25	21	12	124
18	0	0	0	25	21	12	124
19	0	0	0	25	21	12	122
20	0	0	0	25	21	12	123

Fonte: Autor.

A construção do DCCR apresenta-se como uma evolução do planejamento 2^3 , uma vez que acompanhado da MSR, é possível obter condições ótimas das variáveis de controle que irão produzir a melhor resposta desejada (TEÓFILO; FERREIRA, 2006). Nesse sentido, a MSR baseia-se em duas etapas distintas, que envolve a modelagem e o deslocamento. Esta acontece ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, enquanto aquela é feita ajustando-se modelos matemáticos empíricos (lineares ou quadráticos, geralmente) a fim de explorar ao máximo um dado sistema até sua otimização (BARROS; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Para esta pesquisa, o DCCR serviu para a construção de um modelo quadrático obtido a partir das respostas na matriz da **Tabela 13**. Sendo assim, semelhante à análise do Planejamento Fatorial Completo, os valores da **Tabela 14** fazem referência às variáveis independentes quanto à ordem de significância estatística, obedecendo aos valores do teste T (Student), e do método do valor de P para um dado fator.

Tabela 14: Efeitos estimados e coeficientes de regressão dos parâmetros analisados e os erros padrão correspondentes para o número de picos cromatográficos pelo DCCR com o fungo *H. monticulosum*.

Fatores	Efeitos	T _{calc.} (5)*	Valor de p*	-95% Lim. Conf.	+95% Lim. Conf.	Coefic.	Erro Puro
Média	123,579	288,923	0,00000	122,479	124,679	123,58	0,427724
Efeitos Principais							
Temperatura (L)	6,238	10,985	0,000109	4,778	7,698	3,12	0,282931
Temperatura (Q)	-14,471	-26,147	0,000002	-15,893	-13,048	-7,24	0,276718
Tempo (L)	6,578	11,584	0,000084	5,119	8,038	3,29	0,282931
Tempo (Q)	-14,825	-26,787	0,000001	-16,247	-13,402	-7,41	0,276718
Luminosidade (L)	-3,658	-6,443	0,001339	-5,118	-2,199	-1,83	0,282931
Luminosidade (Q)	-14,571	-26,174	0,000002	-15,893	-13,048	-7,24	0,276718
Interações							
X ₁ X ₂	-3,5	-4,719	0,005245	-5,406	-1,593	-1,75	0,370810
X ₁ X ₃	-2,5	-3,371	0,019868	-4,406	-0,5,93	-1,25	0,370810
X ₂ X ₃	0,5	0,674	0,530092	-1,406	2,406	0,25	0,370810

Fonte: Autor.

Legenda: t= estatística do teste com cinco graus de liberdade; p= probabilidade de significância do teste t; L= Linear; Q= Quadrático.

De posse dos dados da **Tabela 14**, é possível perceber que todas as variáveis independentes apresentaram efeitos lineares e quadráticos significativos, com sinais positivos e negativos, respectivamente, além das interações 12 e 13. Isso

permitiu o ajuste do modelo quadrático representado pela **Equação 6**, a partir de dados de coeficientes de regressão.

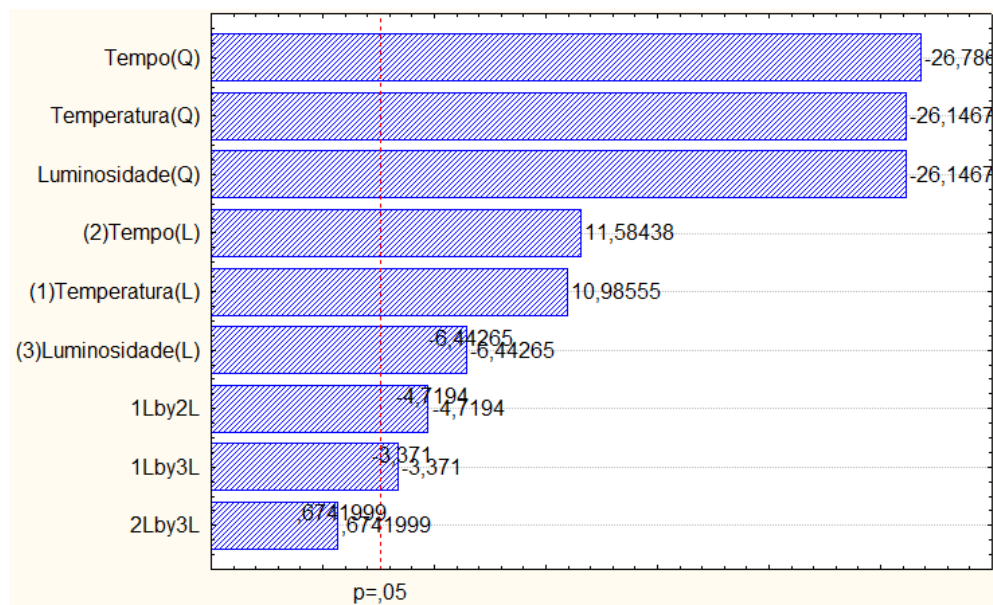
Equação 6: Modelo matemático quadrático do DCCR.

$$Y = 123,58 (\pm 0,427734) + 3,12 (\pm 0,282931)X_1 + 3,29 (\pm 0,282931)X_2 - 1,83 (\pm 0,282931)X_3 - 7,24 (\pm 0,276718)X_1^2 - 7,41 (\pm 0,276718)X_2^2 - 7,24 (\pm 0,276718)X_3^2 - 1,75 (\pm 0,370810)X_1X_2 - 1,25 (\pm 0,370810)X_1X_3$$

Onde: Y representa a resposta (nº de picos); X_1 , X_2 e X_3 representam os termos lineares e quadráticos de cada parâmetro analisado.

Os dados da **Tabela 14** podem ser confirmados graficamente pelo diagrama de Pareto (**Figura 37**), o qual mostra as variáveis em ordem de importância para o modelo de regressão, onde todos os efeitos principais quadráticos foram os mais significativos, ultrapassando o valor de $p = 0,05$, no nível de confiança 95%, comprovando que os valores são estatisticamente significativos.

Figura 37: Diagrama de Pareto com as variáveis de regressão em ordem crescente de importância de acordo com o DCCR.



Fonte: Autor.

A fim de avaliar a qualidade do modelo quadrático proposto foi feita a ANOVA conforme a **Tabela 15**.

Tabela 15: Análise de Variância do modelo com DCCR para o número de picos cromatográficos.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Nº de Graus de Liberdade	Média Quadrática (MQ)
Regressão (R)	2280,08	8	285,01
Resíduo (r)	164,47	11	14,95
Falta de Ajuste	158,97	6	26,49
Erro Puro	5,5	5	1,1
Total	2444,55	19	

$R^2 = 93,27$
 $F_{\text{calculado}} = \text{MQR/MQr} = 19,06$
 $F_{\text{tabelado}}(8,11) = 2,95$
 $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}} = 6,46$

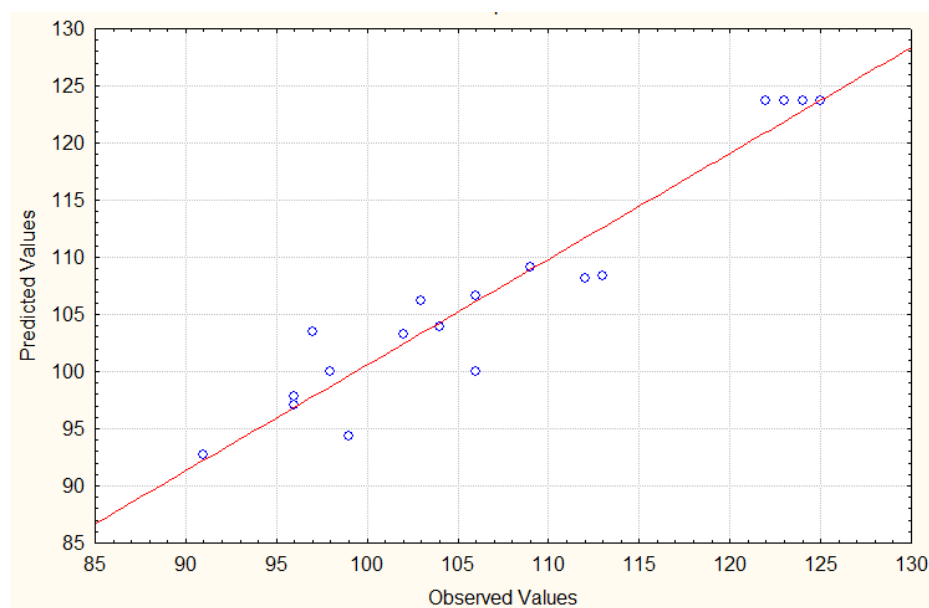
$F_{\text{calculado}} = \text{MQFA/MQEP} = 24,08$
 $F_{\text{tabelado}}(6,5) = 4,95$

Fonte: Autor.

De acordo com a **Tabela 15**, observou-se que o modelo apresentou regressão significativa, haja vista que o valor do $F_{\text{calculado}}$ (MQR/MQr) é 6,46 vezes maior que o F_{tabelado} , o que denota que a equação é estatisticamente significativa a um nível de confiança de 95%. Entretanto, a mesma possui falta de ajuste, uma vez que o $F_{\text{calculado}}$ da MQFA/MQEP é maior que o F_{tabelado} . Dessa maneira, embora a regressão seja significativa pelo teste F, segundo Barros et al. (2001) o modelo não poderia ser preditivo, uma vez que cobre uma pequena variação dos parâmetros analisados.

Todavia, mesmo que haja falta de ajuste, o modelo possui Coeficiente de Determinação (R^2) de 93,27%, portanto maior que 90%, o que evidencia que os dados experimentais estão ajustados ao modelo, além da regressão ter o valor de $F_{\text{calculado}}$ seis vezes maior que o F_{tabelado} . Segundo Box e Wetz (1973), o modelo que atende essas prerrogativas pode ser considerado preditivo. Além do mais, pela análise do gráfico dos valores observados pelos preditos (**Figura 38**), observa-se uma linearidade dos resultados, o que aponta que os valores experimentais aproximam-se satisfatoriamente dos valores preditos (BOSSO et al., 2020).

Figura 38: Valores observados pelos valores preditos para a resposta número de picos cromatográficos DCCR.



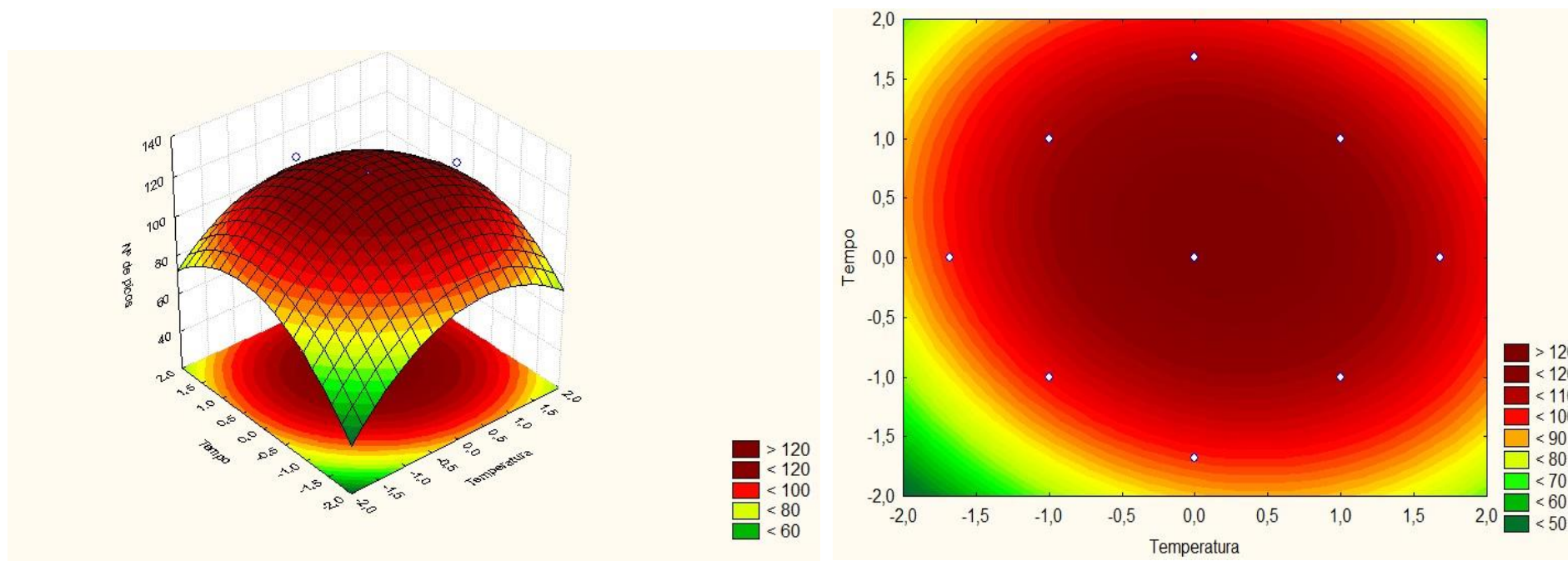
Fonte: Autor.

4.4.1 Análise da Superfície de Resposta

Após a validação do modelo de segunda ordem adotado (**equação 6**), através da análise de variância e estimativa dos efeitos principais, foram construídas as superfícies de resposta, bem como os mapas de contorno obtidos pelo programa STATISTICA, baseado na variável dependente número de picos cromatográficos. Assim, como todas as variáveis principais foram estatisticamente significativas de acordo com a **Tabela 15**, optou-se por fazer combinações entre duas variáveis independentes e a variável resposta, onde se fez variar uma das duas variáveis independentes do seu valor de mínimo ampliado até o valor de máximo ampliado com valores dentro da faixa estudada.

Inicialmente, apresenta-se a superfície de resposta e mapa de contorno para as variáveis temperatura e tempo (**Figura 39 a e b**), em relação ao aumento do número de picos. Vale destacar, que os valores apresentados nas figuras são valores reais resultantes do tratamento estatístico, ao passo que os valores que sustentam a equação são valores codificados.

Figura 39: Superfície de resposta (a) e Mapa de contorno (b) para o aumento do número de picos cromatográficos em função da temperatura e tempo de fermentação do fungo *H. monticulosum*.



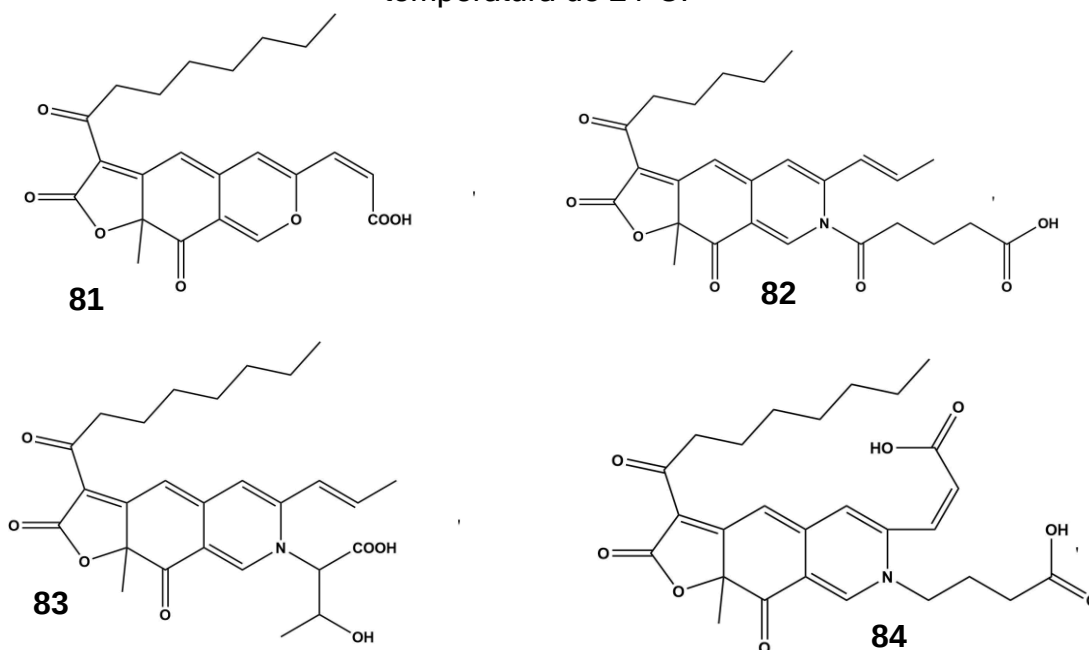
Fonte: Autor.

Analizando a **Figura 39** (a e b), é possível perceber que a maior diversidade de metabólitos secundários produzidos por *H. monticulosum* é alcançada quando os valores de temperatura e tempo de fermentação estão próximos ao do ponto central (25°C para temperatura e 21 dias de tempo de cultivo). Outro fato que é importante destacar nas figuras, em especial na figura (b), é a escolha da faixa inicial de variação desses dois parâmetros, haja vista que tanto no nível +1 como no nível -1 as respostas já se encontram em uma região de valores ótimos, o que facilita a MSR.

De acordo com Jiang et al. (2018), a temperatura e o tempo de fermentação exercem um impacto importante na síntese de metabólitos fúngicos, uma vez que é capaz de interferir nas reações enzimáticas, alterando as vias de biossíntese dos metabólitos. Dessa maneira, a ação conjunta de diversos fatores (bióticos e abióticos), bem como a idade, qualidade dos *slants*, e especiação das estruturas dos fungos, pode levar a mecanismos subjacentes de produção de metabólitos secundários ainda não revelados (ARUMUGAM et al., 2015).

Podemos citar como exemplo da influência de temperatura e tempo de fermentação, os estudos realizados por Jiang et al. (2018), ao conseguir aumentar a produção de flavonoides pelo fungo *Phellinus baumii*, a partir da diminuição da temperatura e do tempo de fermentação. E, em outra pesquisa realizada por Venkatachalam et al. (2019), ser evidenciado o crescimento e a produção de extrólitos (coloração de pigmentos secretados por fungos) (81-84) com atividade antibiótica, pelo fungo marinho *Talaromyces albobiverticillius* a medida que foi proporcionado o aumento gradual de temperatura em um curto intervalo de tempo.

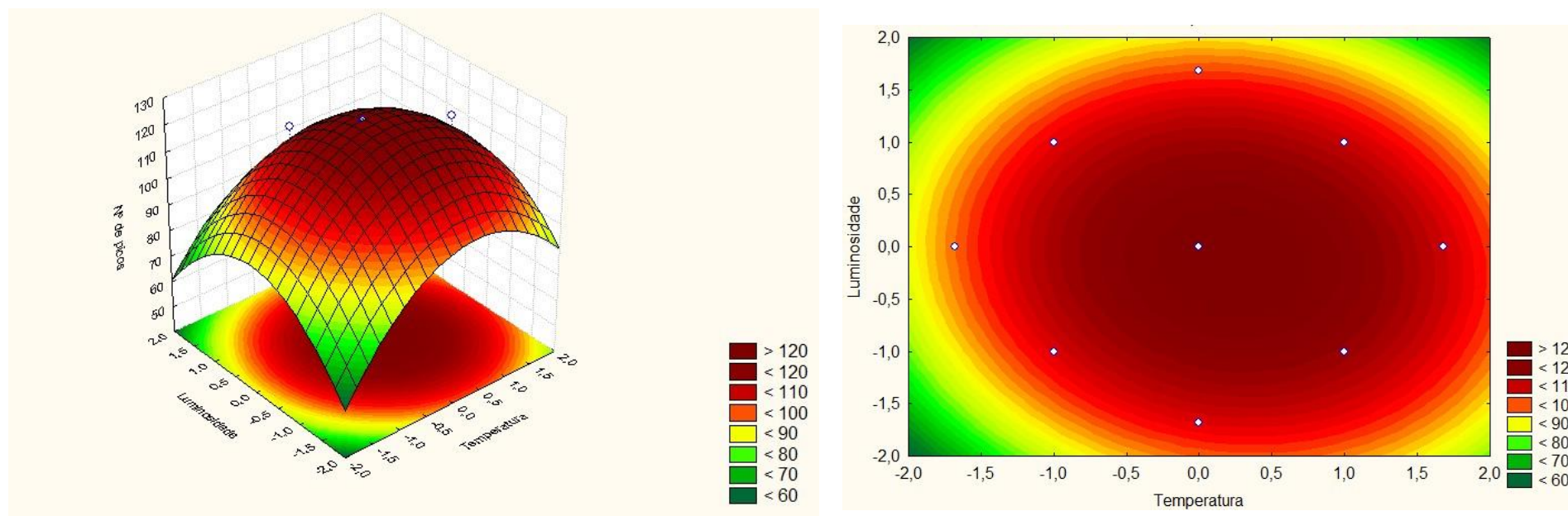
Figura 40: Estruturas químicas dos extrólitos produzidos por *T. albobiverticillus* a temperatura de 24°C.



Fonte: Venkatachalam et al. (2019). 1: PP-O; 2: *N*-glutaril-rubropunctamina; 3: *N*-treonina-monascorubramina; 4: 6-[(*Z*)-2-carboxivinil]-*N*-GABA-monascorubramina.

Desse modo, seguindo a análise de superfície de resposta e mapa de contorno, respectivamente, a **Figura 41** (c e d) mostra a influência das variáveis temperatura e luminosidade, em relação ao aumento do número de picos cromatográficos. Por elas, observa-se que o maior número de picos também é conseguido quando os valores reais estão no ponto central (25°C de temperatura e 12 horas de luminosidade).

Figura 41: Superfície de resposta (c) e Mapa de contorno (d) para o aumento do número de picos cromatográficos em função da temperatura e luminosidade do fungo *H. monticulosum*.



Fonte: Autor.

De acordo com Newman (1968), a variável temperatura se mostra como um dos principais parâmetros que pode afetar as diferentes rotas biossintéticas dos fungos, haja vista que tais microrganismos têm uma classificação específica de acordo com a temperatura ótima, que para a maioria dos fungos está entre 20°C e 30°C. Sob esse aspecto, o *H. monticulosum* é classificado como fungo psicotrófico, com temperatura ótima de crescimento entre 25°C e 40°C (CARVALHO, 2010). Essa característica sugere a justificativa da temperatura do ponto central ser a melhor condição para o possível aumento da produção metabólica e quimiodiversidade de metabólitos secundários produzidos por essa espécie.

Além disso, a temperatura tem consideráveis efeitos não só na produção de metabólitos, mas também nos aspectos morfológicos e fisiológicos dos microrganismos fúngicos, visto que em estudos de Richtie, Bains, MacQuilken (2009), a otimização da temperatura de crescimento a 25°C por *Rhizoctonia solani* favoreceu uma maior atividade antimicrobiana; já em outra pesquisa, os fungos do gênero *Aspergillus* tiveram essa mesma atividade registrada a 37°C (COMPAORE et al., 2016).

Sendo assim, um ponto importante destacado por Kamradgi e Gunagambhire (2021) é que fungos, quando estão em temperaturas abaixo da faixa ótima, podem apresentar atividade enzimática reduzida, e, conseqüentemente, levar a uma menor produção de biomassa e de metabólitos secundários, ao passo que em temperaturas acima do ótimo pode ocasionar a morte das células.

Em relação à luminosidade, pesquisas apontam que essa variável está mais relacionada à esporulação e origem do corpo de frutificação. Segundo Aghajani et al. (2018), os corpos de frutificação de algumas espécies de fungos respondem à luz por reação fototrófica produzindo esporocarpos como no fungo *Pleurotus olearius*. Entretanto, há espécies que se desenvolvem no escuro e outras com luminosidade parcial, como é o caso do *Hydnum auriscalpium*, que tanto em iluminação contínua quanto em escuridão parece ser inibitória a esporulação (BELLETINI et al, 2019).

Ainda de acordo com os últimos autores, a luminosidade também pode promover a alteração de substâncias produzidas pelos fungos, onde o uso de luminosidade provocada por lâmpadas UV com amplo espectro (100-800 nm), e irradiação na forma de pulsos de alta intensidade, pode favorecer a conversão de ergosterol em vitamina D₂ por alguns fungos basidiomicetos, em um curto intervalo de tempo.

Sob essa mesma perspectiva, Priesterjahn, Geisen e Heydt (2020), demonstraram que a luz com comprimento de onda de 450 a 475 nm, gera uma redução significativa na formação de micotoxinas pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, acompanhada pela redução da atividade transcricional dos genes biossintéticos de micotoxinas. Exemplos como estes revelam a importância da luminosidade seja para o aumento, seja para a diminuição da quimiodiversidade de metabólitos produzidos por fungos.

Nesse sentido, essa é a primeira vez que a variável luminosidade é avaliada para o fungo *H. monticulosum*, e de acordo com as respostas da **Tabela 10**, esse parâmetro foi o que teve maior efeito sobre o aumento do número de picos cromatográficos, influenciando consideravelmente em todos os ensaios realizados, inclusive no DCCR associado à MSR quando relacionado à temperatura e ao tempo de fermentação, sendo que ficou nítido o valor do ponto do ponto central como ótimo.

Portanto, foram analisadas as superfícies de resposta, assim como os mapas de contorno ao modelo ajustado. A região contém um ponto máximo, situado aproximadamente em $X_1=X_2=X_3=0$ (zero), isto é, numa temperatura de 25°C, tempo de fermentação de 21 dias e luminosidade de 12 horas. Com esses valores, de acordo com a **equação 6**, a maior diversidade de metabólitos secundários produzidos por *H. monticulosum*, verificada pelo aumento do número de picos cromatográficos por CLAE-DAD atingiu cerca de 123 a 124 picos. Dessa maneira, nossos resultados confirmam a hipótese, amplamente aceita, de que pequenas variações em condições de temperatura, tempo de fermentação e luminosidade possam impactar na quimiodiversidade de metabólitos produzidos por um determinado microrganismo.

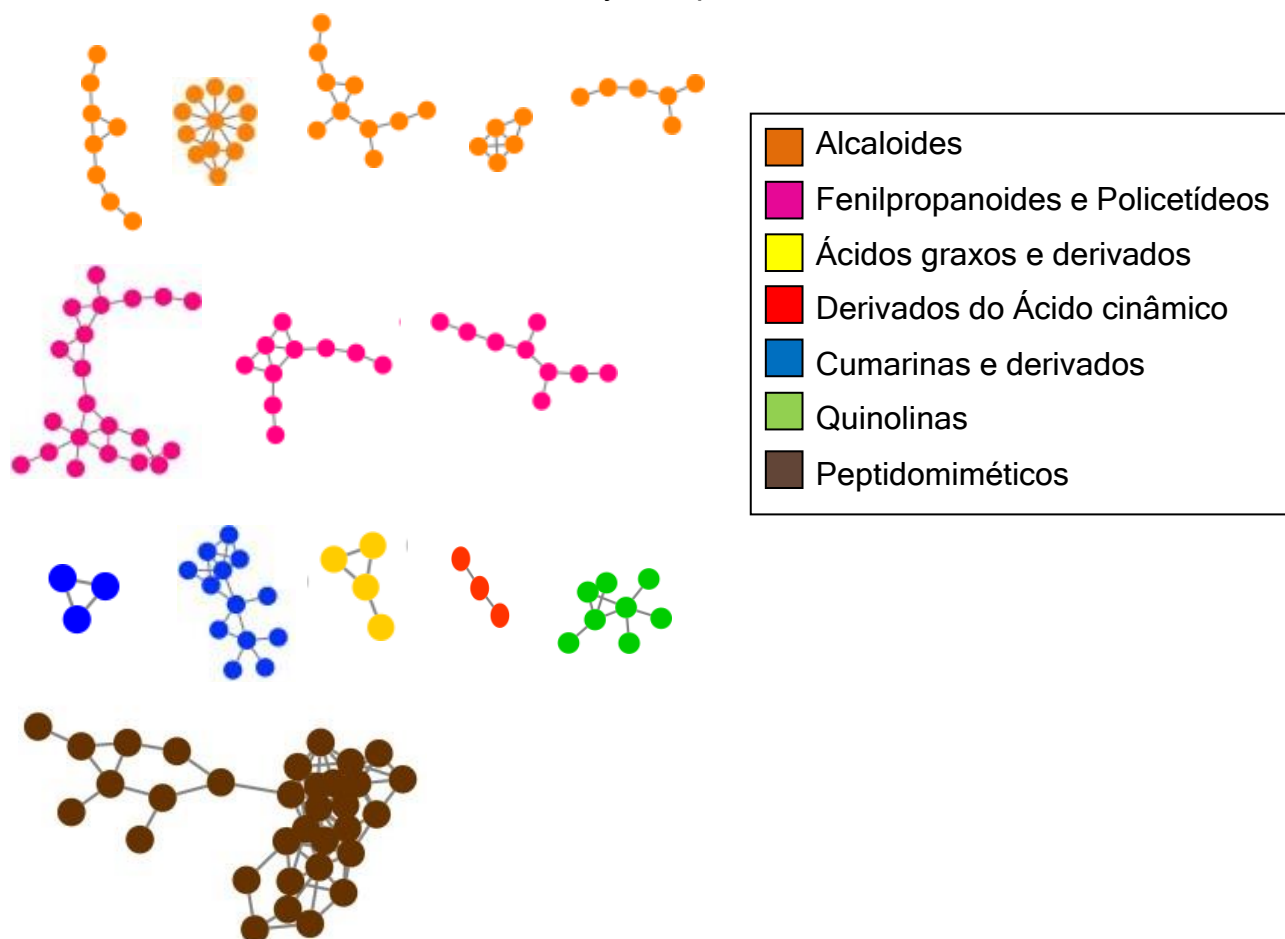
CAPÍTULO 3 - ANOTAÇÕES DA REDE DE INTERAÇÕES MOLECULARES DA PLATAFORMA GNPS

As análises de *Classical Molecular Networking* permitiram observar os perfis metabólicos dos extratos nas diferentes condições de cultivo, nos quais foram observados um total de 4045 nodos, dos quais foram organizados em 1367 clusters com pelos menos um íon. Além disso, através da ferramenta MolNetEnhancer, observou-se que a maioria dos compostos pertence à classe dos alcaloides e seus

derivados correspondendo a 35,7% do total, acompanhado por fenilpropanoides e policetídeos com 25,7%, terpenos com aproximadamente 9,0%; e as demais classes metabólicas (ácidos graxo e flavonoides, por exemplo) apresentaram-se com baixa representação em termos percentuais (**Figura 42**).

A alta representatividade de alcaloides na rede molecular deve ser vista como sinalizador e eventual alvo para pesquisas futuras, haja vista que ainda não foi reportada na literatura a presença de tais substâncias produzidas por *H. monticulosum*, com exceção de algumas dicetopiperazinas.

Figura 42: Classes químicas de produtos naturais anotadas para os clusters do *Molecular Networking* através da ferramenta MolNetEnhancer, visualizada no Cytoscape.



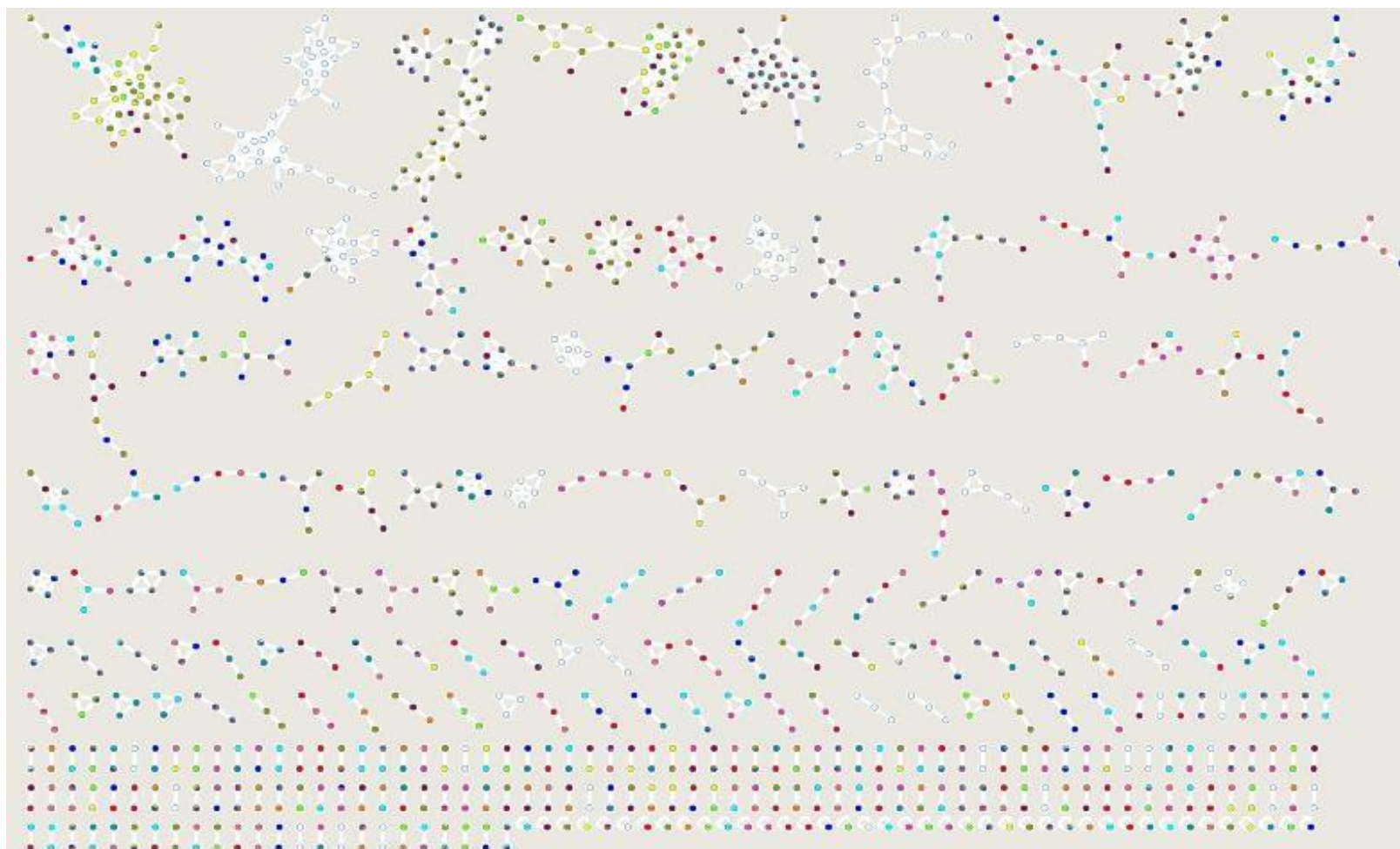
Fonte: Autor.

Outro destaque é o alto valor de cosseno das substâncias exibidas na rede, cuja maioria está entre 0,65-0,97, o que levou à classificação pela biblioteca com padrão ouro, cabendo à interpretação de que tais substâncias, provavelmente, apresentem alto índice de semelhança nos seus espectros de massas (BAUERMEISTER et al., 2022). Chama atenção também, que a condição que apresentou maior número de compostos com altos valores de cosseno, foi com a temperatura em 30 °C, tempo de incubação de 28 dias e luminosidade de 6 horas. Essa condição coincide com aquela apontada na análise estatística do Planejamento Fatorial Completo.

Do total de nodos gerados pela rede molecular, apenas 498 estão reportados na plataforma do GNPS, dos quais foram organizados em 69 *clusters* após remover aqueles relacionados ao branco. Dessa maneira, alguns metabólitos foram anotados nos extratos pelo GNPS, enquanto outros foram anotados fazendo análise comparativa com outras bases de dados como *Dictionary of Natural Products* e *The Natural Products Atlas*.

A **Figura 43** representa a rede de interações moleculares obtida no Cytoscape, onde foram estabelecidas cores aos nodos para diferenciação dos extratos fúngicos obtidos ao longo do Planejamento Fatorial Completo, sendo os ensaios de 1 a 11 representados, respectivamente, pelas cores Laranja, Amarelo, Verde claro, Verde musgo; Marrom; Azul piscina; Azul celeste; Azul escuro; Vermelho; Carmim e Rosa; além da cor branca, que representou apenas o meio de cultivo.

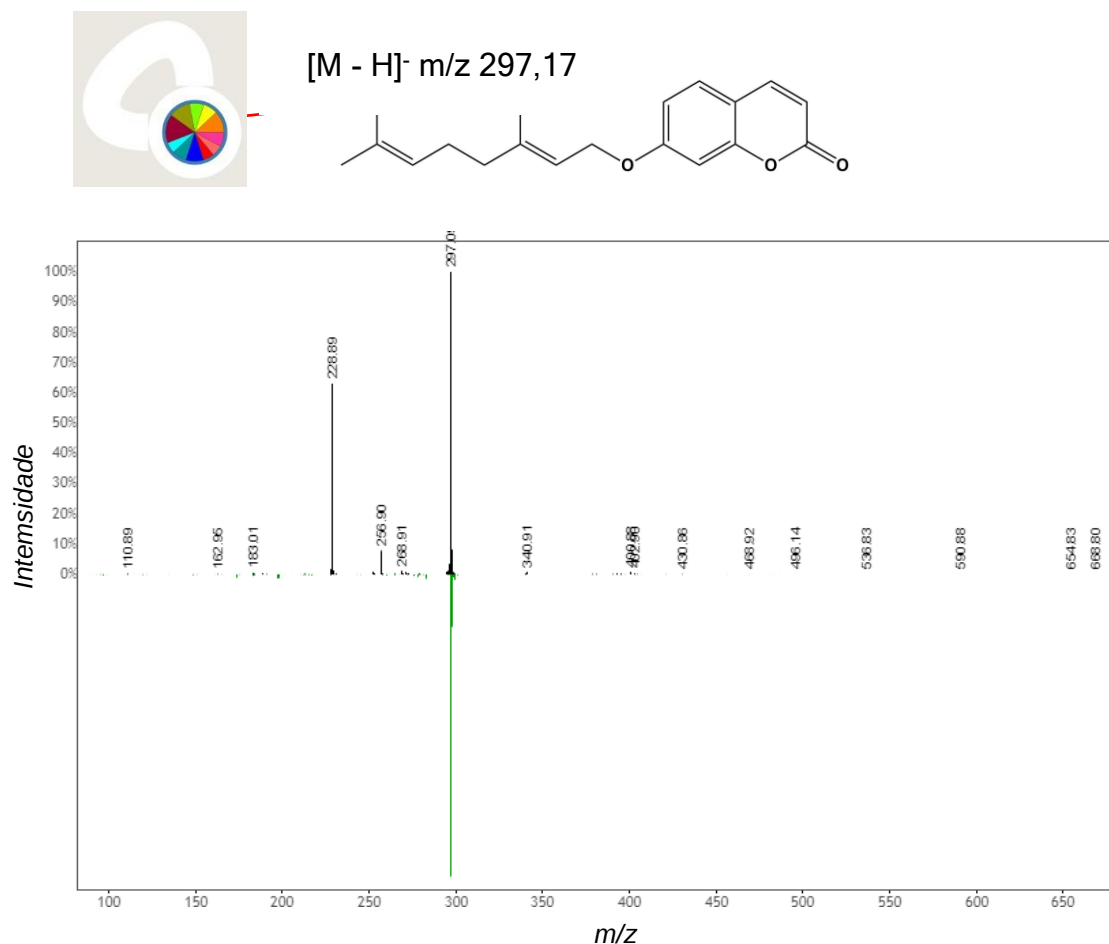
Figura 43: Representação da rede de interações moleculares obtida para os extratos avaliados a partir do Planejamento Fatorial completo 2^3 para o fungo *H. monticulosum*.



Fonte: Autor.

O primeiro nodo anotado foi o monoterpene cumarínico aurapteno (**Figura 44**), cuja principal característica é a presença de um anel benzênico fundido a uma lactona, que se mostrou presente em todos os extratos analisados. Estudos com essa substância revelaram que se trata de um produto natural encontrado, principalmente em plantas da família Rutaceae, exibindo importante atividade antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antileishmania e anticancerígena (NAPOLITANO et al., 2004; BIBAK et al., 2019; NAJARAN; NAJARAN; EGHBALI; 2021).

Figura 44: Produção de Aurapteno por *H. monticulosum* observada através da rede molecular e comparação do espectro de massas.



Fonte: Autor.

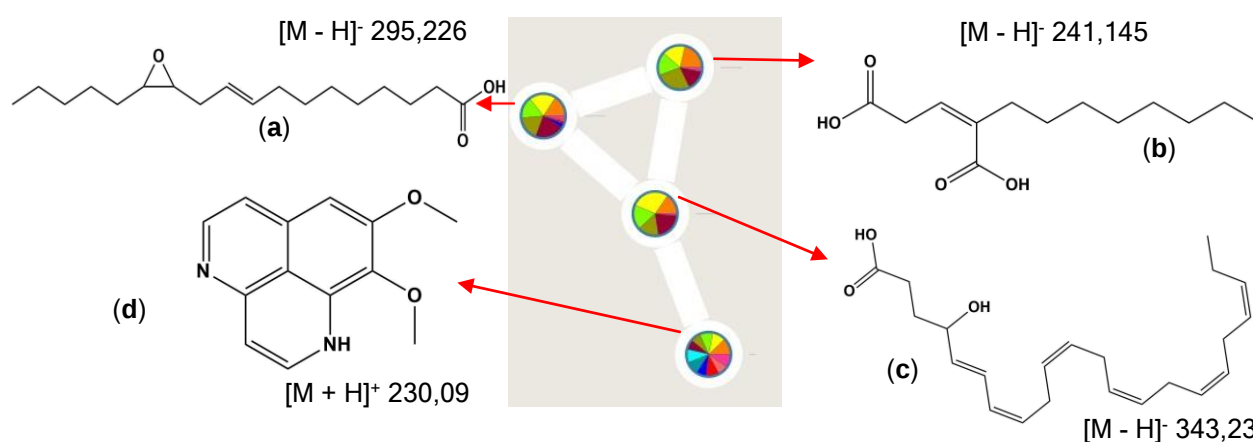
A presença de auropteno em todos os extratos pressupõe que independente da condição de cultivo, o fungo *H. monticulosum* consegue biossintetizá-la por uma rota, provavelmente, diferente daquela utilizada pelas plantas; haja vista que não é comum a produção de auroptenos pelo microrganismo.

Um *cluster* representativo de ácidos graxos insaturados foi observado na rede molecular, acompanhado do alcaloide aptamina (**Figura 45**).

De acordo com Meng et al. (2021), a produção de ácidos graxos insaturados por fungos endofíticos decorre como resultado da micorrização (associação mutualística entre fungos e plantas), oferecendo tolerância e proteção ao material vegetal envolvido. Nesse processo, os ácidos graxos originados podem ser mono ou poli-insaturados, com uma diversidade de aplicações sobre condições inflamatórias, como artrite, doença de Alzheimer e lúpus.

Sendo assim, pela análise das redes moleculares foi possível perceber que a provável produção de tais ácidos graxos mostrou-se acentuada, principalmente, nos experimentos de 01 a 05, o que revelou a influência das interações entre as variáveis eleitas para o planejamento de experimentos, com destaque a luminosidade.

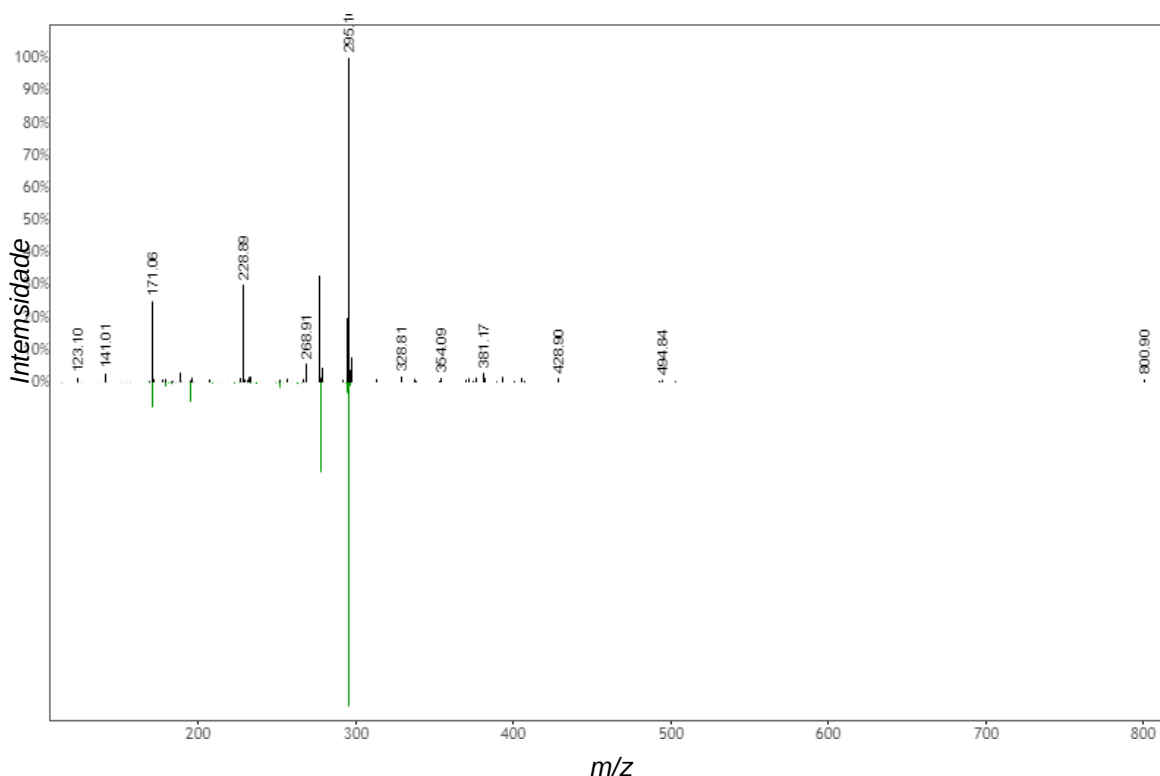
Figura 45: Produção de ácidos graxos insaturados e aptamina por *H. monticulosum* observada através da rede molecular.



Fonte: Autor. (a): ácido 12(13)-epóxi-9Z-octadecenoico; (b): ácido (Z)-2-octilpent-2-enodioico; (c): ácido (+/-)-4-Hidroxy-5E,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosaheptaenoico; (d): aptamina.

O nodo representado pela substância (a) trata-se, supostamente, de um derivado do ácido vernólico, um ácido graxo de cadeia longa, monoinsaturado e contém um epóxido, extraído de alguns representantes da família Euphorbiaceae e também das sementes de *Vernonia galamensis* (erva de ferro) em quantidades não significativas, cuja aplicação tem sido na indústria como substituto de aglutinantes e plastificantes, sendo promissor na redução da poluição atmosférica (CAHOON et al., 2002; METZGER; BORNSCHEUER, 2006) (**Figura 46**).

Figura 46: Comparação dos espectros de massas da plataforma GNPS com o experimento do composto ácido 12(13)-epóxi-9Z-octadecenoico.

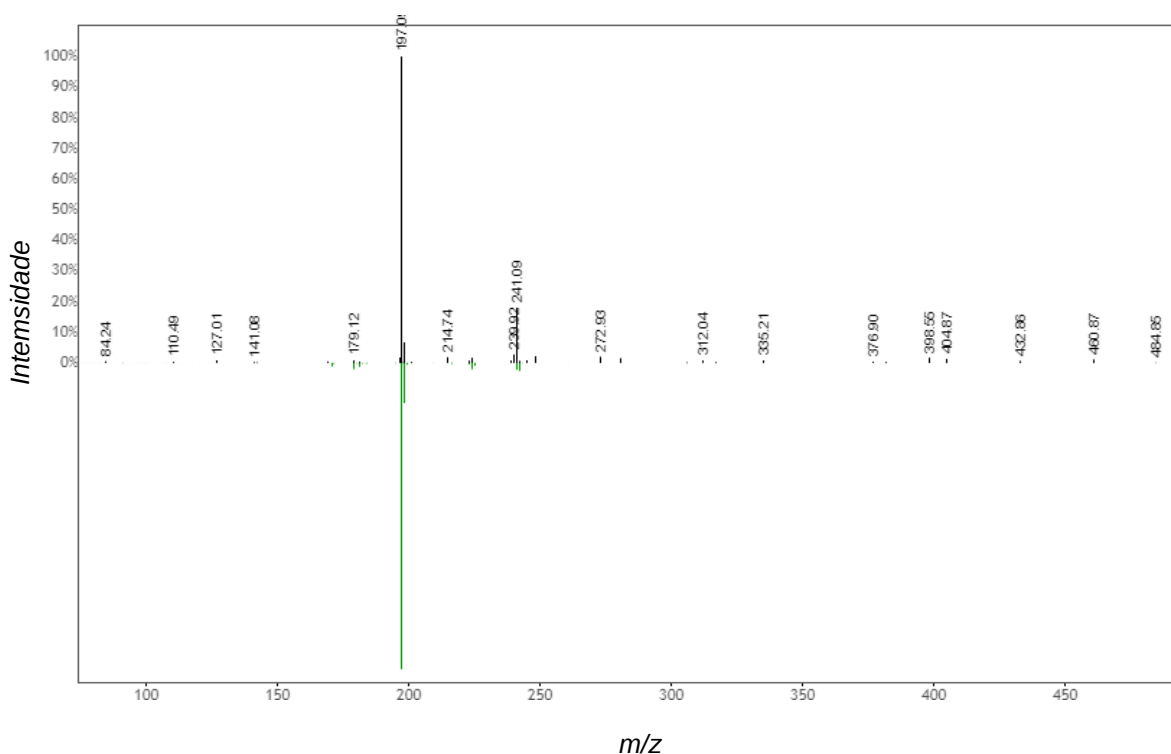


Fonte: Autor.

Já a substância indicada na figura 45 (b), possui espectro de massas com um único pico intenso em m/z 197,10 justificado pela perda de CO_2 (**Figura 47**). Essa substância carece de estudos quanto à atividade biológica, uma vez que até o presente momento não foram precisas as informações na literatura. Contudo, supõe-se que seja algum produto modificado pelo fungo derivado do ácido fumárico, uma vez que a presença da dupla ligação e do grupo carboxílico, confere ao ácido fumárico propriedades únicas e adequadas para a fabricação de polímeros, além do fumarato funcionar como intermediário no ciclo do ácido cítrico usado pelas células para a produção de Adenosina Trifosfato (ATP), entre outras propriedades (GUO et al., 2020; SEBASTIAN et al; 2021).

Por fim, a substância mostrada na figura 45 (c) provavelmente seja um derivado do ácido docosahexanoico, uma forma de ômega-3, que é essencial para o ser humano principalmente na prevenção da doença de Alzheimer e enfermidades cardiovasculares.

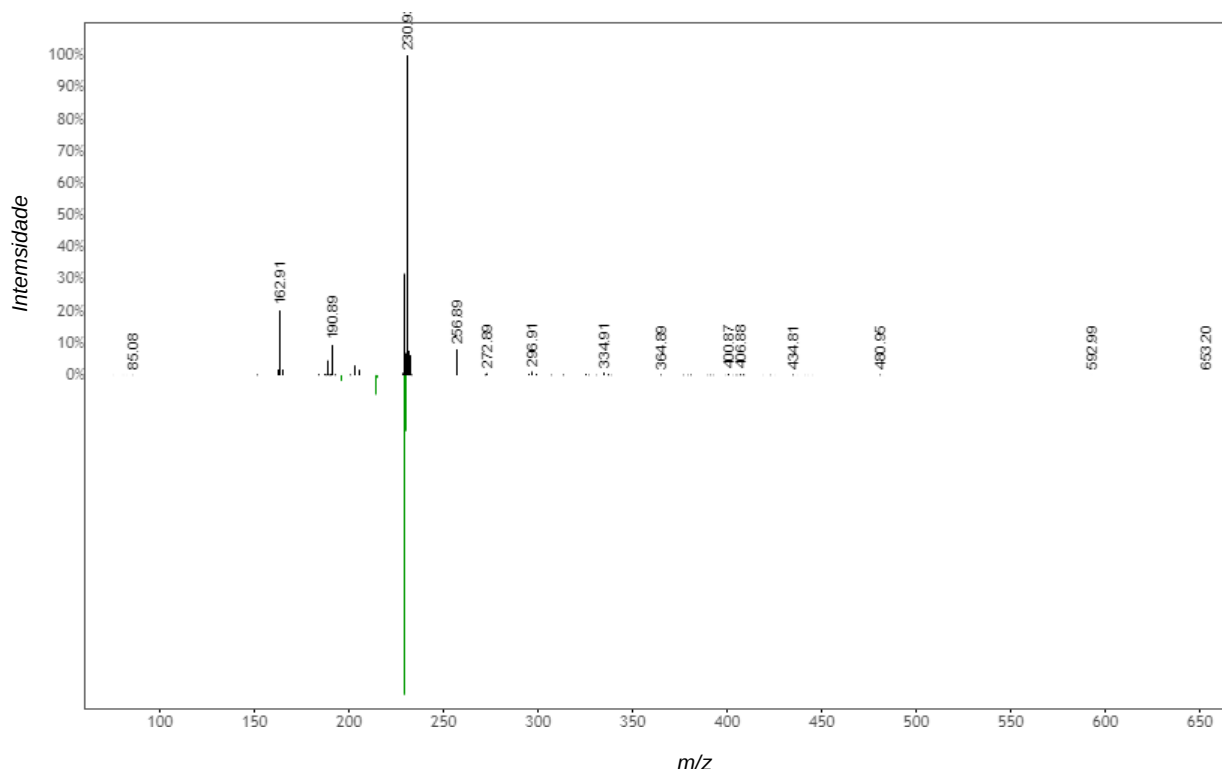
Figura 47: Comparação dos espectros de massas da plataforma GNPS com o experimento do composto ácido (Z)-2-octilpent-2-enodioico.



Fonte: Autor.

Na rede molecular também foi possível sugerir a presença da aaptamina, um alcaloide isoquinolínico cuja principal característica é a presença do esqueleto 1*H*-benzo[*de*]-1,6-naftiridina, que apresentou cosseno de 0,79 e mostrou-se presente em todos os extratos analisados. Para esse composto em particular, a similaridade com a informação do GNPS foi com a molécula em modo positivo, fato que justificou as fragmentações observadas, haja vista a similaridade pelo valor de cosseno (Figura 48).

Figura 48: Comparação dos espectros de massas da plataforma GNPS com o experimento do composto aptamina no modo positivo.

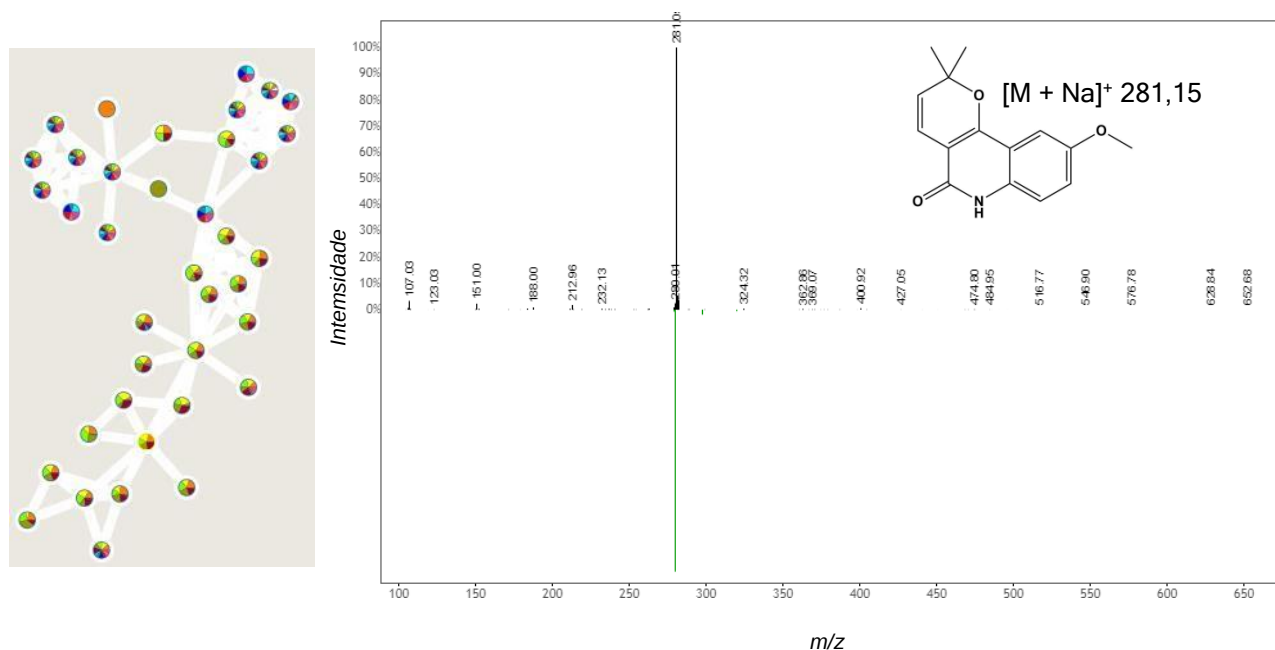


Fonte: Autor.

Estudos com aptamina mostraram que se trata de um produto natural marinho isolado de esponjas do mar, principalmente do gênero *Aaptos*, com importante atividade antioxidante, antimicrobiana, antifúngica e antiviral. Mais recentemente, foi constatado potencial citotóxico moderado frente às células adultas de leucemia (DYSHLOVOY et al., 2014; HAMADA, MATSUMOTO, PHAN; 2019).

Um *cluster* referente à haplamina foi evidenciado, cujo metabólito foi sintetizado principalmente nos ensaios 01 e 04 (nodos laranja e verde musgo, respectivamente), revelando a influência da temperatura como variável predominante para sua produção pelo fungo *H. moticulosum*. Além disso, o metabólito apresentou-se na forma de $[M + Na]^+$ (Figura 49).

Figura 49: Produção de haplamina por *H. monticulosum* observada na rede molecular e comparação dos espectros de massas.



Fonte: Autor.

A haplamina é um alcaloide quinolínic, comumente isolado da planta *Haplophyllum perforatum*, empregada no tratamento de várias doenças, incluindo câncer testicular, pancreático, colorretal e hepático (EA et al., 2008; MOHAMMADHOSSEINI et al., 2021).

Notavelmente, a rede de interações moleculares e a utilização do GNPS, bem como das ferramentas *in silico* disponibilizadas pela plataforma, foram essenciais para obter informações dos extratos avaliados, principalmente sobre as interações das variáveis eleitas para o planejamento de experimentos, ao revelar a eventual presença de alcaloides e com importantes atividades biológicas. Além disso, foi possível obter a informação de metabólitos análogos a partir da comparação de informações químicas, haja vista que não apresentaram similaridade com as estruturas mostradas nas bases de dados.

Sendo assim, é importante destacar que mesmo que a base do GNPS disponibilize milhares de espectros de referência MS/MS atualmente, estes ainda cobrem apenas uma fração das moléculas microbianas, e a dificuldade aumenta quando as redes moleculares são geradas com dados em modo negativo de fragmentação, o que torna-se um gargalo na abordagem de correspondência de

bibliotecas espectrais. Mesmo assim, a perspectiva da análise metabolômica não orientada, pode servir como norte no estudo de microrganismos.

CAPÍTULO 4 - PERFIL BIOLÓGICO DOS EXTRATOS

4.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO

Nos últimos anos, a resistência bacteriana aos medicamentos tem se tornado um grave problema de saúde pública, onde o uso excessivo ou inadequado de antibióticos, associada à falta de higiene, má prevenção e controle da infecção, fez com que esse tipo de medicamento se tornasse menos eficaz contra infecções bacterianas. Nesse sentido, a busca por novos agentes antimicrobianos é imprescindível, com destaque aqueles advindos de endófitos marinhos, haja vista que a literatura recente aponta tal atividade em substâncias isoladas de simbioses de algas, esponjas, corais e fungos (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020).

Sendo assim, a **Tabela 16** mostra os resultados obtidos para a atividade antibacteriana dos extratos brutos do planejamento fatorial completo 2^3 e da curva de crescimento do fungo *H. monticulosum*. Os resultados da triagem foram definidos pela presença ou ausência de atividade na concentração testada (512 µg/mL), a qual também foi considerada como a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Dessa maneira, os compostos com atividade antibacteriana são aqueles que obtiveram resultado ≤ 512 , logo não houve atividade antibacteriana para os extratos testados.

Tabela 16: Resultado da triagem antibacteriana dos extratos brutos.

Linhagens bacterianas	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	07	14	21	28	35
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>S. aureus</i> ATCC 8095	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>E. faecium</i> ATCC 700221	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512

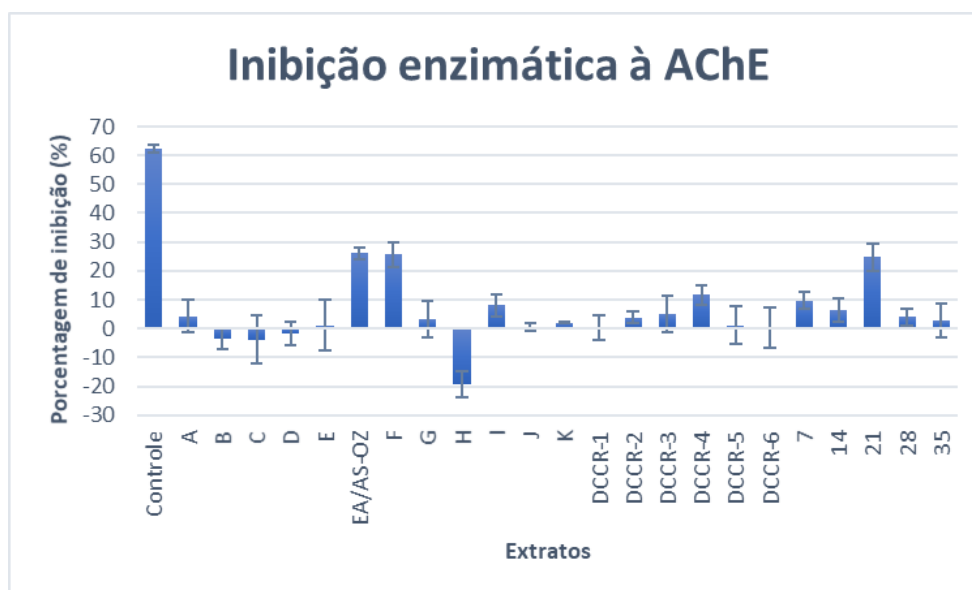
Fonte: Autor. **Legenda:** Em cinza estão as bactérias Gram (+) e em branco estão as bactérias Gram (-).

4.6 TRIAGEM PONTUAL DE INIBIDORES PARA AS ENZIMAS CALICREÍNA (KLK) E ACETILCOLINESTERASES (AChE E BChE)

4.6.1 Triagem de inibidores da acetilcolinesterase (AChE e BChE)

Os dados obtidos dos ensaios de inibição enzimática com os biorreatores AChEee para cada amostra estão descritos e podem ser comparados com o inibidor padrão de galantamina na **Figura 50**. Aqui, foi possível perceber que a maioria dos extratos não apresentou atividade anticolinesterásica, salvo o extrato otimizado em escala ampliada, o extrato do ensaio F que corresponde à condição de temperatura a 30 °C, tempo de fermentação de 28 dias e 6 horas de luminosidade, e o extrato da curva de crescimento de 21 dias, que apresentaram fraca atividade.

Figura 50: Gráfico dos resultados do ensaio de triagem para AChEee para cada extrato.

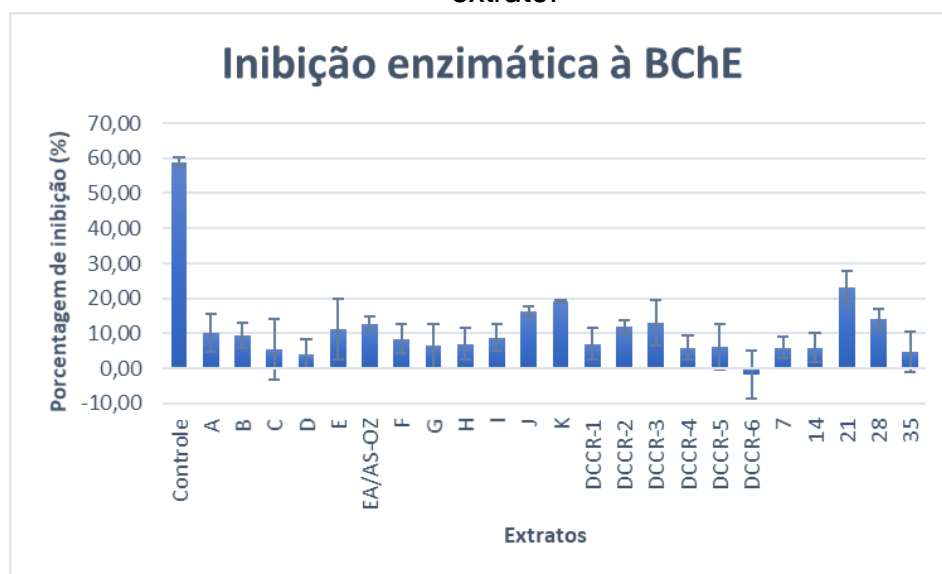


Fonte: Autor. **Legenda:** EA/AS-02: Extrato Otimizado em escala ampliada; DCCR 1-6: Extratos do Delineamento Composto Central Rotacional.

Os dados obtidos dos ensaios de inibição enzimática com os biorreatores BChEhu para cada amostra estão descritos na **Figura 51** e também podem ser comparados com o inibidor padrão de galantamina. Nessa situação, é perceptível a diferença de atividade comparada com a figura anterior, uma vez que frente a enzima BChEhu, a maioria dos extratos apresenta ao menos traços de atividade

anticolinesterásica, especialmente, no extrato da curva de crescimento de 21 dias, que em relação aos demais foi o que teve maior atividade.

Figura 51: Gráfico dos resultados do ensaio de triagem para BChEhu para cada extrato.



Fonte: Autor. **Legenda:** EA/AS-02: Extrato Otimizado em escala ampliada; DCCR 1-6: Extratos do Delineamento Composto Central Rotacional.

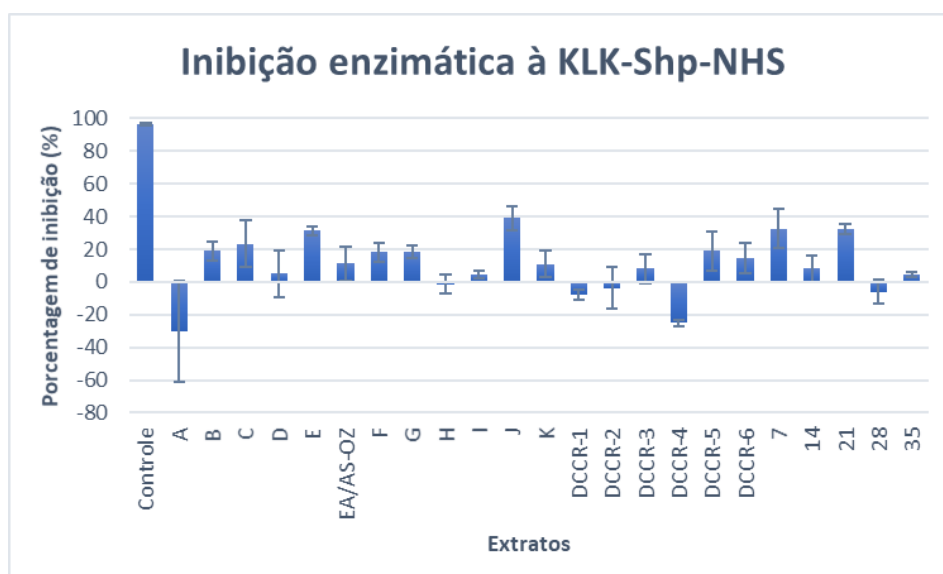
A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor produzido no sistema nervoso central e periférico, responsável diretamente pela regulação da memória, sono e cognição que, em quantidade inadequada pode contribuir para a doença de Alzheimer (PARRAVICINI et al., 2021). Para tanto, no curso da transmissão do impulso nervoso é necessário que a ACh seja degradada, cuja função é desempenhada por enzimas conhecidas como colinesterases, a saber: acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) (KAUSAR et al., 2022).

As duas enzimas têm estruturas gerais semelhantes, onde no cérebro saudável, a proporção de AChE é de aproximadamente 80%, ao passo que de BChE é de 20%. Todavia, à medida que a doença de Alzheimer avança sobre o paciente, ocorre uma inversão na proporcionalidade dessas enzimas no cérebro, na qual a concentração de AChE cai para algo em torno de 10-15%. Assim, é imprescindível fazer a triagem de inibição simultaneamente, e em proporções adequadas (GAO et al., 2021).

4.6.2 Triagem de inibidores da caliceína (KLK)

Os dados obtidos dos ensaios de inibição enzimática com a enzima caliceína KLK-Shp-NHS para cada extrato avaliado podem ser visualizados e comparados com o controle (inibidor padrão de leupeptina) na **Figura 52**. Nesse ensaio, quatro extratos mostraram-se promissores para atividade de inibição enzimática de caliceína, o extrato do experimento E, que corresponde à condição de temperatura de 30 °C, tempo de fermentação de 14 dias e luminosidade de 6 horas; o extrato do experimento J, que corresponde às condições de temperatura, tempo de fermentação e luminosidade, equivalentes ao ponto central, e os extratos da curva de crescimento em 07 dias e 21 dias, respectivamente.

Figura 52: Gráfico dos resultados do ensaio de triagem para KLK-Shp-NHS para cada extrato.



Fonte: Autor. **Legenda:** EA/AS-02: Extrato Otimizado em escala ampliada; DCCR 1-6: Extratos do Delineamento Composto Central Rotacional.

Estudos da literatura pontuam que as caliceínas teciduais humanas (KLKs) pertencem a uma família de serinoproteases, que em diferentes formas de expressão e atividade, podem estar envolvidas em várias condições fisiológicas e patológicas. Por exemplo, níveis alterados de KLK6 podem estar associados à esclerose múltipla e doença de Parkinson, assim como altos índices de KLK8 foram detectados em cérebros humanos com Alzheimer, enquanto a KLK3 foi verificada como marcador para câncer de próstata (CARVALHO et al., 2021; PRASSAS et al., 2015). Portanto, a desregulação dessas enzimas envolve uma variedade de

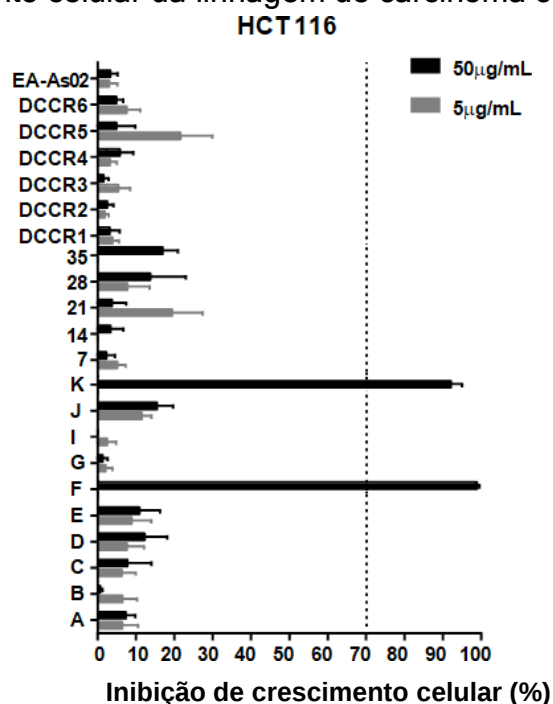
patologias, que as torna alvos terapêuticos para estas doenças por meio da inibição de KLKs.

4.7 ENSAIO ANTITUMORAL (CITOTOXICIDADE)

Analisando a **Figura 53** e **Tabela 17** é possível perceber que as amostras testadas não apresentaram alto potencial citotóxico, haja vista que nenhuma delas apresentou percentual de inibição do crescimento celular superior a 70% na concentração de 5 µg/mL. Os extratos que tiveram maior representatividade nessa concentração foram o do experimento DCCR5 com 21,6% de inibição, cuja condição foi temperatura a 25 °C, tempo de fermentação em 21 dias e luminosidade de 2 horas, e da curva de crescimento em 21 dias com 19,4% de inibição.

Em relação a concentração de 50 µg/mL, os extratos do ensaio F e K apresentaram uma interessante inibição do crescimento celular, com 99,0% e 92,1% respectivamente. Portanto, faz-se necessário otimizar as condições de cultivo da linhagem fúngica em questão, tendo como objetivo amplificar o potencial citotóxico, principalmente na menor concentração.

Figura 53: Porcentagem de inibição dos extratos brutos de *H. monticulosum* frente ao crescimento celular da linhagem de carcinoma colorretal (HCT-116).



Fonte: Autor. **Legenda:** EA/AS-02: Extrato Otimizado em escala ampliada; DCCR 1-6: Extratos do Delineamento Composto Central Rotacional.

Tabela 17: Porcentagem de inibição dos extratos brutos de *H. monticulosum* frente ao crescimento celular da linhagem de carcinoma colorretal (HCT-116) nas concentrações de 5µg/mL e 50 µg/mL (média ± SEM) (n=2)

	5µg/mL		50µg/mL	
	Mean	SEM	Mean	SEM
A	6.43	4.11	7.31	2.51
B	6.47	3.84	0.69	0.59
C	6.28	3.67	7.72	6.32
D	7.63	4.48	12.23	5.89
E	8.84	5.12	10.92	5.39
F	0.00	0.00	98.99	0.60
G	2.11	1.74	1.32	1.32
I	2.40	2.40	0.00	0.00
J	11.54	2.47	15.50	4.15
K	0.00	0.00	92.12	2.92
7	5.13	2.11	2.25	2.25
14	0.00	0.00	3.33	3.33
21	19.37	7.99	3.72	3.72
28	7.76	5.80	13.77	9.21
35	0.00	0.00	16.95	3.99
DCCR1	3.85	1.73	3.16	2.58
DCCR2	1.82	1.06	2.53	1.55
DCCR3	5.35	3.14	1.53	1.35
DCCR4	3.18	1.84	5.82	3.45
DCCR5	21.59	8.32	4.91	4.91
DCCR6	7.57	3.49	4.88	1.76
EA-AS02	3.05	2.07	3.30	1.91

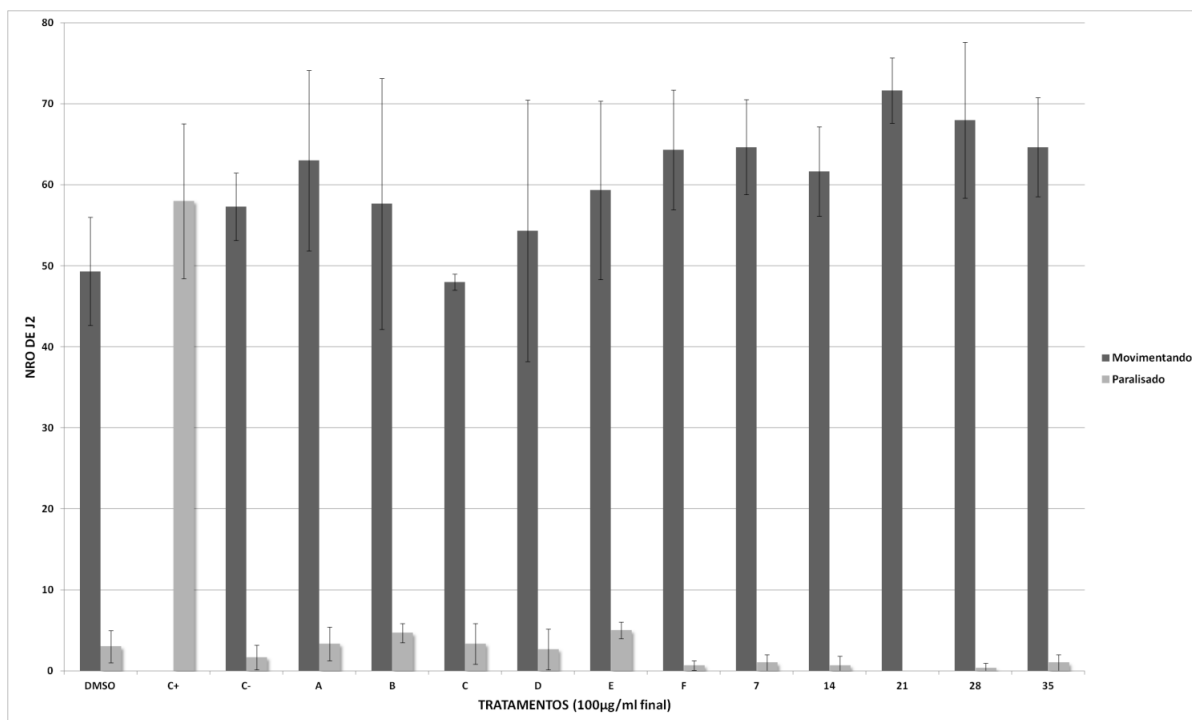
Fonte: Autor. **Legenda:** EA/AS-02: Extrato Otimizado em escala ampliada; DCCR 1-6: Extratos do Delineamento Composto Central Rotacional.

4.8 POTENCIAL NEMATICIDA

Os resultados do bioensaio contra nematodos demonstraram que as amostras avaliadas não exibiram atividade nematotóxica na concentração de 100µg/mL⁻¹ contra J2 de *M. incognita*, após 48 horas de exposição (**Figura 54**).

Em razão do resultado obtido, não foi realizado o bioensaio de recuperação. Assim, faz-se necessário a realização de um novo bioensaio *in vitro* de nematotoxicidade utilizando a concentração de 200 ou 300µg/mL⁻¹ das amostras previamente avaliadas, bem como das outras amostras que não foram testadas nessa oportunidade.

Figura 54: Bioensaio *in vitro* de viabilidade das amostras obtidas a partir de *H. monticulosum* denominadas (A, B, C, D, E, F, 7, 14, 21, 28 e 35) sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, após 48 horas de exposição. Controle negativo (C-) dH₂O; Controle positivo (C+) álcool - EtOH 70% e Controle interno DMSO 1%.



Fonte: Autor.

A literatura recente tem apontado a importância e a possibilidade da utilização de metabólitos secundários de fungos endofíticos no cotidiano agrícola, com destaque ao potencial nematicida, haja vista que os nematoides afetam de modo considerável o crescimento das plantas e o rendimento das culturas (FARHAT et al., 2022). Nesse sentido, Chapla, Biasetto e Araújo (2013) destacam que as estruturas químicas dos metabólitos nematicidas são diversificadas, incluindo ácidos graxos simples, lactonas, antraquinonas, alcaloides, entre outros. Portanto, como a análise do perfil químico dos extratos investigados por meio de redes moleculares apresentou algumas das classes citadas, torna-se interessante a realização de ensaios adicionais visando a identificação de substâncias bioativas com potencial nematotóxico.

Tendo em vista ao exposto, a realização do planejamento de experimentos para o cultivo do fungo *H. monticulosum* representou um avanço importante na busca de novos produtos bioativos, principalmente, quando comparamos com

trabalhos anteriores em nosso grupo de pesquisa, nos quais extratos da mesma linhagem fúngica praticamente não mostraram resposta para atividade anticolinesterásica e antitumoral. No presente trabalho, os resultados obtidos para estas atividades biológicas apresentaram-se satisfatórios, mesmo levando em consideração na matriz resposta o número de picos cromatográficos. Isso sugere que, para pesquisas futuras, seja considerado como matriz resposta do deliameamento experimental o potencial bioativos dos extratos a serem testados .

Importante ainda ressaltar que, apesar das atividades antibacteriana e nematocida não apresentarem potencial relevante, a triagem negativa não exclui a possibilidade das amostras apresentarem tais atividades em concentrações maiores, como sugerido no ensaio nematocida. Além disso, a literatura é vasta quanto aos efeitos sinérgicos e/ou antagônicos eventualmente presentes, em especial para bioensaios de extratos brutos.

CAPÍTULO 5 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS PRODUZIDAS POR *H. monticulosum* NO MÉTODO CULTIVO OTIMIZADO

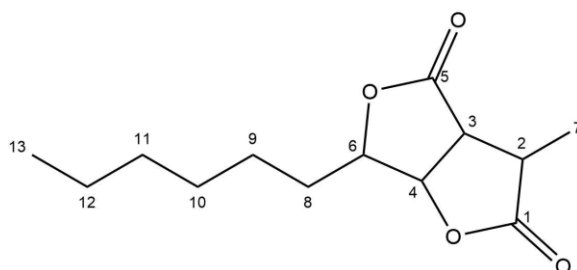
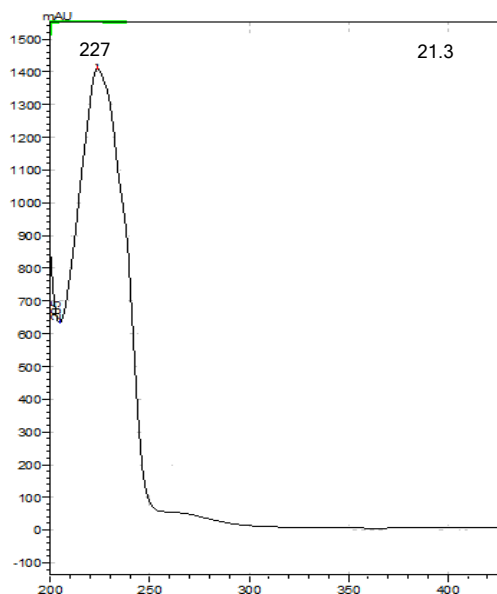
4.9 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA S01

A substância **S01** foi obtida como um óleo incolor, que após a análise dos dados espectroscópicos e espectrométricos, foi identificada como Dihidroesporotriolídeo. Tal substância é uma furofurandiona, anteriormente encontrada em *H. monticulosum* com importante atividade antifúngica (SARUP et al., 2014).

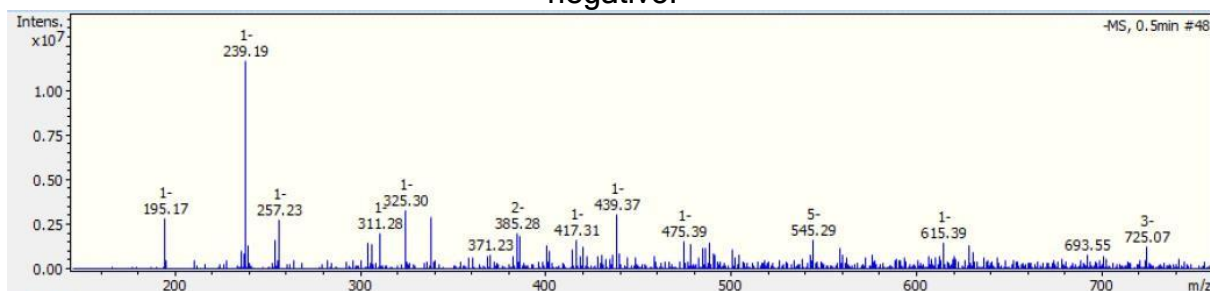
A **Figura 55** mostra seu espectro UV-Vis, no qual é possível destacar bandas de absorção em 227 nm (MeOH).

Figura 55: Espectro no UV-Vis da substância **S01**.

Fonte: Autor.

**S01**

Sua fórmula molecular foi definida como $C_{13}H_{20}O_4$ através da análise dos dados de RMN, bem como do seu espectro de massas de baixa resolução (ESI-IT) no modo negativo (**Figura 56**), cujo pico base em m/z foi 239,19 $[M - H]^-$.

Figura 56: Espectro de massas de baixa resolução da substância **S01**, modo negativo.

Fonte: Autor.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 57**) de **S01** mostrou dois hidrogênios metílicos, sendo um tripleto em δ_{H} 0,86 (J_{13-12} 7,0 Hz, H-13, 3H), e um dubleto em δ_{H} 1,20 referente ao H-7 (J_{7-2} 7,5 Hz, 3H), que acopla com H-2 α -carbonílico; cinco hidrogênios metilênicos sendo um quadrupletto em δ_{H} 1,68 (H-8), e quatro multipletos em δ_{H} 1,38 (H-9), 1,32 (H-10), 1,26 (H-11) e 1,27 (H-12); quatro hidrogênios metínicos sendo dois hidrogênios α -carbonílicos, com um multipletto em δ_{H} 3,27 (H-2), e um duplo dubleto em δ_{H} 3,70 (J_{3-2} 10,1 Hz e J_{3-4} 6,0 Hz, H-3, 1H), e dois hidrogênios oximetínicos com um duplo dubleto em δ_{H} 5,14 (J_{4-6} 6,0 Hz e J_{4-3} 4,0 Hz, H-4, 1H) e um multipletto em δ_{H} 4,79 (H-6).

Já no mapa de contorno de HSQC (**Figura 58**), juntamente com os valores das integrações no espectro de RMN de ^1H , foi possível identificar sinais para cinco carbonos metilênicos em δ_{C} 28,3 (H-8), δ_{C} 24,9 (H-9), δ_{C} 28,4 (H-10), δ_{C} 31,1 (H-11) e δ_{C} 22,7 (H-12); quatro carbonos metínicos em δ_{C} 35,9 (H-2), δ_{C} 44,6 (H-3), δ_{C} 78,6 (H-4), δ_{C} 80,6 (H-6); e duas carbonilas em δ_{C} 177,4 (C-1) e δ_{C} 173,3 (C-5).

No mapa de contorno HMBC (**Figura 59**) foram observadas correlações do hidrogênio H-2 com os carbonos C-1, C-3, C-5 e C-7, hidrogênio H-3 com os carbonos C-1, C-2 e C-5, hidrogênio H-4 com os carbonos C-5 e C-6, hidrogênio H-6 com os carbonos C-4, C-8 e C-9, hidrogênio H-7 com os carbonos C-1, C-2 e C-3, hidrogênio H-8 com os carbonos C-6, C-9 e C-10, hidrogênio H-9 com os carbonos C-8 e C-11, e ainda, do hidrogênio H-10 com o carbono C-9, hidrogênio H-11 com o carbono C-10 e hidrogênio H-12 com os carbonos C-11 e C-13.

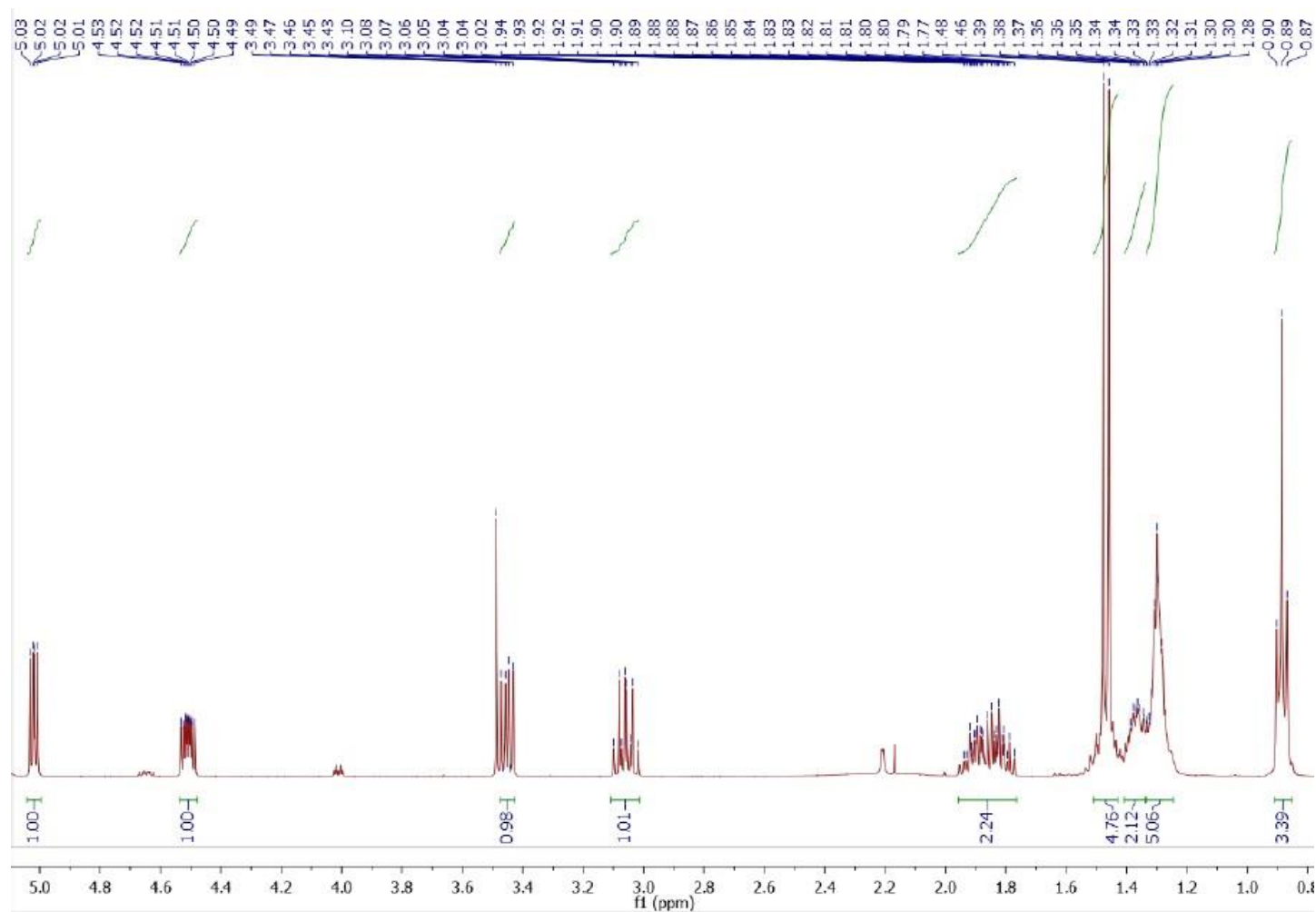
Os dados de RMN foram compilados na **Tabela 18** para melhor visualização dos sinais de ^1H e ^{13}C atribuídos a **S01**.

Tabela 18: Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) da substância **S01**.

Posição	^1H δ (ppm)	^{13}C δ (ppm)
1	-	177,12
2	3,27 (m)	35,89
3	3,70 (dd, 10,1, 6,0)	44,61
4	5,14 (dd, 6,0, 4,0)	78,64
5	-	173,35
6	4,79 (m)	80,63
7	1,20 (d, 7,5)	10,74
8	1,68 (q)	28,32
9	1,38 (m)	24,92
10	1,32 (m)	28,45
11	1,26 (m)	29,8
12	1,27 (m)	22,05
13	0,86 (t, 7,0)	13,99

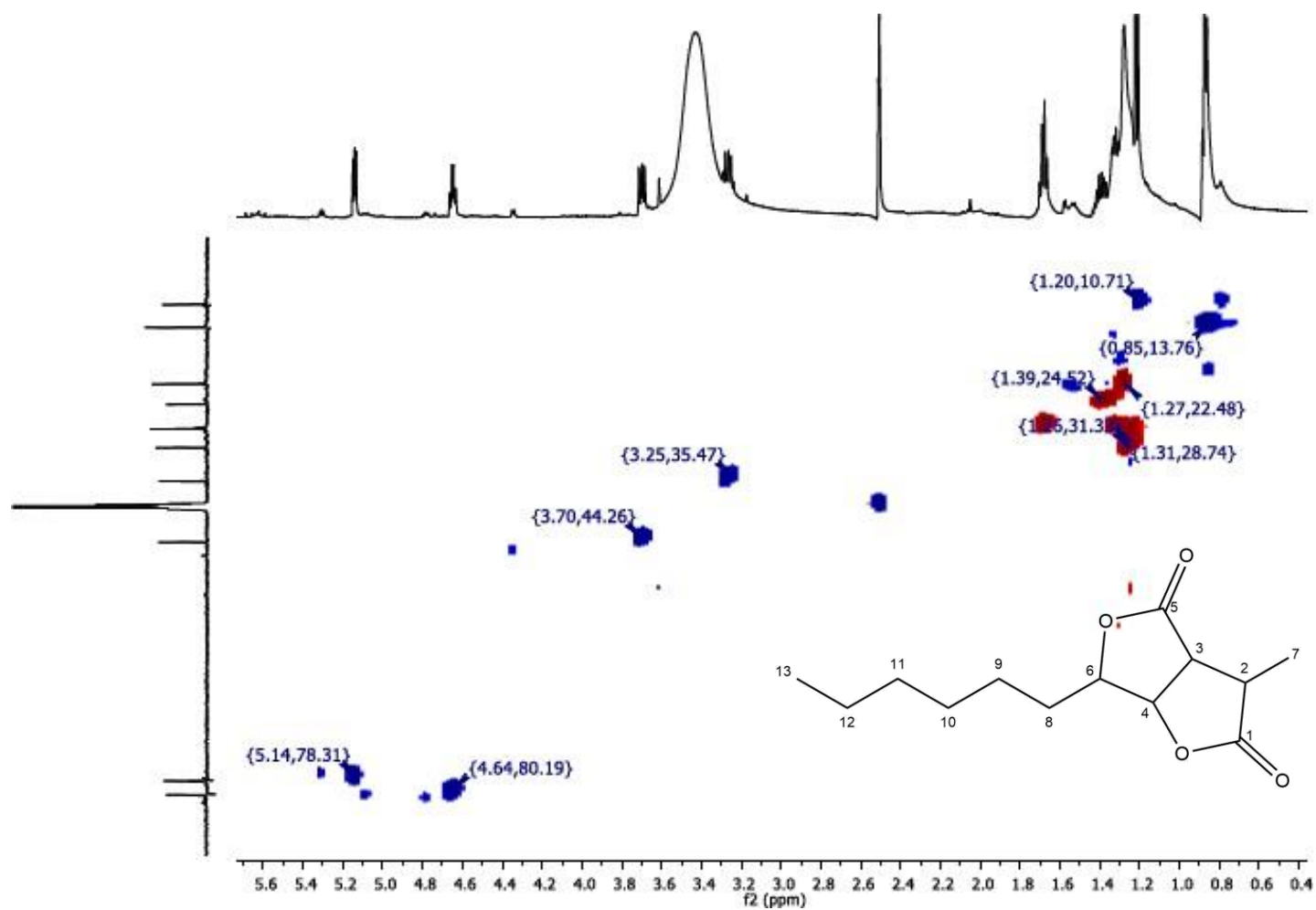
Fonte: Autor.

Figura 57: Espectro de RMN de ^1H de **S01** (DMSO- d_6 600 MHz).



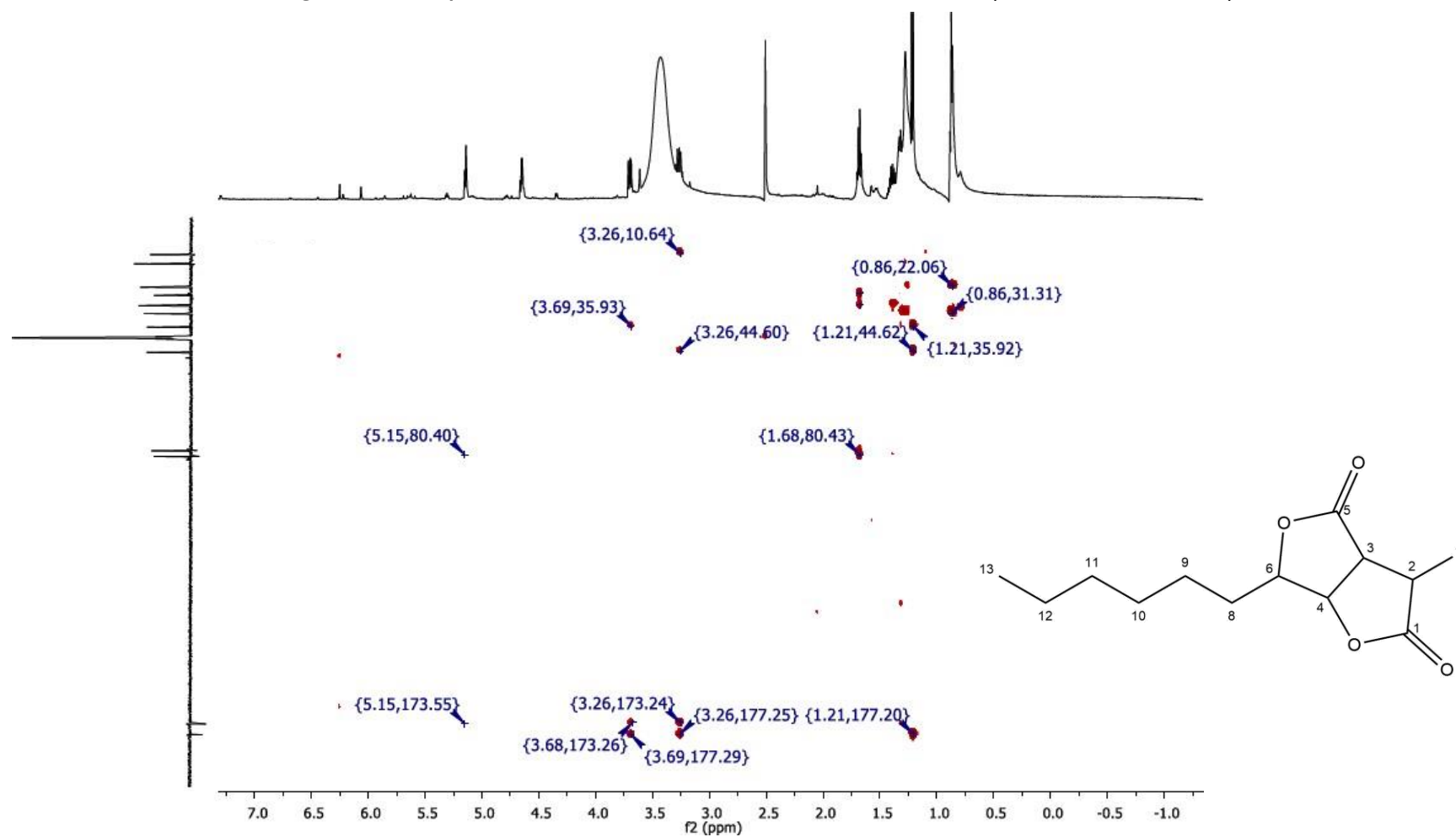
Fonte: Autor.

Figura 58: Mapa de contorno de HSQC da substância **S01** (DMSO- d_6 150 MHz).



Fonte: Autor.

Figura 59: Mapa de contorno de HMBC da substância **S01** (DMSO- d_6 150 MHz).



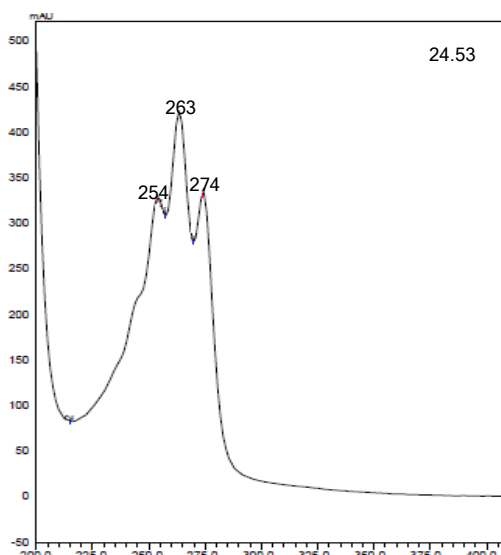
Fonte: Autor.

4.10 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA S02

A substância **S02** foi isolada com aspecto de um óleo amarelo, mostrando-se como um dos metabólitos majoritários da fase acetonitrila. Após as análises dos dados espectroscópicos e espectrométricos, além de comparações com a literatura (Web of Science), ainda não foi possível identificar esta substância com metabólitos anteriormente isolados, o que sugere ser uma nova substância.

Seu espectro de UV-Vis está apresentado na **Figura 60**, que mostra bandas de absorção máxima em 254, 263 e 274 nm (MeOH).

Figura 60: Espectro UV-Vis da substância **S02**



Fonte: Autor.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 61**) de **S02** mostrou sinal de um singlete, provavelmente, relacionado ao hidrogênio de amida em δ_{H} 8,44 (H-16); dois dubletos de hidrogênios metílicos em δ_{H} 1,19 (J_{12-2} 6,22 Hz, H-12, 3H) e δ_{H} 1,16 (J_{15-13} 6,57 Hz, H-15, 3H); dois duplos dubletos referentes aos hidrogênios metilênicos diastereotópicos em δ_{H} 2,27 (J_{9a-9b} 6,44 Hz, H-9a, 1H; J_{9a-2} 14,42 Hz, H-9a, 1H) e δ_{H} 2,46 (J_{9b-9a} 7,39 Hz, H-9b, 1H; J_{9b-2} 14,37 Hz, H-9b, 1H); um quintupeto de hidrogênio metínico em δ_{H} 4,25 (J 6,22 Hz, H-13, 1H); um sexteto referente ao hidrogênio metínico em δ_{H} 5,20 (J 6,51 Hz, H-2, 1H); outro dubleto em δ_{H} 5,78 (J 15,34 Hz, H-4, 1H) referente ao hidrogênio α -carbonílico, um multipeto em δ_{H} 6,08 (J 5,57 Hz, H-7, 1H; J 15,36 Hz, H-7, 1H), e dois duplos dubletos sendo o primeiro

alusivo ao hidrogênio olefínico em δ_H 6,27 (J 11,12 Hz, H-6, 1H; J 15,37 Hz, H-6, 1H), e o segundo em δ_H 7,16 (J 11,09 Hz, H-5, 1H; J 15,33 Hz, H-5, 1H).

Com o auxílio do espectro de HSQC (**Figura 62**) foi possível observar duas metilas em δ_C 24,09 (C-15) e δ_C 20,84 (C-12), três carbonos em δ_C 46,09 (C-9), δ_C 69,15 (C-13) e δ_C 71,63 (C-2), quatro carbonos olefínicos em δ_C 122,96 (C-4), δ_C 146,51 (C-5), δ_C 128,15 (C-6) e δ_C 148,63 (C-7).

Ao analisar o mapa de contorno de COSY (**Figura 63**) é possível perceber que há dois sistemas de spins separados, no qual o duplete em δ_H 1,19 (H-12) faz correlação com o sexteto em δ_H 5,20 (H-2), e com os hidrogênios diasterotópicos em δ_H 2,27 (H_a-9) e δ_H 2,46 (H_b-9). No outro sistema, o duplete em δ_H 1,16 (H-15) faz correlação com o quintuplete em δ_H 4,25 (H-13), com o multiplete em δ_H 6,08 (H-7), com o duplo duplete em δ_H 6,27 (H-6) e em δ_H 7,16 (H-5), além do duplete em δ_H 5,78 (H-4).

Os dados de RMN foram compilados na **Tabela 19** para melhor visualização dos sinais de 1H e ^{13}C atribuídos a **S02**.

Tabela 19: Dados de RMN de 1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) da substância **S02**.

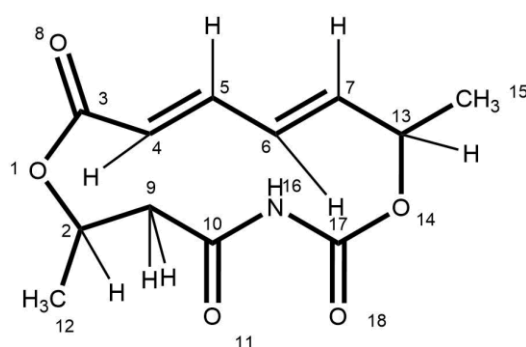
Posição	1H δ (ppm)	^{13}C δ (ppm)
1	-	
2	5,21 (sex, 6,51)	71,63
3	-	
4	5,78 (d, 15,34)	122,96
5	7,17 (dd, 11,09; 15,33)	146,51
6	6,28 (dd, 11,12; 15,37)	128,15
7	6,09 (m)	148,63
8	-	
9 _a	2,27 (dd, 6,44; 14,42)	46,09
9 _b	2,46 (dd, 7,39; 14,37)	46,09
10	-	177,02
11	-	
12	1,20 (d, 6,22)	20,84
13	4,25 (quint, 6,22)	69,15
14	-	
15	1,16 (d, 6,57)	24,09

Fonte: Autor.

O mapa de contorno HMBC (**Figura 64**) permitiu estabelecer a correlação do hidrogênio H-12 com os carbonos sp^3 C-2 e C-9, do hidrogênio H-15 com o carbono

sp^2 C-7 e com o carbono sp^3 C-13. Observou-se também correlação dos hidrogênios diastereotópicos H-9_a e H-9_b com os carbonos C-12, C-2 e C-10, além da relação do hidrogênio H-13 com o carbono sp^3 C-15, e os carbonos sp^2 C-6 e C-7. Outras correlações importantes incluem a do hidrogênio oximetínico H-2 com os carbonos carbonílicos C-3 e C-10, do hidrogênio olefínico H-4 com os carbonos C-3 e C-6, e do hidrogênio H-16 com o carbono sp^2 da amida em C-17.

Sendo assim, em face das características elencadas nos espectros de RMN, a proposta de estrutura para **S02** é representada por:



Os núcleos mais importantes a serem analisados nessa estrutura são aqueles relacionados ao H-16, mais afastado, supostamente, seja do grupo amida; os sinais dos hidrogênios olefínicos em H-4, H-5, H-6 e H-7 todos com J 15,0 Hz, característico de ligações duplas conjugadas em relação *trans*; os carbonos carbonílicos C-3, C-10 e C-17, com destaque ao C-3 que exerce efeito anisotrópico sobre os hidrogênios olefínicos do sistema de ligações duplas conjugadas com o grupo carbonila em C-3, caracterizando um sistema carbonílico α , β , γ , δ - insaturado.

Considerando a estrutura parcialmente proposta, chegou-se a cogitar que se tratava de um macrolídeo, porém a ausência de sinais de hidrogênio suficientes para tal proposta, essa classificação foi abandonada. Contudo, a busca na literatura permitiu localizar o acremonol e o acremodiol (**85** e **86**), duas bislactonas isoladas anteriormente do fungo *Acremonium* com importante atividade antimicrobiana (BERG et al., 2002), como estruturas semelhantes a de **S02**, isolada neste trabalho.

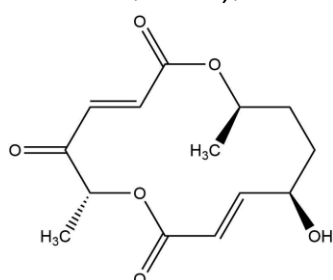
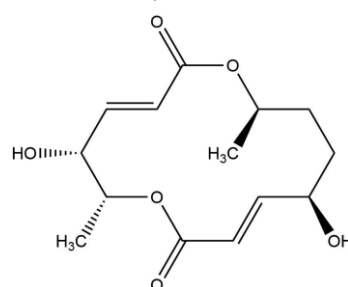
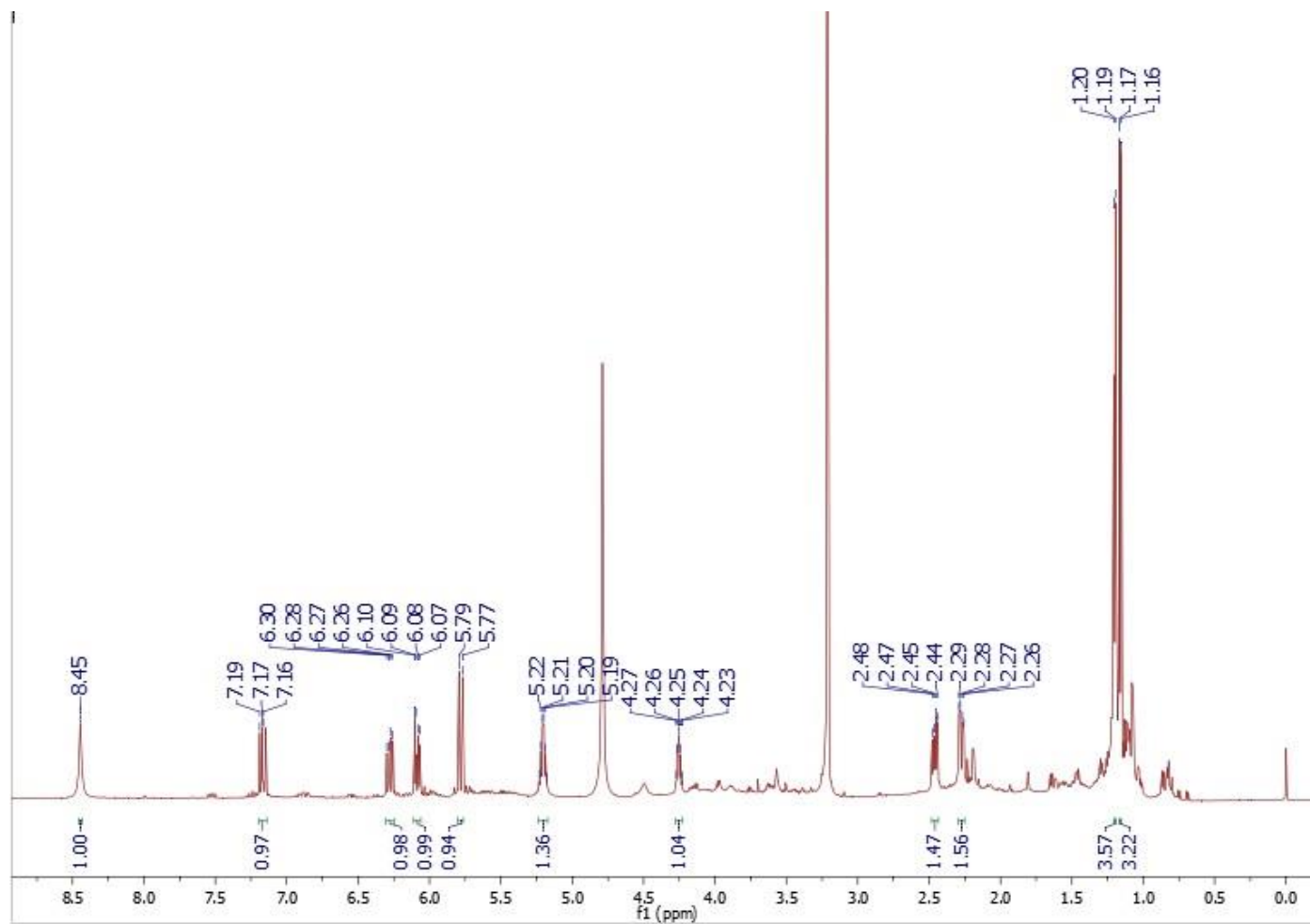
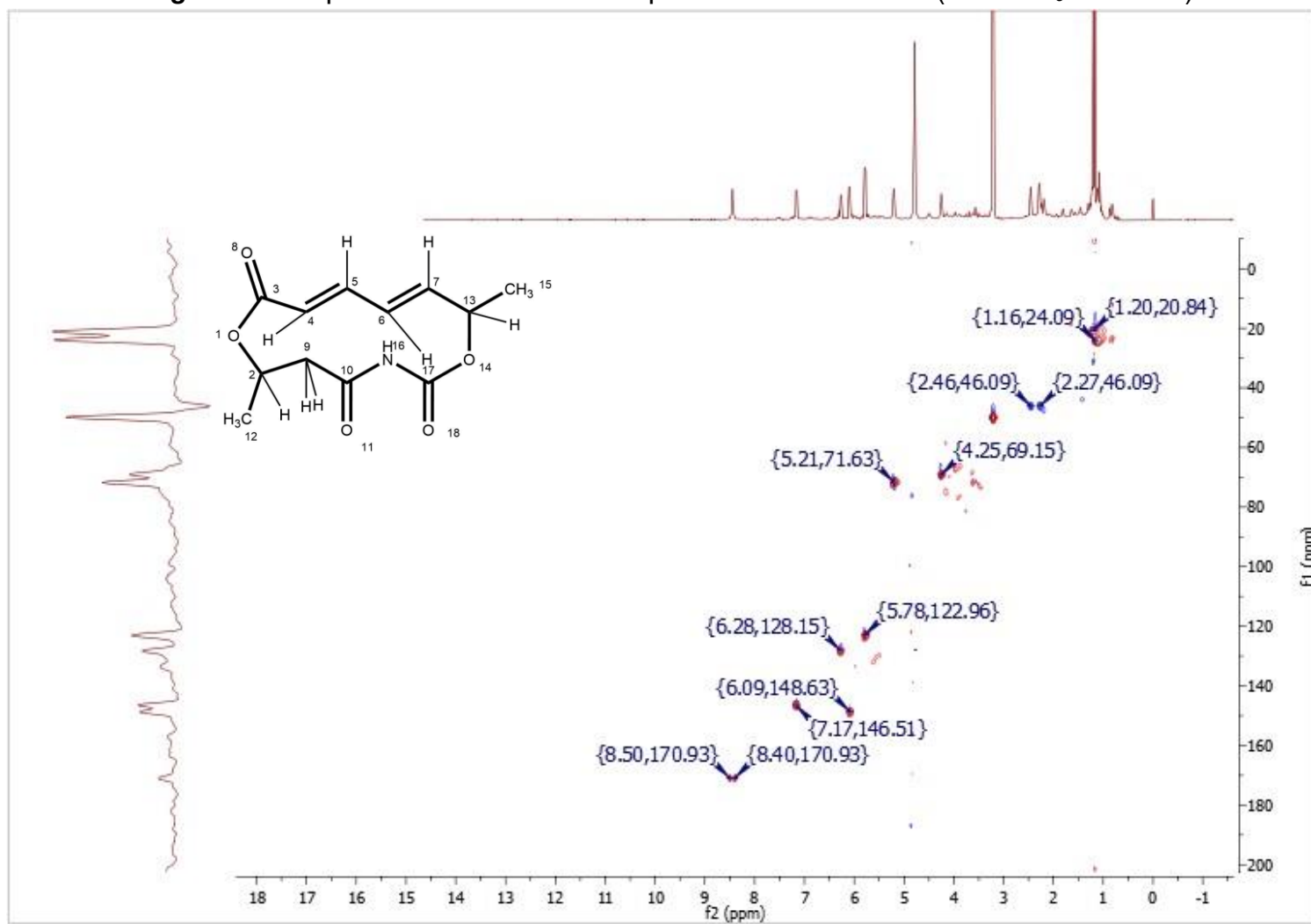
**85****86**

Figura 61: Espectro de RMN de ^1H de **S02** ($\text{DMSO}-d_6$ 600 MHz).



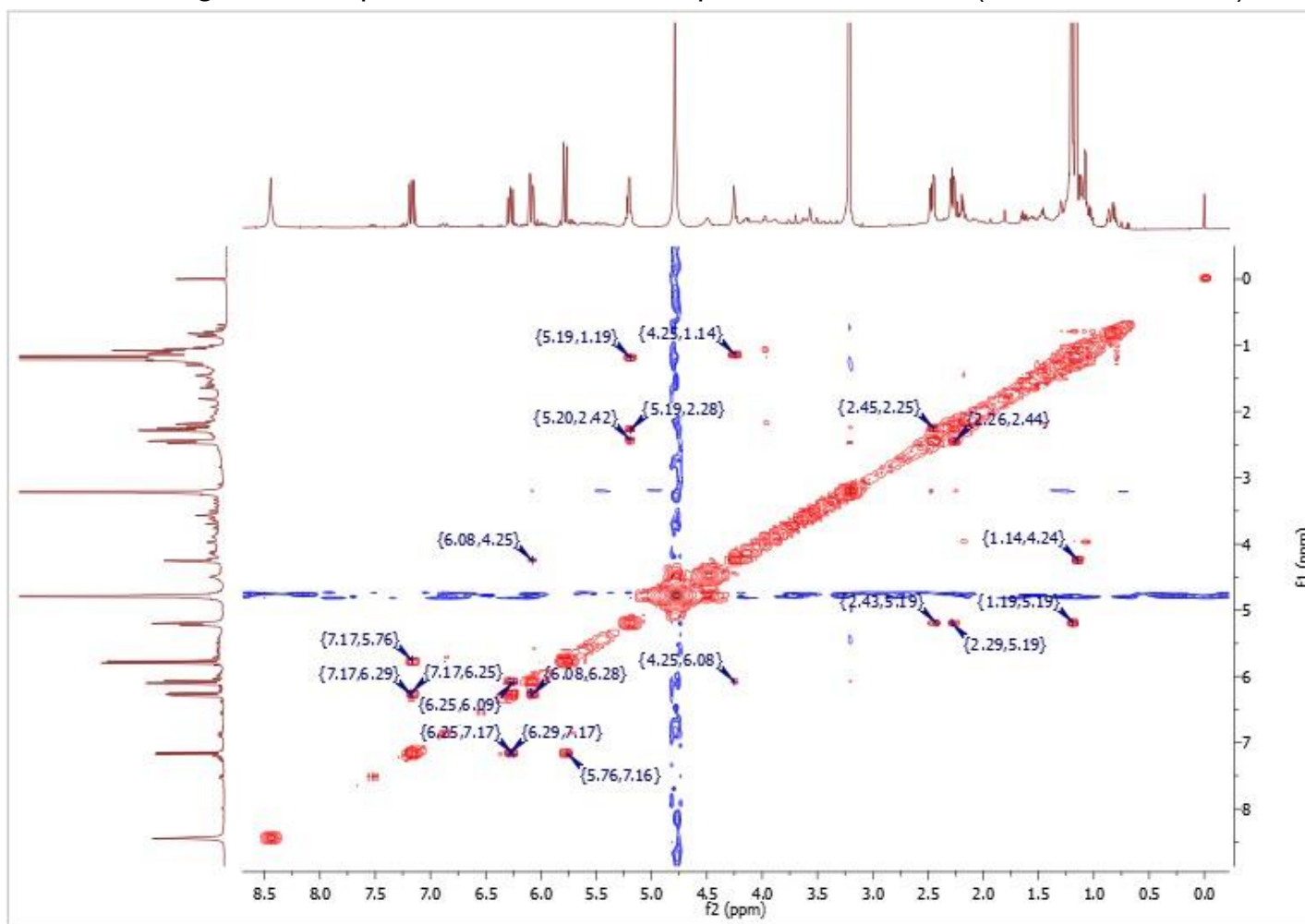
Fonte: Autor.

Figura 62: Mapa de contorno de HSQC para a substância **S02** (DMSO- d_6 150 MHz).



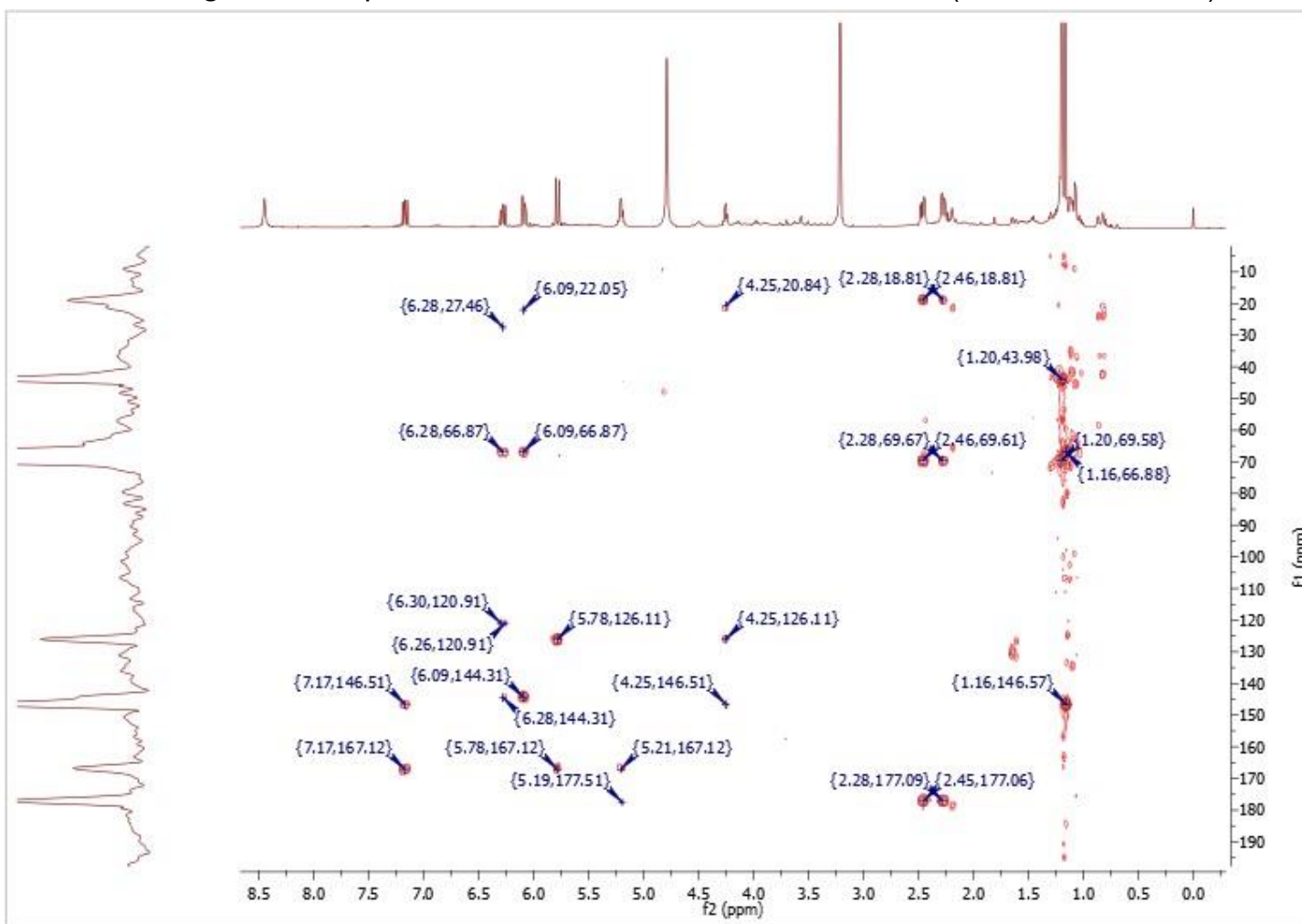
Fonte: Autor.

Figura 63: Mapa de contorno de COSY para substância **S02** (DMSO- d_6 600 MHz).



Fonte: Autor.

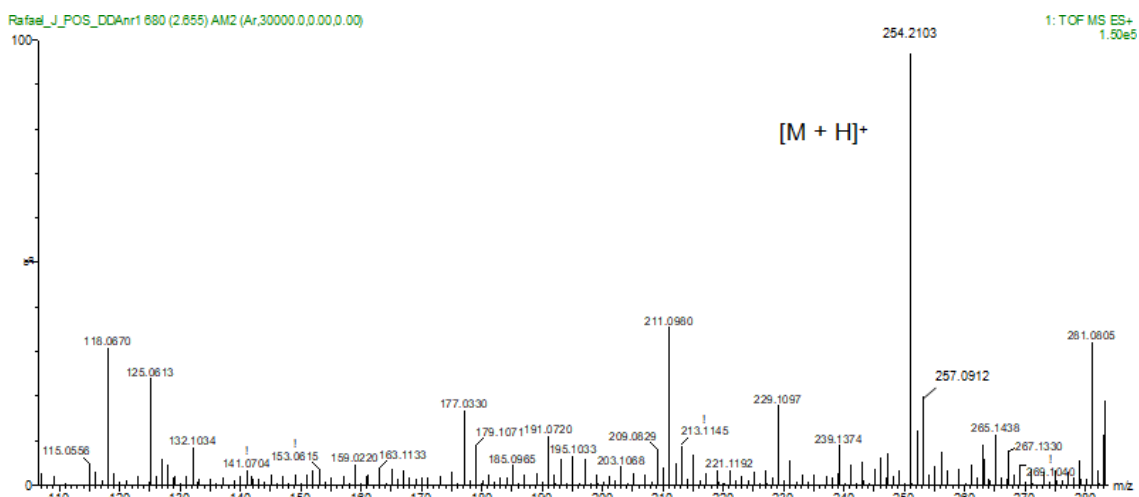
Figura 64: Mapa de contorno de HMBC da substância **S02** (DMSO- d_6 150 MHz).



Fonte: Autor.

Sua fórmula molecular foi definida como $C_{12}H_{15}NO_5$ através da análise dos dados de RMN previamente citados, bem como do seu espectro de massas de alta resolução (ESI-Q-TOF) no modo positivo (**Figura 65**), cujo pico base em m/z foi 254,2103 $[M + H]^+$ (calculado 254,2107 – erro de 1,5 ppm).

Figura 65: Espectro de massas de alta resolução da substância **S02**, modo positivo.



Fonte: Autor.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho ressaltam a importância da investigação dos microrganismos marinhos em variadas formas de cultivo, bem como os fatores que influenciam tanto a produção metabólica como a bioatividade.

A realização do planejamento de experimentos associada a técnica OSMAC evidenciou que a quimiodiversidade de um microrganismo é diretamente influenciada por fatores extrínsecos (temperatura, tempo de fermentação e luminosidade), contribuindo para que o fungo produza ou não determinados metabólitos, justificando a variação nos dados obtidos. Merece destaque a variável tempo de incubação, haja vista que essa, em alguns laboratórios, é trabalhada de maneira padronizada (28 dias em meio líquido e 21 dias em meio sólido). Além disso, os resultados indicaram a importância de se fazer a curva de crescimento do microrganismo sob estudo, a fim de perceber o dia “ótimo” de crescimento em massa, e a partir daí orientar o estudo dessa variável nos níveis alto e baixo.

Ainda em relação ao planejamento de experimentos, é importante salientar que em poucos ensaios foi possível perceber as relações entre as variáveis independentes, a partir da observação de tendências com relação ao resultado de variabilidade química dos extratos produzidos, que servem como ponto de partida para a realização de estudos posteriores. A desvantagem fica por conta da seleção da variável resposta, uma vez que montado o planejamento de experimentos, nem sempre as variáveis eleitas irão se encaixar, para que respostas diferentes sejam otimizadas.

Nesse trabalho, destacamos também a utilização de ferramentas para estudos metabolômicos como o *Molecular Networking*, de alta relevância para a análise do perfil metabólico de misturas complexas (extratos) fornecidas pela abordagem OSMAC ao realizar o planejamento de experimentos. Estes resultados evidenciaram a produção de substâncias pertencentes a classes metabólicas que até então não haviam sido referenciadas na literatura, a partir da espécie fúngica em estudo, como os alcaloides. Esses dados devem nortear investigações de perfis químicos e a seleção de metabólitos secundários para isolamento no futuro. Nesse ponto, a ressalva fica por conta da disponibilidade dos dados de MS/MS na plataforma na qual foi gerada a rede molecular analisada, pois apesar da plataforma estar em franca ascensão, tanto em usabilidade como em quantidade de espectros

depositados, ainda é baixo o número de espectros MS/MS no modo negativo disponíveis, o que representa ainda um gargalo para análises de perfis metabólicos por meio de redes moleculares geradas nesse modo de aquisição.

Em relação aos resultados de atividade biológica, a realização do planejamento de experimentos para o fungo *H. monticulosum* representou um avanço importante na busca de novos produtos bioativos, haja vista que as alterações de cultivo para produção de extratos brutos do fungo evidenciou potencialidade das atividades atitumoral e anticolinesterásica.

Por fim, o exercício de isolamento de substâncias levou a caracterização de dois metabólitos, sendo um deles bastante conhecido na literatura como subproduto do marcador quimiotaxonômico da espécie, o diidroesporotriolídeo. A outra substância purificada, um derivado tipo macrolídeo com resíduos éster e amida, ainda não havia sido relatada na literatura quanto a informações sobre sua elucidação estrutural nem sobre atividade biológica, evidenciando a necessidade de investigações adicionais sobre sua ocorrência em outras fontes, bem como seu potencial biológico.

Portanto, podemos concluir que esse estudo contribui para o aprofundamento no conhecimento da quimiodiversidade de microrganismos endofíticos isolados a partir de organismos do bioma marinho, ainda sub-explorado. Ressalta também sua importância como fonte de material para novos estudos de bioprospecção, contribuindo assim, para agregar valor aos produtos naturais, por exemplo, para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos e outros produtos úteis. Neste sentido, ficam evidentes também, as potenciais contribuições alinhadas com os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS), propostos pela ONU, em especial, aqueles associados aos ODS-3, voltados à saúde e bem-estar, e aos ODS-14, relacionados à vida na água.

REFERÊNCIAS

- AGHAJANI, H. et al. Influence of relative humidity and temperature on cultivation of *Pleurotus* species. **Maderas. Ciencia y Tecnología**, v. 20, n. 4, p. 571-578, 2018.
- ANAND, J. et al. Bioactive potential and composition analysis of sulfated polysaccharide from *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borgeson. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 1238-1244, Mai. 2018.
- ANDRADE, T. J. A. S. **Investigação química e biológica dos metabólitos secundários derivados de macroalgas marinhas e microrganismos associados**. 2014. 358 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.
- ARUMUGAM, G. et al. Production and characterization of bioactive metabolites from piezotolerant deep sea fungus *Nigrospora* sp. in submerged fermentation. **J. Appl. Microbiol**, v. 118, n. 1 p. 99-111, Jan. 2015.
- BARROS, B. N.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da Unicamp, 2001.
- BAUERMEISTER, A. et al. Mass spectrometry-based metabolomics in microbiome Investigations. **Microbiology**, v. 20, p. 143-160, 2022.
- BECKER, K.; STADLER, M. Recent progress in biodiversity research on the Xylariales and their secondary metabolism. **The Journal of Antibiotics**, v. 74, p. 1-23, 2021.
- BELLETTINI, M. B. et al. Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 4, p. 633-646, Mai. 2019.
- BERG, A. et al. Acremonol and acremodiol, new fungal bislactones. **The Journal of Antibiotics**, v. 55, n. 7, p. 660-662, 2002
- BERLINCK, R. G. S. et al. A química de produtos naturais do Brasil no século XXI. **Química Nova**. V. 40, n. 6, p. 706-710, Mai. 2017.
- BERNARDI, E. et al. Diferentes meios de cultivo e condições de luz no crescimento e massa miceliana de *Agaricus brasiliensis* s. Wasser et al. **Arq. Inst. Biol**, v. 75, n. 3, p. 375-378, Set. 2008.
- BERNARDINI, S. et al. Natural products for human health: na historical overview of the drug discovery approaches. **Natural Product Research**, v. 32, n. 16, p. 1926-1950, 2017.
- BHATIA, S. et al. Biotechnological Innovations from Ocean: Transpiring Role of Marine Drugs in Management of Chronic Disorders. **Molecules**, v. 27, 2022.

BIASETTO, C. R. **Fungos endofíticos em *Eugenia brasiliensis***: prospecção química, biológica, enzimática e avaliação do co-cultivo e epigenética em *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp. 2016. 226 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

BIBAK, B. et al. A review of the pharmacological and therapeutic effects of auraptene. **Biofactors**, v. 45, n. 6, p. 867-879, 2019.

BODE, H. B. et al. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. **Chembiochem**, v. 3, n. 7, p. 619-627, 2002.

BOGAS, A. C. et al. Endophytic fungi: an overview on biotechnological and agronomic potential. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, 2022.

BONDKLY, E. A. M. E.; BONDKLY, A. A. M. E.; BONDKLY, A. A. M. E. Marine endophytic fungal metabolites: A whole new world of pharmaceutical therapy exploration. **Heliyon**, v. 7, n. 3, 2021.

BONETTI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia**, v.6, p. 553-553, 1981.

BOSSO, A. et al. β -galactosidase production by *Saccharomyces fragilis* IZ 275 in cheese whey. **Food Science**, v. 15, n. 1, 2020.

BOX, G. E. P.; WETZ, J. **Criteria for judging adequacy of estimation by na approximate response function**. University of Wisconsin Technical Report, n. 9, 1973.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre o regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15 set. 2004. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2004/res0216_15_09_2004.html (Acesso em 21/07/2021).

BURKHOLDER, P. R.; BURKHOLDER, M. L.; ALMODOVAR, L. R. **Botânica Marina**, v. 2, p. 149, 1960. Apud: WAHIDULLA, S.; D'SOUZA, L.; GOVENKER, M. Lipid constituents of the red alga *Acanthophora spicifera*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1203-1206, 1998.

CABRAL, I. S. R. et al. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante e antimicrobiano. **B. Ceppa**, v. 29, n. 2, p. 181-192, Dez. 2011.

CAHOON, E. B. et al. Transgenic production of epoxy fatty acids by expression of a cythochrome P450 enzyme from *Euphorbia lagascae* seed. **Plant physiol**, v. 128, p. 615-624, 2002.

CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences** **91**, e20190105, 2019.

CARDOSO, E.R.; ASSIS, L.C; NAHAS, E. Nutrition and growth of the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.4, p.267-272, 2009.

CARVALHO, I. T. **Microbiologia básica**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2010.

CARVALHO, D. R.et al. Ligand screening assay for the enzyme kallikrein immobilized on NHS-activated Sepharose. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 199, 2021.

CARROLL, A. R. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 36, p. 122-173, 2019.

CARROLL, A. R. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 38, p. 362-413, 2021.

CASAS-FLORES, S. et al. BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. **Microbiology**, v. 150, p. 3561-3569, Ago. 2004.

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

CHARLES, A. L.; ALAMSJAH, M. A. Application of chemometric techniques: An innovative approach to discriminate two seaweed cultivars by physico-functional properties. **Food Chemistry**, v. 289, p. 269-277, 2019.

CHENG, M. J. et al. Metabolites from the endophytic fungus *Hypoxylon monticulosum*. **Chemistry of Naturam Compounds**, v. 56, n. 6, 2020.

CHOUDHARY, A. et al. Current Status and Future Prospects of Marine Natural Products (MNPs) as Antimicrobials. **Marine Drugs**, v. 15, n. 9, 2017.

CHRISTAKI; E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. **J Mol Evol**, v. 88, p. 26-40, 2020.

CHRISTIAN, O. E. et al. Using jasplakinolide to turn on pathways that enable the isolation of new chaetoglobosins from *Phomopsis asparagi*. **Journal Natural Product**, v. 68-, n. 11, 2005.

COCHRANE, V.W. **Physiology of fungi**. New York: John Wiley, 1958.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.

COMPAORE, H, et al. Enhancement of antibacterial compounds production by

Aspergillus flavus and *Penicillium citrinum* isolated from local Foods in Bobo Dioulasso and Ouahigouya, Burkina Faso. **European Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v. 3, n. 10, p. 354-363, 2016.

COOLEN, W. A.; D'HERDE, C.J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ghent. **State Nematology Research Station**. Belgium, 1972.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New horizons for old drugs and drug leads. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 3, p. 703-723, Mar. 2014.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. **Pure Appl Chem**., v. 77, n. 1, p. 7-24, 2005.

DARANAGAMA, D. A. et al. Towards a natural classification and backbone tree for Graphostromataceae, Hypoxylaceae, Lopadostomataceae and Xylariaceae. **Fungal Diversity**, v. 88, 2018.

DA SILVA, R. R. et al. Propagating annotations of molecular networks using in silico fragmentation. **PLoS Comput. Biol**, v. 14, 2018.

DAVID, B.; WOLFENDER, J. L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochem Rev**, v. 14, p. 299-315, 2015.

DE CARVALHO, D. R. **Enzimas calicreína e ciclooxygenases imobilizadas: Estudo de condições para triagem de inibidores**. 2021. 114 f. Tese (Doutorado em Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/ USP, 2021.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3ª edição. Editora Wiley & Sons, 2009.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, p. 303-336, 2012.

DYSHLOVOY, S. A. et al. Aaptamines from the Marine Sponge *Aaptos* sp. Display Anticancer Activities in Human Cancer Cell Lines and Modulate AP-1-, NF-κB-, and p53-Dependent Transcriptional Activity in Mouse JB6 Cl41 Cells. **Biomed Research International**, 2014.

EA, S. et al. Cytotoxic Effects of Haplamine and its Major Metabolites on Human Cancer Cell Lines. **Pharmacology**, v. 74, n. 10, p. 1265-1268, 2008.

ERNST, M. et al. MolNetEnhancer: Redes Moleculares Aprimoradas pela Integração de Ferramentas de Mineração e Anotação de Metaboloma. **Metabolites**, v. 9, n. 7, 2019.

FARHAT, H. et al. Evaluation of nematicidal potential of endophytic fungi associated with healthy plants and GC-MS profiling of metabolites of endophytic *Fusarium solani*. **South African Journal of botany**, v. 146, p. 146-161, 2022.

FELÍCIO, R. et al. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities exhibited by endophytic fungi from the Brazilian marine red alga *Bostrychia tenella* (Ceramiales). **Revista Brasileira de Farmagnosia**, v. 25, p. 641-650, 2015.

FILHO, E. R. **Planejamento fatorial em Química**: maximizando a obtenção de resultados. São Carlos: EdUFSCAR, 2017.

FOX RAMOS, A. E. et al. Natural products targeting strategies involving molecular networking: different manners, one goal. **Natural Product Reports**, v. 36, p. 960-980, 2019.

FRISVAD, J. C. The use of high-performance liquid chromatography and diode array detection in fungal chemotaxonomy based on profiles of secondary metabolites. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 99, p. 81-95, 1989.

GANESAN, A. R. et al. Development of edible film from *Acanthophora spicifera*: Structural rheological and functional properties. **Food Bioscience**, v. 23, p. 121-128, 2018.

GAO, H. et al. Pharmacophore-based drug design of AChE and BChE dual inhibitors as potential anti-Alzheimer's disease agents. **Bioorganic Chemistry**, v. 114, 2021.

GAUGLITZ, J. M. et al. Enhancing untargeted metabolomics using metadata-based source annotation. **Nature Biotechnology**, 2022.

GOGINENI, V.; HAMANN, M. T. Marine natural product peptides with therapeutic potential: Chemistry, biosynthesis, and pharmacology. **BBA – General Subjects**, p. 81-196, 2018.

GUO, F. et al. Current advances on biological production of fumaric acid. **Biochem. Eng. J.**, v. 153, 2020.

HAMADA, T.; MATSUMOTO, Y.; PHAN, C. S. Aaptamine-Related Alkaloid from the Marine Sponge *Aaptos aaptos*. **Natural Product Communication**, v. 14, n. 9, p. 1-3, 2019.

HELALY, S. E.; THONGBAI, B.; STADLER. Diversity of biologically active secondary metabolites from endophytic and saprotrophic fungi of the ascomycete order Xylariales. **Natural Product Reports**, v. 35, 2018.

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.

HONÓRIO, A. E. **Avaliação química e biológica de fungos endofíticos associados às algas marinhas *Acanthophora spicifera*, *Dichotomaria***

marginata e Sargassum vulgare. 2018. 267 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

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

HUSSEY, R.S; BARKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of Meloidogyne spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v. 57, p. 1025-1028, 1973.

JIANG, F. C. et al. Kinetic models for the effect of temperature on flavonoid production in liquid submerged fermentation by *Phellinus baumii*. **Biotechnology and applied biochemistry**. V. 65, n. 5, p. 739-747, Oct. 2018.

KAMAT, S. et al. Endophytic Fungi of Marine Alga From Konkan Coast, India—A Rich Source of Bioactive Material. **Frontiers in Marine Science**, v. 7, 2020.n

KAMRADGI, S. M.; GUNAGAMBHIRE, V. M. Optimization of growth parameters for enhancing antifungal secondary metabolites of *Talaromyces islandicus* VSGF1 against drug resistant *Candida* spp. **Biological sciences**, v. 2, p. 92-104, Mai. 2021.

KAUSAR, N. et al. Design, synthesis, crystal structure, in vitro cytotoxicity evaluation, density functional theory calculations and docking studies of 2-(benzamido) benzohydrazide derivatives as potent AChE and BChE inhibitors. **RSC Advances**, v. 12, p. 154-167, 2022.

KHALIFA, S. A. M. et al. Marine Natural Products: A Source of Novel Anticancer Drugs. **Marine Drugs**, v. 17, 2019.

KILAR, J. A.; MCLACHLAN, J. Ecological studies of the alga, *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borg. (Ceramiales: Rhodophyta): Vegetative Fragmentation. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 104, p. 1-21, 1986.

KUHNERT, E. et al. Phylogenetic and chemotaxonomic resolution of the genus Annulohypoxylon (Xylariaceae) including four new species. **Fungal Divers**, v. 85, n. 1, p. 1-43, 2017.

KROHN, K. et al. Biologically active metabolites from fungi. **The Journal of Antibiotics**, v. 47, n. 1, 1994.

LACERDA, I. C. S.; POLONIO, J. C.; GOLIAS, H. C. Endophytic Fungi as a Source of Antiviral Compounds- A Review. **Chemistry & Biodiversity**, v. 29, 2022.

LAMBERT, C. et al. *Hypomontagnella* (Hypoxylaceae): a new genus segregated from *Hypoxylon* by a polyphasic taxonomic approach. **Mycological Progress**, v. 18, p. 187-201, 2019.

LANG, K. L. et al. Steroids from the red alga *Acanthophora spicifera*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.35, p. 805-808, 2007.

LANGVAD, F. A rapid and eficiente method for growth measurement of filamentous fungi. **Journal of Microbiological Methods**, v. 37, p.97-100, 1999.

LI, G.; LOU, H. X. Strategies to diversify natural products for drug discovery. **Med Res Rev**, v. 38, p. 1255-1294, 2017.

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

LIU, M. et al. A systems approach using OSMAC, Log P and NMR fingerprinting: An approach to novelty. **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 276-286, 2017.

LIU, Y.; BELL-PEDERSEN, D. Circadian rhythms in *Neurospora crassa* and other filamentous fungi. **Eukar Cell**, v. 5, p. 1184-1193, Ago. 2006.

LOTUFO, L. V. C. et al. Organismos marinhos comofonte de novos fármacos: Histórico& perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 703-716, Abr. 2009.

LOUBIÈRE, C. L. et al. Sporothriolide-Related compounds from the fungus *Hypoxylon monticulosum* CLL-205 isolated from a *Sphaerocladina* sponge from the Tahiti Coast. **Journal of Natural Products**, v. 80, p. 2850-2854, Out. 2017a.

LOUBIÈRE, C. L. et al. Sporochartines A-E, A New Family of Natural Products from the Marine Fungus *Hypoxylon monticulosum* Isolated from a *Sphaerocladina* Sponge. **Frontiers in Marine Science**, v. 4, Dez. 2017b.

LOUREIRO, E. S. et al. Efeito da temperatura e da luminosidade no desenvolvimento do fungo *Sporothrix insectorum* (Hoog & Evans). **Arq. Inst. Biol**, v. 69, n. 2, p. 79-83, Jun. 2002.

LYU, C. et al. CMNPD: a comprehensive marine natural products database towards facilitating drug discovery from the ocean. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. 8, 2020.

MANGANYI, M. C. et al. Biodiversity and antibacterial screening of endophytic fungi isolated from *Pelargonium sidoides*. **South African Journal of Botany**, v. 116, p. 192-199, Abr. 2018.

MARQUES, L. M. M.; OLIVEIRA, A. R. M. Técnicas cromatográficas e o desafio na determinação de compostos presentes em matrizes complexas: Relato de um caso prático do produto natural piperlongumina. **Scientia chromatographica**, v. 5, n. 2, p. 101-109, 2013.

MATEUS, N. B.; BARBIN, D.; CANAGIN, A. Viabilidade de uso do delineamento composto central. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 6, p. 1537-1546, 2001.

MAYER, A. M. S. et al. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, n. 6, p. 255-265, June 2010.

MEDINA, R. P. **Bioprospecção das algas vermelhas *Asparagopsis taxiformis* e *Pyropia spiralis* e de seus fungos endofíticos: potencial antimicrobiano e citotóxico.** 2016. 422 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

MEDINA, R. P. et al. Botryane terpenoids produced by *Nemania bipapillata*, an endophytic fungus isolated from red alga *Asparagopsis taxiformis* - Falkenbergia stage. **Scientific Reports**, v. 9, 2019.

MENG, J. et al. Kinetics of seed reserve compounds during the maturation of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) seeds. **Journal of Seed Science**, v. 43, 2021.

METZGER, J. O.; BORNSCHEUER, U. Lipids as renewable resources: current state of chemical and biotechnological conversion and diversification. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 13-22, 2006.

MOGHADDAM, J. A. et al. Recent highlights of biosynthetic studies on marine natural products. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 19, p. 123-140, 2021.

MOHAMMADHOSSEINI, M. et al. The Genus *Haplophyllum* Juss.: Phytochemistry and Bioactivities—A Review. **Molecules**, v. 26, n. 15, 2021.

MOHIMANI, H, et al. Dereplication of microbial metabolites through database search of mass spectra. **Nature Communications**, v. 9, 2018.

MONTGOMERY, D. C. **Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros.** 2ª ed., LTC. Rio de Janeiro, 2003.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the Fungi.** 4ª edição. Nova Jersey: Prentice Hall, 1996.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. **Response Surface Methodology: process and product optimization using design experiments.** Editora Wiley & Sons, 1995.

NAJARAN; Z. T.; NAJARAN, N. T.; EGHBALI, S. A Review of Auraptene as an Anticancer Agent. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 2021.

NAPOLITANO, H. B. et al. Aurapten, a coumarin with growth inhibition against *Leishmania major* promastigotes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 12, p. 1847-1852, 2004.

NEWMAN, D. A. The influence of temperature and light on growth and sporulation of *Melanotus* sp. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 51, n. 5, p. 737-747, Dez. 1958.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, p. 770-803, 2020.

NOZAKI, M.H., CAMARGO, M. & BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em meios de cultura e diferentes condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p. 429-432, Fev. 2004.

ONDEYKA, J. et al. L-696474, A novel cytochalasin as an inhibitor of hiv-1 protease II. **The Journal of Antibiotics**, v. 45, n. 5, 1992.

PARRAVICINI, O. et al. Design, synthesis, biological evaluation and molecular modelling of substituted pyrrolo[2,1-a]isoquinolinone derivatives: Discovery of potent inhibitors of AChE and BChE. **New J. Chem**, 2021.

PARTHASARATHY, R. et al. Molecular profiling of marine endophytic fungi from green algae: Assessment of antibacterial and anticancer activities. **Process Biochemistry**, v. 96, p. 11-20, 2020.

PEREIRA, F. M. V.; PEREIRA FILHO, E. R. Aplicação de programa computacional livre em planejamento de experimentos: um tutorial. **Química Nova**, v. 41, n. 9, p. 1061-1071, Jun. 2018.

PILON, A. C. **Estudo de *Jatropha gossypifolia* e *J. multifida* (Euphorbiaceae) aplicando métodos analíticos in silico e de desreplicação, visando a detecção e elucidação in situ dos constituintes micromoleculares com atividade acetilcolinesterásicas e antioxidante**. 2011. 155 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química de Araraquara, 2011.

PILON, A. C. et al. Redes moleculares: uma análise sobre anotações e descoberta de novos ativos. **Química Nova**, v. 44, n. 9, p. 1168-1179, 2021.

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

PRIESTERJAHN, E. M.; GEISEN, R.; HEYDT, M. S. Influence of Light and Water Activity on Growth and Mycotoxin Formation of Selected Isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Microorganisms**, v. 8, n. 12, Dez. 2020.

QUANG, D. N. et al. New Azaphilones from the Inedible Mushroom *Hypoxylon rubiginosum*. **Journal Natural Products**, v. 67, p. 1152-1155, 2004.

QUANG, D. N. et al. Coharins A and B, azaphilones from the fungus *Hypoxylon cohaerens*, and comparison of HPLC-based metabolite profiles in *Hypoxylon* sect. *Annulata*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 797-809, 2005.

RAMAKRITINAN, C. M. et al. MAA-Palythine Compound of Three Red (Macro) Algae: *Gelidiella acerosa*, *Acanthophora spicifera* and *Hypnea musciformis* of Gulf of Mannar, Southeast Coast of India. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 7, p. 607-615, Jul. 2017.

REJCZAK, T.; TUZIMSKI, T. Application of High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector for Simultaneous Determination of 11

Synthetic Dyes in Selected Beverages and Foodstuffs. **Food Anal. Methods**, v. 10, p. 3572-3588, Mai. 2017.

REVERTER, M. et al. Metabolomics and Marine Biotechnology: Coupling Metabolite Profiling and Organism Biology for the Discovery of New Compounds. **Frontiers in Marine Science**, v. 7, 2020.

RITCHIE, F.; BAIN, R. A.; MCQUILKEN, M. P. Effects of nutriente status, temperature and pH on mycellial growth, sclerotical production and germination of *Rhizoctonia solani* from potato. **Journal of plant Pathology**, v. 91, n. 3, p. 589-596, 2009.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2ª edição. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

RAO, T. et al. The pharmacogenetics of natural products: A pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective. **Pharmacological Research**, v. 146, 2019.

RUSSO, H. M. et al. Untargeted Metabolomics Sheds Light on the Diversity of Major Classes of Secondary Metabolites in the Malpighiaceae Botanical Family. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022.

SALI, V. K. et al. Isolation and evaluation of phytoconstituents from red alga *Acanthophora spicifera* as potential apoptotic agents towards A549 and HeLa cancer cells lines. **Algal Research**, v. 32, p. 172-181, Abr. 2018.

SÁNCHEZ-BALLESTEROS, J. et al. Phylogenetic study of Hypoxylon and related genera based on ribosomal ITS sequences. **Mycologia**, v. 92, n. 5, p. 964-977, 2000.

SARAMAGO, S. F. P.; SILVA, N.P. **Uma introdução ao estudo de superfícies de resposta**. Revista Horizonte Científico. 4ª edição. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2005.

SARUP, F. et al. Sporothriolide derivatives as chemotaxonomic markers for *Hypoxylon monticulosum*. **Mycology**, v. 5, n. 3, p. 110-119, Mai. 2014.

SCHMID, R. et al. Ion identity molecular networking for mass spectrometry-based metabolomics in the GNPS environment. **Nature Communication**, v. 12, n. 1, 2021.

SEBASTIAN, J. et al. Fumaric acid production using alternate fermentation mode by immobilized *Rhizopus oryzae*-a greener production strategy. **Chemosphere**, v. 281, 2021.

SEBASTIANES, F. L. S. et al. 3-Hydroxypropionic Acid as an Antibacterial Agent from Endophytic Fungi *Diaporthe phaseolorum*. **Current Microbiology**, v. 65, p. 622-632, 2012.

SELEGATO, D. et al. Improvement of bioactive metabolite production in microbial cultures—A systems approach by OSMAC and deconvolution-based ¹HNMR quantification. **Magn Reson Chem**, v. 57, p. 458-471, Abr. 2019.

SHANG, J. et al. Cheminformatic Insight into the Differences between Terrestrial and Marine Originated Natural Products. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 58, 2018.

SILVA, G. H. **Substâncias bioativas isoladas dos fungos endofíticos *Xylaria* sp., *Phomopsis cassiae* e *Acremonium* sp. associados a espécies vegetais do Cerrado**. 2005. 306 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

SOARES, P. K. et al. Mixture design PARAFAC HPLC-DAD metabolomic fingerprints of fractionated organic and basic extracts from *Erythrina speciosa* Andrews Leaves. **Chromatographia**, Jun. 2018.

SOUSA, T. M. A. et al. Evaluation of the effects of temperature on processed coffee beans in the presence of fungi and ochratoxin A. **Journal of Food Safety**, v. 39, n. 1, Fev., 2019.

SOUZA, W. C. O. et al. Comportamento *in vitro* de *Chalara paradoxa*, agente causal da podridão-negra do abacaxizeiro, em diferentes condições de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 4, p. 845-851, 2015.

SPITELLER, P. Chemical Ecology of Fungi. **Natural Products Reports**, 2015.

STADLER, M. et al. Changes in secondary metabolism during stomatal ontogeny of *Hypoxylon fragiforme*. **Mycological Research**, p. 811-820, 2006.

STADLER, M.; FOURNIER, J. Pigment chemistry, taxonomy and phylogeny of the Hypoxyloideae (Xylariaceae). **Ver Iberoam Micol**, v. 23, p. 160-170, 2006.

STANGE, S. et al. Influence of Environmental Growth Factors on the Biomass and Pigment Production of *Chlorociboria aeruginascens*. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 46, Jun., 2019.

STEELE, J. H.; BRINK, K. H.; SCOTT, B. E. Comparison of marine and terrestrial ecosystems: suggestions of an evolutionary perspective influenced by environmental variation. **ICES Journal of Marine Science**, v. 76, n. 1, p. 50-59, 2019.

SUDARMAN, E. et al. Truncatones A-D, benzofluoranthenes from *Annulohypoxylon* species (Xylariaceae, Ascomycota). **Tetrahedron**, v. 72, n. 41, p. 6450-6454, 2016.

SUWANNASAI, N. et al. Fungi in Thailand: A Case Study of the Efficacy of an ITS Barcode for Automatically Identifying Species within the *Annulohypoxylon* and *Hypoxylon* Genera. **PLOS One**, v. 8, n. 2, 2013.

TEIXEIRA, V. L. Produtos Naturais de Algas Marinhas Bentônicas. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 343-362, Out. 2012.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, Jan., 2006.

TIAN, D.C. et al. The sporothriolides. A new biosynthetic family of fungal secondary metabolites. **Chemical Science**, v. 11, p. 12477-12484, Out., 2020.

TOMAZ, P. R. U. **Desenvolvimento e validação de método de análise por cromatografia gasosa para metabólitos polares de folhas de cana-de-açúcar e aplicação na avaliação da influência do teor de CO₂ atmosférico na composição de metabólitos polares de cana de açúcar**. 2011. 121 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química de Araraquara, 2011.

TORRE, B. G.; ALBERICIO, F. The Pharmaceutical Industry in 2018. An Analysis of FDA Drug Approvals from the Perspective of Molecules. **Molecules**, v. 24, n. 809, 2019.

UMAMAHESWARI, A. et al. Synthesis of bioethanol by dark fermentation using marine seaweed *Acanthophora spicifera* (Vahl.) Borgesen as a cheap substrate. **Bioenergetics: open access**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 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.

VENKATACHALAM, M. et al. Salinity and Temperature Influence Growth and Pigment Production in the Marine-Derived Fungal Strain *Talaromyces albobiverticillius* 30548. **Microorganisms**, v. 7, n. 10, Jan. 2019.

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

VOSER, T. M.; CAMPBELL, M. D.; CARROLL, A. R. How different are marine microbial natural products compared to their terrestrial counterparts? **Natural Product Reports**, v. 39, p. 7-19, 2022.

WALI, A. F. et al. Natural products against cancer: Review on phytochemicals from marine sources in preventing câncer. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, p. 767-777, 2019.

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, C. et al. Investigating the Function of Cryptic Cytochalasan Cytochrome

P450 Monooxygenases Using Combinatorial Biosynthesis. **Organic Letters**, v. 21, 2019.

WENDT, I. et al. Resurrection and emendation of the Hypoxylaceae, recognised from a multigene phylogeny of the Xylariales. **Mycological Progress**, v. 17, p. 115-154, 2018.

XIA, Y. et al. The Multifunctions and Future Prospects of Endophytes and Their Metabolites in Plant Disease Management. **Microorganisms**, v. 10, 2022.

XIE, C. L. et al. Discovery of andrastones from the deep-sea-derived *Penicillium allii-sativi* MCCC 3A00580 by OSMAC strategy. **Bioorganic Chemistry**, v. 108, Jan., 2021.

YAMADA, T. et al. Sterepinic Acids A-C, New Carboxylic Acids Produced by a Marine Alga-Derived Fungus. **Molecules**, v. 23, n. 6, p. 1-10, 2018.

YUYAMA, K. T. et al. Cytochalasans Act as Inhibitors of Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus*. **Biomolecules**, v. 8, n. 4, 2018.

YU, X. et al. Induction of ambuic acid derivatives by the endophytic fungus *Pestalotiopsis lespedezae* through an OSMAC approach. **Tetrahedron**, v. 79, Dez. 2020.

ZHANG, Y.; XIE, W. P. Evaluation of HPLC-DAD Selectivity by Discrimination Power and Mean List Length for the Identification of Unknown Drugs. **Chromatographia**, v. 77, p. 1613-1622, Set. 2014.